

**WILLIAM AKIRA LIMA SHIMIZU**

**Efeitos da administração aguda de glicose após atividade física sobre o comportamento relacionado à ansiedade, memória e neuroplasticidade**

**São Paulo**

**2014**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

**WILLIAM AKIRA LIMA SHIMIZU**

**Efeitos da administração aguda de glicose após atividade física sobre o comportamento relacionado à ansiedade, memória e neuroplasticidade**

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Comportamento.

Área de Concentração:  
Neurociências e Comportamento

Orientadora:  
Profa. Dra. Michele Schultz

**São Paulo  
2014**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação  
Biblioteca Dante Moreira Leite  
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Shimizu, William Akira Lima.

Efeitos da administração aguda de glicose após atividade física sobre o comportamento relacionado à ansiedade, memória e neuroplasticidade / William Akira Lima Shimizu; orientadora Michele Schultz Ramos de Andrade. -- São Paulo, 2014.

45 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Atividade Motora 2. Memória 3. Ansiedade 4. Plasticidade neuronal 5. Metabolismo energético 6. Apoptose 7. Neuroglia I. Título.

GV461

Dedico ao Sr. Tomio Shimizu (*em memória*), grande homem da minha vida e meu pai, que abriu mão do seu presente comigo para me proporcionar um futuro melhor...

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos vão, inicialmente, para as duas pessoas mais importantes da minha vida, Henrique Faleiros e Mayara Shimizu. Vocês sempre me fizeram ver que o amor é a essência do propósito da vida. Vocês são meu equilíbrio, meu riso e meu colo. Sempre me fazem sentir a pessoa mais especial no mundo... O amor que sinto é incondicional.

Talvez Edna Uematsu nem saiba, mas ela é a minha grande inspiração. Boa parte de quem sou hoje devo muito a você e nossas conversas. Dizem que as pessoas que mais nos influenciam são aquelas que a cada momento plantam na nossa mente algo que nos faz refletir... Você me deu a direção para esse propósito e sempre acreditou em mim. Por tudo, serei eternamente grato.

Agradeço ao incentivo financeiro concedido pela CNPq e FAPESP.

Por último, mas não menos importante... Michele Schultz, minha grande mestre e parceira nessa aventura. Estar com você é uma das experiências mais ricas que alguém pode ter! Agradeço por toda a mudança que você fez na minha vida... Sempre, sempre e sempre aprendo com você. Te acho excelente. Com muito carinho e uma admiração gigante, você é o meu exemplo.

Todos proporcionam os melhores momentos da minha vida.

Obrigado por existirem e por me moverem.

Com amor.

*"Quem passou pela vida em branca nuvem  
E em plácido repouso adormeceu...  
Quem não sentiu o frio da desgraça,  
Quem passou pela vida e não sofreu,  
Foi espectro de homem, não foi homem.  
Só passou pela vida, não viveu."*

Ilusões da vida de Francisco Otaviano.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxo esquemático da influência da atividade física e da glicose sobre o neurometabolismo e suas consequências.	6
Figura 2.	Esquema programático do regime de treinamento e administração de xarope de glicose.	10
Figura 3.	Análise intragrupo da pesagem dos grupos pré e pós programa de atividades	15
Figura 4.	Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre o peso	16
Figura 5.	Controle diário do consumo de ração pelos grupos experimentais.	17
Figura 6.	Controle diário do consumo de água pelos grupos experimentais	18
Figura 7.	Controle diário do consumo de água 1½h após período de treinamento	18
Figura 8.	Análise intragrupo das latências à exposição na caixa de esQUIVA passiva no treino e teste após 48h.	19
Figura 9.	Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre a memória aversiva.	20
Figura 10.	Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre o comportamento relacionado à ansiedade.	21
Figura 11.	Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre o comportamento de risco.	22
Figura 12.	Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre a atividade locomotora	22
Figura 13.	Imagens de imunohistoquímica ilustrando pontos de apoptose e os núcleos celulares na região basolateral da amígdala	23
Figura 14.	Imagens de imunohistoquímica com fluorescência ilustrando expressão de IGF-1 perfil celular astrocitário na região basolateral da amígdala	24

## RESUMO

O estímulo pela atividade física pode mediar a ação do IGF-1 sobre a indução à neuroplasticidade, modular o neurometabolismo e influenciar a memória e a ansiedade. Entretanto, a atividade física também pode induzir à hipoglicemia, condição que pode ser revertida com a administração de rápida fonte de glicose provinda da alimentação. Assim como a atividade física, a dieta exerce forte influência nos processos moleculares, celulares e comportamentais e estudos analisando o efeito exclusivo de dietas ricas em açúcar revelam prejuízos sobre a memória e favorecimento à ansiedade. Portanto, analisar os efeitos moleculares e comportamentais num protocolo que contemple atividade física e dieta não exclusiva de xarope de milho podem corroborar ou discordar das pesquisas que analisam os mecanismos de uma dieta exclusiva. O objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos da administração de xarope de glicose do milho a 15% após atividade física aguda forçada em esteira sobre a memória, a ansiedade, a atividade locomotora, a neuroplasticidade e a morte celular de camundongos machos. Foram formados 4 grupos, sendo sedentário controle (SED), treinado controle (TRE), sedentário administrado (SED15%) e treinado administrado (TRE15%). O regime de treinamento consistiu em atividade física forçada em esteira por 40 min a 0,7km/h por 5 dias. A administração de 15% do xarope de milho se deu sempre após atividade física por período de 1½h. Para avaliação de memória aversiva foi utilizado a esQUIVA passiva no 4º e 6º dias e para avaliação do comportamento relacionado à ansiedade foi utilizado o labirinto em cruz elevado. Para análise de morte celular foi utilizado kit TUNEL que identifica fragmentação do DNA. Os dados comportamentais foram avaliados estatisticamente através do software Prisma e os demais qualitativamente. Houve influência da administração sobre o menor consumo para o grupo TRE15%, prejuízos à memória aversiva para ambos os grupos, indução ao comportamento relacionado à ansiedade nos animais do grupo SED15%, maior exposição às situações de risco para o grupo TRE15%, incidência considerável e difusa de morte celular na amígdala e importante expressão de IGF-1 nos grupos. A administração de 15% de xarope de glicose do milho posterior à exposição na esteira desencadearam importante expressão de IGF-1, mas não suficiente para proporcionar neuroproteção causando consideráveis e difusos pontos de morte celular na amígdala, prejuízos à memória aversiva, medo induzindo comportamento relacionado à ansiedade para SED15% e significativa maior exposição às situações de risco para TRE15% após protocolo agudo de 5 dias.

*Palavras-chave:* atividade física; memória; ansiedade; neurometabolismo; neuroplasticidade; apoptose, neuroglia.



## ABSTRACT

The stimulation by physical activity can mediate the action of IGF-1 on the induction of neuroplasticity, modulating neural energetic metabolism and influencing memory and anxiety behavior. However, physical activity can also lead to hypoglycemia, a condition that can be reversed by the administration of glucose. As physical activity, diet has a strong influence on molecular, cellular and behavioral processes and studies analyzing exclusively the effects of high-sugar diets reveal prejudices on memory and favors anxiety. Therefore, analyze the molecular and behavioral effects in a protocol that includes physical activity and non-exclusive diet of corn syrup can corroborate or disagree with the studies that analyze the mechanisms of an exclusive diet. The aim of this work was to investigate the effects of 15% of glucose corn-syrup administration after treadmill training on memory, anxiety, neuronal plasticity and cell death in male mice. Sedentary control (SED), Trained control (TRE), Sedentary administered (SED15%) and Trained administered (TRE15%) were the 4 groups formed randomly. The training regimen consisted on a treadmill training for 40 min at 0.7km/h during 5 days. The administration of the 15% corn syrup were always given after a 1½h period after physical activity. For evaluation of aversive memory the passive avoidance was used in day 4 and day 6 and for assessment of anxiety-related behavior was used the elevated plus maze. For cell death analysis TUNEL kit that identifies DNA fragmentation was used and immunohistochemistry was applied to analyze IGF-1 expression on amygdala. Behavioral data were evaluated statistically using Prisma software and cell death and IGF-1 expression were analyzed qualitatively. **Results:** There was influence of administration on the lowest feed consumption to TRE15%, losses to aversive memory for both groups, inducing behavior related to anxiety in SED15%, greater exposure to risk situations for TRE15%, considerable incidence and diffuse cell death the amygdala and important expression of IGF-1 in the groups. The administration of 15% glucose corn syrup after treadmill training triggered an important expression of IGF-1, but not enough to provide neuronal protection causing considerable and diffuse points of cell death in the amygdala, losses to aversive memory, fear inducing behavior related to anxiety to SED15% and significantly greater exposure to risk situations for TRE15% after acute protocol 5 days.

*Key-words:* physical activity; memory; anxiety; energetic metabolism; neuronal plasticity; apoptosis; neuroglia.

## INTRODUÇÃO

Os estilos de vida modernos têm favorecido hábitos que podem induzir ao sedentarismo e ao consumo de dietas inadequadas, situações que representam fatores de risco para o aparecimento de doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (GOMEZ-PINILLA, 2011). Tendo em vista que a incidência de transtornos relacionados à ansiedade e ao medo tem aumentado consideravelmente, compreender os processos biológicos envolvidos nas memórias aversivas é importante com intuito de contribuir para tratamentos efetivos dessas desordens comportamentais (MYERS & DAVIS, 2002).

A transição do sedentarismo para estilos de vida mais ativos e saudáveis com prática de atividade física e alimentação adequada vem sendo considerada importante para a neuroproteção, tanto para humanos quanto animais (CHURCHILL et al., 2002; COTMAN et al., 2007; MORA, 2013). Portanto, é importante encontrar estratégias que visem atenuar mecanismos que possam provocar danos neurodegenerativos ao sistema nervoso central (SNC) e facilitar condições que possam potencializar eventos relacionados à neuroproteção e neuroplasticidade (PIETRELLI et al., 2012).

Dentre os demais efeitos da atividade física sobre o SNC estão o incremento da responsividade neural e o aumento da demanda metabólica ocasionado pela estimulação de diversas áreas encefálicas (COTMAN et al., 2002; MONTENI et al., 2004). Nos modelos animais, a modalidade de atividade física em esteira é o recurso comumente utilizado que possibilita um regime de treino próximo ao dos humanos, permitindo correlação entre o estímulo e sua consequência (GARLAND et al., 2011).

