

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO BIOMÉDICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**Saavedra José Rios Valentim Júnior**

**Modulação Dopaminérgica e Glutamatérgica da Memória  
Operacional Espacial no Córtex Pré-Frontal Medial em  
Ratos**

**Vitória  
2008**

**SAAVEDRA JOSÉ RIOS VALENTIM JÚNIOR**

**Modulação Dopaminérgica e Glutamatérgica da Memória  
Operacional Espacial no Córtex Pré-Frontal Medial em Ratos**

**Orientadora:** Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Ester Miyuki Nakamura Palacios

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

Orientadora: Prof. <sup>a</sup> Ester Miyuki Nakamura-Palacios.

**Vitória  
2008**

Valentim Jr., Saavedra José Rios

Modulação Dopaminérgica e Glutamatérgica da Memória Operacional Espacial no Córtex Pré-Frontal Medial em Ratos

Saavedra José Rios Valentim Júnior - Vitória, 2008. 171 p.

Tese, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ester Miyuki Nakamura Palacios.

1. Sistema Dopaminérgico; 2. Sistema Glutamatérgico 3. Córtex Pré-Frontal Medial; 4. Memória Operacional; 5. Labirinto Radial; 6. SKF38393; 7. SCH23390; 8. Clozapina;

# **Modulação Dopaminérgica e Glutamatérgica da Memória Operacional Espacial no Córtex Pré-Frontal Medial em Ratos**

**Saavedra José Rios Valentim Júnior**

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

Aprovada em 27 de Junho de 2008:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Martí Barros- UFRS-RS

---

Prof. Dr. Cláudio da Cunha-UFPR-PR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Livia Carla Silva de Melo Rodrigues-Novo Milênio-ES

---

Prof. Dr. Hélder Mauad-UFES-ES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ester Miyuki Nakamura Palacios  
Orientadora,UFES

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenbeg  
Coordenador do PPGCF-CBM-UFES

## **Aprendizagens e Memórias**

A caminhada foi longa. Começou em 1996, quando passei em ciências biológicas na UFES, curso que sempre sonhei em fazer. Naquela época, ainda garoto, não sabia direito o rumo que minha vida iria tomar. Gostava de tudo: zoologia, botânica, ecologia, evolução... mas sempre tive um carinho especial por neurociências, muito embora eu não tinha consciência disto na ocasião. Sempre que via um documentário a respeito ou mesmo lia nas disciplinas cursadas alguma coisa sobre neuro (permita-me assim apelidar as neurociências) ficava completamente vidrado. Entretanto, as possibilidades que meu curso oferecia eram muito grandes e, por isso pensei em seguir muitos caminhos. Porém, de uma forma ou de outra, a neuro sempre estava rondando minha cabeça.

Por volta de 1998, comecei a fazer iniciação científica no departamento de ciências fisiológicas, porém na área de bioquímica cardiovascular. Gostei muito de trabalhar com a prolilendopeptidase (carinhosamente chamada de PEP), mas ainda não era o que realmente queria fazer. As vésperas de tentar a prova para o mestrado (em 2001), me decidi: vou estudar neuro... mais com quem? Procurei me informar sobre os laboratórios relacionados e, quando li sobre a linha de pesquisa da professora Ester, não tive mais dúvida. Era aquilo que eu queria: entender o funcionamento do córtex pré-frontal.

A Ester não só me abriu as portas de seu laboratório, mas também me ajudou a trilhar esta longa jornada. Ela me deu um presente (talvez sem saber), que foi o projeto sobre dopamina, assunto pelo qual sou apaixonado. Além disso, ela me ajudou a entender melhor a ciência e a agir com prudência e ideologia, coisas raras nos dias atuais no meio científico. Por isso tudo Ester, meu muito obrigado por toda a paciência, acolhimento e dedicação.

Nakamura-Palacios e colaboradores (2001-2008) me ajudaram muito nesta jornada. Colaboradores, dos quais não posso me esquecer de agradecer. Por isso, a todos os colegas de laboratório um muito obrigado. Em especial a Lívia, a Josidéia, a Simone Bazarella, Simone Domingues, Aline, Paula, Mariana e a Lilia, que foram grandes amigas e me deram muita força ao longo desta caminhada. Podem ter certeza, vocês participaram ativamente de toda minha formação e sem vocês ela seria mais difícil e sem graça.

Agradeço aos meus pais e minha irmã, por todo o suporte, dedicação, amor e carinho. Sempre tão preocupados com a minha formação e presentes em todos os

momentos. Não teria conseguido sem vocês, que foram e sempre serão o pilar da minha vida.

Agradeço também a Verônica, meu amor e minha companheira de todos os momentos. Nosso relacionamento veio para preencher um espaço que faltava em minha vida e isto, sem dúvidas, me deu um suporte inestimável nesta reta final de minha jornada. Muito obrigado por tudo.

Durante toda esta jornada mudei e amadureci profissionalmente e pessoalmente. Lembro-me do menino que começou, ainda na infância, a brincar de ciência e que hoje, como um sonho realizado, faz desta brincadeira sua profissão. Seja em sala de aula, ensinando e contribuindo para uma futura geração, seja no laboratório fazendo experimentos. Portanto, chego ao final deste doutorado com a certeza da missão cumprida, vislumbrando a longa caminhada que ainda tenho pela frente em busca de todos os meus sonhos. As próximas conquistas que pretendo realizar serão alcançadas com as muitas experiências profissionais e pessoais que terei daqui em diante, que virão ao longo dos anos de muita dedicação ao ensino e a ciência. Sem dúvida, a maior conquista de todas será, no futuro, olhar para trás e ver uma bela biografia escrita com muito trabalho e paixão pela minha profissão.

*“...Hoje me sinto mais forte,  
mais feliz quem sabe eu só levo a certeza  
de que muito pouco eu sei, eu nada sei... Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
compreender a marcha e ir tocando em frente...é preciso amor para poder pulsar, é  
preciso paz para poder sorrir, é preciso chuva para florir... Cada um de nós compõe a  
sua história,  
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,  
de ser feliz!”*

*Almir Satter.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01-</b> Divisões anatômicas do córtex pré-frontal medial em ratos (painel da esquerda) e em humanos.....	31
<b>Figura 02-</b> Estrutura do receptor NMDA e seu funcionamento .....	41
<b>Figura 03-</b> Vias dopaminérgicas em humanos e no rato .....	50
<b>Figura 04-</b> Ilustração da estrutura dos receptores dopaminérgicos .....	53
<b>Figura 05</b> - Curva em U invertido proposta para a ação dos receptores D <sub>1</sub> , localizados no córtex pré-frontal .....	58
<b>Figura 06-</b> Ilustração da estrutura e mecanismos envolvidos na modulação dopaminérgica do sistema glutamatérgico no córtex pré-frontal.....	61
<b>Figura 07-</b> Fotografias dos animais nas gaiolas.....	66
<b>Figura 08</b> – Fotografia do labirinto radial de 8-braços .....	69
<b>Figura 09</b> – Fotografia de um rato no labirinto radial de 8-braços durante o treinamento na fase II .....	71
<b>Figura 10-</b> Fotografia mostrando a cânula bilateral, o protetor interno e externo.....	72
<b>Figura 11</b> – Cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas bilaterais no CPFm .....	73
<b>Figura 12</b> – Fotografias mostrando os procedimentos para Infusão de drogas diretamente no córtex pré-frontal medial (CPFm) .....	75
<b>Figura 13</b> – Esquema demonstrando os procedimentos na fase III do treinamento, no experimento e nas sessões interdroga .....	76
<b>Figura 14</b> – Diagramas de cortes histológicos marcados com o posicionamento das cânulas bilaterais .....	82
<b>Figura 15</b> – Média de erros nas dez últimas sessões de treinamento dos animais na fase II (n = 30) .....	83

<b>Figura 16</b> – Média de erros na fase III do treinamento dos animais. No painel da esquerda é visto o pré-retardo. No painel da direita, está ilustrado o pós-retardo de 5 s (n = 30) .....	85
....	
<b>Figura 17</b> - Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK 0,32; 1,0; 3,2 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros.....	90
<b>Figura 18</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de SKF 38393 (SKF 0,56; 1,8; 5,6 µg) seguidos de sal no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros. No painel da esquerda, é visto o desempenho no pré-retardo.....	91
<b>Figura 19</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou de SKF 38393 (SKF) na dose de 0,56 µg, seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK) (0,32; 1,0; 3,2 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o total de erros. No painel da esquerda, é visto o desempenho no pré-retardo .....	92
<b>Figura 20</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou de SKF 38393 (SKF) na dose de 1,8 µg, seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK) (0,32; 1,0; 3,2 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros .....	93
<b>Figura 21</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou de SKF 38393 (SKF) na dose de 5,6 µg, seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK) (0,32; 1,0; 3,2 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros .....	94
<b>Figura 22</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK) seguido de sal e, ainda, os tratamentos com sal ou as diferentes doses de SKF 38393 (SKF) seguido de sal, no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2 ± e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços. ruído basal) .....	95
<b>Figura 23</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK) seguido de sal ou de SKF 38393 (SKF) 0,56 (A), ou 1,0 (B) ou 5,6 (C) µg, no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2 ± e.p.m) no	



pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços.....	96
<b>Figura 24</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de SKF 38393 (SKF), seguido de sal ou das doses de MK-801 (MK) 1,0 ou 3,2 µg no desempenho de animais, considerando apenas os erros do tipo 1 (Média de erros tipo 1 ± e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços.....	98
<b>Figura 25</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de SKF 38393 (SKF), seguido de sal ou das diferentes doses MK-801 (MK) no desempenho de animais, considerando apenas os erros tipo 2 (Média de erros ± e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços.....	99
<b>Figura 26</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou SCH 23390 (SCH) na dose de 1,0 µg, seguido das diferentes doses de SKF 38393 (SKF) (sal, 0,56 ou 1,8 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m), submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros. No gráfico superior, é visto o pré-retardo e, no inferior, o pós-retardo.....	101
<b>Figura 27</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou de SCH 23390 (SCH) seguido de sal ou das diferentes doses de SKF 38393 (SKF), no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2 ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h.....	102
<b>Figura 28</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou SCH 23390 (SCH) na dose de 1,0 µg, seguido das diferentes doses de SKF 38393 (SKF) no desempenho do pós-retardo de 1 h (Média de erros tipos 1 ou 2 ± e.p.m) no labirinto radial de oito braços.....	103
<b>Figura 29</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl seguido de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK).....	106
<b>Figura 30</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl ou das diferentes doses de clozapina (CZP) seguida de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK), no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) no pré-retardo (painéis da esquerda) e pós-retardo de 1 h (painéis da direita) no labirinto radial de oito braços.....	107
<b>Figura 31</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl seguido de salina (sal) ou MK-801 (MK) em diferentes doses ( <b>A</b> ) e HCl ou clozapina (CZP) em diferentes doses seguido de sal ( <b>B</b> ) no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2 ± e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços.....	108

<b>Figura 32</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl ou das diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK), no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2 $\pm$ e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços.....	109
<b>Figura 33</b> – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl ou diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de salina (sal) ou MK-801 (MK) 1,0 $\mu$ g ( <b>A</b> ) ou de HCl ou CZP 0,32 $\mu$ g seguido de sal ou diferentes doses de MK ( <b>B</b> ), no desempenho de animais em relação aos erros tipo 1 (Média de erros $\pm$ e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços.....	110
<b>Figura 34-</b> Ilustração e características do modelo proposto por Seamans e Yang (2004)....	140
<b>Figura 35-</b> Ilustração do controle do estado funcional do CPF por diversas regiões do SNC, envolvendo o sistema mesocortical.....	141

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Agonistas e antagonistas de receptores NMDA .....	44
<b>Tabela 02</b> – Antagonistas dopaminérgicos: constante de dissociação para os receptores da família D <sub>1</sub> e D <sub>2</sub> .....	54
<b>Tabela 03</b> – Agonistas dopaminérgicos: constante de dissociação para os receptores da família D <sub>1</sub> e D <sub>2</sub> .....	55
<b>Tabela 04</b> – Média ± e.p.m. do tempo gasto em cada braço visitado, nas 10 últimas sessões da fase II de treinamento no labirinto radial de 8 braços (n = 30) .....	84
<b>Tabela 05</b> – Média ± e.p.m. do tempo gasto em cada braço visitado, no pré- e pós-retardo de 5 s, nas 6 últimas sessões da fase III do treinamento no labirinto radial de 8 braços.....	86
<b>Tabela 06</b> – Média ± e.p.m. do peso corporal dos animais nas dez primeiras semanas (n = 30).....	87
<b>Tabela 07</b> – Média ± e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no desempenho do pré-retardo no labirinto radial de 8 braços sob as diferentes combinações de salina (sal) ou das doses de SKF38393 (SKF) seguido de sal ou das diversas doses de MK-801 (MK).....	88
<b>Tabela 08</b> – Média ± e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no desempenho do pós-retardo de 1 h no labirinto radial de 8 braços sob as diferentes combinações de salina (sal) ou das doses de SKF38393 (SKF) seguido de sal ou das diversas doses de MK-801 (MK).....	88
<b>Tabela 09</b> – Média ± e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no desempenho do pré-retardo no labirinto radial de 8 braços sob as diferentes combinações de salina (sal) ou da dose de 1,0 µg de SCH 23390 (SCH) seguido de sal ou das doses de 0,56 e 1,8 µg de SKF38393 (SKF).....	100
<b>Tabela 10</b> – Média ± e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no desempenho do pós-retardo de 1 h no labirinto radial de 8 braços sob as diferentes combinações de salina (sal) ou 1,0 µg SCH 23390 (SCH) seguido de sal ou das doses de 0,56 e 1,8 µg de SKF38393 (SKF).....	100
<b>Tabela 11</b> – Média ± e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no	

labirinto radial de 8 braços do pré-retardo das diferentes combinações de salina (sal) ou das diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801  
(MK)..... 104

**Tabela 12** – Média  $\pm$  e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no labirinto radial de 8 braços do pós-retardo das diferentes combinações de salina (sal) ou das diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801  
(MK)..... 104

### Lista de Abreviaturas

AMPA                      ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilsoxazole-4-propiónico

ATV	área tegmentar ventral
CaMKII	cálcio calmodulina cinase II
CPF	córtex pré-frontal
CPFm	córtex pré-frontal medial
CZP	clozapina
DA	dopamina
DARRP-32	proteína relacionada ao receptor dopaminérgico
DOPA	dihidroxifenilalanina
e.p.m.	erro-padrão da média
GABA	ácido gama-aminobutírico
GLU	glutamato
IC	intracortical
MD	núcleo médio dorsal do tálamo
MK	MK-801
MO	memória operacional
mRGLU	receptor metabotrópico glutamatérgico
NAC	núcleo accumbens
NMDA	ácido N-Metil-D-Aspártico
PCP	fenciclidina
PP-1	proteína fosfatase 1
sal	salina
SCH	SCH23390
SKF	SKF38393
SNC	sistema nervoso central
TH	tirosina hidroxilase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
----------------------------	-----------

1.1 Memória Operacional.....	22
1.1.1 Testes e modelos experamentais da avaliação das Função executivas e/ou a memória operacional.....	23
1.1.2 Substratos neurais da memória operacional.....	24
1.1.3. Memória operacional e outros tipos de memória .....	26
1.2. O Córtex Pré-frontal .....	27
1.2.1. Estrutura do Córtex Pré-frontal.....	28
1.2.2. Conexões do Córtex Pré-frontal.....	29
1.2.3. Lesões frontais.....	31
1.2.4. Funções do Córtex Pré-frontal.....	32
1.2.5. Aspectos fisiológicos do Córtex Pré-frontal envolvidos na memória operacional.....	35
1.2.6. Neurotransmissão no córtex Pré-frontal.....	37
1.3. Sistema Glutamatérgico .....	38
1.3.1. Receptores glutamatérgicos.....	39
1.3.1.1. Receptores não-NMDA .....	39
1.3.1.2. Receptores NMDA.....	40
1.3.1.3 O funcionamento dos receptores NMDA.....	41
1.3.1.4. Farmacologia dos receptores NMDA.....	43
1.3.1.5. Aspectos fisiológicos dos receptores NMDA no sistema nervoso central.....	45
1.3.1.6. Aspectos fisiológicos do glutamato e dos receptores NMDA na memória operacional.....	46
1.4. Sistema dopaminérgico.....	47
1.4.1. Vias dopaminérgicas.....	48
1.4.1.1. Sistema mesocortical.....	49
1.4.2. Receptores dopaminérgicos.....	51
1.4.2.1. Farmacologia dos receptores dopaminérgicos.....	53
1.4.2.2. Distribuição dos receptores dopaminérgicos no sistema nervoso central.....	55
1.4.2.3. Distribuição dos receptores dopaminérgicos no córtex pré-frontal	56
1.4.3. O sistema mesocortical e a memória operacional.....	56

1.4.4. Interação dopaminérgica e glutamatérgica no Córtex Pré-frontal.....	59
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
2.1 Objetivo Geral .....	64
2.2 Objetivos Específicos .....	64
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
3.1 Animais .....	66
3.2 Drogas .....	67
3.3 Labirinto Radial de 8-Braços .....	67
3.4. O ambiente de treinamento.....	68
3.5. Aquisição da Tarefa .....	68
3.6. Cirurgia Estereotáxica .....	72
3.7. Administração Intracortical da Droga .....	74
3.8. Experimento I - efeitos da interação do SKF38393 (agonista parcial D <sub>1</sub> seletivo) e do MK-801 (antagonista não-competitivo de receptor NMDA) infundidos bilateralmente no CPFm sobre a memória operacional espacial de ratos. ....	77
3.9. Experimento II: efeitos da interação do SCH23390 (antagonista D <sub>1</sub> seletivo) e do SKF38393 (agonista parcial D <sub>1</sub> seletivo) infundidos bilateralmente no CPFm sobre a memória operacional espacial de ratos .....	77
3.10. Experimento III: efeitos da interação de clozapina (antagonista D <sub>4</sub> ) e do MK-801 (antagonista não-competitivo de receptor NMDA) infundidos bilateralmente no CPFm sobre a memória operacional espacial de ratos.....	77
3.11 Avaliação da Memória Operacional Espacial .....	78
3.12. Histologia .....	78
3.13. Análise dos Resultados .....	78
3.13.1. Aquisição da tarefa.....	78
3.13.1. Experimentos I, II e III.....	79
<b>4.0 RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
4.1 Localização das Cânulas .....	82
4.2 Aquisição da Tarefa.....	83
4.2.1 Antes da introdução do retardo de 5 segundos (Fase II) .....	83
4.2.2 Ap[os da introdução do retardo de 5 segundos (Fase III) .....	85
4.3. Análise dos pesos corporais.....	87
4.4. Experimentos I:SKF383993 e MK-801.....	87

4.4.1. Tempo de permanência no labirinto radial por braços visitados.....	87
4.4.2. Total de erros no pré- e pós-retardo.....	89
4.4.2.1. MK-801.....	89
4.4.2.2. SKF383993.....	90
4.4.2.3. Combinações de SKF38393 (SKF) 0,56 µg e diferentes doses de MK-801 (MK).....	91
4.4.2.4. SKF38393 (SKF) 1,8 µg e diferentes doses de MK-801 (MK) .....	92
4.4.2.5. SKF38393 (SKF) 5,6 µg e diferentes doses de MK-801 (MK)	93
4.4.3. Erros do tipo 1 e 2 no Pós-retardo de 1 h nos tratamentos combinados de SKF38393 (SKF) e MK-801 (MK).....	94
4.4.3.1. Comparação entre os tipos de erros .....	95
4.4.3.2. Erros do tipo 1 no Pós-retardo de 1 h nas combinações das diferentes doses de SKF38393 (SKF) e as diversas doses de MK-801 (MK).....	97
4.4.3.3. Erros do tipo 2 no Pós-retardo de 1 h nas combinações das diferentes doses de SKF38393 (SKF) e as diversas doses de MK-801 (MK).....	99
4.5. Experimento 2: SCH 23390 e SKF 38393.....	100
4.5.1. Tempo de permanência no labirinto radial por braço visitado.....	100
4.5.2. Total de erros no pré-retardo e pós-retardo nas combinações de SCH23390 (SCH) e SKF38393 (SKF).....	101
4.5.3. Erros do tipo 1 e 2 no Pós-retardo de 1 h nas combinações de SCH23390 (SCH) e SKF38393 (SKF).....	102
4.6. Experimento 3: Clozapina e MK-801.....	104
4.6.1. Tempo de permanência no labirinto radial por braço visitado.....	104
4.6.2. Total de erros no pré-retardo e pós-retardo de 1 h.....	105
4.6.3) Erros do tipo 1 e 2 no pós-retardo de 1 h nas combinações de clozapina (CZP) e MK-801 (MK) .....	108
<b>5.0. DISCUSSÃO .....</b>	<b>111</b>
5.1 Drogas e dosagens.....	112
5.2 Labirinto radial de 8 braços.....	113
5.3 Treinamento dos animais.....	116
5.4. A infusão de drogas e o teste no labirinto radial.....	116



5.5. Discussão das curvas dose respostas.....	117
5.5.1. Tempo de permanência no labirinto.....	117
5.5.2. Análise dos efeitos do MK sobre a MO.....	117
5.5.2.1. Aspectos funcionais dos receptores NMDA no CPF.....	119
5.5.3. Análise do efeito do SKF sobre a MO.....	121
5.5.3.1. Aspectos funcionais dos receptores D <sub>1</sub> no CPF.....	122
5.5.4. Reversão dos Prejuízos do SKF pelo SCH.....	123
5.5.5. Efeitos das Interações entre SKF e MK .....	124
5.5.5.1. Aspectos funcionais da interação dos receptores D <sub>1</sub> e NMDA.....	125
5.5.6. Efeitos da CZP na MO.....	126
5.5.6.1. Aspectos funcionais da ação da CZP no CPF.....	127
5.5.7. Efeitos da Interação de CZP e de MK na MO.....	128
5.5.7.1. Aspectos funcionais da modulação dos receptores NMDA pela CZP.....	129
5.6. Papel do sistema mesocorticolímbico nas funções do CPF: novas perspectivas e abordagens.....	130
5.6.1. Circuitaria neuronal do CPF relacionada às interações dopaminérgicas e glutamatérgicas no controle das funções pré-frontais.....	130
5.6.2. Aspectos funcionais da via mesocortical durante a execução de tarefas.....	132
5.6.3. Manutenção da informação “on line”: novas diretrizes.....	133
5.6.4. Papel da interação funcional dos receptores dopaminérgicos e NMDA na facilitação e LTP dos circuitos locais do CPF.....	135
5.6.5. A informação codificada pelo sistema mesocortical.....	137
5.6.6. Aplicação das novas diretrizes da MO e a execução de testes com retardos....	142
5.7) Relevância dos Resultados Obtidos.....	143
5.7.1. Relevâncias Clínicas.....	144
5.7.2) Relevância na integração de diversos outros estudos.....	146
5.7.3) Relevância do padrão em U da função do CPF.....	148
<b>6.0. Conclusão.....</b>	<b>150</b>
<b>7.0. Referências.....</b>	<b>152</b>

## 1) Resumo

O cortex pré-frontal (CPF) é considerado o sítio anatômico da memória operacional (MO), sendo sua região medial (CPFm) parte importante nesse processo. A via dopaminérgica mesocortical modula esta função cortical, pois sua alteração funcional interfere no desempenho de animais em testes cognitivos que avaliam esse tipo de memória. Esta ação parece se relacionar com uma interação da dopamina com

o sistema glutamatérgico local. Este estudo investigou o efeito agudo de diferentes combinações intracorticais de agonistas e antagonistas dopaminérgicos com um antagonista não-competitivo de receptores NMDA (MK-801), em ratos testados no labirinto radial de 8 braços, com retardos de 1 h. Ratos Wistar machos, previamente treinados no labirinto radial, tiveram cânulas implantadas bilateralmente no CPFm (B: + 2,5mm AP; +/- 1 mm L; - 2,7 mm V). Eles receberam administrações intracorticais de um agonista D<sub>1</sub> seletivo, o SKF38393 [SKF: 0 (SAL); 0,56; 1,8; 5,6 µg] ou um antagonista D<sub>2</sub>/D<sub>4</sub>, a Clozapina [CZP: 0 (HCl 0,05N); 0,32; 1,0; 3,2 µg], 10 min. antes da infusão de MK-801 [MK: 0 (sal); 0,32; 1,0 ou 3,2µg]. Passados 5 min da segunda administração, os animais foram testados no labirinto radial, com retardos de 1 h. Também foram investigados os efeitos da prévia administração de um antagonista D<sub>1</sub> seletivo, o SCH23390 [SCH: 0 (SAL) ou 1,0 µg] sobre os efeitos do SKF [0 (sal); 0,56 ou 1,8 µg]. O SKF, agonista D<sub>1</sub> seletivo, produziu aumento do número de erros estatisticamente significantes (P < 0,01) nas menores doses empregadas (0,56 e 1,8 µg), no desempenho do pós-retardo. Os erros associados à repetição de braços visitados no pré-retardo foram mais numerosos (P <0,01), sugerindo que a ativação aguda de D<sub>1</sub>, no CPFm, prejudica a MO de longa duração. O uso prévio de SCH na dose de 1,0 µg reverteu o prejuízo das doses de 0,56 e 1,8 µg de SKF (P < 0,01), reforçando que os prejuízos observados com o SKF se devem a sua ação com agonista especificamente em receptores D<sub>1</sub>. O MK prejudicou o desempenho dos animais somente na dose de 1,0 µg (P < 0,05). Novamente, Os erros associados à repetição de braços visitados no pré-retardo foram mais numerosos (P <0,01), sugerindo que o bloqueio de receptores NMDA prejudica a MO de longa duração em um padrão em U invertido. O uso de MK nas doses de 0,32 (P < 0,05) e 1,0 µg (P < 0,01) reverteu o prejuízo da dose de 0,56 µg de SKF. Porém, somente a dose de 1,0 µg de MK conseguiu reverter os prejuízos do SKF na dose de 1,8 µg. Além disso, a combinação de SKF 5,6 µg seguido de MK 1,0 µg prejudicaram o desempenho dos animais em relação ao controle. Estes dados sugerem que os efeitos de prejuízos na MO de longa duração promovidos pela estimulação D<sub>1</sub> se relaciona com o aumento funcional dos receptores NMDA. O antipsicótico atípico, a CZP, que atua principalmente em receptores D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub>, não produziu alterações no desempenho dos animais. Por outro lado, sua interação na dose de 1,0 com 3,2 µg de MK prejudicou a MO dos animais (P < 0,05). Mais uma vez, Os erros associados à repetição de braços visitados no pré-retardo foram mais numerosos (P <0,01). Estes dados sugerem que a inibição concomitante dos receptores da família D<sub>2</sub> e NMDA no CPFm pode prejudicar a MO de longa duração. Estes resultados sugerem que o sistema dopaminérgico mesocortical modula a MO espacial de longa duração, especialmente através de receptores D<sub>1</sub> presentes no CPFm de ratos. Este efeito está diretamente relacionado com a modulação de receptores NMDA que possivelmente também sofre modulação de D<sub>2</sub>/D<sub>4</sub> nesta mesma área cortical.

