

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

JOSIDÉIA BARRETO MENDONÇA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS AGUDOS, CRÔNICOS E
DE ABSTINÊNCIA DA NICOTINA SOBRE A MEMÓRIA
OPERACIONAL: AÇÃO NOS EFEITOS AGUDOS DE
PREJUÍZO DO ETANOL E ENVOLVIMENTO DO CÓRTEX
PRÉ-FRONTAL MEDIAL**

Vitória
2007

JOSIDÉIA BARRETO MENDONÇA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS AGUDOS, CRÔNICOS E
DE ABSTINÊNCIA DA NICOTINA SOBRE A MEMÓRIA
OPERACIONAL: AÇÃO NOS EFEITOS AGUDOS DE
PREJUÍZO DO ETANOL E ENVOLVIMENTO DO CÓRTEX
PRÉ-FRONTAL MEDIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ester Miyuki Nakamura-Palacios.

Vitória
2007

Mendonça, Josidéia Barreto.

Investigação dos Efeitos Agudos, Crônicos e de Abstinência da Nicotina sobre a Memória Operacional: Ação nos Efeitos Agudos de Prejuízo do Etanol e Envolvimento do Córtex Pré-Frontal Medial / Josidéia Barreto Mendonça - 2007.
166f.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ester Miyuki Nakamura-Palacios.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde – PPGCF – UFES.

1. Córtex Pré-Frontal Medial. 2. Nicotina. 3. Etanol. 4. Memória Operacional. 5. Labirinto Radial. 5. Abstinência.

JOSIDÉIA BARRETO MENDONÇA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS AGUDOS, CRÔNICOS E DE ABSTINÊNCIA DA
NICOTINA SOBRE A MEMÓRIA OPERACIONAL: AÇÃO NOS EFEITOS AGUDOS
DE PREJUÍZO DO ETANOL E ENVOLVIMENTO DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
MEDIAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovado por:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alice Aparecida da Matta Chasin – USP - SP

Prof^a. Dr^a. Livia Carla Silva de Melo - Novo Milênio - ES

Prof^a. Dr^a. Jane Tagarro Corrêa Ferreira – UFES - ES

Prof. Dr. José Guilherme Pinheiro Pires – UFES - ES

Prof^a. Dr^a. Ester Miyuki Nakamura-Palacios
Orientadora, UFES-ES

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg
Coordenador do PPGCF- UFES - ES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 05 de dezembro de 2007.

**“A lição sabemos de cor
Só nos resta aprender ...”**

Beto Guedes e Ronaldo Bastos

AGRADECIMENTOS

À professora Ester, que acreditou no meu potencial e me aceitou como sua aprendiz, obrigada pelo voto de credibilidade e por me ensinar a amar a pesquisa e a ciência.

Às minhas grandes amigas Livia Carla, Andresa, Carolina, Simone Domingues e Luziene, pelos momentos que dedicamos juntas à pesquisa e aos estudos. Aprendi muito com vocês.

Aos demais amigos e pesquisadores do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, pelos conhecimentos que souberam dividir comigo e principalmente pelos momentos inesquecíveis.

Aos funcionários do PPGCF, que com grande entusiasmo, dedicação e alegria me auxiliaram nos trabalhos do laboratório.

Ao Jozué, com sua paciência e sabedoria me ensinou técnicas importantes para o desenvolvimento do meu projeto.

Aos Professores e Doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES pelas disciplinas e aulas ministradas.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia do DML de Vitória, que souberam entender e apoiar os meus momentos de dedicação ao estudo.

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram, mas tiveram um membro familiar ausente, contudo a recompensa maior vem com a vitória desse trabalho.

Ao meu filho, Giuliano, que meu esforço sirva de exemplo para você.

Ao meu companheiro e amigo, Edemilson, que soube compreender e algumas vezes participar ativamente dos meus projetos, obrigada pelo amor, dedicação e carinho.

RESUMO

Neste estudo investigou-se os efeitos das administrações aguda e crônica de nicotina (NIC) sobre a memória operacional espacial e sua interação com o etanol (ETOH) no córtex pré-frontal medial (CPFm). No Estudo I, ratos Wistar machos ($n = 22-23$, 250-300 g; $\cong 3$ meses de idade) previamente treinados no labirinto radial de 8 braços, com cânulas bilaterais implantadas no CPFm (B: + 2,5 mm A; ± 1 mm L; 2,7mm V), receberam administrações intracorticais (IC) de salina (SAL) ou NIC 3,2, 10 ou 32 μg , 10 minutos antes da administração de SAL ou ETOH 32, 100 ou 180 μg . Cinco minutos após a última administração, os animais foram submetidos a testes com retardos de 1 h. O ETOH produziu um perfil esperado em “U” invertido de prejuízo do desempenho do pós-retardo de 1 h, sendo a dose de 100 μg a que produziu significativamente maior número de erros comparado ao tratamento controle (SAL e SAL). A administração prévia da menor dose de NIC (3,2 μg) IC reduziu significativamente o efeito de prejuízo do ETOH IC 100 μg , enquanto promoveu efeitos de prejuízos das doses de 32 e 180 μg IC que não apresentaram efeitos quando administrados com SAL, produzindo um perfil em “U” para a curva dose-efeito sob a combinação IC aguda de NIC e ETOH. No Estudo II, outros 32 ratos Wistar machos receberam administrações subcutâneas diárias de SAL ou NIC 1 mg/kg (NIC 1) ou 10 mg/kg (NIC 10) desde o início dos treinamentos no labirinto radial. Uma vez aprendida a tarefa satisfatoriamente, todos os animais foram implantados com cânulas bilaterais no CPFm. As administrações subcutâneas foram mantidas durante todo o período da realização das curvas dose-efeito de NIC IC (3,2, 10 ou 32 μg) ou ETOH IC (32, 100 e 180 μg), e retiradas abruptamente para se verificar os efeitos agudos da NIC IC 3,2 μg nas 1ª, 2ª e 3ª semanas de abstinência. Cinco minutos após as administrações IC, os animais foram submetidos ao teste com retardos de 1 h. Os grupos NIC 1 e NIC 10 aprenderam as tarefas no labirinto radial e apresentaram desempenho sob NIC IC de forma semelhante ao grupo SAL, no entanto, não apresentaram os efeitos de prejuízo no pós-retardo de 1 h do ETOH 100 μg comparados aos animais tratados com SAL. O grupo NIC 10 apresentou prejuízos significativos do desempenho do pós-retardo de 1 h, nas 2ª e 3ª semanas de abstinência. Estes resultados demonstram que a NIC, agudamente no CPFm ou cronicamente por via subcutânea, reduz os efeitos de prejuízo do etanol no CPFm sobre a memória operacional espacial de longa-duração. Também demonstra que a abstinência da NIC sistêmica produz uma supersensibilização no CPFm aos efeitos da própria NIC.

ABSTRACT

This study examined the effects of acute and chronic administrations of nicotine (NIC) on spatial working memory and its interaction with ethanol (ETOH) in the medial prefrontal cortex (mPFC). In study I, male Wistar rats ($n = 22-23$, 250-300 g; ≈ 3 months) well trained in the 8-arm radial maze procedure and with bilateral cannula implanted in the mPFC (B: 2.5 mm A, ± 1 mm L, 2.7 mm V) received intracortical (IC) administrations of saline (SAL) or NIC (3.2, 10 or 32 μg) 10 min before IC administration of SAL or ETOH 32, 100 or 180 μg . Five minutes after the second IC administration the animals were submitted to 1-h delayed tasks. ETOH impaired the 1-h post-delay performance, in an expected inverted “U” shaped dose-effect curve. The dose of 100 μg produced larger number of errors as compared to control (SAL/SAL). The previous administration of the lowest dose of NIC (3.2 μg) decreased significantly the disruptive effects of ETOH IC 100 μg , but impaired the performance when combined with ETOH 32 and 180 μg IC, the same doses of ETOH that showed to be ineffective when combined to SAL, producing an “U” shaped dose-effect curve under the acute IC combination of NIC and ETOH. In study II, other 32 male Wistar rats received daily subcutaneous administrations of SAL or NIC 1 mg/kg (NIC 1) or 10 mg/kg (NIC 10) since the beginning of training in the radial maze. After learning has been achieved satisfactorily, all animals were implanted with bilateral cannula in the mPFC. Subcutaneous administrations were maintained over the course of dose-effect curves of NIC IC (3.2, 10 or 32 μg) or ETOH (32, 100 or 180 μg), and were suspended abruptly to check the acute effect of NIC 3.2 μg IC in the 1st, 2nd and 3rd weeks of abstinence. Five minutes after IC administrations, animals were submitted to 1-h delayed tasks. NIC 1 and NIC 10 groups learned the tasks in the radial maze and performed under NIC IC in a very similar manner of SAL group, however they didn't present the disruptive effects of ETOH 100 μg IC in the 1-h post-delay performance as compared to animals treated with SAL. NIC 3.2 μg IC impaired the 1-h post-delay performance in the 2nd and 3rd weeks of abstinence in animals from NIC 10 group. These results showed that NIC, acutely in mPFC or chronically via subcutaneous, reduced the disruptive effects of ETOH in the mPFC on long-termed spatial working memory. It was also showed that abstinence of a chronic subcutaneous administration of NIC might have produced a sensitization to its own effects in the mPFC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Áreas do CPF (lateral, orbital e medial) da espécie humana, numeradas segundo o mapa citoarquitetônico de Brodmann.....	22
Figura 2 - Sub-regiões do CPF e as principais divisões do CPFm de roedores.....	23
Figura 3 - Visão superior e medial global do cérebro de rato Áreas Cg1, Cg2 e Cg3 do cíngulo anterior e Fr2 do córtex frontal motor do córtex pré-frontal medial em roedores.....	24
Figura 4 - Multi-componentes da memória operacional.....	28
Figura 5 - Vias colinérgicas e suas interações com as vias dopaminérgicas.....	31
Figura 6 - Estrutura molecular da nicotina e principais metabólitos.....	33
Figura 7 - Estrutura do receptor colinérgico nicotínico (nAChRs).....	35
Figura 8 - Representação esquemática dos subtipos $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ de nAChRs neuronais.....	36
Figura 9 - Principais sítios de ação dos subtipos de receptores nicotínicos (nAChR) em sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas sobre neurônios dopamin(DA)érgicos na Área Tegmentar Ventral	40
Figura 10 - Ilustração simplificada de várias sinapses e a liberação de dopamina no Núcleo accumbens induzida por nicotina.....	41
Figura 11 - Esquema da expressão dos nAChRs em interneurônios GABAérgicos do Córtex Pré-Frontal.....	43
Figura 12 - Ilustração dos efeitos da estimulação nicotínica sobre o desempenho cognitivo.....	45
Figura 13 - Modelo proposto para os efeitos da estimulação dos receptores nicotínicos (nAChRs) sobre a função dos neurotransmissores e a função atencional.....	46
Figura 14 - Estrutura molecular do etanol.....	47

Figura 15 - Etanol e a influência na atividade de neurônios dopaminérgicos mesocorticolímbicos através de um ou vários canais iônicos ligante-dependentes.....	49
Figura 16 - Rato em gaiola individual de polipropileno no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia/PPGCF/UFES.....	55
Figura 17 - Fotografia do Labirinto radial de 8 braços do Laboratório de Neuropsicofarmacologia/PPGCF/UFES.....	58
Figura 18 - Ilustração da fase 5 do treinamento, com a interposição de retardo (5 s) entre o 4º e o 5º braços.....	59
Figura 19 - Cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas bilaterais no CPFm.....	60
Figura 20 - Fotografias demonstrativas do procedimento de administração de drogas IC.....	63
Figura 21 - Média de erros $\pm$ e.p.m. nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 (aprendizagem) no labirinto radial de 8-braços (n= 23).....	69
Figura 22 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços (n = 23).....	71
Figura 23 - Média dos pesos corporais (g) $\pm$ e.p.m. durante a primeira semana de adaptação dos animais (Pi = Peso inicial) e as 5 fases de treinamento que antecedem a cirurgia estereotáxica.....	73
Figura 24 - Cortes coronais do cérebro de rato e localização de implante das cânulas no Estudo I. Fatias com vermelho neutro e coloração azul de metileno.....	74
Figura 25 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou etanol (ETOH) na dose de 100 μ g precedida pela administração IC de Salina (SAL) ou doses variadas de Nicotina (NIC), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços.....	75
Figura 26 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou doses variadas de etanol (ETOH) precedida pela administração IC de Salina (SAL) ou Nicotina (NIC) na dose de 3,2 μ g, sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços.....	77

Figura 27 - Efeitos da administração intracortical (IC), no córtex pré-frontal medial, de nicotina (NIC) 3,2 µg ou salina (SAL) seguida de etanol (ETOH) 100 µg ou SAL sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços.....	79
Figura 28 - Média de erros ± e.p.m. dos animais (n = 8) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Salina (SAL) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 no labirinto radial de 8-braços.....	85
Figura 29 - Média de erros ± e.p.m. dos animais (n = 13) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 1 mg/kg (NIC 1) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 no labirinto radial de 8-braços.....	86
Figura 30 - Média de erros ± e.p.m. dos animais (n = 11) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 10 mg/kg (NIC 10) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 no labirinto radial de 8-braços.....	88
Figura 31 - Média de erros ± e.p.m. dos animais (n = 8) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Salina (SAL) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços.....	90
Figura 32 - Média de erros ± e.p.m. dos animais (n = 13) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de nicotina 1 mg/kg (NIC 1) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços.....	91
Figura 33 - Média de erros ± e.p.m. dos animais (n = 11) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 10 mg/kg (NIC 10) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços.....	93
Figura 34 - Média de erros ± e.p.m. dos animais que receberam administrações subcutâneas diárias de Salina (n = 8) (SAL), Nicotina 1 mg/kg (n = 13) (NIC 1) e Nicotina 10 mg/kg (n = 11) (NIC 10) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 no labirinto radial de 8-braços.....	94
Figura 35 - Média de erros ± e.p.m. dos animais que receberam administrações subcutâneas diárias de Salina (n = 8) (SAL), Nicotina 1 mg/kg (n = 13) (NIC 1) e Nicotina 10 mg/kg (n = 11) (NIC 10), antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços.....	95

Figura 36 - Média dos pesos corporais (g) $\pm$ e.p.m. dos animais que receberam administrações subcutâneas diárias de Salina (SAL, n = 8), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1, n = 13), ou Nicotina 10 mg/kg (NIC 10, n = 11), durante a primeira semana de adaptação dos animais (Pi = Peso inicial) e as 5 fases de treinamento que antecedem a cirurgia estereotáxica.....	96
Figura 37 - Cortes coronais do cérebro de rato e localização de implante das cânulas no Estudo II. Fatias com vermelho neutro e coloração azul de metileno.....	99
Figura 38 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou diferentes doses de Nicotina (NIC) nos animais tratados cronicamente com Salina subcutânea (Grupo SAL, n = 8), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	100
Figura 39 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou doses variadas de Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Salina subcutânea (Grupo SAL, n = 8) sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	101
Figura 40 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou de diferentes doses de Nicotina (NIC) nos animais tratados cronicamente com Nicotina subcutânea na dose de 1 mg/kg (Grupo NIC 1, n = 13), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	103
Figura 41 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou de diferentes doses de Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Nicotina subcutânea na dose de 1 mg/kg (Grupo NIC 1, n = 13), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	103
Figura 42 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou de diferentes doses de Nicotina (NIC) nos animais tratados cronicamente com Nicotina subcutânea na dose de 10 mg/kg (NIC 10, n = 11), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	105
Figura 43 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou de diferentes doses de Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Nicotina subcutânea na dose de 10 mg/kg (n = 11), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	106
Figura 44 - Efeitos da administração intracortical (IC) de diferentes doses de nicotina (A = NIC IC 3,2 μ g B = NIC IC 10 μ g e C = NIC IC 32 μ g) ou salina (SAL IC) nos animais tratados	

cronicamente (via subcutânea) com salina (SAL), nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e 10 mg/kg (NIC 10), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	107
Figura 45 - Efeitos da administração intracortical (IC) de diferentes doses de ETOH (A = ETOH IC 32 µg, B = ETOH IC 100 µg e C = ETOH IC 180 µg) ou salina (SAL IC) nos animais tratados cronicamente (via subcutânea) com Salina (SAL), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e 10 mg/kg (NIC 10), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	110
Figura 46 - Média dos pesos corporais (g) ± e.p.m. durante a administração intracortical (IC) de diferentes doses de Nicotina e Etanol nos animais tratados cronicamente com Salina (SAL), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e Nicotina 10 mg/kg (NIC10).....	112
Figura 47 - Efeitos da administração aguda intracortical (IC) de Nicotina (NIC) 3,2 µg na 1ª, 2ª e 3ª semanas após interrupção das administrações crônicas de Salina (Grupo SAL, n = 8), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	113
Figura 48 - Efeitos da administração aguda intracortical (IC) de Nicotina (NIC) 3,2 µg na 1ª, 2ª e 3ª semanas após interrupção das administrações crônicas de Nicotina 1 mg/kg (Grupo NIC 1, n = 13), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	115
Figura 49 - Efeitos da administração aguda intracortical (IC) de Nicotina (NIC) 3,2 µg na 1ª, 2ª e 3ª semanas após interrupção das administrações crônicas de Nicotina 10 mg/kg (Grupo NIC 10, n = 11), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.....	116
Figura 50 - Efeitos da administração intracortical (IC) de NIC 3,2 µg (desafio) nos animais em abstinência, sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora.....	118
Figura 51 - Média dos pesos corporais (g) ± e.p.m. nas 1ª, 2ª e 3ª semanas após a interrupção das administrações crônicas de salina (SAL), nicotina 1 mg/kg (NIC 1) ou nicotina 10 mg/kg (NIC 10).....	120
Figura 52 - Ação coletiva de múltiplos neurotransmissores e neuromoduladores no estabelecimento do perfil de recompensa do etanol.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase 4 (n = 23).....	70
Tabela 2 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. pelos animais (n = 23) em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase 5..	72
Tabela 3 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços sob o tratamento combinado de salina (SAL) ou diferentes doses de nicotina (NIC) e de etanol (ETOH) na dose de 100 μ g, ambos administrados no córtex pré-frontal medial (n = 12-13).....	76
Tabela 4 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços sob o tratamento combinado de salina (SAL) ou nicotina (NIC) na dose de 3,2 μ g e de diferentes doses de etanol (ETOH), ambos administrados no córtex pré-frontal medial (n = 10).....	78
Tabela 5 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase 4 do animais (n = 8) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Salina (SAL).....	85
Tabela 6 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase 4 dos animais (n= 13) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 1 mg/kg (NIC 1).....	87
Tabela 7 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase 4 dos animais (n = 11) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 10 mg/kg (NIC 10).....	89
Tabela 8 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. pelos animais (n = 8) do grupo que recebeu administrações subcutânea diárias de Salina em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase 5.....	90
Tabela 9 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. pelos animais (n = 13) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina 1 mg/kg em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase 5.....	92

Tabela 10 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. pelos animais (n = 11) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 10 mg/kg em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase 5..	93
Tabela 11 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial na administração IC de salina (SAL) ou diferentes doses de Nicotina (NIC) e Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Salina (n = 8).....	102
Tabela 12 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial na administração IC de Salina (SAL) ou diferentes doses de Nicotina (NIC) e Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Nicotina 1 (n = 13).....	104
Tabela 13 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços na administração IC de Salina (SAL) ou diferentes doses de Nicotina (NIC) e Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Nicotina 10 mg/kg (n = 13).....	106
Tabela 14 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos ratos tratados cronicamente com Salina (SAL), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e Nicotina 10 mg/kg (NIC 10) quando receberam administrações intracorticais (IC) agudas de salina (SAL) ou nicotina (NIC) nas doses de 3,2, 10 ou 32 μ g.....	108
Tabela 15 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos ratos tratados cronicamente com salina (SAL), nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e nicotina 10 mg/kg (NIC 10) quando receberam administrações intracorticais (IC) agudas de salina (SAL) ou etanol (ETOH) nas doses de 32, 100 ou 180 μ g.....	111
Tabela 16 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos animais do grupo tratado cronicamente com Salina (SAL, n = 8), na 1ª, 2ª e 3ª semanas de abstinência quando receberam administrações intracorticais (IC) de Nicotina (NIC) na dose 3,2 μ g.....	114
Tabela 17 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos animais do grupo tratado cronicamente com Nicotina 1 mg/kg (NIC 1, n = 13), na 1ª, 2ª e 3ª semanas	

de abstinência quando receberam administrações intracorticais (IC) de Nicotina (NIC) na dose 3,2 µg.....	116
--	-----

Tabela 18 - Média do tempo gasto (segundos) ± e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos animais do grupo tratado cronicamente com Nicotina 10 mg/kg (NIC 10, n = 11), na 1ª, 2ª e 3ª semanas de abstinência quando receberam administrações intracorticais (IC) de Nicotina (NIC) na dose 3,2 µg.....	117
---	-----

Tabela 19 - Média do tempo gasto (segundos) ± e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços na 1ª, 2ª e 3ª semanas sob administração aguda IC de NIC 3,2 µg após a interrupção das administrações crônicas de Salina (SAL), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1) ou Nicotina 10 mg/kg (NIC 10).....	119
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AMPC	Monofosfato de Adenosina cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ATV	Área tegmentar ventral
AB	Área de Brodmann
Ca ⁺²	Cálcio
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
Cg	Cingulado anterior
CPF	Córtex pré-frontal
CPFm	Córtex pré-frontal medial
DA	Dopamina
D ₁	Receptor Dopaminérgico do tipo D1
D ₂	Receptor Dopaminérgico do tipo D2
ETOH	Álcool etílico ou etanol
e.p.m.	Erro padrão da média
Fr2	Córtex frontal anterior
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IC	Intracortical
IP	Intraperitonal
MO	Memória operacional
Na ⁺	Sódio
NAcc	Núcleo accumbens
nAChR	Receptores Colinérgicos Nicotínicos
NIC	Nicotina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDT	Núcleo Médio Dorsal do Tálamo
SAL	Salina (Cloreto de sódio a 0,9%)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Córtex Pré-Frontal.....	21
1.1.1 O Córtex Pré-Frontal em roedores.....	22
1.2 Memória Operacional.....	25
1.2.1 O modelo de múltiplos componentes da Memória Operacional.....	25
1.2.2 Localização anatômica da memória operacional.....	29
1.2.3 Memória Operacional, Córtex Pré-Frontal e Dopamina.....	29
1.3 Nicotina.....	31
1.3.1 O Sistema Colinérgico.....	34
1.3.2 Os Receptores Colinérgicos Nicotínicos.....	34
1.3.3 O Sistema Colinérgico Nicotínico Central.....	35
1.3.4 A Dessensitização e supersensibilização dos receptores nicotínicos...	36
1.3.5 Os Receptores nicotínicos centrais e a Área Tegmentar Ventral.....	38
1.3.6 Os Receptores nicotínicos centrais e o Córtex Pré-Frontal.....	41
1.3.7 A Nicotina e as Funções Cognitivas.....	43
1.4 Etanol.....	46
1.4.1 Efeitos em diferentes sistemas de neurotransmissão.....	47
1.5 Nicotina e Etanol.....	50
2 OBJETIVOS.....	52
2.1 Objetivo Geral.....	53
2.2 Objetivos Específicos.....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1 Animais.....	55
3.2 Drogas.....	55
3.2.1 Estudo I - Interação aguda de nicotina e etanol no CPFm.....	55
3.2.2 Estudo II - Administração crônica de nicotina.....	56

3.2.2.1 Administrações sistêmicas de nicotina.....	56
3.2.2.2 Administrações intracorticais agudas de nicotina ou etanol.....	56
3.3 Labirinto Radial de 8 Braços.....	56
3.4 Aquisição da Tarefa.....	57
3.5 Cirurgia Estereotáxica.....	60
3.6 Estudo I - Interação aguda de nicotina e etanol no CPFm.....	62
3.6.1 Experimento I - Efeitos da administração IC da combinação de diferentes doses de nicotina (3,2; 10 e 32 µg) e etanol (100 µg) sobre o desempenho de testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços.....	63
3.6.2 Experimento 2 - Efeitos da administração da combinação de nicotina (3,2 µg) e de diferentes doses de etanol (32; 100 e 180 µg) no CPFm sobre o desempenho de testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços.....	64
3.7 Estudo II - Administração Crônica de nicotina.....	64
3.7.1 Administrações Sistêmicas Crônicas.....	64
3.7.2 Administrações Intracorticais Agudas.....	65
3.8 Histologia.....	66
3.9 Análise dos Resultados.....	66
3.9.1 Estudo I.....	66
3.9.2 Estudo II.....	67
3.9.3 Programas Estatísticos.....	67
4 RESULTADOS I.....	68
ESTUDO I – Interação Aguda de Nicotina e Etanol no CPFm	69
4.1 Aquisição da Tarefa no Labirinto Radial de 8 Braços.....	69
4.1.1 Fase 4 - Sem o Intervalo de 5 Segundos.....	69
4.1.2 Fase 5 - Com o Intervalo de 5 Segundos.....	71
4.2 Pesos Corporais durante as fases de Treinamento.....	72
4.3 Localização das Cânulas.....	74
4.4 Experimentos.....	75
4.4.1 Experimento 1 – Efeitos da administração IC da combinação de	

diferentes doses de nicotina (3,2; 10 e 32 µg)) e etanol (100 µg) no CPFm sobre a memória operacional de ratos (n = 12-13).....	75
4.4.2 Experimento 2 – Efeitos da administração da combinação de nicotina (3,2 µg) e de diferentes doses de etanol (32; 100 e 180 µg) no CPFm sobre a memória operacional de ratos (n = 10).....	76
5 RESULTADOS II.....	81
ESTUDO II – Administração Crônica de Nicotina	82
5.1 Aquisição da Tarefa no Labirinto Radial de 8 Braços	83
5.1.1 Avaliação intragrupos.....	83
5.1.1.1 Fase 4 – Sem intervalo de 5 segundos.....	83
5.1.1.2 Fase 5 – Com intervalo de 5 segundos.....	89
5.1.2 Avaliação intergrupos.....	94
5.1.2.1 Fase 4 – Sem intervalo de 5 segundos.....	94
5.1.2.2. Fase 5 – Com intervalo de 5 segundos.....	94
5.2 Pesos corporais durante as fases de treinamento.....	95
5.2.1 Avaliação intragrupos.....	95
5.2.2 Avaliação intergrupos.....	98
5.3 Localização das Cânulas.....	98
5.4 Administração Aguda Intracortical (IC) de diferentes doses de nicotina e etanol.....	99
5.4.1. Avaliação intragrupos.....	100
5.4.2 Avaliação intergrupos.....	107
5.4.3 Pesos corporais no protocolo de administração IC de drogas.....	112
5.5 Administrações agudas intracorticais (IC) de nicotina na dose de 3,2 µg após interrupção das administrações crônicas (abstinência).....	113
5.5.1 Avaliação intragrupos.....	113
5.5.2 Avaliação intergrupos.....	117
5.5.3 Pesos corporais após a interrupção dos tratamentos crônicos.....	119
6 DISCUSSÃO.....	121

6.1 O Labirinto Radial de 8 Braços.....	122
6.2 Localização das cânulas bilaterais.....	124
6.3 Efeitos da nicotina e do etanol sobre a memória operacional.....	125
6.3.1 Nicotina.....	125
6.3.2 Etanol.....	128
6.3.3 Nicotina e Etanol.....	131
6.4 Considerações Clínicas.....	138
 7 CONCLUSÃO.....	 141
 8 REFERÊNCIAS.....	 143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Córtex Pré-Frontal

O volume do córtex cerebral do rato é cerca de 100 vezes menor que o córtex cerebral de macacos e 1000 vezes menor que o de humanos (Uylings, 1990).

Esse aumento do volume cortical em primatas é paralelo a uma diferenciação da evolução das áreas corticais e desenvolvimento de funções cognitivas mais complexas (Preuss et al., 1999).

O córtex pré-frontal (CPF) é o córtex de associação do lobo frontal. No cérebro de mamíferos, esse córtex é definido por 2 critérios básicos: sua citoarquitetura e conectividade. Esses critérios servem para delimitar aproximadamente o mesmo território cortical que é caracterizado em todas as espécies de mamíferos por uma proeminente camada celular ou granular IV, e conectividade recíproca com o Núcleo Médio Dorsal do Tálamo (NMDT) (Fuster, 2002).

O CPF em primatas humanos e não humanos tem uma localização rostral às áreas motoras do córtex cerebral, e consiste anatomicamente em 3 diferentes regiões: dorsolateral (ou lateral), medial e orbital (ou ventral) (Fuster, 1997), que estão reciprocamente conectadas, e também conectadas ao núcleo dorsal e anterior do tálamo (Fig. 1).

As regiões orbital e medial conectam-se com o hipotálamo e outras estruturas límbicas, envolvidas com o controle do comportamento emocional (Fuster, 2002).

A região lateral envia conexões para os gânglios basais, envolvidas na coordenação do comportamento motor, e é também profusamente conectada com o córtex das regiões occipital, temporal e parietal. São de especial importância para o aspecto cognitivo as recíprocas conexões da região lateral com o hipocampo e com o córtex de associação posterior. Parece que essas conexões participam na formação da memória executiva ou motora no córtex pré-frontal (Fuster, 2002).

Lesões na região frontal dorsolateral são caracterizadas especialmente por deficiências na memória operacional, particularmente relacionada com processos executivos tais como monitoramento e planejamento do comportamento (Fuster, 1997).

Lesões na região orbitofrontal são caracterizadas por alteração no comportamento sócio-emocional, hipercinesia, deficiência no processamento de informações olfatórias e gustatórias e no comportamento espontâneo (Kolb, 1998 e

2003). Lesões no cíngulo anterior não são bem caracterizadas, mas parecem incluir redução na resposta da dor, mutismo acinético e prejuízo na iniciação motora (Devinsky, 1995).

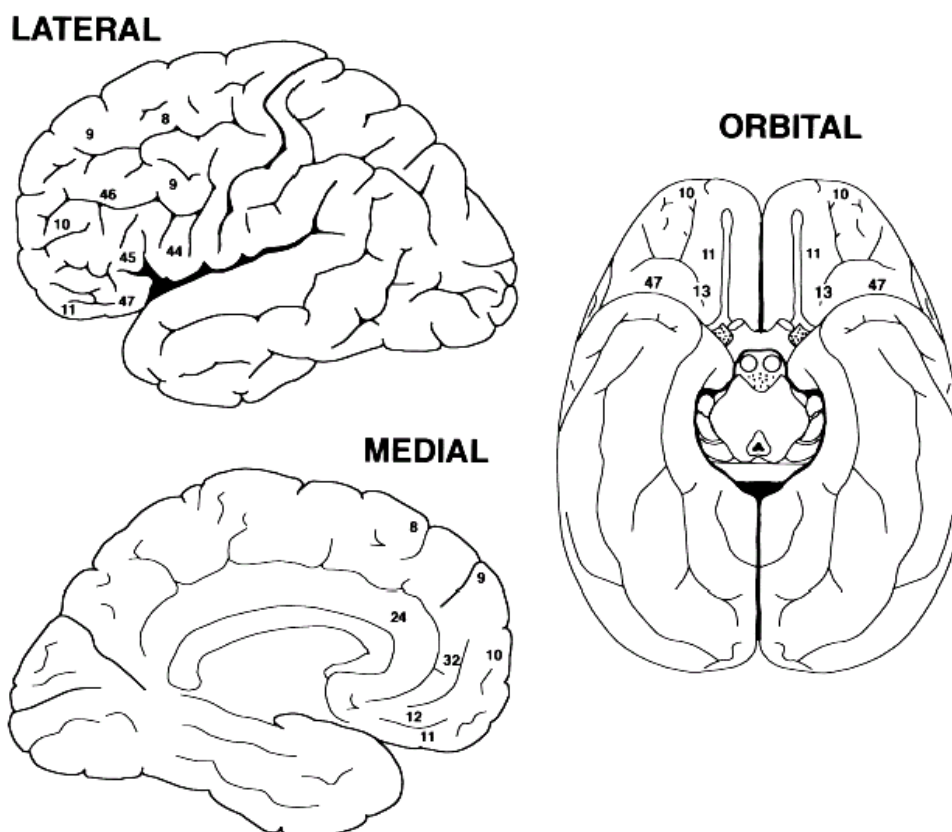


Figura 1 - Áreas do CPF (lateral, orbital e medial) da espécie humana, numeradas segundo o mapa citoarquitetônico de Brodmann. (Extraído e adaptado de Fuster, 2002).

1.1.1 O Córtex Pré-Frontal em roedores

O córtex pré-frontal de roedores é geralmente dividido em 3 regiões topologicamente distintas: o córtex pré-frontal medial (CPFm), o córtex pré-frontal orbital (ou ventral) e o córtex pré-frontal lateral (Sarter, 1983 e 1984, Sesack, 1989).

Segundo Dalley et al (2004), o CPFm é subdividido em uma região dorsal, que inclui a área pré-central (PrC) e o cíngulo anterior e ventral (ACg e Cg2), e uma região ventral, que inclui a área pré-límbica (PrL), infra-límbica (IL) e orbital

medial (MO). O córtex pré-frontal orbital (ou ventral) é composto pelas áreas orbital ventral (VO) e orbital ventro-lateral (VLO). E o córtex pré-frontal lateral é formado pelas áreas agranular dorsal e ventral (AID, AIV) e a área orbital lateral (LO) (Fig. 2).

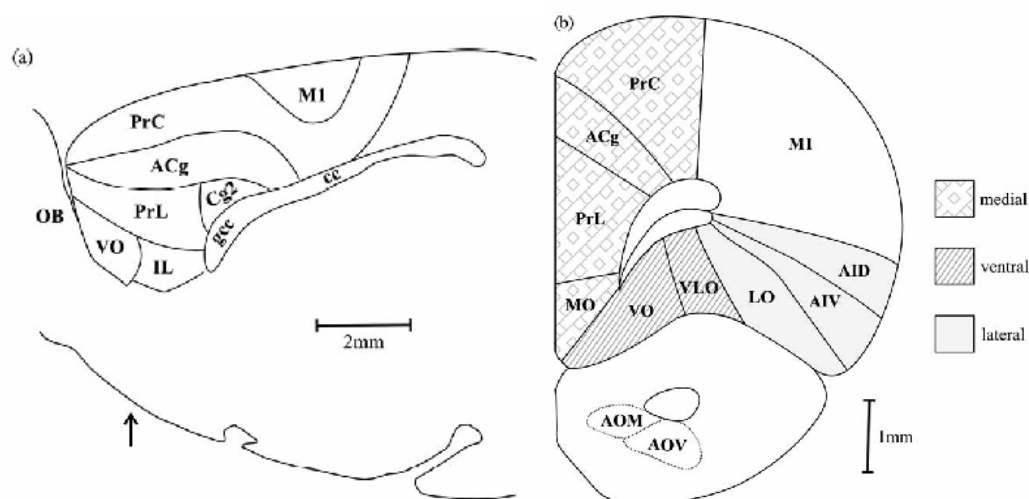


Figura 2 - Sub-regiões do CPF de roedores. a) Secção sagital: 0,9 mm da linha média. b) Secção coronal unilateral: 3,5 mm anterior ao bregma. Os sombreados diferentes indicam as três principais divisões do CPF de roedores (medial, ventral e lateral). Abreviaturas: ACg, córtex cingulado anterior; AID, córtex agranular insular dorsal; AIV, córtex agranular insular ventral; AOM, núcleo olfatório anterior medial; AOV, núcleo olfatório anterior ventral; cc, corpo caloso; Cg2, área 2 do córtex cingulado; gcc, joelho do corpo caloso; IL, córtex infralímbico; LO, córtex orbital lateral; M1, área motora primária; MO, córtex orbital medial; OB, bulbo olfatório; PrL, córtex pré-límbico; PrC, córtex pré-central; VLO, córtex orbital ventro-lateral; VO, córtex orbital ventral. (Extraído e adaptado de Dalley et al., 2004).

Paxinos e Watson (1986) denominam o cingulado anterior (ACg) de Cg1 e a área pré-central (PrC) de Fr2.

Zilles e Wree (1985) definem como constituintes do CPFm em roedores as áreas Cg1 e Cg2 do cingulado anterior, Cg3 do córtex pré-límbico e Fr2 do córtex frontal (Fig. 3).

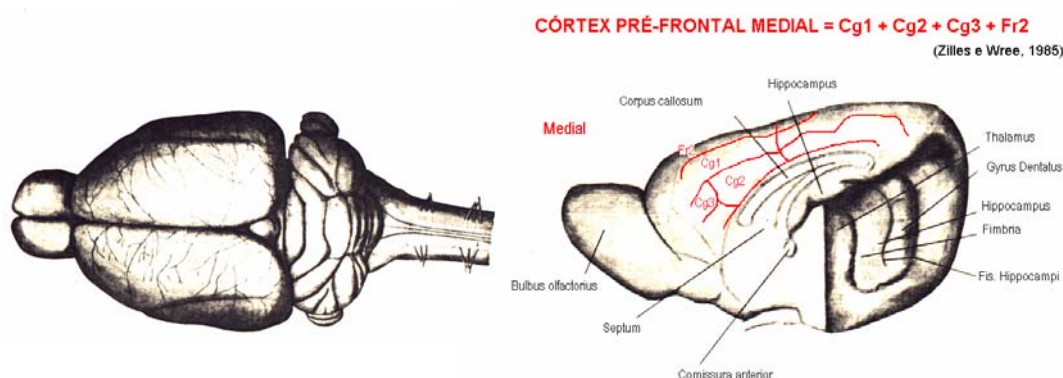


Figura 3 - Visão superior global do cérebro de rato (à direita) e destaque para o Córtex Pré-Frontal Medial (Cg1, Cg2, Cg3 e Fr2) em ratos (à esquerda). (Extraído e adaptado de Zilles e Wree, 1985).

Os núcleos da base, via projeções pálido-estriatal e nigroestriatal por subseqüente projeções palidotálâmicas e nigrotálâmicas, enviam projeções para diferentes áreas do CPF, que também recebe aferências corticais, por exemplo, do córtex parietal posterior e áreas corticais sensoriais, bem como de estruturas subcorticais como substância negra, área tegmentar ventral, amígdala, hipotálamo lateral e hipocampo. Há recíprocas conexões do CPF para essas estruturas (Groenewegen et al., 1997).

O CPF, de maneira topográfica e recíproca, também é alvo de núcleos do maior sistema de neurotransmissão colinérgica e monoaminérgica do prosencéfalo, incluindo neurônios noradrenérgicos (NA) da substância cinzenta central pontina, neurônios dopaminérgicos (DA) da área tegmentar ventral, neurônios serotoninérgicos (5-HT) dos núcleos da rafe e neurônios colinérgicos (ACh) do prosencéfalo basal. Esses sistemas atuam em uma rede cortical modulatória influenciando a transmissão inibitória e excitatória bem como outros processos corticais (Robbins, 2000).

Os processos de memória operacional são influenciados por sistemas modulatórios, especialmente a neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica do CPF (Dunnett, 1990; Zahrt, 1997; Aultman e Moghaddam, 2001).

1.2 Memória Operacional

O termo memória operacional foi inicialmente proposto por Miller, Galanter e Pribram na década de 60 (apud Baddeley, 2001), e posteriormente adotado por Baddeley e Hitch em 1974. Contudo ao longo do tempo foi modificado e complementado por outros autores. Atkinson e Shiffrin, em 1968 (apud Baddeley, 2001) propuseram que a memória operacional seria um sistema unitário e de curta duração, em contraste ao proposto por Baddeley e Hitch (1974), que se referiram a um sistema compreendido por múltiplos componentes.

A memória operacional diferencia-se das demais, por não deixar traços e não produzir arquivos. Usamos, por exemplo, quando conservamos um número de telefone o tempo suficiente para discá-lo, e uma vez feita a comunicação o esquecemos (Izquierdo, 2002). Este critério distingue a memória operacional das memórias semântica, procedural e de referência (Goldman-Rakic, 1995).

A operação mental de um cálculo aritmético, imaginar uma seqüência de movimentos no xadrez, construir uma sentença, a criação de música ou poesia são exemplos de uma infinita variedade de processos mentais dependentes de operações básicas da memória operacional, que mantém os itens da informação na mente até que sejam evocadas, manipuladas e/ou associadas a outras idéias e novas informações (Goldman-Rakic, 1996).

O conceito de memória operacional é freqüentemente confundido com o da memória de curto-prazo, mas difere-se deste em 2 aspectos: a) envolve um número de subsistemas, não um módulo unitário; b) há considerável ênfase do seu papel funcional em outras tarefas cognitivas tais como, aprendizado raciocínio e compreensão (Baddeley, 1996).

1.2.1 O modelo de múltiplos componentes da Memória Operacional

Baddeley e Hitch (1974) deduziram que era necessário abandonar o conceito de sistema unitário para a memória operacional e propuseram em seu lugar o modelo que compreendia 3 componentes: um controlador central, a central executiva, auxiliado por 2 subsistemas subsidiários, o esboço visuo-espacial, capaz

de manter e manipular imagens visuais e espaciais, e a alça fonológica, que envolve um sistema baseado na informação verbal.

