

GUILLERMO PATRICIO GUTIÉRREZ FIGUEROA

PAPEL DO CÓRTEX ENTORRINAL NA MEMÓRIA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do grau de mestre em Ciências — Bioquímica.

CURITIBA
1994

GUILLERMO PATRICIO GUTIÉRREZ FIGUEROA

PAPEL DO CÓRTEX ENTORRINAL NA MEMÓRIA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do grau de mestre em Ciências — Bioquímica.

CURITIBA

1994

GUILLERMO PATRICIO GUTIÉRREZ FIGUEROA

PAPEL DO CÓRTEX ENTORRINAL NA MEMÓRIA

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre no curso de Pós-Graduação em bioquímica pela comissão formada pelos Professores :

Orientador: Prof. Iván A. Izquierdo

UFRGS - Dep. Bioquímica

Prof. Aginaldo J. Do Nascimento

UFPR - Dep. Bioquímica

Prof - Muriel M. Vieira

UFPR - Dep. Bioquímica.

Curitiba, 25 de março de 1994

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

E

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PAPEL DO CÓRTEX ENTORRINAL NA MEMÓRIA

GUILLERMO PATRICIO GUTÉRREZ FIGUEROA

Orientador

Dr. IVAN ANTONIO IZQUIERDO

Co-orientadora

Dra. CARLA DALMAZ

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, como requisito à obtenção do grau de mestre em Ciências - Bioquímica.

Curitiba

1994

*Aos meus pais Rodrigo e Fabiola
exemplo e inspiração de vida*

*Bendeciré al Señor con toda mi
alma;
no olvidaré ninguno de sus
beneficios.*

SAL. 103 (102): 2

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a realização de mais um sonho de juventude.

Ao Dr. Ivan Antônio Izquierdo pela orientação e confiança no meu trabalho.

À Dra. Carla Dalmaz pela co-orientação e ajuda na bioquímica.

Ao Dr. Carlos Alexandre Netto pela boa vontade na correção dos originais.

Aos Professores Dra Maria Beatriz Ferreira e Jorge Quillfeldt pelos esclarecimentos das dúvidas, principalmente no trabalho comportamental e cirúrgico.

Aos Professores Dutra, Clovis Wannmacher e a todo o grupo pela ajuda e empréstimos para os experimentos bioquímicos.

Às bolsistas Nice Arteni e Marilene Zanatta pelo auxílio na histologia.

À Renata, Roger, Ricardo e todo o grupo de memória pela recepção e acolhida.

Ao departamento de Neuroanatomia da UFRGS por conceder a utilização das instalações.

À família Figueroa Ferreira pela ajuda e constante estímulo.

Ao Colegiado da UFPR pela minha aceitação como aluno de mestrado.

Aos professores das disciplinas cursadas por serem parte importante no início do caminho dentro da pesquisa.

À Cirene L. Delgobo pelo privilégio de contar com a sua amizade

e afeto.

Ao Roberto Ferreira de Melo, Juliana Menestrina e Miguel Nosedá pela amizade de colegismo.

À Dra. Marcia Mendonça da UFPR pelas informações fornecidas.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente tornaram possível a realização desta tese.

À CAPES pelas bolsas concedidas.

À FAPERGS pela ajuda financeira.

Deus abençoe a todos vocês.

Obrigado.

S U M A R I O

DEDICATÓRIA	I
MENSAGEM	II
AGRADECIMENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. <u>INTRODUÇÃO</u> -----	1
1.1. MODULAÇÃO DA MEMÓRIA-----	3
1.1.1 Potenciação de Longa Duração (LTP)-----	5
1.2. PAPEL DE ESTRUTURAS CEREBRAIS NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA----	5
1.3. CÓRTEX ENTORRINAL-----	7
1.4. MUDANÇAS NEURONAIS E METABÓLICAS DO CÓRTEX ENTORRINAL E ÁREAS RELACIONADAS-----	9
1.5. EXCITOTOXICIDADE DOS AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS-----	11
2 . <u>OBJETIVOS</u> -----	16
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> -----	17
3. 1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS-----	17
3. 2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS-----	17
3. 3. PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS-----	19
3. 3.1. Esquiva Inibitória-----	19
3. 3.2. Esquiva Ativa de Duas Vias-----	20

3. 3.3. Habituação ao Campo Aberto-----	21
3. 4. PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS-----	22
3. 4.1. .Preparação da Amostra-----	22
3. 4.2. Consumo de Glicose-----	24
3. 4.3. Produção de Lactato-----	24
3. 5. PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS-----	25
3. 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	27
4. <u>RESULTADOS</u> -----	28
4. 1. EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA-----	28
4. 2. EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS-----	28
4. 3. EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO-----	29
4. 4. EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA-----	29
4. 5. EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS-----	36
4. 6. EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO-----	40
4. 7. EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO C.E. SOBRE O CONSUMO DE GLICOSE EM MICROPRISMAS DE HIPOCAMPO-----	44
4. 8. EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO C.E. SOBRE A CONSUMO DE GLICOSE EM MICROPRISMAS DE CÓRTEX ENTORRINAL-----	44
4. 9. EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO C.E. SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO EM MICROPRISMAS DE HIPOCAMPO-----	44

4. 10. EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO C.E. SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO EM MICROPRISMAS DE CÓRTEX ENTORRINAL-----	44
4. 11. RESULTADOS HISTOLÓGICOS -----	49
5. <u>DISCUSSÃO</u> -----	51
5.1. COMPORTAMENTO-----	51
5.2. METABOLISMO ENERGÉTICO-----	53
6. <u>CONCLUSÕES</u> -----	55
7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> -----	56

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estrutura do ácido glutâmico. Fig 1.A para comparação com NMDA. Fig 1.B o agonista que define o sub-tipo de receptor NMDA.....14
2. APARELHO ESTEREOTÁXICO. DAVID KOPF # 1404 Usado na operação para lesionar o córtex entorrinal de ratos.....18
3. MICROFATIADOR CHOPPER DE McILWAIN usado para cortar microprismas de hipocampo e córtex entorrinal.....24
4. Cortes Coronal (fig 4.A) horizontal (fig 4.B) e sagital (fig.4.C) do cérebro de um rato (Atlas Paxinos & Watson 1986) a nível do córtex entorrinal.....50

ÍNDICE DE TABELAS

I.	EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. NA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA	30
II.	EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. NA TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS.....	31
III.	EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. SOBRE O NÚMERO DE CRUZAMENTOS INTER-PROVA NA ESQUIVA ATIVA	32
IV.	EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. NA TAREFA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO	33
V.	EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. SOBRE O NÚMERO DE CRUZAMENTOS NA HABITUAÇÃO.....	34
VI.	EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO C.E. SOBRE O NÚMERO DE BOLOS FECALIS NA HABITUAÇÃO.....	35
VII.	EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA.....	37
VIII.	EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS.....	38
IX.	EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE O NÚMERO DE CRUZAMENTOS INTER-PROVA NA ESQUIVA ATIVA.....	39

X.	EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE A TAREFA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO.....	41
XI.	EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE O NÚMERO DE CRUZAMENTOS NA HABITUAÇÃO.....	42
XII.	EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO C.E. SOBRE O NÚMERO DE BOLOS FECAIS NA HABITUAÇÃO.....	43 .
XIII.	EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO C.E. SOBRE O CONSUMO DE GLICOSE EM MICROPRISMAS DE HIPOCAMPO.....	45
XIV.	EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO C.E. SOBRE O CONSUMO DE GLICOSE EM MICROPRISMAS DE CÓRTEX ENTORRINAL.....	46
XV.	EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO C.E. SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO EM MICROPRISMAS DE HIPOCAMPO.....	47
XVI.	EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO C.E. SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO EM MICROPRISMAS DE CÓRTEX ENTORRINAL.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	=	ADRENOCORTICOTROFINA
AP	=	ANTERO-POSTERIOR
AMPA	=	ACIDO α -AMINO-3-HIDROXI-5-METIL-ISOXAZOE- 4-PROPIÓNICO
AP5	=	2-AMINO-5-FOSFONOPENTANOICO
C. E.	=	CÓRTEX ENTORRINAL
CNQX	=	6-CIANO-7-NITROQUINOXALINA-2-DIONA
dB	=	DECIBÉIS
DV	=	DORSO-VENTRAL
GABA	=	ÁCIDO GAMA-AMINO-BUTÍRICO
Hz	=	HERTZ
ip	=	INTRA PERITONEAL
LL	=	LÁTERO-LATERAL
LTP	=	POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO
mA	=	MILI AMPERES
NADH	=	NICOTINAMIDA-ADENINA-DINUCLEOTÍDEO (reduzida)
NMDA	=	N-METIL-D-ASPARTATO
PKC	=	PROTEINA QUINASE-C
SNC	=	SISTEMA NERVOSO CENTRAL.

RESUMO

A memória é formada e regulada por vários sistemas localizados na amígdala (em tarefas estressantes), no hipocampo e no septo medial (em tarefas espaciais) do SNC. Estas três estruturas convergem no córtex entorrinal (C.E.) através de aferências e eferências. Vários estudos mostram evidências a favor do papel integrador do C.E. Em humanos, nesta estrutura, se inicia a doença degenerativa de Alzheimer. Estudos em ratos e primatas mostram severas alterações de memória, observados após remoção ou lesão do C.E. Por outro lado também tem-se observado que a captação de glicose e produção de lactato dos animais sem o C.E. encontram-se diminuídos, principalmente no hipocampo. Neste trabalho realizou-se lesão do C.E. em ratos adultos machos, (previamente treinados ou não) com o aminoácido excitatório N-metil-D-aspartico (NMDA, 5 μ g), injetado diretamente através de cirurgia estereotáxica. Animais controle foram operados com salina, e foram utilizados também animais não operados. Sete dias após a cirurgia, os animais lesionados apresentaram amnésia parcial, na tarefa de esquiva inibitória, e não apresentaram amnésia para a tarefa de habituação ao campo aberto. Já na tarefa de esquiva ativa de duas vias os ratos lesionados apresentaram amnésia total, (tanto os animais operados após a sessão de treino quanto os previamente treinados). Com a finalidade de estudar parâmetros do metabolismo cerebral dos ratos lesionados, após o treino da tarefa de esquiva inibitória, utilizou-se a técnica de incubação de microprismas do hipocampo e do C.E. lesionado. Mediu-se o consumo de glicose e a produção de lactato. Os resultados das medidas não mostraram diferenças significativas em relação aos ratos injetados com salina e aos intactos. Este trabalho mostra que há alteração de memória do tipo associativa, provocada pela microinjeção de NMDA no C.E, mas não foram detectadas alterações do metabolismo energético cerebral pela técnica de microprismas de hipocampo e córtex entorrinal.

ABSTRACT

Memory is formed and regulated by various systems, located in the amygdala (for stressful task), hippocampus and medial septum (for spatial task) of SNC. The three structures converge upon the entorhinal cortex (C.E.) through afferent and efferent fibers. Several studies show evidence for an integrative role of C.E. In humans, the degenerative lesions of Alzheimer's disease start by this structure. Studies on rats and primates show severe memory deficits after C.E. lesions or ablations. Also, it has been observed that glucose uptake and lactate production are impaired, mainly in the hippocampus, in animals with C.E. lesions. We studied here the effect of lesions of the C.E. caused by the stereotaxic localized infusion of the excitatory amino acid, N-Methyl-D-Aspartate (NMDA, 5 μ g). Control animals were infused with saline, and unoperated controls were also used. Lesioned animals showed partial amnesia in an inhibitory avoidance task, no effect on habituation to an open field, and full amnesia for an active avoidance task, the latter regardless of whether they were prior operated or after the training. With the purpose of studying parameters of cerebral metabolism in the lesioned rats, glucose consumption and lactate production were measured in microprisms obtained from the hippocampus and C.E. of animals sacrificed after inhibitory avoidance training. No effects of the training or the C.E. lesion were observed on these parameters. In conclusion, NMDA lesions of the C.E. alters associative memory, without inducing brain metabolic alterations detectable by the technique used.

I. INTRODUÇÃO

Memória é a capacidade de armazenar e evocar informações aprendidas. Sem a memória não existe aprendizado e não há aprendizado sem experiências (43). As memórias podem ser diferenciadas segundo o tempo entre a aquisição e a evocação: em memória imediata, que dura de poucos segundos até minutos; a memória de curto prazo, que dura umas poucas horas; e a memória de longa duração que dura dias, semanas ou anos (28, 43). Numa situação de novidade, várias informações são recebidas e, após serem selecionadas, são armazenadas ou não (26, 43, 71).

A memória que é mantida por longos períodos é elaborada numa sequência de eventos: aquisição, ou elaboração de novos padrões de comportamento, após uma nova experiência (71) ; consolidação, o tempo imediatamente após a aquisição, quando a memória fica mais lábil (43, 46); armazenamento, que se define como o processo neuronal hipotético onde o aprendizado é fixado. (71) ; evocação, que é o uso da memória em operações neurais e comportamentais (21). Memórias diferentes podem usar diferentes vias e processos, e são integradas por sistemas moduladores (42, 44, 46). A consolidação é modulada por sistemas, que são estudados pela sua resposta a drogas, neurotransmissores e hormônios (19, 42, 43, 46, 49), existindo possíveis interações entre estes diversos sistemas, a nível central e periférico (20, 46, 47).

No Sistema Nervoso Central várias estruturas estão envolvidas nos processos de consolidação, e expressão das memórias:

a amígdala, o hipocampo, o septo medial e o córtex entorrinal, que processam diferentes tipos ou aspectos de memórias (44, 46, 63). Nelas neurotransmissores excitatórios e inibitórios, que exercem um papel fundamental, fortalecendo ou inibindo a consolidação (46, 47, 48).