Tais efeitos podem ser potenciais e efetivos nas regiões límbicas, áreas relacionadas à modulação de respostas emocionais como memória aversiva, assim como de comportamentos relacionados ansiedade, medo e depressão (AMUNTS et al., 2005). A análise da consequência do estímulo pela atividade física pode ser inferida pela avaliação do comportamento, sendo a esQUIVA passiva um recurso utilizado para estudar processos de memória aversiva no qual o animal associa o contexto do ambiente não aversivo ao choque nas patas que poderá produzir uma resposta condicionada de aumento de latência no ambiente aversivo (IZQUIERDO et al., 1999) e o comportamento

relacionado à ansiedade é analisado pela exposição do animal a um ambiente novo, como o labirinto em cruz elevado, que pode evocar comportamentos relacionados ao medo ou respostas defensivas, condição semelhante aos transtornos de ansiedade (BLANCHARD et al., 2001).

Portanto, pelo estímulo da atividade física podem ocorrer respostas comportamentais que podem ser resultantes da capacidade das células neuronais em deflagrar cascatas celulares e moleculares, desencadeadas, entre outras, pela ação de fatores de crescimento como o fator de crescimento similar à insulina tipo 1 (“insulin-like growth factor-1”, IGF-1; LLORENS-MARTIN et al., 2008) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (“brain derived neurotrophic factor”, BDNF; COTMAN et al., 2007). Tais cascatas podem favorecer mudanças bioquímicas, funcionais e morfológicas, podendo representar importantes formas de neuroplasticidade e neuroproteção em regiões encefálicas, especialmente no hipocampo, amígdala, estriado e córtex sensorio motor, tais como: i) transmissão de informações pela *long-term potentiation* (LTP) que estabelece as conexões sinápticas e/ou modificações estruturais caracterizando potencial para aprimorar ou atingir novas funções, como estabelecimento da aprendizagem e na memória (MAREN, 1999; COTMAN et al., 2002; VAYNMAN et al., 2006; TREJO et al., 2007; TREJO ; et al., 2008; LLORENS-MARTIN et al., 2008); ii) minimização do declínio da atividade neuronal por regular a capacidade de neuromodulação de áreas relacionadas aos aspectos emocionais (CHEN, 2007); iii) controle do neurometabolismo frente a demanda dos processos intracelulares (SONNTAG et al. 2006; MATTSON, 2000) e; iv) atenuação de disfunções neurológicas em diferentes processos neurodegenerativos, bem como auxílio na recuperação funcional após um insulto (TREJO et al., 2002; CARRO et al., 2001, COTMAN et al., 2007)

A interação entre células neuronais e células glias é essencial para suporte, manutenção e potencialização das atividades celulares tornando mais evidente quando se trata de metabolismo energético para favorecer eventos relacionados à neuromodulação (DIENEL e HERTZ, 2001). A morfologia e a distribuição espacial dos astrócitos são recursos estratégicos e importantes que os tornam capazes de favorecer a função neuronal. Os pedúnculos astrocitários cobrem os vasos sanguíneos compondo a barreira

hematoencefálica e é onde localizam-se os transportadores de glicose 1 (“glucose transporters” I, GLUT1), responsáveis por permitir a entrada das moléculas de glicose dos capilares ao interior dos astrócitos (HARBER et al., 2006; MAGISTRETTI, 2006), processo intermediado pela insulina e IGF-1.

Uma das consequências da estimulação pela atividade física é o incremento da atividade neural e metabólica, repercutindo em acréscimo sobre a demanda energética (COOPER et al., 2002; MATTSON et al., 2004; HITZE et al., 2010). Nesse sentido, a mitocôndria desempenha papel fundamental para sinalizar sua biogênese e o favorecer o metabolismo energético que pode regular eventos relacionados à neuroplasticidade (CHENG et al., 2010), já que um dos mecanismos para a plasticidade sináptica, favorecida pelo BDNF e pelo IGF-1, depende do incremento da atividade mitocondrial decorrente da demanda energética que pode induzir a expressão de genes mitocondriais (MATTSON et al., 2004; BURKHALER et al., 2003; WILLIAMS et al., 1998).

O incremento da atividade neurometabólica em resposta à atividade física pode induzir à hipoglicemia tornando escassa a glicose circulante e as reservas astrocíticas de glicogênio, que provém neuroproteção à condição de baixa de energia, são utilizadas (HERZOG et al., 2008). O déficit neurometabólico pode indicar alteração na atividade da mitocôndria com a possibilidade de formação de radicais livres de oxigênio (MATTSON et al., 2008) contribuindo para danos mitocondriais importantes como aumento da permeabilidade e ruptura da membrana celular com liberação do citocromo-c para o citoplasma que culminará em processos que induzirão a célula à morte (RIEDL et al., 2007) e que poderão repercutir em prejuízos sobre a plasticidade sináptica e memória (MASSAAD et al., 2011) e também indução à neuroglicopenia (KLEMENT et al., 2010).

Tais eventos podem influenciar o comportamento e podem ser revertidos ao reestabelecer adequadamente a via glicolítica de suprimento energético (HITZE et al., 2010; KLEMENT et al., 2010). Como forma de neuroproteção ao episódio prévio de déficit metabólico induzido pela hipoglicemia, há uma supercompensação de glicogênio nas reservas astrocíticas, prevenindo novos episódios de escassez energética (MATSUI et al., 2011).

Há evidências apontando a influência das dietas sobre a função encefálica, podendo proporcionar incremento de memória e influência sobre aspectos comportamentais além de favorecer condições neuroprotetoras, especialmente suplementação nutricional a base de ácidos graxos essenciais e algumas especiarias (GOMEZ-PINILLA, 2008; WU et al., 2008). Outras evidências também apontam prejuízos neurológicos e comportamentais quando as fontes dietéticas contém alto teor de açúcar e gorduras encontrados em xaropes de glicose, refrigerantes e alimentos quimicamente processados (CAO et al., 2007; STRANAHAN et al., 2008; AGRAWAL et al., 2012). Tais efeitos podem ter diferentes repercussões quando associados à atividade física

A ingesta de alimentos ricos em açúcar e gordura é um dos principais desencadeadores de desarranjos metabólicos que predispõe a doenças como a diabetes do tipo 2, obesidade e, possivelmente, doença de Alzheimer (MOREIRA, 2013). Isso se deve a progressiva alteração na sinalização e ação da insulina e expressão de IGF-1 no SNC que culminará no comprometimento do metabolismo energético, comunicação celular e prejuízos cognitivos (MOREIRA, 2013).

Para o SNC, a exposição a dietas com alto teor de açúcar induz à rápida resistência à insulina que pode deflagrar anormalidade no funcionamento mitocondrial e, conseqüentemente, na produção de energia; comprometimento à sinalização, à plasticidade e à função sináptica; proliferação exacerbada de amiloidose e degeração neuronal, culminando em déficits cognitivos e à memória (CARVALHO et al., 2012; JURDAK et al., 2008; STRANAHAN et al., 2008; MIELKE et al., 2005; CAO et al., 2007).

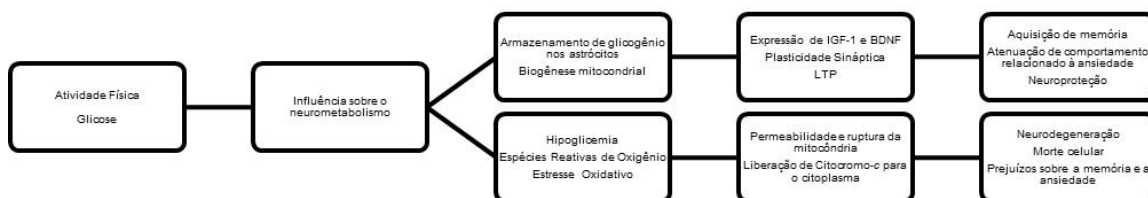


Figura 1. Fluxo esquemático da influência da atividade física e da glicose sobre o neurometabolismo e suas conseqüências.

Em situações de dietas ricas em gordura e alto teor de açúcar, a atividade física tem capacidade de reverter os efeitos disfuncionais provocados pela dieta sobre a plasticidade sináptica, balanço energético e a aprendizagem (MOLTENI et al, 2004). Quando há redução da frequência de atividade física, há uma potencialização dos efeitos deletérios da dieta inadequada sobre a função encefálica e a neuroplasticidade aumentando o risco de disfunções neurológicas e desordens comportamentais (GOMEZ-PINILLA & GOMEZ, 2001). Portanto, o SNC é suscetível aos estímulos da atividade física e da alimentação que podem influenciar sobre a aprendizagem e desencadear modificações moleculares relacionados à neuroplasticidade e ao neurometabolismo (GOMEZ-PINILLA, 2011).

Com intuito de elucidar os mecanismos moleculares e celulares deflagrados pela dieta, os métodos empregados nas pesquisas baseiam-se na administração exclusiva das dietas com alto teor de açúcar, no qual difere do comportamento alimentar rotineiro da sociedade que ingere além desta, outras fontes de alimento. Tendo em vista que o cotidiano da sociedade atual tende a um estilo de vida menos ativo, mais estressante e exposta às dietas inadequadas, analisar os efeitos sobre SNC em uma situação que simule a descrita acima, é importante para compreender alguns mecanismos moleculares deflagrados e estratégias comportamentais emitidas. Assim, o presente trabalho investigou os efeitos da associação de atividade física e dieta com xarope do milho diluído em água sobre o comportamento relacionado à ansiedade, aprendizado e neuroplasticidade.

## OBJETIVOS

Verificar os efeitos da administração de xarope de glicose do milho a 15% após atividade física aguda forçada em esteira sobre a memória, a ansiedade, a atividade locomotora, a neuroplasticidade e a morte celular de camundongos machos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se há ações combinadas da administração do xarope da glicose do milho e da atividade física sobre:

- A memória aversiva;
- O comportamento relacionado à ansiedade;
- O comportamento locomotor;
- Processos de neuroplasticidade e neurometabolismo através da análise de marcação de IGF-1 na amígdala;
- Processos apoptóticos na amígdala.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 (3 semanas de idade) provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP. Os animais foram mantidos sob condições constantes de temperatura e umidade, com ciclo claro/escuro regular e acesso livre à ração e à água de acordo com a Lei Arouca de 2008. O desenvolvimento da pesquisa foi realizado no Biotério de Experimentação do Laboratório de Biomedicina no Centro Multidisciplinar de Pesquisa da EACH/USP e deu-se início após aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação (002/2013).

### Habituação

Os animais foram exclusivamente manipulados no período de atividade do ciclo (fase escura), mantidos em estante ventilada no biotério com controle de temperatura do ambiente a 21-22°C e acomodados em caixas com até cinco animais.