A alça fonológica foi o primeiro e mais bem estudado componente dentro desse modelo de memória operacional (Repovs e Baddeley, 2006). Compreende 2 sub-componentes: um estoque fonológico, que mantém traços de memória na forma acústica ou fonológica que desaparece em poucos segundos, e um processo de repetição articulatória análogo à sub-vocalização da fala (Baddeley, 1983). A função do processo de repetição fonológica é a de restaurar e rearticular o conteúdo mantido no estoque fonológico e com isso restabelecer o traço de memória.

O componente visuoespacial da memória operacional pode ser dividido em sub-componentes visual e espacial, cada qual com estoques separados e independentes, nos quais as representações, mecanismos de manutenção e manipulação estão fortemente relacionados à atenção visual. Enquanto o subcomponente visual está fortemente relacionado à percepção e imagem visual, o subcomponente espacial mostra forte conexão com a atenção e ação, e achados experimentais sugerem que o último é um importante recurso na atenção espacial e controle oculomotor (Repovs e Baddeley, 2006).

A central executiva é o mais importante dos componentes, mas o menos compreendido e estudado dentro do modelo de multi-componentes da memória operacional (Baddeley, 1986, 1996).

Baddeley (1996) propôs diferentes funções para a central executiva: a) coordenação de tarefas separadas, b) capacidade para mudar estratégias de recordação de informação, c) capacidade de seletivamente atender um estímulo e inibir outro, d) manutenção e manipulação de informação em forma temporária da memória de longo prazo. Outra função atribuída é a capacidade de continuamente atualizar e modificar o conteúdo da memória operacional conforme a entrada de informações externas (sensoriais) ou internas (memória de longo prazo) (Morris, 1990).

Como forma de explicar o funcionamento da central executiva, Baddeley (1986) adotou o modelo neuropsicológico de Norman & Shallice (1980), segundo o qual o controle da ação se dá através de um Sistema Atencional Supervisor (SAS) (Shallice, 1988).

Do ponto de vista neurobiológico, a função do SAS (ou Central Executiva) estaria relacionada à atividade dos lobos frontais (Shallice, 1982, 1991, 1993;

Duncan, 1986). As funções executivas frontais envolvem diversos sub-componentes, possivelmente associados com diferentes aspectos do funcionamento dos lobos frontais. Danos nesta região nervosa usualmente levam à perseverança comportamental e/ou ao aumento da distratibilidade (Shallice, 1988). Quando atividades novas estão envolvidas, ou quando um estímulo urgente ou ameaçador é apresentado, o SAS assume o controle da ação, e teria a prerrogativa de inibir e de ativar esquemas de resposta (conhecimento implícito) diretamente (Helene, 2003).

Resumindo, a central executiva seria então, um sistema de capacidade limitada, responsável por estabelecer a ligação entre os sistemas auxiliares (alça visuoespacial e fonológica) e a memória de longo prazo, e por selecionar e planejar estratégias (Baddeley, 1997), ou seja, responsável pelo controle atencional da memória operacional.

O “*buffer*” (retentor ou interface) episódico foi o quarto componente adicionado ao modelo de multi-componentes da memória operacional. É um sistema de armazenamento temporário e de capacidade limitada, que integra informações de fontes variadas (Baddeley, 2000), e no qual a informação evocada da memória de longo prazo tornar-se-ia consciente (Helene, 2003).

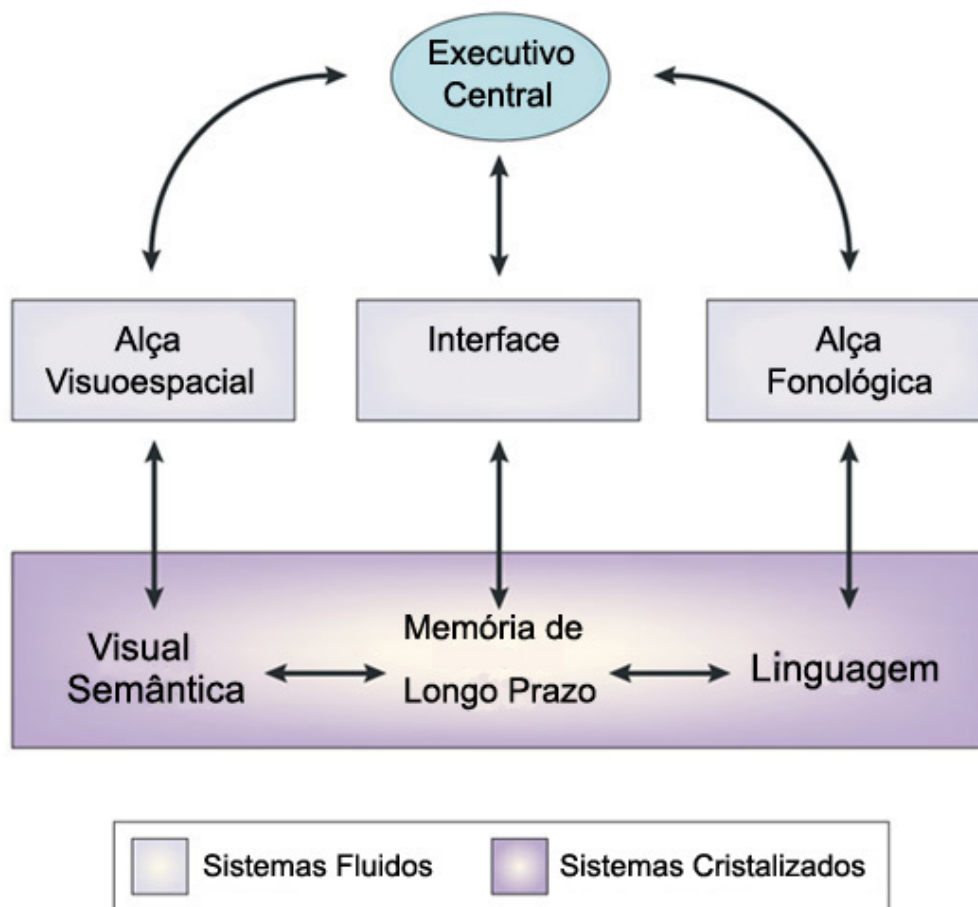


Figura 4 - Múltiplos componentes da memória operacional que se expressam como sistemas fluidos (como a atenção e armazenamento temporário) que não se alteram com a aprendizagem, e suas relações com sistemas cognitivos cristalizados capazes de acumular conhecimentos de longo prazo. (Extraído e adaptado de Baddeley, 2003 e Repovs e Baddeley, 2006).

O termo “memória operacional”, no campo da neurociência comportamental e comportamento animal, está associado ao paradigma do labirinto radial (Shah e Miyake, 1999).

O modelo do labirinto radial foi proposto por Olton e Samuelson (1976), e tem como fundamento a “aprendizagem de lugar”. Este modelo avalia a memória operacional no seu aspecto visuoespacial.

1.2.2 Localização anatômica da memória operacional

Estudos baseados na localização de lesões em pacientes e neuroimagem em indivíduos normais indicam que os 3 componentes básicos da memória operacional estão localizados em diferentes regiões cerebrais. A alça fonológica indica o envolvimento da região temporoparietal esquerda e a visuoespacial parece primariamente localizada nos córtex parietal inferior direito, pré-motor direito e frontal inferior direito. Há extensivas evidências para uma associação entre funções executivas e lobos frontais, principalmente com a área pré-frontal dorsolateral (Baddeley, 2003).

1.2.3 Memória Operacional, Córtex Pré-Frontal e Dopamina

O CPF possui várias funções, mas o seu papel na memória operacional parece ser o mais estudado (Seamans e Yang, 2004).

O componente de curto prazo na memória operacional está completamente dissociado do CPF, pois lesão no CPF não afeta a memória de curto prazo. Então, o CPF manipula itens da memória de curto prazo para planejar, organizar e manipular informações requeridas para gerar uma intenção ou ação (Seamans, 2004). O CPF vincula o intervalo temporal no ciclo percepção-ação (Fuster, 1990 e 2000). O papel do CPF na memória operacional ou de trabalho poderia ser descrito como “trabalhando com memórias” (Winocur, 1992; Seamans, 2004).

Utiliza-se de tarefas com respostas com retardo para se estudar a memória operacional em animais, e nos últimos anos viu-se que as células permanecem ativas durante esse período de retardo ou tornam-se previamente ativas ao iniciar a resposta (Fuster, 1973), o que reflete a manipulação “on-line” (ativa) da memória (Goldman-Rakic, 1995; Fuster, 1990; Robbins, 2000).

Registros eletrofisiológicos no córtex dorsolateral de macacos (Fuster, 1991) e no CPFm de ratos (Batuev et al., 1990), utilizados para mapear a atividade neuronal durante tarefas com retardos, demonstram o envolvimento dessas regiões no processamento da memória operacional. O envolvimento de sub-regiões do CPFm de roedores nos processos cognitivos envolvendo a memória operacional tem

sido amplamente investigado através de estudos com lesão em áreas específicas dessa região do córtex (Poucet, 1990; Delatour e Gisquet-Verrier, 1999).

Os neurônios do CPFm são, em sua maioria, piramidais e se projetam para inúmeras áreas corticais e subcorticais, nas quais secretam glutamato como neurotransmissor. A manutenção da informação “*on line*” para utilização em processos cognitivos, poderia ser explicada pela ativação, através desses neurônios, das áreas relacionadas à percepção sensorial e, ainda, áreas relacionadas à memória de longa duração, por exemplo, hipocampo e corpo amigdalóide (Goldman-Rakic et al., 2000; Steketee, 2003).

Numerosos sistemas de neurotransmissores, incluindo noradrenérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, (GABA)érgico, colinérgico e dopaminérgico modulam os neurônios piramidais do CPF e, mudanças nas interações entre estes sistemas de neurotransmissores no CPF podem levar a alterações de respostas comportamentais (Steketee, 2003).

Ressalte-se, no entanto, que as funções de memória operacional nos lobos frontais são altamente dependentes da transmissão dopaminérgica mesocortical (Le Moal e Simon, 1991; Williams e Goldman-Rakic, 1995; Robbins, 2000).

Os neurônios mesencefálicos dopaminérgicos tornam-se ativos (Schultz et al., 1993) e os níveis de dopamina aumentam significativamente no CPF (Watanabe et al., 1997) durante o desempenho da memória operacional. Depleção de dopamina no CPF (Brozoski et al., 1979; Simon et al., 1980) ou bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 no CPF (Sawaguchi e Goldman-Rakic, 1991, 1994; Seamans et al., 1998) produzem severos prejuízos na memória operacional, enquanto agonistas D1 podem aumentar o desempenho em tarefas com retardo (Arnsten et al., 1994; Müller et al., 1998).

O preciso mecanismo neural fundamental para a manutenção da memória operacional ainda não está claro. No período de retardo, a atividade neural sustentada, sem interrupção, baseada na reverberação sináptica, foi proposta como um possível mecanismo (Wang, 2001).

Em geral, a ativação do receptor dopaminérgico D1, mas aparentemente não do receptor D2, é requerido para o desempenho da memória operacional (Arnsten et al., 1994; Muller et al., 1998; Sawaguchi e Goldman-Rakic, 1994; Zahrt et al., 1997).

Entender a regulação dos neurônios do CPF mediada pelos receptores D1 fornecerá importante compreensão sobre a base celular da memória operacional.

A maioria das drogas psicoativas atua no SNC em receptores como agonistas ou antagonistas de neurotransmissores ou neuromoduladores químicos. O sistema de neurotransmissão que tem sido mais claramente relacionado aos efeitos das drogas de abuso é o sistema dopaminérgico mesolímbico. A dopamina é encontrada em um número limitado de sistemas cerebrais, dentre os quais constituindo os sistemas dopaminérgico mesolímbico e mesocortical, que se projetam primariamente da área tegmentar ventral para o núcleo accumbens e CPF, respectivamente, que parecem envolvidas na estimulação psicomotora da função de recompensa (Wise, 1998).

Projeções colinérgicas do núcleo tegmentar pedúnculo pontino estimula, através de receptores nicotínicos, os neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral, e conseqüentemente as vias dopaminérgicas mesolímbicas e mesocorticais, o que implica também a acetilcolina nos processos de recompensa cerebral (Webster, 2001) (Fig. 5).

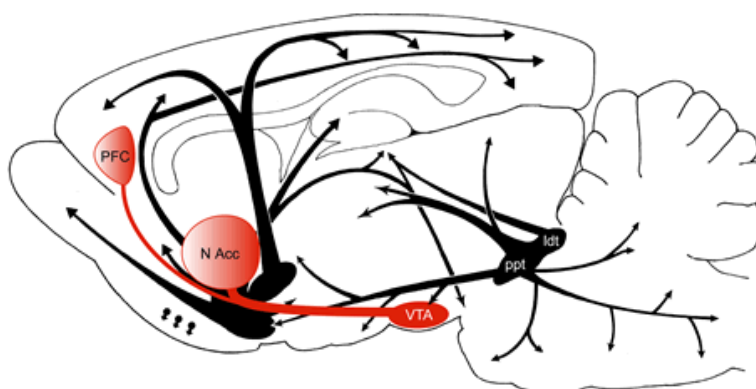


Figura 5 - Vias colinérgicas (preto) e suas interações com as vias dopaminérgicas (vermelho). Abreviações: ldt (área tegmentar laterodorsal); N Acc (nucleus accumbens); PFC (córtex pré - frontal); ppt (núcleo tegmentar pedúnculo pontino); VTA (área tegmentar ventral). Fonte: <http://sci-con.org/2005/12/the-molecular-basis-of-nicotine-addition>

1.3 Nicotina

A nicotina é o principal alcalóide da planta do tabaco, em proporção que varia de 0,5 a 8%, sendo que existem diversas variedades dentre as quais podemos destacar a *Nicotiana rústica* e a *Nicotiana tabacum*, plantas que podem alcançar

1,50 m de altura, com folhas verdes, ovais e flores rosadas. A nicotianina e a nicotelina são alcalóides secundários (Brito, 1988).

É um alcalóide líquido, oleoso, incolor, que em presença do ar apresenta coloração pardo-escura e odor característico, derivado da piridina e pirrolidina, pois a nicotina é a alfa-piridil-beta-N-metilpirrolidina, de fórmula $C_{10}H_{14}N_2$ (Fig. 6) (Brito, 1988). Foi isolada pela primeira vez das folhas do tabaco, por Posselt e Reiman, em 1828. Existem formas racêmicas estereoisômeras de estrutura tridimensional. No tabaco, duas estão permanentemente presentes: l-nicotina e d-nicotina. A primeira é 100 vezes mais ativa farmacologicamente, constituindo 90% do total (Rosemberg, 2003).

Não se introduz nicotina pura no organismo. Ela está num invólucro que é o tabaco, contido no cigarro. Portanto, a nicotina é administrada ao organismo com milhares de substâncias tóxicas que existem no tabaco. Neste já foram isoladas cerca de 6.700, das quais 4.720 bem identificadas quimicamente (Dube, 1982; Green e Rodgman, 1996). O tabagista ao inalar a fumaça, com a nicotina da qual está dependente, inala juntamente, em média, 2.500 substâncias lesivas ao organismo (Rosemberg et al., 2003).

Dos 600 aditivos que a indústria emprega no tabaco, para torná-lo mais palatável, vários têm a função de liberar mais nicotina. Entre estes, o mais importante é a amônia (Kessler, 1994). Esta é alcalina e eleva o pH da nicotina. Quanto mais alto o pH, de 11 para cima, maior a liberação da nicotina, maiores são sua difusão orgânica e penetração pelas membranas celulares nos tecidos (Henningfield e Keenan, 1993; Kessler, 1994). Com o pH elevado, a nicotina é mais retida no organismo porque é mais facilmente reabsorvida pelos túbulos renais, diminuindo sua eliminação, e, com isso, elevando sua concentração sanguínea (Andresen, 1982). Com esse processo, eleva-se a nicotino-dependência, tornando o tabagista escravo do cigarro.

A absorção da nicotina pelo organismo é em média 1.0 mg por cigarro, variando de 0.34 mg a 1.56 mg (Benowitz, 1998). Influi também na absorção a maneira de fumar, a força e a profundidade das tragadas (Rosemberg et al., 2003).

A meia vida da nicotina é cerca de duas horas. Somando-se os valores das meia-vidas subseqüentes, pode-se prever que a nicotina se acumula, num fumante regular, a níveis significantes sanguíneos por pelo menos 6 a 8 horas depois de cessado de fumar (Rosemberg et al., 2003).

A Nicotina e a cotinina (principal metabólito da nicotina) (Fig. 6) podem ser pesquisadas na urina, no sangue e na saliva, sendo o primeiro material orgânico de mais fácil utilização na rotina. A nicotina é mais limitada porque sua meia vida é de duas horas, já a da cotinina prolonga-se por 36 a 40 horas, e às vezes até mais (Benowitz, 1983 e 1998).

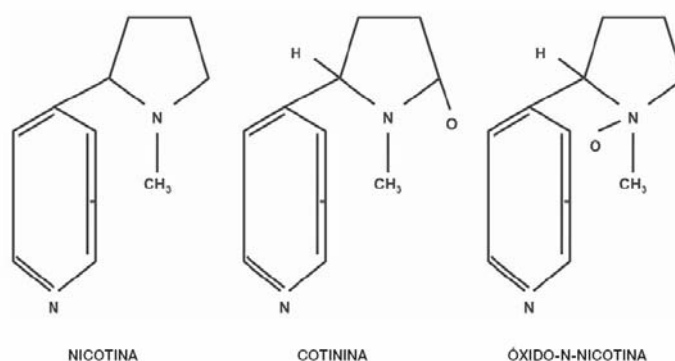


Figura 6 - Estrutura molecular da nicotina e principais metabólitos. (Extraído e adaptado de Rosemberg, 2003).

O consumo de tabaco é um hábito fortemente arraigado ao cotidiano de mais de um terço dos habitantes da Terra. Originário das Américas, e conhecido há cerca de oito mil anos por praticamente todas as culturas que habitavam o continente, foi introduzido na Europa após os Grandes Descobrimentos luso-espanhóis, cultuado durante os séculos XVIII e XIX e rechaçado a partir do século XX (Rosemberg, 2003).

O Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas (CEBRID) realizou em 2005 o II Levantamento Domiciliar sobre Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil (Carlini et al, 2005), e segundo o estudo, 44,0% das pessoas já fizeram uso na vida de tabaco, sendo que 10,1% preencheram os critérios de dependência. O tabagismo é a principal causa de morte evitável em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas (entre as quais 200 milhões de mulheres), sejam fumantes. Mais de 15 bilhões de cigarros são consumidos diariamente mundo afora.

1.3.1 O Sistema Colinérgico

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor a ser descoberto e isolado (Webster, 2001), e tem um importante papel na transmissão sináptica no sistema nervoso central e periférico. Loewi, em 1921, descobriu que a estimulação do nervo vago resultava na liberação de uma substância química então chamada substância vagal, e depois identificada como acetilcolina (Halbach e Dermietzel, 2002).

ACh é sintetizada no citoplasma de fibras colinérgicas pela reação entre acetilcoenzima A e a colina por uma enzima chamada colina acetil transferase (ChAT), e liberada de suas vesículas em resposta a um potencial de ação, por meio de exocitose na fenda sináptica, onde irá interagir com receptores apropriados (muscarínicos ou nicotínicos), resultando em efeitos específicos (Halbach e Dermietzel, 2002).

A degradação de ACh é realizada principalmente pela acetilcolinesterase, tendo como um dos produtos a colina, que é recaptada e na pré-sinapse será utilizada na síntese de novas moléculas de ACh (Webster, 2001).

Existem 2 grupos distintos de receptores colinérgicos: os muscarínicos que são ativados pelo alcalóide muscarina e bloqueados pela atropina e escopolamina, e os nicotínicos que são ativados pelo alcalóide nicotina e inibidos por curare (Halbach e Dermietzel, 2002).

Os receptores muscarínicos que se apresentam em 5 subtipos (M1-M5), são metabotrópicos, acoplados a proteína G e associados com sistema de segundos mensageiros, tendo, portanto, uma ação lenta quando comparados aos receptores nicotínicos, que são ionotrópicos e permitem o influxo rápido de íons positivos quando ativados (Webster, 2001; Cooper, 2003).

1.3.2 Os Receptores Colinérgicos Nicotínicos

Os receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) foram os primeiros a serem isolados (1970) e quimicamente definidos (1973) por técnicas bioquímicas clássicas (Halbach e Dermietzel, 2002).

Pertencem a uma família de canais iônicos ligante-dependentes, encontrados em abundância na junção neuromuscular e são amplamente distribuídos no sistema nervoso central e periférico. São formados pela combinação de cinco subunidades protéicas (estrutura pentamérica) que formam um poro central na superfície celular permeável a cátions (Dart et al., 2000) (Fig. 7).

Na junção neuromuscular embrionária e no órgão elétrico do peixe Torpedo, os nAChRs formam um pentâmero com uma estequiometria com 2 subunidades α , e demais subunidades dos tipos β , γ e δ . Na junção neuromuscular adulta a subunidade γ é substituída pela subunidade ϵ (Itier e Bertrand, 2001).

Os efeitos da nicotina são complexos, sendo um agonista que pode atuar também como um antagonista por dessensitizar os nAChRs quando submetidos à exposição prolongada ao mesmo (Meyer et al., 2001; Gentry et al., 2003).

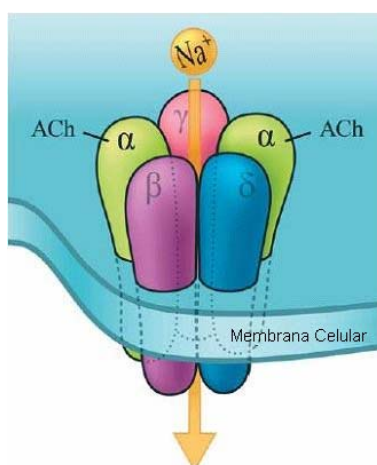


Figura 7 - Estrutura do receptor colinérgico nicotínico (nAChRs). (Extraído e adaptado de Powledge, 2004).

1.3.3 O Sistema Colinérgico Nicotínico Central

Os receptores nicotínicos centrais pertencem a uma superfamília de canais de ligantes iônicos que incluem receptores de glicina, GABA_A e 5-HT₃, (Dani e De Biasi, 2001). Esses receptores são compostos de 2 tipos de subunidades, α e β , sendo

que 9 subunidades do tipo α (α_2 - α_{10}) e 3 do tipo β (β_2 - β_4) têm sido encontrados em vertebrados (Gotti et al., 1997; Lukas, 1998; Colquhoun et al., 1997), e distingue-se entre nAChRs hetero-oligoméricos formados de amplas e distintas combinações entre 5 subunidades α (α_2 - α_6) e 3 subunidades β (β_2 - β_4), e nAChRs homo-oligoméricos, formados apenas de subunidades α_7 , α_8 ou α_9 (Buisson e Bertrand, 2002) (Fig. 8).

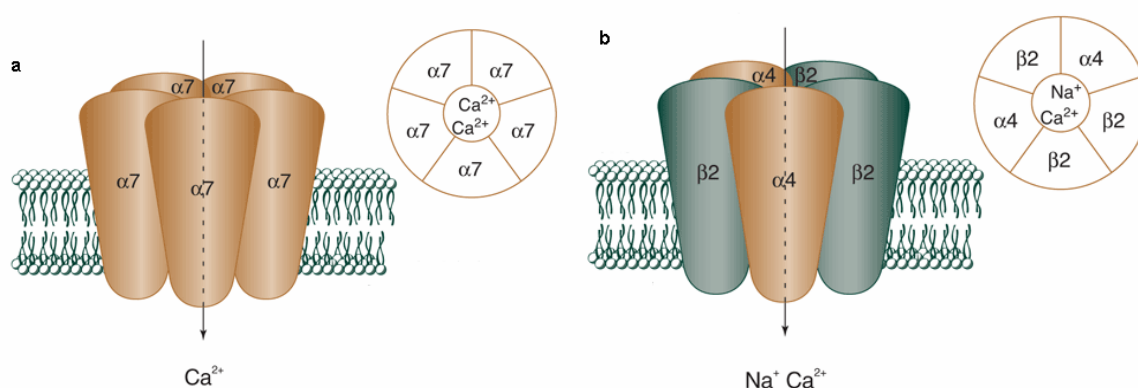


Figura 8 - Representação esquemática dos 2 subtipos mais comuns de nAChRs neuronais, ambos com 5 subunidades. Em ambos, forma-se um poro central que se abre quando agentes como a acetilcolina ou a nicotina se ligam, permitindo o influxo de íons para a célula. Em a) o nAChR α_7 permite principalmente a entrada de íons cálcio (Ca^{2+}), enquanto em b) nAChR $\alpha_4\beta_2$ permite a entrada de cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+). Fonte: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh293/179-185.htm>

1.3.4 Dessensitização e supersensibilização dos receptores nicotínicos

Funcionalmente, os nAChR podem ser encontrados em três estados conformacionais (fechado, aberto e dessensitizado), que são dinamicamente regulados pela exposição ao agonista endógeno, a acetilcolina (ACh), ou exógeno, como por exemplo, a nicotina (Laviolette e van der Kooy, 2004). Após a ligação do agonista, o nAChR entra em um estado conformacional que leva a abertura do canal iônico, permitindo a passagem de cátions (Ca^{+2} , Na^+ e K^+) através do poro. Após poucos milissegundos, o receptor passa para uma conformação que fecha o canal, voltando ao estado de repouso, ou entra em estado conformacional de dessensitização, o qual não responde ao agonista (Dani e De Biasi, 2001).

Fumar um cigarro libera cerca de 50 - 500 nM de nicotina no cérebro (Gourlay e Benowitz, 1997), que ativa e dessensitiza os nAChRs no neurônios dopaminérgicos da ATV (Pidoplichko, 1997).

É importante considerar que a probabilidade dos nAChRs estarem em um certo estado conformacional depende da concentração e do padrão de exposição ao agonista, e a dessensitização pode ser especialmente importante para entender os sintomas da abstinência e o desenvolvimento da tolerância à nicotina (Dani e De Biasi, 2001).

A dessensitização apresenta uma variabilidade entre os diferentes tipos de receptores nicotínicos, e a liberação e a remoção da acetilcolina das sinapses é muito rápida, portanto a dessensitização, em condições fisiológicas, não é importante no SNC (Dani et al., 2000), mas quando a nicotina, obtida do tabaco, está presente, subtipos de nAChRs, que incluem os $\alpha 4\beta 2$, que apresentam alta afinidade pela nicotina, são provavelmente dessensitizados (Alkondon et al., 1997).

Dos nAChRs homo-oligoméricos somente os que apresentam a subunidade $\alpha 7$ é amplamente distribuído no Sistema Nervoso Central de mamíferos (Dani e De Biasi, 2001), são especificamente inibidos por α -bungarotoxina (α -BTX) e baixas concentrações de metillicaconitina (MLA) (Gray et al., 1996). Têm baixa afinidade por nicotina, e somente concentrações elevadas do agonista (500 μ M de acetilcolina ou nicotina) dessensitizam, de maneira rápida, esses receptores. Ressalte-se que esses receptores não são significativamente dessensitizados pelas baixas concentrações de nicotina obtidas do tabaco (Quick e Lester, 2002; Woortorton et al., 2003).

Têm-se sugerido que o acúmulo de nAChRs dessensitizados promove uma supersensibilização (“up regulation”) como resposta adaptativa, não sendo, entretanto, uma propriedade universal de todos os nAChRs (Peng et al., 1994).

De fato, dependendo do tipo de nAChRs a supersensibilização ocorre mesmo não havendo uma inativação (ou dessensitização) prolongada dos receptores, como parece ser o caso para o tipo $\alpha 7$ como observado em culturas de células corticais de embriões de roedores (Kawai e Berg, 2001). Neste mesmo estudo, foi observado um efeito oposto de subsensibilização deste tipo de receptor nicotínico, também sem a ocorrência de uma inativação prolongada, em cultura de neurônios ganglionares (autônomicas) de frango (Kawai e Berg, 2001). Kawai e Berg (2001) concluíram com

as observações acima de que os nAChRs do tipo $\alpha 7$ difere de outros subtipos de receptores nicotínicos em sua regulação pela nicotina e que para estes receptores a inativação prolongada não é um requisito obrigatório para o desenvolvimento de uma supersensibilização.

Este tipo de nAChRs ($\alpha 7$) parece envolvido nos efeitos cognitivos benéficos da nicotina e a sua deficiência na fisiopatologia de distúrbios mentais como a esquizofrenia e a demência de Alzheimer (Kristensen et al., 2007). Desta forma, a supersensibilização destes receptores poderá ter implicações clínicas em disfunções cognitivas.

Quanto aos nAChRs do tipo $\alpha 4\beta 2$, estudos recentes mostram que a resposta funcional destes receptores nas células de mamíferos (Buisson e Bertrand, 2002) e neurônios mesencefálicos (Nashmi et al., 2003) está aumentada após exposição por longo prazo à nicotina.

Há evidências sugerindo que os nAChRs $\alpha 4\beta 2$ seriam o subtipo que parece estar mais envolvido na adição à nicotina, considerando-se que este subtipo de receptor de alta-afinidade é o mais abundante no cérebro de roedores (aproximadamente 90%) e que na ausência da subunidade $\beta 2$ em animais “*knock-out*”, há uma perda da afinidade dos receptores, e conseqüentemente, a auto-administração de nicotina não se estabelece, e tampouco a liberação de dopamina pelos neurônios mesolímbicos ativada pela nicotina (Picciotto et al., 1998).

Sendo assim, a supersensibilização de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ pode apresentar um papel incisivo na adição à nicotina (Nashmi et al., 2003; Vallejo et al., 2005).

1.3.5. Os Receptores nicotínicos centrais e a Área Tegmentar Ventral

Os receptores nicotínicos são abundantes na área tegmentar ventral (ATV) e núcleo accumbens. Na ATV, os receptores nicotínicos são encontrados no corpo dos neurônios dopaminérgicos ($\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 4\alpha 6\alpha 5\beta 2$ e $\alpha 7$), no corpo ($\alpha 4\alpha 5\beta 2$ e $\alpha 7$) e nos terminais ($\alpha 4\beta 2$) dos neurônios gabaérgicos, bem como nos terminais glutamatérgicos ($\alpha 7$) (Fig.10) (Klink et al., 2001; Picciotto, 2003; Wonnacott et al., 2005). Essa população de receptores nicotínicos implica na modulação da nicotina na liberação da dopamina (Champtiaux et al., 2003).

Os nAChRs do tipo $\alpha 7$ apresentam baixa afinidade por acetilcolina (ACh) e nicotina, dessensitam-se rapidamente, porém somente em condições de altas concentrações de ACh ou nicotina (Alkondon et al., 1998 e 1999), e estão envolvidos na resposta sináptica fásica, enquanto os nAChRs do tipo $\alpha 4\beta 2$ apresentam uma alta afinidade por ACh e nicotina, dessensitam lentamente e estão envolvidos na resposta sináptica tônica (Alkondon et al., 1998 e 1999).

Nos neurônios dopaminérgicos da ATV, os nAChRs $\alpha 7$ estão presentes, mas em menor densidade que os nAChRs contendo subunidade $\beta 2$ combinadas com subunidades $\alpha 4$ ou $\alpha 6$. Nesta região mesencefálica, os interneurônios GABAérgicos têm a predominância dos nAChRs $\beta 2$, e na pré-sinapse dos aferentes glutamatérgicos predominam nAChRs $\alpha 7$ (Woortorton et al., 2003). (Fig. 9).

Essa distribuição é importante, pois a subunidade $\beta 2$ presente nos neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos do mesencéfalo tem alta afinidade pela nicotina, são ativados e rapidamente dessensitizados, o que não ocorre com a subunidade $\alpha 7$, presente no neurônio glutamatérgico onde baixas concentrações de nicotina (como aquelas obtidas do tabaco, em torno de 500 nM), dessensitam apenas uma pequena população desses receptores (Pidoplichko et al., 2004).

Esta diferença de ação da nicotina sobre os diferentes tipos de receptores resulta em uma ação persistente da nicotina nos nAChRs $\alpha 7$ na pré-sinapse glutamatérgica, aumentando o influxo de Ca^{+2} nesses terminais, produzindo um aumento na liberação de glutamato e uma conseqüente excitação em neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (Pidoplichko et al., 2004). (Fig. 9).

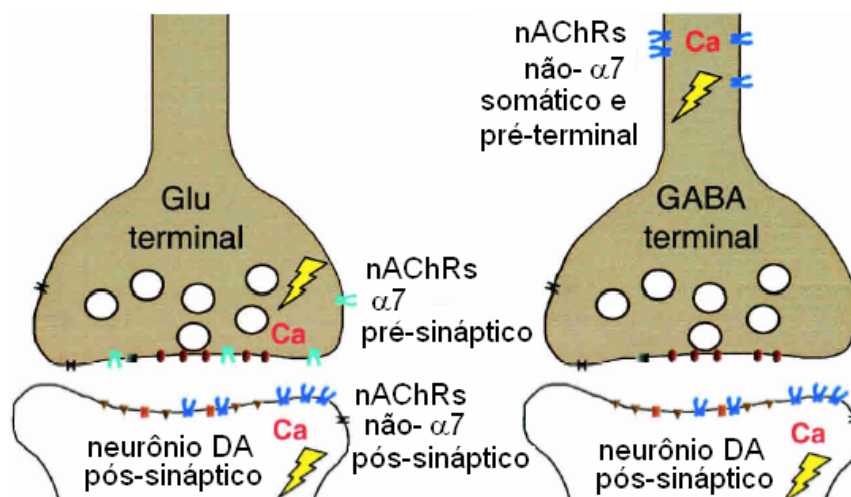


Figura 9 - Esquema representando os principais sítios de ação dos subtipos de receptores nicotínicos (nAChR) em sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas sobre neurônios dopaminérgicos na Área Tegmentar Ventral. A ativação de nAChRs induz uma despolarização local (raio amarelo) que pode ativar canais voltagem-dependente e, em alguns casos, um potencial de ação. Esta atividade também irá iniciar uma sinalização direta e indireta de Ca^{2+} . O sinal de Ca^{2+} pode influenciar a liberação subsequente de Ca^{2+} de estoques intracelulares e iniciar cascatas de reações intracelulares. O tamanho do sinal dependerá de vários fatores, incluindo os subtipos de nAChRs que estão presentes e a ação de ativação versus dessensitização de agonistas e moduladores. O diagrama apresenta os principais locais de ação de alguns subtipos de nAChRs, mas outros subtipos minoritários podem estar presentes. A nicotina, como a obtida do tabaco, ativar brevemente e inicia uma dessensitização significativa dos nAChRs não- $\alpha 7$ (usualmente $\beta 2^*$) localizados em neurônios DAérgicos e GABAérgicos. Os nAChRs $\alpha 7$ será algo ativada, mas não serão fortemente dessensitizados por estes níveis de nicotina. Assim, a ação excitatória aumentada pelos nAChRs $\alpha 7^*$ em terminais glutamatérgicos (Glu) acoplados a um aumento de curta duração nos disparos de neurônios DAérgicos produzidos pela ação direta da nicotina origina a coincidência de atividade pré-sináptica e pós-sináptica que favorece a iniciação da plasticidade sináptica, tais como as potenciação de curto (STP) e longo-prazo (LTP). Assim, os eventos sinápticos múltiplos contribuem para os disparos aumentados prolongados de neurônios DAérgicos. (Extraído e adaptado de Pidoplichko et al., 2004).

Por outro lado, como os nAChRs contendo a subunidade $\beta 2$ são mais rapidamente e extensivamente dessensitizados, a ativação do neurônio GABAérgico pela nicotina é reduzida, resultando em uma diminuição da ação inibitória GABAérgica, e conseqüentemente liberando a ativação do neurônio dopaminérgico. Assim, com a somatória de uma ativação glutamatérgica e uma redução da inibição GABAérgica, o neurônio dopaminérgico é mantido por mais tempo sob ativação. Esta ativação elevada da função dopaminérgica, por sua vez, favorece a potenciação de longo prazo (LTP) e de curto prazo (STP), que são a base para os

processos de aprendizado e memória, visto a dopamina exercer modulação sobre a função glutamatérgica especialmente em áreas corticais, como o córtex pré-frontal (Seamans e Yang, 2004). Além disso, a prolongada sinalização dopaminérgica no núcleo accumbens pode explicar o processo de adição da nicotina (Pidoplichko et al., 2004) (Fig. 10).

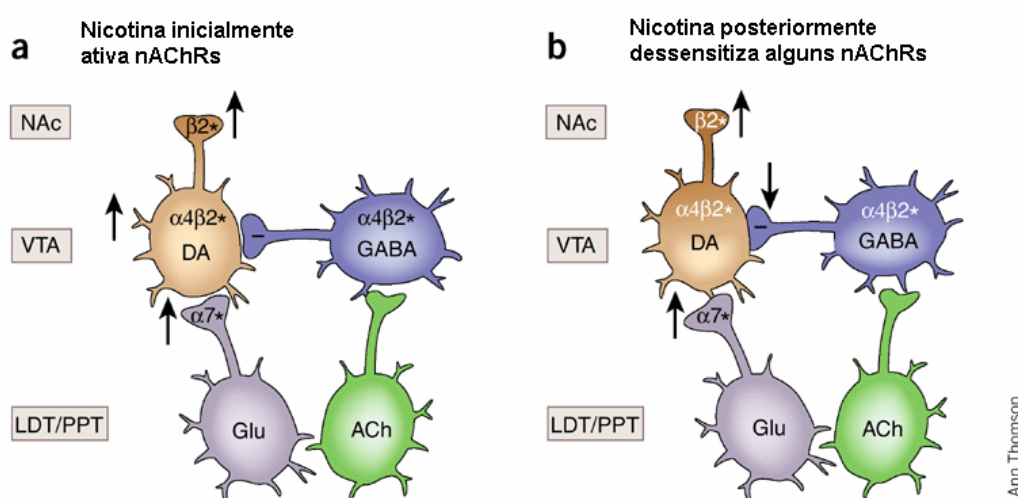


Figura 10 - Uma ilustração simplificada de várias sinapses e a liberação de DA (dopamina) no NAc (Núcleo accumbens) induzida por nicotina. (a) Inicialmente, nicotina causa ativação de vários subtipos de nAChRs. Os nAChRs $\alpha 7$ pré-sinápticos aumentam a excitação glutamatérgica, enquanto ativa diretamente nAChRs $\alpha 4 \beta 2$ nos neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos. O que aumenta as probabilidades de potenciação de longo prazo (LTP). Os neurônios colinérgicos (ACh) da LDT/PPT (núcleos tegmentares laterodorsal e pedunculo pontino) excitam também os interneurônios GABAérgicos (b) A prolongada presença de nicotina causa alguma dessensitização, particularmente dos nAChRs contendo subunidade $\beta 2$. Como consequência, a excitação nicotínica “direta” nos neurônios DA cessa e também diminui a inibição dos interneurônios GABAérgicos nesses neurônios da VTA (Área Tegmentar Ventral). (Extraído e adaptado de Dani e Harris, 2005).

1.3.6 Os Receptores nicotínicos centrais e o Córtex Pré-Frontal

Granon et al (1995) administraram na área pré-límbica do CPF antagonistas nicotínicos e muscarínicos, e observaram que a administração de bungarotoxina (antagonista nicotínico) produziu uma diminuição significativa no desempenho da memória operacional pareada por amostra enquanto que a escopolamina (antagonista muscarínico) prejudicou o desempenho da memória operacional pareada e não-pareada por amostra em tarefas com retardos realizadas em um

labirinto em T, sugerindo que os receptores nicotínicos e muscarínicos apresentam diferentes papéis no córtex pré-frontal de ratos, sendo a transmissão nicotínica importante em tarefas que requer um esforço no processamento da seleção de resposta, enquanto que o sistema muscarínico estaria envolvido no processamento geral da memória operacional.

A plasticidade sináptica no CPF é criticamente importante para as funções cognitivas, tais como a atenção e memória operacional (Laroche et al., 2000). Embora os efeitos da nicotina na memória operacional envolvam a plasticidade sináptica do CPF, os mecanismos celulares continuam desconhecidos (McGehee, 2007).

Segundo Couey et al. (2007) existem no córtex pré-frontal medial de camundongos nAChRs, contendo ambas as subunidades $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$, presentes em interneurônios, que aumentam a inibição dos neurônios piramidais pela redução da propagação do potencial de ação dendrítico e conseqüente redução da sinalização do cálcio intracelular. E segundo McGhee (2007) estes interneurônios seriam GABAérgicos e a terceira classe de interneurônios seria ativada indiretamente pelos nAChRs que aumentam a excitabilidade glutamatérgica sobre aquelas células. Assim, a exposição à nicotina aumenta as aferências inibitórias para os neurônios piramidais da camada V através de ativações direta e indireta de interneurônios GABAérgicos (McGhee, 2007), resultando em mudanças específicas na concentração de cálcio pós-sináptico e a determinação se uma força sináptica seria aumentada, desencadeando uma potenciação a longo-prazo (LTP), ou diminuída, resultando em uma depressão a longo-prazo (LTD).