## 2) Abstract

The prefrontal cortex (PFC) is thought to be the anatomical site for working memory. Its medial region (mPFC) receives massive dopaminergic projections from ventral tegmental area through the mesocortical dopaminergic pathway. Dopaminergic activity is highly related to working memory function and the modulation of N-methyl-D-

aspartate (NMDA) receptors seem to be critical in these processes. Therefore, this study investigated the involvement of dopamine D<sub>1</sub> receptors and its interaction with NMDA receptors in the medial prefrontal cortex (mPFC) on spatial working memory. Male Wistar rats with bilateral cannulae implanted in the mPFC (B: + 2,5 mm AP; +/- 1 mm L; - 2,7 mm V) were trained in the radial maze procedure and received intracortical administrations of the D<sub>1</sub> selective agonist, SKF38393 [SKF: 0 (SAL); 0,56; 1,8; 5,6 µg], or D<sub>2</sub>/D<sub>4</sub> antagonist, clozapine [0 (HCl 0,05N); 0,32; 1,0; 3,2 µg], 10 min before the administration of MK-801 [MK: 0 (sal); 0,32; 1,0 or 3,2 µg]. After 5 min, animals were tested in 1-h delayed tasks in the radial maze. The effect of the administration of the D<sub>1</sub> selective antagonist, SCH23390 [SCH: 0 (SAL) or 1,0 µg] before the SKF (0; 0,56 or 1,8µg), was also investigated. The D<sub>1</sub> selective agonist, SKF produced, however, a significant ( $P < 0,01$ ) increase in number of errors in small doses (0,56 e 1,8 µg) as compared to saline in the 1-h post-delay performance (mostly by reentry of arms visited in the pre-delay performance). This result suggests that the acute activation of D<sub>1</sub> receptor located in mPFC impairs the long-term visuospatial working memory. The non-competitive antagonist of NMDA receptor, MK, disrupted the animals performance only at 1,0 µg dose ( $P < 0,05$ ) (mostly by reentry of arms visited in the pre-delay performance). The lowest and highest dose did not differ from the control. This result suggests that the NMDA receptor blockade promotes an inverted U shaped modulation on working memory. SKF-38393, but not SCH-23390, administered into the mPFC increased the number of errors (mostly by reentry of arms visited in the pre-delay performance) in the 1-h post-delay performance at doses of 0.56 or 1.8 µg, but not at the highest dose. SCH-23390 1.0 µg blocked and MK-801 1.0 µg reversed the disruptive effect of SKF-38393 0.56 or 1.8 µg. The atypical antipsychotic, CZP, an antagonist of D<sub>2</sub> and D<sub>4</sub> receptors, did not alter working memory. Otherwise, their combination at 3,2 µg dose with 1,0 µg of MK increased the number of errors (mostly by reentry of arms visited in the pre-delay performance) as compared to the control treatment ( $P < 0,05$ ) and also to others doses of CZP (0,32 and 1,0 µg) ( $P < 0,05$ ). These results suggest that the blockade of D<sub>2</sub>/D<sub>4</sub> and NMDA receptors, simultaneously, are implicated in the impairment of this cognitive process. These results show that dopamine D<sub>1</sub> receptors activation in the mPFC may disrupt the retention and/or recall of information in long-term delay. This impairment was blocked by dopamine D<sub>1</sub> receptors antagonist and reversed by a non-competitive NMDA receptor antagonist, suggesting that dopamine D<sub>1</sub> receptors and their interaction with NMDA receptors in the mPFC are crucial for adequate spatial working memory processing.

# 1) Introdução

O comportamento organizado e flexível é uma das razões do sucesso evolutivo dos mamíferos. Os animais inferiores possuem menor capacidade de alterar seu comportamento quando necessário, fato este que limita seu repertório comportamental e dificulta suas ações quando uma nova situação aparece. Portanto, o comportamento flexível, porém organizado, lhes confere

obviamente uma vantagem evolutiva, essencial para o sucesso desses animais nos mais diversos ecossistemas (Pough, 1999).

Este padrão comportamental requer algumas características essenciais: processamento e integração de informações sensoriais diversas, bem como de informações mnemônicas de curta e longa duração; foco nas informações mais relevantes para execução da ação (atenção); inibição de ações inapropriadas; planejamento de ações futuras, bem como sua adequação temporal. Todas essas funções podem ser incluídas nas chamadas funções executivas e estão na base do comportamento organizado e flexível (Arnsten, 2003).

Há na literatura, diversas definições das funções executivas, sendo que a inclusão de uma ou outra função pode variar de autor para autor. Segundo Fuster (2000), as funções executivas compreendem uma classe de atividades que capacitam o indivíduo no desempenho de ações voluntárias orientadas por metas específicas. Hamdan e Bueno (2005) definem as funções executivas como as habilidades cognitivas envolvidas no planejamento, iniciação, manutenção e monitoramento de comportamentos complexos dirigidos a um fim. Saboya et al. (2002) inclui o gerenciamento emocional, além do gerenciamento cognitivo e comportamental. Embora, admita-se que as funções executivas estão presentes nos mamíferos de um modo geral, cada função pode ser mais ou menos desenvolvida, dependendo da espécie em questão (Arnsten e Bao-Ming, 2003; Gazzaniga, 2006). Pelo menos no homem, algumas outras funções se relacionam intimamente ou são incluídas nas funções executivas, por exemplo, o pensamento, o raciocínio, julgamento, uso de habilidades verbais no discurso e antecipação de conseqüências (Tekin e Cummings, 2002; Saboya et al. 2002; Fuster, 2000).

Em algumas desordens ou lesões neurais, as funções executivas podem estar prejudicadas. É o caso do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), que apresenta três características básicas: Desatenção, hiperatividade e impulsividade. Os portadores desse transtorno podem apresentar também (como conseqüência dos sintomas clássicos) prejuízos na aprendizagem, desorganização e problemas com condutas sociais. Porém, diversos outros aspectos da cognição podem estar preservados ou até acima da média. Não é incomum que os portadores desse transtorno apresentem bons desempenhos em testes de inteligência

padronizados. Este fato é interessante, pois indica que nem todos os aspectos da cognição relacionam-se diretamente com as funções executivas (Arnsten, 2003; Gazzaniga, 2006; Phelan, 2005).

## 1.1) Memória operacional

Como exposto anteriormente, a execução de tarefas, o direcionamento comportamental e o gerenciamento emocional requerem a manipulação e a retenção temporária de informações sensoriais recentes e/ou provenientes dos sistemas de memória de curta ou longa duração. Em uma visão mais atual, o processamento dessas informações, tal como suas retenções, evocações e manipulações, é realizado por um sistema neural complexo e multifacetado chamado de **memória operacional** (MO) (Baddeley, 1983; 1997; Arnsten, 2003).

O termo memória operacional foi inicialmente proposto por Miller et al. (1960), porém foi modificado e complementado ao longo do tempo, por outros pesquisadores. Atkinson e Shiffrin (1968) propuseram que a MO seria um sistema unitário e de curta duração, não correspondendo às informações processadas de longa duração. Posteriormente, Baddeley e Hitch (1974) sugeriram um modelo que se tornaria o mais conhecido e influente nas concepções teóricas atuais da MO (Funahashi, 2006). É um modelo formado de múltiplos componentes, o qual pode ser dividido em quatro subsistemas: o executivo central, a alça fonológica, a alça visuoespacial e o “buffer” episódico. Este modelo tem maior relevância para humanos, já que inclui componentes semânticos, porém ainda assim muitas de suas características estão presentes em outros animais. Este modelo aborda, de forma satisfatória, muitos aspectos funcionais da MO (Baddeley, 2001).

Segundo Baddeley (2001), há um componente mestre: o executivo central. Ele tem função controladora sobre a atenção, focalizando as informações mais relevantes para a realização da tarefa, mas também sobre a manipulação de informações. Possui uma importante ação inibitória para estímulos irrelevantes, o que auxilia a manutenção do foco principal. É, ainda, assessorado pelos outros dois subsistemas: a alça fonológica que traz

informações semânticas; e a alça visuoespacial que fornece informações acerca do ambiente, processadas pelos sistemas visuais. O quarto componente (“Buffer” episódico) foi recentemente adicionado a este modelo pelo próprio Baddeley. Funciona como um componente de estocagem temporária de informações, com capacidade limitada, podendo conter informações de outros sistemas sensoriais (auditivas, táteis, olfativas, gustativas, etc.), o que confere a MO uma característica polimodal. Pode também conter informações previamente armazenadas pelos sistemas de memória de longa duração, modificando a concepção de que a MO é essencialmente de curta duração.

Nas abordagens mais modernas, a MO é vista como um sistema que lida com informações, inclusive memórias de curta ou longa duração. As informações mantidas “on line” por esse sistema são utilizadas pelo executivo central que, por sua vez, as analisa e programa respostas comportamentais adequadas. Portanto, enquanto houver relevância, uma informação pode ser evocada e utilizada por esse sistema (Funahashi, 2006; D’Eposito, 2007), não devendo ser definida por seu conteúdo sensorial ou por sua duração, mas sim, por seu contexto operacional. É mais bem entendida como memória **em e para** ação (Fuster, 1991).

#### **1.1.1) Testes e Modelos Experimentais para Avaliação das Funções Executivas e/ou Memória Operacional**

Em humanos, vários testes neuropsicológicos têm sido propostos para avaliação das funções executivas e/ou da MO. Pode-se citar: Teste de trilhas, um dos testes mais utilizados e sensíveis para disfunção cerebral e executiva. Requer atenção visual, destreza manual motora e velocidade de processamento de informações; Teste de Cartões de Winsconsin, largamente utilizado para avaliar as funções frontais, sendo sensível para detectar as disfunções características do TDAH; Teste de Repetição de Dígitos, que requer atenção auditiva e memória de curta duração; Blocos de Corsi, que envolve atenção visual e memória de curto-prazo. Todos esses testes são muito utilizados nas investigações clínicas e experimentais das disfunções humanas que envolvem as funções executivas, inclusive a MO (Ferreira, 2006).

Em animais, vários modelos experimentais foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar as funções executivas e/ou a MO em seus diversos aspectos. Como exemplo, podemos citar o labirinto radial de 8-braços, proposto inicialmente por Olton e Samuelson (1976) e, que tem sido de grande valia para avaliar a MO, principalmente em seu aspecto visuoespacial. É considerado um modelo muito sensível para MO e pode ser associado ao uso de substâncias psicoativas ou lesões cerebrais.

Há uma grande variedade de protocolos que pode ser utilizado com o labirinto, cada qual avaliando aspectos cognitivos diferenciados. Um período de retardo pode ser utilizado como um importante parâmetro para avaliar a MO. Este período nada mais é do que um intervalo introduzido durante o desempenho do animal no labirinto, dividindo o teste em dois momentos: pré-retardo e pós-retardo (Nakamura et al., 1996; Nakamura e Roelke, 1997).

O desempenho de animais no labirinto radial de 8-braços também utiliza a memória de referência. Este tipo de memória envolve o registro de regras e procedimentos necessários para a resolução de problemas, podendo ser armazenada por longos períodos. Possui mecanismos cerebrais diferentes em relação a MO, porém se associa a ela durante o desempenho no labirinto para produzir o resultado final do teste (Olton et al., 1977).

### **1.1.2) Substratos Neurais da Memória Operacional**

Baddeley propôs um modelo funcional para a MO, mas sem se basear em estruturas anatômicas específicas (Funahashi, 2006). Desde então, vários estudos vem sendo realizados, com o intuito desvendar sua bases anatômicas. Várias áreas encefálicas parecem se relacionar com a MO diretamente ou indiretamente, fato esperado para uma função tão ampla e sofisticada. Entretanto, o córtex pré-frontal exerce inegavelmente uma função central nesse processo (D'Esposito, 2007).

A relação entre a MO e o CPF foi inicialmente estabelecida a partir de observações de pacientes que apresentavam lesões nessa região cerebral. Eles tinham dificuldade em guiar seus comportamentos no dia-a-dia, sem, no entanto, comprometer suas capacidades intelectuais, de reter grandes volumes de informações e aprender novas habilidades (Goldmann-Rakic, 1992). Outro



aspecto importante, é que lesões no CPF não impedem, embora possam dificultar, a formação de memórias de curta ou longa duração em si, mas prejudicam sua manipulação e integração nas respostas comportamentais. Sua ativação, durante testes cognitivos, vem sendo comprovada por exames com tomografia por emissão de positrons e ressonância magnética funcional (Goldman-Rackic, 1992; D'Esposito, 2007).

Em primatas não-humanos, diversos estudos demonstram que lesões no CPF prejudicam o desempenho em testes com retardo (Funahashi, 2006). Jacobsen (1936) foi o primeiro a descrever estes déficits, utilizando testes com retardo. Posteriormente, vários modelos foram desenvolvidos com esse mesmo objetivo. Um modelo atualmente muito utilizado em primatas é o teste oculomotor com retardo, no qual diversos estudos demonstram prejuízos após lesões no CPF (Takeda e Funahashi, 2002; Funahashi, 2006).

Prejuízos na MO também são observados em outros mamíferos, especialmente em ratos, com lesões no CPF. Tal fato foi demonstrado em inúmeros trabalhos envolvendo testes com retardo. Um teste clássico utilizado para verificar tais prejuízos é o teste com retardo de alternância espacial, realizado no labirinto em T. Diversos outros estudos utilizando outros modelos também demonstraram estes mesmos resultados. Por exemplo, modelos envolvendo o labirinto aquático de Morris (Lacroix et al., 2002) e o labirinto radial de oito braços (Porter et al., 1997).

Todos esses resultados em conjunto, apontam para uma homologia funcional do CPF das diferentes espécies de mamíferos. A participação desta estrutura parece ocupar uma posição central, não só na MO, mas também em outros aspectos das funções executivas. Por isso, pode-se considerá-lo um componente essencial do executivo central proposto por Baddeley (Lacroix et al., 2002; Funahashi, 2006).

### 1.1.3) **Memória Operacional e outros tipos de memórias**

De acordo com Izquierdo (2000), memória pode ser definida como a aquisição, consolidação, manutenção e evocação de informações pelo sistema nervoso. Nesta abordagem, a memória é colocada como um conjunto de processos que ocorrem seqüencialmente e que podem levar uma dada

informação a ser incluída em um banco de dados neural. Por exemplo, pode haver aquisição sem consolidação ou, então, aquisição com consolidação, porém sem manutenção. A perda da informação após sua aquisição é chamada de esquecimento (não confundir com habituação). Analisando nesta ótica, as memórias apresentam um mecanismo de armazenamento seqüencial e, portanto, podem ser classificadas de acordo com a etapa em que estão no processo. Pode-se assumir, pelo menos, três etapas básicas da memória: de curtíssima duração (ou imediata), de curta duração e longa duração. Aparentemente, uma nova informação deve passar seqüencialmente por cada uma dessas etapas. Fisiologicamente, há fortes indícios de que esse seqüenciamento realmente ocorra (Izquierdo, 2000).

O CPF parece ser essencial na manutenção da memória imediata. Sugere-se que a atividade dos neurônios pré-frontais sustenta a atividade das redes neuronais responsáveis pela nova informação adquirida. Há indícios, de que essa atividade do CPF colabore para que o hipocampo promova, através da potenciação de longa duração (LTP) precoce, uma facilitação das redes neurais envolvidas com a informação em questão (consolidação inicial), processo que envolve a fosforilação de canais e receptores celulares no próprio hipocampo (memória de curto prazo). Porém, este mecanismo hipocampal inicialmente realizado não é capaz de sustentar a facilitação por longos períodos, mas somente pelos primeiros minutos a poucas horas após a aquisição. Por isso, o próprio hipocampo pode promover um reforçamento da facilitação inicial, processo que envolve a LTP tardia, na qual novos canais ou até mesmo novas sinapses podem aparecer no hipocampo (memória de longa duração), fato que só começa a ocorrer (se ocorrer) horas após a informação ter sido inicialmente adquirida. A partir daí, o tempo que a informação ficará armazenada é muito variável, pois depende de vários aspectos, por exemplo, de seu contexto emocional ou de sua relevância. Memórias que permanecem muitos anos são, por alguns autores, chamadas de memórias remotas e apresentam características diferentes das outras memórias de longa duração (Izquierdo, 2000).

A palavra “memória” utilizada para designar a MO gera certas confusões em relação ao seu real significado. Talvez, isso se deva ao fato de que a definição de memória na própria literatura ser muito controversa. Porém, vale

lembrar, que a “memória” operacional é atualmente vista como um sistema integrador e manipulador de informações em processo de aquisição ou previamente consolidadas, não sendo, portanto, um sistema que simplesmente sustenta a informações a serem consolidadas, embora isto também faça parte de seu repertório funcional. Porém, a evocação das informações previamente consolidadas para execução de tarefas também faz parte das funções deste sistema. O CPF, que sabidamente envolve-se com a MO, ativa-se durante a evocação de memórias de curta e longa duração, embora também haja a participação do hipocampo e, possivelmente, de outras estruturas. Portanto, definitivamente a MO não deve ser vista como uma memória de curta duração, mas sim como um sistema que trabalha com memórias (Izquierdo, 2000; Seamans e Yang, 2004; D’posito, 2007).

## **1.2) Córtex pré-frontal**

Em humanos, os lobos frontais correspondem à região localizada anterior ao sulco central e superior à fissura de Sylvius (Adams et al., 1997). Este lobo está presente em todos os mamíferos, porém é de difícil delimitação na maioria das espécies. O CPF corresponde à região mais rostral deste lobo. As regiões mais caudais estão envolvidas diretamente com a motricidade (Machado, 2000). Filogeneticamente, o lobo frontal foi a última estrutura dos hemisférios cerebrais a se formarem. São pouco proeminentes na maioria das espécies, mas em primatas, são bem desenvolvidos (Luria, 1981; Kolb, 1984; Adams et al., 1997; Machado, 2000).

Na espécie humana, os lobos frontais ocupam cerca de um quarto da massa total de seus hemisférios. Atinge maturidade estrutural e funcional ainda na adolescência (Luria, 1981; Nolte, 1993; Adams et al., 1997). O número de circunvoluções e fissuras é relativamente grande, o que não ocorre em animais inferiores. Nesses animais, a estrutura deste lobo é bem mais simples, constituindo-se apenas de uma fina e lisa camada (Reading, 1991; Penna, 1996; Machado 2000).

### **1.2.1) Estrutura do Córtex Pré-frontal**

O CPF constitui-se de uma rede neuronal maciça que se conecta a regiões motoras, perceptivas e límbicas do encéfalo (Goldman-Rakic, 1995). Em primatas, é formado por um córtex granular em quase toda sua extensão, exceto na região do cíngulo anterior. Em outros mamíferos, todo o CPF é agranular (Gazzaniga, 2006).

A maior dificuldade em se definir claramente as regiões do lobo frontal correspondentes ao CPF é a enorme variação anatômica entre as espécies, sobretudo diferenças citoarquitônicas e conectivas (Dalley et al., 2004). Rose e Woosey (1948), resolvendo uma antiga discordância entre os pesquisadores da área, definiram o CPF levando em consideração apenas suas conexões talâmicas. Eles observaram que em todas as espécies de mamíferos havia uma área frontal que recebia aferências do núcleo médio dorsal do tálamo (MD). Estas áreas seriam equivalentes funcionais entre as diversas espécies. Desta forma, o CPF foi considerado por esses pesquisadores como sendo a região dos lobos frontais que recebe maciças projeções do MD (Kolb, 1984). Pesquisas posteriores demonstraram que outros núcleos talâmicos se projetam para o CPF de modo importante. Além disso, o MD também se projeta para outras áreas corticais. Portanto, complementando as observações iniciais de Rose e Woosey, muitos autores consideram atualmente como sendo CPF somente as regiões corticais que se conectam reciprocamente e extensamente com o MD. Essa definição aplica-se a grande maioria dos mamíferos, sendo, portanto, a definição mais adequada (Uylings et al., 2003).

Em humanos e primatas não-humanos, o CPF pode ser dividido mais amplamente em pelo menos três regiões: medial, orbital e dorsolateral. Aparentemente, essas regiões possuem homologia funcional entre as diferentes espécies de primatas (Uylings et al., 2003). Em humanos mais especificamente, admitem-se as seguintes regiões anatômicas: Oculomotora (8 de Brodmann), Dorsolateral (9 e 10 de Brodmann), Orbitofrontal lateral (10 de Brodmann) e Cíngulo anterior (24 de Brodmann). Esta última recebe a maior parte das projeções do MD (Kolb, 1984). Porém, devido a sua citoarquitetura agranular, alguns autores não a consideram como parte integrante do CPF de primatas. Evidências anatômicas e funcionais recentes reforçam sua inclusão no CPF (Gazzaniga, 2006).

Em roedores, consideram-se três regiões: medial, lateral e ventral. A região medial (CPFm) é subdividida em Cg1, Cg2 (cingulado anterior), Cg3 (pré-límbico) e Fr2 (Zilles e Wree, 1985). Já a região lateral, inclui as áreas insular agranular lateral e ventral (AID e AIV) e, ainda, a área lateral orbital (LO). Por outro lado, na região ventral encontram-se as áreas orbital ventral (VO) e orbital lateral ventral (VLO) (Dalley et al., 2004). As divisões anatômicas do CPFm de ratos e em humanos são vistas na figura 01.

### **1.2.2) Conexões do Córtex Pré-frontal**

Em linhas gerais, as principais conexões do CPF dos mamíferos são bastante semelhantes entre as espécies, embora possa haver diferenças, sobretudo quantitativas (Uylings et al., 2003; Dalley et al., 2004). Suas principais *afêrências* chegam de inúmeras áreas, tais como áreas corticais diversas, núcleo accumbens, corpo amigdalóide, hipocampo, hipotálamo, MD e, ainda, outros núcleos talâmicos (todas estas *afêrências* são, essencialmente, glutamatérgicas); área tegmentar ventral (*afêrências* dopaminérgicas); núcleos medial e dorsal da rafe (*afêrências* serotoninérgicas); locus ceruleo (*afêrências* noradrenérgicas); núcleo basalis magnocellularis e núcleo dorsolateral mesopontino (*afêrências* colinérgicas). As *eferências* do CPF são predominantemente glutamatérgicas e se direcionam, virtualmente, para todas as regiões que para ele se projetam (Steketee, 2003).

As conexões com o tálamo são extremamente importantes. Não só para fins de delineamento estrutural, mas também funcional, pois integra o CPF com outras áreas corticais e subcorticais. Além das conexões extensas e recíprocas com o MD, outros núcleos talâmicos também se conectam com o CPF, tais como os núcleos intralaminares e da linha média, núcleo medial anterior e a parte rostral do complexo ventral do tálamo. O padrão de conexão e a relevância funcional parecem depender da espécie analisada (Uylings et al., 2003; Dalley et al., 2004).