Também nos mecanismos modulatórios da consolidação atuam vários hormônios, os quais possivelmente modulam diferentes sistemas de neurotransmissores (20, 37, 39, 62).

O fenômeno eletrofisiológico chamado Potenciação de Longa Duração (Long-Term-Potentiation ou LTP) (5, 12), cada vez mais pesquisado, é proposto como a base para o processamento da memória, pelas suas características (5, 49). A LTP acontece em sinapses excitatórias glutamatérgicas, as mais abundantes no cérebro (4, 5, 6). A LTP consiste no aumento da resposta sináptica, específica para esa sinapse, como consequência da estimulação repetitiva e breve, da sinapse (5, 49).

A memória pode ser medida através da evocação. No caso do homem a evocação pode ser verbal ou não. Nos animais inferiores o comportamento mede-se de forma não verbal (43). A exposição de um animal a um certo ambiente, com estímulos específicos que levam a emitir ou suprimir uma resposta determinada é chamada de tarefa (71). A primeira exposição a uma tarefa chama-se treino, e uma segunda exposição é chamada teste. A memória de uma tarefa pode ou não ser facilitada por uma série de tratamentos, antes ou após o treino. O incremento ou a diminuição da memória acontecem pelos sistemas conhecidos como moduladores, antes mencionados (18, 71). O decréscimo ou a disfunção destes sistemas pode provocar

amnésia. Há dois tipos de amnésias : retrógrada , que é a incapacidade de lembrar memórias do passado, em maior grau as recentes do que as remotas, e a amnésia anterógrada, que é a incapacidade de formar novas memórias. Chama-se amnésia global quando o sujeito apresenta os dois tipos de amnésia (29, 43).

1. 1. MODULAÇÃO DA MEMÓRIA

Os neurotransmissores podem ser modulados por hormônios, periféricamente, que melhoram ou não a memória na consolidação. Os chamados hormônios do estresse como são a epinefrina, adrenocorticotrofina (ACTH) e vasopressina, são liberados em proporção ao grau de alerta ou estresse (35, 36). Trabalhos mostram que a administração de adrenalina, ACTH, ou vasopressina em altas doses, ou β -endorfina em doses baixas, depois do treino provoca amnésia. Mas quando administradas as mesmas drogas antes da sessão de teste é revertido o efeito amnésico, em tarefas de esquivas inibitórias. Assim o aprendizado depende de diferenças qualitativas e quantitativas do contexto neuro-humoral presente no treino e no teste (35, 36, 37, 38). Também a glicose injetada intra-peritonealmente, tem efeitos semelhantes sobre a memória (18). Estudos mostram que as catecolaminas são alteradas, de forma diferente em diferentes regiões cerebrais, por diversas tarefas comportamentais. A injeção de agonistas noradrenérgicos ou colinérgicos na amígdala facilita a consolidação (19, 42, 44).

Os aminoácidos de tipo excitatório como o glutamato e

aspartato (57, 72, 98), e inibitório como é o ácido gama-aminobutírico (GABA) (24, 44), modulam a consolidação (20, 25).

Dos receptores para o GABA, o mais abundante, usado por um terço de todas as sinapses no cérebro, é do tipo GABA-A; bem estudado por Izquierdo, Medina e colaboradores (44, 45, 48, 63), como modulador negativo da memória em tarefas de esquila inibitória. O receptor GABA-A é um complexo macromolecular, acoplado a um receptor para benzodiazepínicos. Este complexo consiste de diferentes polipeptídeos (α , β , γ , δ , ϵ), formando uma unidade hetero-oligomérica. A ativação de receptores GABA-A aumenta alostéricamente a permeabilidade da membrana aos íons cloro, conduzindo a uma hiperpolarização pós-sináptica (45, 48, 63). Ao receptor para benzodiazepina unem-se as benzodiazepinas como o diazepam. A molécula de diazepam, e outras benzodiazepinas tem sido encontradas em vários fluidos como no líquido, leite, além de plantas e microrganismos e em cérebro de mamíferos (63). As benzodiazepinas cerebrais endógenas poderiam ser originárias em parte da alimentação (44, 45, 49, 63). Sabe-se que as benzodiazepinas produzem sedação, relaxamento muscular e estabilização autonómica, além de potencializar fortemente efeitos depressivos de barbitúricos e do álcool (63). As benzodiazepinas incrementam a sensibilidade de receptores GABA-A ao GABA, e influenciam na formação da memória (25, 43, 45, 63).

1. 1. 1. Potenciação de Longa Duração

(LTP)

A Potenciação de Longa Duração (em inglês Long-Term - Potentiation ou LTP) foi descrita por Bliss e Lømo (8) em células piramidais do hipocampo (áreas CA1 e CA3). O processo consiste na persistência do incremento na eficácia sináptica, durante horas, dias ou semanas (4, 5, 6, 58). Para melhor esclarecimento, é importante caracterizar três diferentes fases (67), na cascata de mudanças moleculares da LTP. 1) Indução : há consenso que o maior evento é o influxo de Ca^{2+} pós-sináptico, principalmente pelos canais dos receptores NMDA do glutamato (12, 58, 59). 2) Fase Intermediária: mudanças iniciais de sistemas de alguns segundos mensageiros, promovem modificações mais estáveis (59, 67, 95); nesta fase há aumento da atividade de PKC, Calcio-calmodulina quinase II e proteases (49, 57, 58, 59, 67). Na glia também ocorrem mudanças, bloqueando a captação de glutamato (4, 72). 3) Manutenção: uma vez estabelecida a LTP se expressa pelos receptores AMPA (3, 5, 6). Para manter a LTP tem sido propostos, os mensageiros retrógrados: o ácido araquidônico e o óxido nítrico (4, 5).

1.2. PAPEL DE ESTRUTURAS CEREBRAIS NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

As estruturas neuronais centrais que se destacam na modulação da consolidação da memória, processando diferentes tipos de memórias, são: a amígdala, o hipocampo, e o septo medial (28, 43, 47). Estas estruturas estão interconectadas por vias aferentes e

eferentes, curtas , e recebem por sua vez informação polissensorial que vem da formação reticular mesencefálica; projetam ao diencéfalo, e por meio deste ao córtex (43). Tem-se demonstrado que o dano a nível destas estruturas prejudica diferentes tipos de memória (2, 44, 100).

A amígdala modula memórias de alto conteúdo emocional, e está envolvida em processamento de informação do tipo aversiva. O hipocampo e o septo medial processam memórias de trabalho, espaciais e informação olfativa, mas por mecanismos diferentes (44). A administração sistêmica de bloqueadores de receptores excitatórios glutamatérgicos de tipo NMDA como o ácido 2-amino- 5-fosfonopentanóico (AP5), na amígdala, septo medial, e no hipocampo imediatamente após o treino na tarefa de esQUIVA inibitória causa amnésia retrógrada (26, 44). Efeito similar causam agonistas de receptores colinérgicos muscarínicos como a escopolamina. A picrotoxina, que bloqueia o canal de cloro, causa facilitação, anulando o efeito do AP5 e da escopolamina (51). A maioria das interações entre os mecanismos de neurotransmissores nestas três estruturas deve estar excitando as células envolvidas no processo da consolidação, através de mecanismos paralelos e similares (25, 44, 51).

A estimulação de terminais GABAérgicos modulados por benzodiazepinas, inibem estas células. Além disso, a administração sistêmica intraperitoneal ou a microinjeção intra-amígdala de bloqueadores de receptores de tipo GABA-B (pré-sinápticos),

como o baclofem prejudica a retenção, mostrando envolvimento na amígdala de receptores tipo GABA-B (11, 44). Os receptores GABA-A inibem a formação da memória, e são regulados pelas benzodiazepinas. O flumazenil, um antagonista específico de receptores benzodiazepínicos injetado na amígdala bilateralmente após o treino em esquiva inibitória, causa facilitação da memória. Também a injeção imediatamente pós-treino, de flumazenil no hipocampo e no septo incrementa a retenção. Mas apenas a injeção intra-hipocampal de flumazenil incrementa a retenção da tarefa de habituação, o que não acontece com igual tratamento nas outras duas estruturas (42, 44, 98). O muscimol um agonista GABAérgico injetado intra-amígdala, no septo medial ou no hipocampo, imediatamente pós-treino na tarefa de esquiva inibitória, prejudica a retenção (25, 26, 27, 98).

1. 3. CÓRTEX ENTORRINAL

O córtex entorrinal [CE] está conectado diretamente com a amígdala e o hipocampo e indiretamente com o septo medial; e também com áreas associativas do neocórtex (25, 46, 100). O CE encontra-se estrategicamente localizado no paleocórtex, que em todos os animais está na base do telencéfalo, caudal à área prepiriforme, na sua região medial (16). No homem o C.E. corresponde à área 26 de Brodmann (50, 53). Junto com a amígdala e o hipocampo, ocupam o lóbulo temporal; a lesão cirúrgica

bilateral do lobo temporal, provoca sérios problemas de memória, principalmente de amnésia anterógrada. Também apresentam problemas de memória pacientes com doenças que afetam diretamente o C.E. como a doença de Alzheimer (44, 50, 51, 97). Lesões do CE e áreas vizinhas prejudicam o aprendizado e a memória em diferentes tipos de tarefa, como mostram trabalhos com primatas e ratos (2, 66, 85).

A infusão de agonistas ou antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, colinérgicos, beta-noradrenérgicos ou GABAérgicos, na amígdala, hipocampo, e septo medial alteram a formação da memória (26, 27, 47, 98). No C.E, AP5, antagonista de receptores NMDA, e muscimol, agonista GABAérgico (GABA-A) provocam amnésia quando injetados no CE, 90 ou 180 minutos após o treino. Estes não tiveram efeito quando injetados nesta estrutura 0 ou 360 minutos após o treino (27, 47, 51). Tais resultados contrastam com o efeito imediato na amígdala, septo e hipocampo (25, 51). Estes resultados indicam que o C.E. é requerido para processar informações relativas à memória 90 - 180 minutos depois do treino (51).

A doença de Alzheimer, descrita por Alois Alzheimer em , 1907 (53), é a mais comum forma de degeneração cerebral que conduz à demência. Caracteriza-se por emaranhamento de filamentos helicoidais, degeneração de terminais nervosos e, presença de placas de proteína amiloide (32, 50, 53, 80, 83). Jellinger. et al (50) num estudo de pacientes com a doença de Alzheimer e Parkinson, observaram depósitos amiloides com degeneração inicial da camada pré-alfa (II) da região

entorrinal. Tem sido encontradas também mudanças bioquímicas, como diminuição de enzimas envolvidas na síntese de acetil colina e catecolaminas (53,83). Tem - se observado também alterações de: utilização de glicose, consumo de oxigênio, e fluxo sanguíneo diminuídos, no cérebro, principalmente no córtex. (30, 32, 34, 53, 75).

1. 4. ALTERAÇÕES NEURONAIS E METABÓLICAS DO CÓRTEX ENTORRINAL E ÁREAS RELACIONADAS

O cérebro é um órgão processador de informações. Trabalha constantemente e necessita para isto, de abundante suprimento de oxigênio e glicose trazidos pela circulação. Do ponto de vista energético, é um órgão altamente eficiente (27). Estudando variações do metabolismo cerebral, Collins. et al (14) mediram vários parâmetros metabólicos após eletrochoque. Observaram que as concentrações de ATP, fosfocreatina e glicose apresentaram uma queda nos primeiros 20 segundos, a menos de 50% do normal. A produção de lactato aumentou 220 %, por 20 segundos posteriores ao eletrochoque, retornando a níveis normais 8 minutos mais tarde. O lactato por ser um metabólito da via glicolítica, serve como medida do metabolismo cerebral anaeróbico (14). Jorgensen e Wrigth estudaram alterações do metabolismo da glicose das áreas hipocâmpais após a remoção do córtex entorrinal em ratos. O CE foi removido por aspiração transcranial, unilateral e bilateralmente. Os

autores observaram que 4 dias após realizada a cirurgia, 86 % das sinapses na região haviam sido perdidas, comparando-os com controles normais. O maior decréscimo de utilização de glicose, observado por autoradiografia, foi registrado no estrato lacunoso-molecular da area CA1 (45 %); e o menor declínio na camada molecular do giro dentado, e no "estratum" "lucidum" da área CA3 (31 %), e em "estratum radiatum" de CA1 (36 %). A diminuição aconteceu com maior significância nos animais que sofreram remoção bilateral do córtex entorrinal (50).

Sif. et al (84) reportaram aumento na captação de 2-deoxi glicose no CE, em ratos treinados em provas alimentares. O trabalho mostra que a maior captação deste composto pelo CE acontece após 215 minutos, enquanto que no septo medial e no hipocampo, a captação acontece aos 15 minutos depois do treino .

Convencionalmente o metabolismo da glicose cerebral tem sido estudado com [14C] deoxi-glicose (84, 85, 86). O efluxo de lactato e acúmulo de glicose vão depender da atividade funcional das células nervosas em circunstâncias fisiológicas (86). Trabalhos mais recentes, nos quais se utiliza a técnica de lactografia, mostram variação da produção de lactato "in vivo", em ratos com lesão eletrolítica unilateral do CE. Os autores mediram a quantidade de lactato hipocampal extracelular, antes, durante e depois de choque eletrolítico e estresse. Foi observada uma atenuação significativa dos níveis de lactato produzidos pelos ratos lesionados, em relação aos não lesionados,

que mantiveram altos os níveis de lactato no teste. (54).