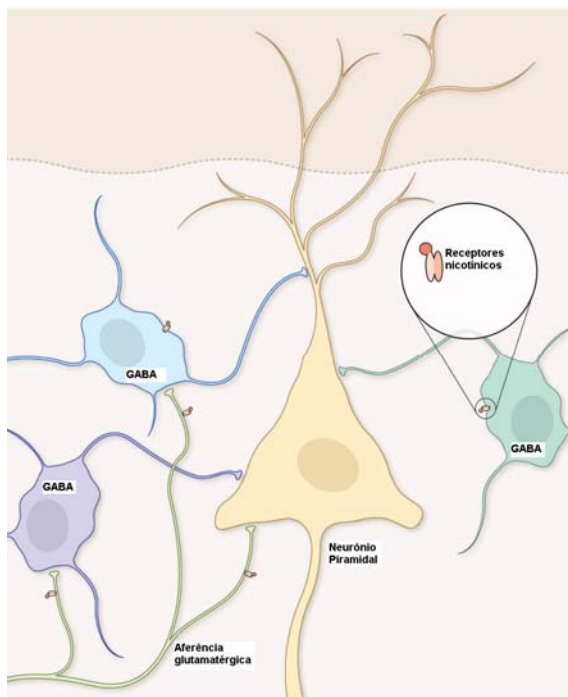


Figura 11 - Esquema da expressão dos nAChRs no CPF. Dois tipos de interneurônios GABAérgicos expressariam nAChRs (em cores verde e azul), enquanto um terceiro tipo não (em cor lilás). A aferência excitatória glutamatérgica para esses interneurônios também expressam nAChRs que contribuem para aumentar o tônus GABAérgico. Inervação colinérgica do núcleo prosencefálico basal para o CPF afeta esse circuito através da ativação desses nAChRs, mas o papel exato dessa conexão nas funções do CPF, na ausência da nicotina, necessita de mais estudos. (Extraído e adaptado de McGehee, 2007).

1.3.7 A Nicotina e as Funções Cognitivas

Agonistas de nAChRs podem melhorar, e antagonistas prejudicar tarefas de desempenho cognitivo, o que implica os receptores nicotínicos em funções cognitivas (Levin et al., 1998).

O sistema colinérgico nicotínico central tem sido implicado em vários aspectos de algumas desordens mentais, neurológicas e cognitivas importantes como Doença de Alzheimer, Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade e Esquizofrenia. Experimentos clínicos e em animais reforçam o papel do sistema nicotínico central no aprendizado, memória e cognição (Rezvani et al., 2001). A nicotina pode aumentar a cognição por efeitos diretos na atenção e por interagir com nAChR pré-sinápticos que facilitam a liberação de acetilcolina, glutamato, dopamina,

noradrenalina, serotonina, GABA, neurotransmissores estes que estão implicados no aprendizado e na memória (Samuels e Davis, 1998; Wonnacott, 1997).

A administração sistêmica aguda de nicotina (0,2 mg/kg) mostrou melhorar o desempenho na memória operacional de ratos no labirinto radial de 8 braços (Levin et al., 1991). Outros agonistas nicotínicos mostram efeitos similares, a lobelina melhorou a memória em uma tarefa de esQUIVA passiva e efetivamente atenuou o déficit de aquisição no labirinto aquático visto após lesão septal em ratos (Decker et al., 1993).

Vários estudos demonstram que a nicotina, tanto aguda quanto crônica, melhora o desempenho da memória operacional de animais no labirinto radial (Levin e Torry, 1996; Levin et al., 1999; Addy e Levin, 2002).

Levin et al. (2002), administrou no hipocampo ventral doses baixas dos antagonistas nicotínicos metillicaconitina (antagonista com preferência por receptores nicotínicos α_7) e dihidro- β -eritroidina (antagonista com preferência por receptores nicotínicos $\alpha_4\beta_2$), e utilizou o labirinto radial de 16 braços como paradigma para avaliar a memória operacional e de referência. Neste estudo foi observado que ambos os antagonistas de receptores nicotínicos prejudicaram principalmente a memória operacional e mostrou que esses receptores nicotínicos no hipocampo ventral estão envolvidos nestas funções de memória (Levin et al., 2002).

No homem, os estudos investigando os efeitos da nicotina nas funções cognitivas têm sido controversos. Os efeitos de prejuízos cognitivos geralmente são demonstrados em indivíduos que não fumam ou nunca fumaram, e os efeitos de melhora cognitiva geralmente utilizam fumantes ou pacientes com baixo desempenho cognitivo (Newhouse et al., 2004). Esses resultados opostos refletem as diferentes populações utilizadas nos estudos e que o desempenho cognitivo pode ser visto como uma função curvilínea relacionado com a estimulação nicotínica, com níveis intermediários de estimulação produzindo desempenho ótimo, enquanto que baixos e altos níveis de estimulação prejudicam o desempenho (Newhouse et al., 2004) (Fig. 12).

Ressalte-se que este perfil de resposta em “U” invertido corresponde ao padrão de desempenho da memória operacional no CPF sob diferentes concentrações de dopamina, especialmente com relação à ativação de seus receptores do tipo D₁ (Goldman-Rakic et al., 2000).

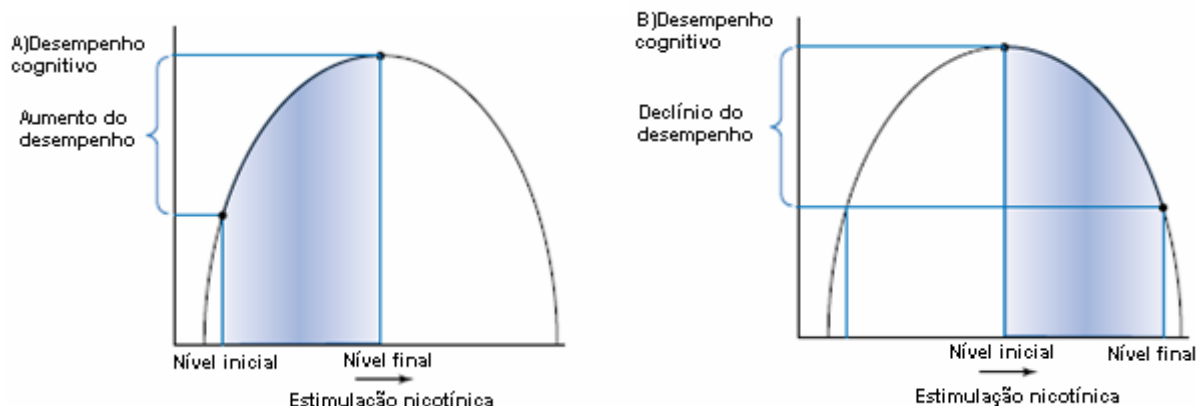


Figura 12 - A figura ilustra duas situações em que graus equivalentes de estimulação nicotínica produzem efeito opostos e ilustra o princípio geral no qual o resultado da estimulação nicotínica representa um reflexo do nível basal de desempenho. Os resultados da estimulação nicotínica, como em muitos sistemas biológicos, pode tanto aumentar quanto prejudicar uma função (princípio de Yerkes-Dodson). A) Desempenho inicial prejudicado: a administração de nicotina ou estimulação de receptores nicotínicos produz melhora no desempenho cognitivo, alcançando níveis ótimos. B) Desempenho inicial próximo do nível ótimo: a mesma estimulação nicotínica de A produz prejuízo no desempenho. (Extraído e adaptado de Newhouse et al., 2004).

Desta forma, um indivíduo com Doença de Alzheimer que apresenta baixo desempenho, poderá melhorá-lo com a estimulação nicotínica, e um indivíduo não fumante ou que nunca fumou apresenta prejuízos cognitivos com a estimulação nicotínica, por ele já apresentar um nível ótimo no desempenho cognitivo (Newhouse et al., 2004).

Evidências sugerem que os maiores efeitos da nicotina são vistos em tarefas que requer altos níveis atencionais. A melhora da memória pode ser consequência da melhora das funções atencionais (Warburton e Rusted, 1993) e, em alguma extensão, da estimulação psicomotora. Desta forma, os efeitos positivos da nicotina no aprendizado e memória podem ser, na verdade, mediados por seus efeitos nas funções atencionais (Fig. 13). Nos processos de aprendizagem e memória é necessária a aquisição, codificação, armazenamento e evocação de informações, entretanto, para que estes processos ocorram a função atencional adequada é requerida primariamente, estando, portanto, a função atencional na linha de frente dos processos cognitivos (Newhouse et al., 2004) (Fig. 13).

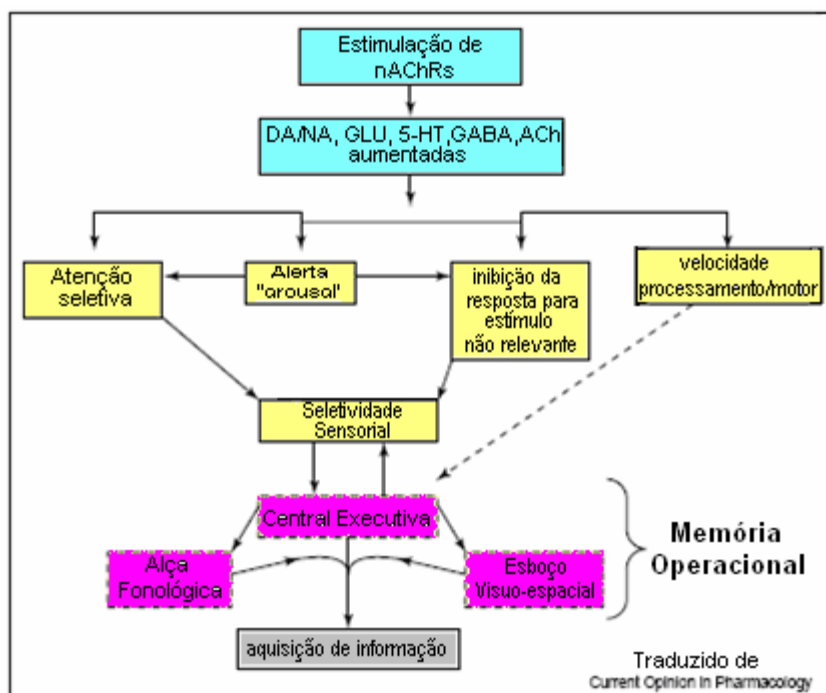


Figura 13 - Modelo proposto para os efeitos da estimulação dos receptores nicotínicos (nAChRs) sobre a função dos neurotransmissores (DA = dopamina, NA = noradrenalina, GLU = glutamato, 5-HT = serotonina, GABA = ácido γ -aminobutírico, ACh = acetilcolina) e a função atencional. Nesse modelo, a estimulação dos nAChRs aumenta a liberação de neurotransmissores em áreas relevantes para a função de alerta (*arousal*), atenção seletiva, processos inibitórios e velocidade de processamento motor. Considera-se a seletividade sensorial como sendo uma consequência de uma melhora do desempenho atencional. Esses processos são, por fim, direcionados à central executiva, componente atencional do modelo de Baddeley (2003) para a memória operacional levando à melhora da aquisição da informação. (Extraído e adaptado de Newhouse et al., 2004).

Como vimos anteriormente, o CPF tem sido considerado a estrutura cerebral relacionada à central executiva do modelo de memória operacional de Baddeley (2003).

1.4 Etanol

O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (Fig. 14) é uma substância de baixo peso molecular, hidrossolúvel, sendo rapidamente absorvido no estômago (20%) e intestino delgado

(80%). A concentração plasmática máxima é atingida entre 30 a 90 minutos após a ingestão. Vários fatores podem influenciar a absorção, sendo que o tempo de esvaziamento gástrico e o início da absorção intestinal podem ser considerados os principais fatores determinantes das taxas variáveis de absorção encontradas em diferentes indivíduos ou circunstâncias (Oga, 1996).

Sob condições ordinárias, é um líquido incolor e claro, volátil, inflamável, possuindo um odor agradável e característico. Suas propriedades físicas e químicas dependem primeiramente do grupo hidroxila, -OH, o qual imputa polaridade à molécula, além de promover interações intermoleculares via ligações de hidrogênio. Essas duas características ocasionam as diferenças observadas entre os álcoois de baixo peso molecular (incluindo o metanol e o etanol) e os respectivos hidrocarbonetos (Pereira e Andrade, 1998).

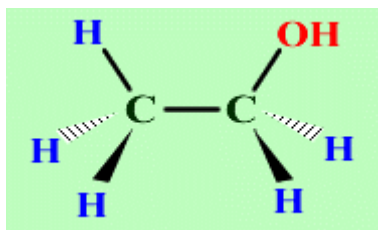


Figura 14 - Estrutura molecular do etanol. (Extraído de [http:// www.uyseg.org](http://www.uyseg.org))

1.4.1 Efeitos em diferentes sistemas de neurotransmissão

Ao contrário de outras drogas psicotrópicas, o álcool não produz seus efeitos centrais ligando-se a receptores específicos para iniciar suas ações (Tabakoff et al., 1995). É ainda aceita a idéia de que o etanol penetra na membrana devido a uma alteração no arranjo primário de sua estrutura lipídica, tornando-a mais fluida. Porém, tem sido bastante estudada a participação de diversos sistemas de neurotransmissão nas ações fisiológicas e farmacológicas do etanol, tais como

monoaminas, acetilcolina e aminoácidos neurotransmissores, além de canais de cálcio, entre outros mecanismos de ação (Zaleski et al., 2004).

Agudamente, o álcool potencializa o efeito do GABA nos receptores do tipo GABA_A (Edwards et al., 1999; Silva, 2002). Concentrações tóxicas de etanol (5 a 50 mmol por litro) inibem a atividade do fluxo de cálcio nos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA em hipocampo de ratos (Lovinger et al., 1989) e a resposta celular induzida pela ativação desses receptores, incluindo a liberação de neurotransmissores (Woodward e Gonzales, 1990) e a geração de potenciais pós-sinápticos excitatórios (Lovinger et al., 1989). Os receptores NMDA são importantes para a potenciação sináptica de longo prazo, que se mostra fundamental nos processos de aprendizado e memória (Nicoll, 1988), o que pode explicar a deficiência cognitiva e apagões ("*blackouts*") causados pela intoxicação alcoólica (Hoffman, 1989).

A exposição prolongada ao etanol produz um aumento na expressão de receptores glutamatérgicos nos cérebros de humanos dependentes e em sinaptosomas de ratos que receberam administração de etanol por 2 a 3 semanas (Michaelis et al., 1978 e 1990), o que pode contribuir para a síndrome de abstinência ao álcool (Valverius et al., 1990).

A serotonina e seus metabólitos encontram-se diminuídos no líquido de um grande número de indivíduos que fazem uso abusivo de álcool, sugerindo que o abuso e a dependência por esta substância possam ter uma base bioquímica relacionada com uma deficiência central desse neurotransmissor (Silva, 2002).

Além desta ação, o álcool atuaria inibindo a função de canais de Ca⁺² voltagem dependente do tipo L. Este efeito induziria o aumento do número destes canais e levariam a liberação excessiva de neurotransmissores durante o estado de abstinência alcoólica (Edwards et al., 1999; Silva, 2002).

A maioria dos estudos que relacionam o etanol e a cognição foi realizada nos últimos 15 anos (Hoaken e Stewart, 2003). Em geral a literatura sugere que a intoxicação alcoólica aguda prejudica uma variedade de aspectos da cognição, incluindo a memória episódica (Tiplady et al., 1999), o aprendizado verbal e espacial e a atenção visuoespacial (Post et al., 1996). Entretanto, esses efeitos parecem estar mais associados ao CPF, sendo que vários estudos demonstram a interferência específica do álcool nas capacidades cognitivas mediadas por essa região cerebral, incluindo atenção, raciocínio abstrato, abstração e memória operacional (Sayette,

1994), enquanto a memória de curto prazo está relativamente intacta (Tzambazis e Stough, 2000).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que o etanol administrado bilateralmente no CPFm produziu prejuízos dose-dependentes do desempenho de testes com retardos de 5 s ou de 1 h, nas doses de 180 μ g e 100 μ g, respectivamente, sugerindo que o etanol administrado no CPFm prejudica a memória operacional espacial de curta e de longa duração (de Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003).

As estruturas do circuito de recompensa cerebral, como o CPFm, o Nacc e a ATV parecem ser particularmente vulneráveis aos efeitos do álcool, sendo levados a um estado de hiperdopaminergia induzida pelo etanol (Fadda et al., 1985). Entretanto, os mecanismos subjacentes a este fenômeno ainda continuam bastante obscuros.

Dohrman e Reiter (2003) mostraram em estudos com cultura de células que o etanol pode modular a expressão de nAChRs tanto isoladamente como em combinação com a nicotina.

Dada as circunstâncias acima, sugeriu-se a hipótese que o etanol produz ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico via interferência primária em nAChRs centrais localizados nos corpos celulares e/ ou nos terminais neuronais dos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos (Soderpalm et al., 2000) (Fig. 15).

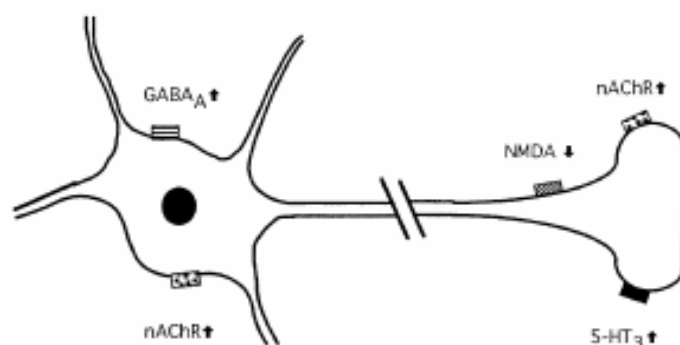


Figura 15 - Etanol e a influência na atividade de neurônios dopaminérgicos mesocorticolímbicos através de um ou vários canais iônicos ligante-dependentes. ↑ denota positiva e ↓ denota negativa interferência do etanol no respectivo receptor. (Extraído e adaptado de Larsson e Engel, 2004).

A complexidade dos mecanismos de ação do etanol e o crescente interesse da comunidade científica no estudo do envolvimento de sistemas de neurotransmissão central levam ao surgimento, cada vez maior, de novos estudos e teorias sobre a relação destes sistemas com os efeitos do álcool e os da cessação do seu consumo, tanto em pesquisas com animais, como em estudos clínicos (Zaleski et al., 2004).

1.5 Nicotina e Etanol

O uso de álcool frequentemente está acompanhado do uso de outras substâncias psicoativas, particularmente o tabaco.

Estima-se que 80 a 90 % de todas as pessoas com problemas de uso do álcool também fumam cigarros, índices altos quando comparado com os 25% da população em geral, o que demonstra a forte ligação entre o uso do álcool e da nicotina (Hurt et al., 1996).

Além disso, têm-se observado que indivíduos que são mais severamente dependentes do álcool fumam mais cigarros por dia e fumam o primeiro cigarro do dia mais cedo que aqueles que são moderadamente dependentes do álcool (Batel et al., 1995). Usuários pesados e freqüentes de álcool apresentam menores probabilidades em parar de fumar e são mais propensos a fumarem quando bebem (Dawson, 2000). O alcoolismo é dez vezes mais comum em fumantes que não-fumantes, e parece haver uma forte correlação entre iniciar-se no tabagismo e subsequente dependência ao álcool (DiFranza et al., 1990).

A habilidade de uma droga para reduzir o efeito de outra droga (tolerância cruzada) e a habilidade de uma droga de aumentar o efeito de outra droga (reforço cruzado) pode ter um importante papel em mediar essa relação álcool-nicotina (Pomerleau., 1995a).

Há suposições de que os fumantes consumiriam mais álcool porque a nicotina exerce um efeito estimulatório que pode diretamente conter tanto os efeitos sedativos do álcool como os déficits cognitivos associados com a intoxicação alcoólica. Esta hipótese é reforçada em modelos animais no qual a administração de

nicotina aumenta o consumo de álcool, parecendo ser esse efeito mediado por receptores nicotínicos no cérebro (Lê et al., 2000).

Desta forma, considerando-se a elevada proporção do uso combinado de álcool e tabaco, torna-se relevante entender os mecanismos farmacológicos centrais dessa interação, sobretudo sobre as funções cognitivas mediadas pelo CPFm, e conseqüentemente sobre a adição, já que esta estrutura cerebral é parte importante do circuito de gratificação cerebral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo investigou em ratos, os efeitos da combinação da administração aguda de nicotina e etanol no córtex pré-frontal medial (CPFm), da administração subcutânea diária da nicotina sobre os efeitos agudos de diferentes doses de nicotina e etanol no CPFm, bem como de administrações agudas de nicotina no CPFm no período de abstinência, sobre a memória operacional espacial de longa duração.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos da combinação de diferentes doses da nicotina (0, 3,2, 10 ou 32 μg) e da dose de 100 μg do etanol, ambos administrados bilateralmente no CPFm, sobre o desempenho de testes com retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços;
- Investigar os efeitos da combinação da dose de 3.2 μg da nicotina e diferentes doses do etanol (0, 32, 100 ou 180 μg), ambos administrados bilateralmente no CPFm, sobre o desempenho de testes com retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços.
- Determinar os efeitos da administração subcutânea (sc) diária de nicotina 1 mg/kg e 10 mg/kg sobre a aquisição de tarefas, realizadas sempre após um intervalo mínimo de 6 horas das administrações, no labirinto radial de 8-braços.
- Investigar a influência da administração sistêmica diária de nicotina sobre o efeito agudo de diferentes doses de nicotina e etanol, administradas bilateralmente no CPFm, sobre a memória operacional espacial de longa duração (retardo de 1 hora).
- Examinar os efeitos agudos da dose de 3,2 μg de nicotina administrada no CPFm, sobre a memória operacional espacial com retardo de 1 hora na vigência da abstinência da própria nicotina no 7º, 14º e 21º dia (ou 1ª, 2ª e 3ª semanas).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar, machos, com peso inicial entre 250 e 300g, provenientes da colônia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas-CBM-UFES, mantidos em gaiolas individuais de polipropileno (Fig. 16) ou de acrílico transparente no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, com ambiente com controle de temperatura e ciclo claro-escuro de aproximadamente 12 horas.



Figura 16 - Rato em gaiola individual de polipropileno no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia / PPGCF/ UFES.

3.2 Drogas

3.2.1 Estudo I - Interação aguda de nicotina e etanol no CPFm

- Álcool etílico (ETOH) absoluto pró-análise (Jand Química Ind.Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) diluído em água destilada v/v, sendo o volume de administração ajustado para as concentrações de 64, 200 e 360 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Nicotina (NIC, Nicotine Hydrogen Tartrate Salt, Sigma-Aldrich – ([-]-1-methyl -2- [3-pyridyl] pyrrolidine), diluída em soro fisiológico estéril na concentração de 6,4, 20 e 64 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

- Salina (SAL), soro fisiológico estéril (solução de cloreto de sódio a 0,9%), como solução controle.

3.2.2 Estudo II - Administração crônica de nicotina

3.2.2.1 Administrações sistêmicas de nicotina

- Nicotina (NIC, Nicotine Hydrogen Tartrate Salt, Sigma-Aldrich – ([-]-1-methyl –2- [3-pyridyl] pyrrolidine) diluída em 2 ou 3 gotas de Tween 80 e soro fisiológico estéril, nas concentrações de 1mg/ml e 10mg/ml para as administrações crônicas subcutâneas.
- Salina (SAL), soro fisiológico estéril (solução de cloreto de sódio a 0,9%), como solução controle.

3.2.2.2 Administrações intracorticais agudas de nicotina ou etanol

- Nicotina (NIC, Nicotine Hydrogen Tartrate Salt, Sigma-Aldrich – ([-]-1-methyl –2- [3-pyridyl] pyrrolidine) diluída em 2 ou 3 gotas de Tween 80 e soro fisiológico estéril, nas concentrações de 6,4, 20 e 64 µg/µl.
- Álcool etílico (ETOH) absoluto pró-análise (Jand Química Ind.Com.Ltda, São Paulo, SP, Brasil) diluído em água destilada v/v nas concentrações de 64, 200 e 360µg/µl.
- Salina (SAL), soro fisiológico estéril (solução de cloreto de sódio a 0,9%) como solução controle.

3.3 Labirinto Radial de 8 Braços

O labirinto radial de 8 braços (Lr-8), proposto originalmente por Olton e Samuelson em 1976, constitui uma valiosa ferramenta para a investigação sistemática da memória operacional espacial em animais (Olton,1979) e para o estudo dos efeitos de drogas sobre este tipo de memória (Oliveira et al.,1990; Nakamura et al.,1991; Nakamura-Palacios e Roelke,1997).

É construída em acrílico transparente e mantida a 1m de altura, possuindo uma plataforma central de base octogonal (33 cm de diâmetro) e paredes elevadas (30 cm de altura) da qual irradiam 8 braços simétricos removíveis (70 cm de comprimento, 10 cm de largura e paredes laterais de 4cm de altura), tendo um receptáculo preto (10cm de largura e 3 cm de profundidade) no qual é colocado o reforço (amendoim) (Fig. 17). Na entrada de cada braço, portas do tipo guilhotina conectadas a fios de nylon permitem o controle do acesso aos mesmos.

Todos os 8 braços do labirinto radial eram similares entre si, diferindo apenas na localização espacial, o que era sinalizado por estímulos visuais distais fixos (quadros, mesa, porta, janela e outros) de fácil discriminação e visualização a partir do labirinto.

3.4 Aquisição da Tarefa

Foi subdividida em 5 fases, realizando-se apenas uma sessão por dia com um período máximo de permanência no Lr-8 de 10 minutos por sessão. Treinavam-se individualmente os animais.

Fase 1 – Colocava-se o animal na plataforma central do Lr-8 com todas as portas de acesso aos braços abertos para livre exploração e habituação ao ambiente, 10 minutos por dia, durante 2 dias.

Fase 2 - Para que o animal aprendesse a localizar o reforço no final de cada braço, pedaços de amendoim eram colocados em todos os receptáculos. Nesta fase iniciou-se a privação alimentar parcial do animal, mantendo-o com 80 a 85% do peso inicial, ajustado ao crescimento.

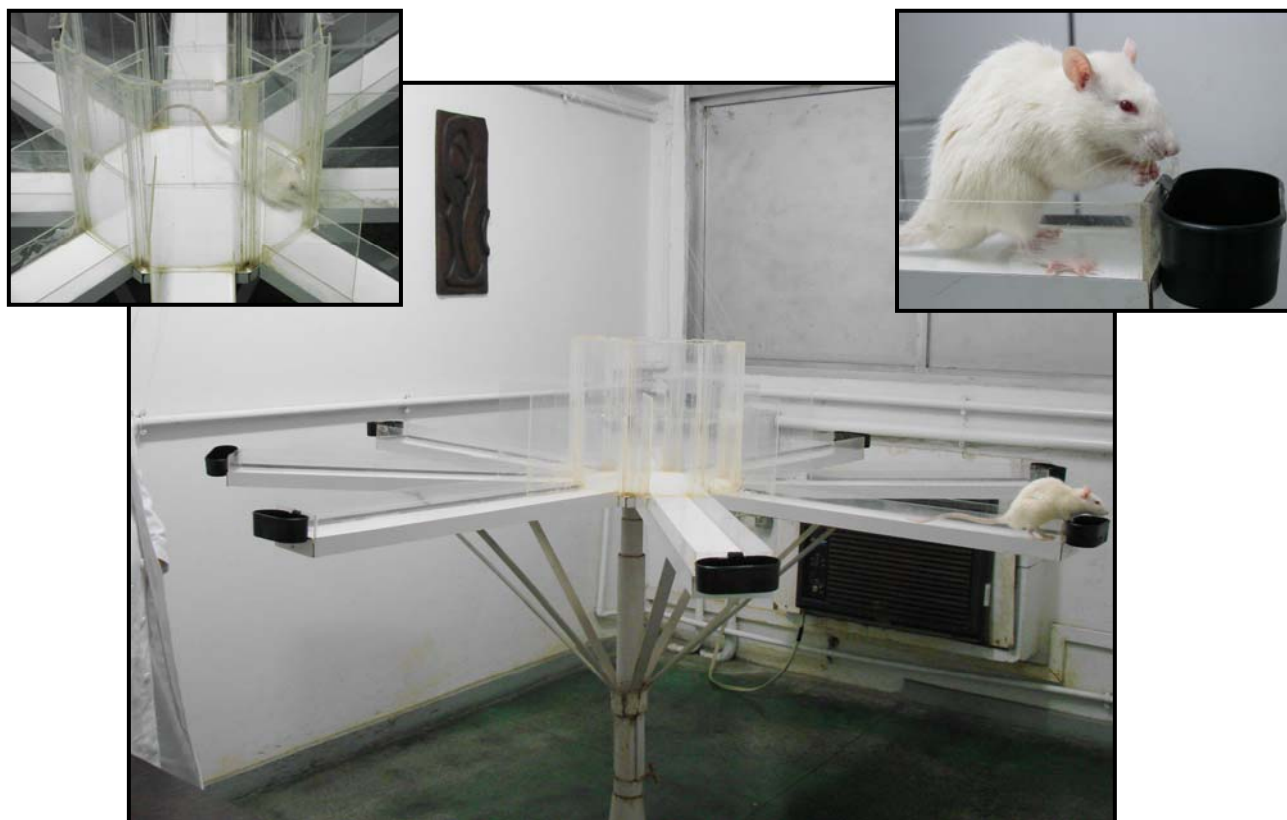


Figura 17 - Labirinto radial de 8 braços. À esquerda, animal no centro do labirinto radial, e à direita, animal localiza reforço (amendoim) no final do braço.

Fase 3 - Após aprender a localizar o reforço, o animal era colocado na plataforma central, todas as portas eram abertas e, após o animal entrar em um dos braços a porta que permitia o acesso aquele braço era fechada. Tendo ingerido o reforço, o animal era retornado a plataforma central pelo experimentador, sendo-lhe agora permitido somente o acesso aos braços ainda não visitados. O animal tinha que localizar o reforço nos 8 braços durante a sessão de treinamento no tempo máximo de 10 minutos.

Fase 4 - Esta é a fase de aquisição da tarefa propriamente dita, onde se abriam todas as portas a cada recolocação do animal na plataforma central do labirinto, após ter entrado em qualquer um dos braços. O animal, assim aprendia a não repetir os braços já visitados, e a repetição era considerada

como erro de desempenho. Treinava-se o animal até atingir um critério de 0 a 1 erro em 3 sessões consecutivas, por no mínimo 10 sessões.

Fase 5 - Após ter atingido o critério de aquisição da tarefa, introduziu-se um intervalo de retenção (**retardo**) entre o quarto e quinto braço visitados para avaliar a memória operacional espacial. Neste procedimento apenas 4 portas escolhidas aleatoriamente a cada sessão de treinamento eram abertas a cada recolocação do animal na plataforma central, estando o reforço presente no final destes braços. Esta etapa foi chamada de **pré-retardo** ou primeira corrida. Tendo percorrido os 4 braços, era o animal levado para sua gaiola por 5 segundos (retardo de 5 segundos) e a seguir, recolocado na plataforma central quando todas as 8 portas eram abertas, estando o reforço presente apenas nos receptáculos dos 4 braços ainda não visitados (Fig.18). Esta etapa correspondeu ao **pós-retardo** ou segunda corrida. Considerou-se erro de desempenho a repetição de um braço anteriormente visitado. Treinava-se o animal até atingir o critério de 0 a 1 erro por sessão em 3 sessões consecutivas. Atingindo este critério, o animal foi submetido à cirurgia estereotáxica descrita abaixo.

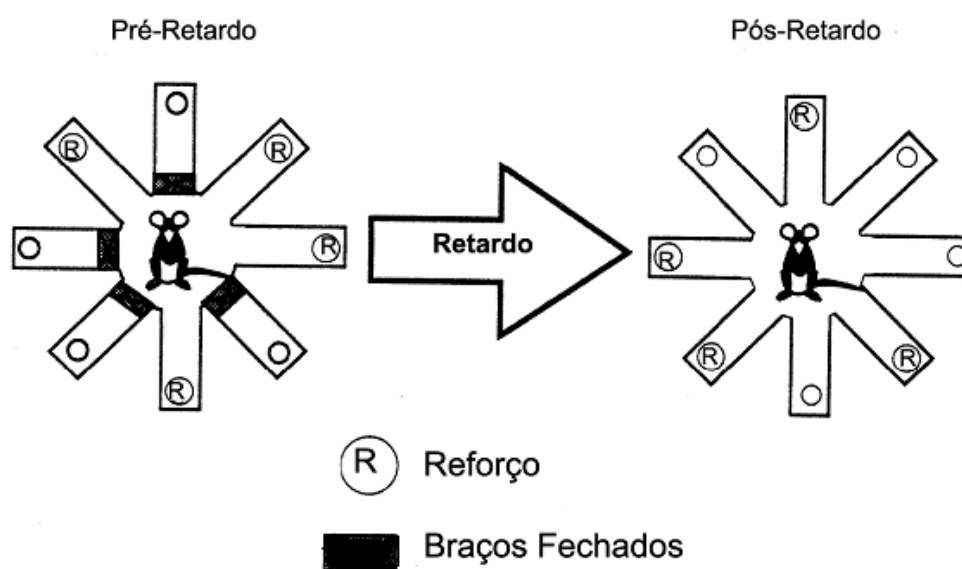


Figura 18 - Fase 5 do treinamento, com retardo de 5 segundos entre o 4º e o 5º braços. Na administração de drogas, os testes foram com retardo de 1 hora. R = reforço (amendoim). (Extraído e adaptado de Floresco et al., 1997).

3.5 Cirurgia Estereotáxica

À medida que atingiam o critério na aquisição da tarefa, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas bilaterais de 2 mm de comprimento (Plastics One Inc., 26 GA, VA, USA) no córtex pré-frontal medial (Fig. 19).

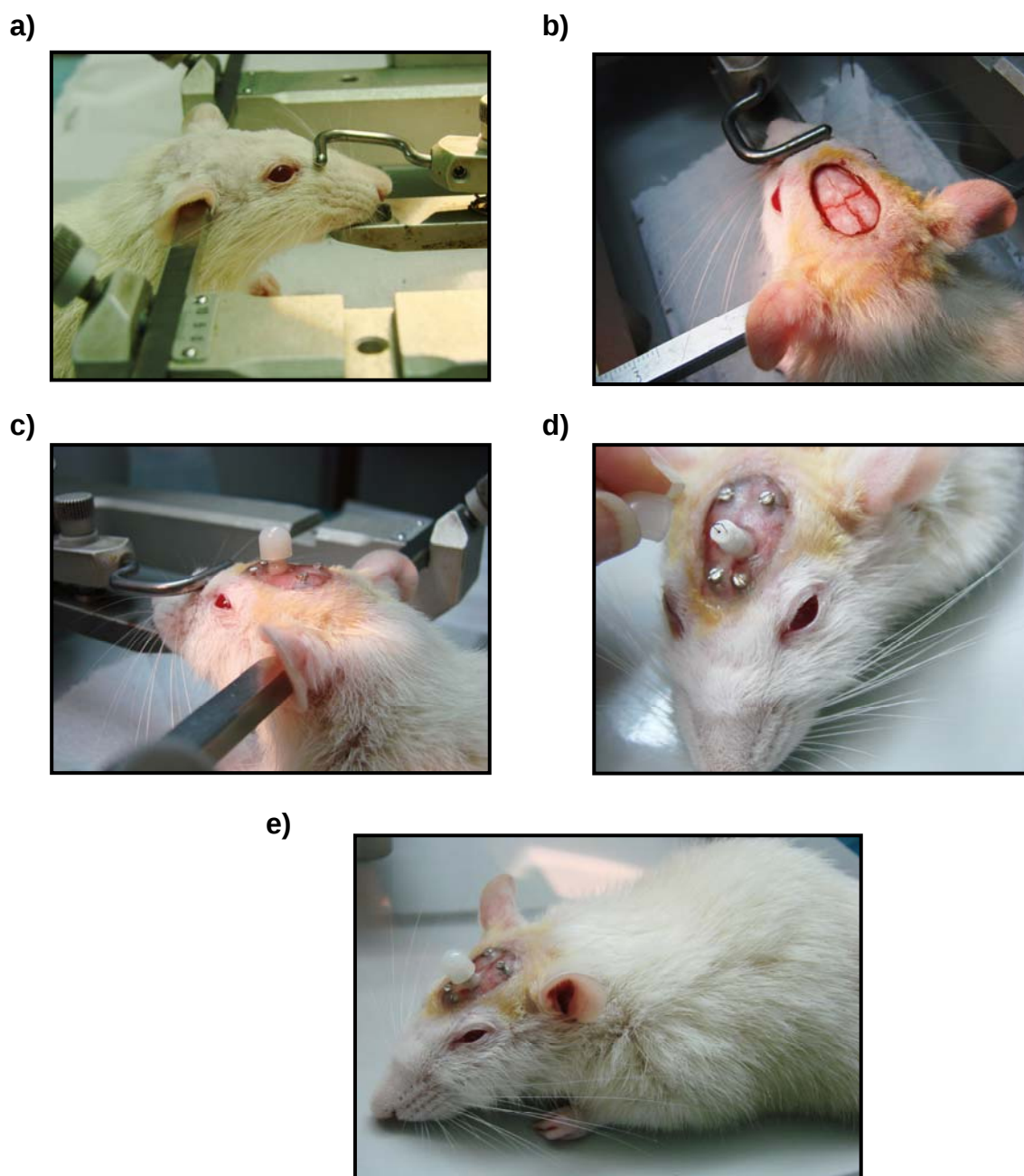


Figura 19 - Cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas bilaterais no CPFm. a) Animal no estereotáxico; b) Perfurações feitas com medidas a partir do bregma (B: +2,5 mm A, +/- 1 mm L e - 2,7 mm V) para implante da cânula bilateral; c) Cânula bilateral já implantada e a colocação de 4 parafusos de aço inoxidável para suporte da

resina acrílica; d) Retirada do protetor externo para visualização do protetor interno da cânula bilateral; e) Animal em recuperação do procedimento cirúrgico.

O animal era anestesiado com Hidrato de Cloral a 10% por via intraperitoneal (400 mg/kg) e imobilizados no aparelho estereotáxico (Modelo 51600 Stoelting, IL,USA). Solução de lidocaína a 1% com epinefrina foi infundida subcutaneamente de modo a formar um botão anestésico na região em que se efetuou a remoção de uma pequena área ovalada de pele e tecido subcutâneo, expondo a calota na altura do bregma. Perfurava-se a calota, limpa e seca em 4 pontos (2 nos ossos frontais e 2 nos parietais) com o auxílio de uma mini-furadeira (Dremel multipro+kit, Stoelting, IL, USA) para a fixação de 4 parafusos de aço inoxidável que servem para a ancoragem da prótese cirúrgica. Em seguida o crânio foi posicionado de forma que o bregma e o lambda situassem-se em um plano horizontal e a seguir cânulas (26 GA, Plastic One Inc., VA, USA) foram implantadas bilateralmente nas seguintes coordenadas com relação ao bregma: + 2,5 mm AP, +/- 1 mm L e - 2,7 mm V.

Feita a limpeza e secagem, o campo cirúrgico foi preenchido por resina acrílica auto-polimerizável de secagem rápida (Polímero de metil metacrilato, JET, São Paulo, SP, Brasil), que soldou as peças em uma prótese sólida. Nos orifícios das cânulas foram colocados protetores internos de 2,7 mm de comprimento e o conjunto foi envolvido por uma capa de proteção externa (Plastics One Inc,VA,USA).

O animal recebia 24000UI de penicilina G Benzatina por via intramuscular, ao término da cirurgia.

Após um período aproximado de 3 dias, treinava-se o animal em 2 sessões consecutivas no Lr-8 para avaliar se mantinha a linha de base de desempenho comportamental adquirido antes da cirurgia.

3.6 Estudo I - Interação aguda de nicotina e etanol no CPFm

Após recuperação cirúrgica, os animais que foram utilizados nesse experimento, retornaram aos treinamentos no labirinto radial de 8-braços até readquirirem a linha de base comportamental, quando então se iniciava a administração intracortical (IC) da combinação de drogas ou salina.

Retirando-se os protetores internos e externos da cânula bilateral implantada no CPFm do animal, foram feitas as administrações IC através desta cânula bilateral implantada, em um volume de 0,5 µl de cada lado do CPFm durante 90 segundos, permanecendo o animal conectado ao sistema de infusão por mais 90 segundos para melhor difusão da droga. O sistema de infusão era constituído por 2 cânulas de polietileno (PE50) e uma extremidade em forma de bocal (Pastics One Inc, VA, USA) no qual se adapta um injetor bilateral de 2,7mm de comprimento (Pastics One Inc, VA, USA). O injetor conectava-se com precisão à cânula implantada. Controlava-se o volume e a velocidade da infusão através de uma bomba de infusão contínua (Stoelting CO, IL, USA) onde as seringas Hamilton estavam posicionadas (Fig. 20).