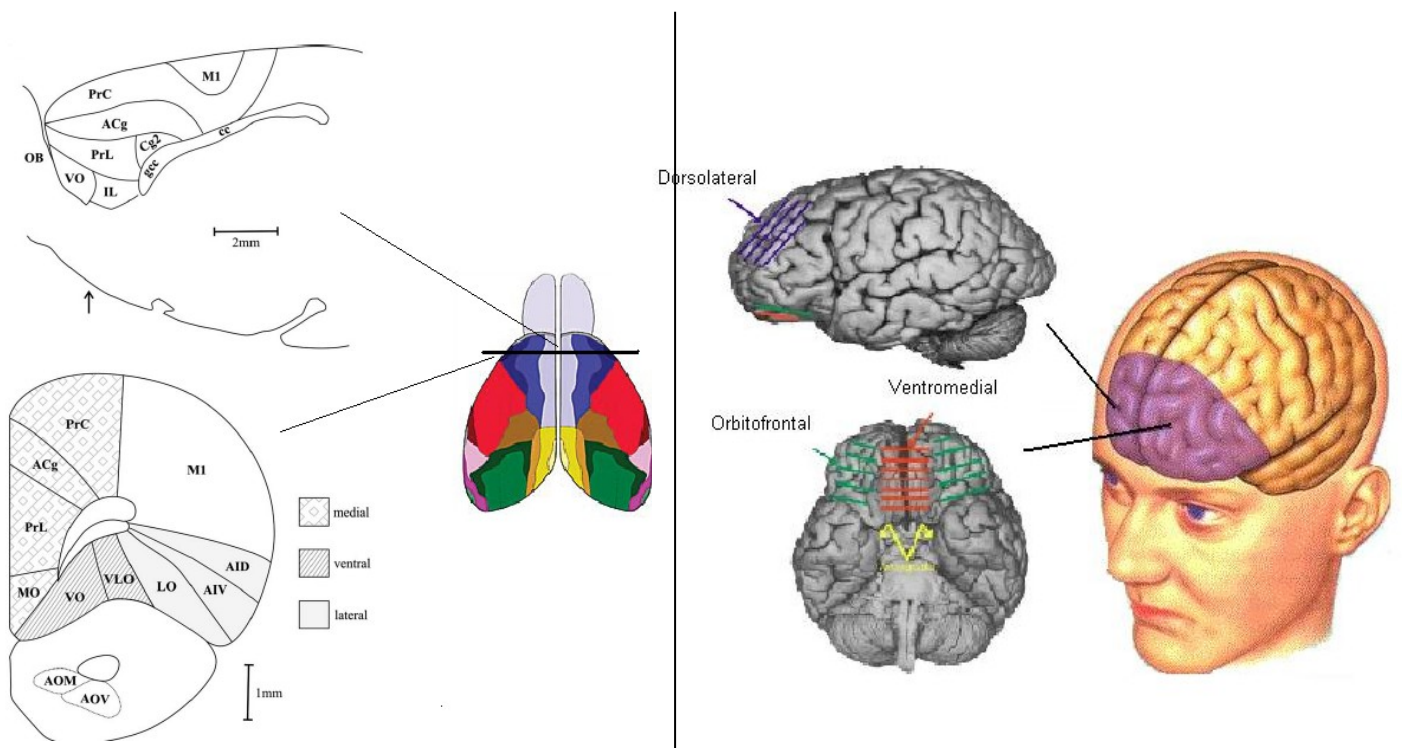
As conexões com outras áreas corticais tanto em primatas, quanto em ratos são predominante ipsilaterais e recíprocas. Correspondem as conexões mais proeminentes realizadas pelo CPF. As principais áreas corticais com as quais ele se conecta são: pré-motoras, somatossensorial, auditiva, visual,

olfatória, gustatória, hipocampal e áreas corticais límbicas. Em primatas, a região dorsolateral é a mais densamente abastecida por essas fibras. Por outro lado em ratos o CPFm é a região que mais recebe estas projeções (Dalley et al., 2004). Segundo Fuster (1997) essas conexões são essenciais no ciclo percepção-ação, provendo a base anatômica para o monitoramento momento a momento das funções executivas.

Todo o lobo frontal tem uma importante relação com os núcleos da base. Tanto os córtices motores, como o CPF enviam projeções para esses núcleos, especialmente o estriado. Entretanto, apenas o CPF recebe projeções recíprocas dessa estrutura. Principalmente, da porção mais ventral do estriado, conhecida como núcleo accumbens. Essas conexões *frontais-núcleos da base* são topográficas e se relacionam com as conexões *núcleos da base-tálamo* também topograficamente. Esta relação é a base dos circuitos frontais-subcorticais (Uylings et AL., 2003; Dalley et al., 2004).

De cada região dos lobos frontais, origina-se um circuito frontal-subcortical. Nestes circuitos envolvem-se, ainda, outras estruturas, tais como o estriado, complexo globo pálido/substância negra e núcleos talâmicos. Cinco circuitos podem ser identificados, porém apenas três têm suas origens no CPF: *circuito pré-frontal dorsolateral*, *circuito orbitofrontal lateral* e *circuito cingulado anterior*. Os outros dois são essencialmente motores e, portanto, originam-se em áreas motoras, como o *circuito motor* com origem na área motora suplementar e o *circuito oculomotor*, com origem nos campos ópticos frontais (Cummings, 1993).

## **Córtex Pré-Frontal**



**Figura 01-** Divisões anatômicas do córtex pré-frontal medial em ratos (painel da esquerda) e em humanos (painel da direita). Abreviações: ACg, córtex cingulado anterior; AID, córtex insular agranular dorsal; AIV, córtex insular agranular ventral; AOM, Núcleo olfatório medial anterior; AOV, núcleo olfatório ventral anterior; cc, corpo caloso; Cg2, córtex cingulado 2; gcc, corpo geniculado; 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 ventrolateral; VO, córtex orbital ventral. Painel da esquerda, extraído de Jeffrey e colaboradores 2004. Painel da direita, extraído de Davidson e Irwin, 1999.

### 1.2.3) Lesões frontais

Grandes avanços na compreensão das funções do CPF se devem a estudos realizados com pacientes lesionados. A observação clínica de pacientes com lesões extensas em todo CPF, evidenciou o que foi chamado de síndrome apático-acinético-abúlica. Nesta síndrome, os pacientes exibem um comportamento completamente passivo, distraem-se com facilidade, não expressam quaisquer vontades ou desejos e não fazem nenhuma solicitação (nem mesmo em estado de fome), levando a substituição de comportamentos complexos por outros menos elaborados (Luria, 1981; Mesulan, 2000).

Dependendo do tamanho, local, natureza e curso temporal da lesão, pode-se identificar diferentes sintomas, caracterizando as chamadas síndromes pré-frontais (Mesulan, 2000). Em humanos, três síndromes neurocomportamentais podem ser relacionadas com o CPF (Cummings, 1993):

- 1) **Síndrome Pré-frontal Dorsolateral**: apresenta-se com déficit na “função executiva” e anormalidades da programação motora. Os pacientes com lesão nesta área não são adequadamente capazes de gerar hipóteses ou de alterar suas ações por mudanças no contexto de uma tarefa. Exibem, também, uma redução da frequência e da fluência verbal, assim como, da capacidade de elaborar estratégias adequadas para aprendizagem de novas tarefas.
- 2) **Síndrome Orbitofrontal**: caracteriza-se por mudanças marcadas na personalidade, como por exemplo, alterações de humor, perda de interesse e iniciativa, além de rompimento com comportamentos socialmente aprendidos e adequados.
- 3) **Síndrome do Cingulado anterior**: nos casos de lesões bilaterais, os pacientes apresentam um quadro de apatia profunda chamado de mutismo acinético. Esses pacientes mantêm seus olhos abertos, não falam espontaneamente, respondem a perguntas monossilabicamente, movimentam-se pouco, são incontinentes e não comem nem bebem espontaneamente.

Lesões correspondentes em primatas levam a sintomas parecidos, sugerindo uma correlação funcional importante com humanos. Em ratos, as lesões mais específicas são menos correlacionadas, porém lesões extensas no CPF apresentam várias correlações com os sintomas observados em primatas (Gazzaniga, 2006).

#### **1.2.4) Funções do Córtex Pré-Frontal**

Durante anos, o CPF foi considerado como sítio anatômico das mais sofisticadas funções cerebrais humanas. O controle comportamental abstrato, a síntese intelectual, o comportamento ético, o afeto e a autoconsciência são exemplos de funções que eram atribuídas a essa estrutura. Porém, os estudos de Hebb (1939), demonstraram que pacientes submetidos à cirurgia para



remoção dos lobos frontais, muito utilizada no passado para tratamento de certas psicopatologias, não apresentavam déficits de intelectualidade, quando submetidos a testes padronizados de inteligência (QI). Ficou claro, que as funções dos lobos frontais eram mais específicas do que até então aceito, não sendo responsável por todos os aspectos da intelectualidade (Kolb, 1984).

As conexões do CPF com outras áreas corticais são muito amplas, sugerindo que esta estrutura está relacionada à função de várias áreas do córtex cerebral. Aparentemente, influencia no curso de muitas atividades mentais humanas, regulando processos que estão na base da atenção voluntária. Além disso, o CPF é responsável por atividades complexas, tais como o planejamento, o controle comportamental e emocional do indivíduo (Luria, 1981). Em 1984, Kolb sugeriu que o CPF seria atuante na organização temporal do comportamento. Segundo Fuster (2006), essa estrutura relaciona as informações sensoriais a uma ação comportamental adequada, em tempo adequado, estando no topo das estruturas relacionadas com integração sensório-motora, encarregadas de preencher as lacunas no ciclo percepção ação.

Quando se analisa as lesões pré-frontais em primatas, três regiões parecem se distinguir funcionalmente: região dorsolateral, região do cíngulo anterior e região orbitofrontal. Vários estudos recentes vêm comprovando essas diferenças. Estudos com ressonância magnética funcional demonstram que essas regiões ativam-se de modo específico de acordo com a tarefa realizada (Gazzaniga, 2006).

A região dorsolateral é, sem dúvida, a mais importante na manipulação de informações sensoriais e mnemônicas realizadas na MO. Além disso, alguns estudos têm sugerido outros aspectos funcionais. Milner (1995) demonstrou que pacientes com lesões seletivas nessa região possuem déficits na identificação temporal de eventos passados. Jasper (1995) relata que, pacientes com lesão dorsolateral seletiva, apresenta grande dificuldade em organizar temporalmente ações rotineiras seqüenciais que já realizavam antes da lesão. Aparentemente, eles não conseguem se lembrar da seqüência correta de execução, mesmo quando devem apenas relatar, sem executar. Esse fato sugere que a região dorsolateral do CPF pode apresentar uma

importante função na organização temporal de memórias de longa duração, fato que pode também prejudicar a realização de tarefas (Gazzaniga, 2006).

O cíngulo anterior conecta-se com diversas estruturas límbicas e parece exercer papel importante em muitas funções emocionais. Sua estimulação elétrica pode gerar alterações autonômicas, podendo alterar a frequência cardíaca, o padrão respiratório, desencadear micção e defecação. Por outro lado, vários trabalhos têm demonstrado que esta estrutura parece participar de funções importantes na execução de tarefas e organização comportamental. Experimentos com ressonância magnética funcional (IRMf) em humanos, demonstraram uma maior ativação do cíngulo anterior em testes para atenção dividida, em relação a outras regiões do próprio CPF. Sua ativação pode aumentar quando se eleva a dificuldade dos testes. Alguns autores sugerem sua participação no foco atencional para informações mais relevantes durante a execução de tarefas. Além disso, outros estudos apontam para uma importante função no reconhecimento de erros, pois sua atividade aumenta sempre que os indivíduos percebem o erro durante um teste, podendo servir como um sistema de supervisão de execução (Gazzaniga, 2006).

A região orbitofrontal do CPF possui uma importante função na tomada de decisão nos comportamentos sociais e em respostas emocionais. Como visto anteriormente, as lesões nesta região mudam completamente as atitudes e comportamentos dos indivíduos, muitas vezes descritas como uma mudança brusca na personalidade. Sua ativação tem sido verificada com ressonância magnética funcional (IRMf) em testes para tomada de decisão social, bem como em situações de contexto emocional. Suas fortes conexões anatômicas e funcionais com estruturas límbicas, sobretudo com o corpo amigdalóide, reforçam este fato. É provável, que tais estruturas forneçam informações acerca de regras sociais aprendidas e experiências emocionais anteriores, auxiliando o julgamento do contexto e relevância do comportamento em curso, planejado ou provocados por necessidades inatas (Gazzaniga, 2006).

O CPF como um todo possui, pelo menos, duas funções importantes nessa organização do comportamento (Fuster, 1991): uma função retrospectiva para manutenção e manipulação de informações relevantes (**ligado a MO**); e uma função prospectiva de preparação para a ação (**planejamento**) (Olton, 1979; Baddeley, 1997). Pode-se ainda incluir outros aspectos funcionais do

CPF, tais como o foco atencional nas informações relevantes (pelo menos em parte, pois o córtex parietal posterior também parece importante neste aspecto) e a inibição de ações irrelevantes ou inadequadas (Gazzaniga, 2006).

### **1.2.5) Aspectos Fisiológicos do Córtex Pré-frontal Envolvidos na Memória Operacional**

Fuster (1991), através de estudos eletrofisiológicos em neurônios isolados da área dorsolateral de macacos submetidos a testes com retardo, verificou que há uma ativação seletiva de alguns neurônios no CPF, de acordo com a fase do teste. Ele demonstrou que, quando se apresentava para o animal o estímulo sensorial que iniciava o teste, determinados grupos neuronais contidos no CPF aumentavam suas frequências de disparo. Durante o período de retardo, outros grupos neuronais se tornavam ativos. Além disso, foi verificada a ativação de um terceiro grupo neuronal, cujo aumento nas frequências de disparo ocorria apenas quando os animais iniciavam sua resposta motora após o retardo. Fuster considerou aqueles neurônios ativados durante o período de retardo, com sendo o sítio anatômico da MO, pois estariam envolvidos na manutenção da informação ativa e disponível (“on line”) para o desempenho no teste (Goldman-Rakic, 1992).

Esses resultados foram posteriormente corroborados e complementados por Funahashi (1993 e 2002). Em estudo semelhante, ele verificou uma organização neuronal com o mesmo funcionamento temporal ao longo do teste. Além disso, demonstrou que há uma inter-relação funcional entre os três tipos de neurônios encontrados. Foi verificado, que cada grupo neuronal influencia o aspecto temporal da ativação dos grupos ativados na seqüência, de modo que quando o primeiro grupo era mantido ativado por eletroestimulação, o segundo grupo não se ativava na fase de retardo e isto se associava a prejuízos de desempenho no teste. A partir destas informações, pode-se entender que a função dos neurônios do CPF não é somente determinada por estímulos sensoriais, mas controlada por uma rede neuronal aparentemente complexa, contida no próprio CPF. Este fato é essencial para a integração de outras informações não sensoriais manipuladas pelo CPF (Funahashi, 2006).

Ainda no mesmo estudo, Funahashi, também demonstrou que alguns neurônios do CPF respondem somente a locais específicos do estímulo no campo visuoespacial, sugerindo uma organização retinotópica presente no CPF. Este fato sugere que o processamento das informações visuoespaciais é bem elaborado e que, dependendo da localização do estímulo no campo visual, diferentes redes neuronais intrínsecas são ativadas no CPF, o que pode ser utilizado para guiar o comportamento do animal no ambiente (Funahashi, 2006).

Nestes estudos, boa parte das respostas foi obtida a partir de neurônios piramidais. Estes neurônios projetam-se para as mais diversas áreas cerebrais e, portanto, sua ativação poderia se relacionar à atividade das redes neurais responsáveis pela informação sensorial ou de memórias de longa duração relevantes para a tarefa. Propõem-se a existência de circuitos reverberativos existentes entre o CPF e as áreas correspondentes e, que esta reverberação é importante para manter as informações disponíveis para o CPF (Goldman-Rakic, 2000; D'Esposito, 2007).

Alguns estudos apontam para uma assimetria funcional no CPF. Estudos realizados com IRMf indicam maior ativação da região dorsolateral esquerda em testes envolvendo linguagem. Do mesmo modo, a região direita correspondente se ativa mais em testes visuoespaciais. Este fato está de acordo com o padrão de projeções cortico-corticais preferencialmente ipsilaterais, fazendo com que as informações que são processadas assimetricamente em outras áreas corticais mantenham, pelo menos em parte, este padrão no CPF (Gabrieli et al., 1998). Porém, ainda não foi determinado para outras informações sensoriais ou mnemônicas qualquer padrão claro de segregação no CPF. Contudo, alguns estudos mostram que as informações olfativas podem ser processadas pela região orbitofrontal. Visto que o olfato exerce efeitos importantes nos comportamentos sociais e emocionais, sobretudo em animais inferiores, esta informação está condizente com a função orbitofrontal (Gazzaniga, 2006).

Pelo exposto acima, pode-se concluir que, em primatas, a região dorsolateral do CPF é funcionalmente mais envolvida com a retenção e a manipulação de informações sensoriais, semânticas e mnemônicas. Isto vem sendo evidenciado por estudo com lesão, estudos eletrofisiológicos e exames

de imagem. Porém, em ratos, o CPFm parece estar preferencialmente envolvido nesta função cognitiva (Goldman-Rackic, 1987, 1998; Seamans et al., 2004). Estudos anatômicos comparativos demonstram uma homologia filogenética entre a área dorsolateral de primatas e o CPFm de ratos. Além disso, lesões neuroquímicas no CPFm de ratos prejudicam de forma consistente a MO (Heidbreder e Groenewegen, 2003).

### **1.2.6) Neurotransmissão no Córtex Pré-frontal Relacionada à Memória Operacional**

A neurotransmissão no CPF é bastante complexa, envolvendo diversos tipos de neurotransmissores. Neurônios locais podem liberar muitos tipos de neurotransmissores, porém os interneurônios gabaérgico e colinérgicos se destacam nas funções corticais (Kandel 1999; Goldman-Rakic, 2000). Por outro lado, o glutamato (GLU), como neurotransmissor, provém principalmente de fibras aferentes, sendo pouco expressiva sua liberação por interneurônios. Estas vias que atingem o CPF são provenientes das mais diversas regiões e atribui-se a elas, a função de transmitir informações sensoriais e mnemônicas Goldman-Rakic, 2000; Briand et al., 2007). Tanto os neurônios locais, quanto as aferências glutamatérgicas formam uma rede neuronal extensa e bastante complexa, envolvida no fluxo de informações processadas por esta área cortical que, por sua vez, influencia de forma decisiva o funcionamento dos neurônios piramidais do CPF (Goldman-Rakic, 2000).

Diversos neurotransmissores são liberados no CPF por sistemas neurais bem organizados e modulam vários aspectos funcionais. Pode-se destacar o sistema ascendente de monoaminas, formado por fibras que partem principalmente de núcleos do tronco cerebral. São elas: as fibras dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas. Em relação a MO, as vias dopaminérgicas parecem ser mais importantes, embora os outros neurotransmissores também se relacionem com esta função. Alterações na liberação de dopamina no CPF interferem de forma consistente no desempenho em inúmeros testes com retardo, bem como alteram o funcionamento dos neurônios corticais. Estas ações dopaminérgicas parecem relacionadas com a transmissão glutamatérgica local (Briand et al., 2007).

### **1.3) Sistema Glutamatérgico**

O GLU é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Corresponde a mais de 40% das sinapses centrais. Desta forma, é secretado em todas as regiões do SNC, sendo difícil delinear suas projeções, já que envolve todo o encéfalo e a medula espinhal (Cooper et al., 2001).

A síntese de GLU pode ocorrer por três vias: 1) a partir de compostos produzidos no ciclo de Krebs; 2) através da transaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato; 3) metabolização da glutamina pela glutaminase. Sem dúvida, esta última é a forma mais significativa, merecendo maior detalhamento (Cooper et al., 2001).

A glutamina é produzida em células gliais e, em seguida, liberada. Os neurônios glutamatérgicos possuem transportadores nos terminais sinápticos para a glutamina de cinética elevada e, portanto, captam esse aminoácido rapidamente. Já dentro do terminal, sofre a ação da enzima mitocondrial glutaminase, formando GLU que, por sua vez, é extensamente captado por vesículas, nas quais fica armazenado até o estímulo para liberação (Cooper et al., 2001).

O principal mecanismo de retirada do GLU da fenda sináptica é a recaptação neuronal e glial. Há cinco transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT1-5) conhecidos: EAAT1 e EAAT2 são gliais, sobretudo presentes em astrócitos. Já, EAAT3 e EAAT4 são neuronais. O tipo EAAT5 é encontrado fundamentalmente na retina (Cooper et al., 2001). Após recaptação glial, o GLU é metabolizado pela glutamina sintase em glutamina, posteriormente reutilizada para nova síntese de GLU pelos terminais neuronais. O GLU recaptado pelos próprios neurônios é em boa parte reutilizado, porém podem sofrer metabolização (Webster et al., 2001).

#### **1.3.1) Receptores Glutamatérgicos**

O conhecimento a cerca dos receptores glutamatérgicos tem evoluído muito nos últimos anos. Desde os estudos pioneiros de Curtis e colaboradores nos anos 50 do século passado, sua estrutura e funcionamento foram extensivamente analisados e descritos. São implicados atualmente nos mais diversos processos neurais, dentre eles a promoção rápida de potenciais pós-sinápticos excitatórios (PPSE) e LTP (Webster et al. 2001; Seamans e Wang, 2004).

Inicialmente, foram identificados somente receptores ionotrópicos, classificados como receptores ativados pelo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e aqueles não ativados pelo N-Metil-D-Aspartato (não-NMDA), cujos nomes referem-se a seus principais agonistas: Kainato e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionato (AMPA). Atualmente, além dos receptores ionotrópicos, são conhecidos pelo menos oito tipos de receptores metabotrópicos (mGluR1-8) descritos (Cooper, 2001).

#### *1.3.1.1) Receptores não-NMDA*

Os receptores não-NMDA ionotrópicos são do tipo AMPA e Kainato, com estrutura pentamérica homo ou heterométrica. As subunidades GluR1, 2, 3 e 4 são encontradas em receptores AMPA, já os receptores Kainato podem ser formados pelas subunidades GluR5, 6 e 7. Ambos os receptores possuem maior condutância ao sódio, porém alguns tipos podem ser permeáveis ao cálcio, sobretudo os receptores AMPA com ausência da subunidade GluR2 (Webster et al., 2001). O agonista endógeno de ambos os tipos de receptores é o GLU, promovendo um PPSE rápido e transitório, desta forma estão envolvidos com excitação neuronal rápida (Seamans e Wang, 2004). Suas distribuições pelo SNC são bastante amplas, sendo os receptores AMPA mais abundante na maioria das regiões encefálicas. Os receptores Kainato têm sido implicados como autorreceptor excitatório, sendo esse aspecto pouco compreendido, mas com grande potencial farmacêutico, visto que seu antagonismo pode diminuir a liberação de GLU (Cooper, 2001; Webster et al., 2001).

Os receptores metabotrópicos são típicos receptores acoplados a proteína G. Portanto, tem sete domínios transmembrânicos e três alças extra

e intracelulares. mGluR1 e mGluR5 estão acoplados principalmente a  $G_q$ , ativando desta forma o sistema da fosfolipase C. Por outro lado, todos os outros mGluR acoplam-se de forma mais significativa a  $G_i$ , diminuindo a ativação da adenilil ciclase. São encontrados na pré- e pós-sinapse em diversas regiões do SNC. Atualmente, são considerados importantes em vários processos fisiológicos, como memória e transmissão dolorosa e, ainda, em algumas fisiopatologias tais como neurodegenerações e ansiedade (Watkins, 1994; Webster et al., 2001).

### *1.3.1.2) Receptores NMDA*

A ativação das sinapses glutamatérgicas promove uma excitação rápida e transitória, seguida de uma excitação mais prolongada, de maior amplitude, que envolve o aumento da condutância ao cálcio pela membrana (Watkins, 1994). Esse padrão não pode ser totalmente explicado somente pela presença dos receptores AMPA e kainato. Na verdade, depende também da ativação de receptores NMDA que possuem um funcionamento peculiar, sendo envolvidos com a resposta mais tardia e robusta da ativação glutamatérgica (Cooper, 2001; Webster, 2001).

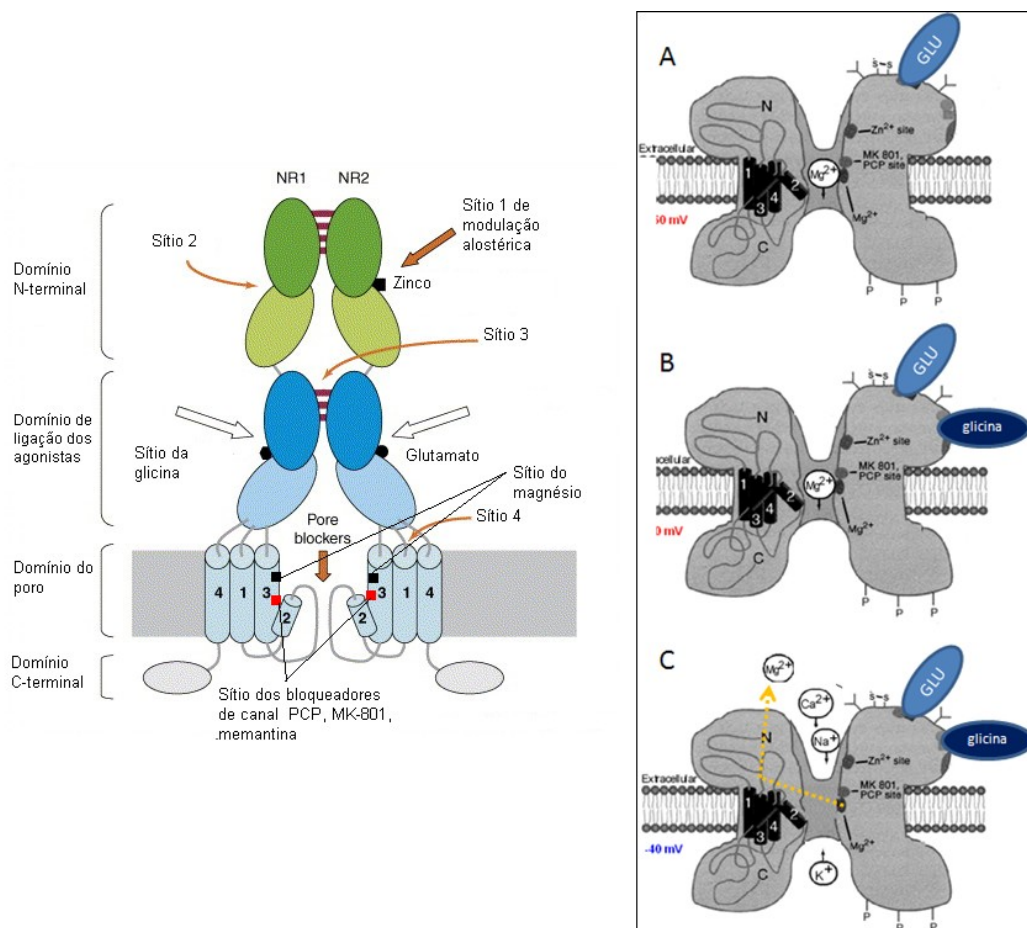
O receptor NMDA aparentemente possui uma estrutura tetramérica. Suas principais subunidades são NR1 e NR2. Esta última possui pelo menos quatro isoformas (NR2 A, B, C e D). Cada subunidade corresponde a uma cadeia polipeptídica com três domínios transmembrânicos (M1, M3 e M4) e uma reentrada na membrana restrita a face intracelular que parece controlar, pelo menos em parte, a permeabilidade do canal (M2) (Dingledine et al., 1999). Um receptor completo tem duas subunidades NR1 e duas NR2. Existe ainda uma terceira subunidade, NR3, com uma distribuição mais restrita pelo SNC e, que pode conferir ao receptor, características fisiológicas distintas daqueles formados somente por NR1 e NR2. Porém, a importância de NR3 nos processos neurais, ainda não foi bem determinada (Danysz e Parsons, 1998). A estrutura do receptor NMDA é vista na figura 02.