Steward. et al (87) estudou comportamento em campo aberto em ratos com lesão eletrolítica no CE .Observou uma máxima atividade exploratória entre 7 a 10 dias após a lesão, em relação a ratos não lesionados, que não apresentaram esta atividade. Após este tempo, os ratos voltaram a níveis normais de exploração; tempo necessário, segundo autores (78, 95), para que a organização e reinervação de vias aferentes, sobreviventes no giro denteado aconteçam. Posteriormente Lasher (58), interpretou a natureza da mudança comportamental, de retorno aos níveis normais entre os dias 5 e 10 , como decorrente de alguns ajustes reativos do cérebro em resposta à injúria.

Além disto, estudos mostram que animais lesionados por sucção do córtex entorrinal, mostram algumas irregularidades na atividade elétrica cerebral (92).

1. 5. EXCITOTOXICIDADE DOS AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS

Os receptores de aminoácidos excitatórios são os principais mediadores da excitação sináptica no SNC em mamíferos . Eles estão envolvidos em muitos fenômenos fisiológicos desde o processo de informação sensorial, até processos cognitivos de aprendizado e memória (94). Anormalidades destes sistemas observam-se em certas situações tais como epilepsia, esquizofrenia, ou neurodegenerações como nas doenças de Huntington e Alzheimer. Estudos de autoradiografia, com antagonistas de NMDA indicam perda neuronal de receptores NMDA que acompanham

estas doenças (64, 84).

Pelo menos três classes diferentes de sub-tipos de receptores de glutamato têm sido identificados usando ligantes e suas respostas fisiológicas (72, 94). Estes sub-tipos de receptores glutamatérgicos são o AMPA, kainato (57), os metabotrópicos (70), e o NMDA (33, 57, 59, 65, 72).

Aminoácidos excitatórios como o cisteato, e a cisteína, entre outros, atuam parcialmente nos receptores NMDA. O canal ligado ao receptor NMDA é controlado por íons Mg^{2+} , bloqueando a passagem de íons Ca^{2+} de forma voltagem-dependente (5, 57). Além disto a glicina também atua como antagonista do receptor NMDA. O mais potente antagonista seletivo deste receptor é o ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico o AP5 (72, 94).

Usando rádio-ligantes, pode-se observar em autoradiografia a ampla distribuição de receptores NMDA no cérebro. Ele está presente em alta densidade no córtex cerebral e hipocampo, principalmente; também está presente em septo e amígdala (57, 65, 94, 99). Além disto, a sua localização é sub-celular, uma evidência a favor de seu papel crítico em aprendizado, comportamento e plasticidade sináptica (33, 65, 94). O receptor AMPA apresenta-se amplamente distribuído no SNC, e sua localização é paralela aos receptores NMDA (3, 57, 72, 94).

Desde 1957 sabe-se que o L - glutamato é potencialmente tóxico em neurônios centrais (64, 99). Um padrão de danos neuronais foi evidenciado com a administração de análogos do glutamato em cérebro de animais adultos. Observou-se uma forte correlação entre o potencial neurotóxico e o excitatório,

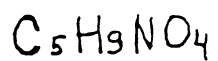
ficando assim estabelecido o termo excitotoxina (99).

A citotoxicidade do aminoácido NMDA deve-se ao excessivo influxo de Ca^{2+} (64). Tem-se observado que em fatias de cerebelo e hipocampo a omissão de Ca^{2+} na solução de incubação abole a toxicidade em todas as células neurais (12, 58, 59, 64). O acúmulo de Ca^{2+} intra-celular vai acompanhado de mudanças citopatológicas, relativas ao tempo e lugar de exposição envolvidos (8, 64, 80, 86). O período da exposição para causar dano irreversível nos neurônios está relacionado à concentração de NMDA (33, 64, 94, 99). Assim altas concentrações deste aminoácido em fatias cerebelares e do hipocampo matam as células em menos de 5 minutos, enquanto baixas concentrações tiveram este efeito em 30 minutos ou mais (8, 62, 87, 88). Em fatias hipocâmpais de ratos adultos, 10 μM de NMDA causa a morte de aproximadamente metade dos neurônios de CA1 em 90 minutos (33, 64, 65).

Diversos trabalhos mostram que o uso de NMDA (figura 1.b) como ferramenta lesionadora é bastante interessante, pois afeta apenas os corpos neuronais e os dendritos, poupando os axônios, terminais pré-sinápticos e células não neuronais (8, 81, 88). Após a lesão, ocorre uma proliferação de tecido glial, (8, 80).

Receptores do tipo NMDA não são encontrados na glia, sendo exclusivos dos neurônios (15, 89). Os mecanismos pelos quais os receptores NMDA são ativados e conduzem à morte celular ainda não foram bem elucidados, mas mudanças ultra estruturais tem sido observadas (8, 64, 81). Elas iniciam-se com o inchamento do aparelho de Golgi, acúmulo da cromatina no

A.



B.

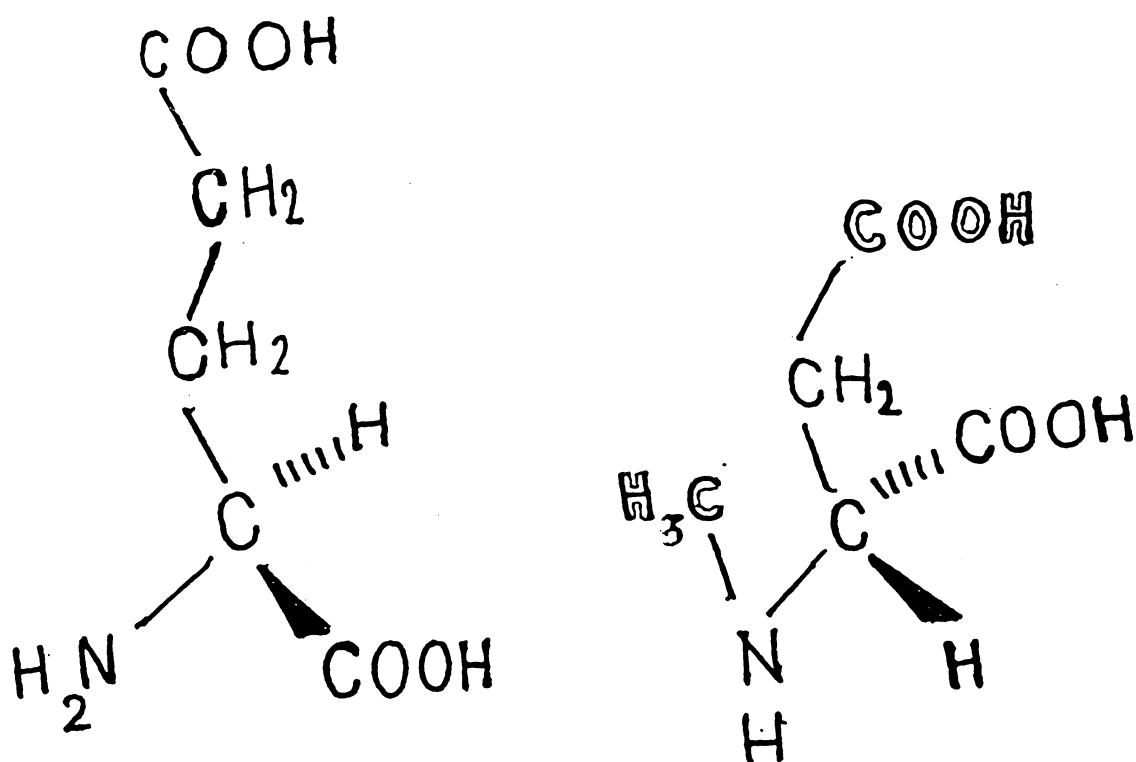


FIGURA 1

ESTRUTURA DO ÁCIDO GLUTÂMICO (1.A) PARA COMPARAÇÃO COM O N-METIL-D-ASPARTATO (1.B) O AGONISTA QUE DEFINE O SUBTIPO DE RECEPTOR NMDA

núcleo, inchamento das mitocôndrias e finalmente do citoplasma, juntamente com a perda das funções mitocondrial e nuclear (64, 81). Enzimas ativadas por Ca^{2+} devem contribuir com os efeitos excitotóxicos do aminoácido (64, 99). As principais enzimas às quais tem sido atribuído um papel neste processo são as enzimas Calpains I e II, que devem induzir a quebra do citoesqueleto. A produção de radicais livres gerados durante o metabolismo das purinas também deve contribuir para estes efeitos (64). Além disto estas enzimas são responsáveis pela quebra de PKC para produzir a proteína-quinase M, o fragmento cataliticamente ativo desta última (64). A PKC deve ser responsável pela prolongada fase de influxo de Ca^{2+} , após a recepção do aminoácido (59, 64, 67). Também parecem estar envolvidos, a Fosfolipase A₂, que produz ácido araquidônico, o qual pode ser metabolizado e produzir radicais livres, incrementando a liberação de glutamato e inibindo sua captação pela glia (4, 64, 72). Também a fosfolipase C, que gera inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃), o qual incrementa o Ca^{2+} citosólico; e também o diacil glicerol que ativa a PKC (5, 58, 59, 64). A Proteína cálcio-calmodulina-quinase II está envolvida na LTP (58, 64, 67). Podem ainda estar envolvidos nos mecanismos de morte neuronal endonucleases que fragmentam o DNA, óxido nítrico sintetase, a qual produz óxido nítrico (altamente tóxico porque colabora com os efeitos citotóxicos de macrófagos ativados através de inibição da respiração mitocondrial, da enzima aconitase do ciclo do ácido cítrico e da inibição da síntese de DNA) (64).

2. OBJETIVOS

Após provocar lesões do córtex entorrinal pela microinjeção intracerebral, bilateral, de NMDA:

- 1.- Estudar o comportamento dos animais assim lesionados nas tarefas de esQUIVA inibitoria, habituação e esQUIVA ativa de duas vias.
- 2.- Medir o consumo da glicose em córtex entorrinal e o hipocampo.
- 3.- Medir produção de lactato em córtex entorrinal e o hipocampo.

3 . MATERIAL E MÉTODOS

3 . 1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram usados ratos Wistar machos com idade média de 110 dias (peso entre 250 e 300 g) do biotério do Instituto de Biociências da UFRGS. Os animais eram alimentados " ad libitum " e eram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 / 12 horas (77).

3 . 2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de tiopental mono-sódico [2,5%], na dose de 40 mg/Kg (mais eventuais suplementações) e foram colocados em um aparelho estereotático David Kopf # 1404, (figura 2) com inclinação da cabeça de -0,33 cm conforme o atlas de Paxinos e Watson (76) para tal faixa de pesos.

A superfície do crânio foi exposta mediante uma incisão sagital e, com o emprego de uma broca odontológica, foram abertos dois orifícios, um de cada lado nos locais correspondentes às coordenadas antero- posterior (AP) e latero-laterais (LL) da estrutura em questão. Uma agulha fina "Mizzy" com diâmetro externo de 0,33 mm, calibre (gauge) 31, presa à torre móvel era baixada suavemente através de cada um desses orifícios e introduzida no cérebro até a coordenada dorso-ventral (DV) final. Esta agulha estava conectada a uma microseringa Hamilton de 5 µl contendo a droga (NMDA 10mg/ml) ou solução salina 0,9 g % (para o animal controle), a ser injetada lentamente. A operação era repetida para a estrutura contralateral.

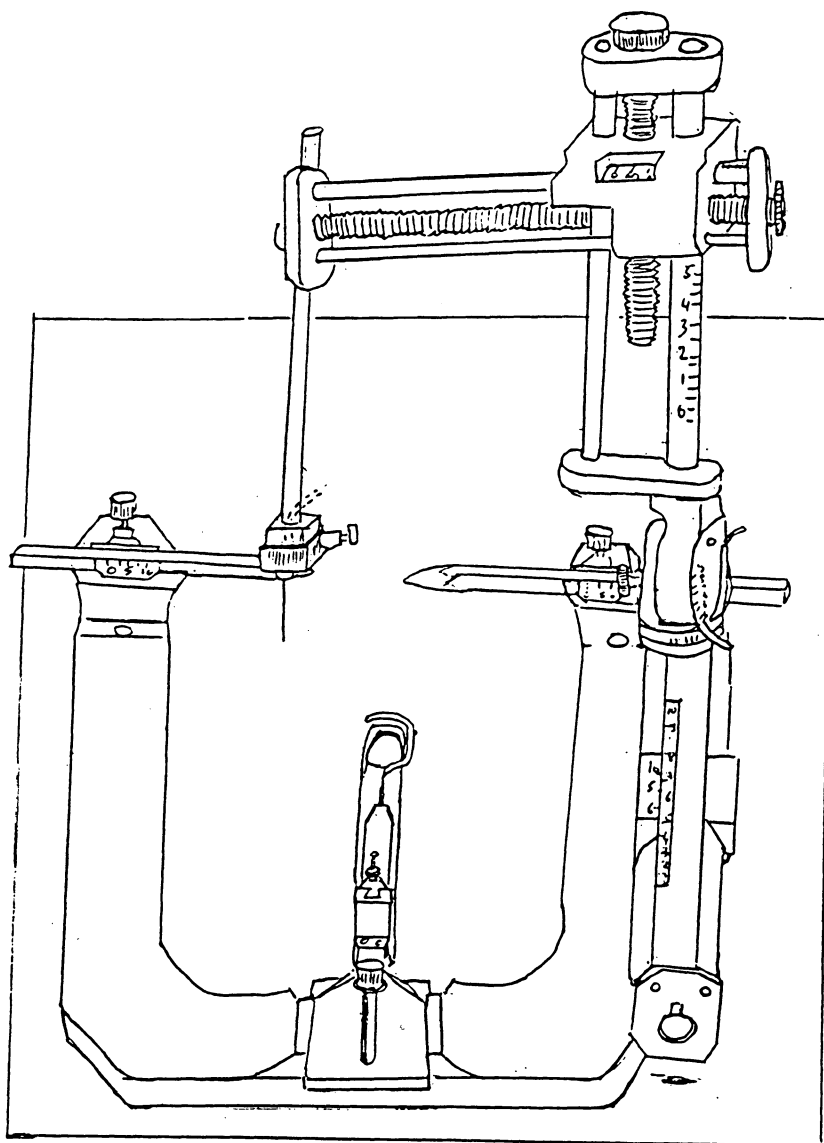


FIGURA 2

APARELHO ESTEREOTÁXICO DAVID KOPF # 1404 USADO PARA REALIZAR MICROINJEÇÃO DIRECTA NO CÓRTEX ENTORRINAL.