### Descrição dos grupos

Os camundongos foram randomicamente distribuídos para formação dos grupos sedentários e treinados, conforme descrição abaixo:

<b>Grupo</b>	<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
Controle	a) Sedentário (SED)	Exposição à esteira parada e água comum
	b) Treinado (TRE)	Treinamento em esteira e água comum
Administração	a) Sedentário (SED15%)	Exposição à esteira parada e administração de água com xarope de glicose
	b) Treinado (TRE15%)	Treinamento em esteira e administração de água com xarope de glicose



## Adaptação ao treinamento e à administração

Após formação dos grupos experimentais, houve um período de adaptação de 5 dias ao ambiente de atividade física que foi realizada na semana prévia ao treinamento.

Os animais foram mantidos em jejum de ração e água por 45 minutos antes da exposição à esteira e os grupos tratados receberam água com xarope de milho 5% por 45 minutos depois do treinamento, diferente dos grupos controle que tiveram livre acesso à ração e água. Neste período, houve acréscimo gradual de velocidade da esteira de 0,3km/h para 0,7km/h com duração de 40 minutos. Os animais sedentários permaneceram por 10 minutos em esteira desligada.

### Programa de Atividades

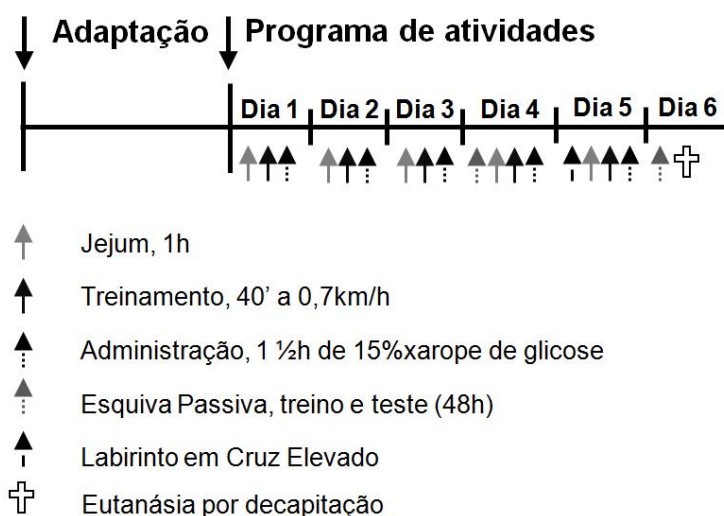


Figura 2. Esquema programático do regime de treinamento e administração de xarope de glicose.

O peso corporal dos animais foi verificado antes e no final do protocolo experimental e o foi realizado cálculo do ganho ponderal.

Ao longo do período do procedimento experimental, os consumos diários de ração e água foram registrados.

## **Protocolo de treinamento**

Os grupos que realizaram atividade física foram submetidos ao treino com velocidade de 0,7km/h pelo tempo de 40 minutos ou distância de 0,50km diários em esteira automatizada adaptada, seguindo Trejo e colaboradores (2008), por um período de 5 dias.

Antes da sessão de treinamento, os grupos foram mantidos em jejum por 1h. Durante a atividade física, nenhum animal foi submetido à punição por choque elétrico na calda ou qualquer recurso estressor para estimular ou correr. Quando necessário, foi apresentada pelota de ração ou dado estímulo tátil gentil na calda. Em caso de exaustão, ou seja, quando não houvesse resposta após os estímulos, o animal era retirado da atividade e posto na caixa correspondente a seu grupo até o término da sessão e exposto novamente na próxima sessão.

Os grupos sedentários não realizaram atividade física, mas permaneceram na esteira automatizada parada por 10 minutos diários para terem os mesmos estímulos ambientais.

## **Protocolo de administração**

A água recebeu adição de xarope de glicose do milho comercialmente vendida (Glucose do milho, Karo®). O xarope foi diluído a 15% em água filtrada. A água era trocada todos os dias.

A duração da administração ocorreu por 1h ½ sempre após a exposição à esteira, seguida de dieta convencional (acesso a ração e a água *ad libitum*). Os grupos controles receberam água simples.

## **Avaliação de memória, comportamento relacionado à ansiedade, comportamento de risco e atividade locomotora**

### *i. Memória Aversiva*

Para avaliar influência da administração e/ou treinamento sobre a memória, foi realizado o treino no aparato no 4º dia do programa e o teste de memória aversiva 48h, no 6º dia (Ugo Basile, Comerio, Itália). A tarefa consiste

na inibição do comportamento inato de preferência a ambientes escuros utilizando um estímulo aversivo que permite comparação posterior e inferindo memória. O teste consiste na exposição única por até 3 minutos no qual cada animal é posto no ambiente claro adjacente ao ambiente escuro com grade eletrificada. Ao entrar no compartimento escuro, a resposta é punida com choque de 0,2mA por 2 segundos nas patas, conforme descrito por Graham e Buccafusco (2001). O tempo de latência no ambiente claro é registrado e utilizado para as inferências de aprendizado associada à resposta aversiva recebida no ambiente escuro.

## ii. *Ansiedade e Atividade Locomotora*

A avaliação do comportamento relacionado à ansiedade e atividade locomotora foi realizada utilizando o Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Trata-se de uma estrutura elevada de 40cm com 2 braços abertos (BA) de 5x40cm e 2 braços fechados (BF) de 5x40x20cm. O teste consiste em avaliar respostas invocadas a partir da propensão do animal para ambientes fechados e escuros (preferência) e o medo incondicional de altura e espaços abertos (esquiva) durante 5 minutos.

Os parâmetros críticos para análise do comportamento relacionado à ansiedade no LCE são:

$$\% \text{ de entradas nos BA: } \frac{n^{\circ}\text{BA}}{n^{\circ}\text{BA}+n^{\circ}\text{BF}} \times 100$$

$$\% \text{ de tempo nos BA: } \frac{t\text{BA}}{t\text{BA}+t\text{BF}} \times 100$$

Essas medidas são inversas à ansiedade, portanto quanto maior o índice, menor a emissão de comportamento relacionado à ansiedade.

Outra mensuração etológica foi a avaliação do comportamento de risco com a frequência de 'head dips' que consiste no movimento colocar a cabeça sentido ao chão nos braços abertos indicando maior exposição e riscos, seguindo protocolo de Walf e Frye (2007).

A atividade locomotora foi avaliada pelo cálculo do número de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas nos braços, seguindo protocolo de Walf e Frye (2007).

### **Eutanásia dos animais**

Após o período de treinamento, os animais foram profundamente anestesiados via intraperitoneal com uma combinação de cloridrato de cetamina (1.50 ul/mg) e cloridrato de xilazina (0.75 ul/mg). Os animais foram submetidos à eutanásia através de decapitação. Os encéfalos foram extraídos, imediatamente congelados com dimetilbutano e mantidos em freezer -80°C até processamento.

### **Processamento tecidual**

#### *Técnica de detecção de antígeno por Imunohistoquímica*

Os encéfalos foram seccionados em 20 µm de espessura em criostato a -17°C. Para os procedimentos imunohistológicos, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 1h e então fixadas com 4% de paraformaldeído por 30 minutos. As secções foram lavadas 3x em PBS por 5 min e feito o primeiro bloqueio com 5% de leite por 1h. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 0.3% de peróxido de hidrogênio em PBS por 15 min sendo lavadas por 2x após em PBS por 5 minutos. Para bloqueio de regiões não específicas, utilizou-se 10% da albumina do soro bovino em 0,1% de triton por 1h. Utilizou-se o anticorpo primário anti-IGF1 (1:25, Santa Cruz) diluído na mesma solução de soro bovino, overnight, a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente FITC anti-rabbit (1:100).

#### *Técnica para análise de morte celular por TUNEL*

Através da fragmentação do DNA, marca distintiva da apoptose ou morte celular programada, uma enzima conhecida como *terminal deoxynucleotidyl*

*transferase (TdT)* identifica fendas ou pontos de fragmentação no DNA. Para verificar processos de morte celular, os tecidos seccionados foram fixados com 4% de paraformaldeído em PBS por 20 minutos a 15-25°C e depois lavados em PBS por 30 minutos. As lâminas foram incubadas em solução permeabilizadora de 0,1% triton x-100 em 0,1% de citrato de sódio por 2 minutos em gelo e depois lavados duas vezes em PBS. Após fixar e permeabilizar, as amostras receberam a mistura de TUNEL conforme instruções do fabricante (Cell Death Detection Kit, Fluorescein, ROCHE) por 60 minutos a 37°C no escuro. Para preservação da fluorescência dos tecidos tratados utilizou-se um meio de montagem aquoso enriquecido com DAPI que é um contrastante para DNA (Fluoroshield com DAPI, Sigma) e permite a visualização dos núcleos celulares.

### **Análises Estatísticas**

Os dados coletados foram analisados usando o programa estatístico *GraphPad Prism* (versão 5.0). Inicialmente, verificou-se a frequência de distribuição das amostras e, pelas características dos dados que considerou ausência de distribuição normal e quantidade amostral pequena, foram utilizadas análises não paramétricas.

Os valores de retenção de latência para a esquiva passiva foram apresentados na forma estatística descritiva de medianas  $\pm$  interquartis e para análise intragrupo foi utilizado teste de Wilcoxon para medidas pareadas não paramétricas. Todos os demais valores foram expressos por médias  $\pm$  erro padrão e foi utilizada análise intergrupos pelo teste Mann Whitney para medidas independentes não-pareadas.

Análises de variância não-paramétricas pelo teste de Kruskal-Wallis seguindo pelo pós-teste de Dunn foram utilizadas para comparação de todos os pares de colunas com nível de significância  $\alpha=0.05$  (95% de intervalo de confiança). Diferenças foram consideradas significantes se  $p<0,05$ .

Para análise de medidas repetidas foi utilizado Two-way ANOVA e pós-teste Bonferroni para comparar médias replicadas.

## RESULTADOS

### Treinamento e administração não influenciaram no peso

Não houve influência do treinamento e da administração sobre o de peso dos animais na análise intragrupo, figura 3 (SED,  $p=0,0781$ ; TRE,  $p=0,1309$ ; SED15%,  $p=0,4609$ ; TRE15%,  $p=0,1206$ ).