As administrações agudas das combinações de drogas foram realizadas seguindo um Quadrado Latino para se reduzir os efeitos de um possível seqüenciamento e realizava-se somente uma administração por dia, obedecendo a um intervalo de 7 dias entre as administrações, durante o qual era realizada uma sessão de treinamento sem administração de droga (sessão inter-droga) para avaliarmos se a linha de base do desempenho (0 a 1 erro em uma mesma sessão) estava mantida. Interrompia-se a participação do animal no experimento, se não houvesse o desempenho adequado na sessão inter-droga.

Após a administração da primeira droga ou SAL da combinação, o animal retornava a sua gaiola, onde permanecia por 10 minutos, sendo então novamente retirado para receber a segunda droga ou SAL, seguindo novamente o protocolo de administração de drogas citado acima. Após a retirada da cânula de infusão, os protetores internos e externos da cânula bilateral eram recolocados no animal, e em seguida ele retornava para sua gaiola onde permanecia por 5 minutos, após o qual realizava-se a 1ª corrida

(**pré-retardo**), sendo empregado um retardo de 1 hora para a 2ª corrida (**pós-retardo**).

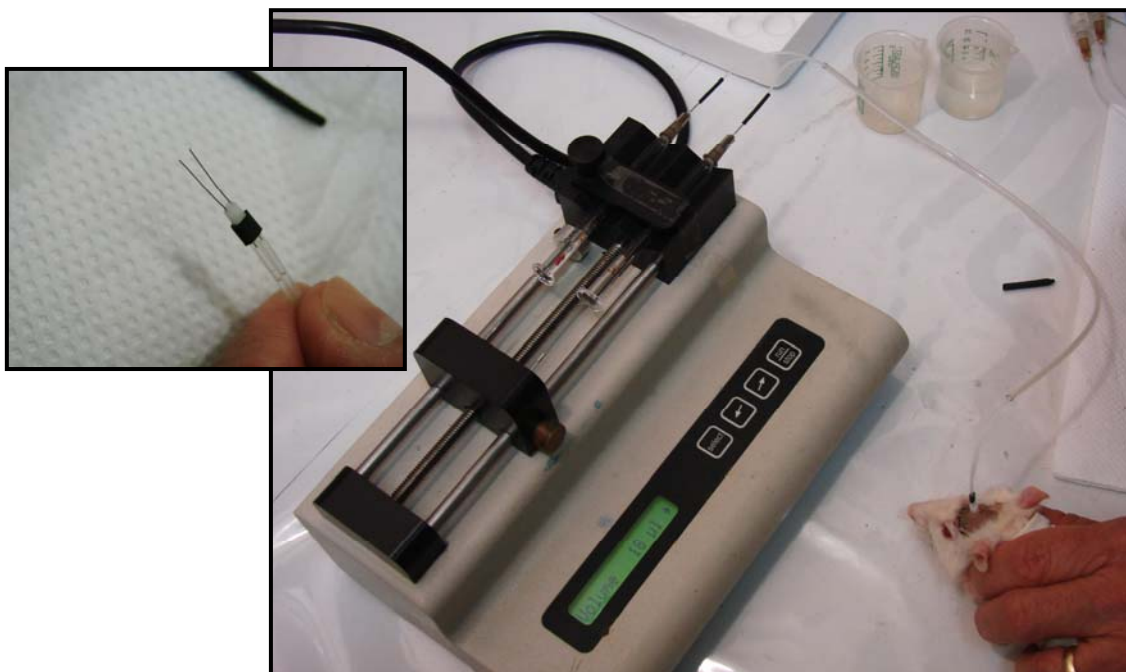


Figura 20 - Administração IC através de cânula bilateral implantada, em um volume de 0,5 μ l de cada lado do CPFm do rato. Controle do volume e da velocidade da infusão com bomba de infusão contínua. À esquerda, detalhe do injetor bilateral.

3.6.1 Experimento I - Efeitos da administração IC da combinação de diferentes doses de nicotina (3,2; 10 e 32 μ g) e etanol (100 μ g) sobre o desempenho de testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços.

Neste primeiro experimento, os animais ($n = 12-13$) que foram previamente treinados no Lr-8 e com cânulas bilaterais implantadas no CPFm, receberam administrações intracorticais (IC) de Salina (SAL) ou Nicotina (NIC) nas doses de 3,2, 10 ou 32 μ g/0,5 μ l, 10 minutos antes da administração de SAL ou Etanol (ETOH) na dose de 100 μ g/0,5 μ l. Cinco minutos após a última administração, os animais realizaram a 1ª corrida (**pré-retardo**), sendo empregado um retardo de 1 hora para a 2ª corrida (**pós-retardo**).

3.6.2 Experimento 2 – Efeitos da administração da combinação de nicotina (3,2 µg) e de diferentes doses de etanol (32; 100 e 180 µg) no CPFm sobre o desempenho de testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços.

Neste segundo experimento, os animais (n = 10) previamente treinados e com cânulas bilaterais implantadas, foram submetidos à administração IC de SAL ou NIC (3,2 µg/0,5µl), 10 minutos antes da administração de SAL ou ETOH nas doses 32, 100 ou 180 µg/0,5µl. Cinco minutos após a última administração, realizou-se a 1ª corrida (**pré-retardo**), sendo empregado um retardo de 1 hora para a 2ª corrida (**pós-retardo**).

3.7 Estudo II - Administração crônica de nicotina

3.7.1 Administrações Sistêmicas Crônicas

Na Fase 2 da aquisição da tarefa, quando os animais aprendiam a localizar o reforço no final de cada braço, iniciavam-se as administrações crônicas, com a distribuição aleatória dos ratos em 3 grupos: Grupo 1 (SAL) que recebeu doses diárias de salina, Grupo 2 (NIC 1) que recebeu doses diárias de nicotina na dose de 1 mg/kg, e, Grupo 3 (NIC 10) que recebeu doses diárias de nicotina na dose de 10 mg/kg.

Cada animal recebia administrações matinais diárias de nicotina ou salina por via subcutânea em dose única, 6 a 8 horas antes de serem conduzidos ao labirinto radial para continuidade dos treinamentos.

Cumprido o protocolo para aquisição da tarefa no labirinto radial, os animais foram submetidos à cirurgia estéreo-táxica (Fig. 19), como citado acima, para implantação de cânulas bilaterais no CPFm, ficando sem receber administrações sistêmicas no dia do procedimento cirúrgico e retornando-as após 48 horas da cirurgia. Os animais tratados cronicamente com nicotina 10 mg/kg antes de anestesiados com hidrato de cloral para a cirurgia

estereotáxica, recebiam administração subcutânea de atropina (antagonista muscarínico) na dose de 0,05 mg/kg ou 0,1 mg/kg.

Após recuperação cirúrgica (72 horas), os animais retornavam aos treinamentos no labirinto radial de 8-braços, até readquirirem a linha de base comportamental (com no mínimo 2 sessões consecutivas de treinamento), quando então iniciava-se as administrações intracorticais (IC) de nicotina ou etanol em diferentes doses.

3.7.2 Administrações Intracorticais agudas

Os animais que receberam as administrações crônicas diárias conforme citado acima, e que passaram pelas cirurgias estereotáxicas para implante das cânulas bilaterais, foram submetidos a administrações intracorticais agudas de Nicotina (NIC) ou Etanol (ETOH) em diferentes doses e Salina (SAL), respeitando-se um intervalo de 6 a 8 horas entre as administrações crônicas e agudas, ou seja, os animais recebiam as administrações crônicas no período matinal e as administrações agudas no período vespertino, e empregava-se o Quadrado Latino para distribuição dessas doses agudas.

Para as administrações IC procedeu-se da mesma forma descrita anteriormente para o Estudo I, apenas com a diferença de que era feita uma única administração IC, sendo que 5 minutos depois realizava-se a 1ª corrida (**pré-retardo**), sendo empregado um retardo de 1 hora para a 2ª corrida (**pós-retardo**).

A NIC foi administrada nas doses de 3,2; 10 e 32 $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$ e o ETOH nas doses de 32; 100 e 180 $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$. As administrações IC foram feitas a intervalo de 7 dias.

Entre as administrações IC, era sempre realizado um treino no labirinto radial (sessão interdroga) para avaliar se os animais mantinham o desempenho da tarefa em níveis basais, e a participação do animal no experimento era interrompida, caso não houvesse o desempenho adequado nessa sessão.

3.8 Histologia

Ao final dos experimentos, após completarem todo o protocolo de administração de drogas (estudos I e II), os animais foram anestesiados com solução de hidrato de cloral a 10% por via intraperitonal (IP) e submetidos a administração IC de solução de azul de metileno a 1% (Biotec,PR.Brasil) no mesmo volume das drogas. A seguir, recebiam uma sobredose de anestésico e foram perfundidos com soluções de salina e posteriormente formaldeído (8%). Suas cabeças foram removidas e seus encéfalos retirados e mantidos em solução formaldeído (8%) por no mínimo 3 dias, após o que foram seccionados em cortes de aproximadamente 80 μ m em um vibrátomo (Série 1000 Plus – sistema de secção tecidual – St. Louis, MO, EUA) posicionadas em lâminas gelatinizadas que após secarem em estufa, foram coradas com solução de vermelho neutro. A localização das cânulas foi visualizada por meio de um microscópio óptico e assinalada em diagramas extraídos do Atlas de Paxinos & Watson (1986).

3.9 Análise dos resultados

Os dados dos pesos corporais dos animais, o número de erros e o tempo gasto no labirinto radial de 8 braços foram coletados durante todas as fases de treinamento e o decorrer dos experimentos dos estudos I e II.

A entrada do animal em um braço já visitado numa mesma sessão de treinamento ou nos experimentos correspondia a um erro de desempenho. O tempo gasto em cada braço foi avaliado pela relação entre a permanência total no labirinto (em segundos) e o número de braços visitados naquela sessão.

3.9.1 Estudo I

Nas fases 4 e 5 (consideradas de aprendizagem propriamente dita) foram empregadas análises de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas seguidas do Teste de Fisher, com $p < 0,05$ como nível mínimo de significância, para determinação de diferenças estatisticamente significantes

durante a aprendizagem (erros) e do tempo gasto, e análises de regressão linear como análise complementar.

No protocolo experimental foi empregada ANOVA de uma via para medidas repetidas seguidas do teste de comparações múltiplas de Fisher, com $p < 0,05$ como nível mínimo de significância, para avaliação do número de erros e tempo gasto no labirinto radial e pesos corporais dos animais.

3.9.2 Estudo II

Na fase de aprendizagem (fases 4 e 5) para avaliar erros, tempos e pesos corporais dos animais no mesmo grupo (análise intragrupos) foram empregadas análises de variância (ANOVA) de 1 via para medidas repetidas seguidas do Teste de Fisher para localização das diferenças estatisticamente significantes, com $p < 0,05$ como nível mínimo de significância, e análises de regressão linear como análise complementar. Para avaliação entre os diferentes grupos (análise intergrupos) foram utilizadas análises de variância (ANOVA) de 2 vias para medidas repetidas seguidas do Teste de Fisher para localização das diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

Para as análises dos resultados obtidos nas administrações IC de diferentes doses de nicotina e etanol foram utilizados ANOVA de 1 via para medidas repetidas para avaliação intragrupos e ANOVA de 1 via para medidas independentes para avaliação intergrupos, seguidas do Teste de Fisher para localização das diferenças estatisticamente significantes, considerando-se $p < 0,05$ como nível de significância mínimo.

3.9.3 Programas estatísticos

Foram utilizados os programas *GraphPad Prism* versão 4.0 e o *GBStat* versão 6.5 para análise estatística e representação gráfica.

4 RESULTADOS I

ESTUDO I – Interação Aguda de Nicotina e Etanol no CPFm

4.1 Aquisição da Tarefa no Labirinto Radial de 8 Braços

4.1.1 Fase 4 - Sem o intervalo de 5 segundos

Todos os animais que foram incluídos no protocolo experimental ($n = 23$) apresentaram melhora gradativa do desempenho na fase de aquisição da tarefa no decorrer das últimas 10 sessões de tratamento. A análise de regressão linear demonstrou uma diminuição progressiva do número de erros até a última sessão, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem [$F(1,228) = 26,43$; $Y = 2,0 - 0,16X$; $r = -0,10$; $p < 0,0001$] (Fig. 21).

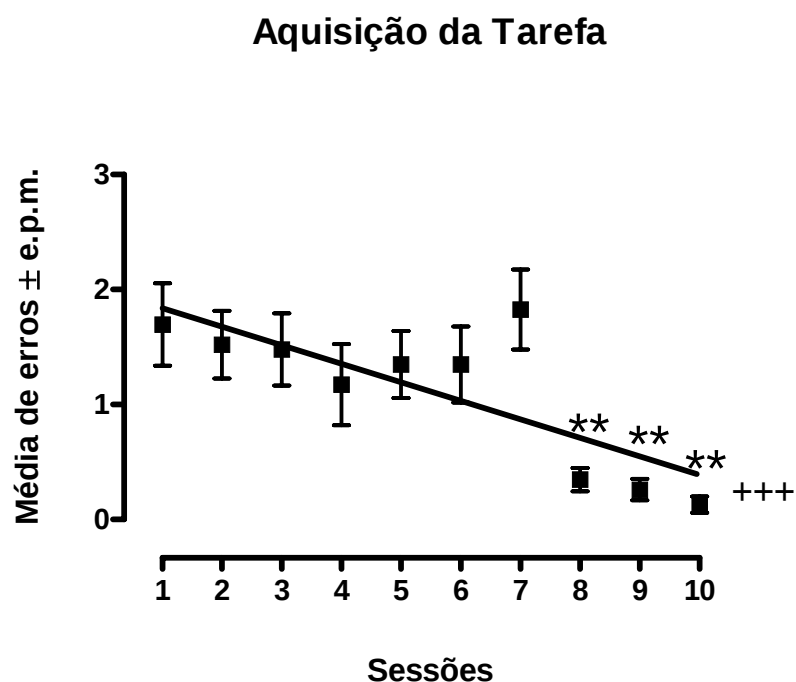


Figura 21 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais ($n = 23$) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV no labirinto radial de 8-braços. +++ $p < 0,0001$ (Análise de regressão linear). ** $p < 0,01$ comparada as 3 primeiras sessões (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Fisher).

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do número de erros entre as sessões de treinamento [$F(9,198) = 5,38$; $p < 0,0001$]. O teste de Fisher demonstrou que o número de erros foi significativamente ($P < 0,01$) menor nas últimas 3 sessões quando estas foram comparadas às 3 primeiras sessões.

Em relação ao tempo gasto em cada braço nas 10 sessões de treinamento, a análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do tempo de permanência em cada braço no decorrer das 10 sessões de treinamento [$F(1,228) = 25,02$; $Y = 19,75 - 0,92X$; $r = 0,09$; $p < 0,0001$].

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do tempo gasto nas sessões de treinamento [$F(9,198) = 4,14$; $p < 0,0001$]. O teste de Fisher demonstrou que o tempo gasto em cada braço foi significativamente menor para $p < 0,05$ na sessão 3 e $p < 0,01$ nas sessões 4 a 10 comparadas à primeira sessão.

Este resultado é consistente com a melhora de desempenho dos animais no tempo gasto para a realização da tarefa (Tab. 1).

Tabela 1. Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase 4 ($n = 23$). $p < 0,0001$ (Análise de regressão linear). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparadas a primeira sessão (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Fisher)

Tempo gasto em cada braço (segundos)			
Sessões	Média $\pm$ e.p.m.	Sessões	Média $\pm$ e.p.m.
1	21,0 $\pm$ 2,7	6	14,4 $\pm$ 2,4 **
2	18,9 $\pm$ 2,7	7	13,7 $\pm$ 1,3 **
3	16,3 $\pm$ 1,7 *	8	13,1 $\pm$ 0,9 **
4	13,3 $\pm$ 0,9 **	9	11,4 $\pm$ 0,4 **
5	13,2 $\pm$ 0,7 **	10	11,4 $\pm$ 0,5 **

4.1.2 Fase 5 – Com intervalo de 5 segundos

Na fase 5, ainda para a aquisição da tarefa no labirinto radial de 8 braços com a introdução dos retardos de 5 segundos, os animais apresentaram, no pré e no pós-retardo, bom desempenho (0 a 1 erro) nas últimas 3 sessões de treinamento, que é pré-requisito para o aprendizado nesta fase. A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do número de erros somente no pós-retardo [$F(1,136) = 15,42$; $Y = 0,99 - 0,14X$; $r = -0,10$; $p = 0,0001$] no decorrer das 6 sessões de treinamento nesta fase (Fig. 22).

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas, detectou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre as sessões de treinamento no pós-retardo [$F(5,110) = 3,73$; $p = 0,0037$]. A média de erros cometidos nas sessões 4, 5 e 6 foi significativamente menor ($p < 0,01$) quando comparadas à primeira sessão (Teste de Fisher).

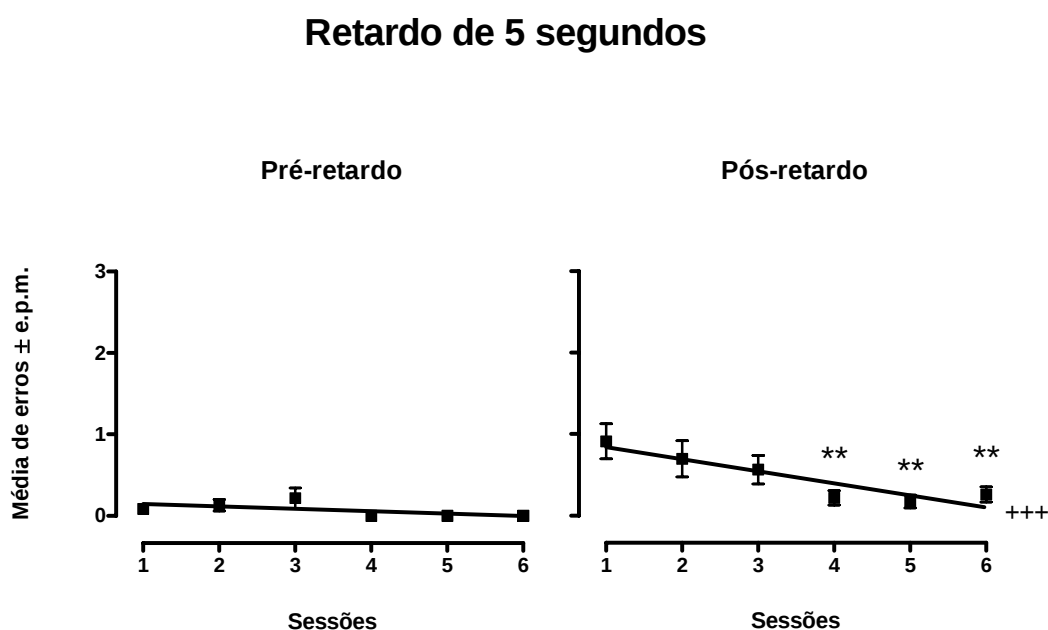


Figura 22 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais ($n = 23$) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços. No pós-retardo, +++ $p < 0,0001$ (Análise de regressão linear) ** $p < 0,01$ comparada à primeira sessão (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Fisher).

A análise de regressão linear demonstrou que no pré-retardo houve diminuição progressiva no tempo gasto em cada braço [$F(1,136) = 5,3$; $Y = 13,24 - 0,57$; $r = -0,04$; $p = 0,02$] no decorrer das 6 sessões de treinamento nesta fase. A ANOVA de 1 via para medidas repetidas, detectou a existência de diferenças estatisticamente significantes [$F(5,110) = 2,7$; $p < 0,02$]. A média do tempo gasto na sessão 4 ($p < 0,01$) e nas sessões 5 e 6 ($p < 0,05$) foi significativamente menor quando comparado a primeira sessão (Tab. 2) (Teste de Fisher).

A análise de regressão linear e a ANOVA de 1 via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no tempo gasto no pós-retardo de 5 segundos no decorrer das 6 sessões de treinamento que antecederam a cirurgia estereotáxica.

Tabela 2 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. pelos animais ($n = 23$) em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase 5. $p = 0,02$ (Análise de regressão linear). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados à primeira sessão (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Fisher).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Sessões	Pré-retardo	Pós-retardo
1	13,3 $\pm$ 1,6	10,3 $\pm$ 0,5
2	11,1 $\pm$ 0,5	10,6 $\pm$ 0,6
3	12,5 $\pm$ 1,4	9,6 $\pm$ 0,4
4	9,7 $\pm$ 0,4 **	9,3 $\pm$ 0,3
5	10,6 $\pm$ 0,9 *	10,4 $\pm$ 1,2
6	10,2 $\pm$ 0,4 *	10,4 $\pm$ 0,6

4.2 Pesos corporais durante as fases de treinamento

Os animais quando incluídos no protocolo de treinamento eram pesados (peso inicial) e iniciava-se a medida e anotação dos pesos corporais durante todas as fases de aprendizagem (F1 a F5).

O peso dos animais foi mantido abaixo do peso inicial em todas as fases, sendo que nas fases 3 e 4 intensificava-se a privação alimentar para que a motivação ao aprendizado ocorresse satisfatoriamente (Fig. 23). Nota-se que o percentual da média de perda de peso nas fases se manteve abaixo (8,0 a 15,4%) do máximo preconizado (15 a 20%) para este protocolo.

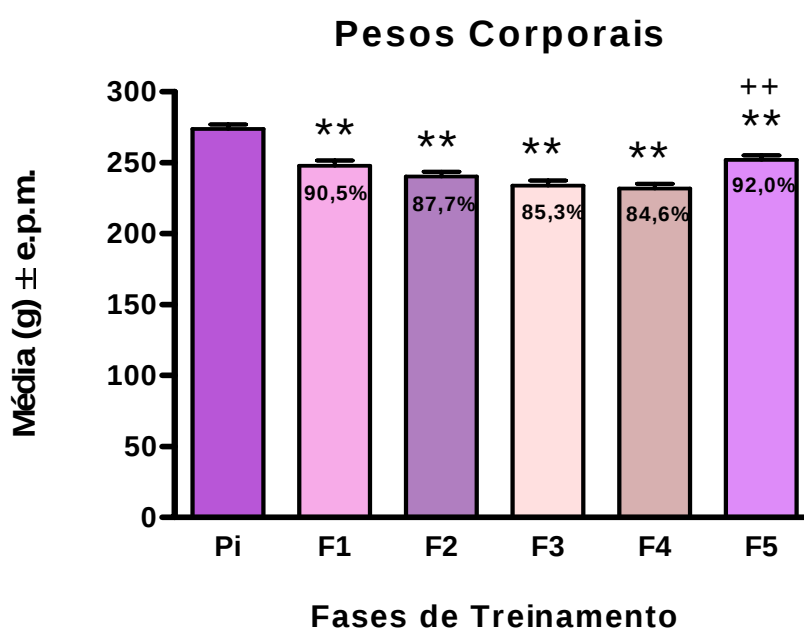


Figura 23 - Média dos pesos corporais (g) ± e.p.m. durante a primeira semana de adaptação dos animais (Pi = Peso inicial) e as 5 fases de treinamento que antecedem a cirurgia estereotáxica (F1 a F5). ** $p < 0,01$ comparado ao Peso inicial (Pi) e ++ $p < 0,01$ comparado aos pesos da F2, F3 e F4. Valores numéricos representam os percentuais dos pesos corporais em relação ao Pi.

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes nos pesos corporais entre as fases de treinamento [$F(5,110) = 55,4$; $p < 0,0001$]. O teste de Fisher demonstrou que os pesos corporais em todas as 5 fases de treinamento foram significativamente ($p < 0,01$) menores em relação ao peso inicial (Fig. 23).

Na fase 5, os animais foram mantidos com um maior percentual de peso corporal, em torno de 92% do peso inicial, já que adquiriram os critérios de aprendizado necessários para prosseguimento do protocolo experimental. O teste de múltiplas comparações de Fisher demonstrou que a média de peso corporal observado na fase 5 foi significativamente maior ($p < 0,01$) quando comparado às médias dos pesos das fases 2, 3 e 4 (Fig. 23).

4.3 Localização das cânulas

Os ratos que atingiram o critério de aprendizagem exposto acima, foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas bilaterais no CPFm. A figura 24 mostra os locais de implantação das cânulas no CPFm, marcados com azul de metileno 1%, que estão ilustrados em diagramas extraídos do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Observa-se que a maioria das cânulas bilaterais localizaram-se predominantemente na área Cg1 do cíngulo anterior, Fr2 do córtex frontal e Cg3 do córtex pré-límbico que constituem o CPFm.

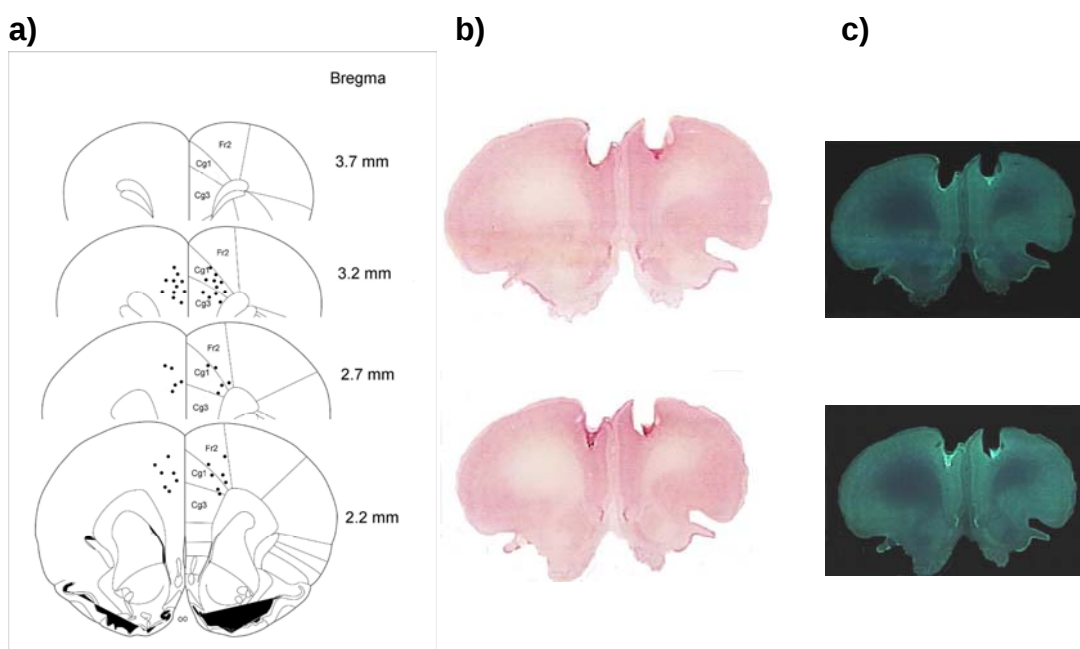


Figura 24 - a) Cortes coronais do cérebro de rato. Nota-se que as cânulas localizaram-se predominantemente nas áreas Cg1, Cg3 e Fr2 que constituem o CPFm em roedores. **b)** Fotografia das fatias cerebrais coradas em vermelho neutro ilustrando as localizações

bilaterais das cânulas destacadas pelo azul de metileno. **c)** Imagem com inversão de cores para destaque (fluorescente) da coloração azul de metileno.

4.4 Experimentos

4.4.1 Experimento 1 – Efeitos da administração IC da combinação de diferentes doses de nicotina (3,2; 10 e 32 μg) e etanol (100 μg) no CPFm sobre a memória operacional de ratos ($n = 12-13$).

Nesta análise não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes no número de erros na administração IC aguda de etanol 100 μg ou salina antecedida de salina ou de diferentes doses de nicotina, tanto no pré quanto no pós-retardo de 1 hora, quando comparada ao tratamento controle (SAL e SAL), ainda que tenha havido uma menor ocorrência de erros sob o tratamento com a nicotina na dose de 3,2 μg IC (Fig. 25).

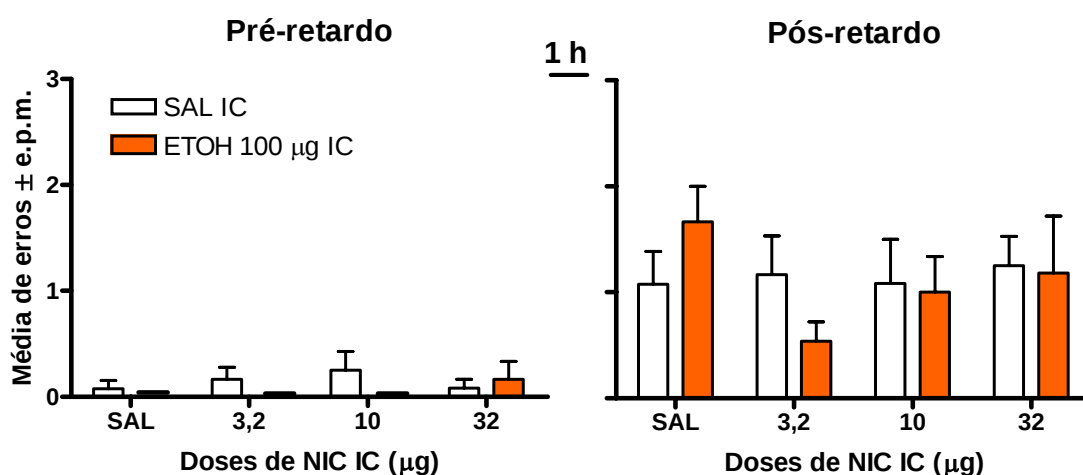


Figura 25 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou etanol (ETOH) na dose de 100 μg precedida pela administração IC de Salina (SAL) ou doses variadas de Nicotina (NIC), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços.

A tabela 3 abaixo refere-se ao tempo gasto em cada braço no pré e no pós-retardo de 1 hora. A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não identificou diferenças estatisticamente significantes entre os tempos em cada tratamento tanto antes como após os retardos de 1 hora.

Tabela 3 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços sob o tratamento combinado de salina (SAL) ou diferentes doses de nicotina (NIC) e de etanol (ETOH) na dose de 100 μ g, ambos administrados no córtex pré-frontal medial (n = 12-13).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Combinações	Pré-retardo	Pós-retardo
SAL e SAL	12,5 $\pm$ 0,9	11,1 $\pm$ 0,6
NIC 3,2 e SAL	11,7 $\pm$ 1,2	10,6 $\pm$ 0,8
NIC 10 e SAL	11,3 $\pm$ 1,2	10,0 $\pm$ 0,5
NIC 32 e SAL	11,7 $\pm$ 1,3	11,0 $\pm$ 1,1
SAL e ETOH 100	11,5 $\pm$ 0,8	10,5 $\pm$ 0,7
NIC 3,2 e ETOH 100	11,4 $\pm$ 1,5	10,6 $\pm$ 1,0
NIC 10 e ETOH 100	11,9 $\pm$ 0,9	12,5 $\pm$ 0,9
NIC 32 e ETOH 180	11,2 $\pm$ 0,6	11,4 $\pm$ 0,5

4.4.2 Experimento 2 – Efeitos da administração da combinação de nicotina (3,2 μ g) e de diferentes doses de etanol (32; 100 e 180 μ g) no CPFm sobre a memória operacional de ratos (n = 10).

ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre as combinações [$F(7,63) = 2,13$; $p = 0,05$]. O teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais tratados com a administração aguda da combinação SAL e ETOH 100 μ g apresentaram significativamente ($p < 0,01$) maior número de erros após o retardo de 1 hora comparada ao tratamento controle (SAL e SAL) (Fig.26).

Ressalte-se que este padrão de curva em U-invertido para os efeitos IC do ETOH sobre o desempenho do pós-retardo de 1 h replica integralmente os dados anteriormente obtidos em nosso laboratório.

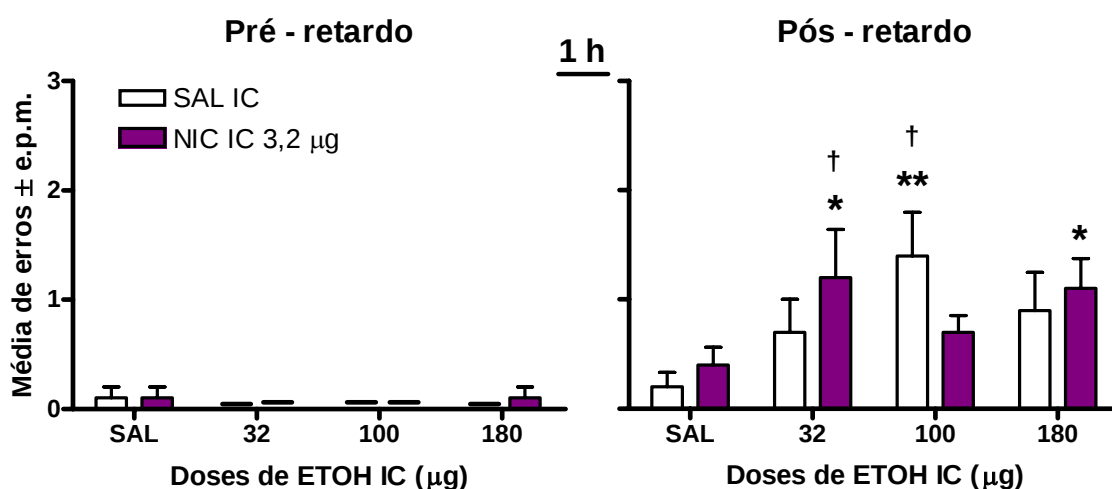


Figura 26 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou doses variadas de etanol (ETOH) precedida pela administração IC de Salina (SAL) ou Nicotina (NIC) na dose de 3,2µg, sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao controle SAL e SAL, † $p < 0,05$ comparado à combinação NIC 3,2 e SAL.

Curiosamente, a administração IC de NIC 3,2 µg seguido de ETOH 32 µg ou de ETOH 180 µg também apresentou significativamente maior número de erros ($p < 0,05$) quando comparado ao tratamento controle (SAL e SAL) (Fig.26). Entretanto, a combinação IC de NIC 3,2 µg seguido de ETOH 100 µg não foi estatisticamente diferente da combinação SAL e SAL (Fig.26), sugerindo a ocorrência de um bloqueio do efeito de prejuízo do ETOH 100 µg. Esses dados sugerem um efeito em U de prejuízo da memória operacional da interação NIC e ETOH no CPFm sobre a MO espacial de ratos, um padrão oposto ao encontrado para os efeitos de prejuízo *per se* do ETOH mencionado acima.

Observou-se ainda que a combinação aguda de NIC 3,2 µg e a menor dose do ETOH (32 µg) apresentaram maior número de erros quando comparado a NIC 3,2 µg e SAL ($p < 0,05$), assim como observamos maior número de erros na combinação SAL e ETOH 100 µg comparado com a combinação NIC 3,2 µg e SAL ($p < 0,05$) (Fig. 26). Estes dados sugerem que a combinação de pequenas doses da NIC e do ETOH é tão prejudicial para a memória operacional quanto à administração de uma dose de efeito máximo do ETOH sozinho.

Em relação ao tempo gasto em cada braço, não houve diferença entre as combinações, tanto no pré quanto no pós-retardo de 1 hora (Tab. 4).

Tabela 4 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços sob o tratamento combinado de salina (SAL) ou nicotina (NIC) na dose de 3,2 µg e de diferentes doses de etanol (ETOH), ambos administrados no córtex pré-frontal medial ($n = 10$).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Combinações	Pré-retardo	Pós-retardo
SAL e SAL	10,5 $\pm$ 1,0	11,5 $\pm$ 2,0
SAL e ETOH 32	9,6 $\pm$ 0,7	9,9 $\pm$ 1,0
SAL e ETOH 100	10,0 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 0,6
SAL e ETOH 180	12,4 $\pm$ 1,2	10,9 $\pm$ 1,2
NIC 3,2 e SAL	9,2 $\pm$ 0,7	8,9 $\pm$ 1,2
NIC 3,2 e ETOH 32	9,5 $\pm$ 0,6	10,3 $\pm$ 0,8
NIC 3,2 e ETOH 100	10,3 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 0,3
NIC 3,2 e ETOH 180	10,0 $\pm$ 0,7	10,8 $\pm$ 1,7

Nos dois experimentos acima descritos os animais que receberam a administração IC da combinação da menor dose de NIC (3,2 µg) e a dose de efeito máximo de prejuízo do ETOH (100 µg) apresentaram, consistentemente, mas não de forma estatisticamente significante, menor número de erros comparado ao tratamento combinado de SAL e ETOH 100 µg. Considerando-se que ambos os experimentos foram realizados em condições bastante semelhantes, foi feita uma

análise adicional destes resultados somando-se os dados de todos os animais ($n = 22-23$) submetidos a ambos os tratamentos e às combinações controles de SAL e SAL, e, NIC 3,2 μg e SAL (Fig. 27).

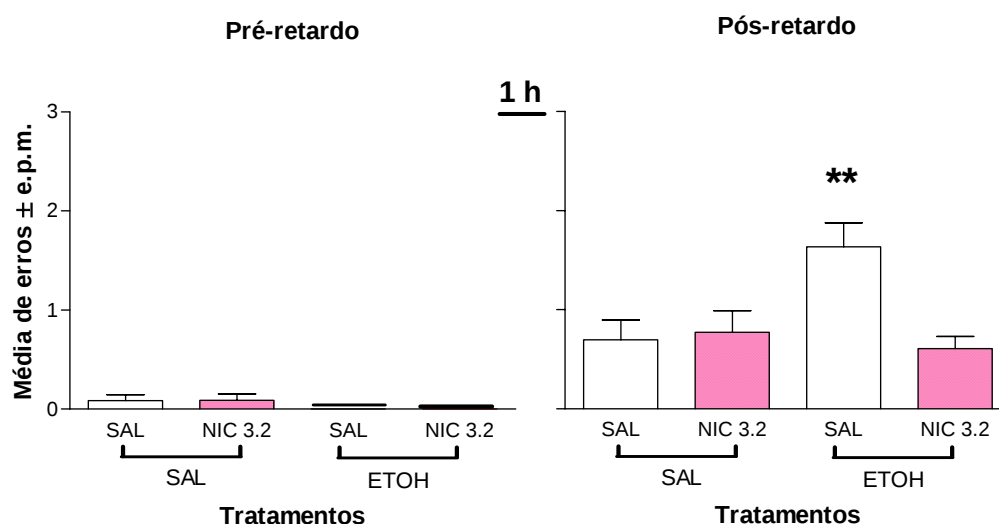


Figura 27 - Efeitos da administração intracortical (IC), no córtex pré-frontal medial, de nicotina (NIC) 3,2 μg ou salina (SAL) seguida de etanol (ETOH) 100 μg ou SAL sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços. ** $p < 0,01$ comparado ao controle SAL e SAL e à combinação de NIC 3,2 μg e SAL, e, principalmente comparado à combinação de NIC 3,2 μg e ETOH 100 μg .

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre as combinações [$F(3,66) = 6,31$; $p = 0,0002$]. O teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que a administração aguda da combinação SAL e ETOH 100 apresentaram significativamente ($p < 0,01$) maior número de erros após o retardo de 1 hora comparada ao tratamento controle (SAL e SAL) e comparado à combinação NIC 3,2 e SAL (Fig. 27).

Destaque-se que os animais que receberam a combinação aguda de NIC 3,2 e ETOH 100 apresentaram significativamente menor número de erros ($p < 0,01$) quando comparado aos que receberam a combinação SAL e ETOH 100 μg (Fig. 27),

o que evidencia o bloqueio do efeito de prejuízo da memória operacional produzido pelo ETOH 100 µg por uma pequena dose da NIC (3,2 µg), ambos administrados diretamente no CPFm.

5 RESULTADOS II

ESTUDO II – Administração Crônica de Nicotina

A administração crônica de nicotina subcutaneamente produziu vários efeitos centrais e periféricos agudos, e mais intensos na dose maior (10 mg/kg), que tinham uma duração máxima de 15 minutos. Várias respostas foram observadas e notificadas para controle das administrações, dentre elas, hiperatividade motora (aumento da locomoção e saltos), espasmos musculares (contrações musculares espásticas), engasgos, tremores, exoftalmia, taquicardia e/ou bradicardia, taquipnéia e/ou bradipnéia, cianose periférica (especialmente após engasgos e bradipnéia), liberação de esfíncter (urina e/ou fezes), incoordenação motora e perda da postura corporal, hiperexcitabilidade (hiper-reatividade a ruídos e ao estalar de dedos), tentativa de fuga, rigidez de cauda (hiper-extensão de cauda com a cauda de Strauss), pré-convulsões e convulsões (focais ou generalizadas tônico-clônicas ou tônicas).