As coordenadas do córtex entorrinal foram obtidos inicialmente a partir do atlas de Paxinos & Watson (76) e confirmadas na prática, mediante injeções com o corante azul-trypan, que é moderadamente aniônico. As coordenadas finais (em cm) obtidas para o córtex entorrinal, foram AP= -0,87; LL= $\pm$ 0,50 do bregma e DV = - 0,58 a partir da dura mater. A droga era injetada num tempo de 2 minutos, e aguardava-se 5 minutos antes da agulha ser lentamente retirada, para se obter uma máxima difusão da droga, segundo trabalhos que usaram anteriormente o NMDA para fins semelhantes (8, 81).

Logo após a microinjeção os animais eram suturados com fio estéril e aplicava-se o antibiótico despacilina 400.000 UI intramuscular 0,1 ml. Cinco a sete dias depois de realizada a cirurgia com NMDA eram realizadas as tarefas comportamentais, tempo necessário para estabelecer a lesão (8) ou eram sacrificados para os experimentos bioquímicos.

3 . 3. PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

3.3.1. Esquiva Inibitória: Foi realizada numa caixa de condicionamento automatizada Albarsch de acrílico com 50 cm de comprimento 25 cm de largura, e 25 cm de altura , de face frontal transparente . O assoalho consistia de uma grade com barras de bronze cilíndricas de 1 mm de diâmetro, colocadas paralelamente a 1 cm uma da outra, nas quais se aplicava uma diferença de potencial elétrico de intensidade variável. Do lado esquerdo da caixa, havia uma plataforma de madeira revestida com fórmica, com 8 cm de largura e 5 cm de altura.

Na sessão de treino, os animais eram colocados cuidadosamente no canto posterior esquerdo sobre a plataforma, e liberto o animal, cronometrava-se a latência de descida da plataforma com as quatro patas sobre a grade. Acionava-se então uma corrente elétrica de 0,5 mA de intensidade, 60 Hz de frequência de forma intermitente de 2 em 2 segundos, a qual era mantida até que o animal subisse de volta para a plataforma.

Na sessão de teste, passadas 24 horas após o treino, os animais eram recolocados na caixa de condicionamento da mesma forma já descrita. Novamente era medida a latência de descida da plataforma a qual foi adotada como índice de memória ou "escore de retenção" (35, 38). O tempo foi registrado até que os animais desciam da plataforma.

3.3.2. Esquiva Ativa de Duas Vias : Realizada numa caixa de condicionamento automatizada Albarsch com as mesmas dimensões da caixa empregada para a esquiva inibitória, mas sem plataforma sobre o assoalho, que estava dividido em 2 metades. A sessão de treino começava por um período de 3 minutos para que o animal se habituassem à caixa, sem receber qualquer estímulo. Logo após apresentava-se uma série de 30 tons de 5 segundos; 70 dB e 1 KHz, emitidos em intervalos randômicos variando entre 10 e 50 segundos, seguidos cada qual por um choque elétrico de 0,5 mA de intensidade nas patas do animal, através da grade metálica.

Cada choque foi aplicado no lado da caixa em que o animal se encontrava no momento em que era emitido o tom e era mantido até

que o animal cruzasse de lado. Para evitar o choque elétrico, os animais deviam aprender a emitir a resposta de cruzamento ou esquiva (fuga) durante os 5 segundos de apresentação do tom, estivessem do lado que estivessem (duas vias). A apresentação dos estímulos (tom e choque) e o registro das respostas de cruzamento ou esquiva eram realizados automaticamente por um sistema eletrônico.

A sessão de teste era realizada 24 horas após o treino, expondo de novo os animais à caixa, mas com o período de habituação reduzido de 3 para 1 minuto. A diferença teste-treino do número de respostas de esquiva ou fugas foi usado como medida de memória (35), também chamada "escore de retenção". No treino e no teste, mediu-se também o número de vezes que o animal cruzou a caixa de um lado para o outro espontaneamente, não em resposta ao estímulo. Tais cruzamentos interprova foram considerados como um índice de atividade motora dos animais (10).

3.3.3. Habituação Ao Campo Aberto: Foi realizada numa caixa de madeira envernizada, com 60 cm de largura, 40 cm de profundidade e 50 cm de altura, com a parede frontal de vidro. O fundo da caixa era liso, revestido de linóleo , e dividido com linhas pretas desenhadas formando doze retângulos iguais de 15 cm x 13,3 cm.

No treino, os animais eram colocados com a cabeça voltada para o canto esquerdo posterior da caixa, e deixados livres para explorar a arena por 3 minutos, retornando depois, as suas caixas moradia (contou -se o número de respostas de orientação, elevando o trem dianteiro, "rearings"), o número de cruzamentos de

um retângulo a outro (considerado índice de atividade motora), e o número de bolos fecais (como índice de emocionalidade ou medo geral à situação). Na sessão de teste, o animal era colocado na caixa outra vez de forma idêntica à do treino (38,70).

3 . 4. PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS

3.4.1. Preparação da Amostra: Foram usados ratos Wistar adultos, mantidos como anteriormente citado, para comportamento. Um grupo de 12 animais foi operado para microinjeção de NMDA no córtex entorrinal. Outros 12 ratos foram operados e injetados com solução salina 0,9%, e 12 foram deixados intactos. sete dias após realizadas as operações, seis animais de cada grupo foram treinados na tarefa de esquiva inibitória, como indicado no procedimento comportamental acima.

Os outros 6 animais de cada grupo foram diretamente sacrificados por decapitação.

O cérebro de cada animal foi removido e imediatamente transferido a uma placa de vidro sobre gelo. Os bulbos olfatórios, ponte, medula e cerebelo foram descartados, para unicamente separar duas estruturas, o hipocampo e o córtex entorrinal. Estas estruturas foram cortadas em um microfatador ou "Chopper" de McIlwain (figura 3) em duas direções para obter microprismas de 40 μ m de espessura. O tecido era então pesado diretamente em copos de Becker, onde era mantido em tampão Krebs-Ringer-bicarbonato pH 7,0 composto de:

Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3).....0,65 M (5,46%)
Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4)...0,031 M (0,42%)

Cloreto de Potassio (KCl).....0,12 M (0,92%)
 Sulfato de Magnésio (MgSO₄).....0,031 M (0,76%)
 Cloreto de Sódio (NaCl).....3,08 M (18%)
 Cloreto de Cálcio (CaCl₂).....0,085 M (0,98%),
 dissolvidos em água destilada.
 O pH foi ajustado com NaOH 10 N (22).

III.4.2. Consumo de Glicose: Prismas de hipocampo ou córtex entorrinal pesando 50 mg aproximadamente eram transferidos aos beakers e, após adicionado o tampão (450 µl) adicionava-se 5 µl de glicose na concentração de 5 mM. Os prismas eram incubados a 37 C em banho metabólico com agitação (30 agitações por minuto) em atmosfera de carbogênio (5% CO₂ ; 95% O₂) por hora. Após a incubação, foi retirada uma alíquota de 20 µl do meio de incubação para dosagem de glicose (em duplicata), pelo método da glicose oxidase (90), utilizando um Kit de dosagem de glicose da Doles.

A captação de glicose pelas 2 estruturas foi determinada a partir da curva padrão de glicose, subtraindo a quantidade encontrada após a incubação da quantidade total conhecida antes da incubação; o volume final foi de 0,5 ml. Os resultados foram expressos como µmoles de glicose consumida / mg de tecido / hora de incubação (22.23).

III.4.3. Produção de Lactato : Prismas de hipocampo e córtex entorrinal foram incubados em tampão Krebs-Ringer- bicarbonato pH 7,0, conforme anteriormente descrito. Após a incubação, foi adicionado ácido perclórico 0,6 N no meio de incubação na proporção 2 volumes de ácido perclórico para um de meio

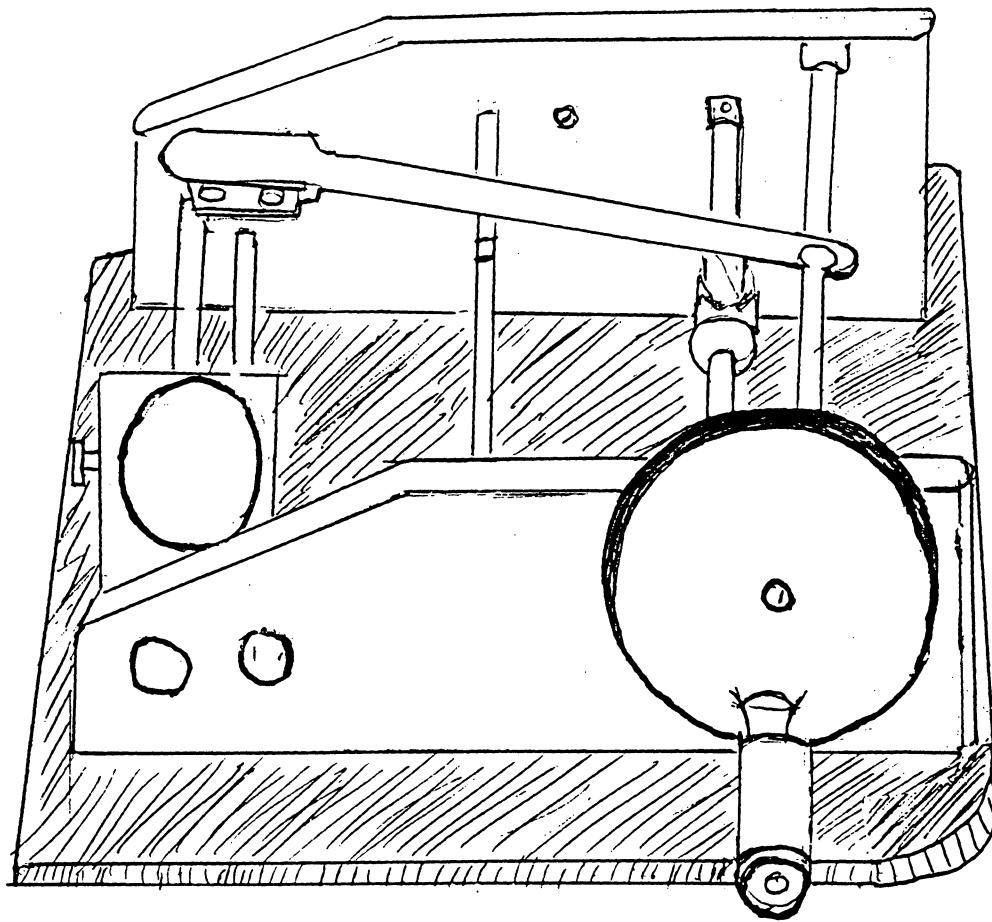


FIGURA 3

MICROFATIADOR DE McILWAIN USADO PARA CORTAR O HIPOCAMPO E O CÓRTEX ENTORRINAL (40 μm DE ESPESSURA) PARA OBTER MICROPRISMAS DESTAS ESTRUTURAS.

de incubação (concentração final de perclorato = 0,4 N). A mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos; posteriormene, o pH foi acertado com indicador universal e neutralizado com 100 μ l de hidróxido de potassio 20% . Para precipitar o perclorato formado, deixou-se as amostras no "freezer" por 5 minutos. Foram retirados os sobrenadantes para dosagem de lactato. Para tal usou-se um Kit da Boehringer, sendo o incremento na NADH, medida pela mudança de extinção a 334 nm é diretamente proporcional à concentração de lactato (73).

Usando uma curva padrão para lactato foram medidas as concentrações em μ mol de lactato formado / mg de tecido / hora de incubação (22, 93).

3 . 5. PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

A fim de verificar se foi atingida a região correta do cérebro do animal pelas injeções estereotáticas (em cm): AP = -0,67; LL = $\pm$ 0,50 e DV = -5,8 finais, foram examinados cortes histológicos de animais injetados com 0.5 μ l de azul de metileno 2 % no córtex entorrinal, confirmando o lugar. Foram examinados cortes histológicos de todos os animais lesionados, e também dos ratos controle operados com salina, que foram utilizados para as tarefas comportamentais. Os cérebros dos animais recém sacrificados foram rapidamente dissecados e colocados em solução de formaldeído 3,7% por 24 a 72 horas. Posteriormente foram feitos macrocortes, para observar no microscópio as marcas deixadas pela agulha no tecido cerebral (figura 4). Alguns

animais foram aleatoriamente selecionados, e sacrificados por perfusão com formaldeído a 10 % , após lavagem da árvore vascular com solução salina 0,9 g % . Dissecado o cérebro e fixado em bloco de parafina, foram feitos cortes de 7 micras em micrótomo rotatório. O material foi montado em lâminas, corado pela técnica de hematoxilina-eosina (24, 77), e examinado ao microscópio para determinação da posição da agulha e o estabelecimento da lesão mediante observação das características celulares na região lesionada.