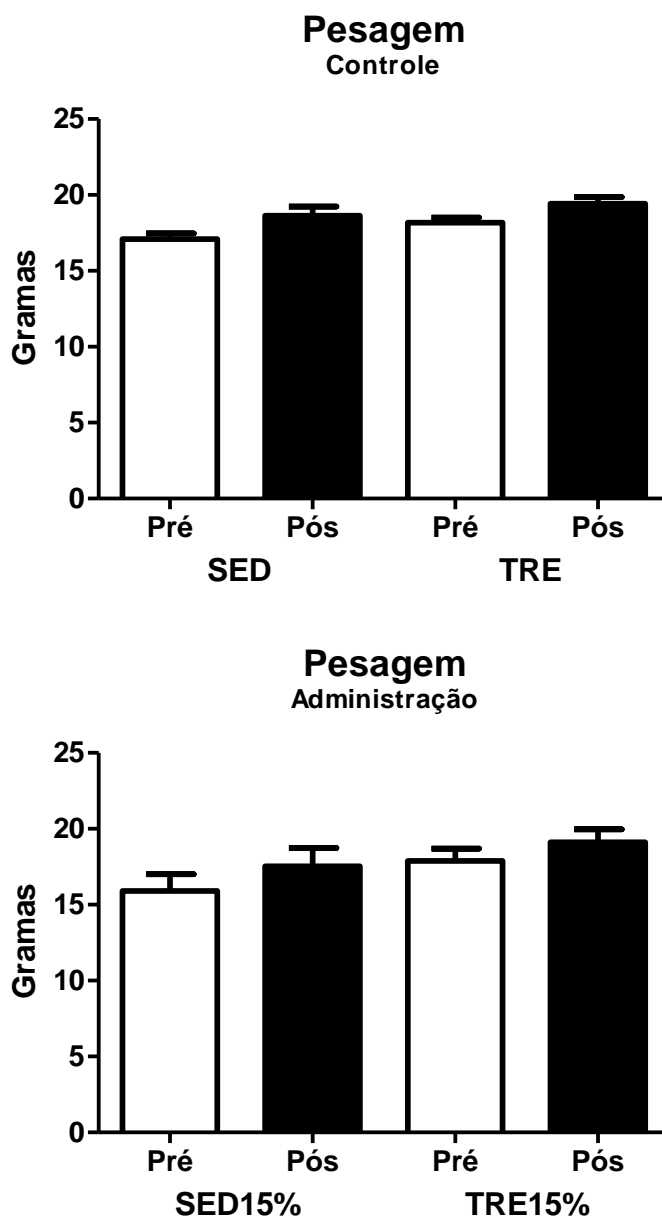
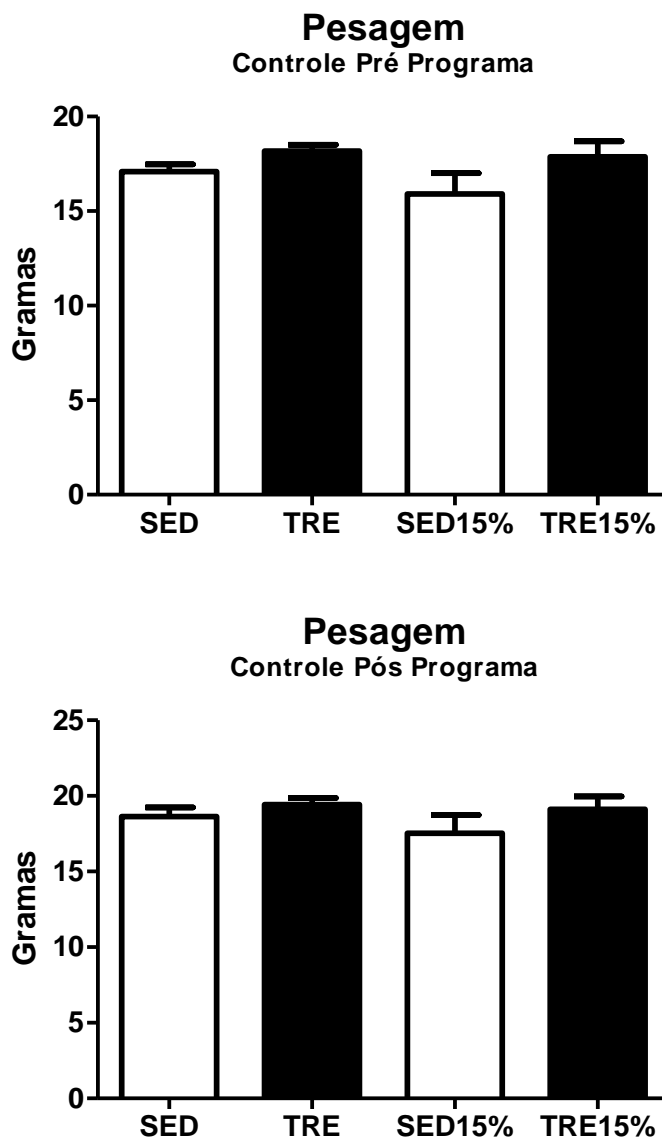


Figura 3. Análise intragrupo da pesagem dos grupos pré e pós programa de atividades. Valores expressos em  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Teste de Wilcoxon.

Na comparação entre os grupos não houve diferença sobre o peso nos grupos ( $p=0,2207$ ), conforme figura 4.



---

Figura 4. Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre o peso. Valores expressos em médias $\pm$ epm; Teste Kruskal-Wallis com pós-teste para comparações múltiplas Dunn's.

---

## Administração reduz quantidade de ingestão de ração

A análise de medidas repetidas sobre o controle diário de ingestão alimentar, mostrou que houve influência do tempo sobre os resultados ( $p=0,0119$ ;  $F=4,06$ ). Houve também efeito da administração, uma vez que o grupo TRE15% consumiu menos ração ao longo do período *versus* grupo SED ( $p<0,05$ ), efeito mais acentuando nos dias 3 e 4 ( $p<0,01$ ), conforme ilustrado na figura 5.

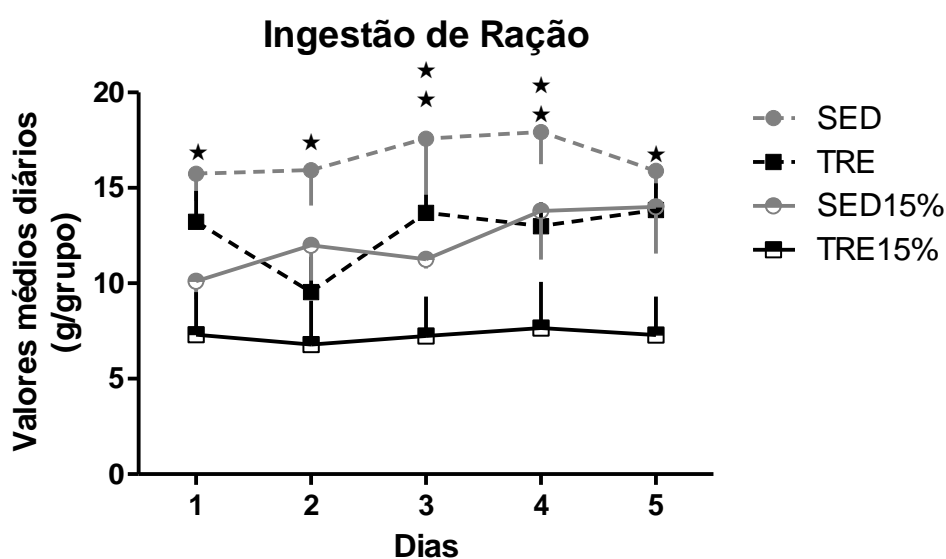


Figura 5. Controle diário do consumo de ração pelos grupos experimentais. Valores expressos em médias $\pm$ epm por grupo; (\*)  $p<0,05$  e (\*\*)  $p<0,001$ , ANOVA duas vias com pós-teste Bonferroni.

Em relação ao consumo de água, não houve diferenças entre os grupos ou influência do tempo da intervenção ( $F=1,60$ ,  $p=0,1539$ ; figura 6).



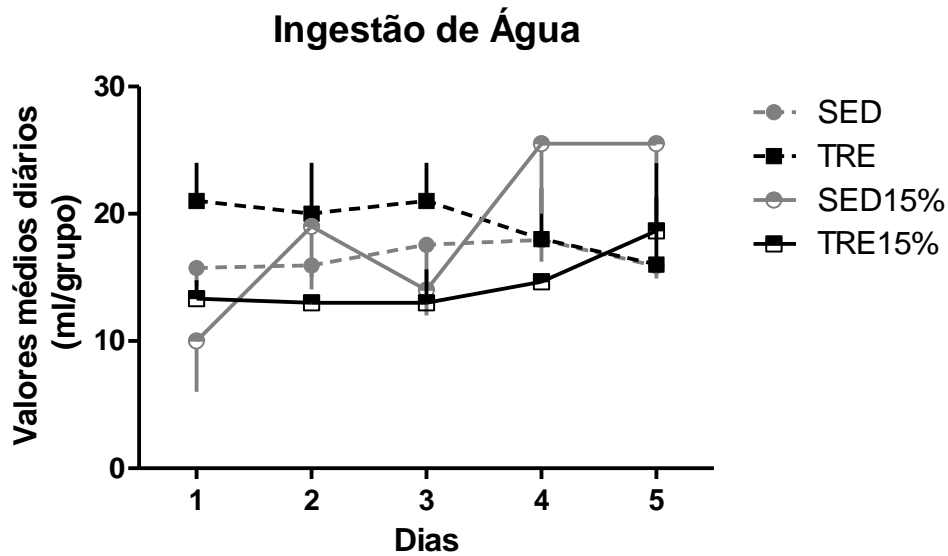


Figura 6. Controle diário do consumo de água pelos grupos experimentais. Valores expressos em médias±epm por grupo; sem diferenças entre os grupos, ANOVA duas vias com pós-teste Bonferroni.

Assim como para o consumo de água, não houve influência do tempo entre os grupos na ingestão de água comum e com xarope logo após o treinamento ( $F=0,67$ ,  $p=0,7632$ ; figura 7), mas nota-se maior consumo de água com xarope pelo grupo TRE15% no período.