As respostas que se apresentaram com alguma regularidade, porém não na totalidade dos animais, nas administrações da menor dose de nicotina (1 mg/kg) foram, em ordem crescente de intensidade, tremores, exoftalmia, taquicardia, taquipnéia, hiperatividade motora, rigidez de cauda e tentativa de fuga.

Estas respostas também se apresentaram com mais frequência e em todos os animais nas administrações da maior dose de nicotina (10 mg/kg), e ainda acrescidas de bradicardia e bradipnéia, cianose periférica, espasmos musculares, engasgos, incoordenação motora e perda da postura corporal, liberação de esfíncteres, rigidez de cauda, hiperexcitabilidade, pré-convulsões e convulsões focais ou generalizadas tônico-clônicas ou tônicas, em geral intensas.

Entretanto, como será detalhada a seguir, ainda que tenham ocorridas estas manifestações especialmente no grupo tratado com a maior dose da nicotina, os animais não apresentaram alterações comportamentais ou clínicas nos intervalos das administrações e mantiveram o desempenho bastante satisfatório das tarefas no labirinto radial, bem como em seu estado físico geral (pesos corporais).

5.1 Aquisição da Tarefa no Labirinto Radial de 8 Braços

5.1.1 Avaliação intragrupos

5.1.1.1 Fase 4 – Sem intervalo de 5 segundos

Os animais dos 3 grupos: SAL ($n = 8$), NIC 1 mg/kg ($n = 13$) e NIC 10 mg/kg ($n = 11$), que receberam administrações crônicas a partir da 2ª fase de treinamento no labirinto radial, apresentaram melhora gradativa do desempenho na fase de aquisição da tarefa (fase 4) no decorrer das últimas 10 sessões de treinamento.

- **Grupo SAL**

No grupo SAL, que recebeu doses subcutâneas diárias de salina durante a aprendizagem, a análise de regressão linear demonstrou uma diminuição progressiva do número de erros até a última sessão, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem para os animais do grupo SAL [$F(1,78) = 5,92$; $Y = 1,84 - 0,13X$; $r=0,07$; $p= 0,02$]. A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do número de erros entre as sessões de treinamento [$F(9,63) = 2,78$; $p = 0,008$]. O teste de Fisher demonstrou significativamente menor número de erros ($p < 0,05$) nas últimas 2 sessões quando estas foram comparadas às sessões 1, 3 e 5, e também nas 3 últimas sessões ($p < 0,01$) comparada à sessão 7 (Fig. 28).

Aquisição da tarefa - Grupo SAL

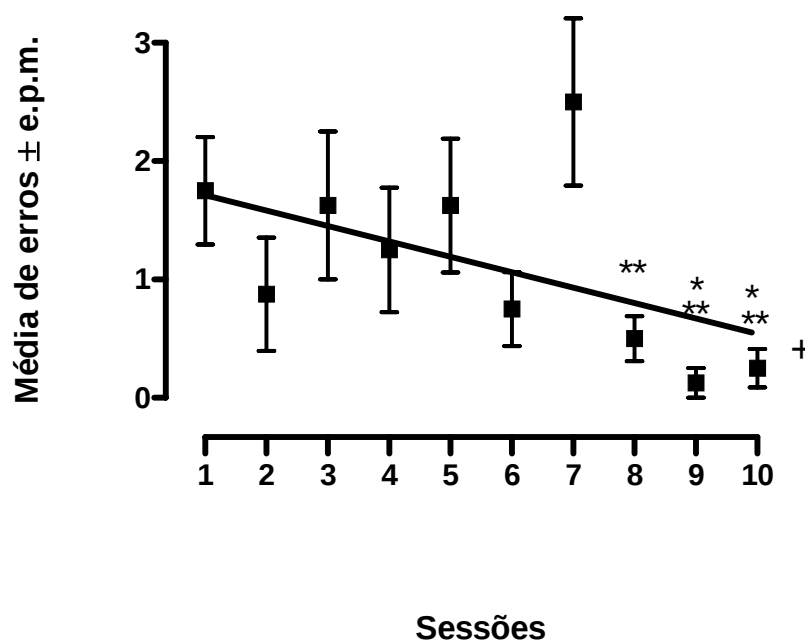


Figura 28 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais ($n = 8$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Salina (SAL) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 no labirinto radial de 8-braços. + $p = 0,02$ (Análise de regressão linear). * $p < 0,05$ comparado às sessões 1, 3 e 5; ** $p < 0,01$ comparado à sessão 7 (ANOVA 1 via medidas repetidas seguida do teste de Fisher).

A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do tempo de permanência em cada braço no decorrer das 10 sessões de treinamento [$F(1,78) = 9,7$; $Y = 20,25 - 0,85X$; $r = -0,1$; $p = 0,0025$]. A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do tempo gasto nas sessões de treinamento [$F(9,63) = 2,4$; $p = 0,02$]. O teste de Fisher demonstrou que o tempo gasto foi significativamente menor nas últimas 4 sessões ($p < 0,01$) comparado à primeira sessão, e quando comparadas ($p < 0,05$) à 2ª sessão.

Tabela 5 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase 4 dos animais ($n= 8$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Salina (SAL). $p = 0,0025$ (Análise de regressão linear). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparada à segunda e à primeira sessões, respectivamente.

Tempo gasto em cada braço (segundos)			
Sessões	Média $\pm$ e.p.m.	Sessões	Média $\pm$ e.p.m.
1	21,1 $\pm$ 4,8	6	15,4 $\pm$ 2,1
2	19,4 $\pm$ 3,6	7	13,4 $\pm$ 1,2 */**
3	14,3 $\pm$ 1,5	8	13,2 $\pm$ 1,4 */**
4	18,9 $\pm$ 3,7	9	12,5 $\pm$ 1,3 */**
5	14,5 $\pm$ 1,2	10	13,2 $\pm$ 1,3 */**

- Grupo NIC 1**

No grupo NIC 1, que recebeu doses subcutâneas diárias de nicotina na dose de 1 mg/kg durante a aprendizagem, a análise de regressão linear demonstrou uma diminuição progressiva do número de erros até a última sessão, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem [$F(1,128) = 20,37$; $Y = 2,72 - 0,26X$; $r = -0,14$; $p < 0,0001$] e a ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças significantes entre as sessões $F(9,108) = 4,88$; $p < 0,0001$]. O Teste de Fisher demonstrou que o número de erros apresentados nas 2^a a 10^a sessões foram significativamente ($p < 0,01$) menores comparadas à sessão 1, nas sessões 9 e 10 foram menores ($p < 0,01$) comparadas à sessão 7, e ainda, na sessão 9 foram significativamente ($p < 0,05$) menores comparadas às sessões 2 a 5 (Fig. 29).

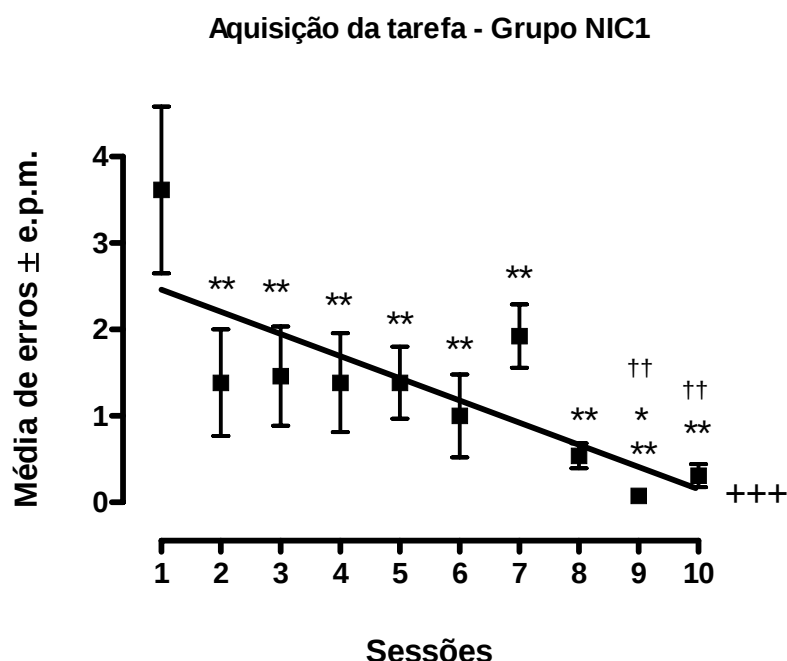


Figura 29 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais ($n = 13$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 1 mg/kg (NIC 1) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 no labirinto radial de 8-braços. +++ $p < 0,0001$ (Análise de regressão linear). * $p < 0,05$ comparado com as sessões 2, 3, 4 e 5; ** $p < 0,01$ comparado à primeira sessão; †† $p < 0,01$ comparada com a sessão 7.

A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do tempo de permanência em cada braço no decorrer das 10 sessões de treinamento [$F(1,128) = 10,21$; $Y = 19,81 - 0,75X$; $r = -0,07$; $p = 0,002$]. A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do tempo gasto nas sessões de treinamento [$F(9,108) = 2,52$; $p = 0,01$]. O teste de Fisher demonstrou que o tempo gasto em cada braço foi significativamente ($p < 0,01$) menor nas últimas 4 sessões quando estas foram comparadas à primeira sessão, e nas sessões 3, 4 e 5 ($p < 0,05$) quando comparadas a primeira sessão (Tab.6).

Tabela 6 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase 4 dos animais (n= 13) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 1 mg/kg (NIC 1). $p = 0,002$ (Análise de regressão linear). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados à primeira sessão.

Tempo gasto em cada braço (segundos)			
Sessões	Média $\pm$ e.p.m.	Sessões	Média $\pm$ e.p.m.
1	21,0 $\pm$ 3,8	6	16,8 $\pm$ 2,7
2	17,5 $\pm$ 2,3	7	14,6 $\pm$ 0,8 **
3	16,4 $\pm$ 2,6 *	8	13,5 $\pm$ 1,0 **
4	15,3 $\pm$ 1,3 *	9	13,7 $\pm$ 1,3 **
5	16,0 $\pm$ 2,9 *	10	11,9 $\pm$ 0,7 **

- **Grupo NIC 10**

No grupo NIC 10, que recebeu administrações subcutâneas diárias de nicotina na dose de 10 mg/kg durante a aprendizagem, também houve uma diminuição progressiva no número de erros até a última sessão, o que foi demonstrado através da análise de regressão linear [$F(1,108) = 5,56$; $Y = 2,04 - 0,14X$; $r = -0,05$; $p = 0,02$]. A ANOVA de 1 via para medidas repetidas também detectou diferenças significantes entre as sessões [$F(9,90) = 3,71$; $p = 0,0005$]. O Teste de Fisher mostrou que houve significativamente ($p < 0,05$) menor número de erros nas sessões 8 a 10 comparadas à primeira sessão, e, nas sessões 2 a 5 e 8 a 10 ($p < 0,01$) comparadas à sessão 7 (Fig. 30).

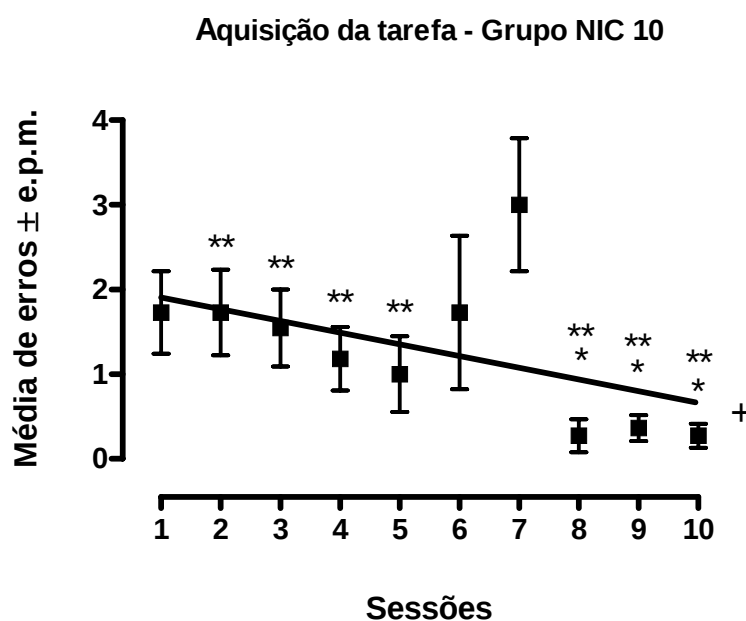


Figura 30 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais ($n = 11$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 10 mg/kg (NIC 10) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 no labirinto radial de 8-braços. + $p = 0,02$ (Análise de regressão linear). * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão e ** $p < 0,01$ comparado à sessão 7.

A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do tempo de permanência em cada braço no decorrer das 10 sessões de treinamento [$F(1,108) = 11,87$; $Y = 28,67 - 1,41X$; $r = -1,0$; $p = 0,0008$]. A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do tempo gasto nas sessões de treinamento [$F(9,108) = 3,58$; $p = 0,0006$]. O teste de Fisher demonstrou que houve significativamente menor tempo gasto ($p < 0,01$) nas sessões 6, 7, 8 e 10 quando estas foram comparadas à primeira e segunda sessões, e na sessão 9 ($p < 0,05$) quando comparada à primeira e segunda sessões (Tab.7).

Tabela 7 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase 4 dos animais ($n = 11$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 10 mg/kg (NIC 10). $p = 0,0008$ (Análise de regressão linear). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado à primeira e segunda sessões.

Tempo gasto em cada braço (segundos)			
Sessões	Média $\pm$ e.p.m.	Sessões	Média $\pm$ e.p.m.
1	28,6 $\pm$ 5,4	6	17,0 $\pm$ 1,6 **
2	29,7 $\pm$ 5,8	7	17,3 $\pm$ 2,5 **
3	22,4 $\pm$ 4,8	8	16,9 $\pm$ 1,9 **
4	22,6 $\pm$ 3,9	9	20,0 $\pm$ 4,8 *
5	19,0 $\pm$ 2,5	10	15,2 $\pm$ 1,2 **

5.1.1.2 Fase 5 – Com intervalo de 5 segundos

Na fase 5, ainda para a aquisição da tarefa no labirinto radial de 8 braços foi introduzido o retardo de 5 segundos entre o pré e o pós – retardo, em todos os grupos. Foram consideradas para análise as 6 últimas sessões de treinamento nesta fase.

- **Grupo SAL**

Os animais que receberam administrações diárias de salina apresentaram, no pré e no pós-retardo, bom desempenho (0 a 1 erro) nas últimas 3 sessões de treinamento, que é pré-requisito para o aprendizado nesta fase. A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do número de erros somente no pós-retardo [$F(1,46) = 4,29$; $Y = 1,05 - 0,14X$; $r = -0,08$; $p = 0,04$] no decorrer das 6 sessões (Fig. 31).

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não detectou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre as sessões de treinamento no pré ou no pós-retardo.

Retardo de 5s - Grupo Salina

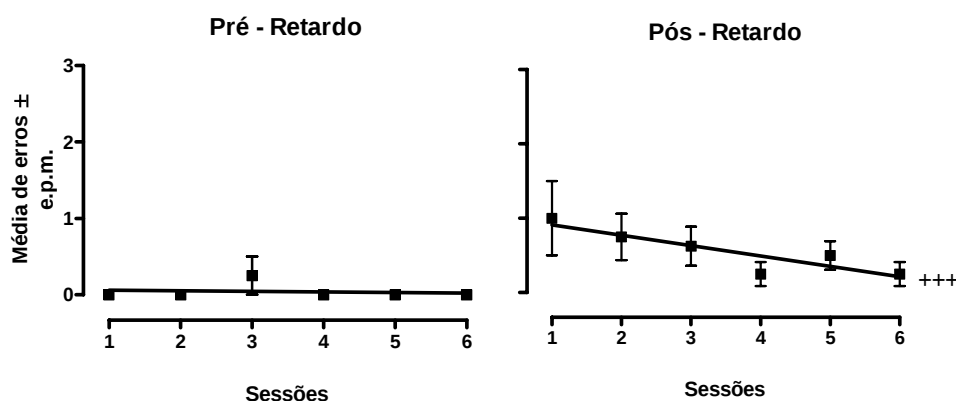


Figura 31 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais ($n = 8$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Salina (SAL) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços. No pós-retardo, +++ $p = 0,04$ (Análise de regressão linear).

Não houve diferenças estatisticamente significantes do tempo gasto em cada braço no decorrer das 6 sessões de treinamento que antecederam a cirurgia estereotáxica (Tab. 8).

Tabela 8 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. pelos animais ($n = 8$) do grupo que recebeu administrações subcutânea diárias de Salina em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase 5.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Sessões	Pré-retardo	Pós-retardo
1	13,2 $\pm$ 1,6	10,5 $\pm$ 0,9
2	12,1 $\pm$ 1,0	11,4 $\pm$ 1,1
3	10,8 $\pm$ 1,0	10,9 $\pm$ 0,8
4	12,2 $\pm$ 1,4	10,7 $\pm$ 1,0
5	11,0 $\pm$ 1,0	10,5 $\pm$ 0,9
6	11,2 $\pm$ 1,0	10,8 $\pm$ 1,0

- **Grupo NIC 1**

Os animais do grupo que recebeu administrações diárias de nicotina 1 mg/kg também apresentaram, no pré e no pós-retardo, bom desempenho (0 a 1 erro) nas últimas 3 sessões de treinamento. A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do número de erros somente no pós-retardo [$F(1,76) = 4,89$; $Y = 0,65 - 0,08X$; $r = -0,06$; $p = 0,03$] no decorrer das 6 sessões de treinamento nesta fase (Fig. 32).

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as sessões de treinamento no pré ou no pós – retardo.

Retardo de 5 s - Grupo NIC 1

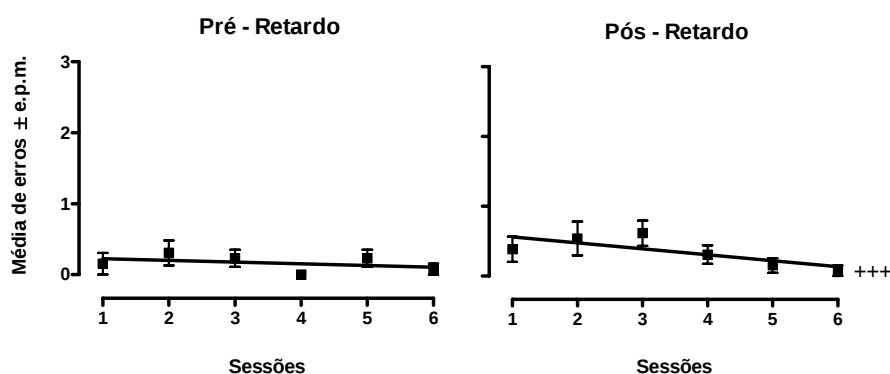


Figura 32 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais ($n = 13$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de nicotina 1 mg/kg (NIC 1) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços. No pós-retardo, +++ $p = 0,03$ (Análise de regressão linear).

Não houve diferenças no tempo gasto em cada braço no decorrer das 6 sessões de treinamento que antecederam a cirurgia estereotóxica (Tab. 9).

Tabela 9 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. pelos animais ($n = 13$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina 1 mg/kg em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase 5.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Sessões	Pré-retardo	Pós-retardo
1	11,9 $\pm$ 0,7	11,6 $\pm$ 0,8
2	14,3 $\pm$ 1,6	11,3 $\pm$ 0,6
3	13,4 $\pm$ 1,9	12,1 $\pm$ 0,6
4	11,9 $\pm$ 0,8	10,5 $\pm$ 0,5
5	11,8 $\pm$ 0,8	11,5 $\pm$ 1,4
6	12,5 $\pm$ 1,6	10,0 $\pm$ 0,5

- **Grupo NIC 10**

Os animais do grupo que recebeu administrações diárias de nicotina na dose de 10 mg/kg (NIC 10) também apresentaram, no pré e no pós-retardo, bom desempenho (0 a 1 erro) nas últimas 3 sessões de treinamento, sendo que a análise de regressão linear não detectou diferenças estatisticamente significantes entre as sessões tanto no pré quanto no pós-retardo (Fig. 33).

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas também não detectou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre as sessões de treinamento no pré ou no pós-retardo.

Retardo de 5 s - Grupo NIC 10

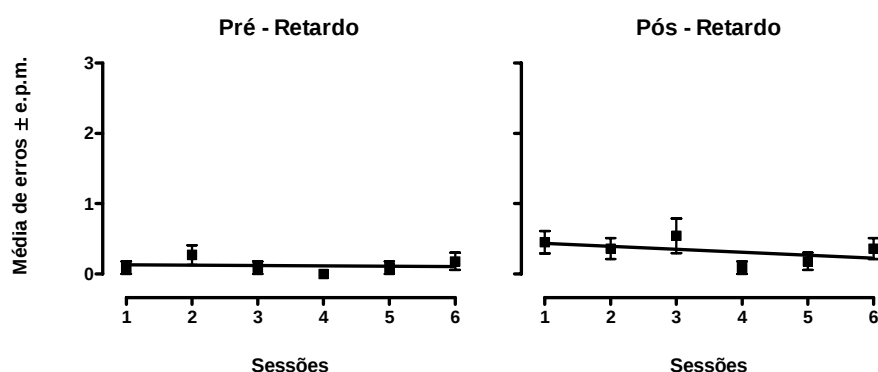


Figura 33 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais ($n = 11$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 10 mg/kg (NIC 10) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços.

Não houve diferenças no tempo gasto em cada braço no decorrer das 6 sessões de treinamento que antecederam a cirurgia estereotóxica (Tab. 10).

Tabela 10 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. pelos animais ($n = 11$) do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de Nicotina na dose de 10 mg/kg em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase 5.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Sessões	Pré-retardo	Pós-retardo
1	20,0 $\pm$ 4,6	13,1 $\pm$ 1,7
2	23,0 $\pm$ 7,6	14,7 $\pm$ 2,0
3	17,5 $\pm$ 4,1	13,7 $\pm$ 1,8
4	24,3 $\pm$ 8,2	13,5 $\pm$ 1,7
5	20,9 $\pm$ 7,0	13,8 $\pm$ 1,8
6	25,0 $\pm$ 6,4	15,3 $\pm$ 2,2

5.1.2 Avaliação intergrupos

5.1.2.1 Fase 4 – Sem intervalo de 5 segundos

A ANOVA de 2 vias para medidas repetidas não detectou diferenças no número de erros (Fig. 34) e nos tempos gastos nas 10 sessões da fase 4 nos 3 diferentes grupos que receberam administrações crônicas.

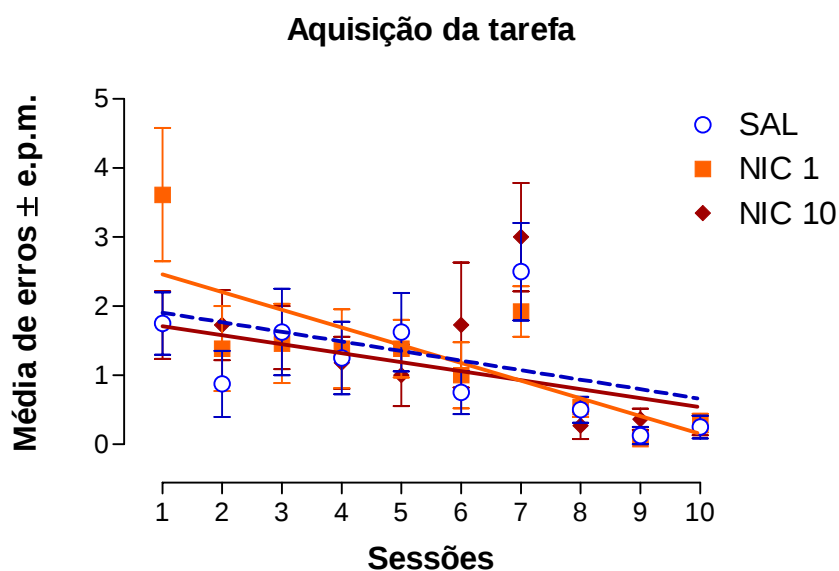


Figura 34 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais que receberam administrações subcutâneas diárias de Salina ($n = 8$) (SAL), Nicotina 1 mg/kg ($n = 13$) (NIC 1) e Nicotina 10 mg/kg ($n = 11$) (NIC 10) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase 4 no labirinto radial de 8-braços.

5.1.2.2. Fase 5 – Com intervalo de 5 segundos

A ANOVA de 2 vias para medidas repetidas também não detectou diferenças estatisticamente significantes no número de erros (Fig. 35) e no tempo gasto em cada braço nas 6 sessões, tanto no pré quanto no pós –retardos da Fase 5, entre os 3 diferentes grupos.

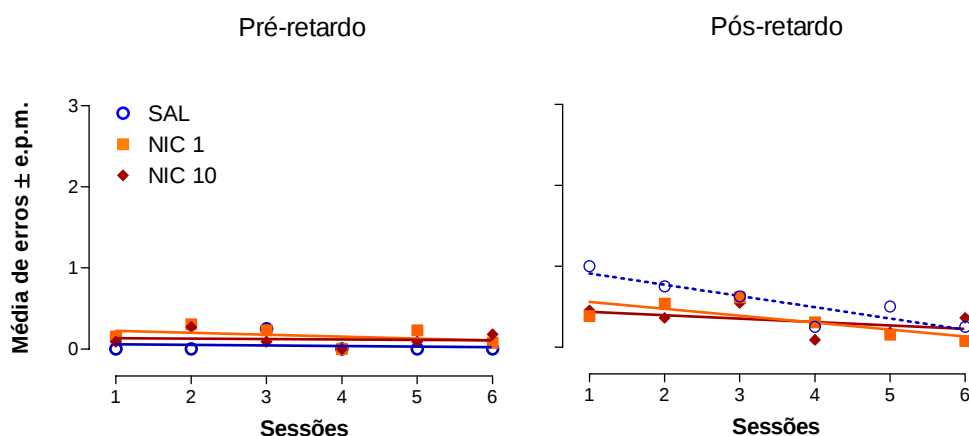


Figura 35 - Média de erros $\pm$ e.p.m. dos animais que receberam administrações subcutâneas diárias de Salina ($n = 8$) (SAL), Nicotina 1 mg/kg ($n = 13$) (NIC 1) e Nicotina 10 mg/kg ($n = 11$) (NIC 10), antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase 5 para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços.

5.2 Pesos corporais durante as fases de treinamento

5.2.1 Avaliação intragrupos

Os animais quando incluídos no protocolo de treinamento, eram pesados (peso inicial) e iniciava-se a medida e anotação dos pesos corporais durante todas as fases de aprendizagem (F1 a F5).

O peso dos animais em todos os 3 grupos foi mantido abaixo do peso inicial em todas as fases, sendo que nas fases 3 e 4 intensificava-se a privação alimentar para que a motivação ao aprendizado ocorresse satisfatoriamente (Fig. 36). No entanto, na fase 5 a privação alimentar era suavizada uma vez que os animais já teriam aprendido a tarefa.

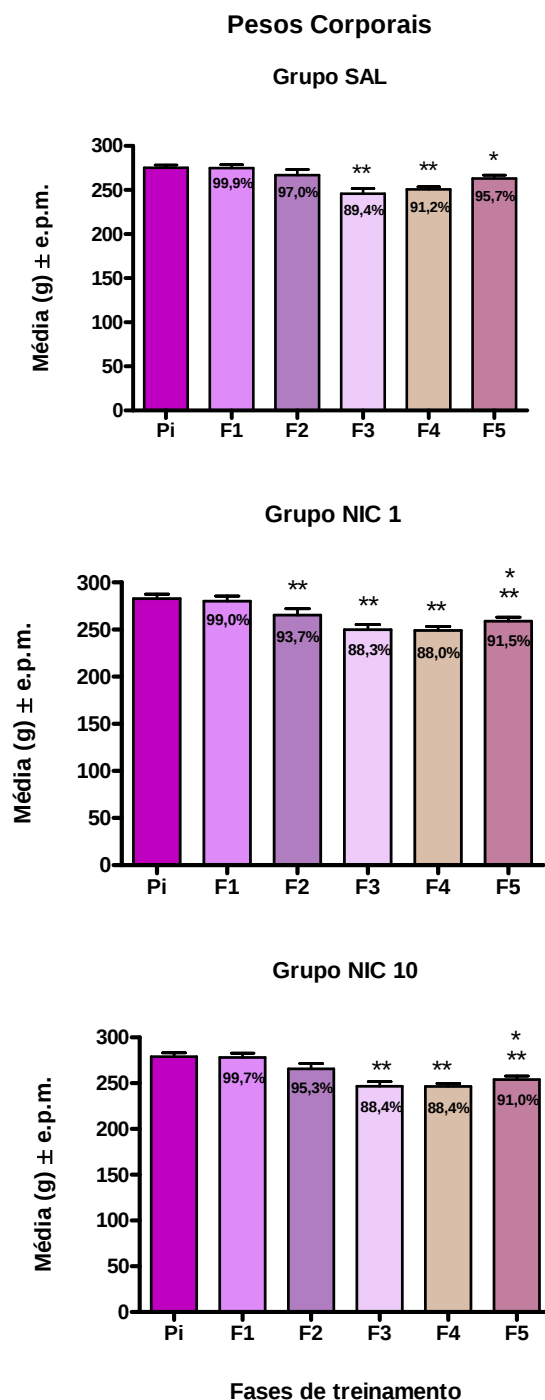


Figura 36 - Média dos pesos corporais (g) $\pm$ e.p.m. dos animais que receberam administrações subcutâneas diárias de Salina (SAL, n = 8), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1, n = 13), ou Nicotina 10 mg/kg (NIC 10, n = 11), durante a primeira semana de adaptação dos animais (Pi = Peso inicial) e as 5 fases de treinamento que antecedem a cirurgia estereotáxica (F1 a F5). * p < 0,05 comparado a Pi, F1 e F4 (para SAL), à F3 e F4 (para NIC 1) e à F2 (para NIC 10) e **p < 0,01 comparado ao Pi, F1 (e também comparado à F2

para o grupo SAL). Valores numéricos representam os percentuais dos pesos corporais em relação ao P_i .

- **Grupo SAL**

Na comparação das médias de pesos corporais nos animais do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de salina (SAL), a ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre as fases de treinamento [$F(5,35) = 11,8$; $p < 0,0001$]. O teste de Fisher demonstrou que as médias de pesos corporais nas fases F3 e F4 foram significativamente menores ($p < 0,01$) em relação ao peso inicial (P_i), F1 e F2, e na F5 a média do peso corporal dos animais foi significativamente menor comparado a P_i e F1 ($p < 0,05$) (Fig. 36)

Na fase 5, no entanto, os animais foram mantidos com um maior percentual de peso corporal, em torno de 96% do peso inicial, já que adquiriram os critérios de aprendizado necessários para prosseguimento do protocolo experimental. O teste de múltiplas comparações de Fisher demonstrou que houve um ganho de peso na fase 5 ($p < 0,05$) comparado à fase 4 (Fig. 36).

- **Grupo NIC 1**

Na comparação das médias de pesos corporais nos animais do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de nicotina (NIC) na dose de 1 mg/kg, a ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre as fases de treinamento [$F(5,60) = 22,86$; $p < 0,0001$]. O teste de Fisher demonstrou que as médias de pesos corporais nas fases F2 a F5 foram significativamente menores ($p < 0,01$) em relação ao peso inicial (P_i) e na F1 (Fig. 36).

Na F5, semelhante ao que foi mencionado para o grupo SAL, os animais do grupo NIC 1 foram mantidos com um maior percentual de peso corporal, em torno de 91,5% do peso inicial, já que adquiriram os critérios de aprendizado necessários para prosseguimento do protocolo experimental. O teste de múltiplas comparações de Fisher demonstrou que houve ganho de peso na fase 5 ($p < 0,05$) quando comparado aos pesos nas fases 3 e 4 (Fig. 36).

- **Grupo NIC 10**

Na comparação das médias de pesos corporais nos animais do grupo que recebeu administrações subcutâneas diárias de nicotina (NIC) na dose de 10 mg/kg, a ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes nos pesos corporais entre as fases de treinamento [$F(5,50) = 19,36$; $p < 0,0001$]. O teste de Fisher demonstrou que as médias de pesos corporais nas fases F3, F4 e F5 foram significativamente menores ($p < 0,01$) em relação ao peso inicial (P_i) e F1, e na F5 a média de peso corporal foi significativamente menor ($p < 0,05$) comparado a F2 (Fig. 36).

Na F5, como mencionado para os dois grupos anteriores, os animais do grupo NIC 10 foram mantidos com um maior percentual de peso corporal, em torno de 91,0% do peso inicial, já que adquiriram os critérios de aprendizado necessários para prosseguimento do protocolo experimental. Entretanto, apesar de ter ocorrido um ganho de peso em relação às fases 3 e 4, as comparações não foram estatisticamente significantes (Fig. 36).

5.2.2 Avaliação intergrupos

A ANOVA de 2 vias para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significante entre os pesos dos animais nas diferentes fases de treinamento na comparação entre os 3 grupos tratados cronicamente.

5.3 Localização das cânulas

Os ratos que atingiram o critério de aprendizagem exposto acima, foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas bilaterais no CPFm. A figura 37 mostra os locais de implantação das cânulas no CPFm, marcados com azul de metileno 1%, que estão ilustrados em diagramas extraídos do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Observa-se que a maioria das cânulas bilaterais localizaram-se predominantemente na área Cg1 do cíngulo anterior, Fr2 do córtex frontal e Cg3 do córtex pré-límbico que constituem o CPFm.

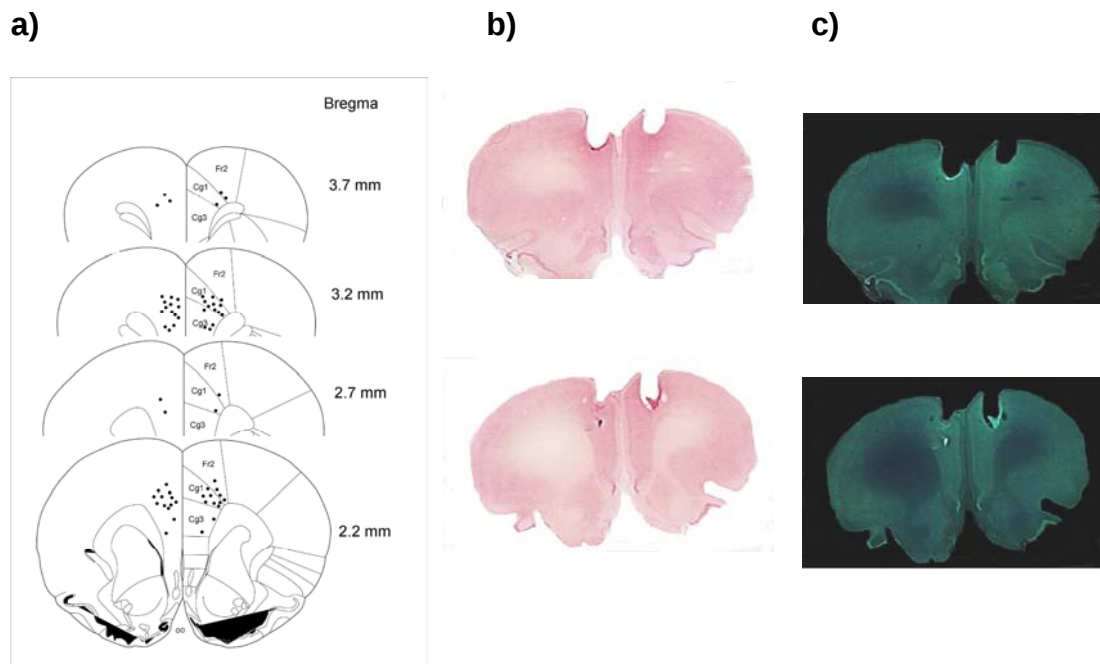


Figura 37 - a) Cortes coronais do cérebro de rato. Nota-se que as cânulas localizaram-se predominantemente nas áreas Cg1, Cg3 e Fr2 que constituem o CPFm em roedores. **b)** Fotografia das fatias cerebrais coradas em vermelho neutro ilustrando as localizações bilaterais das cânulas destacadas pelo azul de metileno. **c)** Imagem com inversão de cores para destaque (fluorescente) da coloração azul de metileno.

5.4 Administração aguda intracortical (IC) de diferentes doses de nicotina e etanol

Visto que os animais vinham recebendo administrações subcutâneas diárias a partir da 2ª fase de treinamentos de tarefas no labirinto radial de 8-braços, nesta fase eles estavam com aproximadamente 2 meses de tratamento crônico com salina, nicotina 1 ou 10 mg/kg.

Os animais recebiam as administrações intracorticais (IC) de diferentes doses de nicotina e etanol após 6 horas da administração subcutânea de SAL, NIC 1 ou NIC 10.

5.4.1 Avaliação intragrupos

- Grupo SAL

a. Administração aguda de diferentes doses de nicotina

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os tratamentos IC agudos com as diferentes doses da nicotina nos animais tratados cronicamente com salina subcutânea (SAL), tanto no pré quanto no pós-retardo (Fig. 38).

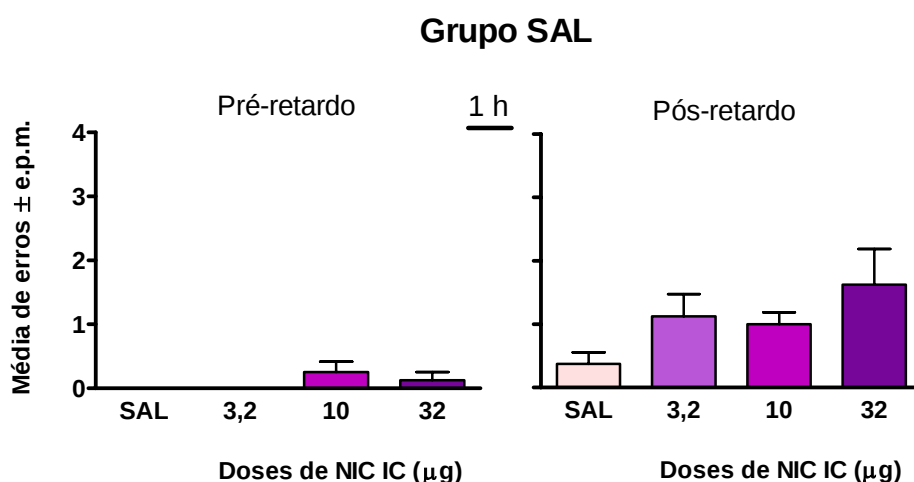


Figura 38 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou diferentes doses de Nicotina (NIC) nos animais tratados cronicamente com Salina subcutânea (Grupo SAL, n = 8), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

b. Administração aguda de diferentes doses de etanol

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os tratamentos IC agudos com as diferentes doses de etanol nos animais tratados cronicamente com salina

subcutânea (SAL) após o retardo de 1 hora [$F(3,21) = 3,60$; $p = 0,03$] (Fig. 39). O Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais tratados cronicamente com salina e que receberam administração IC de ETOH 100 μg apresentaram significativamente maior número de erros comparado às administrações IC de SAL ($p < 0,01$) e de ETOH 32 μg ($p < 0,05$) (Fig. 39).

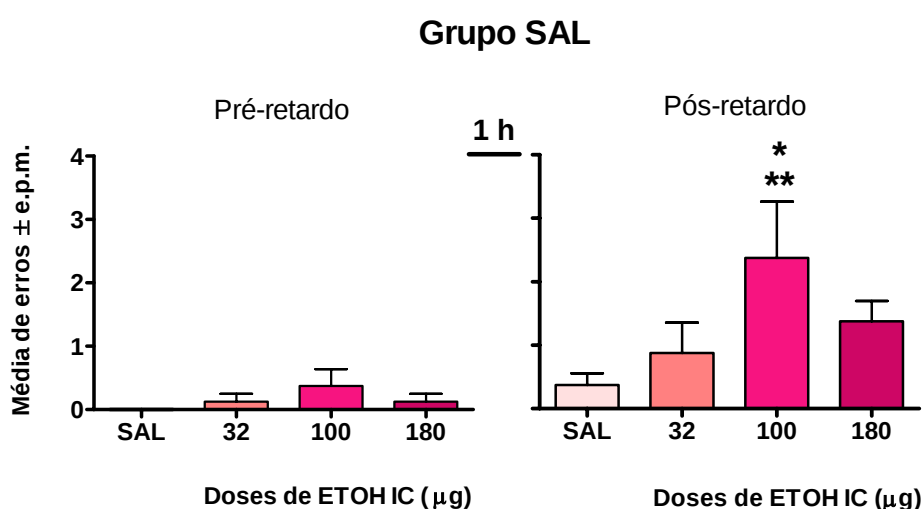


Figura 39 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou doses variadas de Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Salina subcutânea (Grupo SAL, $n = 8$) sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial. * $p < 0,05$ comparado à ETOH 32 μg e ** $p < 0,01$ comparado à SAL.

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não identificou diferenças estatisticamente significantes entre os tempos gastos em cada tratamento tanto antes como após os retardos de 1 hora (Tab. 11).