3 . 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para as comparações dos resultados bioquímicos realizou-se a análise de variância de Duas Vias (ANOVA). A comparação de mais de dois grupos, no comportamento foi realizada por análise de variância de Uma Via (ANOVA), seguida quando indicado, pelo teste de Neuman-Keuls, para classificação das médias.

Os dados comportamentais foram submetidos ao teste t de Student para medidas repetidas (treino e teste) de cada grupo. As análises foram efetuadas em um microcomputador IBM / PC XT compatível.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO CE SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA

Os resultados do trabalho mostraram que a lesão pré-treino do córtex entorrinal na tarefa de esquiva inibitória, afeta o desempenho para esta tarefa. Comparados com os ratos controle, injetados com salina e os intactos, os animais lesionados tiveram um desempenho significativamente diferente no treino, (ANOVA, $p < 0,05$), como mostra a tabela I. Também no teste os ratos lesionados demoraram menos tempo para descer da plataforma. Os controles ficaram em média mais tempo sobre a plataforma, com diferença significativa quando comparados, com os ratos lesionados (ANOVA, $p < 0,05$). A diferença treino - teste observada nos grupos separadamente, foi significativamente diferente para todos eles (Teste t student, $p < 0,001$) (tabela I).

4.2. EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO CE SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS

Os animais que foram lesionados antes do treino, na tarefa de esquiva ativa de duas vias, mostraram uma diferença significativa quando comparados com os grupos controle. O grupo salina teve em média $5 \pm 0,7$ fugas, no treino, semelhante ao desempenho do grupo lesionado que teve em média $4,3 \pm 1,9$ fugas; ambos os grupos foram diferentes significativamente do grupo intacto. Já no teste, os grupos controle melhoraram significativamente o seu desempenho, tanto os animais intactos (teste t pareado de Student, $p < 0,001$),

como os injetados com salina (teste t pareado de Student, $p < 0.005$). Os ratos lesionados, no entanto, não apresentaram melhora no desempenho, não evidenciando assim, memória para a tarefa. Os dados estão mostrados na tabela II. Nesta tarefa registrou-se também o número de cruzamentos inter-prova ; como mostra a tabela III não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

4.3. EFEITO DA LESÃO PRÉ-TREINO DO CE SOBRE A TAREFA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

Na tarefa de habituação ao campo aberto , não houve diferença significativa no número de respostas de orientação ("rearings") no número de cruzamentos, nem no número de bolos fecais entre os grupos (tabelas IV, V e VI), no treino e nem no teste (ANOVA, $p > 0,05$). Mostrando, que o grupo lesionado tem desempenho semelhante aos grupos controles, para esta tarefa.

4.4. EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO CE SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA

No treino não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$). No teste o grupo controle intacto foi diferente significativamente dos outros 2 grupos operados, que mostraram um menor desempenho para a tarefa (ANOVA , $p < 0,05$). A diferença teste - treino entre os grupos também foi significativa (ANOVA, $p < 0,05$). Houve maior diferença significativa entre o grupo lesionado, e o grupo controle intacto (Neuman-Keuls, $p < 0,001$) (tabela VII).

TABELA I

Efeito da lesão pré-treino do córtex entorrinal com NMDA sobre o desempenho dos animais na tarefa de esquiiva inibitória, valores expressos como media $\pm$ erro padrão (treino) da latência para descida da plataforma (em segundos); choque 0,5 mA.

GRUPO	N	TREINO *	TESTE *	Δ TESTE-TRENO *
C. Intacto	7	12,4 $\pm$ 1,6	518,9 $\pm$ 58,6	505,8 $\pm$ 59,4
C. Salina	8	8,5 $\pm$ 1,5	565,7 $\pm$ 56,9	557,2 $\pm$ 56,5
L.NMDA	8	5,6 $\pm$ 1,6 ^a	354,9 $\pm$ 32,4 ^a	337,5 $\pm$ 32,2 ^a

* Há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$)

^a Difere significativamente (teste Neuman-Keuls, $p < 0,05$).

† Há diferença significativa entre treino e teste para cada grupo separadamente, (teste t pareado de Student, $p < 0,001$).

TABELA II

Efeito da lesão pré-treino do córtex entorrinal com NMDA, sobre o desempenho dos animais na tarefa de esquiva ativa de duas vias. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão do número de fugas

GRUPO	N	TREINO *	TESTE *	Δ TESTE-TREINO
C. INTACTO	8	11,0 $\pm$ 1,8 ^a	19,38 $\pm$ 1,3	8,4 $\pm$ 1,3 †
C. SALINA	8	5,0 $\pm$ 0,7	13,75 $\pm$ 2,5	8,3 $\pm$ 1,9 ‡
L. NMDA	8	4,3 $\pm$ 1,9	5,25 $\pm$ 1,8 ^b	0,8 $\pm$ 1,3 ^b ≠

* Há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

a Difere significativamente, (teste Neuman-Keuls, $p < 0,05$).

b Difere significativamente, teste (Neuman-Keuls, $p < 0,01$).

† Há diferença significativa entre treino e teste, para cada grupo separadamente (teste t pareado de Student $p < 0,025$).

≠ Não difere significativamente (teste t pareado de Student, $p > 0,05$).

TABELA III

Efeito da lesão do córtex entorrinal pré-treino, sobre o número de cruzamentos inter prova da tarefa de esquiiva ativa de duas vias , valores expressos como media $\pm$ erro padrão

GRUPO	N	TREINO A	TESTE A
C. INTACTO	8	5,63 $\pm$ 1,0	4,13 $\pm$ 0,91
C. SALINA	8	10,0 $\pm$ 8,0	6,75 $\pm$ 2,0
L. NMDA	8	8,13 $\pm$ 2,0	4,13 $\pm$ 0,8

A. Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$)

TABELA IV

Efeito da lesão pré-treino do córtex entorrinal com NMDA sobre o desempenho dos animais na tarefa de habituação ao campo aberto, dados expressos como média $\pm$ erro padrão de número de respostas de orientação (rearing) e diferença treino-teste (intervalo treino teste 24 horas).

GRUPO	N	TREINO A	TESTE A	Δ TREINO-TESTE A
C. INTACTO	9	11,22 $\pm$ 1,9	8,3 $\pm$ 1,9	3,0 $\pm$ 1,4 †
C. SALINA	12	10,83 $\pm$ 1,3	9,3 $\pm$ 1,8	2,9 $\pm$ 1,3 †
L. NMDA	8	12,44 $\pm$ 2,4	7,2 $\pm$ 1,7	5,2 $\pm$ 1,9 †

A Não há diferença significativa entre os grupos ANOVA, $p > 0,05$)

† Diferença significativa entre treino e teste, para cada grupo separadamente (teste t pareado de Student, $p < 0,05$).

TABELA V

Efeito da lesão pré-treino no córtex entorrinal com NMDA sobre o número de cruzamentos na tarefa de habituação ao campo aberto. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão do número de cruzamentos (intervalo-treino teste 24 horas).

GRUPO	N	TEINO A	TESTE A
C. INTACTO	9	31,56 $\pm$ 6,0	27,44 $\pm$ 5,0
C. SALINA	12	33,12 $\pm$ 5,3	28,0 $\pm$ 3,4
L. NMDA	8	29,67 $\pm$ 8,0	19,33 $\pm$ 3,3

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $P > 0,05$)

TABELA VI

Efeito da lesão pré-treino no córtex entorrinal com NMDA sobre o número de bolos fecais. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão (intervalo treino e teste 24 horas).

GRUPO	N	TREINO A	TESTE A
C. INTACTO	9	2.6 $\pm$ 0,6	2.44 $\pm$ 0,5
C SALINA	12	2.67 $\pm$ 0,5	2.58 $\pm$ 0,4
L. NMDA	8	3.67 $\pm$ 0,7	1.89 $\pm$ 0,7

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

4.5. EFITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO CE SOBRE A TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS

Os resultados dos animais lesionados pós-treino no córtex entorrinal na tarefa de esquiva ativa de duas vias mostraram que o número de fugas no treino não foi significativamente diferente (ANOVA, $p > 0,05$).

Já no teste, como mostram a tabela VIII, houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$). O grupo intacto, foi significativamente diferente do grupo controle salina, e do grupo lesionado (Neuman-Keuls, $p < 0,05$). O grupo controle intacto e o grupo controle salina apresentaram aumento significativo no número de fugas, entre treino e teste (teste t pareado de Student, $p < 0,001$). O grupo lesionado não apresentou aumento significativo no número de fugas no teste em relação ao treino (teste t pareado de Student, $p > 0,05$). Comparando as medias da diferença teste menos treino dos três grupos, elas foram significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$).

O número de cruzamentos inter-prova pode ser observado na tabela IX. No treino não há diferença significativa entre os grupos. No teste há uma diferença significativa entre as medias dos cruzamentos do grupo lesionado comparados com o grupo controle intacto e controle salina (ANOVA, $p < 0,05$).

TABELA VII

Efeito da lesão do córtex entorrinal com NMDA 24 horas após o treino sobre desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória, valores expressos como média $\pm$ erro padrão (treino) da latência para descida da plataforma (em segundos) intervalo treino-teste sete dias.

GRUPO	N	TREINO A	TESTE *	Δ TESTE-TREINO *
C. INTACTO	7	12,4 $\pm$ 1,6	518,0 $\pm$ 48,6 ^b	505,8 $\pm$ 59,4 †
C. SALINA	8	8,7 $\pm$ 1,8	394,8 $\pm$ 62,8	386,1 $\pm$ 62,9 †
L. NMDA	8	14,2 $\pm$ 1,7	199,5 $\pm$ 16,5	186,7 $\pm$ 18,1 ^b ≠

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$)

* Há diferença significativa entre os grupos. (ANOVA, $p < 0,05$)

^b Difere significativamente (teste Neuman-Keuls, $p < 0,05$).

† Há diferença significativa entre treino e teste, para cada grupo separadamente (Teste t pareado de Student, $p < 0,001$)

≠ Não há diferença entre treino e teste (teste t pareado de Student, $p > 0,05$).

TABELA VIII

Efeito da lesão do córtex entorrinal com NMDA 24 horas após treino, sobre o desempenho dos animais na tarefa de esquiwa ativa de duas vias. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão do número de fugas e diferença teste-treino; intervalo treino teste de 7 dias.

GRUPO	N	TREINO A	TESTE *	Δ TESTE-TREINO *
C. INTACTO	8	11,0 $\pm$ 1,8	19,3 $\pm$ 1,3 ^b	8,4 $\pm$ 1,3 †
C. SALINA	10	8,7 $\pm$ 1,6	13,6 $\pm$ 1,2	4,9 $\pm$ 1,0 †
L. NMDA	10	13,9 $\pm$ 1,6	9,9 $\pm$ 1,2	-4,0 $\pm$ 1,7 ^b ≠

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

* Há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

^b Difere significativamente (teste Neuman-Keuls, $p < 0,05$).

† Diferença significativa entre treino e teste, para cada grupo (teste t pareado de Student, $p < 0,001$).

≠ Não há diferença significativa entre treino e teste, para o grupo lesionado (teste t, pareado de Student, $p > 0,05$).

TABELA IX

Efeito da lesão pós treino do córtex entorrinal com NMDA sobre o número de cruzamentos inter-prova na tarefa de esquivas ativa de duas vias . Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (intervalo treino-teste de 7 dias).

GRUPO	N	TREINO A	TESTE *
C. INTACTO	8	5,63 $\pm$ 1,0	4,13 $\pm$ 0,9
C. SALINA	10	5,80 $\pm$ 1,3	0,30 $\pm$ 0,9
L. NMDA	10	9,50 $\pm$ 2,1	8,90 $\pm$ 2,4 ^b

A Não há diferença significativa entre os grupos no treino
(ANOVA, $p > 0,05$)

* diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$)

b Difere significativamente, teste Neuman-Keuls, $p < 0,05$).

4.6. EFEITO DA LESÃO PÓS-TREINO DO CE SOBRE A TAREFA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

Na tabela X se observa que os grupos lesionados pós-treino, comparados com os outros dois grupos controle, na tarefa de habituação ao campo aberto não apresentaram diferença significativa no número de respostas de orientação (ANOVA, $p > 0,05$). Cada grupo independentemente apresentou menor número de respostas de orientação no teste em relação ao treino .

A tabela XI mostra que não há diferença significativa entre os grupos no número de cruzamentos na tarefa de habituação ao campo aberto (ANOVA, $p > 0,05$). A tabela XII mostra a média do número de bolos fecais no treino e no teste para cada grupo. Não há diferença significativa entre eles (ANOVA, $p > 0,05$).

TABELA X

Efeito da lesão pós-treino no córtex entorrinal com NMDA sobre o desempenho dos animais nas tarefas de habituação ao campo aberto .

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão do número de respostas de orientação (rearing), e diferenças treino - teste; intervalo treino-teste de 7 dias .

GRUPO	N	TREINO A	TESTE A	Δ TREINO-TESTE A
C. INTACT	10	12,60 $\pm$ 1,8	9,7 $\pm$ 1,5	2,91 $\pm$ 0,5 $\uparrow$
C. SALINA	8	16,10 $\pm$ 1,3	11,62 $\pm$ 1,2	4,75 $\pm$ 1,7 $\uparrow$
L. NMDA	10	16,0 $\pm$ 1,6	13,2 $\pm$ 1,8	2,9 $\pm$ 1,3 $\uparrow$

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$)

$\uparrow$ Há diferença significativa entre treino e teste, para cada grupo separadamente (teste t pareado de Student, $p < 0,005$).

TABELA XI

Efeito da lesão pós-treino do córtex entorrinal, com NMDA, sobre o número de cruzamentos dos animais na tarefa de habituação ao campo aberto. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão do número de cruzamentos (intervalo treino-teste de 7 dias).