### 1.3.1.3) O Funcionamento do Receptor NMDA

O receptor NMDA parece conferir as sinapses glutamatergicas efeitos mais duradouros. Além disso, podem estar envolvidos em eventos de plasticidade sináptica. Isto por que, quando ativado, possui alta condutância ao sódio, potássio e, em particular, ao cálcio, sendo este último íon envolvido em diversos processos intracelulares, tais como ativação de proteínas cinases e calmodulinas. Este fato lhe confere uma ação metabotrópica, além de seus efeitos excitatórios diretos no potencial de membrana (Watkins, 1994; Cooper, 2001).

### Receptor NMDA



**Figura 02-** Estrutura do receptor NMDA e seu funcionamento. No painel a esquerda é vista a estrutura do receptor NMDA e os sítios de ligação de seus principais agonistas e antagonistas (extraído e modificado da internet: lasoedaddelexcentrico.wordpress.com). No painel a direita (A, B e C), demonstra-se o funcionamento dos receptores NMDA (extraído e modificado de Bressan e Pilowsky, 2003).

No interior do lúmen do canal há um sítio de ligação para o  $Mg^{++}$  extracelular que, quando acoplado, impede o acesso dos íons permeantes (Dingledine et al., 1999). Três eventos devem ocorrer simultaneamente para que o canal seja desbloqueado pelo  $Mg^{++}$ : 1) ligação do GLU em sítios extracelulares específicos localizados nas subunidades NR2 (Fig.02A); 2) ligação da glicina em sítios localizados nas subunidades NR1 (Fig. 02B); 3) uma despolarização local da membrana de, pelo menos, alguns milivolts (Fig. 02C) (Danysz e Parsons, 1998). Caso esses três eventos ocorram simultaneamente, o Sítio do  $Mg^{++}$  diminui sua afinidade pelo íon, que é liberado para o meio extracelular, desbloqueando o canal (Cooper, 2001; Webster, 2001). O período de abertura e a condutância iônica do canal podem variar de acordo com as diferentes combinações de subunidades que formam o receptor (Dickenson, 2001).

O receptor NMDA possui vários sítios alostéricos que permitem diversas modulações. Abaixo são citados os mais importantes:

- O  $Zn^{++}$  inibe o canal NMDA por mecanismos dependentes e independentes de voltagem. Os mecanismos voltagem-dependentes são bem mais fracos do que o bloqueio pelo  $Mg^{++}$ , já o bloqueio voltagem-independente ocorre pelo  $Zn^{++}$  extracelular em sítios específicos, supostamente localizados na subunidade NR2, que parece diminuir a frequência e período de abertura do canal (Dingledine et al., 1999).
- Há dois resíduos de cisteínas nas subunidades NR1 e NR2 que, quando oxidados ou reduzidos alteram a frequência de abertura do canal, sem alterar a condutância iônica. A redução aumenta a frequência de abertura. A oxidação promove o oposto (Dingledine et al., 1999; Woodward, 2000).
- Poliaminas extracelulares, tais como a espermina e espermidina, alteram o funcionamento dos receptores NMDA. Este efeito modulatório é complexo e pode promover aumento funcional ou inibição do receptor, dependendo das concentrações de poliaminas, dos tipos de subunidades que forma o canal ou presença de outros moduladores (Woodward, 2000);
- O pH extracelular fisiológico promove uma estabilização nos receptores NMDA, pois inibem aberturas espontâneas do canal. A diminuição do pH inibe o canal e pode relacionar-se com um efeito protetor em certas

situações, por exemplo, em isquemias e crises epiléticas, condições que tipicamente reduzem o pH. Este efeito parece envolver diversos resíduos de aminoácidos extracelulares das subunidades NR1 e NR2, nos quais os prótons se ligam e reduzem a efetividade do GLU em ativar esses receptores (Digledine et al., 1999; Woodward, 2000).

#### *1.3.1.4) Farmacologia dos receptores NMDA*

Os receptores NMDA possuem diversos sítios potencialmente importantes para ação farmacológica. Na subunidade NR2 encontra-se o sítio de ligação para o GLU, seu agonista endógeno. Este sítio é estimulado pelo NMDA, um agonista exógeno, com grande potência e afinidade. Outros agonistas deste mesmo sítio podem ser citados: aspartato, homocysteato e quinolinato. Por outro lado, diversos fármacos agem neste local como antagonistas: D-2-amino-5-fosfonopectanoato (AP5), D-2-amino-7-fosfonopectanoato (AP7), CGS19755 e CPP. Suas ações são competitivas com o GLU e, portanto, dependentes das concentrações basais deste neurotransmissor (Bressan e Pilowsky, 2003).

O sítio da glicina, localizado na subunidade NR1, é essencial para o funcionamento do receptor NMDA. Sendo assim, sua ativação ou bloqueio é um mecanismo importante que regula o funcionamento deste receptor. A D-serina e a D-Cycloserina (agonista parcial) atuam neste local, aumentando a condutância iônica do canal. Estes agonistas têm sido utilizados em ensaios clínicos em pacientes com esquizofrenia com certo sucesso terapêutico. Além disso, são eficientes na reversão de efeitos antagônicos de diversos fármacos antagonistas de receptores NMDA. Opostamente, o antagonista MDL105,572 impede a ativação do receptor, pois liga-se a este sítio impedindo a ligação da glicina (Bressan e Pilowsky, 2003).

Outro local importante de ação farmacológica é o sítio de ligação dos bloqueadores de canal. Seu acesso só ocorre quando o receptor está ativado, pois é neste momento que o  $Mg^{++}$  é liberado e, assim, os fármacos podem se difundir para o interior do canal. Possuem um sítio específico no qual se ligam e impedem a passagem de sódio, potássio e cálcio. Dentre os fármacos que agem por este mecanismo pode-se citar a fenciclidina, dizocilpina (MK-801) e a

memantina. Os dois primeiros ligam-se com alta afinidade e por longos períodos e, desta forma, suas ações antagônicas são bastante prolongadas. Já, a memantina possui menor afinidade, desfazendo seu bloqueio com certa facilidade. É importante destacar que o antagonismo promovido pelos bloqueadores de canal é do tipo não-competitivo (Dingledine, 1999).

Existem ainda diversas outras substâncias que podem ativar ou inibir os receptores NMDA, agindo pelos sítios das poliaminas, redox ou de fosforilação. O etanol, curiosamente, é um antagonista destes receptores, entretanto seu local específico de ação não é conhecido. Este efeito antagônico pode ser responsável em parte por seus efeitos depressores (Dingledine, 1999). Os principais agonistas e antagonistas de receptores NMDA estão expostos na tabela 01, já os sítios de ligação destes fármacos estão ilustrados na figura 02.

**Tabela 01-** Agonistas e antagonistas de receptores NMDA

Sítio Regulatório	Agonista	Antagonista
Sítio do Glutamato	Glutamato Aspartato Homocysteato NMDA Quinolinato	AP5, AP7 CGS19755 CPP CPP-ene
Sítio da Glicina	Glicina D-Serina D-Cycloserina*	MDL 105,572
Sítios do Canal Iônico**		Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> n-Alkyl diaminas
Sítio da Phenciclidina (PCP) no canal Iônico** Phenciclidina (PCP)***		Ketamina*** MK801 (dizocilpina)*** CNS1102 (cerestat)***
Memantina*** Dextromethorphan***		
Sítio da Polyamina	Spermina, Spermidina	Ifenprodil
Sítio de Redox	Glutathione	DTNB
Sítio de Protons		H <sup>+</sup>
Sítio do Zn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>
Sítio de Fosforilação	Kinases da Tyrosine	Fosfatases de Proteínas

Fonte: Bressan e Pilowsky (2003)

\*Agonista parcial; \*\*A ligação neste sítio só é possível quando o canal encontra-se aberto;

\*\*\*Bloqueadores do canal iônico.

#### *1.3.1.5) Aspectos Fisiológicos dos receptores NMDA no SNC*

Devido à alta distribuição do GLU como neurotransmissor no SNC, é esperado seu envolvimento com as mais diversas funções neurais. Desde a transmissão de informações sensoriais e motoras, até as funções cognitivas mais complexas (Kandel, 1999). Seu papel é claramente excitatório na atividade neuronal, porém é possível encontrar diferentes mecanismos de ação, dependendo da região do SNC analisada ou do tipo neuronal que sofre a ação do GLU. Em áreas onde a transmissão sináptica deve ser fugaz, parece haver um predomínio de receptores AMPA e kainato, cujos efeitos despolarizantes duram apenas poucos milissegundos. Este padrão é comum, por exemplo, em áreas sensoriais primárias. Já em áreas com funções mais complexas, tais como o hipocampo e o CPF, parece existir uma elevada densidade de receptores NMDA, mas também AMPA e kainato. Os receptores metabotrópicos glutamatérgicos não parecem apresentar um padrão tão claro de distribuição (Kandel, 1999).

A inibição farmacológica de receptores NMDA no hipocampo inibe a potenciação de longa duração (LTP), observada normalmente em neurônios após estimulação tetânica dos mesmos. Por outro lado, a administração de agonistas de receptores NMDA promove LTP mesmo na ausência de estimulações tetânicas. Experimentos semelhantes em outras regiões cerebrais têm encontrado resultados parecidos. Estes achados sugerem que o receptor

NMDA parece ser o estopim para LTP, um processo importante para diversas funções neurais, tais como a coordenação de movimentos finos, aprendizagem e memória (Watkins, 1994; Izquierdo e McGaugh, 2000; Dickenson, 2001).

A entrada intensa de cálcio no terminal pós-sináptico é essencial para o desenvolvimento da LTP. Este íon, em concentrações citosólicas elevadas, ativa a cálcio calmodulina cinase 2 (CaMKII) que, após a ativação, se torna autônoma. Isto inicia a fosforilação de diversos elementos do citoplasma, o que desencadeia respostas rápidas, tal como o aumento numérico de receptores AMPA na membrana, e ainda respostas em longo prazo, como por exemplo, a ativação de fatores de transcrição gênica e eventos plásticos que podem aumentar o número de sinapses em espinhos dendríticos. Portanto, o receptor NMDA tem um importante papel no fortalecimento sináptico (Izquierdo e McGaugh, 2000).

Os receptores NMDA parecem também essenciais para a depressão de longa duração (LTD), processo no qual há uma hiperpolarização pós-sináptica que diminui a excitabilidade neuronal. Este processo parece ser importante na habituação e, talvez, no esquecimento, mas é comprovadamente importante na aprendizagem motora que envolve o cerebelo (Dickenson, 2001).

O mesmo  $Ca^{++}$  que ativa a LTP, também ativa a LTD. Porém, para ativar este último processo menores concentrações citosólicas deste íon são requeridas. Nesta situação, ao invés de se ativar a CaMKII, há a ativação de fosfatases e conseqüente retirada de fosfatos de diversos elementos citosólicos e membranosos. Desta forma, a estimulação fraca dos receptores NMDA gera baixa entrada de  $Ca^{++}$ , envolvido-se com a LTD. Por outro lado, a estimulação moderada a intensa relaciona-se com a LTP (Bear et al., 2002).

#### *1.3.1.6) Aspectos Fisiológicos do GLU e dos receptores NMDA na MO*

A liberação de GLU no CPF promove a excitação dos neurônios pré-frontais. Esta ativação ocorre tanto em interneurônios gabaérgicos, quanto em neurônios piramidais. Esta excitação pode durar vários milissegundos. Porém, o uso de MK-801 reduziu a frequência de disparo média e a duração da excitação. Este fato sugere que a estimulação dos receptores NMDA no CPF é

importante para os efeitos excitatórios do GLU, pois quando bloqueados, a resposta é menos intensa e mais passageira (Seamans e Yang, 2004).

A função do CPF é diretamente afetada pela transmissão glutamatérgica. Em humanos, a administração de antagonistas não-competitivos de receptores NMDA, tais como a fenciclidina (PCP), Ketamina ou MK-801, prejudica funções cognitivas relacionadas ao CPF e, ainda, produz sintomas psicóticos semelhantes aos observados na esquizofrenia (Xun Wang et al., 2005). Além disso, a administração de PCP em esquizofrênicos exacerba os sintomas (Lahti et al., 1995). Estudos recentes demonstram que este efeito está relacionado a um aumento da ativação do CPF (Katayama et al., 2007). Em outros estudos envolvendo animais tratados com PCP, foi demonstrado que o tratamento promovia alterações comportamentais e cognitivas, compatíveis com os sintomas característicos da esquizofrenia. Desta forma, o bloqueio da transmissão glutamatérgica, especialmente pelo receptor NMDA, prejudica as funções do CPF (Xun Wang et al., 2005).

#### **1.4) Sistema dopaminérgico**

A dopamina (DA), como substância, é conhecida há aproximadamente cem anos. Inicialmente, foi considerada apenas uma molécula intermediária na síntese de outras catecolaminas, como a noradrenalina e adrenalina. Em meados de 1950, surgiram fortes evidências de que a DA possuía importantes funções no SNC. Foi, então, proposta uma função específica e independente para DA, que finalmente se caracterizou como um verdadeiro neurotransmissor (Cooper, 1996; Halbach e Dermietzel, 2001; Webster, 2001). Hoje, após anos de estudos, atribui-se a ela inúmeras funções no SNC: controle motor, atividades cognitivas, reforçamento comportamental e controle neuroendócrino (Cooper, 1996).

A DA é classificada quimicamente como uma catecolamina, termo utilizado para designar todos os compostos orgânicos que apresentam um núcleo catecol (um anel benzênico com duas hidroxilas adjacentes) e um grupo amina. Na prática, o termo significa diidroxifeniletíl amina (Cooper, 1996). Sua síntese ocorre nos terminais dos neurônios dopaminérgicos

(Cooper, 1996) e tem como precursor o aminoácido tirosina que, ao contrário da DA, atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica (Cooper, 1996; Halbach e Dermietzel, 2001). Há dois passos enzimáticos em sua síntese. No primeiro, a tirosina sofre a ação da tirosina hidroxilase, convertendo-se em dihidroxifenilalanina (DOPA), esta etapa é limitante na síntese (Cooper, 1996; Halbach e Dermietzel, 2001). A ação da TH requer  $O_2$ ,  $Fe^{++}$  (Webster, 2001) e, ainda, tetrahidrobiopterina (Cooper, 1996; Halbach e Dermietzel, 2001; Webster, 2001). A concentração de DOPA no SNC é baixa, pois, assim que formada, sofre a ação da L-aminoácido aromático descarboxilase, produzindo DA. Esta segunda etapa ocorre rapidamente (pelo menos cem vezes mais rápido do que a primeira) e não limita a síntese de DA. Essa enzima requer, como cofator, vitamina B<sub>6</sub> e pode descarboxilar outros aminoácidos, como por exemplo, triptofano e tirosina (Webster, 2001).

#### 1.4.1) Vias dopaminérgicas

No cérebro de humanos há, aproximadamente, 400.000 neurônios dopaminérgicos. Seus corpos celulares são encontrados, em sua maioria, no mesencéfalo, particularmente, na substância negra (A9) e área tegmentar ventral (A8 e A10) (Webster, 2001). Podem ser encontrados, ainda, em outras regiões do SNC, como por exemplo, área postrema, retina e hipotálamo (Cooper, 1996; Machado, 2000). Essas vias podem ser classificadas quanto ao comprimento de suas projeções em:

- **Vias curtas:** *neurônios amácrinos interplexiformes*, que conectam as camadas plexiforme interna e externa da retina; *células dopaminérgicas periglomerulares do bulbo olfatório*, que conectam os dendritos das células mitraes separadas em glomérulos adjacentes.
- **Vias médias:** *via dopaminérgica tuberohipofisário* (também conhecido como tuberoinfundibular), que se projetam dos núcleos arqueado e periventricular para o lobo intermediário da hipófise e eminência média; *via incertohipotalâmica*, que conectam o



hipotálamo dorsal e posterior com o núcleo dorsal anterior do hipotálamo e o núcleo septal lateral; *neurônios periventriculares bulbares*, que incluem os neurônios dopaminérgicos no perímetro dos núcleos motores do nervo vago, dos núcleos do trato solitário e os neurônios dispersos na radiação tegmentar da substância cinzenta periaquedutal.

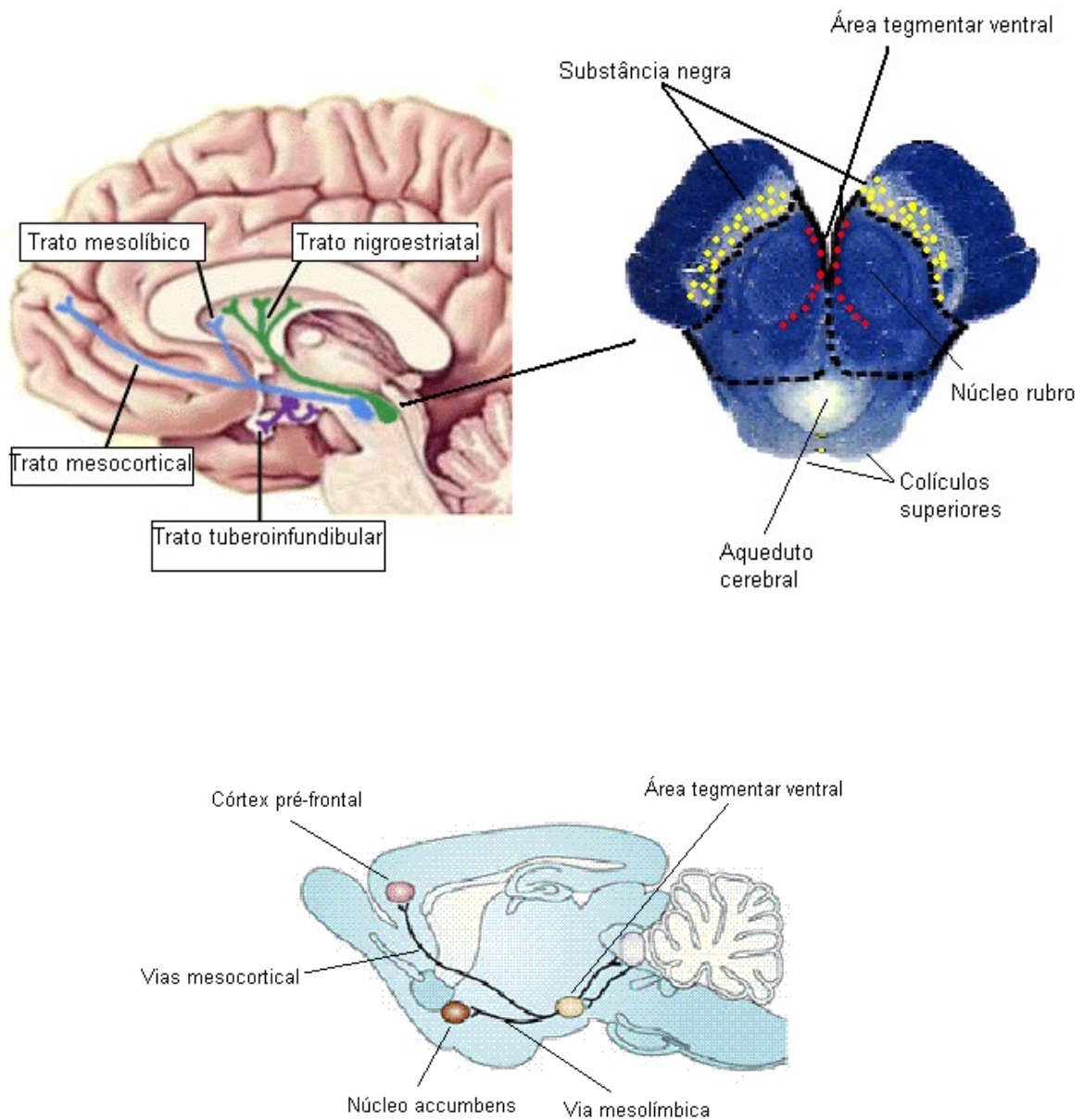
- **Vias longas:** *via nigrostriatal* (Fig. 03), projetando-se da substância negra (A9) para o neostriado, principalmente, caudado e putâmen. Esta via é importante no controle motor e a degeneração de seus neurônios causa o mal de Parkinson; *via mesocorticolímbica* (Fig. 03), projeta-se da área tegmentar ventral (A8 e A10) para estruturas subcorticais límbicas (núcleo accumbens, septum, corpo amigdalóide) e áreas corticais (córtex piriforme, córtex pré-frontal e córtex entorrinal).

#### 1.4.1.1) Sistema mesocorticolímbico

Este sistema pode ser subdividido em dois: *sistema mesolímbico*, com projeções para estruturas subcorticais, principalmente, núcleo accumbens; *sistema mesocortical*, cujas projeções atingem áreas corticais, sobretudo, o CPF (Simon et al., 1978; Swanson, 1982). Na área tegmentar ventral (ATV), os corpos neuronais localizados no núcleo *paranigralis*, formam o sistema mesolímbico, enquanto que, neurônios localizados no núcleo *parabrachialis pigmentosus*, formam o sistema mesocortical (Berger et al., 1976; Swanson et al., 1982), caracterizando uma importante topografia nessa região.

O CPF recebe grande parte das projeções mesocorticais (Fig. 03) (Berger et al., 1976; Carr et al., 1999). Sua distribuição é laminar, atingindo todas as camadas corticais, principalmente as mais inferiores (V e VI) (Berger, 1988, 1991). Os neurônios piramidais são os alvos preferenciais dessas aferências, mas também, há importantes projeções para interneurônios gabaérgicos (Goldman-Rakic et al., 1989; Benes et al., 1993).

## Vias Dopaminérgicas



**Figura 03-** No painel superior, são vistas as vias dopaminérgica mesocorticolímbica e nigrostriatal em cérebro humano (extraído da Internet e modificado: [thebrain.mcgill.ca/.../a\\_03\\_cl\\_que.html](http://thebrain.mcgill.ca/.../a_03_cl_que.html)). Além disso, mostra um corte coronal do mesencéfalo ao nível dos colículos superiores (extraído e modificado de Nolte, 1993). Destaca-se a localização da área tegmentar ventral (marcada em vermelho) e a substância negra (marcada

em amarelo). No painel inferior, São vistas a via mesocorticolímbica em cerebros de ratos (extraído da internet e modificado: [www.nature.com/.../v5/n1/fig\\_tab/nrn1298\\_F2.html](http://www.nature.com/.../v5/n1/fig_tab/nrn1298_F2.html)).

O número de fibras dopaminérgicas que atingem o CPF, é menor do que aquelas que se projetam para o núcleo accumbens (NAC) e estriado (Kolb, 1984; Garris, 1993). Entretanto, a concentração de DA em seu compartimento extracelular é bem maior. Isso se deve, principalmente, a três motivos: 1) os neurônios mesocorticais apresentam uma frequência de disparo elevado (Hoffman et al., 1998); 2) no CPF, há uma menor quantidade de recaptadores de DA, do que nas outras estruturas (Sesack, 1998); 3) no CPF, é observado um baixo número de autorreceptores. Desta forma, a atividade dopaminérgica no CPF depende, quase que exclusivamente, de suas taxas de liberação, determinadas pela frequência de disparos dos neurônios mesocorticais. No NAC e estriado, as taxas de recaptação e mecanismos autorreceptores são mais importantes para determinar a atividade dopaminérgica (Garris e Wightman, 1994).

A ATV recebe projeções recíprocas do CPF. Essas eferências corticais terminam em interneurônios gabaérgicos que controlam neurônios da via mesolímbica e, ainda, terminam diretamente nos neurônios dopaminérgicos mesocorticais. De acordo com algumas evidências recentes, esse padrão de inervação ATV-CPF-ATV pode relacionar-se com aspectos importantes da aprendizagem e das funções do CPF como um todo (Schultz, 1997; Briand, et al., 2007).