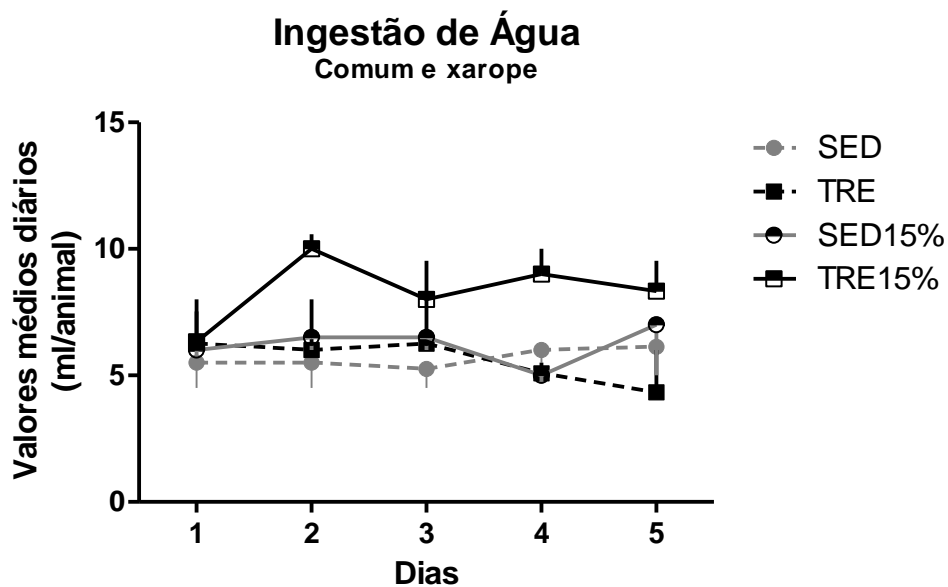
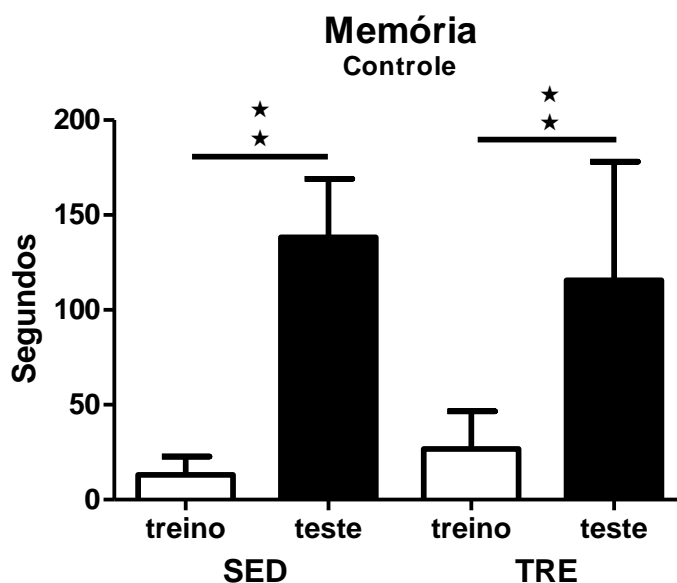


Figura 7. Controle diário do consumo de água 1½h após período de treinamento. Valores expressos em médias±epm por grupo; sem diferenças entre os grupos, ANOVA duas vias com pós-teste Bonferroni.

## Administração provoca prejuízos à memória aversiva

Para verificar os efeitos do treino na caixa de esQUIVA passiva, foram feitas análises treino *versus* teste. A figura 8 ilustra a influência da primeira exposição e as diferenças intragrupos no teste, revelando a efetividade do treino à tarefa, exceto para TRE15% (SED,  $p=0,0039$ ; TRE,  $p=0,0049$ ; SED15%,  $p=0,0117$ ; TRE15%,  $p=0,0654$ ).

a)



b)

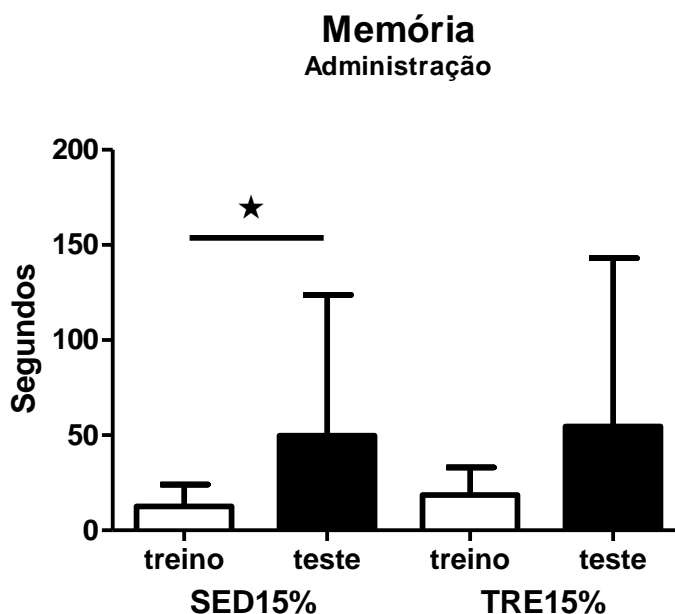
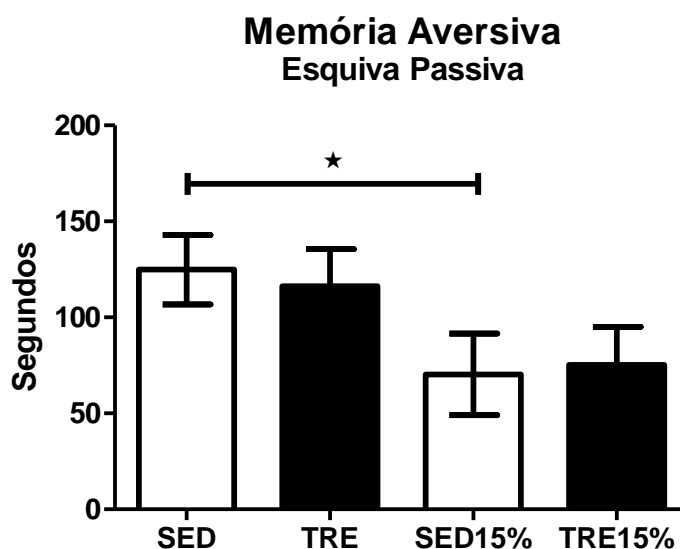


Figura 8. Análise intragrupo das latências à exposição na caixa de esQUIVA passiva no treino e teste após 48h. Valores expressos em medianas±interquartis. a) (\*\*)  $p<0,005$ , teste de Wilcoxon. b) (\*)  $p=0,01$ , teste de Wilcoxon.

A administração de glicose influenciou sobre a memória aversiva na comparação entre grupos, repercutindo em menor latência no teste e indicando prejuízo à memória na análise intergrupos SED *versus* SED15% ( $p=0,0463$ ; figura 9).



---

Figura 9. Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre a memória aversiva. Valores expressos em médias $\pm$ epm; (\*)  $p=0,0463$ , teste Kruskal-Wallis com pós-teste para comparações múltiplas Dunn's.

---

### **Administração associada ao treinamento potencializa redução do comportamento relacionado à ansiedade e exposição ao risco, mas não sobre a atividade locomotora**

Houve influência da administração associada ao treinamento, conforme ilustra a figura 10. O grupo TRE15% permaneceu mais tempo em braços abertos em comparação aos grupos TRE e SED15% ( $p<0,001$ ), efeito que pode estar relacionado ao comportamento não ansioso do grupo TRE15%. O grupo SED foi diferente de SED15% ( $p<0,05$ ), indicando que a administração induziu ao comportamento relacionado à ansiedade.

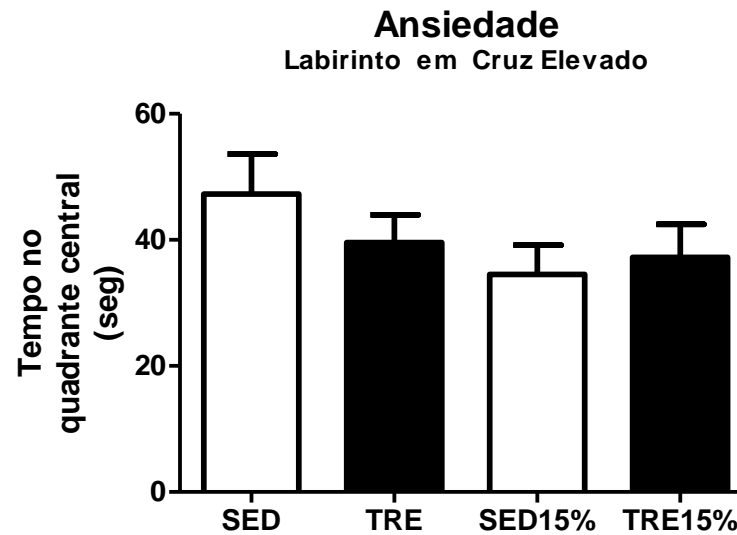
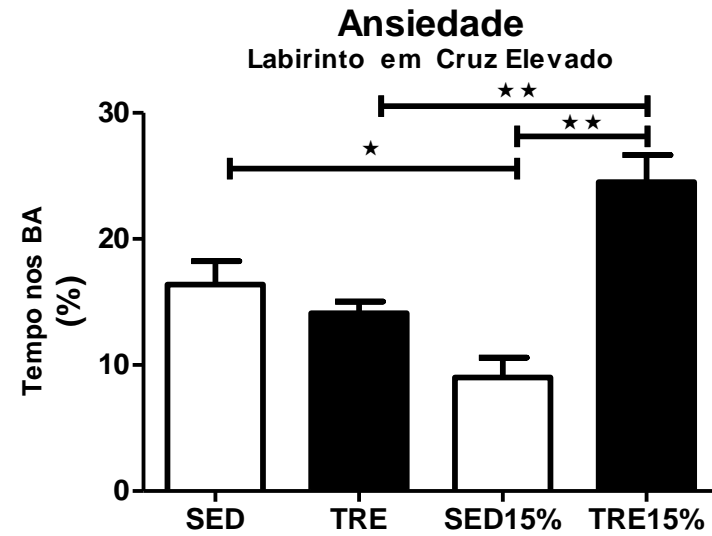
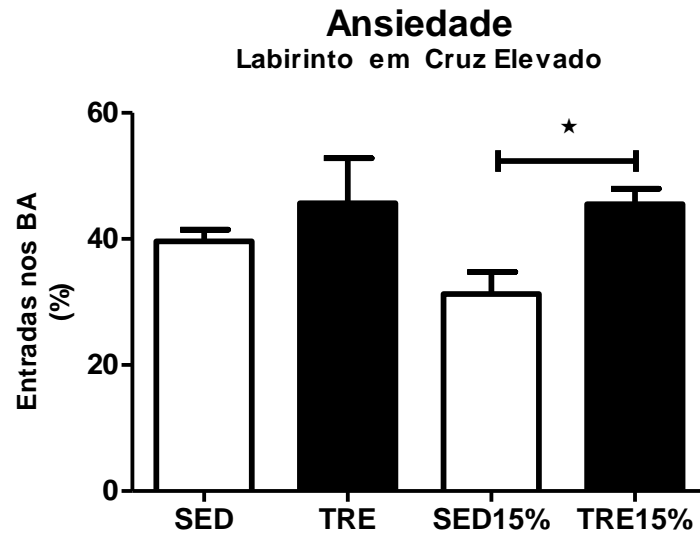
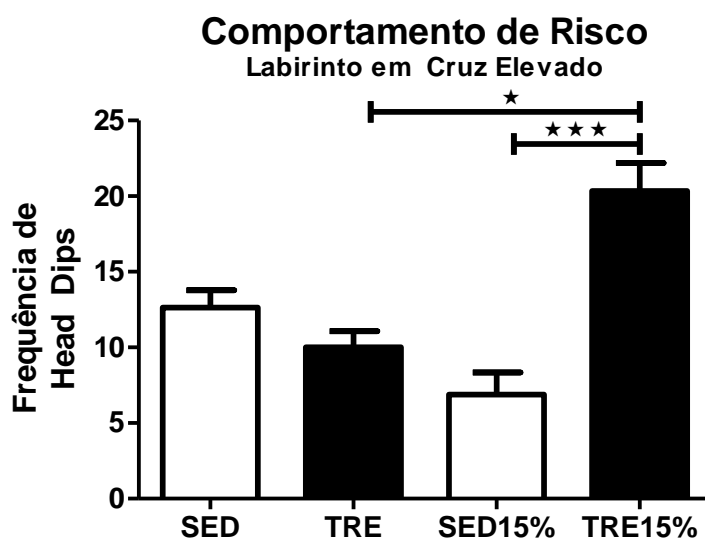


Figura 10. Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre o comportamento relacionado à ansiedade. Valores expressos em médias $\pm$ epm por grupo; (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$ , teste Kruskal-Wallis com pós-teste para comparações múltiplas Dunn's.