GRUPO	N	TREINO A	TESTE A
C. INTACTO	10	51,90 $\pm$ 3,0	58,80 $\pm$ 3,2
C. SALINA	8	46,12 $\pm$ 1,9	45,12 $\pm$ 2,0
L. NMDA	10	59,8 $\pm$ 2,7	51,30 $\pm$ 3,5

A Não há diferença significativa entre os grupos (anova $p > 0,05$)

TABELA XII

Efeito da lesão pós-treino no córtex entorrinal com NMDA sobre número de bolos fecais na tarefa de habituação ao campo aberto. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão do número de bolos fecais (intervalo treino- teste de 7 dias).

GRUPO	N	TREINO A	TESTE A
C. INTACTO	10	3,50 $\pm$ 0,5	1,60 $\pm$ 0,5
C. SALINA	8	2,63 $\pm$ 0,1	0,88 $\pm$ 0,6
L. NMDA	10	2,90 $\pm$ 0,3	1,90 $\pm$ 0,3

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

4.7. EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO CE SOBRE O CONSUMO DE GLICOSE EM MICROPRISMAS DE HIPOCAMPO

A lesão do córtex entorrinal não teve efeito sobre a captação de glicose.

A tarefa de esQUIVA inibitória também não alterou o consumo de glicose do hipocampo (ANOVA, $p > 0,05$) como mostra a tabela XIII.

4.8. EFEITO DA LESÃO COM NMDA NO CE SOBRE O CONSUMO DE GLICOSE EM MICROPRISMAS DE CÓRTEX ENTORRINAL

A lesão de córtex entorrinal não teve efeito significativo no consumo de glicose, nem o treino em esQUIVA inibitória alteraram o consumo de glicose de microprismas do córtex entorrinal (ANOVA, $p > 0,05$). Em relação aos grupos controle, os dados são mostrados na tabela XIV.

4.9. EFEITO DA LESÃO COM NMDA DO CE SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO EM MICROPRISMAS DE HIPOCAMPO

Também resultou negativo o efeito da lesão de córtex entorrinal e da esQUIVA inibitória sobre a produção de lactato em microprismas de hipocampo (ANOVA, $p > 0,05$), como mostra a tabela XV

4.10 EFEITO DA LESÃO COM NMDA NO CE SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO EM MICROPRISMAS DE CÓRTEX ENTORRINAL

A produção de lactato em microprismas de córtex entorrinal também não foi afetada pela lesão de C.E. por NMDA ou pelo treino na esQUIVA inibitória (ANOVA, $p > 0,05$). (tabela XVI).

TABELA XIII

Efeito da lesão bilateral com NMDA (5 μ g) no córtex entorrinal , com ou sem treino na tarefa de esquiiva inibitoria (choque 0,5 mA); sobre o consumo de glicose em microprismas de hipocampo. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão de μ M de glicose consumida / mg de tecido / hora de incubação.

GRUPO	N	G L I C O S E		A
		μ M / mg / hora		
1.- INTACTO COM TREINO	6	0.597	$\pm$ 0.104	
2.- INTACTO SEM TREINO	6	0.444	$\pm$ 0.043	
3.- SALINA COM TREINO	6	0.610	$\pm$ 0.081	
4.- SALINA SEM TREINO	6	0.516	$\pm$ 0.102	
5.- L.NMDA COM TREINO	6	0.540	$\pm$ 0.065	
6. L.NMDA SEM TREINO	6	0.566	$\pm$ 0.064	

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA de duas vias $p > 0.05$).

TABELA XIV

Efeito da lesão bilateral com NMDA (5 μ g) no córtex entorrinal, sobre a captação de glicose por microprismas da área lesionada, com e sem treino na tarefa de esQUIVA inibitória, (choque 0,5 mA e 60 Hz de frequência). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão de μ M glicose consumida / mg de tecido / hora de incubação.

GRUPO	N	G L I C O S E		A
		μ M / mg / hora		
1.-INTACTO COM TREINO	6	0.490	$\pm$ 0.086	
2.-INTACTO SEM TREINO	6	0.473	$\pm$ 0.094	
3.-SALINA COM TREINO	6	0.488	$\pm$ 0.067	
4.-SALINA SEM TREINO	6	0.510	$\pm$ 0.071	
5.-L.NMDA COM TREINO	6	0.603	$\pm$ 0.110	
6.-L.NMDA SEM TREINO	6	0.493	$\pm$ 0.099	

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, de duas vi as $p > 0,05$).

TABELA XV

Efeito da lesão bilateral com NMDA (5 μ g) do córtex entorrinal, ratos injetados com salina (0,9 %) com ou sem treino na tarefa de esquiva inibitória (choque 0,5 mA, 60 Hz de frequência) sobre a produção de lactato em hipocampo. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão em μ M de lactato produzido / mg de tecido / hora de incubação.

GRUPO	N	L A C T A T O	A
		μ M / mg / hora	
1.-SALINA COM TREINO	6	0.108 $\pm$ 0.018	
2.-SALINA SEM TREINO	5	0.101 $\pm$ 0.023	
3.-L. NMDA COM TREINO	6	0.100 $\pm$ 0.022	
4.-L. NMDA SEM TREINO	6	0.109 $\pm$ 0.018	

A: A diferença entre os grupos não é significativa.

(ANOVA, de duas vias $p > 0,05$).

TABELA XVI

Efeito da lesão bilateral com NMDA (5 μ g) do córtex entorrinal sobre a produção de lactato por prismas da área lesionada, com ou sem treino na tarefa de esquiva inibitória (choque 0.5 mA 60 Hz de frequência). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão de μ M de lactato produzido / mg de tecido / hora de incubação.

GRUPO	N	L A C T A T O	A
		μ M / mg / hora	
1.-SALINA COM TREINO	6	0.100 $\pm$ 0.014	
2.-SALINA SEM TREINO	6	0.113 $\pm$ 0.014	
3.-L.NMDA COM TREINO	6	0.128 $\pm$ 0.023	
4.-L.NMDA SEM TREINO	6	0.088 $\pm$ 0.029	

A Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, de duas vias $p > 0,05$).

4. 11 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Observou-se histologicamente todos os ratos lesionados, e os injetados com salina. Dividiu-se em dois grupos, um para observações macroscópicas, do sinal da agulha deixado na área do C.E. lesionado; e o outro para observações microscópicas do tecido lesionado.

Observações Macroscópicas. Dos cérebros escolhidos para tal, 84,4 % apresentaram o sinal da agulha corretamente no C.E. bilateralmente (figura 4). Os 12,7 % dos cérebros observados, também apresentaram o sinal correto unilateralmente. Os restantes 4,9 % dos cérebros que não apresentaram o sinal corretamente, foram excluídos dos experimentos comportamentais ou bioquímicos.

Observações Microscópicas. Foram escolhidos aleatoriamente 25 % do total de cérebros, para observar o C.E. lesionado pela técnica de hematoxilina-eosina. Destes 84,3 % correspondentes aos ratos injetados com NMDA no C.E. apresentaram mudanças do tecido cortical, similares ao descrito na literatura (8, 62, 78); em contraste com o tecido do C.E. dos ratos controle intacto, (3,2 % dos escolhidos). As mudanças observadas consistem, na perda de células neuronais, proliferação do tecido glial, e eventualmente foram observados macrófagos. O 10,5 % correspondente aos ratos injetados com salina, apresentaram unicamente o sinal da agulha. Os 2 % injetados com NMDA, mas que não apresentaram nenhuma mudança na região-alvo, foram eliminados dos experimentos comportamentais ou bioquímicos.

ENTORRINAL

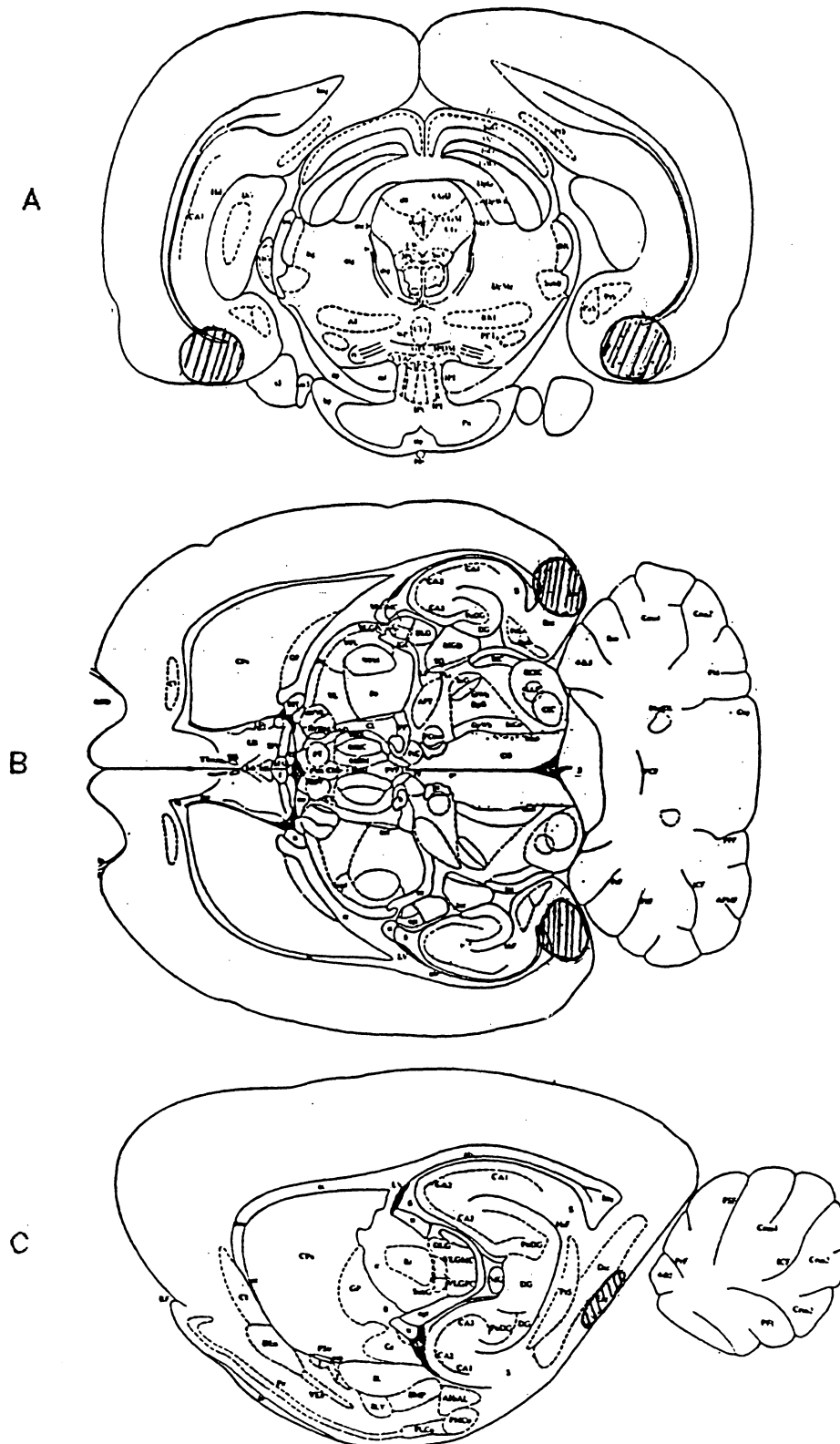


FIGURA 4

CORTES CORONAL (A) HORIZONTAL (B) E SAGITAL (C) DO CEREBRO DE RAT (ATLAS DE PAXINOS E WATSON 1986). AO NÍVEL DO CÓRTEX ENOTORRINAL. REGIÃO MARCADA INDICA ÁREA-ALVO ATINGIDA PELO NMDA.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo observar possíveis alterações no comportamento de animais lesionados com NMDA no córtex entorrinal, assim como observar possíveis mudanças no metabolismo energético cerebral através da medida do consumo de glicose e da produção de lactato em microprismas de hipocampo e córtex entorrinal.

5. 1 COMPORTAMENTO

Os resultados comportamentais mostraram que ratos lesionados no córtex entorrinal têm uma latência menor para descer da plataforma em relação aos ratos controle (ANOVA, $p < 0,05$). Os ratos lesionados apresentaram amnésia parcial para a tarefa de esquiva inibitória. Os valores obtidos pelo teste t pareado de Student, mostraram que em cada grupo houve diferença significativa entre a sessão de treino e o teste. Algo parecido aconteceu nos ratos lesionados pós-treino. O teste t pareado de Student, também foi significativamente diferente, entre treino e teste de cada grupo (teste t pareado de Student, $p < 0,001$).

O grupo intacto na sessão de teste, teve um desempenho melhor não apenas em relação aos ratos operados com NMDA (lesionados) mas também em relação ao grupo de animais controle

operados com salina (ANOVA, $p < 0,05$). No entanto, comparando as diferenças entre treino e teste dos grupos, a maior diferença está entre o grupo intacto e o grupo lesionado (ANOVA, $p < 0,01$). Efeito amnésico tem sido observado, injetando agonistas de receptores inibitórios GABAérgicos (muscimol) ou antagonistas de receptores excitatórios glutamatérgicos (AP5) (25, 26, 49, 51).

A perda neuronal provocada pelo NMDA na mesma região, provocou amnésia parcial da tarefa.

Os animais lesionados pré-treino e pós-treino na tarefa de esquiiva ativa de duas vias mostraram um comportamento semelhante nas duas situações. A lesão no córtex entorrinal afetou a memória deste grupo. Isto indica que esta tarefa é mais sensível a esta lesão que a esquiiva inibitória. Dado o papel integrador do C.E. para informações adquiridas consecutivamente (26, 46, 49, 100), é possível que o efeito da lesão sobre esta tarefa se deva ao carácter consecutivo da aquisição da mesma: usando vários processos (31) em vez de só um como na esquiiva inibitória.