#### **1.4.2) Receptores dopaminérgicos**

Em 1979, Keabian e Calne descobriram que a DA promove seus efeitos, atuando em receptores metabotrópicos ligados à proteína G. Inicialmente, foram identificados: D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Durante 10 anos, a atividade dopaminérgica foi atribuída exclusivamente a eles. Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, outros receptores foram descobertos. Primeiramente, a busca pela clonagem do D<sub>2</sub> revelou a existência de duas variações desse mesmo tipo de receptor, cuja diferença básica reside na extensão de suas estruturas primárias: D<sub>2</sub> curto e D<sub>2</sub> longo. Logo em seguida,

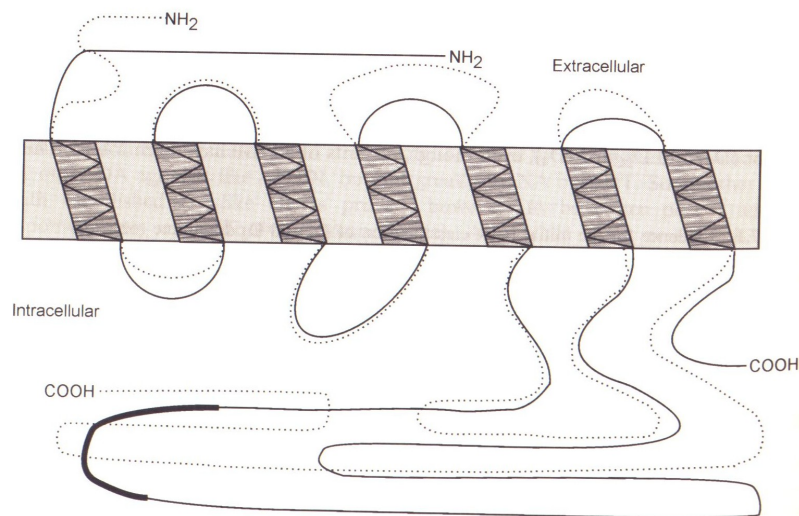
dois outros tipos foram identificados: D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> (Sokoloff et al., 1990), nomeados de acordo com a ordem de suas descobertas. Mais tarde, um quinto receptor foi identificado: D<sub>5</sub> (Cooper, 1996). Considerando algumas características desses receptores, tais como, estrutura primária, farmacologia e mecanismo de ação, pode-se dividi-los em duas famílias: família D<sub>1</sub>, na qual são incluídos D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>; e família D<sub>2</sub>, formada pelos tipos D<sub>2</sub> (longo e curto), D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> (Webster, 2001). A estrutura geral dos receptores dopaminérgicos pode ser vista na figura 04.

Há diferenças na estrutura primária entre todos os tipos de receptor. Entretanto, entre aqueles pertencentes a uma mesma família, essas diferenças são menores. Nos domínios transmembrânicos, os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> são 79% idênticos. Quando comparados a família D<sub>2</sub>, esta semelhança situa-se, em torno, de 40%. Por outro lado, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>, são, respectivamente, 75% e 51% idênticos a D<sub>2</sub> (Fig. 04) (O' Dowd, 1989).

Inicialmente, a divisão em famílias dos receptores dopaminérgicos baseava-se basicamente no tipo de proteína G com a qual os receptores interagem. Foi proposto, que a família D<sub>1</sub> acoplava-se de modo importante a proteína G<sub>s</sub> e, portanto, estimula a adenil ciclase. Por outro lado, a família D<sub>2</sub> ligava-se a proteína G<sub>i</sub>, inibindo a adenil ciclase (Cooper, 1996). Essas seriam as principais ações desses receptores. Porém, atualmente, outras ações celulares importantes lhes são atribuídas. O receptor D<sub>1</sub> liga-se também a proteína G<sub>q</sub>, ativando sistemas de fosfolípides da membrana e, ainda, estimula diretamente correntes de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup> da membrana plasmática (efeito despolarizante). Por outro lado, o tipo D<sub>2</sub> parece promover diretamente a abertura de canais de potássio (efeito hiperpolarizante) e a inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes (isto pode estar ligado a sua ação autorreceptora) (Cooper, 2001; Seamans e Yang, 2004).

Os receptores dopaminérgicos, por si só, não induzem grandes alterações em correntes iônicas pós-sinápticas. Na verdade, suas principais ações eletrofisiológicas dependem de interações com canais iônicos ou receptores de outros neurotransmissores, o que indica uma ação principalmente modulatória da DA (Seamans e Yang, 2004).

## Receptor Dopaminérgico



**Figura 04**– Ilustração da estrutura dos receptores dopaminérgicos. Em pontilhado, a representação da estrutura dos receptores da família D<sub>1</sub>. Em linha contínua, a estrutura dos receptores da família D<sub>2</sub>. Destaque para os terminais carboxi (mais longo na família D<sub>1</sub>) e amina (mais curtos na família D<sub>1</sub>), além do terceira alça intracelular desses receptores (mais longo na família D<sub>2</sub>). Essas diferenças estruturais estão relacionadas tanto com a interação com a proteína G, como também com as diferenças farmacológicas existentes entre as famílias D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (extraído de Webster, 2001).

### 1.4.2.1) Farmacologia dos receptores dopaminérgicos

Nos domínios transmembrânicos, há, pelo menos, 21 resíduos de aminoácidos que diferenciam as duas famílias. Essas diferenças influenciam no reconhecimento de ligantes, sendo, portanto, responsáveis pelas diferenças farmacológicas. A família D<sub>1</sub> apresenta alta afinidade pelo antagonista benzazepina (SCH23390), enquanto que a família D<sub>2</sub> apresenta alta afinidade por outro antagonista, a espiperona (Levesque et al., 1992). Esses fatos demonstram uma semelhança farmacológica entre os membros de uma mesma família de receptor. As tabelas 02 e 03 relacionam, respectivamente, os principais antagonistas e agonistas dopaminérgicos e suas constantes de dissociação pelos receptores dopaminérgicos.

Farmacologicamente, os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> não podem ser diferenciados, entretanto, D<sub>5</sub> possui, aproximadamente, 100 vezes mais

afinidade pela DA do que D<sub>1</sub> (Cooper, 1996). Em contraste, entre os receptores pertencentes à família D<sub>2</sub> tais diferenças são observadas. A maioria dos antipsicóticos liga-se a D<sub>2</sub> com afinidade muito maior do que a D<sub>3</sub> ou D<sub>4</sub> (Cooper, 1996). Por exemplo, a sulpirida, um antipsicótico atípico, apresenta alta seletividade por D<sub>2</sub>, atuando como antagonista (webster, 2001).

A clozapina, um antipsicótico atípico, é um antagonista que possui alta afinidade pelo receptor D<sub>4</sub>. Na esquizofrenia, esse composto é administrado em concentrações 10 vezes menores do que o necessário para agir em outros receptores D<sub>2</sub>, indicando que suas ações antipsicóticas ocorrem, possivelmente, por antagonismo D<sub>4</sub>. Alguns fatos reforçam essa hipótese. Por exemplo, a clozapina não causa efeitos extrapiramidais como muitos antipsicóticos (típicos) que agem, primariamente, em D<sub>2</sub> (Van Tol et al., 1991) e, ainda, em esquizofrênicos, a densidade de receptores D<sub>4</sub> é maior, quando comparados a pessoas normais (Seeman et al., 1995). Tais evidências sugerem uma participação importante desse tipo de receptor na gênese da esquizofrenia.

**Tabela 02** – Antagonistas dopaminérgicos: constante de dissociação para os receptores da família D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (extraído de Bloom e Kupfer, 1995).

<b>Antagonista</b>	<b>Família D1</b>		<b>Família D2</b>		
	<b>D1</b>	<b>D5</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D5</b>
Clorpromazina	94	133	3	4,4	35
Clozapina	172	331	229	174	21
Haloperidol	55	98	1,2	4	2,3
Olozapina	-	-	45	-	27
SCH23390	0,17	0,3	1.690	780	3.000
Sulpirida-S- (-)	57.000	34.500	15	13	1.005

**Tabela 03** – Agonistas dopaminérgicos: constante de dissociação para os receptores da família D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (extraído de Bloom e Kupfer, 1995).

Agonista	Estado funcional	Família D1		Família D2		
		D1	D5	D2	D3	D5
Apomorfina	Alto	0,7	0,7	-	-	-
	Baixo	206	252	127		
Bromocriptina		439	454	4,8	4,8	285
Dopamina	Alto	0,9	18	7,5	4	30
	Baixo	383	228	4.300	31	150
Quinpirole	Alto	1.200	-	4,8	4,8	-
	Baixo	4.200	50.000	3.680	3.680	-
SKF38393	Alto	1,1	0,5	157	-	-
	Baixo	381	80	8.800	9.560	5.000

\* Estado de afinidade do agonista com o receptor.

#### 1.4.2.2) Distribuição dos receptores no Sistema Nervoso Central

Os receptores dopaminérgicos possuem uma ampla distribuição pelo SNC (Mansour et al., 1990). Altas densidades de RNAm para D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> podem ser encontrados no caudado-putâmen, NAC e tubérculo olfatório. Em menor densidade, são encontrados no septum, hipotálamo e córtex cerebral. Já, na ATV e substância negra, o RNAm para D<sub>2</sub> é encontrado em alta densidade, o que não ocorre com D<sub>1</sub> (Weiner et al., 1989). Esse fato sugere uma ação autorreceptora de D<sub>2</sub> nas vias mesolímbicas e nigrostriatal. RNAm para D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub> podem ser encontrados, basicamente, em todas as regiões onde D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> estão presentes, porém em densidades duas ou três vezes menores (Sokoloff et al. 1990; Van Tol et al., 1991).

Os receptores D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> estão associados a estruturas límbicas, especialmente, em áreas que recebem projeções da ATV. Estão envolvidos com cognição, emoção e secreção endócrina. Já, D<sub>5</sub> é encontrado principalmente no hipotálamo, hipocampo e núcleo parafascicular do tálamo,

envolvido com afeto, nocicepção e secreção endócrina (Meador-Woodruff et al., 1992).

#### 1.4.2.3) *Distribuição dos receptores DA no Córtex Pré-frontal*

Todos os tipos de receptores dopaminérgicos estão presentes no CPF, porém suas densidades e distribuições diferem entre si (Goldman-Rakic et al., 1990). A densidade dos tipos D<sub>3</sub> (Sokoloff et al., 1990) e D<sub>5</sub> (Sunahara et al., 1991) são muito baixas, se não, desprezíveis. Desta forma, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub> ganham maior importância nessa região cortical.

O receptor D<sub>1</sub> é, pelo menos, vinte vezes mais denso no CPF do que D<sub>2</sub> ou D<sub>4</sub> (Goldman-Rackic et al., 2000). Está presente em todas as camadas corticais, com maior densidade nas camadas mais superiores (I, II e III). É encontrado em dendritos e axônios de interneurônios gabaérgicos e, principalmente, em espinhos dendríticos de neurônios piramidais, importante local de interação sináptica (Goldman-Rakic et al., 1990; Vincent et al., 1993; Seamans e Yang, 2004).

Apesar da menor densidade em relação a D<sub>1</sub>, o receptor D<sub>2</sub> está presente no CPF em quantidade considerável. Localiza-se quase que exclusivamente na camada V, em neurônios piramidais e interneurônios gabaérgicos que se projetam para o estriado e outras áreas corticais (Goldman-Rackic et al., 1990; Vincent et al., 1993).

Dados obtidos através de estudos em humanos, primatas não-humanos e roedores, demonstram que o CPF também possui níveis consideráveis de receptores D<sub>4</sub> (Arino et al., 1997). É a única região cortical onde esse tipo pode ser encontrado de forma consistente. Estão presentes principalmente nas camadas mais inferiores (V e VI), tanto nos neurônios piramidais, como nos interneurônios gabaérgicos, sendo esse último tipo celular o sítio principal de sua localização (Meador-Woodruff et al., 1992).

#### **1.4.3) Sistema Mesocortical e a Memória Operacional**

A DA tem sido associada a inúmeras funções no SNC, como motivação, recompensa, afetividade e movimento. Todas essas funções,



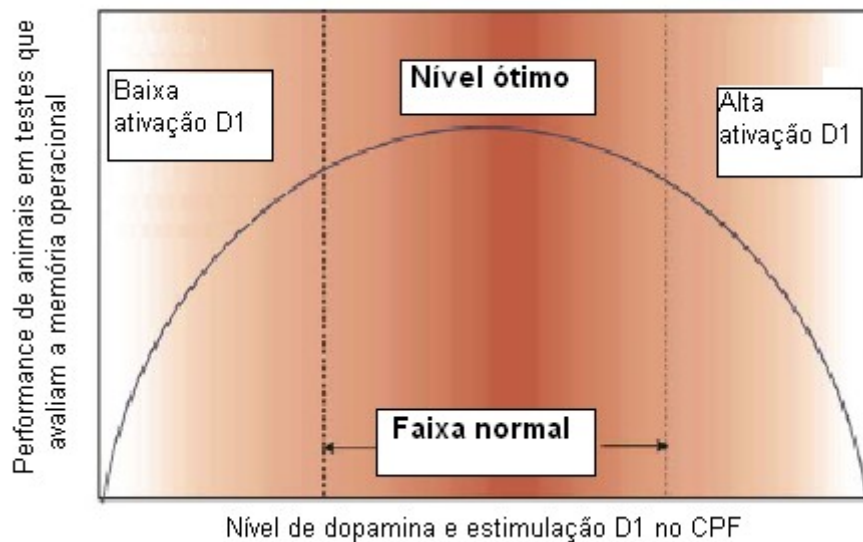
quando alteradas, podem influenciar o rendimento de animais em testes cognitivos. Porém, inúmeros estudos relacionam diretamente alterações da transmissão dopaminérgica no CPF com déficits em testes cognitivos (Brozoski et al., 1979; Muller et al., 1998). Por exemplo, a diminuição da atividade dopaminérgica, causada pela infusão da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) no CPF, prejudica a MO espacial em animais (Murphy et al., 1996; Arnsten, 1998). Por outro lado, a estimulação excessiva dos receptores dopaminérgicos também prejudica as funções cognitivas do CPF (Murphy et al., 1996; Arnsten, 1998). Em primatas, no início da realização de testes com retardos, o nível de DA no CPF aumenta e pode continuar elevado durante várias sessões (Seamans e Yang, 2004).

Phillips e colaboradores (2004) avaliaram os níveis de DA no CPF de ratos, durante testes com longos retardos (30 minutos) em labirinto radial de 8 braços. Foi verificado que os níveis de DA aumentaram durante a fase de treinamento e permaneceram elevados por vários minutos durante o período de retardo, até retornar à linha de base. Voltou a aumentar na fase de teste propriamente dito e permaneceram elevados alguns minutos após. Estes dados sugerem que a DA no CPF é mais importante na fase de aquisição e utilização das informações necessárias ao teste, mas não na sua retenção. Este padrão aparentemente não se relaciona com a predição de recompensa, mas sim com a demanda de processamento de informações.

Willams e Goldman-Rackic (1995), utilizando análises farmacológicas e anatômicas, verificaram que os campos mnemônicos do CPF são modulados pela DA. Nestas regiões, os neurônios relacionados com a MO possuem alta densidade de receptores dopaminérgicos, especialmente o tipo  $D_1$  (Goldman-Rackic, 2000). A frequência de disparo desses neurônios aumenta com um nível moderado de ativação  $D_1$ , porém diminui com um nível mais baixo ou mais elevado. Esses dados podem ser relacionados a outros encontrados em estudos que analisaram o efeito da ativação  $D_1$  no desempenho de animais em testes cognitivos. A administração, diretamente no CPF, de agonistas e antagonistas  $D_1$  produz melhora no desempenho apenas quando há ativação  $D_1$  moderada. Ativações baixas ou elevadas deste receptor causaram prejuízo nesse desempenho. Obtém-se, portanto, uma curva em U invertido para a ativação  $D_1$  em testes cognitivos (Fig. 05)

(Arnsten et al., 1997; Zart et al., 1997; Goldman-Rackic, 2000; Lindow et al., 2003). Além disso, em análises eletrofisiológicas, os neurônios piramidais do CPF sob bloqueio D<sub>1</sub>, parecem incapazes de responder adequadamente a estímulos dentro de seus campos de memórias. Sendo assim, os receptores D<sub>1</sub> parecem envolvidos no processo de manipulação de informações realizado pelo CPF. Alguns autores sugerem que sua ativação é importante na seleção de estímulos relevantes (Seamans e Yang, 2004).

### Curva em U Invertido



**Figura 05** - Curva em U invertido proposta para a ação dos receptores D<sub>1</sub>, localizados no córtex pré-frontal (extraído e modificado de Seamans e Yang, 2004).

A participação do tipo D<sub>2</sub> nas funções do CPF não está muito bem definida. Os resultados obtidos em estudos sobre a função D<sub>2</sub> na MO são inconsistentes. O uso de antagonistas D<sub>2</sub>, diretamente no CPF, não prejudica esse tipo de memória em diversos modelos experimentais (Sawaguchi e Goldman-Rakic, 1993; Seamans et al., 1998), entretanto, administrações sistêmicas de agonistas e antagonistas D<sub>2</sub> podem causar algum efeito. Por exemplo, administrações sistêmicas de quinpirol, agonista D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>, promovem prejuízo na MO, porém acompanhado de diminuição na atividade motora

(Bushnell, 1993). Já, o uso do antagonista D<sub>2</sub> racloprida, também sistêmico, promove prejuízo, sem alterar a função motora (Didriksen, 1995).

Muitos trabalhos demonstram que o receptor D<sub>4</sub> está também relacionado com a cognição. O uso de antagonistas D<sub>4</sub> melhora o prejuízo na MO induzido tanto pelo estresse agudo (Murphy et al., 1996), quanto pelo tratamento crônico com fenciclidina em macacos (Dulawa et al., 1999; Rubinstein et al., 2001). Xun Wang et al. (2002) sugere que os receptores D<sub>4</sub> atuam na modulação das funções do CPF, diminuindo a transmissão gabaérgica. Age, diretamente, nos interneurônios gabaérgicos e, ainda, na diminuição da condutância dos receptores GABA<sub>A</sub>, localizados nos neurônios piramidais. Entretanto, os receptores D<sub>4</sub> também inibem a transmissão glutamatérgica que atingem os neurônios piramidais do CPF (Rubinstein et al., 2001). Desta forma, a atividade D<sub>4</sub> no CPF pode promover uma ação tanto excitatória, quanto inibitória (Werner et al., 1996), similar à característica multifuncional de D<sub>1</sub> sobre esse sistema (Nicola et al., 2000).

#### **1.4.4) Interações Dopaminérgica e Glutamatérgicas no Córtex Pré-frontal**

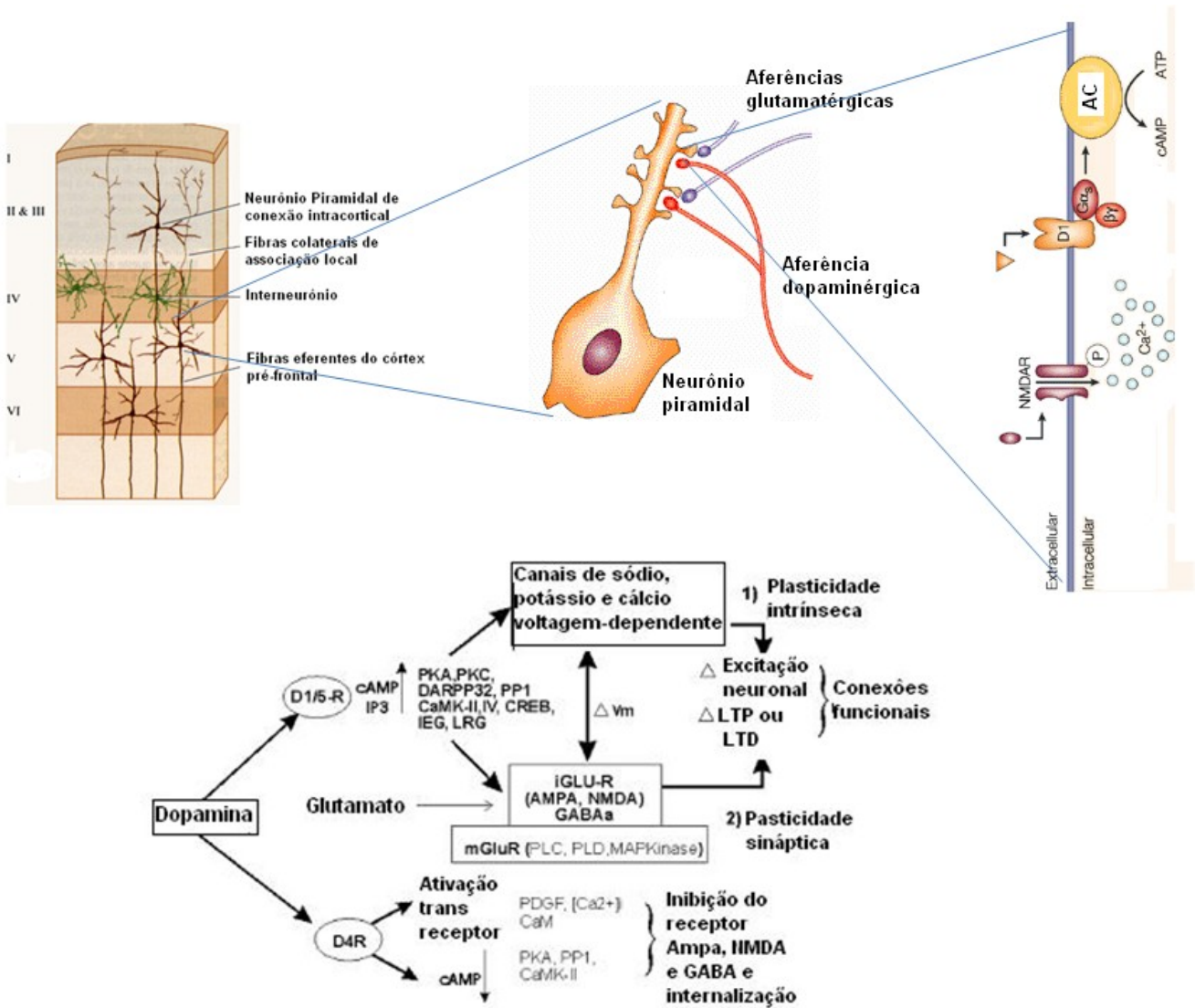
Há uma importante interação no CPF entre as vias aferentes glutamatérgicas e dopaminérgica. Ambas projetam-se para os mesmos tipos celulares, sendo suas sinapses co-localizadas (Carr e Sesack, 1996; Goldman-Rackic et al., 2000). Além disso, há evidências de que o GLU é co-liberado com a DA no CPF pelos neurônios dopaminérgicos da via mesocortical (Seamans e Yang, 2004). Desta forma, há fortes evidências anatômicas para uma interação dopaminérgica e glutamatérgica no CPF (Goldman-Rackic et al., 2000).

Receptores que interagem com a proteína G alteram o funcionamento de diversas proteínas celulares, interferindo assim no metabolismo celular ou nas funções das membranas celulares. No caso dos receptores dopaminérgicos, esses efeitos foram bem estudados tanto em estruturas subcorticais, quanto no CPF. Nesses estudos, fortes evidências encontradas sugerem que a DA tenha uma função tônica modulatória sobre outros sistemas de neurotransmissores que atingem o CPF, especialmente o sistema glutamatérgico (Greengard, 2001; Seamans e Yang, 2004).

As proteínas  $G_s$  e  $G_q$  promovem, via segundos-mensageiros, a ativação de proteínas cinase (PKA e PKC). Estas por sua vez, fosforilam vários elementos intracelulares. Pelo menos em neurônios do estriado e CPF, estas cinases estão envolvidas no controle de dois grupos de proteínas importantes para as ações dopaminérgicas: a proteína relacionada ao receptor dopaminérgico (DARPP-32) e a cálcio calmodulina cinase II e IV (CaMKII e CaMKIV, respectivamente). A fosforilação da DARPP-32 via PKA e PKC inibe a proteína fosfatase 1 (PP-1), uma enzima constitutiva de células em geral e que é responsável pela fosfatação de diversos canais, receptores, enzimas celulares e fatores transcricionais. Por outro lado, a ativação das CaMKII e IV promove ampla fosforilação de elementos celulares. Portanto, a ativação de receptores tipo  $D_1$ , via toda essa cascata enzimática, desvia metabolicamente os terminais sinápticos nos quais estão presentes, a favor da fosforilação de canais, receptores e fatores de transcrição. Já, a ativação de receptores tipo  $D_2$  faz justamente o oposto (Greengard, 2001; Seamans e Yang, 2004).

A fosforilação dos receptores NMDA e AMPA pelas cinases celulares aumentam tanto a frequência de abertura, quanto a condutância iônica quando esses canais são ativados. Desta forma, a fosfatação realizada pela PP-1 nestes receptores diminui a excitação glutamatérgica no neurônio. Como a ativação dos receptores  $D_1$  leva a uma menor atividade da PP-1, eles indiretamente aumentam a quantidade de receptores glutamatérgicos fosforilados, aumentando a excitação neuronal. Por outro lado, os receptores do tipo  $D_2$  diminuem a excitação, pois age na contramão dos receptores  $D_1$ . Portanto, a DA produz efeitos intracelulares que modulam a ação glutamatérgica e este efeito parece ser importante nas funções desempenhadas pela DA no CPF (Seamans e Yang, 2004). A figura 06 resume as principais interações do sistema glutamatérgico e dopaminérgico no CPF.

## Modulação Dopaminérgica do Sistema Glutamatérgico no Córtex Pré-frontal



**Figura 06** – Ilustração da estrutura e mecanismos envolvidos na modulação dopaminérgica do sistema glutamatérgico no córtex pré-frontal. No painel superior, são vistas as camadas e neurônios presentes no córtex pré-frontal (à esquerda), a co-localização dos terminais dopaminérgicos e glutamatérgicos em neurônio piramidal do córtex pré-frontal (central) e os receptores D<sub>1</sub> e NMDA na membrana pós-sináptica (à direita). No painel inferior, é visto um esquema demonstrando as principais ações intracelulares de D<sub>1</sub> na regulação do estado funcional dos neurônios corticais, por vias dependentes dos receptores AMPA, NMDA e GABA, além da via independente por modulações em canais iônicos da membrana (extraído e modificado de Seamans e Yang, 2004).