Houve também efeito da administração e do treinamento na avaliação do comportamento risco. O grupo TRE15% se expôs mais ao risco em relação ao grupo SED15% ( $p=0,0005$ ) e TRE ( $p<0,05$ ), conforme figura 11.

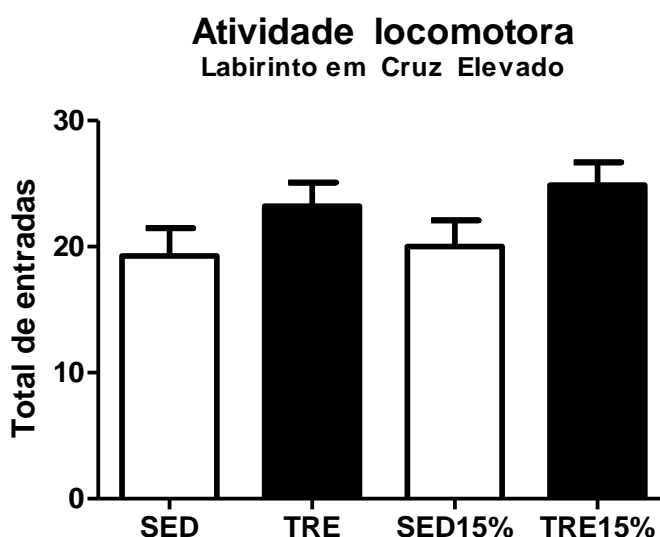


---

Figura 11. Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre o comportamento de risco. Valores expressos em médias±epm por grupo; (\*)  $p<0,05$ ; (\*\*\*)  $p=0,0005$ , teste Kruskal-Wallis com pós-teste para comparações múltiplas Dunn's.

---

Ao verificar o perfil da atividade locomotora, não houve diferença entre os grupos, conforme figura 12.



---

Figura 12. Comparação dos efeitos do treinamento e da administração sobre a atividade locomotora. Valores expressos em médias±epm por grupo; teste Kruskal-Wallis com teste para comparações múltiplas Dunn's.

---

### Administração associado ao treinamento deflagrou maiores pontos de fragmentação do DNA na amígdala

Há possibilidade da influência da administração de glicose sobre a incidência de pontos apoptóticos na região basolateral da amígdala com difusos pontos de fragmentação do DNA nos grupos administrados sendo qualitativamente mais expressivos nos animais do TRE15%.

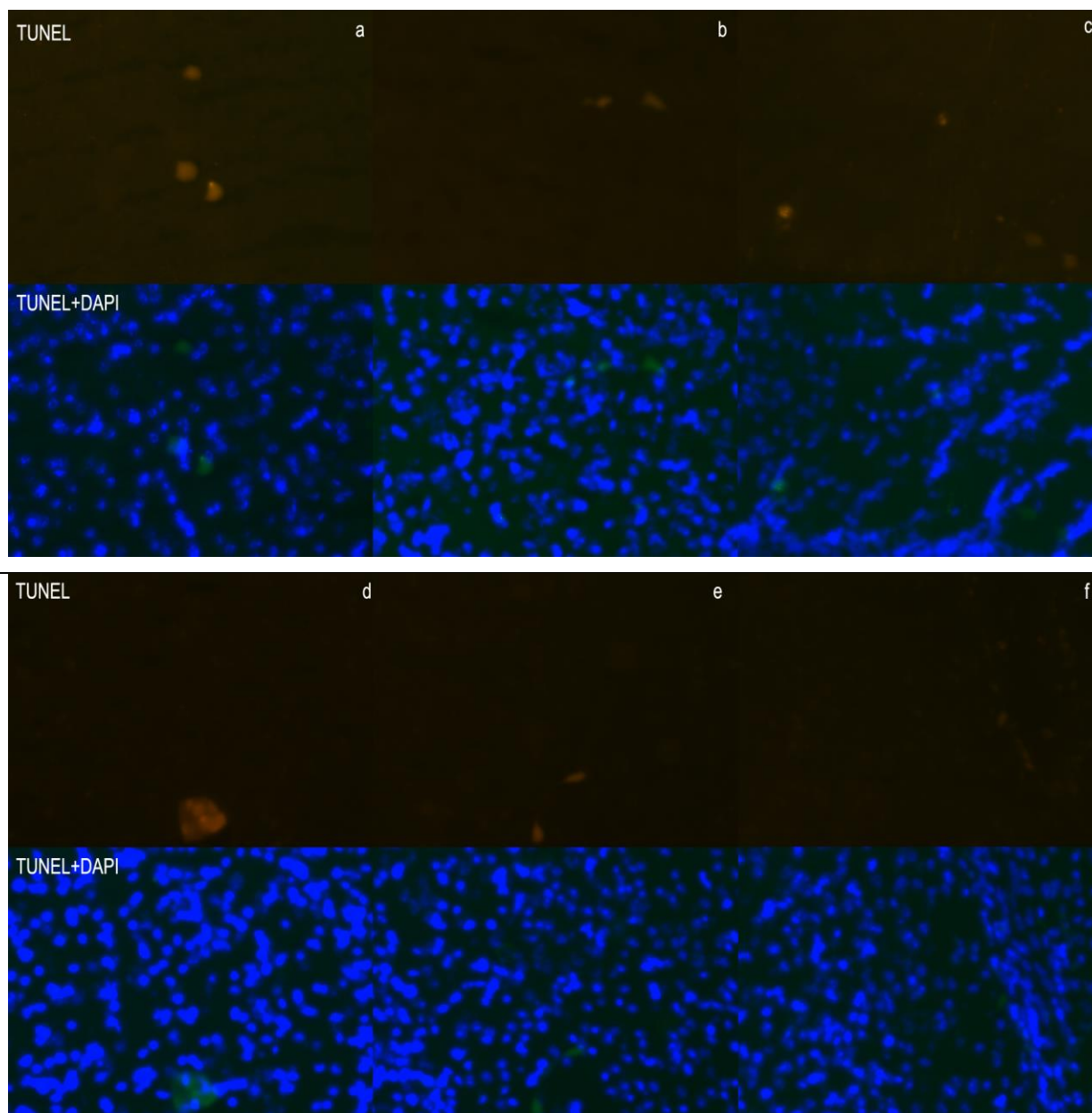


Figura 13. Imagens de imunohistoquímica ilustrando pontos de apoptose (TUNEL, vermelho) e os núcleos celulares (colocalizado abaixo com DAPI, azul) na região basolateral da amígdala, sendo: a) SED; b) TRE; c) SED15%; d;e;f) TRE15%.

### **Administração promove maior expressão de IGF-1 em células com perfil astrocitário da amígdala**

De forma qualitativa, nota-se efeito da administração sobre concentração de IGF-1 nos astrócitos amigdalares, conforme figura 14.

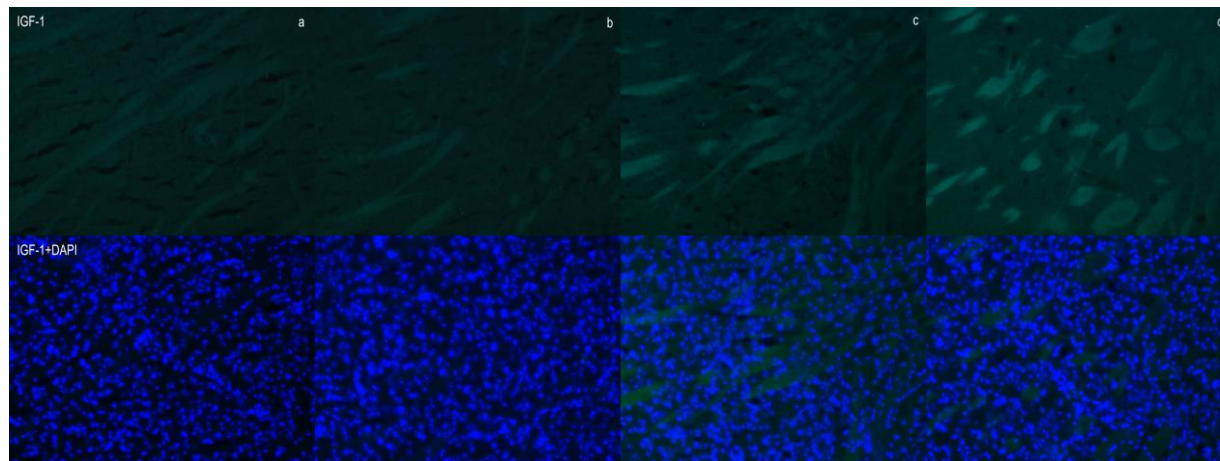


Figura 14. Imagens de imunohistoquímica com fluorescência ilustrando expressão de IGF-1 astrocitário (FITC, verde) na região basolateral da amígdala, sendo: a) SED; b) TRE; c) SED15%; d) TRE15%.

## DISCUSSÃO

O acesso a dietas contendo alto teor energético é um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças metabólicas, como hipertrigliceridemia, hiperinsulemia e hipertensão arterial sistêmica, contribuindo para obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e comprometimento cognitivo (NEWCOMER, 2007; TOUMILEHTO et al., 2001). Na contra via deste processo, evidências consideráveis dão suporte à ideia de que hábitos mais ativos de vida tenham respostas benéficas levando à atenuação, além de potencial para prevenir o início dessas condições clínicas, sendo a atividade física um importante complemento (TOUMILEHTO et al., 2001; COTMAN et al., 2007).