Os ratos lesionados pós treino apresentaram um número de cruzamentos interprova significativamente maior no teste, em relação aos dois grupos controle, nesta tarefa. Isto sugere uma hiperatividade motora no momento do teste, conforme descrito por outros autores (78, 87, 92). Porém, na tarefa de habituação ao campo aberto, não houve evidência alguma de hiperatividade pós-lesão, nem medida pelos cruzamentos nem pelos "rearings".

Os resultados da lesão pré-treino na tarefa de habituação ao

campo aberto, no número de respostas de orientação (rearing), ou cruzamentos, mostraram que todos os grupos lembram bem da tarefa. Dado o caráter não associativo desta memória (40, 68, 87), é possível concluir então que o C.E. não tem um papel importante neste tipo de memórias, em contraste à aquelas que exigem um maior grau de associação ou integração (10, 24, 35, 42, 71).

Vários estudos também mostram, a existencia de vias que se conectam entre o hipocampo e a amígdala (2, 79, 97), e que a remoção destas duas estruturas, não unicamente de uma delas, causa amnésia de tarefas em primatas (2, 86, 100). Sugere-se então que, informações aferentes e eferentes, provenientes destas duas estruturas, sejam especialmente importantes, para a tarefa de esquivo ativa de duas vias, onde a amnésia foi total nos ratos.

5. 2. METABOLISMO ENERGÉTICO e SUA RELAÇÃO COM O COMPORTAMENTO

Os resultados obtidos em animais controles no presente trabalho são compatíveis com os dados prévios da literatura. Os valores por nós obtidos são menores que os relatados para ratos neonatos (14, 20, 21, 93).

É conhecido que há um incremento na produção de lactato pela estimulação de receptores NMDA, particularmente com glutamato durante estresse e isquemia (20, 55, 82).

No entanto, a falta de efeito tanto da lesão como do treino

em esquivas sobre produção de lactato ou consumo de glicose, indicam que estas medidas não são nem adequadas nem suficientes para detectar alterações metabólicas devidas a estas variáveis.

Nossos dados indicam que outras técnicas, talvez "in situ" , são necessárias para esse propósito (91). Por exemplo a lactografia e técnicas de autoradiografia usadas por alguns autores (83, 84, 89).

Porém, surge-nos a dúvida sobre o real valor de tais técnicas, aplicadas a segmentos ou setores grandes de tecido "in situ", dada a delicada especificidade do efeito da lesão de C.E. sobre um ou outro tipo de memória relatada acima.

O modelo de lesão permanente do córtex entorrinal com NMDA , guarda uma relação com o que acontece nos estágios iniciais da doença de Alzheimer, onde o padrão neuronal de degeneração, no CE deve explicar o dano cognitivo (1, 49, 50, 64, 83). Assim também na lesão com NMDA há perda de sinapses no CE, e provoca amnésia total em tarefas de tipo associativo.

Será interessante, no futuro, complementar este tipo de estudo com análises neuroquímicas ou imunocitoquímicas das vias lesadas pela lesão do C.E. com NMDA.

6. CONCLUSÕES

- 1.- Animais lesionados no CE pré-treino e pós-treino na tarefa de esquiva inibitória apresentam amnésia parcial em relação aos controles no teste.
- 2.- Animais lesionados no CE pré-treino e pós-treino na tarefa de esquiva ativa de duas vias apresentam amnésia total para a tarefa.
- 3.- Animais lesionados no C.E. pré-treino e pós-treino na tarefa de habituação ao campo aberto não tem alteração de memória, nem da atividade motora.
- 4.- Animais lesionados no CE, apresentam maior alteração de memória em tarefas associativas , do que nas tarefas de exploração.
- 5.- Não há alterações no consumo de glicose nem na área lesionada do C.E. nem no hipocampo , 7 dias após a cirurgia, medida pela técnica de micrprismas.
- 6.- Não há alterações na produção de lactato nem em microprismas de CE. lesionado, nem em microprismas de hipocampo , 7 dias após a cirurgia , medida pela técnica de microprismas.
- 7.- O treino de esquiva inibitória não afetou significativamente o consumo de glicose, nem a produção de lactato, medida pela técnica de microprismas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, I.M., Strutural plasticity of synapses in Alzheimer's disease, Molec. Neurobiol, Totowa, v. 5, p. 411-419, 1991.
- 2.- BACHEVALEIR, J. Ontogenic development of habit and memory formation in primates. Ann NY Acad Sci, New York, v. 608, p.457-477, 1990.
3. BERNARD, E.A, HENLEY, J.M . The non-NMDA receports types, protein struture and molecular biology. Trends. Pharm. Sci, New York, a special report, p. 82-89, 1991.
4. BLISS, T.V.P.; ERRIGTON, M.L.; CLEMENTS, M.P.; WILLAMS, J.H.; VOSS, K.L.; LYNCH, M.A. Presynaptyc mechanisms in long-term potentiation and the role of Arachidonic acid. In SQUIRE, L.; LINDERBEL, E (Eds) The Biology of Memory, Stuttgart: Verlag. S . 1989. p. 671 p. 233-331.
5. BLISS, T.V.P, COLLINGRIDE , G.L., A synaptic model of memory: Long-Term Potentiation in the hippocampus. Nature, London, v. 361, p. 31-39; 1993.
6. BLISS, T.V.P.; LOMO, T. Long - lasting potentiation of sinaptyc transmission in the dentade area of the anaesthetied rabbit following stimulation of the perforant parth. Physiol, Amsterdam, v, 232, p. 331-356, 1973.
7. BRIONI, J.D.; IZQUIERDO, I. Retention enhancement by pretest β

- endorphin and oxotremorine and its reversal by scopolamine. Behav. Neural. Biol., New York, v, 50, p. 251-254, 1988.
8. CAHIL L.; McGAUGH, J.L. Amigdaloid complex lesion differentially affect retention of task using appetitive and aversive reinforcement, Behav. Neurosci., Arlington, v. 104, p. 532-543, 1990.
9. CARRASCO, M.A.; DIAS, R.D.; IZQUIERDO, I. Naloxone reverses retrograde amnesia induced by electroconvulsive shock. Behav. Neural. Biol., New York, v. 34, p. 352-357, 1982.
10. CARRASCO, M.A.; PERRY, M.C.; DIAS, R.D.; WOFCHUK, S.; IZQUIERDO, I.; Effect of tones, footshocks, shuttle avoidance, and electroconvulsive shock on met-enkephalin immunoreactivity of rat brain. Behav. Neural. Biol., New York, v. 34, p. 1-14, 1982.
11. CASTELHAND, C.; BRIONI, J.D.; NAGAHARA, A.; McGaugh, J.L. Post-training systemic and intra-amygdala administration of the Gaba-B agonist baclofen impairs retention. Behav. Neural. Biol., New York, v. 52, p. 170-179, 1989.
12. COLLINGRIDGE, G.L.; BASHIR, Z.I.; BLAKE, J.F.; DAVIES, C.H.; DAVIES, S.N.; IRVING, A.J.; RANDAL, A.D.; SCHOFIELD, J.G. Amino Acid receptors and LTP in area CA1 of the Hippocampus In SQUIRE, L.; LINDEREL, E (Eds). The Biology of Memory Stuttgart: Ed. Verlag. S. 1989. p 671. p 233-250.
13. COLLINGRIDGE, G.L.; SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. Trends. Pharmacol. Sci., New York,

- a special report, p. 42-48, 1991.
14. COLLINS,R.C.; POSNER,J.B.; PLUM,F. Cerebral energy metabolism during electroshock seizures in mice. Am.J.Phisiol., Bethesda, v.218, p. 943-950, 1970.
 15. CORNELL - BELL,A.H.; FINKBEINERS, S.M.; COOPER, S.M.; SMITH, S.J. Glutamate induce calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling .Science, Washington, v. 247, p. 470-473, 1990.
 16. CRAIGIERS'S. Neuroanatomy of the rat. New York: Academic Press, 1963. pp 233.
 17. CUNHA,C.; FERREIRA, M. B.; JERUSALINSKYy, D.; WALTZ, R.; BIANCHIN,M.; HUANG,C.; KOYA,R.; ZANATTA,M.; MEDINA,J.H.; IZQUIERDO,I. evidence that similar neurotransmitter mechanisms in amygdala, hippocampus and medial septum of avoidance behavior in rats. Ciencia e Cultura, São Paulo, v. 43, p. 312-315, 1991.
 18. DALMAZ,C. Tratamento de ratos com etanol: efeitos sobre a modulação da memória e sobre parâmetros neuroquímicos relacionados. Curitiba; 1989. 154, p. Tese (Doutorado em Bioquímica) Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
 19. DALMAZ,C.; NETTO,C.A.; OLIVEIRA ,C.B.; FIN,C.A.; IZQUIERDO, I. Chronic ethanol tratament: efects on the activation of brain β -endorfin sisstem by novelty. Psychobiology, Austin, v. 19, p. 70-74, 1991.

20. DE-BRUIN, L.A.; SCHASFOORT, E.M.C.; STEFFENS, A.B. and KORF, J.
Effects of stress and exercise on rat hippocampus and striatum extracellular lactate, Am.J.Physiol, Bethesda, v. 259 (4pt-2), p. R333-R339, 1990.
21. DUDAY, Y. Why learning and memory should be redefined.
Concepts In Neuroscience, Singapore, v. 3, p. 99-121, 1992.
22. DUTRA, J.C. Efeito do Metilmalonato e do propionato sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo intermediário cerebral de ratos jovens. Curitiba; 1991 . 155 p.
Tese (Doutorado em Bioquímica) Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
23. DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANMMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S.
WANMMACHER, C.M.D. Effects of Methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies in vitro by brain of developing rats. Biochem. Med. Metab. Biol, Orlando, v. 45, p. 54-56, 1991.
24. FERREIRA, M.B.C. Papel do Sistema Gabaérgico modulado por receptores benzodiazepínicos, sobre a formação da memória em ratos. Porto Alegre; 1992. Tese (Doutorado em Fisiologia) Curso de Pós-Graduação em Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
25. FERREIRA, M.B.C.; DA SILVA, D.S.; MEDINA, J.H. and IZQUIERDO I.
Late postraining memory processing by entorhinal cortex: involvement of NMDA and gabaergic receptors. Pharmacol.Biochem.Behav. New York, v. 41, p. 767-771, 1992.

26. FERREIRA,M.B.C.; WOLFMAN, C.; WALTZ,R.; DA SILVA,R.C.; ZANATTA,M.S.; MEDINA,J.H. IZQUIERDO,I. NMDA receptor-dependent,muscimol-sensitive role of the entorhinal cortex in post- training memory processing. Behav. Pharmacol, Oxford , v. 3, p. 387-391, 1992.
27. GRAEFF,G.F.Drogas. Psicotr3picas e seu modo de Acç3o (2da Ed) S3o Paulo: Pedag3gica e Universitaria. 1989.p. 135 p. 11-19.
28. GILBERT.D.T.; PATTERSON, T.A.; ROSE, S. Dissociation of brain sites necessary for registration and storage of memory for a onetrial passive avoidance task in chick. Behav. Neurosci, Arlington, v. 105, p. 553-561, 1991.
29. GUYTON, A.C.Tratado de Fisciologia Medica (8 ed) Rio de Janeiro: Guanabara , 1991 p.864. p.558-569.
30. HARIK, S.I.; KALARIA, R.N. Blood-brain barrier abnormalities in Alzheimer's disease studied with pet. Ann. N.Y. Acad. Sci, New York, v. 640, p. 131-133, 1991.
31. HAWKINS, R.D.; KANDEL, E. R.; SIEGELBAUM, S.A. Learning to modulate transmitter release: Themes and Variations in synaptic plasticity . Ann Rev. Neurosci, Palo Alto, v. 16, p. 625-665, 1993.
32. HEISS,W.D. ; SZELIES, R.J.; KESSLER. HERHOLz, K. Abnormalities of energy metabolism in Alzheimer's disease studied with pet. Ann N.Y. Acad. Sci, New York, v.640, p. 65-71, 1991.
33. HOFFMAN , M.; NMDA receptors cloned-twice ! SCIENCE,

- Washington, v. 254, p. 801-802, 1991.
34. HOYER, S. Abnormalities of glucose metabolism in Alzheimer's disease. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, v. 640, p. 53-58 ; 1991.
 35. IZQUIERDO, I. Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat; possible role of endogenous opiates in memory consolidation, Psychopharmacology, Berlin, v.66, p. 199-203, 1979.
 36. IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. Memory as a state-dependent phenomenon: role of ACTH and epinephrine. Behav. Neural. Biol., New York, v. 38, p. 144-151, 1983.
 37. IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. Effect of ACTH, epinephrine, β -endorphin with ACTH or epinephrine, naloxone, and of the naloxone or β -endorphine on memory consolidation. Psychoneuroendocrinology, New York, v. 8, p. 81-87, 1983.
 38. IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D. Endogenous state-dependency: memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, β -endorphin, adrenaline and tyramine. Braz.J. Med. Biol. Res., Ribeirão Preto, v. 16, p. 55:64, 1983.
 39. IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D. Influence on memory of posttraining or pre-test injections of ACTH, vasopressin epinephrine and β -endorphine and their intervention with naloxone. Psychoneuroendocrinology, New York, v. 10, p. 165-172, 1985.
 40. IZQUIERDO, I..Endogenous state-dependency : Memory depends