Embora haja fortes evidências de que o sistema dopaminérgico e glutamatérgico interagem no CPF, nenhum estudo analisou suas interações durante a execução de testes. Todas as evidências existentes foram obtidas *in vitro* ou *in vivo* com diversas abordagens, porém restritas a análises do funcionamento neuronal desta área. Portanto, investigações com abordagens mais funcionais, verificando as interações destes neurotransmissores durante a execução de tarefas, complementariam de modo importante a vasta literatura existente sobre este assunto.

## 2.0) Objetivos

## **2.1) Objetivo Geral**

Examinar a modulação dopaminérgica e glutamatérgica, particularmente mediada pelo receptor NMDA, no córtex pré-frontal medial sobre a memória operacional espacial de ratos.

## **2.2) Objetivos Específicos**

- 1) Investigar os efeitos da interação de diversas doses (curva dose-efeito) do agonista parcial D<sub>1</sub> seletivo, SKF38393, com o antagonista não-competitivo de receptores NMDA, MK-801, administrados diretamente sobre o córtex pré-frontal medial, sobre o desempenho de ratos em tarefas no labirinto radial de 8-braços, envolvendo retardos de 1 h.
- 2) Investigar os efeitos da interação de SCH 23390 com diversas doses (curva dose-efeito) do agonista parcial D<sub>1</sub> seletivo, SKF38393, administrados diretamente sobre o córtex pré-frontal medial, sobre o desempenho de ratos em tarefas no labirinto radial de 8-braços, envolvendo retardos de 1 h.
- 3) Investigar os efeitos da interação de diversas doses (curva dose-efeito) do antagonista D<sub>4</sub>, clozapina, com o antagonista não-competitivo de receptores NMDA, MK-801, administrados diretamente sobre o córtex pré-frontal medial, sobre o desempenho de ratos em tarefas no labirinto radial de 8-braços, envolvendo retardos de 1 h.



## **3.0) Materiais e Métodos**

### 3.1) Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal inicial entre 250 - 350g, provenientes da colônia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – CBM– UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro-escuro natural de, aproximadamente, 12 h (figura 07).



**Figura 07-** Fotografias dos animais nas gaiolas. Em A, é visto um animal em uma gaiola individual. Em B, pode ser vista a disposição das várias gaiolas no biotério.

### 3.2) Drogas

- SKF38393 (SKF, Sigma-Aldrich, MO, USA [1-fenil- 2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina-7,8-diol]), diluído em água destilada nas concentrações de 0,56; 1,8; 5,6 mg/0,5 ml para administrações intracorticais.
- SCH23390 (SCH, Sigma-Aldrich, MO, USA- [(R)-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina]), diluído em água destilada na concentração de 1,0 mg/0,5 ml para administrações intracorticais.
- CLOZAPINA (CZP, Sigma-Aldrich, MO, USA) diluído em ácido clorídrico (HCl) 0,05 N nas concentrações de 0,32; 1,0; 3,2 mg/ 0,5 ml para administrações intracorticais.
- MK-801 (MK, Sigma-Aldrich, MO, USA) diluído em água destilada nas concentrações de 0,32; 1,0; 3,2 mg/0,5 ml para administrações intracorticais.
- Salina (sal) ou HCl 0,05N foram empregados como soluções controles.

### 3.3) Labirinto radial de oito braços

Olton e Samuelson (1976) foram os primeiros a propor o labirinto radial de oito braços com modelo eficaz na avaliação da memória operacional espacial. Desde então, tem sido largamente utilizado na investigação de sistemas neuronais que estão envolvidos na aprendizagem e memória (Olton, 1987; Nakamura et al., 1991). Sua estrutura consiste de uma plataforma central de base octogonal (33 cm de diâmetro), mantida a 1 metro de altura, com 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 4

cm de altura). Na extremidade final de cada braço, encontra-se um receptáculo preto (10 cm de largura e 3 cm de profundidade) no qual é colocado o alimento. Na entrada de cada braço, portas do tipo guilhotina ligadas a fios de nylon permite o controle a distância do acesso aos mesmos. Toda a estrutura do labirinto é constituída de acrílico transparente (Fig. 08).

### **3.4) O ambiente de treinamento**

Uma vez que a memória operacional espacial foi a que se buscou avaliar, todos os 8 braços do labirinto radial eram similares entre si, diferindo apenas por sua localização espacial em relação aos outros braços, o que era sinalizada por estímulos visuais distais fixos (quadros, mesas, portas, etc.) de fácil discriminação e visualização a partir do labirinto.

### **3.5) Aquisição de tarefa**

Foi subdividida em 3 fases, sendo realizada apenas uma sessão diária com o período máximo de permanência no labirinto radial de oito braços de 10 min por sessão:

1. Inicialmente os animais foram colocados no centro do labirinto com todas as portas de acesso aos braços abertos para livre exploração e habituação ao ambiente, durante 10 min por sessão. Pedacos de amendoim foram colocados nos receptáculos para que os animais aprendessem a localizar o reforço no final de cada braço. Os animais foram submetidos à privação parcial de alimento, mantendo o peso corporal, ao longo do experimento, em 80 a 85% do peso inicial. A passagem para a fase seguinte ocorria quando o animal encontrava e consumia o alimento no receptáculo, com, pelo menos, três sessões consecutivas de consumo.

## Labirinto Radial de 8 Braços

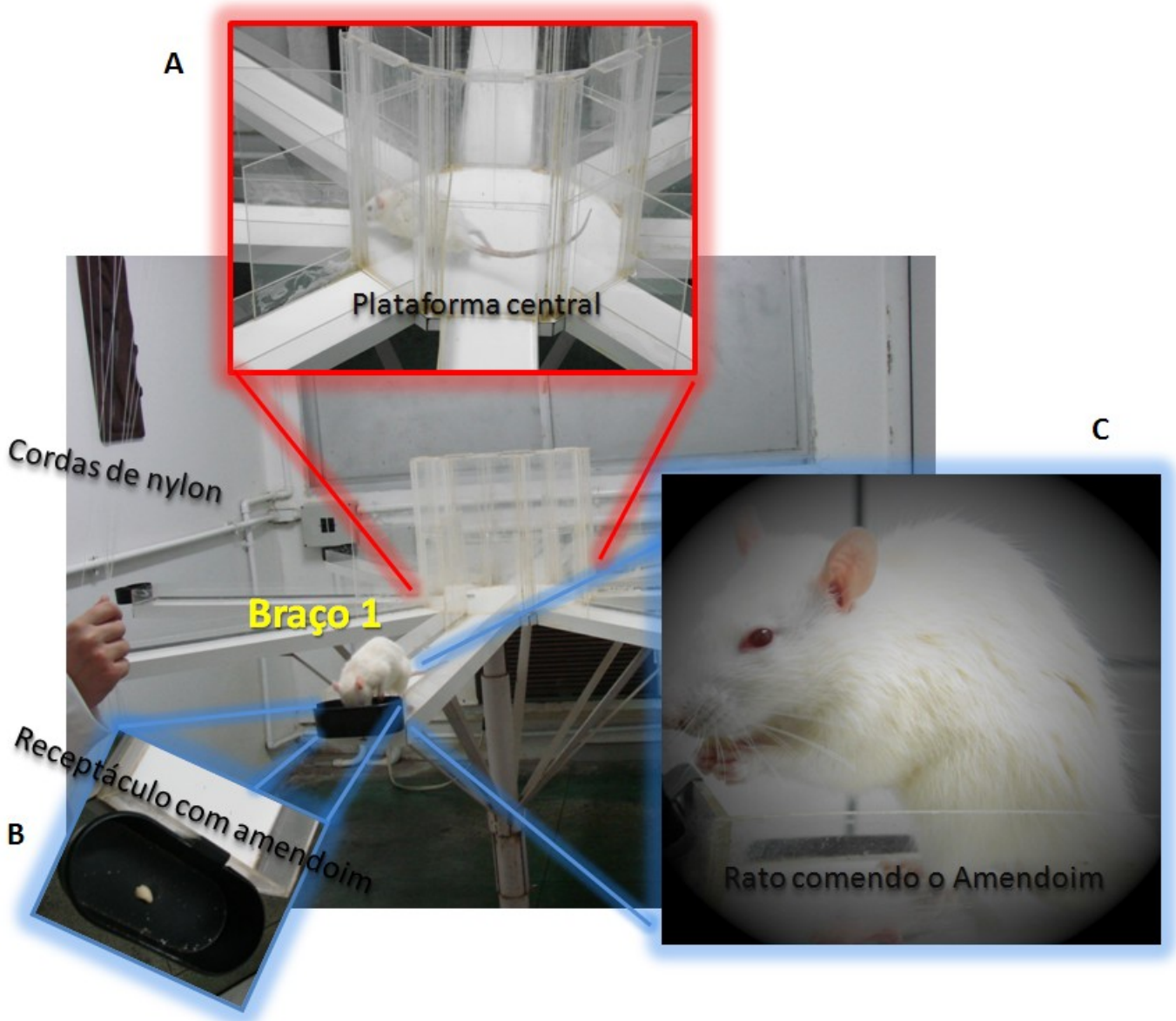


**Figura 08** – Fotografia do labirinto radial de 8-braços. No centro, é visto o labirinto em uma visão de toda a sua estrutura. Nas fotografias laterais são vistos diferentes ângulos do mesmo labirinto, demonstrando as pistas espaciais fixadas na parede ou distribuídas no ambiente. Tais elementos

são fixos e, portanto, não mudam de posição durante todo protocolo experimental. Os números em amarelo correspondem às designações de cada braço, orientadas no sentido anti-horário a partir do braço 1.

2. A finalidade desta fase era a aquisição de tarefa propriamente dita. Todas as portas eram abertas, permitindo o animal escolher qualquer uma das oito portas. Ao entrar em um braço, fechavam-se todas as portas e o animal era, então, recolocado no centro do labirinto, sendo todas as portas abertas novamente. A repetição de um braço já visitado era considerada erro. A passagem para a fase seguinte só ocorria quando o animal alcançasse um desempenho de 0 ou 1 erro por sessão, durante 3 sessões consecutivas. Em média, cada animal foi submetido a 10 sessões de treinamento nesta fase (figura 09).
  
3. Na terceira e última fase, foi introduzido um período de retenção (retardo) entre o quarto e quinto braço visitado. Na primeira etapa da sessão (pré-retardo), apenas 4 portas eram abertas, escolhidas aleatoriamente. Quando o animal entrava em uma das portas abertas todas se fechavam e o mesmo era novamente recolocado no centro do labirinto. Concluída a entrada nos 4 braços previamente escolhidos o animal retornava para gaiola, onde permanecia por 5 s (retardo). A seguir, ele voltava ao centro do labirinto, a fim de desempenhar a segunda etapa (pós-retardo), onde as 8 portas eram abertas. Agora o animal deveria entrar nos 4 braços que ainda não haviam sido visitados. Era considerado erro tanto na etapa de pré- como de pós-retardo, a repetição de um braço anteriormente visitado. Os animais eram treinados até atingirem um critério de 0 ou 1 erro por sessão, em 3 sessões consecutivas. Atingido tal critério os animais

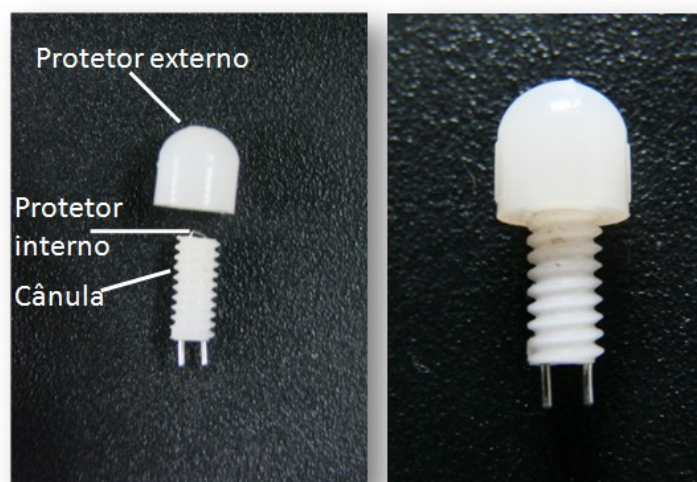
eram submetidos à cirurgia estereotáxica descrita a seguir (figura 13).



**Figura 09**– Fotografia de um rato no labirinto radial de 8-braços durante o treinamento na fase II. No centro, é visto uma visão mais ampla do labirinto no momento em que o rato entrou no braço 1. Destaque para as cordas de nylon utilizadas para comandar a abertura das portas. Na figura A, pode-se ver o rato na plataforma central, poucos instantes antes da abertura das 8 portas pelo treinador. Na figura B, destaca-se o receptáculo contendo o amendoim (reforço). Em C, destaque para o animal se alimentando no final do braço 1, após ter encontrado o reforço..

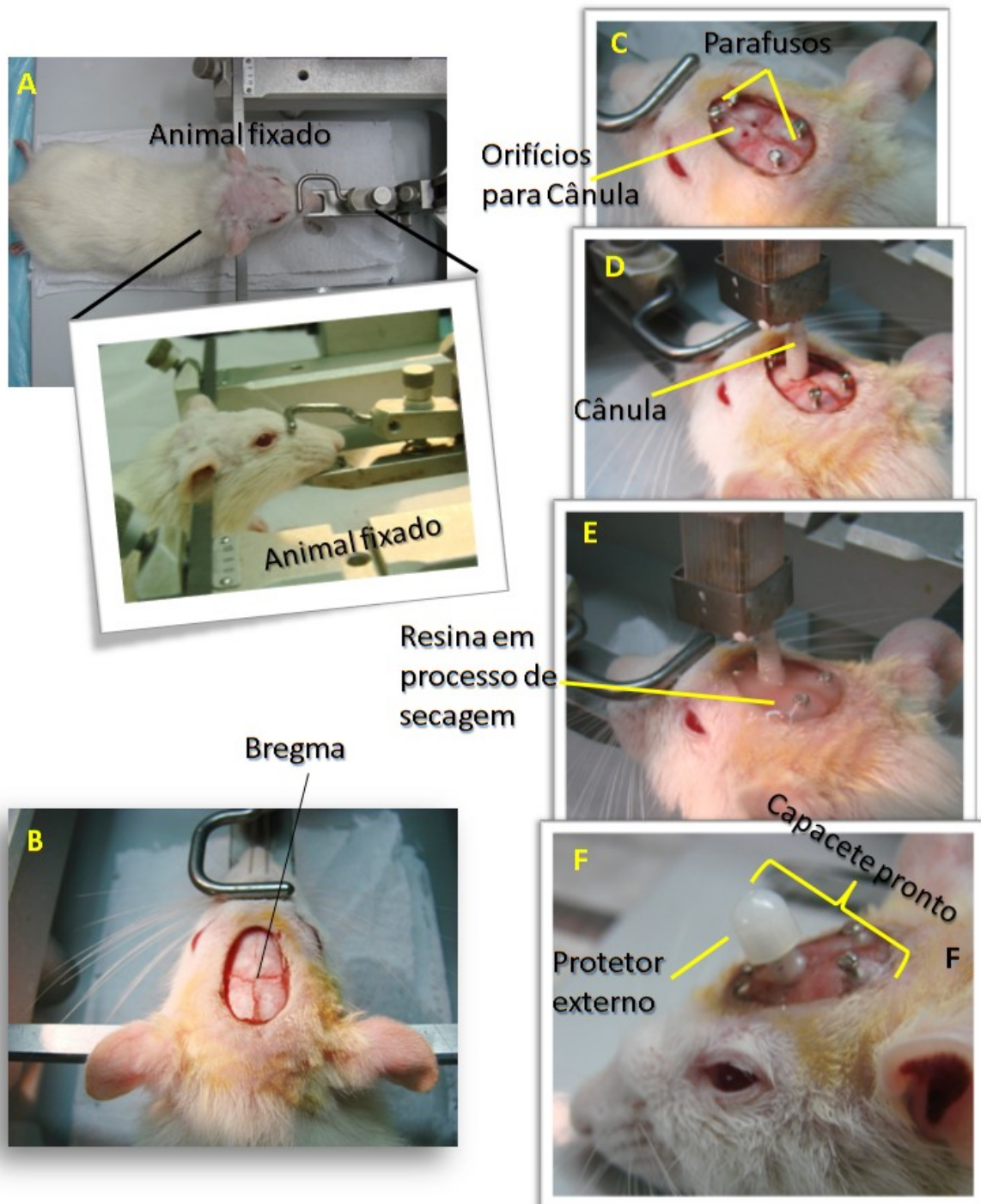
### 3.6) Cirurgia estereotáxica

A cirurgia estereotáxica, a qual os animais foram submetidos, tinha como finalidade implantar cânulas bilaterais de 2 mm de comprimento (Plastics One Inc., 26 GA, VA, USA) no córtex pré-frontal medial (CPFm), para posterior administração de drogas nessa região do SNC (figura 10). Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% administrados por via intraperitoneal (400 mg/kg) e imobilizados em um aparelho estereotáxico (Modelo 51600 Stoelting, IL, USA). Em seguida, foi realizada a tricotomia de toda a parte superior da cabeça e feito um botão anestésico, injetando-se 0,2 ml de lidocaína a 1% de epinefrina no tecido subcutâneo. Uma pequena área ovalada de pele e tecido subcutâneo foi removida expondo a calota craniana na altura do bregma. Após a limpeza e secagem da área exposta, foram feitos 4 orifícios na superfície óssea com o auxílio de uma mini-furadeira (Dremel multipro + Kit, Stoelting, IL, USA) para a fixação de 4 parafusos de metal, dois no osso frontal e dois no osso parietal, para a ancoragem da prótese cirúrgica (figura 11).





**Figura 10-** Fotografia mostrando a cânula bilateral, o protetor interno e externo. No painel da



esquerda, é vista a cânula com o protetor interno acoplado, porém com o protetor externo desacoplado. No painel da direita, a cânula está com o protetor externo acoplado.

**Figura 11** – Cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas bilaterais no CPFm. Em A, é visto, em ângulo superior e lateral, o animal fixado no aparelho estereotáxico. Em B, a calota craniana está exposta, após remoção cirúrgica dos tecidos superficiais. Destaque para a localização de bregma. Em C, podem ser vistos os quatro parafusos implantados e os orifícios no crânio, por onde posteriormente foram implantadas as cânulas. Em D, o implante da cânula bilateral

orientada através do aparelho estereotáxico. Em E, é vista a resina recém cimentada sobre o crânio em processo de secagem. Em F, ao final da cirurgia, o animal foi retirado do estereotáxico. Destaque para o capacete pronto, composto pela cânula bilateralmente implantada, os parafusos de fixação e a resina seca.

Com o crânio posicionado de forma que o bregma e o lambda se situassem no plano horizontal, as cânulas foram implantadas bilateralmente a + 2,5 mm AP, +/- 1 mm L e - 2,7 mm V, em relação a bregma. Após limpeza e secagem, o campo cirúrgico foi preenchido com resina auto-polimerizável de secagem rápida (Polímero de metil metacrilato, Jet, São Paulo, SP, Brasil) soldando as peças em uma prótese sólida. Nos orifícios das cânulas foram colocados protetores internos e o conjunto foi envolvido por uma capa de proteção externa (Plastics One Inc., VA, USA). Ao término da cirurgia, os animais receberam 24000 UI de penicilina G benzatina por via intramuscular. A figura 07 exhibe os componentes da cirurgia (figura 11).

Uma vez recuperados da anestesia, os animais foram transferidos para gaiolas-casas individuais com paredes de acrílico de 3 mm de espessura (25 cm de comprimento, 15 cm de largura e 30 cm de altura). Passado um período mínimo de 3 dias os animais foram treinados no labirinto radial de 8 braços para reaquisição da linha de base de desempenho comportamental (figura 11).

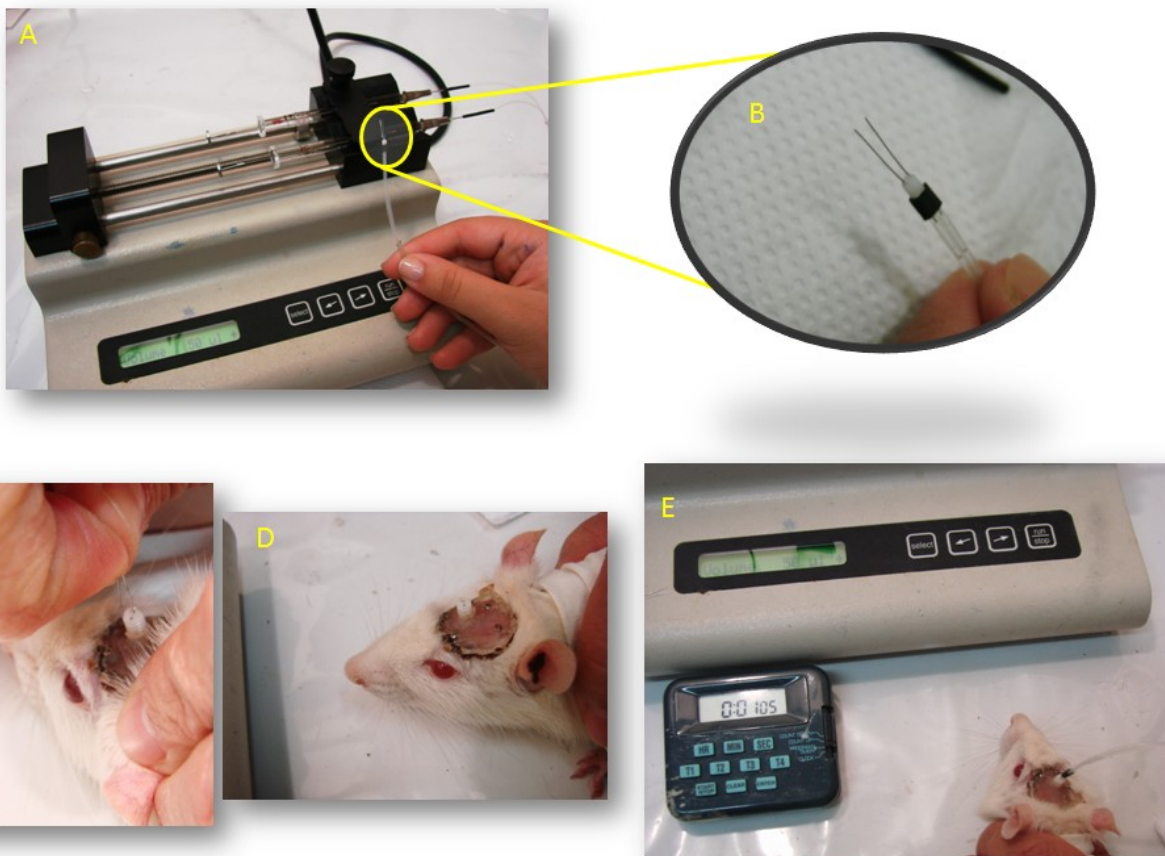
### **3.7) Administração de drogas**

Todas as administrações foram realizadas intracorticalmente (IC), através de cânulas bilaterais implantadas por cirurgia estereotáxica no CPFm. O volume administrado foi de 0,5 µl em cada lado do córtex durante 90 s, permanecendo conectado ao sistema de infusão por outros 90 s para melhor difusão da droga. Este sistema era constituído de duas seringas Hamilton (Stoelting 53431, CO., IL, USA) de 10 µl, acopladas a um sistema de injeção composto por um conector constituído de duas cânulas de polietileno (PE50), sendo a ela adaptada um injetor bilateral de 2,7 mm de comprimento em sua extremidade (Plastics One Inc., VA, USA). Este injetor, por sua vez, encaixa-se com precisão à cânula implantada. O volume e a velocidade de infusão foram

controlados por uma bomba de infusão contínua (Stoelting CO., IL, USA), na qual as seringas Hamilton estavam posicionadas (Fig.12).

Após a primeira infusão, o animal retornava a gaiola, onde permanecia por 10 minutos. Logo após, voltava ao sistema de infusão para receber a segunda administração, semelhante ao descrito anteriormente para a primeira. Na seqüência, voltava à gaiola, onde permanecia por mais 5 minutos e, em seguida, eram colocados no labirinto para avaliação de tarefa com retardos de 1 h. Os braços visitados e o tempo gasto para cada etapa da sessão (pré-retardo e pós-retardo) eram registrados (figura 13).