Neste estudo, o grupo para o qual foi administrado 15% de glicose ingeriu menos ração sem influenciar no peso corporal dos animais. Os demais grupos não apresentaram diferenças, entretanto, qualitativamente, nota-se que os grupos que receberam glicose apresentaram uma discreta tendência ao aumento da ingestão de água simples e estabilização na ingestão de água com xarope ao longo dos dias.

No estudo de Agrawal e Gomez-Pinilla (2012), ratos submetidos por 6 semanas à uma dieta a base de frutose a 15% e ômega 3 não apresentaram diferenças no peso corporal, ingestão de ração e água. Os animais tinham preferência por beber água com frutose a ingerir ração, sem diferenças sobre o consumo calórico entre os grupos. Neste estudo, assim como no estudo citado, os animais tratados não apresentaram diferença sobre peso e ingestão de água. Os dois estudos apresentam diferentes períodos e formas de administração das fontes com alto teor de açúcar. Neste estudo, os animais receberam glicose por tempo limitado, seguido por água simples, e, por essa razão, não seria possível avaliar preferência. Já no estudo de Agrawal e Pinilla, os animais receberam a frutose ininterruptamente por maior período de tempo.

Stranahan e colaboradores (2008) submeteram por 8 meses ratos à ração de rico teor calórico e água com suplementação de glicose diluída a 20%, resultando em redução da quantidade de consumo diário de ração em relação aos animais com dietas controles. Houve ainda aumento do consumo



diário de água com glicose quando comparado ao grupo que bebeu água simples. Ao converter em calorias o total ingerido por dia, revelou-se que os animais dos grupos das dietas com alto teor calórico apresentaram maior consumo calórico, atribuindo que o excesso de caloria possa ter resultado em prejuízos na aquisição de memória (STRANAHAN et al., 2008).

Assim como no estudo de Stranahan e colaboradores (2008), o grupo administrado TRE15% consumiu menos ração. O estudo de Stranahan, entretanto, fez análise da ingesta calórica, o que não fizemos, sendo uma limitação deste estudo para comparações. No mesmo estudo, os autores identificaram influência da administração de glicose sobre a memória aversiva, dado que corrobora nossos achados.

Estudos que utilizaram o estímulo pela atividade física e avaliação de retenção de memória aversiva pela esQUIVA passiva apresentam resultados divergentes. No estudo de Ke e colaboradores (2011) não houve diferença na retenção de memória entre os grupos após 24h, verificando que 4 semanas de atividade física em esteira não influenciaram sobre a memória aversiva de camundongos machos adultos e velhos transgênicos com mutação da proteína precursora amilóide e presenilina 1. Parcialmente semelhante, não houve influência da exposição à esteira nos grupos controles sobre a memória aversiva neste estudo.

Os efeitos da administração de glicose sobre a memória aversiva assemelham com os resultados do estudo de Chae e colaboradores (2009), no qual ratos Sprague-Dawley diabéticos e não diabéticos foram submetidos à atividade física em esteira por 6 semanas. Não houve diferença entre os grupos controles e o grupo diabético treinado sobre a retenção de memória aversiva após 72h. Já o grupo diabético sem atividade física apresentou prejuízos à memória com diferença para menor latência. Ainda assim, a atividade física regular aumentou os níveis de fatores tróficos na região hipocampal (CHAE et al., 2009). Há semelhanças entre os resultados do estudo de Chae e este estudo o qual o grupo diabético apresentou prejuízos à memória aversiva assim como os grupos que receberam glicose neste estudo e, além disso, os demais grupos não apresentaram incremento sobre a memória.

Diferente da condição de deficiência na ação da insulínica na diabetes tipo 2, a influência tanto do hormônio insulina quanto do IGF-1 sobre o metabolismo da glicose tem significativo impacto no funcionamento do SNC como sendo um mecanismo neuromodulador para os aspectos comportamentais, moleculares, celulares e bioquímicos influenciando a função de diversas áreas, tais como amígdala, hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral, importantes em processos cognitivos que incluem atenção, aprendizado e memória (DERAKHSHAN e TOTH, 2013; ABERG et al., 2006).

A glicose atenua ou previne a hipoglicemia que é uma situação crítica ao sensível e dependente SNC, além de favorecer a secreção de insulina (NYBO, 2003). Se administrada, a glicose pode gerar uma supercompensação astrocitária de glicogênio na região cortical e no hipocampo em até 24h após treinamento, além do aumento dos níveis basais de glicogênio ao longo período de atividade (MATSUI et al., 2012). Essa condição se justifica pelo metabolismo glicolítico mediado pelo IGF-1, fator de crescimento com potencial para contribuir na regulação de neurotransmissão e minimizar déficits de memória e de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão (SONNTAG et al. 2006; TREJO et al., 2002; CARRO et al., 2000; TREJO et al., 2008).

Nesse estudo, verificou-se possível efeito da administração de glicose sobre a expressão de IGF-1 em perfis celulares astrocitários na amígdala podendo indicar um possível efeito sobre o neurometabolismo, mas que pode não ter exercido influência sobre a memória aversiva, indo de encontro a estudos que concluíram que a administração intracerebroventricular de fatores insulínicos promoveu incremento de memória na esQUIVA passiva (BABRI et al., 2007). Portanto, os prejuízos à memória podem ser efeito da administração de glicose, mas por outro lado a considerável expressão de IGF-1 pode ser indicativa de mediação à supercompensação de glicogênio nas células com perfis astrocitários.

Houve influência da administração de glicose sobre o comportamento relacionado à ansiedade repercutindo em um significativo efeito ansiolítico para TRE15% que apresentou expressiva maior exposição ao risco em relação à SED15% com maior frequência e tempo nos braços abertos e quantidade de

'head dips'. Tais efeitos não foram identificados isoladamente nos grupos controle.

No estudo de Salim e colaboradores (2010), um mês de atividade física em esteira ou a administração de antioxidante preveniu a indução do estresse oxidativo pela aplicação intraperitoneal da droga L-buthionine-(S,R)-sulfoximine e contribuiu para um comportamento ansiolítico em ratos. Maiores índices de estresse oxidativo, principalmente em região do hipocampo e amígdala, parecem exercer influência sobre o comportamento relacionado à ansiedade.

Supostamente, a maior demanda de glicose durante a atividade física poderia justificar maior aporte à geração de energia para a célula, favorecendo suas funções e atenuando efeitos de processos oxidativos (CARRO et al., 2000; LYNCH et al., 2001). Entretanto, parece que a administração de glicose desencadeou processos apoptóticos na região da amígdala, mais acentuados no grupo que teve associado à atividade física. Ao compararmos os grupos que receberam glicose com seus controles, identificou-se mais perfis reativos no primeiro grupo, denotando influência da glicose sobre processos de morte celular. As consideráveis zonas de morte celular nos grupos administrados podem indicar uma consequência de estresse oxidativo decorrente do efeito agudo da administração de glicose e a exposição à esteira que resultaram nos comportamentos apresentados como indução à ansiedade, maior exposição ao risco e prejuízos à memória (MOREIRA et al., 2013; STRANAHAN et al., 2008).

A maior expressão de IGF-1 nos perfis celulares astrocitários nos grupos administrados pode ter sido consequência do incremento da capacidade neurometabólica através da ação da glicose na célula, mas, além disso, uma capacidade neuroprotetiva contra o mecanismo patogênico da oxidação. Assim, a via de ação do IGF-1 pode ter sido prioritária ao possível cenário de estresse oxidativo instaurado, podendo ter repercutido modificações comportamentais. De fato, a ação neuroprotetiva do IGF-1 favorece maior resiliência aos astrócitos para proteger os neurônios, que são mais sensíveis ao dano oxidativo, e, ao mesmo tempo, favorece suporte antioxidante (FERNANDES-FERNANDES et al., 2012; GENIS et al., 2014). Por conta dessa condição e favorecido pela ação do IGF-1, os astrócitos promovem incremento na atividade antioxidantes, como Cu/ZNSOD e MnSOD, e diminuição de

importantes indutores ao estresse oxidativo (GENIS et al., 2014). Enquanto em resposta ao estresse oxidativo há diminuição na concentração do IGF-1, após um insulto ou lesão há aumento da síntese de IGF-1 no SNC com acúmulo na microglia, vasos e astrócitos (BEILHARS et al., 1998), podendo corroborar os resultados desse estudo que revelaram maiores perfis reativos para morte celular e maior expressão de IGF-1 na região da amígdala nos grupos que receberam glicose indicando um efeito neurodegenerativo da administração de glicose, que não foi observada nos grupos controles.

A amígdala, em conjunto com o sistema nervoso simpático, desempenha um papel crucial e importante nas emoções relacionadas ao medo como uma resposta condicionada que favorece a emissão de comportamentos defensivos de luta e fuga para evitar ameaças ou estímulos aversivos, o que pode induzir à ansiedade e prejuízos à memória (LeDOUX, 2003; BRACHA, 2004; LEE et al, 2006). Para Duvarci e Pare (2014), o medo aprendido ou a capacidade de aprender com experiências aversivas é a chave para a sobrevivência dos animais por favorecer situações de segurança e prevenir situações de perigo como uma forma de adaptação às situações estressoras quando exposta repetidas vezes (SCHWABE e WOLF, 2013), podendo esta condição ter sido deflagrada pelo efeito da glicose sobre o comportamento de SED15%. Bem como danos na região da amígdala podem repercutir em prejuízos ao reconhecimento do medo, o que pode favorecer a maior exposição do animal às situações que ameacem sua vida (ADOLPHS et al., 2005), podendo o efeito da glicose associado à atividade física ter desencadeado o comportamento de indiferença ao risco e maior exposição às situações ameaçadoras de TRE15%.

O modelo de atividade física forçada ou a permanência na esteira parada utilizados para avaliar os efeitos do treinamento sobre o comportamento podem ser considerados estímulos estressores por ser um ambiente desconhecido e sem possibilidade de esquivar ou fugir durante o período. O período agudo de protocolo associando administração de glicose e atividade física podem ter potencializado respostas deletérias suficientemente estressoras para desencadear os processos de morte celular repercutindo em alterações no comportamento e desproporcionalmente curto para controlar a neurodegeneração pela ação neuroprotetiva do IGF-1, tendo em vista que a atividade física crônica pode induzir mecanismos para controlar os efeitos da

oxidação promovida pelo estresse e reverter a redução dos níveis de fatores neurotróficos como o BDNF que desempenha, assim como o IGF-1, uma sinalização para controle na ação de radicais livres e contribui para efeitos sobre aspectos cognitivos (KWON et al., 2013) além de suprimir a morte neuronal (KIM et al., 2011)

As exposições repetidas à esteira seguida de administração glicose influenciaram sobre a demanda energética e desencadearam consideráveis processos apoptóticos na amígdala não contornadas ou controladas pela ação do IGF-1, o qual contribuiu para o prejuízo à memória aversiva e medo repercutindo em comportamento relacionado à ansiedade para SED15% e significativa maior exposição às situações de risco para TRE15%, como num processo de adaptação às situações novas e nocivas.