- on the relation between the neuronhumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. In LYNCH, G.; McGAUGH J.L.; WEINBERG, N.M. (Eds). Neurobiology of Learning and Memory, New York: Gilford Press, 1984. 528 p. p. 333-350.
41. IZQUIERDO, I. Opioid-catecholamine and opioid - cholinergic interactions in memory regulations. Trends .Pharmacol.Sci., New York, v.6, p. 192-193, 1985.
 42. IZQUIERDO, I. Different forms of postraining memory processing. Behav.Neural.Biol., New York, v.5, p. 171-202, 1989.
 43. IZQUIERDO, I. Aprendizaje e Memória. In HOUSAL, B (Edr) Fisiologia Humana 6ta ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1989 p. 326 p. 311-319.
 44. IZQUIERDO, I. CUNHA, C.; HUANG, C. Pos-training dawn-regulation of memory consolidation by GABA-A mechanisms in amygdala modulated by endogenous benzodiazepines, Behav. Neural. Biol., New York, v. 54, p. 105-109, 1990.
 45. IZQUIERDO, I.; CUNHA, C.; MEDINA, J.H. Endogenous benzodiazepine modulation of memory processes. Neurosci. Behav. Rev., v. 14, p. 419- 424, 1990.
 46. IZQUIERDO, I. The neurobiology of memory consolidation. Neurosciences, Okayama, v. 18, p. 1-11, 1992,
 47. IZQUIERDO, I.; CUNHA, C.; JERUSALINSKY.; FERREIRA, M.B.; MEDINA, J.H.; Neurotransmitter receptors involved in

- post - training memory, processing by the amygdala, media septum and the hippocampus of the rat. Behav.Nerual.Biol, New York, v. 58, p. 16-26, 1992.
48. IZQUIERDO, I. Neurotransmitter systems involved in memory consolidation: the role of GABA A receptors. IN : Naturally Occurring Benzodiazepines. 1ra ed. New.York.: Ellis Horwood. 1993 p. 134. p. 54-64.
49. IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Role of the amygdala, Hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression; Braz.J.Med Biol. Res, Ribeirão Preto, v. 26, p. 573-589, 1993.
50. JELLINGER, K.; BRAAK,H.; BRAAK, E. .; FISCHER, P. Alzheimer lesions in the entorhinal region and isocortex in Parkinsons's and Alzheimers's deseases.ANN. N.Y. ACAD. Sci, New York, v. 640, p. 203-209, 1990.
51. JERUSALINSKY, D.; FERREIRA,M.B.C.; WALTZ,R.; DA SILVA,R.; BIANCHIN, M.; ZANATTA, M.; MEDINA,J.H.; IZQUIERDO,I. Amnesia by post-treaning infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus and entorrinal cortex. Behav. Neural. Biol, New York, v. 58, p. 76-80, 1992.
52. JORGENSEN, M.B.; WRIGHT,D.C. The effect of unilateral and bilateral removal of the entorrinal cortex on the glucose utilization in various hippocampal regions in the rat. Neurosci.Lett, Limirick, v. 87, p. 227-232, 1988.

53. KATZMAN, R.; LEON, T. Neurochemistry of Alzheimer's disease in
SIGAL, J.; AGRANOFF, B.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P. (Eds)
The Basic Neurochemistry 4th ed. New York: Raven Press 1989.
p. 984 p. 827-837.
54. KRUGERS, H.J.; JAARSMA, D.; KORF. Rat hippocampal lactate
efflux during electroconvulsive shock or stress in
differentially dependent on entorhinal cortex and adrenal
integrity. J. Neurochem. New York, v. 58, p. 826-830, 1992.
55. KUHR, W.; KORF, J. Nmethyl-D-aspartate receptor involvement
in lactate production following ischemic or convulsion in
rats. Eur. J. Pharmacol. Amsterdam, v. 155, p. 145-149, 1988.
56. LASHER, S.S.; STEWARD, O. The time course of changes in open
field activity following bilateral entorhinal lesions in
rats and cats. Behav. Neural. Biol. New York, v. 32, p.
1-20, 1981.
57. LEVITAN, I.B.; KACZMAREK, L.K. Neurotransmitters and
Neurohormones. In The Neuron. 2nd ed Oxford: University
Press. 1991 450 p. p. 193-217.
58. MALENKA, R.C. The role of Postsynaptic calcium in the
induction of long-term potentiation. Molec. Neurobiol.
Totowa, v. 5, p. 289-295, 1991.
59. MALENKA, R.C.; KAUER, J.A.; PERKEKARD, R.A. Impact of postsynaptic
calcium on synaptic transmission. Trends.
Neurosci. Cambridge, v. 12, p. 440-450, 1989
60. MARTINS, J.H. Autoradiographic estimation of the extent of

- reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in rat. Neurosci. Letters, v. 127, p. 160-164, 1991.
61. MARTINS, R.N.; ROBINSON, P.J.; CHLEBOUN, J.D.; BEYREUTHER, K.; MASTERS, C.L. The molecular pathology of Amyloid deposition in Alzheimer's disease. Molec. Neurobiol. Totowa, v. 5, p. 389-398, 1991.
 62. McGAUGH, J.L. Modulation of memory storage process. In SOLOMON, P.R.; GROETHALS, G.R.; Kelley, C.M. and STEPHENS, B.R. (Eds). Perspectives of Memory Research, New York, 1988, p. 33-64.
 63. MEDINA, J.H. Natural benzodiazepines in the brain. Possible biological roles. Comunicaciones Biológicas, Buenos Aires, v. 8 p. 217- 234, 1990.
 64. MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends in Pharmac. Sci., New York, a special report, p. 54-62, 1991.
 65. MEYER, L.M. NMDA receptors cloned at last. Nature, London, v. 354, p. 16-17, 1991.
 66. MISHKIN. Memory in monkeys severely impaired by combined but not separate removal of amygdala and hippocampus. Nature, London, v. 273, p. 297, 1978.
 67. MULLER, D.; BURCHS, P.A.; STOPPINI, L.; BODDEKE, H. Long-term potentiation, protein kinase C, and glutamate receptors Molec. Neurobiol. Totowa, v. 5, p. 277-288, 1991.

68. NETTO, C.A.; IZQUIERDO, I. Posterior hypothalamic deafferentation abolishes the amnestic effect of electroconvulsive shock in rats Psychoneuroendocrinology, New York, v. 10, p. 159-163, 1985
69. NETTO, C.A.; DIAS, R.D.; IZQUIERDO, I. Interaction between consecutive learnings: inhibitory avoidance and habituation. Behav. Neural. Biol., New York, v. 44, p. 515-520, 1985.
70. NETTO, C.A.; Dias, R.D.; Izquierdo, I. Differential effects of posttraining naloxone, β -endorphin, Leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of open-field habituation and of a water-finding task Psychoneuroendocrinology, New York, v. 11; 437-446, 1986.
71. NETTO, C.A. Efeitos da ativação do sistema beta-endorfínico cerebral sobre a modulação da memória a nocicepção e os níveis de aminas biogênicas cerebrais, Curitiba 1987. 147 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
72. NICHOLLS .; ARRWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids . Trends Pharm. Sci, New York a special report. p. 68-74, 1991.
73. NOLL, F.; Determination with LDH, GPT and NAD . In BERGEMEYER A. V.; Methods of Enzymatic Analysis. 2da Ed N.Y. Vekar Chem Weiheim .Acad. Press. 1974 .vol.3, 1624 p. p. 1474-1479 .
74. NUMAN, M.; CORODIMAS, K.P.; NUMAN, M.J.; FACTOR, E.M.; PIERS W.D. Axons sparing lesions of the preoptic region and

- substantia inmoninata disrupt maternal behavior in rats. Behav. Neurosci, Arlington, v. 102, p. 381- 396, 1988.
75. PARKER Jr, D.W. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. Ann. N.Y Acad. Sci, New York, v. 640, p. 59-63, 1991.
76. FAXINOS, G.; WATSON, C. The brain in Stereotaxic coordinates. Academic press, New York, 138 pp 1986.
77. QUILLFEDT, J. Injeção do anticolinesterásico Fasciculina na amígdala ou no septo lateral de ratos: Efeitos sobre diferentes tarefas comportamentais e sobre parâmetros neuroquímicos relacionados . Porto Alegre 1989. 124 p. Tese (Mestrado em bioquímica) -Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
78. REEVS, T.M. ; SMITH, D.C. Reinervation of the dentate gyrus and recovery of alteration behavior following entorhinal cortex lesions. Behav. Neurosci, Arlington, v. 101, p. 179-186, 1987.
79. ROSEN, J.B.; HITCHCOCK, J.M; MISERENDINO, M.J.D.; FALLS, W.A.; CAMPEAUI, S.; DAVIS, M. Lesions of the perirhinal cortex but not of the frontal, medial pre frontal, visual or insular cortex block fear-potentiated startle using an visual conditioned stimulus J. Neurosci, Oxford, v. 12, p. 4624-4633, 1992.
80. ROYSTON, MC.; ROTHWELL, N.J. ROBERTS, G.W. Alzheimer's disease: Pathology to potential treatments ?. Trends. Pharmacol. Sci,

New York, v. 13, p. 131-133, 1992.

81. SANANES, B.C.; Davis, M. N-metyl-D-aspartate lesions of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala block fear potentiate startle and shock sensitization startle. Behav Neurosci, Arlington, v. 106, p. 72-80, 1992.
82. SCHASFOORT, E.M.C.; DE BRUIN, L.A.; KORF, J. Mild stress stimulates rat hippocampal glucose utilization transited via NMDA receptors assessed by lactography. Brain.Res Amsterdam, v. 475, p. 58-63; 1988.
83. SELKOE, D.J. Amyloid Protein and Alzheimer's disease . Sc Am. Med, N.Y, Special Issue , p. 54-61, 1993.
84. SIF, J.; MISSIER, C.; MEUNIER, M.; BONTEMPI, B.; CALAS, A. DESTRADE, C. Time-dependent sequential increase [14 C]-deoxyglucose uptake in subcortical and cortical structures during memory consolidation during an operant training in mice. Behav. Neural. Biol, New York, v. 56, p. 43-61, 1991.
85. SOKOLOFF, L. Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. J. Neurochem, New York v. 29, p. 13-26, 1977.
86. SOKOLOFF, L. Circulation and Energy Metabolism of the brain I: SEGAL, J.; AGRANOFF, B.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P. (Eds) The Basic Neurochemistry 4th ed. New York. Raven Press 1989. p. 984 p. 565-589.
87. STEWARD, O.; LOESCHE, J.; HORTON, W.C. Behavioral correlates

- of denervation and reinnervation of the hippocampal formation of the rat: open-field activity and the cue utilization following bilateral entorhinal cortex lesions. Brain. Res. Bulletin, New York. v. 2, p. 41-48, 1977.
88. STEWART, G.R.; PRICE, M.; OLNEY, J.W.; HARTMAN, B.K.; COZZARI, C. N-Methylaspartic: an effective tool of lesioning basal forebrain cholinergic neurons of the rat. Brain. Res., Amsterdam, v. 369, p. 377-382, 1986.
89. TEICHBERG, V. Glial glutamate receptors likely actors in brain signaling; Eur. J., v. 5, p. 3.086-3.091, 1991.
90. TRINDER, P.R. Determination of blood glucose using an oxidase peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. J. Clin. Pathol., London, v. 22 p. 158-161, 1969.
91. TZIGARET, C.; MCINTOSH, T.K.; OKIYAMA, K.; JENKINS, W.L.; PRASAD, R.M. Measurement of hippocampal levels of cellular second messengers following in situ freezing. J. Neurochem., New York, v. 60, p. 827-834, 1993.
92. VANDERWOLF, C.H.; LEUNG, L.W.S. Hippocampal rhythmic slow activity: a brief history and the effects of entorhinal lesions and phenylcyclidine. In SEIFER, W. (Edr). Neurobiology of the Hippocampus 1 ed London: Acad. Press. 1983 (cop) p. 632 p 275-302.
93. WAJNER, M.; DUTRA, J.C.; CARDOSO, S.E.; WAMMACH, M.D.; DE MOTA, E.R. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling

- rats. J. Inher. Metab. Dis., v. 14, p. 1-5, 1991.
94. WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-L, P. ; HONORÉ, T. Struture-activity relationship in the development of excitatory aminoacid receptor agonists and competitive antagonists. Trends Pharm.Sci, New York ,a special report, p. 4-12, 1991.
 95. WEST, J. R.; DEADWYLER, S.; COTMAN, C. W.; LYNCH, G. Time dependent changes in commissural field potentials in the gyrus following lesions of the entorhinal cortex in adults rats. Brain. Res., Amsterdam, v. 97, p. 215-233, 1975
 96. WICKLIFFE, C.A.; DRAGUNOW, M. ; TATE, W.F. The role of immediate early genes in the stablization of long-term potentiation. Molec. Neurobiol, Totowa, v. 5, p. 297-314, 1991.
 97. WITTER, M.; GROENEWENGEM, H.J.; LOPES, S.; LOHMAN. A.H. Funtional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. Prog. Neurobiol, Oxford, v. 33, p. 153-161, 1989.
 98. WOLFMAN, C.; CUNHA, C.; JERUSALINSKY, D.; LEVI de STEIN, M.; VIOLA. H.; IZQUIERDO, I. MEDINA, J.H. Habituation an inhibitory avoidance trainig after brain regional levels of benzodiazepine like molecules and are affected by intracerebral flumazenil microinjection . Brain. Res., Amsterdam, v. 548, 74-80, 1991.
 - 99- YOUNG, A.B. ; GRAHAM, E.F. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. Trends. Pharmacol. Sci.

New York. a special report, 18-24, 1991.

100. ZOLA-MORGAN , S. The neuropsychology of memory . Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, v. 608, p. 434-456, 1990.