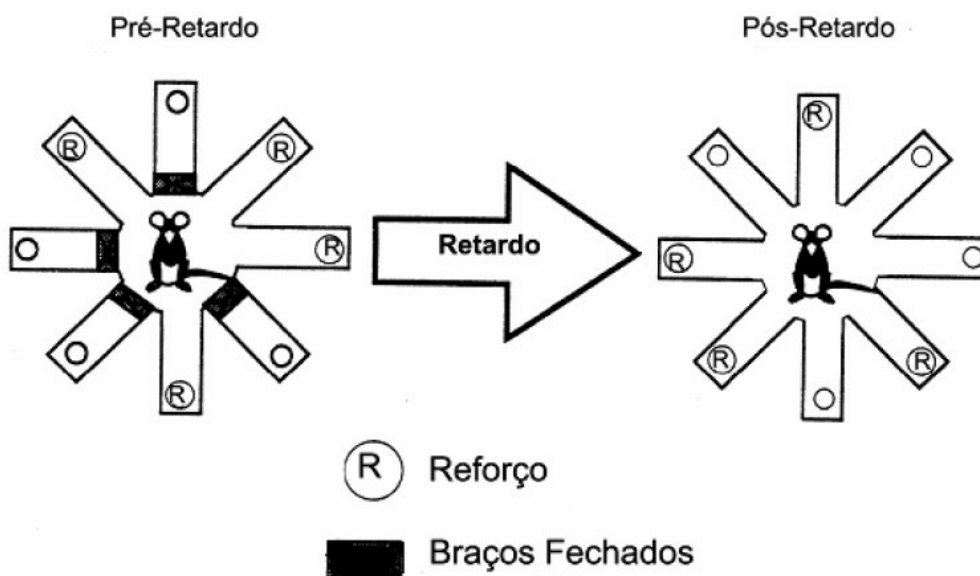
Durante o experimento, apenas uma administração de droga era realizada por dia, com intervalo entre as administrações de 3 a 7 dias, dependendo do tipo da droga utilizada. Neste período, os animais realizavam uma sessão teste, sem droga (sessão interdroga), para verificar se o critério de 0 ou 1 erro por sessão estava mantido. Se o desempenho do animal não estivesse dentro do critério, era, então, treinado até atingir novamente tal critério.



**Figura 12** – Fotografias mostrando os procedimentos para Infusão de drogas diretamente no córtex pré-frontal medial (CPFm). Em A, é visto o sistema de infusão conectado com a bomba de infusão. Em B, o injetor bilateral é mostrado em maiores detalhes. Em C, mostra-se a retirada do protetor interno que protege o lúmen da cânula de possíveis entupimentos. Em D, a animal sem o protetor externo e interno, pronto para se conectar ao sistema de infusão. Em E, o animal está com o injetor inserido na cânula. Neste momento, o animal recebe a infusão da droga diretamente no CPFm.

A definição da seqüência das doses administradas para cada animal presente em uma mesma curva de drogas foi feita através de um método conhecido por **Quadrado Latino**. Este consistiu em uma tabela, na qual se cruzaram as doses utilizadas na curva com os animais que as receberam. Para tanto, criava-se uma tabela com o mesmo número de células, tanto no eixo horizontal, como no eixo vertical. Assim, obtinha-se uma tabela “quadrada”, na qual a quantidade de células era definida pelo número de combinações de drogas existentes na curva. Os animais eram distribuídos nas linhas da tabela, um para cada célula, de tal modo que cada animal possuía uma ordenação específica dos tratamentos.

A utilização do quadrado latino é de grande valia quando se utilizam amostras dependentes como foi o caso desse estudo. Este recurso faz com que os animais passem por seqüências de administrações diferentes entre si, de modo que a primeira dose recebida e as subseqüentes sejam exclusivas para cada animal. Ao final do processo, consegue-se evitar ou minimizar um possível viés de seqüenciamento, comum quando se administram doses em seqüências iguais para todos os animais.



**Figura 13** – Esquema demonstrando os procedimentos na fase III do treinamento, no experimento e nas sessões interdroga. No treinamento e nas sessões interdroga, o retardo foi de 5 segundos. Já no experimento, os procedimentos foram semelhantes, porém com retardo de 1 hora.

### **3.8) Experimento I: efeitos da interação do SKF38393 (agonista parcial D<sub>1</sub> seletivo) e do MK-801 (antagonista não-competitivo de receptor NMDA) infundidos bilateralmente no CPFm sobre a memória operacional espacial de ratos**

Foram utilizados animais (n = 10) previamente treinados no labirinto e com cânulas bilaterais implantadas no CPFm. Receberam uma primeira administração aguda de sal ou SKF nas doses de 0,56; 1,8 ou 5,6 µg IC, bilateralmente. Passados 10 minutos, receberam uma segunda administração aguda de sal ou MK nas doses de 0,32; 1,0 ou 3,2 µg IC, bilateral.

### **3.9) Experimento II: efeitos da interação do SCH23390 (antagonista D<sub>1</sub> seletivo) e do SKF38393 (agonista parcial D<sub>1</sub> seletivo) infundidos bilateralmente no CPFm sobre a memória operacional espacial de ratos**

Foram utilizados animais (n = 7) previamente treinados no labirinto e com cânulas bilaterais implantadas no CPFm. Receberam uma primeira administração aguda de sal ou SCH na dose de 1,0 µg IC, bilateralmente. Passados 10 minutos, receberam uma segunda administração aguda de sal ou SKF nas doses de 0,56 ou 1,8 µg IC bilateral.

### **3.10) Experimento III: efeitos da interação de clozapina (antagonista D<sub>4</sub>) e do MK-801 (antagonista não-competitivo de receptor NMDA) infundidos bilateralmente no CPFm sobre a memória operacional espacial de ratos**

Foram utilizados animais (n = 10) previamente treinados no labirinto e com cânulas bilaterais implantadas no CPFm. Receberam uma primeira administração aguda de HCl ou clozapina nas doses de 0,32; 1,0 ou 3,2 µg IC, bilateral. Passados 10 minutos, receberam uma segunda administração aguda de sal ou MK nas doses de 0,32; 1,0 ou 3,2 µg IC, bilateral.

### **3.11) Avaliação da memória operacional espacial**

Após as administrações de drogas, os animais permaneciam por 5 minutos nas gaiolas e, em seguida, eram submetidos a uma sessão no labirinto com retardos de 1 hora. Os braços visitados e o tempo gasto em cada etapa foram anotados para posterior análise.

### **3.12) Histologia**

Para verificar a localização exata das cânulas, os tecidos imediatamente próximos a elas foram corados e posteriormente analisados. Inicialmente, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral intraperitoneal e, em seguida, infundidos com um volume de 0,5 µl de azul de metileno a 1%, semelhante à administração das drogas descrito anteriormente. Logo após, eram sacrificados sob altas doses do mesmo anestésico e suas cabeças foram removidas após perfusão intracardíaca com solução salina seguida de solução de formaldeído a 8%. Os cérebros foram retirados e conservados em formol a 8% por, no mínimo, 48 h. Através de um vibrátomo (Série 1000 Plus – sistema de secção tecidual – St. Louis, MO, USA), os cérebros foram seccionados em cortes de, aproximadamente, 80 µm e, as lâminas obtidas foram coradas com vermelho neutro. A localização das cânulas foi visualizada por meio de um microscópio óptico e determinada em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

### **3.13) Análise de resultados**

#### **3.13.1) Aquisição de tarefas**

O desempenho dos animais na fase de aquisição de tarefa no Labirinto foi avaliado pela análise dos erros cometidos e do tempo gasto em cada braço visitado em uma sessão de treinamento. Os erros foram definidos como a repetição de braços já visitados em uma mesma sessão de treinamento e são apresentados na forma de média de erros  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m).

A análise do tempo gasto em cada braço foi feita dividindo-se o tempo total de permanência no labirinto (em segundos) pelo número de braços visitados e apresentados na forma de média  $\pm$  e.p.m.

Tanto para avaliação dos erros cometidos como do tempo gasto em cada braço nas 10 sessões de aquisição da tarefa foram empregadas análises de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, seguida do teste de Fisher para localização das diferenças estatisticamente significantes, tendo sido adotado um nível de significância de 5% (Zar, 1999). Ainda, utilizou-se uma análise de regressão linear para verificar se houve uma diminuição progressiva tanto no número de erros, quanto nos tempos de permanência.

### **3.13.2) Experimento I, II e III**

Nestes experimentos também foram considerados o número de erros cometidos e o tempo gasto em cada braço, após administração de droga ou veículo tanto no pré- quanto no pós-retardo de 1 h.

Os erros no pós-retardo foram separados em duas categorias: erros tipo 1 e tipo 2. O primeiro tipo correspondeu aos erros cometidos por reentrada em um braço visitado no pré-retardo. Já, os erros tipo 2 foram aqueles cometidos pela repetição de um braço anteriormente visitado no próprio pós-retardo. Segundo Floresco e colaboradores (1997) cada tipo de erro se relaciona com aspectos diferentes do desempenho dos animais. Os erros tipo 1 são mais relacionados a prejuízos na MO propriamente dita. Por outro lado, o tipo 2 pode indicar prejuízos na memória de referência ou mesmo perseveração de erros. Desta forma, foram feitas as seguintes análises: do número total de erros cometidos no pré-retardo; número total de erros cometidos no pós-retardo e dos tipos de erros cometidos no pós-retardo.

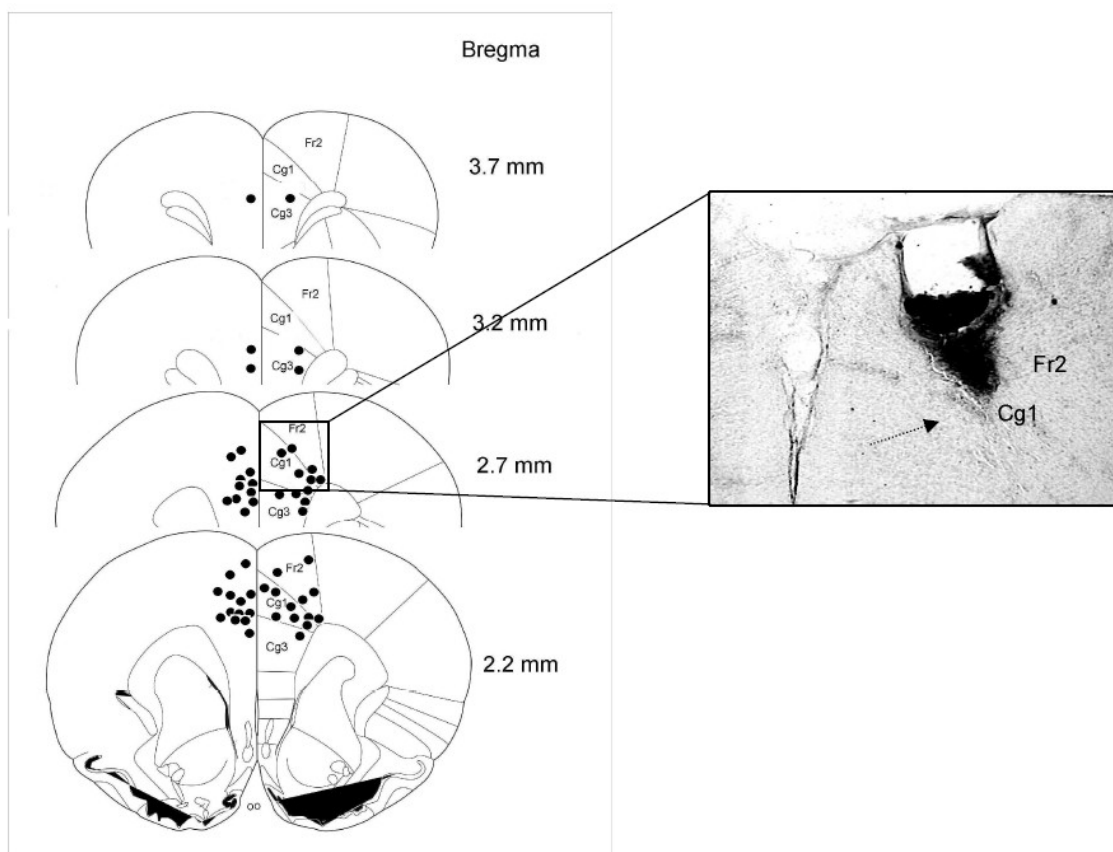
Nos três experimentos, análises estatísticas tanto para o tempo gasto em cada braço, quanto para o número total de erros foi realizada através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida de teste de Fisher. Por outro lado, as análises dos tipos de erros foram feitas através da ANOVA de três vias para medidas repetidas, seguida de teste de Fisher. Em todas as análises, adotou-se um nível de significância de 5% (Zar, 1999).



## 4.0) Resultados

#### 4.1) Localização das cânulas

Os sítios de implantação das cânulas, marcados com azul de metileno 1%, estão ilustrados em diagramas extraídos do Atlas de Paxinos e Watson (1986), como demonstrado abaixo (Fig. 14).



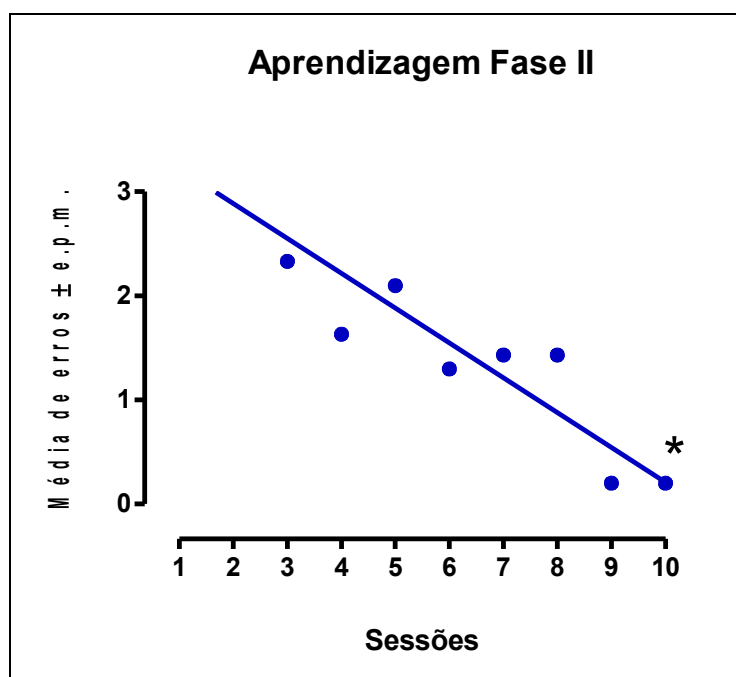
**Figura 14** – Diagramas de cortes histológicos marcados com o posicionamento das cânulas bilaterais (painel da esquerda) e fotomicrografia (destaque à direita), mostrando a localização da extremidade (seta) de uma cânula na área Cg1 em um dos lados do córtex pré-frontal medial.

Observa-se que a maioria das cânulas localizaram-se em Cg1 (Cingulado anterior) e Cg3 (córtex pré-límbico), partes integrantes do CPFm (Zilles e Wree, 1985), especialmente nos cortes 2,7 mm e 2,2 mm nos diagramas de Paxinos e Watson (1986).

## 4.2) Aquisição de tarefa

### 4.2.1) Antes da introdução de retardo (fase II)

Durante o período de treinamento, todos os animais ( $n = 30$ ) apresentaram melhora gradativa do desempenho no labirinto radial, nas dez últimas sessões de treinamento. Houve uma diminuição progressiva do número de erros, atingindo o critério pré-estabelecido para a aprendizagem (Figura 15). A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou uma diferença estatisticamente significativa na comparação do número de erros cometidos entre as sessões [ $F(9,261) = 10,56$ ;  $P < 0,0001$ ]. O teste de Fisher mostrou que, de um modo geral, as três últimas sessões apresentaram uma diminuição significativa ( $P < 0,01$ ) do número de erros, em relação às duas primeiras sessões. A análise de regressão linear também demonstrou um decréscimo do número de erros, estatisticamente significativo, ao longo das sessões [ $Y = 3,5 - 0,33x$ ;  $r = -0,2$ ;  $F(1,298) = 74,94$ ;  $P < 0,0001$ ].



**Figura 15** – Média de erros nas dez últimas sessões de treinamento dos animais na fase II (n = 30). \* P < 0,0001 (Análise de regressão linear).

O tempo gasto em cada braço visitado na fase de aquisição da tarefa, antes da introdução de intervalos de retenção de 5 s (fase II), está demonstrado na Tabela 04.

**Tabela 04** – Média ± e.p.m. do tempo gasto em cada braço visitado, nas 10 últimas sessões da fase II de treinamento no labirinto radial de 8 braços (n = 30).

Tempo gasto (segundos) ± e.p.m. em cada braço			
Sessão	Média ± e.p.m	Sessão	Média ± e.p.m
1	23,97 ± 11,62	6	17,37 ± 5,97**
2	23,70 ± 12,60	7	17,47 ± 8,48**
3	20,80 ± 9,94	8	17,23 ± 6,62**
4	19,80 ± 9,85	9	15,47 ± 4,22**/++
5	19,90 ± 8,70	10	15,57 ± 4,56**/++

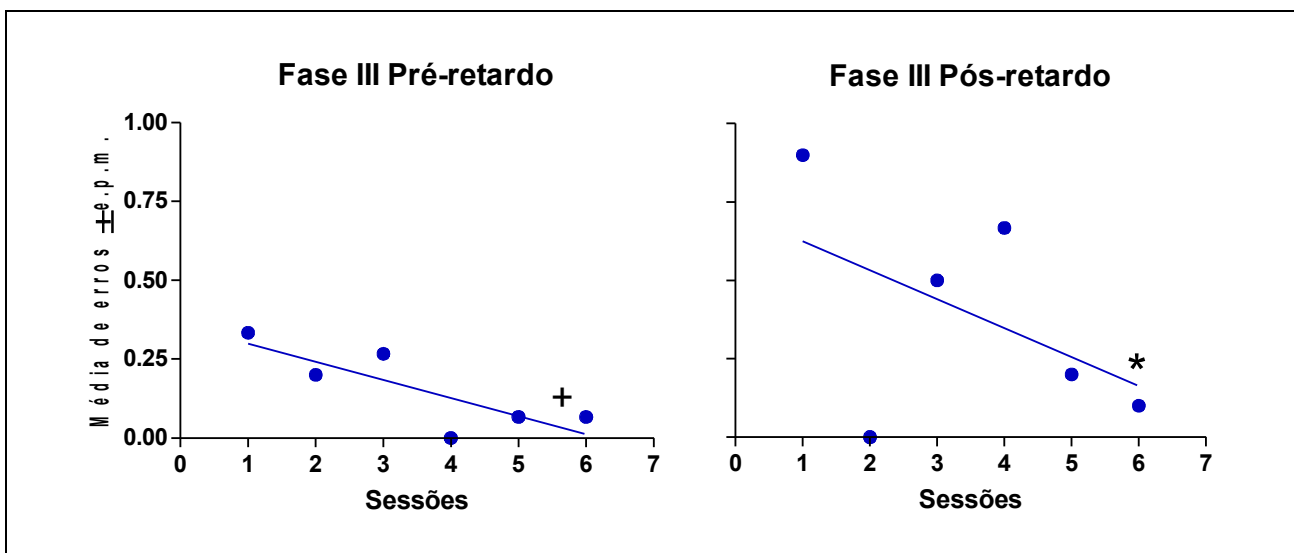
\*\* P < 0,01 comparados à sessões 1 e 2; ++ P < 0,01 comparados às sessões de 3 a 5.

Observou-se uma diminuição progressiva do tempo gasto em cada braço visitado ao longo das dez últimas sessões. A comparação desse tempo, realizada pela ANOVA de uma via para medidas repetidas, demonstrou diferenças estatisticamente significantes [F (9,261) = 7,77; P < 0,0001] entre as sessões (Tabela 04). O teste de Fisher localizou essas diferenças na comparação entre as cinco últimas sessões, em relação às duas primeiras (P < 0,01), e entre as duas últimas sessões, em relação às sessões 3, 4 e 5 (P < 0,01). A análise de regressão linear também demonstrou uma diferença progressiva deste parâmetro [Y = 24,48 – 0,97 x; r = - 0,097; F (1,298) = 32,22; P < 0,0001]. Este resultado é consistente com a melhora do desempenho dos animais no labirinto radial, fato esperado durante o processo de aprendizagem.

#### 4.2.2) Com a introdução do intervalo de retenção de 5 s

Nesta fase, com a introdução do intervalo de retenção (retardos) de 5 s, também foi observado uma melhora progressiva do desempenho dos animais no labirinto radial, nas seis últimas sessões de treinamento.

A ANOVA de uma via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação dos números de erros cometidos no pré-retardo, porém o teste de regressão linear verificou um decréscimo significativo no número de erros no pré-retardo [ $Y = 0,35 - 0,06 x$ ;  $r = -0,03$ ;  $F(1,178) = 7,28$ ;  $P = 0,008$ ] (Fig. 16, painel da esquerda). No pós-retardo, a ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes do número de erros [ $F(5,145) = 3,60$ ;  $P = 0,004$ ] (Figura 16, painel da direita). O teste de Fisher localizou estas diferenças nas comparações entre a primeira e quinta sessão ( $P < 0,05$ ) e, ainda, entre a primeira e a sexta sessão ( $P < 0,01$ ). A análise de regressão linear para o pós-retardo detectou uma diminuição significativa do número de erros [ $Y = 0,71 - 0,09 x$ ;  $r = -0,02$ ;  $F(1,178) = 4,18$ ;  $P = 0,04$ ].



**Figura 16** – Média de erros na fase III do treinamento dos animais. No painel da esquerda é visto o pré-retardo. No painel da direita, está ilustrado o pós-retardo de 5 s ( $n = 30$ ). +  $P = 0,008$ ; \*  $P = 0,04$  (análise de regressão linear).

Em relação ao tempo gasto em cada braço visitado ao longo das sessões, a ANOVA de uma via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no pré-retardo, porém no pós-retardo de 5 s tais diferenças foram detectadas [F (5,145) = 3,21; P = 0,008]. O teste de Fisher as localizou entre a primeira em relação a quinta e a sexta sessão (P < 0,01) e, ainda, entre a segunda comparada a quinta (p < 0,01) e a sexta sessão (P < 0,05). A análise de regressão linear não mostrou uma diminuição progressiva do tempo gasto em cada braço no pré-retardo. Por outro lado, no pós-retardo, foi detectada uma redução progressiva [Y = 17,72 – 0,80 x; r = - 0,04; F (1,178) = 8,32; P = 0,004] e significativa do tempo gasto em cada braço ao longo das sessões (Tabela 05).

**Tabela 05** – Média ± e.p.m. do tempo gasto em cada braço visitado, no pré- e pós-retardo de 5 s, nas 6 últimas sessões da fase III do treinamento no labirinto radial de 8 braços.

Tempo gasto (segundos) ± e.p.m. em cada braço		
Sessão	Pré-retardo	Pós-retardo
1	17,27 ± 9,83	16,70 ± 7,24
2	15,43 ± 4,85	16,17 ± 8,56
3	14,93 ± 3,82	15,47 ± 7,85
4	16,63 ± 8,61	15,33 ± 5,16
5	15,03 ± 5,88	12,67 ± 3,67 **/+
6	18,00 ± 9,82	13,23 ± 4,21 **/+

\*\* P < 0,01 comparados a primeira sessão (pós-retardo); + P < 0,05, ++ P < 0,01 comparados a segunda sessão (pós-retardo).

Ambos os resultados sugerem aquisição satisfatória da tarefa após a interposição de retardos de 5 s, estando de acordo com o descrito na literatura.

### 4.3) Análise dos pesos corporais

Nas dez semanas iniciais, nas quais os animais estavam em treinamento, os pesos corporais foram mensurados e analisados. A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças significantes ao longo das semanas [F(9,261) = 9,52; P < 0,0001]. A aplicação do teste de Fisher revelou que, em relação à primeira semana, o peso corporal dos animais diminuiu significativamente na segunda semana (P < 0,05) e manteve-se baixo da terceira a sexta semana (P < 0,01), porém sem ultrapassar o limite inferior de 85% do peso inicial. Esta diminuição se deve a privação parcial de alimentos que se realiza durante o período de treinamento. Porém, na décima semana, a média do peso dos animais foi superior à primeira semana (P < 0,01), fato esperado, pois está de acordo com a curva natural de crescimento dos animais após o período de privação alimentar. A Tabela 06 ilustra estes resultados.

**Tabela 06** – Média  $\pm$  e.p.m. do peso corporal dos animais nas dez primeiras semanas (n = 30).

Média dos pesos corporais (em gramas) $\pm$ e.p.m.			
Semanas	Média $\pm$ e.p.m	Semanas	Média $\pm$ e.p.m
1	269,27 $\pm$ 12,33	6	263,17 $\pm$ 11,77**
2	263,77 $\pm$ 10,51*	7	265,37 $\pm$ 9,93
3	262,67 $\pm$ 8,56**	8	269,50 $\pm$ 9,94
4	263,00 $\pm$ 8,28**	9	272,43 $\pm$ 10,73
5	260,00 $\pm$ 11,58 **	10	275,27 $\pm$ 13,57**

\* P < 0,05, \*\* P < 0,01 comparados à primeira semana.

### 4.4) Experimento 1: SKF23393 e MK-801

#### 4.4.1) Tempo de permanência no labirinto radial por braço visitado

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou alterações no tempo de permanência dos animais tanto no pré-retardo, quanto no pós-retardo. As médias do tempo de cada interação estão expostas na tabela 07 (pré-retardo) e 08 (pós-retardo).

**Tabela 07** – Média  $\pm$  e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no desempenho do pré-retardo no labirinto radial de 8 braços sob as diferentes combinações de salina (sal) ou das doses de SKF38393 (SKF) seguido de sal ou das diversas doses de MK-801 (MK).

Tempo de permanência por braço visitado Pré-retardo				
Doses de SKF ( $\mu$ g)	Doses de MK ( $\mu$ g)			
	sal	0,32	1,0	3,2
sal	12,1 $\pm$ 1,7	12,3 $\pm$ 1,76	12,1 $\pm$ 1,66	12,8 $\pm$ 2,04
0,56	12,5 $\pm$ 1,91	12,0 $\pm$ 1,41	12,3 $\pm$ 1,33	12,9 $\pm$ 2,23
1,8	11,6 $\pm$ 1,74	13,1 $\pm$ 2,13	12,7 $\pm$ 2,17	12,1 $\pm$ 2,74
5,6	12,3 $\pm$ 1,82	11,3 $\pm$ 0,94	12,2 $\pm$ 1,98	13,0 $\pm$ 1,85

**Tabela 08** – Média  $\pm$  e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no desempenho do pós-retardo de 1 h no labirinto radial de 8 braços sob as diferentes combinações de salina (sal) ou das doses de SKF38393 (SKF) seguido de sal ou das diversas doses de MK-801 (MK).