Tabela 11 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial na administração IC de salina (SAL) ou diferentes doses de Nicotina (NIC) e Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Salina (n = 8).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Doses agudas	Pré-retardo	Pós-retardo
SAL	20,7 $\pm$ 6,9	12,6 $\pm$ 0,9
NIC 3,2	12,5 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 0,7
NIC 10	11,6 $\pm$ 1,0	11,4 $\pm$ 1,0
NIC 32	13,1 $\pm$ 1,5	12,8 $\pm$ 1,0
ETOH 32	13,1 $\pm$ 1,5	11,5 $\pm$ 0,8
ETOH 100	11,0 $\pm$ 1,2	11,5 $\pm$ 0,6
ETOH 180	18,8 $\pm$ 5,4	13,9 $\pm$ 2,5

- **Grupo NIC 1**

a. Administração aguda de diferentes doses de Nicotina

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais tratados cronicamente com nicotina subcutânea (NIC) na dose de 1 mg/kg e que receberam diferentes doses IC de nicotina, tanto no pré quanto no pós-retardo de 1 hora (Fig. 40).

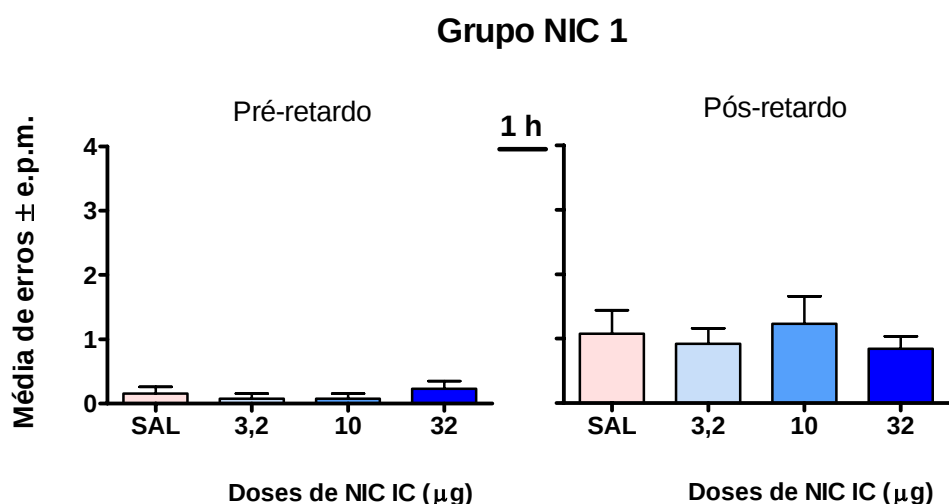


Figura 40 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou de diferentes doses de Nicotina (NIC) nos animais tratados cronicamente com Nicotina subcutânea na dose de 1 mg/kg (Grupo NIC 1, $n = 13$), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

b. Administração aguda de diferentes doses de etanol

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais tratados cronicamente com nicotina 1 mg/kg e que receberam diferentes doses IC de etanol, tanto no pré quanto no pós-retardo de 1 hora (Fig. 41).

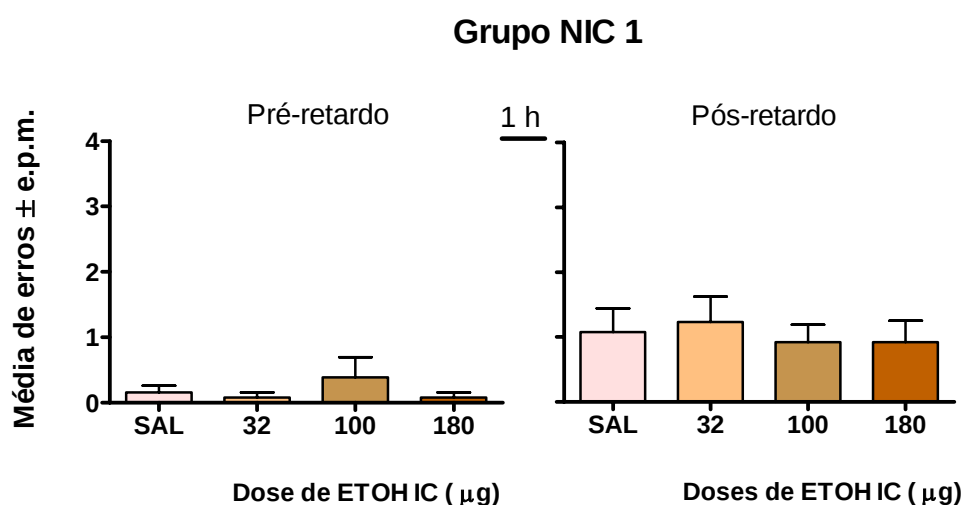


Figura 41 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou de diferentes doses de Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Nicotina subcutânea na dose de 1 mg/kg (Grupo NIC 1, n = 13), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não identificou diferenças estatisticamente significantes entre os tempos gastos na administração das diferentes doses IC de nicotina e etanol, tanto antes como após os retardos de 1 hora (Tab.12).

Tabela 12 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial na administração IC de Salina (SAL) ou diferentes doses de Nicotina (NIC) e Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Nicotina 1 (n = 13).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Doses agudas	Pré-retardo	Pós-retardo
SAL	11,8 $\pm$ 0,9	12,0 $\pm$ 1,5
NIC 3,2	11,0 $\pm$ 0,6	11,0 $\pm$ 0,9
NIC 10	11,7 $\pm$ 1,2	12,0 $\pm$ 0,7
NIC 32	14,0 $\pm$ 2,6	11,7 $\pm$ 1,1
ETOH 32	11,7 $\pm$ 1,7	10,9 $\pm$ 0,7
ETOH 100	15,2 $\pm$ 2,6	10,4 $\pm$ 0,7
ETOH 180	17,1 $\pm$ 4,4	11,7 $\pm$ 0,6

- **Grupo NIC 10**

a. Administração aguda de diferentes doses de Nicotina

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais tratados cronicamente com nicotina subcutânea na dose de 10 mg/kg e que receberam diferentes doses IC de nicotina, tanto no pré quanto no pós-retardo de 1 hora (Fig. 42).

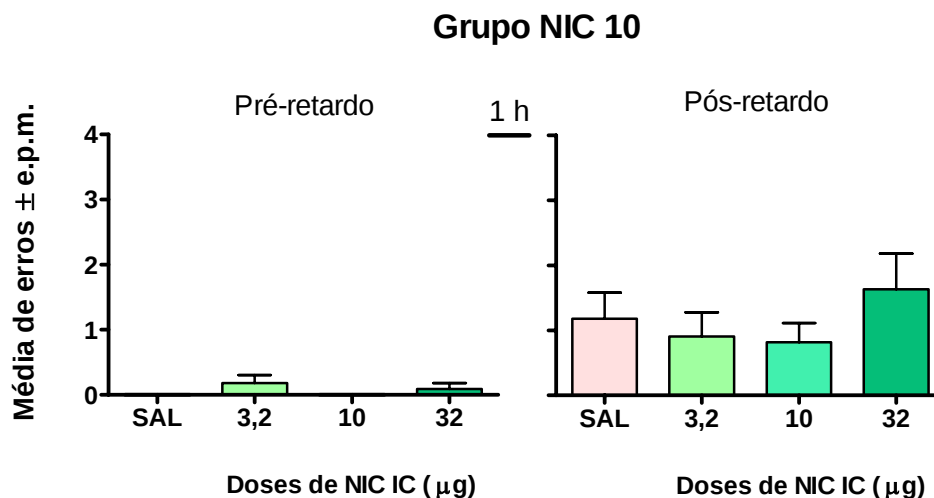


Figura 42 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou de diferentes doses de Nicotina (NIC) nos animais tratados cronicamente com Nicotina subcutânea na dose de 10 mg/kg (NIC 10, n = 11), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

b. Administração aguda de diferentes doses de etanol

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais tratados cronicamente com a nicotina subcutânea 10 mg/kg e que receberam diferentes doses IC de etanol, tanto no pré quanto no pós-retardo de 1 hora (Fig. 43).

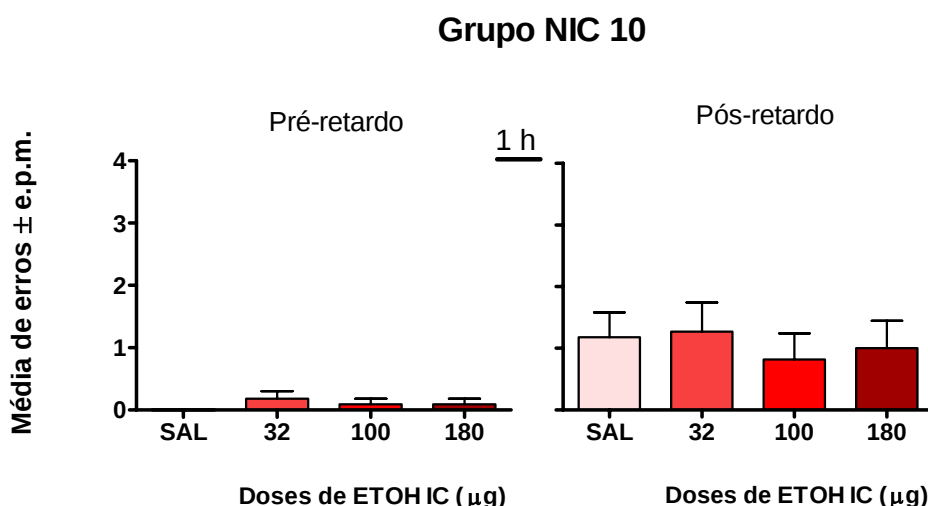


Figura 43 - Efeitos da administração intracortical (IC) de Salina (SAL) ou de diferentes doses de Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Nicotina subcutânea na dose de 10 mg/kg ($n = 11$), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não identificou diferenças estatisticamente significantes entre os tempos gastos na administração das diferentes doses IC de nicotina e etanol, tanto antes como após os retardos de 1 hora (Tab. 13).

Tabela 13 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços na administração IC de Salina (SAL) ou diferentes doses de Nicotina (NIC) e Etanol (ETOH) nos animais tratados cronicamente com Nicotina 10 ($n = 11$).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
Doses agudas	Pré-retardo	Pós-retardo
SAL	22,6 $\pm$ 6,3	22,2 $\pm$ 5,7
NIC 3,2	18,9 $\pm$ 2,7	19,0 $\pm$ 4,7
NIC 10	30,5 $\pm$ 12,7	22,4 $\pm$ 5,3
NIC 32	18,3 $\pm$ 2,9	16,5 $\pm$ 2,7
ETOH 32	20,4 $\pm$ 3,9	20,6 $\pm$ 3,6
ETOH 100	24,4 $\pm$ 6,1	17,5 $\pm$ 2,9
ETOH 180	25,2 $\pm$ 8,0	17,7 $\pm$ 3,5

5.4.2 Avaliação intergrupos

• Doses IC de Nicotina

A ANOVA de 1 via para medidas independentes não detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais que receberam administrações agudas IC de nicotina nas doses de 3,2, 10 e 32 μg em animais tratados cronicamente com salina ou nicotina nas doses de 1 ou 10 mg/kg, tanto no pré quanto no pós – retardo de 1 hora (Fig. 44).

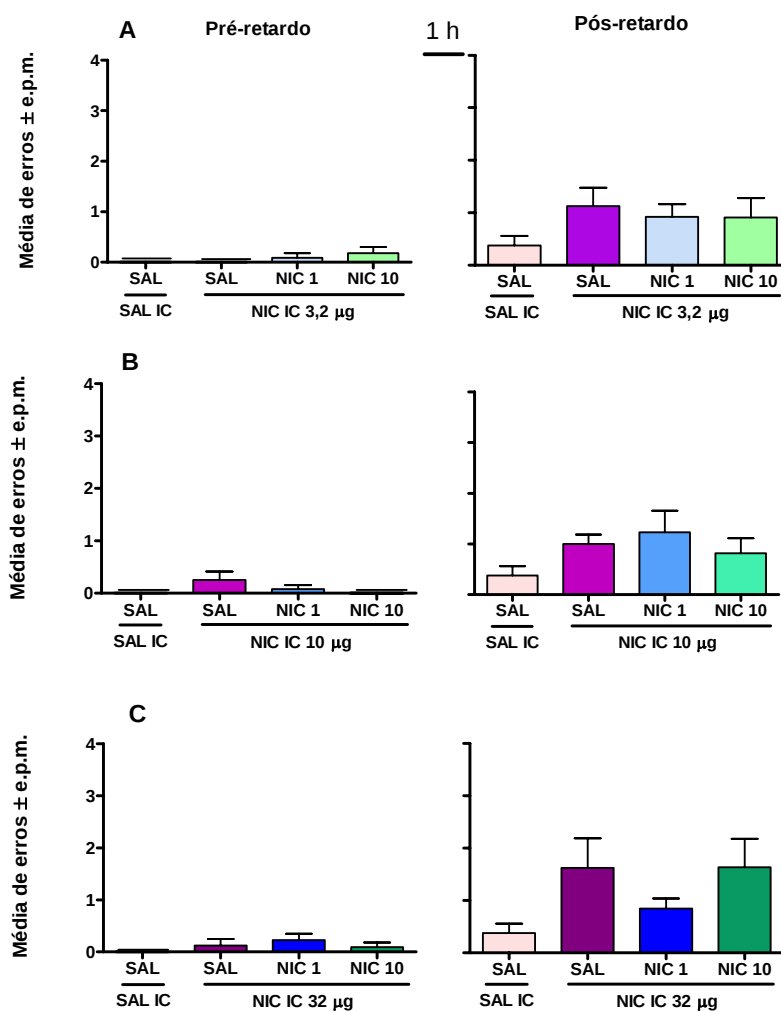


Figura 44 - Efeitos da administração intracortical (IC) de diferentes doses de nicotina (A = NIC IC 3,2 μg B = NIC IC 10 μg e C = NIC IC 32 μg) ou salina (SAL IC) nos animais tratados cronicamente (via subcutânea) com salina (SAL), nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e 10 mg/kg (NIC 10), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

Com relação ao tempo gasto em cada braço, a ANOVA de 1 via para medidas independentes detectou diferenças estatisticamente significantes no tempo gasto somente após o retardo de 1 hora para os animais que receberam administrações agudas IC de nicotina na dose de 10 µg na comparação entre os grupos tratados cronicamente com salina, nicotina 1 ou 10 mg/kg [$F(3,36) = 3,22$; $p = 0,034$] (Tab. 14).

Tabela 14 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos ratos tratados cronicamente com Salina (SAL), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e Nicotina 10 mg/kg (NIC 10) quando receberam administrações intracorticais (IC) agudas de SAL ou nicotina (NIC) nas doses de 3,2, 10 ou 32 µg.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)			
Tratamento nicotina IC agudo	Tratamento crônico	Pré-retardo	Pós-retardo
SAL	SAL	20,7 $\pm$ 6,9	12,6 $\pm$ 0,9
NIC 3,2 µg	SAL	12,5 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 0,7
	NIC 1	11,0 $\pm$ 0,6	11,0 $\pm$ 0,9
	NIC 10	18,9 $\pm$ 2,7	19,0 $\pm$ 4,7
NIC 10 µg	SAL	11,6 $\pm$ 1,0	11,4 $\pm$ 1,0
	NIC 1	11,7 $\pm$ 1,2	12,0 $\pm$ 0,7
	NIC 10	30,5 $\pm$ 12,7	22,4 $\pm$ 5,3 *
NIC 32 µg	SAL	13,1 $\pm$ 1,5	12,8 $\pm$ 1,0
	NIC 1	14,0 $\pm$ 2,6	11,7 $\pm$ 1,1
	NIC 10	18,3 $\pm$ 2,9	16,5 $\pm$ 2,6

* $p < 0,05$ comparado a SAL e SAL, SAL e NIC 10 µg, e, NIC 1 e NIC 10 µg.

O Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais que receberam administração IC de NIC 10 µg e tratados cronicamente com nicotina subcutânea 10 mg/kg gastaram significativamente ($p < 0,05$) mais tempo em cada braço do labirinto radial no pós-retardo comparado aos animais tratados cronicamente com salina subcutânea e salina IC aguda ou nicotina IC 10 µg, e, aos

animais tratados cronicamente com a nicotina 1 mg/kg e nicotina IC 10 µg (Tab. 14). O que demonstra que a administração crônica de nicotina, na maior dose, e a administração IC de nicotina na dose de 10 µg aumentaram o tempo para a realização da tarefa no labirinto radial.

- **Doses IC de Etanol**

A ANOVA de 1 via para medidas independentes detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais tratados cronicamente com SAL, NIC 1 e NIC 10 e que receberam administração aguda IC de etanol na dose de 100 µg, no pós-retardo de 1 hora [$F(3,36) = 2,90$; $p = 0,048$] (Fig. 45).

O Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais que receberam administração IC de ETOH 100 µg e tratados cronicamente com SAL apresentaram significativamente maior número de erros no labirinto radial comparados aos animais que foram tratados cronicamente com SAL e que receberam administração IC de salina ($p < 0,01$), e maior número de erros ($p < 0,05$) quando comparados aos animais que receberam a mesma dose IC de ETOH e que foram tratados cronicamente com nicotina nas doses de 1 mg/kg (NIC 1) e 10 mg/kg (NIC 10) (Fig. 45).

Estes resultados sugerem que a administração crônica de nicotina subcutânea, independente da dose, reduziu os efeitos de prejuízo do etanol sobre a memória operacional espacial.

Não houve diferenças estatisticamente significantes nas demais comparações, tanto antes como após os retardos de 1 hora (Fig. 45).

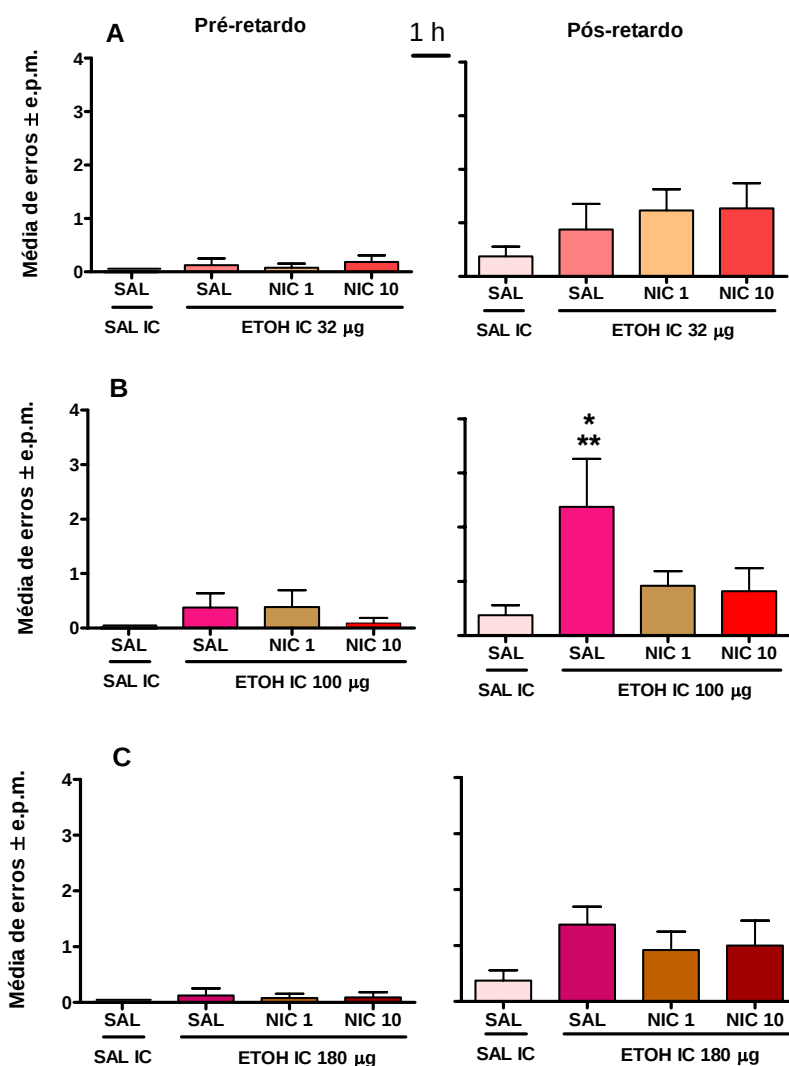


Figura 45 - Efeitos da administração intracortical (IC) de diferentes doses de ETOH (A = ETOH IC 32 μ g, B = ETOH IC 100 μ g e C = ETOH IC 180 μ g) ou salina (SAL IC) nos animais tratados cronicamente (via subcutânea) com Salina (SAL), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e 10 mg/kg (NIC 10), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial. * $p < 0,05$ comparado aos grupos NIC 1 e NIC 10 e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle SAL e SAL IC.

Com relação ao tempo gasto em cada braço, a ANOVA de 1 via para medidas independentes detectou diferenças estatisticamente significantes no tempo gasto pelos animais tratados cronicamente e que receberam administração aguda IC de etanol na dose de 100 μ g, após o retardo de 1 hora [$F(3,36) = 3,93$; $p = 0,016$] (Tab.

15). O Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais que receberam administração IC de ETOH 100 µg e tratados cronicamente com nicotina 10 mg/kg gastaram significativamente mais tempo em cada braço do labirinto radial no pós-retardo comparado aos animais submetidos a tratamento crônico com salina e administração IC de salina ou de ETOH 100 µg ($p < 0,05$), e a tratamento crônico com nicotina 1 mg/kg e testados com ETOH IC 100 µg ($p < 0,01$) (Tab. 15). Estes resultados demonstram que a administração crônica de nicotina na maior dose e a administração aguda de etanol na dose de 100 µg no CPFm aumentou o tempo para a realização da tarefa no labirinto radial

Tabela 15 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos ratos tratados cronicamente com salina (SAL), nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e nicotina 10 mg/kg (NIC 10) quando receberam administrações intracorticais (IC) agudas de SAL ou etanol (ETOH) nas doses de 32, 100 ou 180 µg.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)			
Tratamento etanol IC agudo	Tratamento crônico	Pré-retardo	Pós-retardo
SAL	SAL	20,7 $\pm$ 6,9	12,6 $\pm$ 0,9
ETOH 32 µg	SAL	13,1 $\pm$ 1,5	11,5 $\pm$ 0,8
	NIC 1	11,7 $\pm$ 1,7	10,9 $\pm$ 0,7
	NIC 10	20,3 $\pm$ 3,9	20,6 $\pm$ 3,6
ETOH 100 µg	SAL	11,0 $\pm$ 1,2	11,5 $\pm$ 0,6
	NIC 1	15,2 $\pm$ 2,6	10,4 $\pm$ 0,7
	NIC 10	24,4 $\pm$ 6,1	17,5 $\pm$ 2,9 */**
ETOH 180 µg	SAL	18,7 $\pm$ 5,4	13,9 $\pm$ 2,5
	NIC 1	17,0 $\pm$ 4,4	11,7 $\pm$ 0,6
	NIC 10	25,2 $\pm$ 8,1	17,7 $\pm$ 3,5

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL e SAL IC e ao grupo SAL e ETOH IC 100 µg, e, ** $p < 0,01$ comparado ao grupo NIC 1 e ETOH IC 100 µg.

5.4.3 Pesos corporais no protocolo de administração IC de drogas

Os pesos corporais dos animais também foram controlados durante as administrações IC de drogas. Todos os animais recebiam uma alimentação balanceada e controlada para que mantivessem o mesmo padrão de peso durante o protocolo de administrações IC semanais de diferentes doses de nicotina e etanol. A cada administração IC os pesos eram anotados e foram avaliados no final do protocolo experimental.

A ANOVA de 1 via para medidas independentes detectou diferenças estatisticamente significantes nos pesos dos animais nos 3 grupos crônicos durante o protocolo experimental de administração aguda IC de diferentes doses de nicotina e etanol [$F(2,29) = 5,59$; $p < 0,0089$]. O teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais que receberam tratamento crônico com nicotina 10 mg/kg (NIC 10) apresentaram uma média de pesos menor comparado aos animais do grupo salina ($p < 0,05$) e nicotina 1 mg/kg ($p < 0,01$) (Fig. 46).

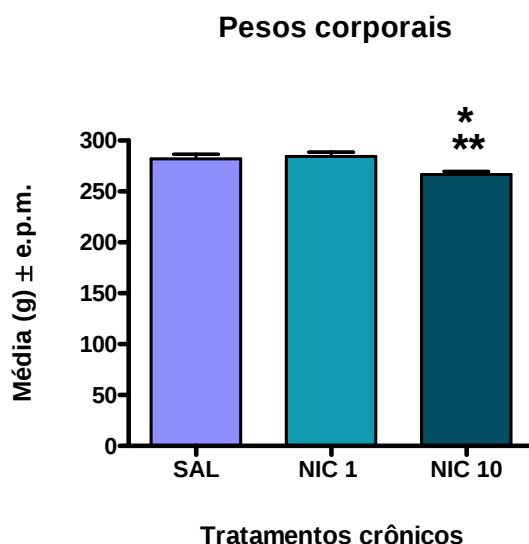


Figura 46 - Média dos pesos corporais (g) ± e.p.m. durante a administração intracortical (IC) de diferentes doses de Nicotina e Etanol nos animais tratados cronicamente com Salina (SAL), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1) e Nicotina 10 mg/kg (NIC10). * $p < 0,05$ comparado a SAL e ** $p < 0,01$ comparado a NIC 1.

Mencione-se, no entanto, que esta média de pesos corporais do grupo NIC 10, ainda que menor comparada aos outros grupos, corresponde a 95,6% da média do peso inicial deste grupo, estando, portanto, ainda dentro dos parâmetros adotados no presente estudo. Entretanto, este resultado demonstra que a maior dose da nicotina comprometeu o ganho de peso destes animais.

5.5 Administrações agudas intracorticais (IC) de nicotina na dose de 3,2 μ g após interrupção das administrações crônicas (abstinência)

5.5.1 Avaliação intragrupos

- **Grupo SAL**

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais do grupo salina crônico (SAL) quando receberam administrações agudas IC de NIC 3,2 μ g na 1^a, 2^a e 3^a semanas de abstinência, tanto no pré quanto no pós-retardo (Fig. 47).

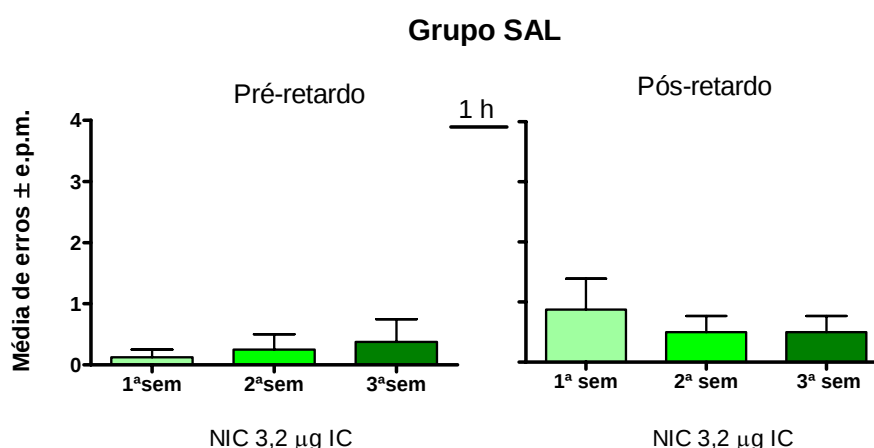


Figura 47 - Efeitos da administração aguda intracortical (IC) de Nicotina (NIC) 3,2 μ g na 1^a, 2^a e 3^a semanas após interrupção das administrações crônicas de Salina (Grupo SAL, n = 8), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas identificou diferenças estatisticamente significantes entre os tempos gastos pelos animais do grupo SAL, nas 1^a, 2^a e 3^a semanas de abstinência, no pré-retardo de 1 hora [$F(2,14) = 3,84$, $p = 0,0468$]. O teste de Fisher de múltiplas comparações demonstrou que na 3^a semana de abstinência esses animais gastaram mais tempo para o desempenho do pré-retardo no labirinto radial comparado à 1^a e 2^a semanas sob a administração IC de NIC 3,2 µg (Tab. 16).

Tabela 16 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos animais do grupo tratado cronicamente com Salina (SAL, $n = 8$), na 1^a, 2^a e 3^a semanas de abstinência quando receberam administrações intracorticais (IC) de Nicotina (NIC) na dose 3,2 µg.

Grupo SAL		
Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
NIC IC 3,2 µg	Pré-retardo	Pós-retardo
1 ^a semana	10,9 $\pm$ 0,9	9,4 $\pm$ 0,8
2 ^a semana	11,2 $\pm$ 1,2	10,8 $\pm$ 1,0
3 ^a semana	15,6 $\pm$ 1,5 *	10,3 $\pm$ 0,7

* $p < 0,05$ comparado com a 1^a e 2^a semanas de abstinência.

- **Grupo NIC 1**

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais do grupo NIC 1 quando receberam administrações agudas IC de NIC 3,2 na 1^a, 2^a e 3^a semanas de abstinência, tanto no pré quanto no pós-retardo (Fig. 48).

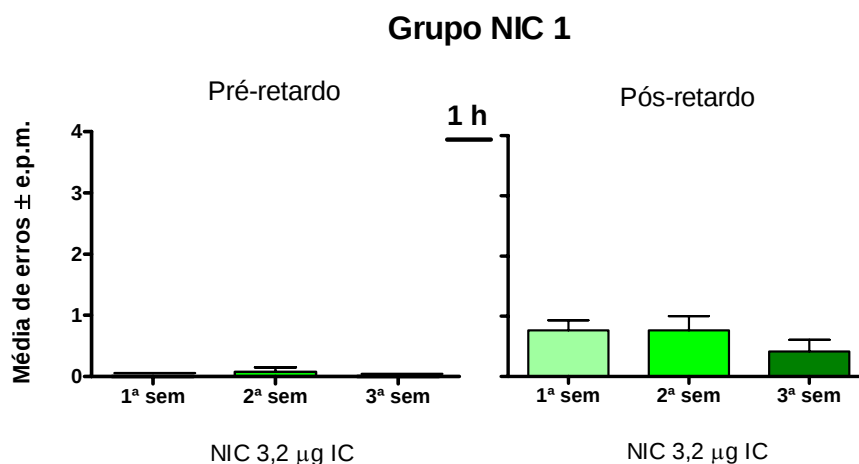


Figura 48 - Efeitos da administração aguda intracortical (IC) de Nicotina (NIC) 3,2 µg na 1ª, 2ª e 3ª semanas após interrupção das administrações crônicas de Nicotina 1 mg/kg (Grupo NIC 1, n = 13), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas identificou diferenças estatisticamente significantes entre os tempos gastos pelos animais do grupo NIC 1, nas 1ª, 2ª e 3ª semanas de abstinência, no pós-retardo de 1 hora [$F(2,24) = 8,14$, $p = 0,002$] (Tab. 17).

O teste de Fisher de múltiplas comparações demonstrou que na 2ª semana de abstinência esses animais sob a administração IC de NIC 3,2 µg gastaram mais tempo no labirinto radial de 8 braços no pós-retardo comparado à 1ª e 3ª semanas (Tab.17).

Tabela 17 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos animais do grupo tratado cronicamente com Nicotina 1 mg/kg (NIC 1, n = 13), na 1ª, 2ª e 3ª semanas de abstinência quando receberam administrações intracorticais (IC) de Nicotina (NIC) na dose 3,2 μ g.

Grupo NIC 1		
Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
NIC IC 3,2 μ g	Pré-retardo	Pós-retardo
1ª semana	11,3 $\pm$ 0,9	10,4 $\pm$ 0,7
2ª semana	10,2 $\pm$ 0,6	12,2 $\pm$ 0,7 **
3ª semana	10,8 $\pm$ 0,9	10,0 $\pm$ 0,7

** p < 0,01 comparada com a 1ª e 3ª semana de abstinência.

- **Grupo NIC 10**

Também não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais do grupo NIC 10 quando receberam administrações agudas IC de NIC 3,2 na 1ª, 2ª e 3ª semanas de abstinência, tanto no pré quanto no pós-retardo (Fig. 49).

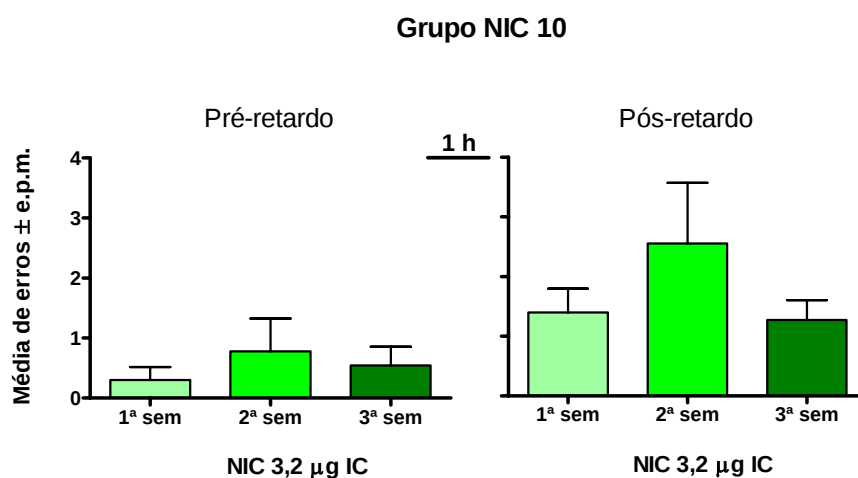


Figura 49 - Efeitos da administração aguda intracortical (IC) de Nicotina (NIC) 3,2 μ g na 1ª, 2ª e 3ª semanas após interrupção das administrações crônicas de Nicotina 10 mg/kg (Grupo

NIC 10, n = 11), sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora no labirinto radial.

Também não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tempos gastos no labirinto radial de 8 braços pelos animais do grupo NIC 10, nas 1^a, 2^a e 3^a semanas de abstinência, tanto antes como após os retardos de 1 hora (Tab. 18).

Tabela 18 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços nos animais do grupo tratado cronicamente com Nicotina 10 mg/kg (NIC 10, n = 11), na 1^a, 2^a e 3^a semanas de abstinência quando receberam administrações intracorticais (IC) de Nicotina (NIC) na dose 3,2 μ g.

Grupo NIC 10		
Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)		
NIC IC 3,2 μ g	Pré-retardo	Pós-retardo
1 ^a semana	16,6 $\pm$ 3,0	20,4 $\pm$ 6,7
2 ^a semana	15,2 $\pm$ 2,0	13,4 $\pm$ 0,7
3 ^a semana	14,4 $\pm$ 2,1	12,2 $\pm$ 1,2

5.5.2 Avaliação intergrupos

A ANOVA de 1 via para medidas independentes detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais nos 3 grupos que foram tratados cronicamente e que estavam em abstinência e receberam administração aguda IC de nicotina na dose de 3,2 μ g na 2^a semana [$F(2,27) = 3,56$; $p < 0,04$] e na 3^a semana [$F(2,28) = 3,21$; $p < 0,05$]. O teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais que foram tratados cronicamente com NIC 10 apresentaram maior número de erros comparado aos grupos tratados cronicamente com SAL e NIC 1 ($p < 0,05$) na 2^a semana e ao grupo NIC 1 na 3^a semana ($p < 0,05$) de abstinência (Fig. 50)

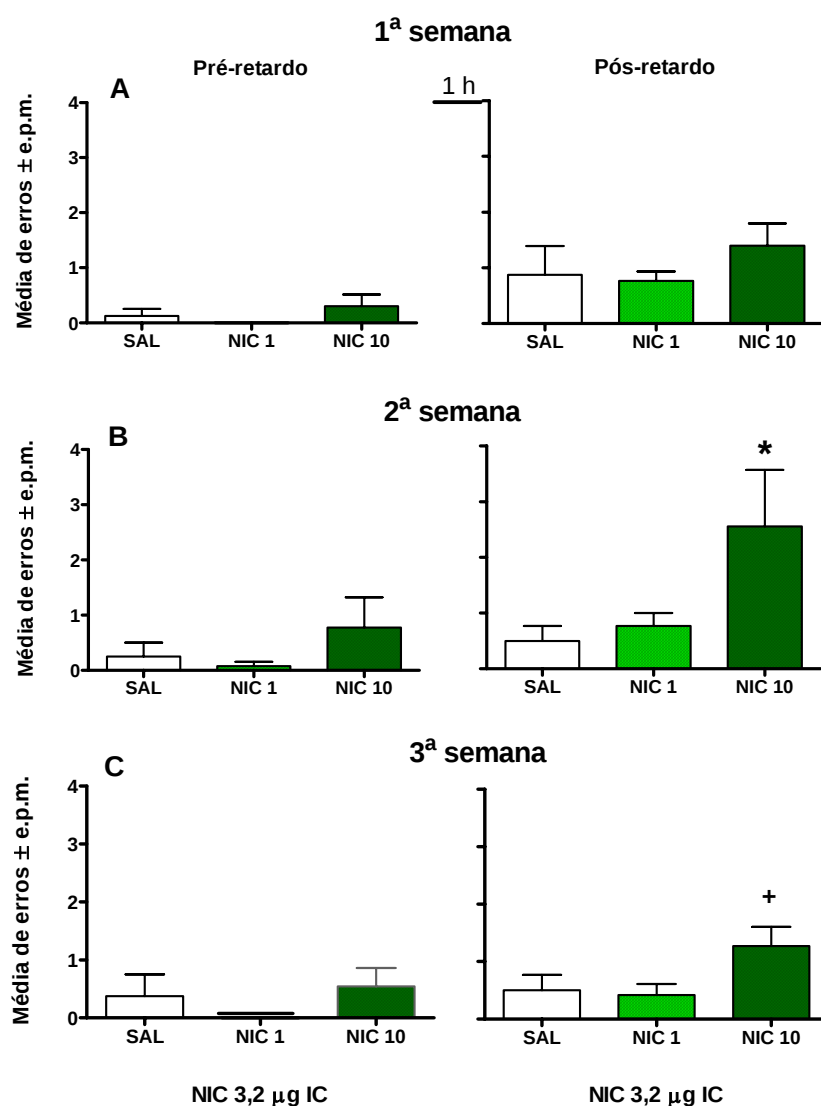


Figura 50 - Efeitos da administração intracortical (IC) de NIC 3,2 µg (desafio) nos animais em abstinência, sobre o desempenho do pré- (à esquerda) e do pós-retardo (à direita) em testes com retardo de 1 hora. *p < 0,05 comparado ao grupo SAL e NIC 1 na 2ª semana e + p < 0,05 comparado ao grupo NIC 1 na 3ª semana.

Com relação ao tempo gasto em cada braço, a ANOVA de 1 via para medidas independentes detectou diferenças estatisticamente significantes no tempo gasto pelos animais em abstinência e que receberam administração aguda IC semanal de nicotina na dose de 3,2 µg, no pré-retardo da 2ª semana [$F(2,27) = 4,25$; $p = 0,025$]. O Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais NIC 10 que receberam administração aguda IC de NIC 3,2 µg na 2ª semana de abstinência

gastaram significativamente mais tempo em cada braço antes do retardo no labirinto radial comparado aos animais em abstinência do grupo NIC 1 ($p < 0,01$) (Tab. 19). As demais comparações não foram significativamente diferentes.

Tabela 19 - Média do tempo gasto (segundos) $\pm$ e.p.m. em cada braço visitado antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços na 1ª, 2ª e 3ª semanas sob administração aguda IC de NIC 3,2 μ g após a interrupção das administrações crônicas de Salina (SAL), Nicotina 1 mg/kg (NIC 1) ou Nicotina 10 mg/kg (NIC 10).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m.)			
NIC 3,2 μ g IC	Tratamento crônico	Pré-retardo	Pós-retardo
1ª semana	SAL	10,9 $\pm$ 0,9	9,4 $\pm$ 0,8
	NIC 1	11,3 $\pm$ 0,8	10,4 $\pm$ 0,7
	NIC 10	16,6 $\pm$ 3,0	20,4 $\pm$ 6,7
2ª semana	SAL	11,2 $\pm$ 1,2	10,8 $\pm$ 1,0
	NIC 1	10,2 $\pm$ 0,6	12,2 $\pm$ 0,7
	NIC 10	15,2 $\pm$ 2,0 **	13,4 $\pm$ 0,7
3ª semana	SAL	15,6 $\pm$ 1,5	10,3 $\pm$ 0,7
	NIC 1	10,8 $\pm$ 0,9	10,0 $\pm$ 0,6
	NIC 10	14,4 $\pm$ 2,1	12,2 $\pm$ 1,2

** $p < 0,01$ comparado com NIC 1.

5.5.3 Pesos corporais após a interrupção dos tratamentos crônicos

Após a interrupção das administrações subcutâneas crônicas de salina (SAL), nicotina 1 mg/kg (NIC 1) ou 10 mg/kg (NIC 10) os animais foram mantidos também com o controle alimentar já que recebiam doses agudas IC de nicotina 3,2 uma vez na semana e eram avaliados no labirinto radial de 8 braços.