Os apontamentos deste estudo revelam efeitos neurodegenerativos ao SNC causados pela administração de glicose, mas indicam também uma possível tentativa neuroprotetiva de controle endógeno, indicando a capacidade de neuroplasticidade desse sistema.

## **CONCLUSÃO**

A administração de 15% de xarope de glicose do milho posteriormente à exposição na esteira desencadearam aumento da expressão de IGF-1 na amígdala. Tal aumento não foi suficiente para proporcionar neuroproteção, pois identificou-se difusos pontos de morte celular na amígdala, prejuízos à memória aversiva, medo que pode ter induzido ao comportamento relacionado à ansiedade para SED15% e significativa maior exposição às situações de risco como efeito ansiolítico para TRE15% após protocolo agudo de 5 dias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. Aspects of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Related to Neuroprotection, Regeneration, and Functional Plasticity in the Adult Brain. *TheScientificWorldJOURNAL* 2006 6, 53–80
- Adolphs R, Gosselin F, Buchanan TW, Tranel D, Schyns P, Damasio AR. A mechanism for impaired fear recognition after amygdala damage. *Nature*. 2005 Jan 6;433(7021):68-72.
- Agrawal R, Gomez-Pinilla F. 'Metabolic Syndrome' in the brain: deficiency in Omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *J Physiol*. 1;590:2485-89, may 2012.
- Amunts K, Kedo O, Kindler M, Pieperhoff P, Mohlberg H, Shah NJ, Habel U, Schneider F, Zilles K. Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps. *Anat Embryol (Berl)*. 2005 Dec;210(5-6):343-52.
- Babri S, Badie HG, Khamenei S, Seyedlar MO. 2007. Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male Wistar rats. *Brain Cogn* 64: 86–91
- Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, *et al.*: Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998; 59(2): 119–134.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001 May;25(3):205-18
- Bracha HS. Freeze, flight, fight, fright, faint: adaptationist perspectives on the acute stress response spectrum. *CNS Spectr*. 2004 Sep;9(9):679-85.
- Burkhalter J, Fiumelli H, Allaman I, Chatton JY, Martin JL. Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons. *J Neurosci*. 2003;23:8212-20
- Cao D, Lu H, Lewis TL, Li L. Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2007; 282:36275–36282.

- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20(8):2926–2933.
- Carvalho C, Cardoso S, Correia SC, et al. Metabolic alterations induced by sucrose intake and Alzheimer's disease promote similar brain mitochondrial abnormalities. *Diabetes* 2012; 61:1234–1242.
- Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Wang SW, Cho IH, Cho JY, Kim HT. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience*. 2009 Dec 29;164(4):1665-73
- Chen MJ. Running exercise- and antidepressant-induced increases in growth and survival-associated signaling molecules are IGF-dependent. *Growth Factors*. 2007 Apr;25(2):118-31.
- Cheng A, Hou Y, Mattson MP. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*. 2010;2:e00045.
- Churchill JD, Galvez R, Colcombe S, Swain RA, Kramer AF, Greenough WT. Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol. Aging* 23, 941–955, 2002.
- Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, and Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*; 30: 280–285, 2002.
- Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25:295– 301. 2002.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie L. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*. 30(9):464-72, sep. 2007.
- Derakhshan F, Toth C. Insulin and the brain. *Curr Diabetes Rev*. 2013 Mar 1;9(2):102-16.
- Dienel GA, Hertz L, Glucose and lactate metabolism during brain activation, *Journal of Neuroscience Research*, vol. 66, no. 5, pp. 824–838, 2001.
- Duvarci S, Pare D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*. 2014 Jun 4;82(5):966-80.
- Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolanos JP: Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J*. 2012; 443(1): 3–11.



- Garland Jr, T., Schutz H, Chappell MA, Keeney BK, Meek TH, Copes LE, Acosta W, Drenowatz C, Maciel RC, van Dijk G, Kotz CM, Eisenmann JC. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. *J. Exp. Biol.* 214, 206–229, 2011.
- Genis L, Dávila D, Fernandez S, Pozo-Rodrigálvarez A, Martínez-Murillo R, Torres-Aleman I. Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000Res.* 2014 Jan 28;3:28.
- Gomez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 568–578, 2008.
- Gomez-Pinilla F. The combined effects of exercise and foods in preventing neurological and cognitive disorders. *Prev Med.* 2011 June 1; 52(Suppl 1): S75–S80.
- Gomez-Pinilla F and Gomez AG. The influence of dietary factors in central nervous system plasticity and injury recovery. *PMR.* 2011 Jun;3(6 Suppl 1):S111-6.
- Graham JH, Buccafusco JJ. Inhibitory Avoidance Behavior and Memory Assessment. In: Buccafusco JJ, ed. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2001. Cap 9. Pp: 153-163.
- Haber M, Zhou L, Murai K, Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses, *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 35, pp. 8881–8891, 2006.
- Herzog RI, Chan O, Effect of acute and recurrent hypoglycemia on changes in brain glycogen concentration. *Endocrinology.* 2008 Apr;149(4):1499-504.
- Hitze B, Hubold C, van Dyken R, Schlichting K, Lehnert H, Entringer S, Peters A. How the selfish brain organizes its supply and demand. *Front Neuroenergetics.* 9;2:7, jun. 2010.
- Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res.* 1999 Aug;103(1):1-11
- Jurdak N, Lichtenstein AH, Kanarek RB. Diet-induced obesity and spatial cognition in young male rats. *Nutr Neurosci* 2008; 11:48–54.
- Ke HC, Huang HJ, Liang KC, Hsieh-Li HM. Selective improvement of cognitive function in adult and aged APP/PS1 transgenic mice by continuous non-shock treadmill exercise. 2011 Jul 27;1403:1-11.

- Kim BS, Kim MY, Leem YH. Hippocampal neuronal death induced by kainic acid and restraint stress is suppressed by exercise. *Neuroscience*. 2011 Oct 27;194:291-301
- Klement J, Hubold C, Cords H, Oltmanns KM, Hallschmid M, Born J, Lehnert H, Peters A. High-calorie comfort food attenuates neuroglycopenic symptoms in patients with Addison's disease. *J. Clin. Endocr. Metab.* 95, 522–528, 2010.
- Kwon DH, Kim BS, Chang H, Kim YI, Jo SA, Leem YH. Exercise ameliorates cognition impairment due to restraint stress-induced oxidative insult and reduced BDNF level. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 3;434(2):245-51.
- LeDoux, J. The emotional brain, fear and the amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2003;23:727-38
- Lee JL, Milton AL, Everitt BJ. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci*. 2006;26(39): 10051-6.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL. Growth factors as mediators of exercise actions on the brain. *Neuromolecular Med.*, 2008. 10 (2), 99–107.
- Lynch CD, Lyons D, Khan A, Bennett SA, Sonntag WE. Insulin-like growth factor-1 selectively increases glucose utilization in brains of aged animals. *Endocrinology*. 2001 January; 142(1): 506–509.
- Magistretti PJ, Neuron-glia metabolic coupling and plasticity, *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, part 12, pp. 2304– 2311, 2006.
- Maren S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci*. 1999 Dec;22(12):561-7.
- Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*. 2011 May 15;14(10):2013-54
- Matsui T, Ishikawa T, Ito H, Okamoto M, Inoue K, Lee MC, Fujikawa T, Ichitani Y, Kawanaka K, Soya H. Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. *J Physiol*. 2012 Feb 1;590(Pt 3):607-16.
- Mattson MP. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* 2000; 866: 47-53.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev*. 2004 Nov;3(4):445-64.

- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. *Neuron*. Dec 10, 2008; 60(5): 748–766.
- Mielke JG, Taghibiglou C, Liu L, et al. A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. *J Neurochem* 2005; 93:1568–1578.
- Molteni R, Wu A, Vaynman S, et al. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. 2004;123:429–440.
- Mora F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. *Dialogues Clin Neurosci*. ;15(1):45-52, mar. 2013.
- Moreira PI. High-sugar diets, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013 Jul;16(4):440-5.
- MYERS, K.M.; DAVIS, M. Systems-Level Reconsolidation: Reengagement of the Hippocampus with Memory Reactivation. *Neuron*, v.36, p.340-343, 2002.
- Newcomer JW. Metabolic syndrome and mental illness. *Am J Manag Care*, 2007. 13, S170–177.
- Nybo L.. CNS fatigue and prolonged exercise—effect of glucose supplementation. *Med. Sci. Sports Exerc.* , 2003 35, 589–594.
- Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav*. 2000 Feb;68(4):509-14.
- Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goñi R, Brusco A, Basso N. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related Behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience*. 27; 202:252-66, jan. 2012.
- Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav. Brain Res.* , 2010; 208, 545–552.
- Schwabe L, Wolf OT (2013) Stress and multiple memory systems: from 'thinking' to 'doing'. *Trends Cogn Sci* 17:60-68.
- Sonntag WE, Bennett C, Ingram R, Donahue A, Ingraham J, Chen H, et al. Growth hormone and IGF-I modulate local cerebral glucose utilization and ATP levels in a model of adult-onset growth hormone deficiency. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*.2006;291(3):E604–610.

- Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann R, Egan JM, Mattson MP. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*. 2008 ; 18(11): 1085–1088
- Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*2007;8:405–413.
- Trejo JL, Carro E, Nunez A, Torres-Aleman I. Sedentary life impairs self-reparative processes in the brain: the role of serum insulin-like growth factor-I. *Reviews in the Neurosciences*.2002;13(4):365–374.
- Trejo JL, Piriz J, Llorens-Martin MV, Fernandez AM, Bolós M, LeRoith D, Nuñez A, Torres-Aleman I. Central actions of liver-derived insulin like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry*. 2007 Dec;12(12):1118-28.
- Trejo JL, Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2008 37:402–411,
- Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ianne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance *N. Engl. J. Med.*, 2001. 344, pp. 1343–1350.
- Vaynman S, Ying Z, Wu A, Gomez-Pinilla F. Coupling energy metabolism with a Mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity. *Neuroscience*. 2006;139(4):1221-34.
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2(2):322-8, 2007.
- Williams JM, Thompson VL, Mason-Parker SE, Abraham WC, Tate WP. Synaptic activity-dependent modulation of mitochondrial gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;60:50-6.
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience* 155, 751–759, 2008.