A ANOVA de 1 via para medidas independentes detectou diferenças estatisticamente significantes nos pesos dos animais entre os 3 grupos na 1ª

semana [$F(2,29) = 8,31$; $p = 0,0014$], na 2ª semana [$F(2,29) = 7,62$; $p = 0,0022$] e na 3ª semana [$F(2,29) = 4,65$; $p = 0,0177$] após a interrupção das administrações crônicas. O teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais do grupo NIC 10 apresentaram pesos mais baixos na 1ª semana comparado com SAL ($p < 0,05$) e NIC 1 ($p < 0,01$), na 2ª semana comparado com SAL e NIC 1 ($p < 0,01$) e também na 3ª semana comparado com SAL ($p < 0,05$) e NIC1 ($p < 0,01$) (Fig. 51).

O menor peso observado nos animais tratados cronicamente com NIC 10 observado anteriormente, durante as administrações IC de diferentes doses de nicotina e etanol, se manteve mesmo após a interrupção das administrações crônicas, sugerindo que o menor ganho de peso neste grupo não se recuperou mesmo após 3 semanas da retirada das administrações da nicotina.

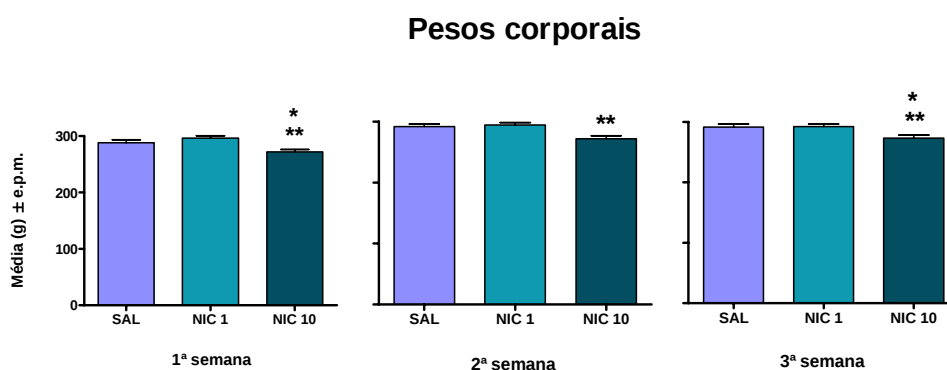


Figura 51 - Média dos pesos corporais (g) $\pm$ e.p.m. nas 1ª, 2ª e 3ª semanas após a interrupção das administrações crônicas de salina (SAL), nicotina 1 mg/kg (NIC 1) ou nicotina 10 mg/kg (NIC 10). Na 1ª semana, * $p < 0,05$ comparado a SAL e ** $p < 0,01$ comparado a NIC1. Na 2ª semana, ** $p < 0,01$ comparado a SAL e NIC 1. Na 3ª semana, * $p < 0,05$ comparado a SAL e ** $p < 0,01$ comparado a NIC 1.

6 DISCUSSÃO

6.1 O labirinto radial de 8 braços

A despeito de novos modelos animais para avaliação da memória operacional em roedores, o labirinto radial de 8 braços, inicialmente proposto por Olton e Samuelson (1976), continua sendo um aparato sensível e eficaz na avaliação da memória operacional espacial.

O treinamento dos animais neste modelo consistiu de cinco fases, onde os animais aprendiam a localizar um reforço (pedaço de amendoim) ao final de cada braço somente uma vez por sessão.

Todos os animais inseridos nos protocolos dos estudos I e II atingiram o critério de aprendizagem, alcançando melhora gradativa do desempenho tanto nas tarefas sem o retardo quanto nas tarefas com o retardo de 5 segundos, utilizadas para avaliar o desempenho dos animais no labirinto radial.

Neste modelo, podem-se diferenciar dois tipos de memória: a memória de referência e a memória operacional. A primeira diz respeito à memória de procedimento, relativa às regras de aprendizagem da tarefa, como, por exemplo, o conhecimento de que cada braço apresenta apenas um reforço (amendoim), e que a entrada em um braço já visitado implica em um não reforçamento.

O segundo tipo, a memória operacional, está relacionado ao processamento de diversas funções cognitivas, dentre as quais o armazenamento temporário da informação, por exemplo, dos braços já visitados em uma sessão de treinamento, e a recuperação (evocação) da mesma, na presença ou não de retardos (segundos, minutos ou horas) para a realização de um desempenho apropriado e efetivo (Fuster, 1997; Floresco e Phillips, 2001; Phillips et al., 2004).

Neste caso, a informação seria relevante para aquela sessão específica, não sendo necessária para o desempenho das sessões seguintes (Fuster, 1997; Floresco e Phillips, 2001; Phillips et al., 2004; Silva de Melo et al., 2005). Neste contexto, o labirinto radial constitui-se em um modelo animal clássico para avaliar a memória operacional (Shah e Miyake, 1999; Seamans et al, 1998).

A introdução de um período de retardo durante o desempenho dos animais, torna a sessão pós-retardo mais sensível à memória operacional, podendo a mesma ser verificada em um curto prazo (segundos), ou em longos-prazos através de intervalos mais prolongados (horas) (Strijkstra e Bolhuis, 1987). Nos protocolos realizados nos nossos estudos I e II, utilizamos retardos de 1 h, porém, alguns

trabalhos utilizam períodos de retardo menores (5 s) ou ainda maiores, de quatro ou até mesmo 18 h.

A versão espacial do labirinto foi a utilizada para a avaliação de memória operacional. Para desempenhar a tarefa nesse tipo de labirinto, o animal utiliza pistas visuais (mesas, quadros, etc.) que se encontram localizadas externamente ao labirinto para mapear o ambiente e poder distinguir a exata localização dos braços a serem visitados. Deste modo, os animais podem discriminar os braços já visitados e armazenar essa informação em uma memória transitória (memória operacional). O labirinto radial de 8 braços, portanto, permite avaliar as características visuoespaciais da memória operacional (Olton, 1979).

Alguns autores questionam o uso do termo “memória operacional de longa duração” para os resultados obtidos com retardos acima de alguns segundos. Não consideramos a memória operacional quanto ao aspecto temporal, mas sim como um processo, para manipular uma informação a fim de atingir um objetivo final de execução da tarefa (Fuster, 1991). Assim, o animal retém a informação, na sessão pré-retardo, dos 4 braços já visitados aleatoriamente no labirinto radial de 8 braços e esta permanece até a sessão pós-retardo, com a visita aos 4 outros braços ainda não visitados. Após esse evento, a informação é descartada, não influenciando uma outra sessão realizada no dia seguinte. Isso demonstra que não houve uma consolidação da informação e que ela não é sustentada além do período necessário.

Portanto, o desempenho da memória operacional do animal estaria relacionado à habilidade de integrar a informação adquirida no pré-retardo, com a sustentação durante o intervalo, à resposta do teste no pós-retardo, onde a resposta comportamental seria o resultado do processamento dessas informações. Com o exposto acima, os testes realizados nos nossos estudos com retardos de uma hora de duração podem ser considerados avaliações da memória operacional espacial de longa duração (Silva de Melo et al., 2005).

O labirinto radial provou ser uma importante ferramenta no estudo da farmacologia comportamental (Olton, 1987). Em trabalho realizado no nosso laboratório de neuropsicofarmacologia, a administração aguda de etanol IC nas doses de 100 µg prejudicou o desempenho dos animais no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de 8 braços, demonstrando o prejuízo do etanol na memória operacional espacial de duração prolongada (de Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003; Galvão, 2005; Anhoque, 2007; Benevides, 2007). Outros estudos

demonstraram que a administração aguda de diferentes drogas (nicotina, cocaína, diazepam, tetrahydrocannabinol, agonistas e antagonistas de neurotransmissores) produz diferentes alterações de desempenho em animais submetidos a testes no labirinto radial de 8 braços, demonstrando que esse instrumento é eficaz para a avaliação dos efeitos de drogas sobre a memória operacional espacial (Laranja, 2003; Rios Valentim, 2004; Bazzarela, 2004; Marinho, 2005; Silva de Melo et al., 2005).

6.2 Localização das cânulas bilaterais

A maioria dos animais dos estudos I e II teve as cânulas bilaterais implantadas nas regiões Cg1 (cingulado anterior dorsal), Cg3 (área pré-límbica - PrL) e Fr2 (ou PrC) do CPFm. Apesar de alguns autores considerarem apenas a área pré-límbica (PrL) como o verdadeiro CPF de ratos (Condé et al., 1995; Preuss, 1995), por entenderem que essa área seria aquela que recebe o maior contingente de aferências do Núcleo Médio Dorsal do tálamo, estudos conduzidos posteriormente demonstraram que outras regiões, como a região dorsal do cingulado anterior (ACd, Cg1) e a região 2 do córtex frontal (Fr2) são de fato parte integrante da porção medial do CPF (CPFm), uma vez que também recebiam maciças projeções do NMDT (Uylings et al., 2003).

Em recente revisão, os autores sugeriram que a parte medial do CPF de ratos (CPFm) era uma região não diferenciada que possuía funções cognitivas encontradas na região dorsolateral do córtex pré-frontal de macacos e, por isso, seria importante para a investigação de funções cognitivas pré-frontais, como a memória operacional espacial. Outras funções que envolvem o CPF, como processos atencionais, também parecem ser semelhantes em roedores e primatas (Brown e Bowman, 2002).

Estudos de conexão também parecem mostrar similaridades neuroanatômicas e estruturais entre o córtex pré-frontal dorsolateral de primatas e o CPFm de roedores. Há conexões do corpo amigdalóide tanto com o córtex cingulado anterior dorsal (Cg1) e a região Fr2 em roedores, quanto com o córtex pré-frontal dorsolateral em primatas (Groenewegen et al., 1997).

Por suas características funcionais pode-se também correlacionar o CPF dorsolateral de primatas ao CPF medial de roedores, o que é de relevância nos estudos que investigam a memória operacional espacial e permite que os resultados apresentados neste estudo possam ser estendidos para espécies superiores como primatas.

6.3 Efeitos da nicotina e do etanol sobre a memória operacional

6.3.1 Nicotina

Muitos estudos, porém não todos, têm demonstrado que a nicotina facilita o desempenho cognitivo em animais e também no homem (Levin, 1991; Levin et al., 2006), e esses efeitos dependem do tipo tarefa, dose, idade e métodos de administração da droga.

Estudos empregando o labirinto radial como método experimental para examinar os efeitos da administração da nicotina sobre a memória operacional espacial de roedores têm sido realizados por alguns autores (Levin et al., 1991; Brucato et al., 1994; Levin et al., 2006), tendo-se demonstrado que a administração sistêmica aguda de nicotina (0,2 mg/kg) melhorou o desempenho (Levin et al., 1991), assim como a sua infusão intracerebroventricular facilitou a acuidade de escolha neste aparato (Brucato et al., 1994), sugerindo que a nicotina facilita a memória operacional espacial.

Em estudos realizados anteriormente em nosso laboratório, a administração bilateral aguda de uma pequena dose de nicotina (3,2 µg), mas não a de doses maiores (10 e 32 µg), diretamente no córtex pré-frontal medial melhorou, reduzindo o número de erros cometidos, o desempenho de tarefas com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços, sugerindo facilitar a memória operacional de longa duração de ratos (De Paula e Gasparini, 2004; Marinho, 2005). Adicionalmente, esta facilitação foi bloqueada pela administração intracortical prévia de um antagonista D₁ seletivo, SCH 23390, na dose de 1 µg, sugerindo a participação do sistema dopaminérgico, neste caso mais especificamente de receptores dopaminérgicos do tipo D₁, na ação da nicotina no córtex pré-frontal medial de roedores (Marinho, 2005).

Considerando os estudos prévios acima mencionados, no presente estudo foram selecionadas as mesmas doses de nicotina, ou seja, 3,2, 10 e 32 μg , para as administrações agudas no córtex pré-frontal medial. Entretanto, em ambos os experimentos do estudo I não foram observados um efeito de facilitação da memória operacional espacial em testes com retardos de 1 h no labirinto radial.

É preciso considerar algumas diferenças nos procedimentos do presente estudo comparado aos estudos anteriores do nosso laboratório. Nos dois estudos precedentes, os grupos controles apresentaram médias de erros maiores após os retardos de 1 h comparados aos grupos controles do presente estudo, de tal forma que nos estudos anteriores foi possível verificar a redução dos erros cometidos pelos animais sob a ação intracortical da nicotina, sendo este efeito sutil e observado apenas sob a administração da menor dose deste agente.

Os grupos controles do presente estudo atingiram um desempenho muito bom, com médias muito baixas de erros, no labirinto radial, mesmo após os retardos de 1 h, produzindo uma condição que se poderia considerar como de efeito “teto” (*“ceiling effect”*), no qual não seria possível observar uma melhora de um desempenho que já se encontra em seu máximo, o que inviabilizou a visualização e caracterização do efeito de facilitação da memória operacional.

Segundo Lambe et al (2003), pequenas concentrações de nicotina (300 nM) são suficientes para induzir um aumento da liberação de glutamato na camada V de neurônios piramidais do CPFm, afetando a neurotransmissão excitatória na principal via de saída do córtex cerebral que é crítica para as funções cognitivas e de recompensa, possivelmente através da estimulação de heteroreceptores nAChRs de alta afinidade do tipo $\alpha 4\beta 2$, que aumentariam a corrente excitatória pós-sináptica espontânea desses neurônios.

Neste caso, a ação facilitadora da nicotina seria relevante somente em condição de baixo desempenho basal ou quando a tarefa impõe novas dificuldades (Levin et al., 2006), e essa hipótese estabelece um fundamento para a análise da influência da nicotina em mecanismos modulatórios de aprendizagem, memória e atenção.

Considerando-se ainda as evidências clínicas de que a nicotina melhora o desempenho de indivíduos que apresentam dificuldades cognitivas, mas piora o desempenho de indivíduos cujo desempenho inicial encontra-se em seu melhor nível (Newhouse et al., 2004), é possível fortalecer a sugestão de que a ausência da

evidência de um efeito facilitador da nicotina nos animais do presente estudo se deveria à condição de bom (máximo) desempenho basal dos mesmos.

Levin et al (1993), demonstraram que a infusão crônica (12 mg/kg/dia) de nicotina facilitou significativamente o desempenho da memória operacional de roedores no labirinto radial, sendo este efeito bloqueado pela mecamilamina, um antagonista nicotínico, demonstrando que este efeito seria de fato mediado por receptores colinérgicos nicotínicos.

Em outro estudo Levin e Torry (1996) demonstraram que a facilitação da memória operacional espacial em decorrência de uma melhora do desempenho das tarefas no labirinto radial após infusão crônica subcutânea (em média de 5 mg/kg/dia) da nicotina se deu em ratos jovens (3 a 7 meses de idade) mas não em ratos idosos (24 a 28 meses de idade).

Demonstraram ainda que administrações agudas posteriores (após 2 semanas de abstinência), nestes mesmos animais tratados cronicamente com a nicotina, da mecamilamina (antagonista nicotínico) prejudicou o desempenho de ratos jovens mas não o de idosos. Entretanto a administração aguda da própria nicotina ou pilocarpina (agonista muscarínico) melhorou o desempenho de ratos idosos, mas não o de ratos jovens, enquanto que a escopolamina (antagonista muscarínico) prejudicou o desempenho de ambos, ratos jovens e adultos (Levin e Torry, 1996).

Estes dados parecem sugerir que há uma diferença no envolvimento de receptores nicotínicos e muscarínicos no processamento da memória operacional dependendo da idade, sendo os receptores nicotínicos mais susceptíveis em ratos jovens enquanto que em ratos idosos os receptores nicotínicos estariam menos responsivos ou funcionantes, no entanto ainda respondem favoravelmente à ação aguda da nicotina, e ainda, parece haver um envolvimento maior de receptores muscarínicos na mediação do desempenho da memória operacional em ratos idosos.

No presente estudo, os animais que receberam administrações subcutâneas crônicas de nicotina nas doses de 1 ou 10 mg/kg durante a aquisição das tarefas no labirinto radial de 8 braços alcançaram o critério de melhor desempenho com médias de número de erros um pouco mais baixas, especialmente os tratados com a maior dose da nicotina, quando comparados aos animais controle, que receberam salina cronicamente. No entanto a comparação do desempenho entre os grupos não

se mostrou estatisticamente significativa, não sendo possível constatar a ocorrência de alterações na aprendizagem das tarefas sob o efeito crônico da nicotina. Estes resultados sugerem a tênue influência do uso continuado da nicotina nos processos de aprendizagem e memória, que podem ter sido mais uma vez mascarada pelo efeito “teto” de melhor desempenho do grupo controle, não possibilitando a evidência de uma melhora do desempenho nos grupos tratados com a nicotina.

6.3.2 Etanol

Ao contrário da nicotina, o etanol apresenta efeitos predominantemente prejudiciais aos processos cognitivos, ainda que pequenas doses possam também facilitar algumas funções cognitivas (Rossetti et al., 2002). São inúmeros os estudos que demonstram os efeitos de prejuízo do etanol sobre a aprendizagem e a memória, e especialmente sobre a memória operacional, tanto em animais experimentais (Gibson, 1985; Oliveira et al., 1990), quanto no homem (Zhang et al., 1997; Gevins et al., 2002).

Estudos prévios em nosso laboratório têm repetidamente demonstrado que a administração do etanol bilateral e diretamente no córtex pré-frontal medial de roedores prejudica significativamente o desempenho de testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços, sugerindo que o etanol administrado intracorticalmente prejudica a memória operacional espacial de duração longa, e ainda, que o córtex pré-frontal medial está definitivamente envolvido nos prejuízos cognitivos produzidos pelo etanol (de Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003; Galvão, 2005; Anhoque, 2007; Benevides, 2007).

Desta forma, no presente estudo a escolha das doses para administração de etanol no córtex pré-frontal medial foi feita de acordo com os estudos prévios realizados em nosso laboratório que realizou curvas dose-efeito empregando as doses de 32, 100 e 180 µg (de Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003; Galvão, 2005). Têm-se observado consistentemente um padrão de efeito de prejuízo em “U” invertido no desempenho do pós-retardo de 1 h, sendo a dose intermediária, de 100 µg, a que produz a maior média de número de erros quando comparada ao controle (de Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003; Galvão, 2005), tendo sido esta a dose escolhida para as administrações agudas dos experimentos no Estudo I.

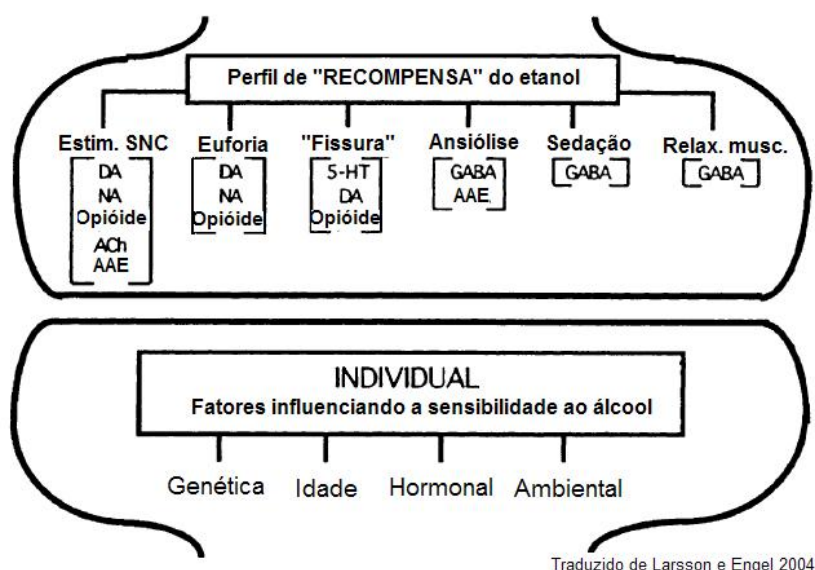
Este padrão em curva em “U” invertido sugere um perfil bifásico de efeitos do etanol no córtex pré-frontal medial de roedores. Rossetti et al (2002), observaram, em animais desempenhando tarefas com retardo alternado em um labirinto em “T”, que uma dose pequena (0,5 g/kg) do etanol administrado sistemicamente melhora a memória operacional enquanto que uma dose maior (1 g/kg) prejudica esta função. Curiosamente, estes autores implicam o córtex pré-frontal como alvo para estas ações bidirecionais do etanol sobre a memória operacional (Rossetti et al., 2002).

Este perfil de efeitos de prejuízo do etanol sobre a memória operacional espacial de duração prolongada foi integralmente reproduzido nos experimentos do presente estudo (Estudos I e II), tendo se observado que a dose de 100 µg, precedida de uma administração de salina prejudicou significativamente o desempenho de tarefas com retardo de 1 h no labirinto radial de 8-braços.

O receptor GABA do tipo GABA_A é considerado o principal alvo da ingesta aguda do etanol. Assim, há uma potencialização da neurotransmissão inibitória no cérebro (Edwards et al., 1999). Caracteriza-se desta forma, como uma droga de abuso de efeito depressor do sistema nervoso central (Fig. 52).

Por outro lado, o etanol inibe o receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA), atuando provavelmente em um sítio alostérico e alterando o acoplamento do agonista ou os eventos decorrentes entre a ativação do receptor pelo agonista e a abertura do canal iônico (Woodward, 2000; Nagy et al., 2003). De fato, há evidências bioquímicas e comportamentais sugerindo que os receptores NMDA podem contribuir para intoxicação alcoólica, tolerância e síndrome de abstinência (Piasecki et al., 1998) (Fig. 52).

O álcool atua também sobre outros sistemas de neurotransmissão como dopaminérgico, ativando o disparo neuronal na área tegmentar ventral (Diana et al., 1992), e serotoninérgicos com aumento funcional do receptor 5-hidroxitriptamina (5-HT) do tipo 5-HT₃ (Lovinger, 1999) (Fig. 52). É possível também que o etanol tenha efeitos de inibição de canais de cálcio voltagem dependente do tipo L (Edwards et al., 1999; Focchi et al., 2001).



Traduzido de Larsson e Engel 2004

Figura 52 - Ação coletiva de múltiplos neurotransmissores e neuromoduladores no estabelecimento do perfil de recompensa do etanol. Observe-se que o resultado final depende de fatores individuais e que não estão somente relacionados à natureza genética, mas incluem a idade, hormônios e o ambiente (DA: dopamina, NA: noradrenalina, ACh: acetilcolina, AAE: aminoácidos excitatórios, 5-HT: serotonina, GABA: ácido gama-aminobutírico) (Extraído e traduzido de Larsson e Engel, 2004).

Weiss e Porrino (2002) fazem uma clara revisão sobre o envolvimento de vários sistemas de neurotransmissores, dentre os quais a dopamina, os opióides e outros nos efeitos produzidos pelo álcool e a sua relação com o sistema de recompensa cerebral (Fig. 52). Sabe-se que, pelo menos em parte, o etanol estimula o sistema de recompensa atuando sobre o sistema nervoso dopaminérgico central (Koob, 1992).

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram o envolvimento do sistema dopaminérgico pré-frontal nos efeitos de prejuízo do etanol sobre a memória operacional espacial de longa-duração, uma vez que o bloqueio de receptores dopaminérgicos, por um antagonista seletivo de receptores do tipo D₁, nesta área cortical impediu que os efeitos clássicos de prejuízo da memória operacional fossem produzidos pelo etanol administrado diretamente no córtex pré-frontal medial (Galvão, 2005).

Estudos recentes de nosso laboratório também demonstraram o envolvimento dos receptores dopaminérgicos do tipo D₂ do córtex pré-frontal medial, desde que a administração intracortical de um antagonista D₁/D₂, haloperidol, aumentou (de Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003) enquanto pequenas doses de um antagonista

seletivo para receptores dopaminérgicos do tipo D₂, sulpirida, bloqueou (Benevides, 2007) os efeitos de prejuízo do etanol sobre a memória operacional espacial de longa-duração avaliados no labirinto radial. Também foi observado o envolvimento dos receptores NMDA do córtex pré-frontal medial, desde que a administração intracortical de antagonistas NMDA, MK-801 e memantina, bloquearam os efeitos de prejuízo do etanol sobre a memória operacional (Anhoque, 2007).

Entretanto, não se descarta a ação do etanol nos receptores nicotínicos dos subtipos $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ (Fig. 8), que são os mais expressivos no cérebro de mamíferos, das onze subunidades de receptores nAChR ($\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ e $\beta 2$ - $\beta 4$) que já foram identificadas (Lindstrom et al., 1995), o que reforça uma possível interação entre nicotina e etanol.

De fato um conjunto de evidências de estudos eletrofisiológicos, farmacológicos e neuroquímicos sugerem que o etanol pode interagir com receptores nicotínicos no sistema nervoso central (Larsson e Engel, 2004). Adicionalmente, estudos comportamentais e neuroquímicos, agudos e crônicos, desenvolvidos em camundongos e ratos indicam que os receptores nicotínicos centrais da área tegmentar ventral estão envolvidos na mediação da ativação dopaminérgica mesolímbica e nos efeitos reforçadores do etanol (Söderpalm et al., 2000).

6.3.3 Nicotina e Etanol

Interação aguda de nicotina e etanol no CPFm

Tratamentos com agonistas nicotínicos ou inibidores reversíveis da colinesterase revertem os efeitos de prejuízo de aprendizagem induzida pelo etanol (Beracochea et al., 1986; Hodges et al., 1991).

No presente estudo, apesar das administrações agudas de nicotina, particularmente de uma dose pequena (3,2 μ g), diretamente no córtex pré-frontal medial ter reduzido a média de erros cometidos pelos animais sob a administração intracortical aguda de etanol, especialmente na dose que usualmente prejudica o desempenho dos animais (100 μ g), este efeito não se mostrou estatisticamente significativo nos experimentos 1 e 2.

Entretanto, considerando-se a somatória dos resultados destes dois experimentos, já que todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, a redução dos efeitos de prejuízo do etanol 100 μg sobre a memória operacional pela administração intracortical da nicotina na dose de 3,2 μg foi estatisticamente significativa comparado aos animais que receberam administrações intracorticais de salina e etanol 100 μg , sugerindo que a nicotina, em uma dose pequena, bloqueou o efeito de prejuízo da memória operacional produzido pelo etanol no córtex pré-frontal medial.

Curiosamente, a administração da dose de 3,2 μg da nicotina no córtex pré-frontal medial que reduziu o efeito de prejuízo do etanol na sua dose de efeito máximo (100 μg), aumentou, de modo estatisticamente significativa, o efeito de prejuízo do etanol nas doses intracorticais que usualmente não demonstram prejuízos significantes (32 e 180 μg), conferindo um perfil de efeito em um padrão de “U” do etanol combinado à nicotina, sendo o oposto do habitualmente observado apenas para o etanol, ou seja, um padrão em “U” invertido.

Estes resultados sugerem uma interação entre nicotina e etanol nos efeitos sobre o desempenho da memória operacional espacial de longa-duração de modo que a nicotina, em uma dose pequena, bloqueia o efeito de prejuízo do etanol em sua dose de máximo efeito, mas potencializa o efeito de prejuízo do etanol em doses que usualmente não são prejudiciais.

Esta diferença de efeitos de acordo com a dose de ambas as drogas provavelmente está relacionada ao perfil de efeitos das mesmas, sendo que tanto a nicotina (Newhouse, 2004) quanto o etanol (de Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003; Galvão, 2005) apresentam um padrão em “U” invertido de efeitos sobre as funções cognitivas, entretanto, em direções contrárias, ou seja, há uma dose ótima de nicotina para um efeito de melhor desempenho, de tal modo que doses menores ou maiores seriam ineficazes ou prejudiciais, enquanto que para o etanol, há uma dose máxima de efeito de prejuízo de desempenho, sendo que doses menores ou maiores não produzem este efeito de prejuízo.

O perfil de curva em “U” invertido para os efeitos da nicotina sugerido por Newhouse (2004) no homem, também foi observado em animais experimentais em estudos realizados por Levin et al (1999). Estes autores observaram uma melhora do desempenho da memória operacional no labirinto radial de 8-braços em ratas

após a administração subcutânea aguda dos agonistas nicotínicos isonicotina e norisonicotina, em sua dose intermediária 4,5 mg/kg), enquanto que as doses menores (0,5 mg/kg e 1,5 mg/kg) e a maior dose (13,5 mg/kg) não alteraram a acuidade de escolha para o desempenho das tarefas.

Assim, no presente estudo as curvas de efeitos da nicotina e do etanol se interporiam de tal forma a ocorrer uma melhora do desempenho quando este está deficiente pela ação do etanol, mas por outro lado ocorreria uma piora do desempenho quando este não é alterado isoladamente pelo etanol, mas que na presença da nicotina, mesmo que em pequenas doses, o etanol passa a afetar o desempenho da memória operacional.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com um estudo conduzido por Tracy et al (1999), no qual demonstraram que a nicotina subcutânea (0,4 mg/kg) teria prevenido os efeitos de prejuízo do etanol administrado oralmente (2,0 g/kg) sobre o desempenho de tarefas em um labirinto radial de 8-braços.

Rezvani e Levin (2002) por outro lado, observaram que a administração combinada de uma dose intraperitoneal relativamente elevada do etanol (1,5 g/kg), que não apresentou efeito sozinho, com uma dose pequena (0,3 mg/kg) ou grande (1,2 mg/kg) de nicotina subcutânea, que também não apresentaram efeitos sozinhos, produziu um prejuízo significativo da acuidade de escolha no labirinto radial de 8-braços, demonstrando haver uma interação de efeitos entre nicotina e etanol, sendo no sentido de uma diminuição da acuidade de desempenho cognitivo. Observe-se, no entanto, que no presente estudo, doses do etanol intracortical que não se apresentaram prejudiciais (32 e 180 µg) quando combinadas com salina, passaram a produzir maior número de erros ao serem combinadas com a nicotina intracortical (3,2 µg), sendo concordantes com os resultados de Reszvani e Levin (2002).

Os mecanismos subjacentes a estas interações provavelmente não seriam de caráter farmacocinético, pois ambas as drogas foram administradas diretamente no córtex pré-frontal medial no presente estudo. É possível supor que estes efeitos se deveriam à ação independente ou interdependente em receptores nicotínicos e/ou em sítios de ação do etanol no córtex pré-frontal medial.

É interessante notar que, segundo a literatura, o padrão de curva de efeitos da nicotina sobre a facilitação cognitiva em “U” invertido, é equivalente ao perfil que caracteriza a ação da dopamina, sobretudo por meio de receptores do tipo D₁, sobre

o desempenho da memória operacional (Goldman-Rakic, 1996; Zahrt et al., 1997; Arnsten, 1998).

Considere-se que foi observado em nosso laboratório que o efeito de facilitação da nicotina sobre o desempenho de testes com retardos de 1 h no labirinto radial, na mesma dose empregada no presente estudo (3,2 μ g), foi bloqueada por um antagonista seletivo para os receptores dopaminérgicos do tipo D₁ (Marinho, 2005), e que o efeito de prejuízo da memória operacional espacial de longa-duração (retardos de 1 h) produzido pelo etanol, em dose equivalente à empregada no presente estudo (100 μ g), também foi bloqueado pela mesma dose (1 μ g) do antagonista D₁ (Galvão, 2005). É possível, portanto, sugerir que a interação dos efeitos da nicotina e do etanol envolva a neurotransmissão dopaminérgica, sobretudo em seus receptores do tipo D₁.

Entretanto, os eventos que antecedem a ação da dopamina, quer por ativação da nicotina, quer por ação do etanol, certamente envolvem a ativação de receptores nicotínicos no córtex pré-frontal medial, e os vários sítios de ação do etanol, notadamente GABA e NMDA, mas também os próprios receptores nicotínicos.

Couey et al (2007) demonstrou recentemente que no córtex pré-frontal medial de camundongos a ativação de receptores nicotínicos, contendo ambas as subunidades $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$, presentes em interneurônios aumenta a inibição dos neurônios piramidais pela redução da propagação do potencial de ação dendrítico e conseqüente redução da sinalização do cálcio intracelular. Como resultado, uma ativação pós-sináptica mais vigorosa seria requerida para superar esta inibição dendrítica para induzir uma plasticidade dependente do tempo de disparo (*spike-timing-dependent plasticity*), um processo em que as mudanças na força das sinapses corticais dependeriam de um ajuste preciso do tempo de atividade pré- e pós-sináptica, resultando em mudanças específicas na concentração de cálcio pós-sináptico para determinar se uma força sináptica seria aumentada, desencadeando uma potenciação a longo-prazo (LTP), ou diminuída, resultando em uma depressão a longo-prazo (LTD).

Segundo McGhee (2007) estes interneurônios mencionados por Couey et al (2007) seriam GABAérgicos, sendo que duas das três classes presentes no córtex pré-frontal expressam subunidades de nAChRs. A terceira classe de interneurônios é ativada indiretamente pelos nAChRs que aumentam a excitabilidade

glutamatérgica sobre aquelas células (Fig. 11). Assim, a exposição à nicotina aumenta as aferências inibitórias para os neurônios piramidais da camada V através de uma ativação direta e indireta de interneurônios GABAérgicos (McGhee, 2007).

Kristensen et al (2007) demonstrou que um agonista parcial seletivo de nAChR $\alpha 7$, e a própria nicotina, estimulam a expressão de um gene que codifica uma proteína implicada na função de memória de longo-prazo no córtex pré-frontal e no córtex ventral orbital, mas não no hipocampo ou no córtex parietal. Este subtipo de receptor homomérico ionotrópico, altamente permeável ao cálcio, tem atraído muita atenção nos últimos tempos, pois tem sido considerado o principal responsável pelos efeitos cognitivos da nicotina. Efeitos estes que são tipicamente mediados pelo córtex pré-frontal (Kristensen et al., 2007).

Foi exatamente este tipo de nAChRs, $\alpha 7$, que foi inibido pelo etanol de forma concentração-dependente em oócitos de *Xenopus* (Yu et al., 1996).

Entretanto há evidências de que o etanol, em concentrações relevantes fisiologicamente, aumentou significativamente as correntes em nAChRs neuronais de alta-afinidade insensíveis à α -bungarotoxina, ou seja, provavelmente nAChRs do tipo não $\alpha 7$, em cultura de neurônios corticais de uma forma rápida e reversível (Aistrup et al., 1999), enquanto apresentou modesta ação sobre as correntes de nAChRs sensíveis à α -bungarotoxina, ou seja, provavelmente nAChRs do tipo $\alpha 7$ (Aistrup et al., 1999). Aistrup et al (1999) sugerem que os nAChRs, particularmente aqueles não sensíveis à α -bungarotoxina, seriam os condutores através dos quais o etanol poderia mediar algumas de suas ações no sistema nervoso central.

Enfim, o etanol parece exercer, pelo menos parte de sua ação, por meio de receptores nicotínicos sendo dos tipos predominantes no sistema nervoso central e também encontrados no córtex pré-frontal medial, ou seja, $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$. Considerando-se que os receptores do tipo $\alpha 7$ são aparentemente inibidos ou fracamente ativados e o segundo, $\alpha 4\beta 2$, são consideravelmente ativados pelo etanol, a ação do etanol na presença da nicotina no córtex pré-frontal medial poderia ser modificada de tal forma a produzir os efeitos que foram observados no presente estudo.

A forma exata sob a qual ocorre a interação aguda entre etanol e nicotina quer por atuação nos próprios receptores nicotínicos, ou por atuação direta ou indireta sobre ação de outros neurotransmissores, notadamente a dopamina, GABA

e glutamato, no córtex pré-frontal medial não pode ser extraída dos presentes resultados, merecendo estudos específicos para a sua elucidação.

Administração crônica de nicotina

Estima-se que 80 a 95% das pessoas com problemas com o uso de álcool são fumantes, em contraste com 25% na população geral (Ellingstad et al., 1999; Penland et al., 2001). Por outro lado, 15% dos fumantes consomem álcool e 40% tem um passado com problemas de alcoolismo (Hughes, 2000).

A existência de uma forte ligação entre o uso de álcool e cigarro é repetidamente demonstrada em diversos estudos (Dawson, 2000). Por exemplo, indivíduos que são mais severamente dependentes do álcool fumam mais cigarros por dia e mais cedo após acordarem que aqueles menos comprometidos pela dependência alcoólica (Batel et al., 1995). Fumantes com alcoolismo ativo no ano precedente foram 60% menos propensos a pararem de fumar comparados aos que não apresentam história de alcoolismo (Breslau et al., 1996). Usuários pesados e freqüentes de álcool apresentam menores probabilidades em parar de fumar e são mais propensos a fumarem quando bebem (Dawson, 2000).

As possíveis explicações para o uso combinado de álcool e cigarro são de que ambas as drogas aumentam os efeitos reforçadores (desejo) uma da outra (efeito similares) ou de que ambas podem diminuir os efeitos tóxicos ou indesejáveis (aversivos) de uma e de outra (efeitos compensatórios) (Schmidt e Smolka, 2001). De fato, a nicotina diminui os efeitos prejudiciais do álcool sobre as habilidades cognitivas, tais como o alerta e a atenção, mas por outro lado, os fumantes podem usar os efeitos sedativos do álcool para mitigar os efeitos aversivos do cigarro.

No Brasil, em estudos epidemiológicos domiciliares nacionais realizadas pelo CEBRID em 2001 e 2005 (Carlini et al, 2001 e 2005) demonstraram o uso na vida de tabaco em 41,1 e 44%, e de 9 e 10,1% de dependência à nicotina, respectivamente, na população investigada. No presente estudo foi considerado uma condição de uso prolongado da nicotina por meio da administração subcutânea diária de uma dose pequena e uma dose elevada de nicotina (1 e 10 mg/kg, respectivamente) comparadas à administração subcutânea diária de salina, e as possíveis influências que esta exposição crônica da nicotina ou salina poderia produzir nas respostas do córtex pré-frontal medial à própria nicotina ou ao etanol.

Ainda buscando verificar os efeitos da exposição crônica da nicotina, foram investigados os possíveis efeitos da retirada da nicotina, procedendo-se ao exame dos efeitos de doses agudas de nicotina no córtex pré-frontal medial na abstinência da nicotina em animais tratados cronicamente com as doses acima mencionadas.

Nestes experimentos foi observado que o etanol administrado diretamente no córtex pré-frontal medial produziu um prejuízo do desempenho após os retardos de 1 h no labirinto radial, caracterizando-se pelo perfil em “U” invertido já mencionado para os efeitos do etanol intracortical e que foi também reproduzido no Estudo 1, no grupo de animais tratados cronicamente com a salina. Entretanto, este efeito de prejuízo em “U” invertido não foi observado nos grupos de animais tratados cronicamente com a nicotina 1 ou 10 mg/kg, ocorrendo uma ausência dos efeitos do etanol, sobretudo na dose intracortical que usualmente produz o prejuízo máximo, ou seja, 100 µg, sob a administração subcutânea crônica da nicotina. Estes resultados reforçam a existência de interação dos efeitos da nicotina e do etanol no córtex pré-frontal medial em seu processamento da memória operacional espacial em ratos.

Observou-se ainda que a administração crônica da nicotina, em ambas as doses sistêmicas, não modificou significativamente os efeitos da própria nicotina no córtex pré-frontal medial.

A ausência de efeito de prejuízo do etanol sobre a memória operacional espacial no córtex pré-frontal medial de animais expostos à ação contínua de nicotina sistemicamente pressupõe a ocorrência de alguma alteração nos sítios de ação do etanol nesta estrutura cortical e/ou em estruturas a ela relacionadas de tal modo que o etanol não mais produz os prejuízos cognitivos esperados. Esta interação não parece sugerir um tipo de antagonismo já que não ocorreu um desvio da curva dose-efeito, e sim uma ausência completa dos efeitos do etanol no córtex pré-frontal medial.

Considerando-se que o etanol pode produzir ao menos parte dos seus efeitos por atuação direta em receptores nicotínicos (Dohrman e Reiter, 2003), seria possível supor que a exposição contínua à nicotina sistemicamente produziria mudanças na atividade dos receptores nicotínicos presentes no córtex pré-frontal medial ou mesmo em outras estruturas relacionadas.

Na presença contínua da nicotina, possivelmente ocorreria uma dessensitização dos receptores nicotínicos, respeitando as características dos tipos

de receptores encontrados no córtex pré-frontal e/ou em estruturas a ele relacionados, ou seja $\alpha 7$ sendo um receptor de baixa-afinidade, cuja dessensitização somente ocorre na presença de doses elevadas da nicotina, mas ocorre de forma rápida (Alkondon et al., 1998 e 1999; Pidoplichko et al., 2004), enquanto que o subtipo $\alpha 4\beta 2$, de alta-afinidade, cuja dessensitização ocorre mais facilmente mas de forma algo mais lenta (Alkondon et al., 1998 e 1999), de tal forma que reduziria a resposta à ação do etanol e da própria nicotina.

Apesar da nicotina ser um agonista, há evidências de que a dessensitização de receptores nicotínicos pode estar relacionada ao estabelecimento de uma supersensibilização de receptores nicotínicos (Dani e Heinemann, 1996) de ambos os tipos, $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$, nas estruturas do circuito de gratificação cerebral a ele relacionados, como a área tegmentar ventral, núcleo accumbens (Pidoplichko et al., 2004.;Dani e Harris, 2005), e possivelmente córtex pré-frontal. Esta supersensibilização poderia ser a razão da maior resposta à nicotina administrada no córtex pré-frontal medial em ratos tratados cronicamente com a nicotina em sua maior dose subcutânea (10 mg/kg), nas segunda e terceira semanas após a retirada abrupta da nicotina. Este efeito não foi observado na primeira semana de abstinência, sendo aparentemente necessário um período maior (no caso 15 dias) para que este fenômeno se evidencie.

Entretanto, a natureza desta interação da nicotina administrada cronicamente e do etanol no córtex pré-frontal medial ainda não está muito clara. São poucos os estudos, e também muito recentes que evidenciam e localizam os receptores nicotínicos no córtex pré-frontal de modo que para a melhor compreensão dos fenômenos observados no presente estudo serão necessários avanços nos estudos relacionados aos mecanismos celulares e a interação com os diferentes neurotransmissores presentes nesta estrutura cortical e sobretudo no envolvimento dos mesmos na mediação e/ou modulação dos processos cognitivos frontais, notadamente na memória operacional.

6.4 Considerações Clínicas

No presente estudo foi demonstrado que a administração, aguda e crônica, da nicotina reduz os efeitos do etanol no córtex pré-frontal medial de roedores,

sugerindo que o uso, agudo e crônico, do cigarro reduziria os efeitos do etanol no sistema nervoso central, particularmente de seus prejuízos sobre uma função cognitiva frontal, a memória operacional. Esta evidência sugere um efeito compensatório para o uso combinado destes compostos.

A nicotina, e principalmente os seus análogos, tem sido amplamente investigados como potenciais agentes para o tratamento de patologias com disfunções cognitivas como a Doença de Alzheimer (Levin e Torry, 1996).

A Doença de Alzheimer é um tipo de demência senil associada à degeneração dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal que projetam-se para o córtex, a amígdala, o hipocampo, e que resulta em diminuição da capacidade de manter a atenção sustentada e em profundos prejuízos cognitivos (Coyle et al., 1983).

Há estudos demonstrando que a administração de nicotina atenua as deficiências no desempenho cognitivo resultantes de lesões no prosencéfalo basal e septo (Levin e Torry, 1996), e que melhora a atenção, a aprendizagem e a memória em pacientes com Alzheimer (Rezvani e Levin, 2001).

Também tem se mostrado que a administração de nicotina, na forma de emplastro ou goma de mascar, reduziu significativamente a rigidez, o tremor, o pensamento desorganizado e a depressão em pacientes não fumantes com Doença de Parkinson.

Há evidências epidemiológicas sugerindo que fumar cigarros representaria uma auto-medicação em adultos com o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), sendo que 40% dos adultos com esse transtorno fumam cigarros comparados a 26% da população em geral (Pomerleau et al., 1995b).

Também há uma relação entre o uso da nicotina e a esquizofrenia. Os pacientes esquizofrênicos frequentemente fumam pesado e a abstinência nesses indivíduos resulta em piora dos sintomas da esquizofrenia (Greeman e McClellan, 1991). Freedman et al (1995), demonstraram que há uma diminuição no número de nAChRs contendo subunidades do tipo $\alpha 7$ no hipocampo desses pacientes.

Desta forma, a síntese de novos agonistas nicotínicos com alta seletividade para subtipos específicos de nAChRs, com baixos efeitos colaterais e com ação neuroprotetora, poderá ser benéfica no tratamento das doenças neurodegenerativas (Mihailescu e Drucker-Colin, 2000), e possivelmente das dependências tanto da própria nicotina como de outras drogas. De fato, recentemente foi disponibilizado um

agonista parcial dos receptores nicotínicos neuronais $\alpha 4\beta 2$, o tartarato de vareniclina (aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration – FDA* – em maio de 2006), para o tratamento da dependência à nicotina, com resultados clínicos promissores, que também poderá ser de grande interesse no tratamento de outras dependências, sobretudo a de álcool.

É, contudo necessário alertar para evidências experimentais demonstrando que a nicotina, apesar de demonstrar efeitos benéficos sobre algumas funções cognitivas, é neurotóxica, visto apresentar efeitos deletérios em neurônios hipocampais de ratos (Barros et al., 2007).

7 CONCLUSÃO

- A administração IC aguda de ETOH produziu um perfil esperado em “U” invertido de prejuízo do desempenho do pós-retardo de 1 h no labirinto radial de 8 braços, sendo a dose de 100 µg a que produziu significativamente maior número de erros.
- O resultado anterior reforça o envolvimento do córtex pré-frontal medial nos efeitos de prejuízo cognitivos produzidos pelo etanol.
- A administração aguda prévia da menor dose de NIC (3,2 µg) IC reduziu significativamente o efeito de prejuízo do ETOH IC 100 µg sobre a memória operacional espacial, enquanto promoveu efeitos de prejuízos das doses de ETOH 32 e 180 µg IC que não apresentaram efeitos quando administrados com SAL IC, produzindo um perfil em “U” para a curva dose-efeito sob a combinação IC aguda de NIC e ETOH no CPFm.
- Os animais dos grupos tratados cronicamente com NIC 1 e NIC 10 aprenderam as tarefas no labirinto radial e apresentaram desempenho sob NIC IC de forma semelhante ao grupo crônico SAL, no entanto, não apresentaram os efeitos de prejuízo na memória operacional de longa duração do ETOH 100 µg IC comparados aos animais do grupo crônico SAL.
- Os animais do grupo NIC 10 apresentaram prejuízos significativos do desempenho do pós-retardo de 1 h no labirinto radial de 8 braços quando receberam administrações IC aguda de NIC 3,2 µg, nas 2^a e 3^a semanas de abstinência da nicotina.
- Estes resultados demonstram que a NIC, agudamente no CPFm ou cronicamente por via subcutânea, reduz os efeitos de prejuízo do ETOH no CPFm sobre a memória operacional espacial de longa-duração. Também demonstra que a abstinência da nicotina sistêmica produz possivelmente uma supersensibilização no CPFm aos efeitos da própria NIC.

8 REFERÊNCIAS

Addy, N.; Levin, E.D. Nicotine interactions with haloperidol, clozapine and risperidone and working memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology*, 27(4):534-541, 2002.

Aistrup, G.L.; Marszalec, W.; Narahashi, T. Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol*, 55:39 - 49, 1999.

Alkondon, M.; Pereira, E.F.; Cortes W.S.; Maelicke A.; Albuquerque E.X. Choline is a selective agonist of alpha – 7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J. Neurosci*, 9:2734-42, 1997.

Alkondon, M.; Pereira, E.F.R.; Albuquerque E.X. Alfa- Bungarotoxin-and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res.*, 810:257-263, 1998.

Alkondon, M.; Pereira, E.F.R.; Eisenberg, H.M.; Albuquerque E.X. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci.*, 19:2693-2705, 1999.

Andresen, B. D.; Kwokey, J., Jams, J. et al. Cotinine in amniotic fluids from passive smokers. *Lancet*, I:971, 1982.

Anhoque, C.F. Antagonistas NMDA, MK-801 e Memantina, no CPFm bloqueiam prejuízos da memória operacional espacial produzido pelo etanol. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

Arnsten A.F.; Cai J.X.; Murphy B.L.; Goldman-Rakic P.S. Dopamine D1 receptor mechanisms in the cognitive performance of young and aged monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 116:143-151, 1994.

Arnsten, A.F.T. Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends Cognit Sci.*, 2:436-447, 1998.

Aultman J.M.; Moghaddam, B. Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology*, 153:353-64, 2001.

Baddeley, A.D. Exploring the central executive. *Q J Exp Psychol A.*, 49:5–28, 1996.

Baddeley, A.D. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci.*, 4(11):417-423, 2000.

Baddeley, A.D. Working memory. Oxford: Oxford University Press; 1986.

Baddeley, A.D. Working memory. *Philos Trans R Soc*, 302:311-324, 1983.

Baddeley, A.D. Is working memory still working? *American Psychologist*, 56(11): 849- 864, 2001.

Baddeley, A.D. Working Memory. In: Gazzaniga, M.S. (ed): *The Cognitive Neurosciences*, New York: Bradford, p 755-764, 1997.

Baddeley, A.D. The fractionation of working memory. *Proc.Natl.Sci.USA*, 93: 13468-13472, 1996.

Baddeley, A.D. Working memory: Looking back and looking forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 829-839, 2003.

Baddeley, A.D.; Hitch, G. Working memory. In the psychology of learning and motivation, vol 8, G.A Bower, ed. New York: Academic Press, pp.47-89, 1974.

Barros, D.M.; Galhardi, F.G.; Ribas Ferreira, J.L.; Guterres, L.B, Dickel, O.; Geracitano, L.A.; Izquierdo, I.; Monserrat, J.M. The benefits and drawbacks of

nicotine exposure in the cortex and hippocampus of old rats. *NeuroToxicology*, 28:562–568, 2007.

Batel, P.; Pessione, F.; Maitre, C.; Rueff, B. Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction*, 90:977-980, 1995.

Batuev, A.S.; Kursina, N.P.; Shutov, A.P. Unit activity of the frontal cortex during delayed performance in rats. *Behavioral Brain Research*, 41:95-102, 1990.

Bazzarella, S.M. Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na memória operacional espacial e nos efeitos agudos do álcool no córtex pré-frontal medial. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2004.

Benevides, M.C.A. O Antagonista Seletivo Dopaminérgico D₂, Sulpirida, no Córtex Pré-Frontal Medial Reduz os Prejuízos do Etanol sobre a Memória Operacional em Ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

Benowitz, N. L. Nicotine safety and toxicity. Ed Oxford Univ Press New York. 1998.

Benowitz, N. L., Kuit, F., Jacob, P. et al. Cotinine dispositions and effects. *Clin Pharmacol Therap.*, 139:309, 1983.

Beracochea, D.; Durkin, T.P.; Jaffard, R. On the involvement of the central cholinergic system in memory deficits induced by long term ethanol consumption in mice. *Pharmacol, Biochem Behav.*, 24:519-24, 1986.

Breslau, N.; Peterson, E.; Schultz, L.; Andreski, P.; Chilcoat, H. Are smokers with alcohol disorders less likely to quit? *Am J Pub Health*, 86:985-990, 1996.

Brito, F.D. Toxicologia Humana e Geral. 2^a ed. Atheneu-Rio de Janeiro,.São Paulo,1988.

Brown, V.J.; Bowman, E.M. Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends in Neurosciences*, 25 (7):340-343, 2002.

Brozoski, T.J.; Brown, R.M.; Rosvold, H.E.; Goldman, P.S. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*, 205:929-932, 1979.

Brucato, F.H.; Levin, E.D.; Rose, J.E.; Swartzwelder, H.S. Intracerebroventricular nicotine and mecamylamine alter radial-arm maze performance in rats. *Drug Development Research*, 31:18-23, 1994.

Buisson, B.; Bertrand, D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol Sci*, 23:130-136, 2002.

Carlini, E.A.; Galduroz, J.C.F.; Noto, A.R.; Nappo, S.A. I Levantamento Domiciliar sobre Uso de Drogas no Brasil - 2001. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) - Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina e Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD), Presidência da República, Gabinete de Segurança Nacional, 2001.

Carlini, E.A.; Galduroz, J.C.F.; Noto, A.R.; Fonseca, A.M.; Carlini, C.M.; de Oliveira, L.G.; Nappo, S.A.; de Moura, Y.G.; Sanchez, Z.V.D.M. II Levantamento Domiciliar sobre Uso de Drogas no Brasil - 2005. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) - Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina e Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD), Presidência da República, Gabinete de Segurança Nacional, 2005.

Champtiaux, N.; Gotti C.; Cordero-Erausquin, M.; David, D.J.; Przybylski, C et coll. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knockout mice. *J Neurosci*, 23 (21):7820-7829, 2003.

Colquhoun, L.M.; Patrick, J.W. Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Adv Pharmacol*, 39:191-220, 1997.

Condé, F.; Maire-Leproive, E.; Audinat, E.; Crépel, F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferent. *The Journal of Comparative Neurology*, 352:567-593, 1995.

Cooper, J.R.; Bloom, F.E.; Roth, R.H. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. 8. ed. Oxford University Press: New York, 1996.

Coyle, J.T, Price, D.L, DeLong, M.R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219(4589):1184-90, 1983.

Couey, J.J.; Meredith, R.M.; Spijker, S.; Poorthuis, R.B.; Smit, A.B.; Brussard, A.B.; Mansvelder, H.D. Distributed network actions by nicotine increase the threshold for spike-timing- dependent plasticity in Prefrontal Cortex. *Neuron.*, 54:73-87, 2007.

Dalley, J.W.; Cardinal, R.N.; Robbins, T. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28:771-784, 2004.

Dani, J.A.; Radcliffe, K.A.; Pidoplichko, V. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine area. *Eur J Pharmacol.*, 393:31-38, 2000.

Dani, J.A., de Biasi, M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 439-446, 2001.

Dani, J.A.; Heinemann, S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*, 16:905–908, 1996.

Dani, J.A; Harris, R.A. Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. *Nature Neuroscience*, 8:1465 – 1470, 2005.

Dart, M.J.; Wasicak, J.T.; Ryther, K.B.; Schrimpf, M.R.; Kim, K.H.; Anderson, D.J.; Sullivan, J.P.; Meyer, M.D. Structural aspects of high affinity ligands for the $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptor. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 74:115–12, 2000.

Dawson, D.A Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Dep.*, 50(3):235-249, 2000.

De Oliveira, R.W.; Nakamura-Palácios, E.M.; Haloperidol increases the disruptive effects of alcohol on spatial working memory in rats: a dopaminergic modulation in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 170:51-61, 2003.

De Paula, D.M.L.; Gasparine, B.; Nakamura-Palacios, E.M. Nicotine in the medial prefrontal cortex facilitates long-termed spatial working memory. *Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, p.155, 2004.

Decker, M. W.; Majchrzak, M. J.; Arneric, S. P. Effects of lobeline, a nicotinic receptor agonist, on learning and memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 45:571-576; 1993.

Delatour, B.; Gisquet-Verrier, P. Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory? *Behavioral Neuroscience*, 113:941-995, 1999.

Devinsky, O.; Morrell, M.J.; Vogt, B.A. Contributions of anterior cingulate cortex to behavior. *Brain*, 118:279-306.1995.

Diana, M.; Gessa, G.L.; Rossetti, Z.L.; Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of dopamine mesolimbic system. *Alcohol Alcohol.*, 4(2): 329-333, 1992.

DiFranza, J.R.; Guerrera M.P. Alcoholism and smoking. *J.Stud.Alcohol*, 51:130-5, 1990.

Dohrman, D.P.; Reiter CK. Ethanol modulates nicotine-induced upregulation of nAChRs. *Brain Research*, 975:90-98, 2003.

Dube, M., Greem, C. R. Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Advances in Tobacco.Science*, 2:42, 1982.

Duncan, J. Consistent and varied training in the theory of automatic and controlled information processing. *Cognition*, 23(3):279-84, 1986.

Dunnett, S.B.; Wareham, A.T.; Torres, E.M. Cholinergic blockade in prefrontal cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats. *Neuroreport*,1:61-4, 1990.

Edwards, G.; Marshall, E.J.; Cook, C.C.H. *O Tratamento do Alcoolismo*. Porto Alegre: Artmed 1999.

Ellingstad, T.P.; Sobell, L.C.; Sobell, M.B.; Cleland, P.A.; Agrawal, S. Alcohol abusers who want to quit smoking: Implications for clinical treatment. *Drug Alcohol Dep.*, 54:259-264, 1999.

Fadda, F.; Mosca, E.; Melori, R.; Gessa, G.L. Ethanol-stress interaction on dopamine metabolism in the medial prefrontal cortex. *Alcohol Drug Res.*, 6:449-454, 1985.

Floresco, S.T.; Seamans, J.K.; Phillips, A.G. Selective Roles for Hippocampal, Prefrontal Cortical, and Ventral Striatal Circuits in Radial-Arm Maze Tasks With or Without a Delay.*J. Neurosci.*, 17(5):1880-189, 1997.

Floresco, S.B.; Phillips, A.G. Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D1 agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behavioral Neuroscience*, 115:934-939, 2001.

Focchi, G.R.A.; Leite, M.C.; Laranjeira, R.; Andrade, A.G. Dependência Química: Novos Modelos de Tratamento. São Paulo: Roca, 2001.

Freedman, R.; Hall, M.; Adler, L.E.; Leonard, S. Evidence in postmortem brain tissue for decreased number of hippocampal nicotinic acetylcholine receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 38(1):22-33, 1995.

Fuster, J.M. Prefrontal cortex and the bridging of temporal gaps in the perception-action cycle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 608: 318-329, 1990.

Fuster, J.M. The prefrontal cortex and its relation to behavior. *Progress in Brain Research*, 87:201-211, 1991.

Fuster, J.M. Unit activity in prefrontal cortex during delayed response performance: neuronal correlates of transient memory. *J. Neurophysiol.*, 36:61-78, 1973.

Fuster, J.M. Frontal lobe and cognitive development. *Journal of Neurocytology*, 31:373-385, 2002.

Fuster, J.M. The prefrontal cortex: anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe, 3rd ed. New York: Raven Press, p. 333, 1997.

Fuster, J.M. Executive frontal functions. *Exp. Brain Res.*, 133:66-70, 2000.

Galvão, M. Envolvimento da transmissão dopaminérgica D₁ do córtex pré-frontal medial no prejuízo da memória operacional espacial produzido pelo álcool. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2005.

Gentry, C.; Wilkins, L.; Lukas, R. Effects of prolonged nicotinic ligand exposure on function of heterologously expressed human $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 4\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.*, 304:206-216, 2003.

Gevins, A.; Smith, M.E.; Mcevoy, L.K. Tracking the cognitive pharmacodynamics of psychoactive substances with combinations of behavioral and neurophysiological measures. *Neuropsychopharmacology*, 26(1):27-39, 2002.

Gibson, W.E. Effects of alcohol on radial maze performance in rats. *Physiol Behav.*, 35:1003-1005, 1985.

Goldman-Rakic, P.S. Regional and cellular fractioning of working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:13473-13480, 1996.

Goldman-Rakic, P.S.; Muly, E.C.; Williams, G.V. D1 receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Research Reviews*, 31:295-301, 2000.

Goldman-Rakic, P.S. Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14:477-485, 1995.

Gotti, C., Fornasari, D.; Clementi, F. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol.*, 53:199-237, 1997.

Gourlay, S.G.; Benowitz, N.L. Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine. *Clin Pharmacol Ther.*, 62:453-63, 1997.

Granon, S.; Poucet, B.; Thinus-Blanc, C.; Changeux, J.P.; Vidal, C. Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. *Psychopharmacology(Berl)*, 119(2):139-44, 1995.

Gray, R.; Rajan, A.S.; Radcliffe, K.A.; Yakehiro, M.; Dani, J.A. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, 383:713-6, 1996.

Greeman, M.; McClellan, T.A. Negative effects of a smoking ban in patient psychiatry service. *Hosp Community Psychiatry*, 42(4):408-12, 1991.

Green, C.R.; Rodgman, A. The tobacco chemist research conference a halfcentury forum for advances in analytical methodology of tobacco and products. *Recent Advances Tobacco Science*, 22:131, 1996.

Groenewegen, H.J.; Wright, C.I.; Uylings, H.B.M. The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J Psychopharmacol.*, 11:99-106,1997.

Halbach, O.B.; Dermietzel, R. Neurotransmitter and neuromodulators. Wiley-VCH:Weinheim,2002.

Helene, A.D., Xavier, G.F. A construção da atenção a partir da memória. *Rev Bras Psiquiatr.*, 25(Supl II):12-20, 2003.

Henningfield, J.; Keenan, R. Nicotine delivery kinetics and abuses liability. *J Consult Clin Psychol.*, 61(5):743-50,1993.

Hoaken, P.N.S.; Stewart, S.H. Drugs of abuse and the elicitation of human aggressive behavior. *Addictive behaviors*, 28:1533-1554, 2003.

Hodges, H.; Allen, Y.; Sinden, J.D.; Mitchell, S.N.; Arendt, T.; Lantos, P.L.; Gray, J.A. The effect of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol induced deficits in rats. *Behav Brain Res*, 43:7-28, 1991.

Hoffman, P.L.; Rabe, C.S.; Moses F.; Tabakoff, B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: Inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem.*, 52:1937-1940,1989.

Hughes, J.R. Treating smokers with current or past alcohol dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 24(11):1633-1638, 2000.

Hurt, R.D.; Offord, K.P.; Croghan, I.T.; Gomezdahl, L.; Kottke, T.E.; Morse, R.M.; Melton, L.J. Mortality following inpatient addictions treatment: Role of tobacco use in a community- based cohort. *J. Am. Med. Assoc.*, 275:1097-1103, 1996.

Itier, V.; Bertrand, D. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Letters*, 504:118-125, 2001.

Izquierdo, I. Memória. Porto Alegre: Artmed, 2002.

Kawai, H.; Berg, D.K. Nicotinic acetylcholine receptors containing $\alpha 7$ subunits on rat cortical neurons do not undergo long-lasting inactivation even when up-regulated by chronic exposure. *J. Neurochem.*, 78:1367-1378, 2001.

Kessler, D.A. The control and manipulation of nicotine and cigarettes. Subcommittee on Health and the Environmental Committee on Energy and Commerce. US House of Representatives. 21/06/1994.

Klink, R.; de Kerchove d'Exaerde, A.; Zoli, M.; Changeux, J.P. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci.*, 21:1452-1463, 2001.

Kolb, B.; Whishaw, I.Q. Brain plasticity and behavior. *Ann Rev Psychol.*, 49:43-64, 1998.

Kolb, B.; Whishaw, I.Q. Fundamentals of human neuropsychology, 5th ed. New York: Worth; 2003.

Koob, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci.*, 13:177-184, 1992.

Kristensen, S.E.; Thomsen, M.S.; Hansen, H.H.; Timmermann, D.B, Hay-Schmidt, A.; Mikkelsen, J.D. The $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist SSR180711 increases activity regulated cytoskeleton protein (Arc) gene expression in the prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience Letters*, 418:154-158, 2007.

Lambe, E.K.; Picciotto, M.R.; Aghajanian, G.K. Nicotine Induces Glutamate Release from Thalamocortical Terminals in Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 28: 216-225, 2003.

Laranja, L.R. Envolvimento do córtex pré-frontal medial nos efeitos de prejuízo da memória operacional e ansiolíticos do diazepam. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2003.

Laroche, S.; Davis, S.; Jay T.M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: Dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus*, 10:438-446, 2000.

Larsson, A.; Engel, J.A. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27:713-720, 2004.

Laviolette, S.R.; van der Kooy, D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behavior. *Nature Reviews Neuroscience*, 5:55-65, 2004.

Le Moal, M.; Simon, H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol. Rev.*, 71:155-234, 1991.

Lê, A.D.; Corrigall, W.A.; Watchus, J.; Juzytsch, W.; Li, T-K. Involvement of nicotine receptors in alcohol self-administration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24:155-163, 2000.

Levin, E. D.; Rose, J. E. Nicotinic and muscarinic interactions and choice accuracy in the radial-arm maze. *Brain Res. Bull*, 27:125-128, 1991.

Levin, E.D.; Bradley, N.A.; Sigurani, N. Hippocampal α_7 and $\alpha_4\beta_2$ nicotinic receptors and working memory. *Neuroscience*, 109(4):757-765, 2002.

Levin, E.D.; Briggs S.J.; Christopher N.C.; Rose J.E. Chronic nicotinic stimulation and blockade effects on working memory. *Behav. Pharmacol.*, 4:179-182, 1993.

Levin, E.D.; Damaj, M.I.; Glassco, W.; May, E.L.; Martin, B.R. Bridged nicotine, isonicotine, and norisonicotine effects on working memory performance of rats in the radial-arm maze. *Drug Development Research*, 46:107-111, 1999.

Levin, E.D.; McClernon, F.J.; Rezvani, A.H. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*, 184:523-39, 2006.

Levin, E.D.; Simon, B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl.)*, 138:217-230, 1998.

Levin, E.D.; Torry, D. Acute and chronic nicotine effects on working memory in aged rats. *Psychopharmacology*, 123:88-97, 1996.

Lindstrom, J.; Anand, R.; Peng, X.; Gerzanich, V.; Wang, F.; Li, Y. Neuronal nicotinic receptor subtypes. *Ann NY Acad Sci.*, 757:100-116, 1995.

Lovinger, D.M. 5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. *Neurochem Int.*, 35(2):125-30, 1999.

Lovinger, D.M.; White, G.; Weight, F.F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 243:1721-1724, 1989.

Lukas, R.J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In *The Nicotinic Acetylcholine Receptor: Current Views and Future Trends*. Berlin: Springer Verlag; 145-173, 1998.

Marinho, A.R. Modulação Dopaminérgica do Tipo D1 no córtex pré-frontal medial no efeito de facilitação da memória operacional produzido pela nicotina Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2005.

McGehee, D.S. Nicotine and synaptic plasticity in prefrontal cortex. *Sci. STKE* (399), pe44. [DOI: 10.1126/stke.3992007pe44], 2007.

Meyer, E.; Xiao, Y.; Kellar, K. Agonist regulation of rat $\alpha_3\beta_4$ nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in human embryonic kidney 293 cells. *MolPharmacol.*, 60:568-576, 2001.

Michaelis, E.K.; Freed, W.J.; Galton, N., Foye J, Michaelis, M.L.; Phillips, I.; Kleinman, J.E. Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. *Neurochem Res.*, 15:1055-1063,1990.

Michaelis, E.K.; Mulvaney, J.J.; Freed, W.J. Effects of acute and chronic ethanol intake on synaptosomal glutamate binding activity. *Biochem Pharmacol.*, 27:1685-1691, 1978.

Mihailescu, S.; Drucker-Colín, R. Nicotine, Brain Nicotinic Receptors, and Neuropsychiatric Disorders. *Archives of Medical Research*, 31:131-144., 2000.

Morris, N.; Jones, D.M. Memory updating in working memory: the role of the central executive. *Br J. Psychol.*, 81:112-121, 1990.

Muller, U.; von Cramon, D.Y.; Pollmann, S. D1 - versus D2 - receptor modulation of visuospatial working memory in humans. *J Neurosci.*, 18:2720-2728, 1998.

Nagy, J.; Kolok, S.; Dezso, P.; Boros, A.; Szombathelyi, Z. Differential alterations in the expression of NMDA receptor subunits following chronic ethanol treatment in primary cultures of rat cortical and hippocampal neurons. *Neurochemistry Int.*, 42:35-43, 2003.

Nakamura, E.M.; Da Silva, E.A.; Concílio, G.V.; Wilkinson, D.A.; Masur, J. Reversible effects of acute and long-term administration of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. *Drug and Alcohol Dependence*, 28:167-75, 1991.

Nakamura-Palacios, E.M.; Roelke, C.E. Effects of acute or daily administration of diazepam on spatial learning and working memory. *Drug Alcohol Depend.*, 46:181-190, 1997.

Nashmi, R.; Dickinson, M.E.; McKinney, S.; Jareb, M.; Labarca, C.; Fraser, S.E.; Lester, H.A. Assembly of $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptors assessed with functional fluorescently labeled subunits: effects of localization, trafficking, and nicotine-induced upregulation in clonal mammalian cells and in cultured midbrain neurons. *J Neurosci.*, 23:11554-11567, 2003.

Newhouse, P.A.; Potter, A.; Singh, A. Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance. *Current Opinion in Pharmacology*, 4:36-46, 2004.

Nicoll, R.A. The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels. *Science*, 241:545-551, 1988.

Norman, D.A.; Shallice, T. Attention to action: willed and automatic control of behavior. San Diego: University of California, 1980.

Oga, S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu Editora de São Paulo, 1996.

Oliveira, M.G.M.; Kireeff, W.; Hashizume, L.K.; Bueno, O.F.A.; Masur, J. Ethanol decreases choice accuracy in a radial maze delayed test. *Brazil J Med Biol Res.*, 23:547-553, 1990.

Olton, D.S. Mazes, Maps, and Memory. *American Psychologist*, 34 (7): 583-597, 1979.

Olton, D.S. The radial maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiology and Behavior*, 40 (6): 793-797, 1987.

Olton, D.S.; Samuelson, R.J. Relembrence of places passed: spatial memory in rats. *Journal of Experimental Physiology: Animal Behaviour Process*, 2: 97-116, 1976.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Tobacco Free Initiative. <http://www.who.int/tobacco/en>

Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2^a Ed. New York: Academic Press, 1986.

Peng, X.; Gerzanich, V.; Anand, R.; Whiting, P.J.; Lindstrom, J. Nicotine induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol Pharmacol*, 46:523-530, 1994.

Penland, S.; Hoplight, B.; Obernier, J.; Crews, F.T. Effects of nicotine on ethanol dependence and brain damage. *Alcohol*, 24: 45-54, 2001.

Pereira, P.A.P.; Andrade, J.B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. *Quím. Nova*, 21(6), São Paulo, 1998.

Phillips, A.G.; Ahn, S.; Floresco, S. B. Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *J Neurosci.*, 24:547-553, 2004.

Piasecki, J.; Koros, E.; Dyr, W.; Kostowski, W.; Danysz, W.; Bienkowski, P. Ethanol-reinforced behaviour in the rat: effects of uncompetitive NMDA receptor antagonist, memantine. *Eur J. Pharmacol.*, 354: 135-143, 1998.

Picciotto, M.R.; Zoli, M.; Rimondini, R.; Lena, C.; Marubio, L.M.; Pich, E.M.; Fuxe, K.; Changeux, J.P. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391:173-177, 1998.

Picciotto, M.R. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends Pharmacol. Sci.*, 24:493-499, 2003.

Pidoplichko, V.I.; De Biasi, M.; Williams, J.T.; Dani, J.A. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, 390:401-404, 1997.

Pidoplichko, V.I.; Noguchi, J.; Areola, O.O.; Liang, Y.; Peterson, J.; Zhang, T.; Dani, J.A. Nicotinic Cholinergic Synaptic Mechanisms in the Ventral Tegmental Area Contribute to Nicotine Addiction. *Learning & Memory*, 11:60-69, 2004.

Pomerleau, O.F. Neurobiological interactions of alcohol and nicotine. In: Ferting, J.B.; Allen, J.P., eds. *Alcohol and Tobacco: From Basic Science to Clinical Practice*. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Research Monograph N°30. NIH Pub.Nº, 95-3931. Washington, DC: Government Printing Office, pp145-158, 1995a.

Pomerleau, O.F.; Downey, K.K.; Stelson, F.W.; Pomerleau, C.S. Cigarette smoking in adult patients diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder. *J Subst Abuse*, 7:373-378, 1995b.

Post, R.B.; Lott, L.A.; Maddock, R.J., Beede, J.I. An effect of alcohol on the distribution of spatial attention. *Journal of studies on Alcohol*, 57: 260-266, 1996.

Poucet, B. A further characterization of the spatial problem-solving deficit induced by lesions of the medial frontal cortex in the rat. *Behavioral Brain Research*, 41:229-237, 1990.

Powledge, T.M. Nicotine as Therapy; *PLoS Biology*; 2 (11):1707-1710, 2004.

Preuss, T.M. Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert program reconsidered. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 7:1-24, 1995.

Preuss, T.M.; Kaas, J.H. Human brain evolution. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, editors. *Fundamental of neuroscience*. San Diego, CA: Academic Press; p. 1283-311, 1999.

Quick, M.W.; Lester R.A.J. Desensitization of Neuronal Nicotinic Receptors, Wiley Periodicals, Inc. *J Neurobiol.*, 53:457-478, 2002.

Repovs. G.; Baddeley, AD. The multi- componente model of working memory: Explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience*, 139:5-21, 2006.

Rezvani, A.H.; Levin, E.D. Cognitive effects of nicotine. *Biological Psychiatry*, 49:258-267, 2001.

Rezvani, A.H.; Levin, E.D. Nicotine–alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72:865-872, 2002.

Rios Valentim, S.J Jr. Modulação dopaminérgica da memória operacional espacial no córtex pré-frontal medial em ratos: envolvimento de receptores dos tipos D₁ e D₄. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2003.

Robbins, T.W. Chemical neuromodulation of fronto-executive functions in humans and other animals. *Exp Brain Res.*, 133:130-8, 2000.

Rosemberg, J.; Rosemberg, A.M.A., Moraes, M.A. Nicotina: droga universal. São Paulo: Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiologia, 2003.

Rossetti, Z.L.; Carboni, S.; Stancampiano, R.; Sori, P.; Pepeu, G.; Fadda, F. Bidirectional modulation of spatial working memory by ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.*, 26(2):181-5, 2002.

Samuels, S.C.; Davis, K.L. Experimental approaches to cognitive disturbance in Alzheimer's Disease. *Harv Rev Psychiatry*, 6:11-22, 1998.

Sarter, M.; Markowitsch, H.J. Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. *J Comp Neurol.*, 224:445-60, 1984.

Sarter, M.; Markowitsch, H.J. Convergence of basolateral amygdaloid and mediodorsal thalamic projections in different areas of the frontal cortex in the rat. *Brain Res Bull*, 10:607-22, 1983.

Sawaguchi, T.; Goldman-Rakic, P. S. The role of D1-dopamine receptor in working memory: Local injections of dopamine antagonists into the prefrontal

cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. *Journal of Neurophysiology*, 71:515-528, 1994.

Sawaguchi, T.; Goldman-Rakic, P.S. D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science*, 251:947-950, 1991.

Sayette, M.A. Effects of alcohol on self- appraisal. *International Journal of the Addictions*, 29:127-133, 1994.

Schmidt, L.G.; Smolka, M. Relapse prevention in alcoholics by cigarette smoking? Involvement of nicotinic-dopaminergic mechanisms. *Alcohol*, 24:111-115, 2001.

Schultz, W.; Apicella, P.; Ljungberg, T. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci.*, 13:900-913, 1993.

Seamans, J.K. Working memory in the prefrontal cortex and its modulation by dopamine. In: Otani, S.(Ed.), *Prefrontal Cortex: From Plasticity to Cognition*. Kluwer, MA, 2004.

Seamans, J.K.; Yang, C.R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology*, 74:1-57, 2004.

Seamans, J.K.; Floresco, S.B.; Phillips, A.G. D1 receptor modulation of hippocampal–prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *J Neurosci*, 18:1613-1621, 1998.

Sesack, S.R.; Deutch, A.Y.; Roth, R.H.; Bunney, B.S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol.*, 290:213-42, 1989.

Shah, P.; Miyake, A. Models of working memory. An introduction. In: *Models of Working Memory. Mechanisms of Active Maintenance and Executive Control*.

Miyaki, A.; Shah, P. (Eds). New York, U.S.A.: Cambridge University Press, pp. 1-27, 1999.

Shallice, T. From neuropsychology to mental structure. Cambridge: Cambridge University Press; 1988.

Shallice, T. Specific impairments of planning. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 25;298(1089):199-209, 1982.

Shallice, T.; Burgess, P. Deficits in strategy application following frontal lobe damage in man. *Brain*, 114:727-41, 1991.

Shallice, T.; Burgess, P. Supervisory control of action and thought selection. In: Baddeley A, Weiskrantz L, editors. Attention: selection, awareness and control. Oxford: Clarendon Press; p. 171-87, 1993.

Silva de Melo, L.C.; Cruz, A.P.; Rios Valentim, S.J Jr.; Marinho, A.R.; Mendonça, J.B.; Nakamura-Palacios, E.M. Delta(9)-THC administered into the medial prefrontal cortex disrupts the spatial working memory. *Psychopharmacology (Berl)*, 183(1):54-64, 2005.

Silva, P. Farmacologia. 6ªed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2002.

Simon, H.; Scatton, B.; Le Moal, M. Dopaminergic A₁₀ neurones are involved in cognitive functions. *Nature*, 286:150-151, 1980.

Soderpalm, B.; Ericson, M.; Olausson, P.; Blomqvist, O.; Engel, J.A. Nicotine mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behavioural Brain Research*, 113: 85-96, 2000.

Steketee, J.D. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain Research Reviews*, 41:203-228, 2003.

Strijkstra, A.M.; Bolhuis, J.J. Memory persistence of rats in a radial maze varies with training procedure. *Behav Neural Biol.*, 47(2):158-66, 1987.

Tabakoff, B.; Hellevuo, K.; Hoffman, P.L. Alcohol. *In: Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin (Germany), 29:373-458, 1995.

Tiplady, B.; Harding, C.; McLean, D., Ortner, C., Porter, K., Wright, P. Effects of ethanol and temazepam on episodic and semantic memory: A dose-response comparison. *Human Psychopharmacology*, 14: 263-269, 1999.

Tracy, H.A.; Wayner, M.J.; Armstrong, D.L. Nicotine blocks ethanol and diazepam impairment of air righting and ethanol impairment of maze performance. *Alcohol*, 18:123-30, 1999.

Tzambazis, K.; Stough, C. Alcohol impairs speed of information processing and simple and choice reaction time and differentially impairs higher-order cognitive abilities. *Alcohol and alcoholism*, 35:197-201, 2000.

Uylings, H.B.M.; Groenewegen, H.J.; Kolb, B. Do rats have prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 146:3-17, 2003.

Uylings, H.B.M.; Van Eden, C.G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Progress in brain research*, vol. 85. Amsterdam: Elsevier; p. 31-62, 1990.

Vallejo, Y.F.; Buisson, B.; Bertrand, D.; Green, W.N. Chronic Nicotine Exposure Upregulates Nicotinic Receptors by a Novel Mechanism. *J. Neurosci.*, 25(23):5563-5572, 2005.

Valverius, P.; Crabbe, J.C.; Hoffman, P.L.; Tabakoff, B. NMDA receptors in mice bred to be prone or resistant to ethanol withdrawal seizures. *Eur J Pharmacol.*, 184:185-189, 1990.

Wang, X.J. Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. *Trends Neurosci.*, 24:455-463, 2001.

Warburton, D.M.; Rusted, J.M. Cholinergic control of cognitive resources. *Neuropsychobiology*, 28:43-46, 1993.

Watanabe, M.; Kodama, T.; Hikosaka, K. Increase of extracellular dopamine in primate prefrontal cortex during a working memory task. *J Neurophysiol*, 78:2795-2798, 1997.

Webster, R.A. Neurotransmitters, drugs and brain function. John Wiley & Sons: Chichester, 2001.

Weiss, F.; Porrino, L. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. *J Neurosci.*, 22:3332-3337, 2002.

Williams, G.V.; Goldman-Rakic, P.S. Modulation of memory fields by dopamine D₁ receptors in prefrontal cortex. *Nature*, 376(6541):572-5, 1995.

Winocur, G. A comparison of normal old rats and young adult rats with lesions to the hippocampus or prefrontal cortex on a test of matching-to-sample. *Neuropsychologia*, 30: 769-781, 1992.

Wise, R.A. Drug-activation of brain reward pathways. *Drug and Alcohol Dependence*, 51:13-22, 1998.

Wonnacott, S. Presynaptic nicotinic Ach receptors. *Trends Neurosci.*, 20:92-98, 1997.

Wonnacott, S.; Sidhpura, N.; Balfour, D.J. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:53-59, 2005.

Woodward, J.J. Ethanol and NMDA receptor signaling. *Critical Reviews in Neurobiology*, 14(1):69-89, 2000.

Woodward, J.J.; Gonzales, R.A. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated endogenous dopamine release from rat striatal slices: Reversal by glycine. *J Neurochem.*, 54:712-715, 1990.

Wooltorton, J.R.A.; Pidoplichko, V.I.; Broide R.S.; Dani, J.A. Differential Desensitization and Distribution of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Midbrain Dopamine Areas. *J. Neurosci.*, 23(8):3176-3185, 2003.

Yu, D.; Zhang, L.; Eisele, J.L.; Bertrand, D.; Changeux, J.P.; Weight, F.F. Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type $\alpha 7$ receptors involves the amino-terminal domain of the receptor. *Mol Pharmacol.*, 50:1010-1016, 1996.

Zahrt, J.; Taylor, J.R.; Matthew, R.G.; Arnsten, A.F.T. Supranormal stimulation of D₁ dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs working memory performance. *J Neurosci.*, 17:8528-35, 1997.

Zaleski, M.; Morato, G.S.; Silva, V.A.; Lemos, T. Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do Álcool. *Rev Bras Psiquiatr.*, 26 (Supl I):40-42, 2004.

Zhang, X.L.; Begleiter, H.; Porjesz, B.; Litke, A. Electrophysiological evidence of memory impairment in alcoholic patients. *Biol Psychiatry*, 15; 42(12):1157-71, 1997.

Zilles, K.; Wree, A. Cortex: Areal and laminar structure. In Paxinos, G (ed.). The rat nervous system. Forebrain and midbrain. Academic Press, Inc. San Diego, California: Academic Press, Inc., 374-415, 1985.