Tempo de permanência por braço visitado Pós-retardo				
Doses de SKF ( $\mu$ g)	Doses de MK ( $\mu$ g)			
	sal	0,32	1,0	3,2
sal	12,7 $\pm$ 1,62	12,5 $\pm$ 2,24	12,1 $\pm$ 1,66	12,8 $\pm$ 2,04
0,56	12,6 $\pm$ 2,01	11,9 $\pm$ 1,66	11,7 $\pm$ 1,85	12,5 $\pm$ 2,56
1,8	13,1 $\pm$ 2,16	11,9 $\pm$ 1,76	13,0 $\pm$ 2,60	12,1 $\pm$ 1,55
5,6	12,6 $\pm$ 2,16	12,0 $\pm$ 1,41	11,9 $\pm$ 2,12	12,0 $\pm$ 1,51



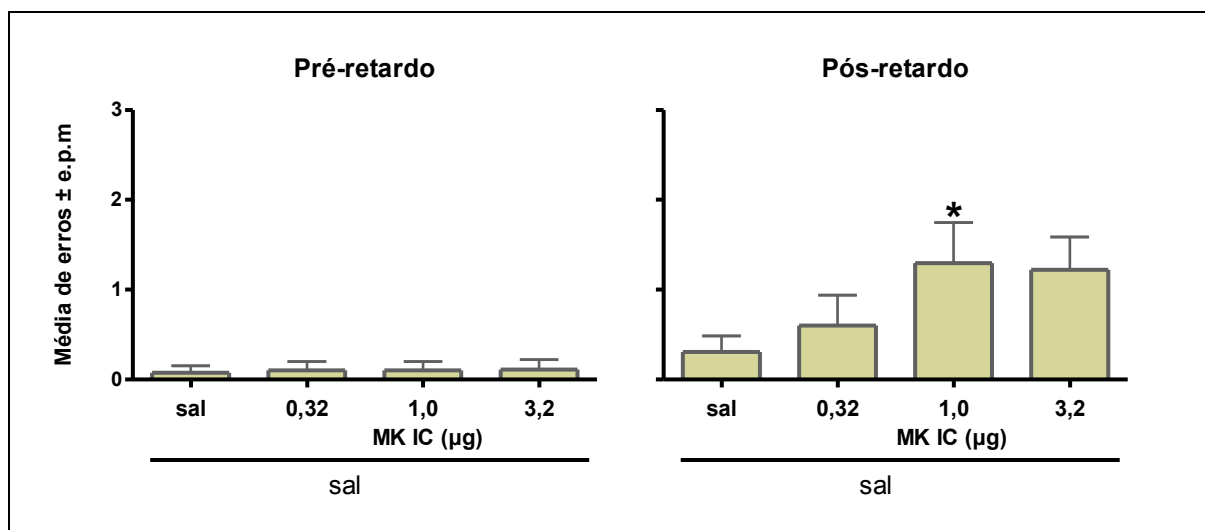
#### 4.4.2) Total de erros no pré-retardo e no pós-retardo

No pré-retardo, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes no número total de erros dos animais somente nas análises entre os grupos [ $F(9,126) = 2,14$ ;  $P = 0,03$ ]. O teste *post-hoc* de Fisher não localizou diferenças estatísticas entre nenhuma das diversas combinações de drogas e o tratamento controle (sal seguido de sal). Entretanto, algumas combinações foram diferentes entre si. A combinação de SKF 0,56  $\mu\text{g}$  seguido de sal apresentou um maior número de erros no pré-retardo em relação aos tratamentos SKF 0,56  $\mu\text{g}$  seguido de MK 0,32  $\mu\text{g}$  ou 1,0  $\mu\text{g}$  ( $P < 0,05$ ). Além disso, o tratamento SKF 1,8  $\mu\text{g}$  seguido de SAL também apresentou mais erros no pré-retardo em relação ao tratamento SKF 1,8  $\mu\text{g}$  combinado com MK 3,2  $\mu\text{g}$  ( $P < 0,05$ ).

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas também detectou diferenças significantes na análise do número total de erros no pós-retardo de 1 h nas análises entre os grupos [ $F(3,138) = 2,86$ ;  $P = 0,048$ ] e intragrupo [ $F(9,126) = 2,31$ ;  $P = 0,019$ ]. O teste de Fisher localizou tais diferenças estatísticas entre diversos tratamentos, que serão a seguir apresentados separadamente para uma melhor compreensão.

##### 4.4.2.1) MK-801(MK)

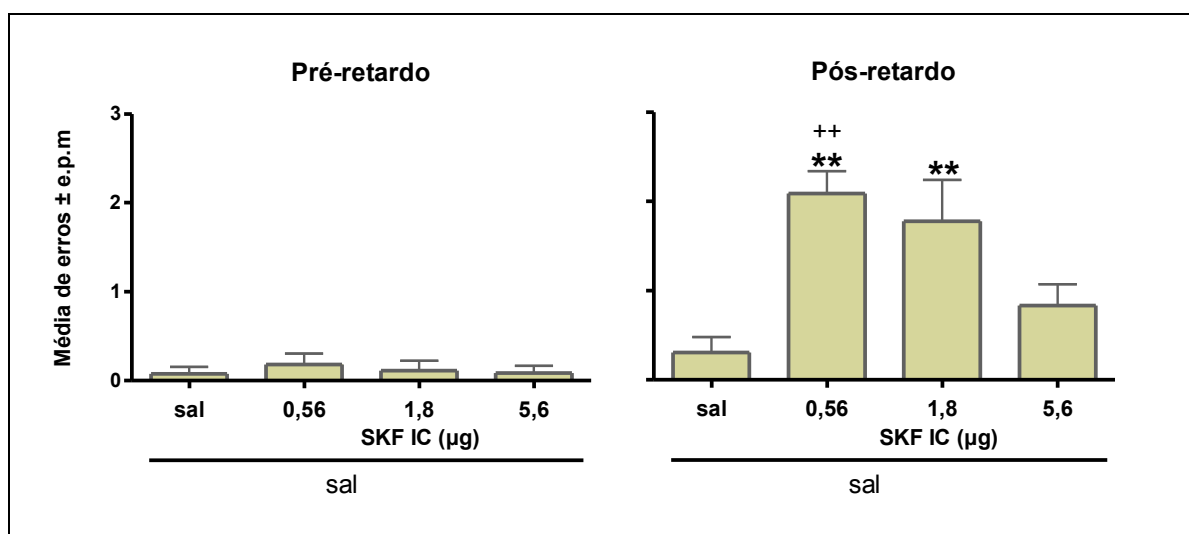
Dentre os tratamentos que combinaram sal seguido de sal ou das diferentes doses de MK, somente a combinação que utilizou MK na dose de 1,0  $\mu\text{g}$  promoveu um aumento do número total de erros no pós-retardo de 1 h de modo estatisticamente significativo em relação ao tratamento controle ( $P < 0,05$ ) (figura 17).



**Figura 17** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK 0,32; 1,0; 3,2 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros. No painel à esquerda, é visto o desempenho no pré-retardo. No painel da direita, está ilustrado o desempenho no pós-retardo. \*  $P < 0,05$  comparado ao tratamento sal seguido de sal (controle).

#### 4.4.2.2) SKF38393 (SKF)

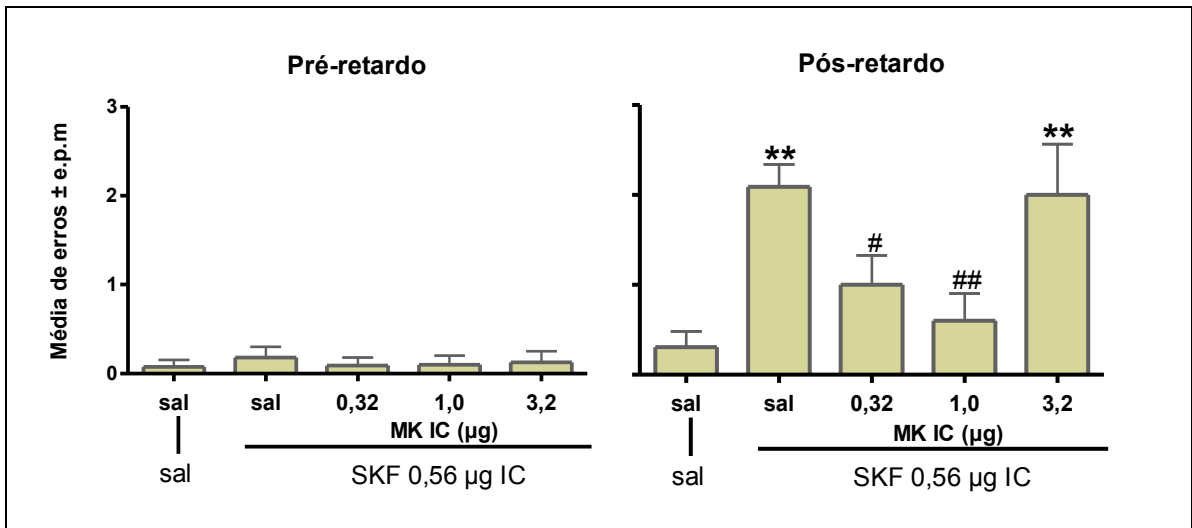
A infusão IC de SKF nas doses de 0,56 µg e 1,8 µg prejudicou significativamente o desempenho dos animais no pós-retardo de 1 h em relação ao grupo controle ( $P < 0,01$ ). Além disso, o tratamento que utilizou a dose de 0,56 µg também apresentou maior número total de erros em relação a combinação de SKF 5,6 µg seguido de sal ( $P < 0,01$ ). Estes resultados são vistos na figura 18.



**Figura 18** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de SKF 38393 (SKF 0,56; 1,8; 5,6 µg) seguidos de sal no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros. No painel da esquerda, é visto o desempenho no pré-retardo. No painel da direita, está ilustrado o desempenho no pós-retardo. \*\* P < 0,01 comparado ao tratamento sal seguido de sal (controle); ++ P < 0,01 comparado ao tratamento com SKF 5,6 µg seguido de sal.

#### 4.4.2.3) Combinações de SKF38393 (SKF) 0,56 µg e diferentes doses de MK-801 (MK)

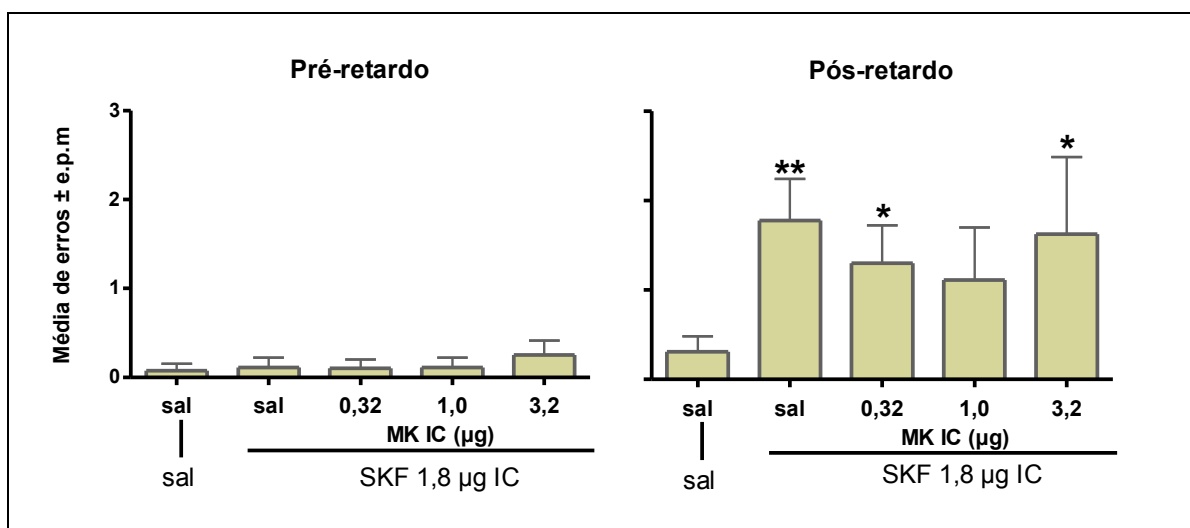
A administração de MK nas doses de 0,32 µg (P < 0,05) e 1,0 µg (P < 0,01), posterior a infusão de SKF 0,56 µg, reverteu significativamente os prejuízos observados com a infusão do agonista D<sub>1</sub>. Por outro lado, a dose de 3,2 µg de MK não promoveu tal reversão, visto que sua interação com o SKF, previamente administrado, promoveu prejuízos significativos quando comparado ao tratamento controle (P < 0,01), na mesma magnitude causada pelo SKF por si só. A figura 19 demonstra estes efeitos.



**Figura 19** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou de SKF 38393 (SKF) na dose de 0,56 µg, seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK) (0,32; 1,0; 3,2 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o total de erros. No painel da esquerda, é visto o desempenho no pré-retardo. No painel da direita, está demonstrado o desempenho no pós-retardo. \*\* P < 0,01 comparado ao tratamento com sal seguido de sal (controle); # P < 0,05, ## P < 0,01 comparado ao tratamento com SKF na dose de 0,56 µg seguido de sal.

#### 4.4.2.4) SKF38393 (SKF) 1,8 µg e diferentes doses de MK-801 (MK)

Nenhum dos tratamentos com MK administrado posteriormente ao SKF alterou-se estatisticamente em relação à combinação de SKF 1,8 µg seguido de sal. Além disso, a utilização das doses de MK 0,32 ou 3,2 µg, posterior ao uso do agonista D<sub>1</sub>, prejudicou o desempenho dos animais em relação ao grupo controle (P < 0,05). Entretanto, o desempenho dos animais tratados com MK 1,0 µg posterior ao SKF não diferiu estatisticamente do tratamento controle, o que sugere uma atenuação dos prejuízos. Esses resultados são apresentados na figura 20.

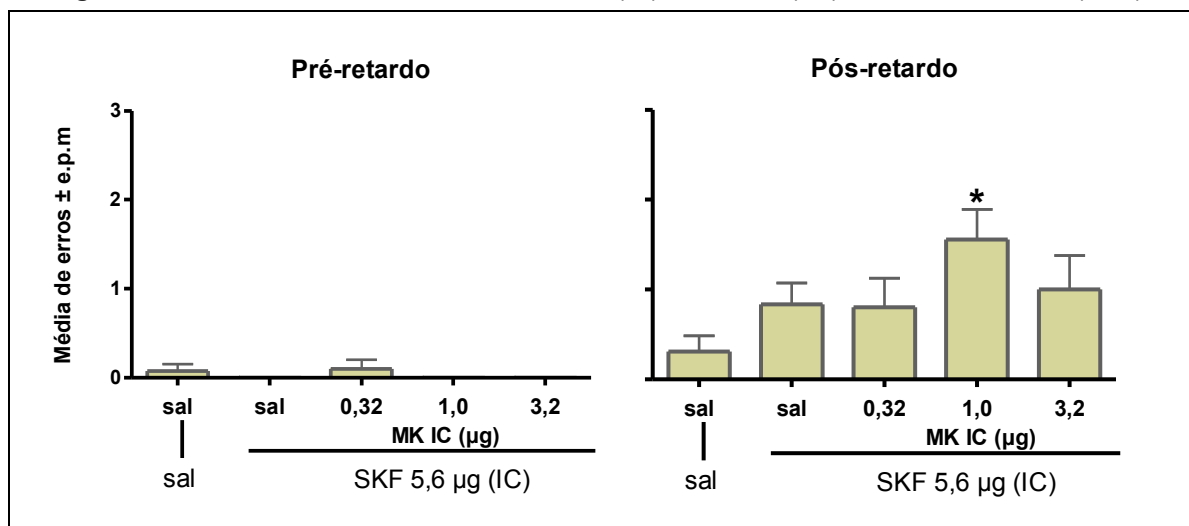


**Figura 20** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou de SKF 38393 (SKF) na dose de 1,8 µg, seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK) (0,32; 1,0; 3,2 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros. No painel da esquerda, é visto o desempenho no pré-retardo. No painel da direita, está ilustrado o desempenho no pós-retardo. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 comparado ao tratamento sal seguido de sal (controle).

#### 4.4.2.5) SKF38393 (SKF) 5,6 µg e diferentes doses de MK-801 (MK)

Como visto anteriormente, a dose de 5,6 µg de SKF seguida de sal não foi diferente do tratamento controle. Sua interação com as doses de 0,32 e 3,2 µg de MK não modificaram este efeito. Entretanto, sua combinação com o antagonista NMDA na dose de 1,0 µg prejudicou o desempenho dos animais em relação ao grupo controle (P < 0,05) (Fig. 21).

**Figura 21** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou de SKF 38393 (SKF) na



dose de 5,6 µg, seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK) (0,32; 1,0; 3,2 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros. No painel da esquerda, é visto o desempenho no pré-retardo. No painel da direita, está demonstrado o desempenho no pós-retardo. \* P < 0,05 comparado ao tratamento sal seguido de sal (controle).

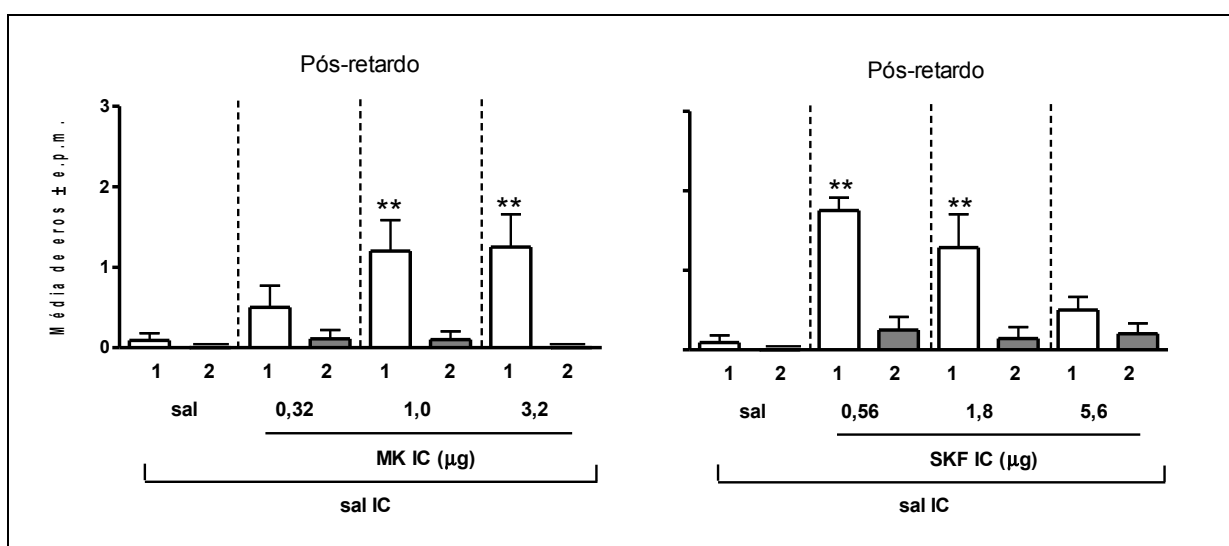
#### **4.4.3) Erros do tipo 1 e 2 no Pós-retardo de 1 h nos tratamentos combinados de SKF38393 (SKF) e MK-801 (MK)**

A ANOVA de três vias para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes nas análises entre as doses de MK [ $F(3,139) = 3,599$ ;  $P = 0,0152$ ], entre as doses de SKF [ $F(3,139) = 5,322$ ;  $P = 0,0017$ ] e entre os tipos de erros [ $F(1,139) = 284,135$ ;  $P < 0,0001$ ]. Houve também interações estatisticamente significantes entre os três fatores (entre as doses de MK, doses de SKF e tipos de erros) [ $F(9,139) = 5,744$ ;  $P < 0,0001$ ]. As doses de SKF interagiram significativamente com as doses de MK [ $F(9,139) = 3,971$ ;  $p = 0,0002$ ] e também com os diferentes tipos de erros [(3,139) = 12,537;  $p < 0,0001$ ], e as doses de MK também interagiram significativamente com os diferentes tipo de erros [(3,139) = 8,392;  $p < 0,0001$ ]. Estas interações significativas sugerem que as curvas doses-respostas sob as diferentes combinações de diferentes doses dos agentes apresentaram diferentes padrões, sobretudo considerando-se os diferentes tipos de erros.

O teste de Fisher localizou diversas diferenças que serão apresentadas a seguir.

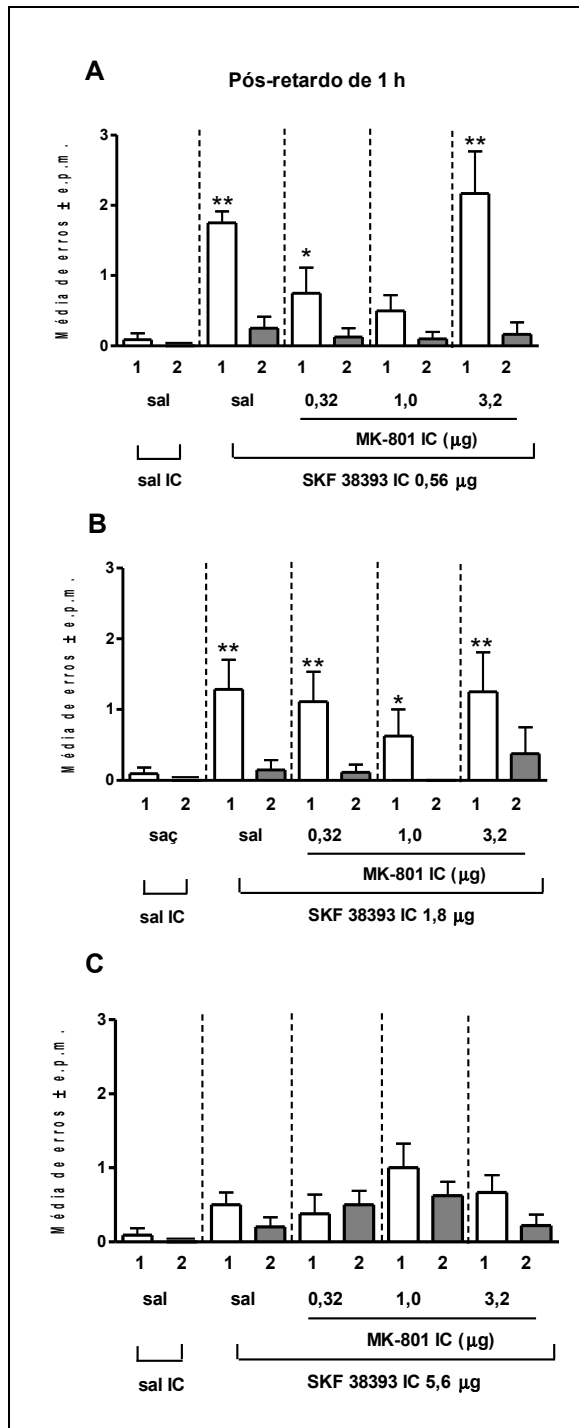
#### 4.4.3.1) Comparação entre os tipos de erros

A infusão de SKF nas doses de 0,56 e 1,8  $\mu\text{g}$  seguidos de salina apresentaram um maior número de erros tipo 1 em relação ao tipo 2 ( $P < 0,01$ ). Do mesmo modo, os tratamentos com salina seguidos de MK nas doses de 1,0 e 3,2  $\mu\text{g}$  tiveram mais erros do tipo 1 ( $P < 0,01$ ). Estes resultados são vistos na figura 22.



**Figura 22** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK) seguido de sal e, ainda, os tratamentos com sal ou as diferentes doses de SKF 38393 (SKF) seguido de sal, no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2  $\pm$  e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços. No gráfico da esquerda, é visto os efeitos dos tratamentos com sal seguido das diferentes doses de MK no pós-retardo, evidenciando os erros tipo 1 e 2. No gráfico da direita, está demonstrado os efeitos dos tratamentos com sal ou com as diferentes doses de SKF seguido de sal no pós-retardo, evidenciando os erros tipo 1 e 2. \*\*  $P < 0,01$  em relação aos erros do tipo 2 do mesmo tratamento.

Nos tratamentos que combinaram as diferentes doses de SKF e MK, também houve um predomínio dos erros do tipo 1 (Fig. 23).



**Figura 23** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK) seguido de sal ou de SKF 38393 (SKF) 0,56 (A), ou 1,0 (B) ou 5,6 (C) µg, no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2 ± e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 em relação aos erros do tipo 2 do mesmo tratamento.



Fisher localizou estas diferenças nas combinações de SKF na dose de 0,56 µg seguida de 0,32 (  $P < 0,05$ ) ou 3,2 µg (  $P < 0,01$ ) de MK e, ainda, nos tratamentos com 1,8 µg de SKF seguido de MK nas doses de 0,32 (  $P < 0,01$ ), 1,0 (  $P < 0,05$ ) e 3,2 µg (  $P < 0,01$ ). É interessante destacar que o agonista  $D_1$  na dose de 5,6 µg, tanto seguido de sal, quanto combinado com as diferentes doses de MK, não promoveu alterações quantitativas entre os tipos de erros de modo estatisticamente significativo. Estes resultados estão demonstrados na figura 23.

#### *4.4.3.2) Erros do tipo 1 no Pós-retardo de 1 h nas combinações das diferentes doses de SKF38393 (SKF) e as diversas doses de MK-801 (MK)*

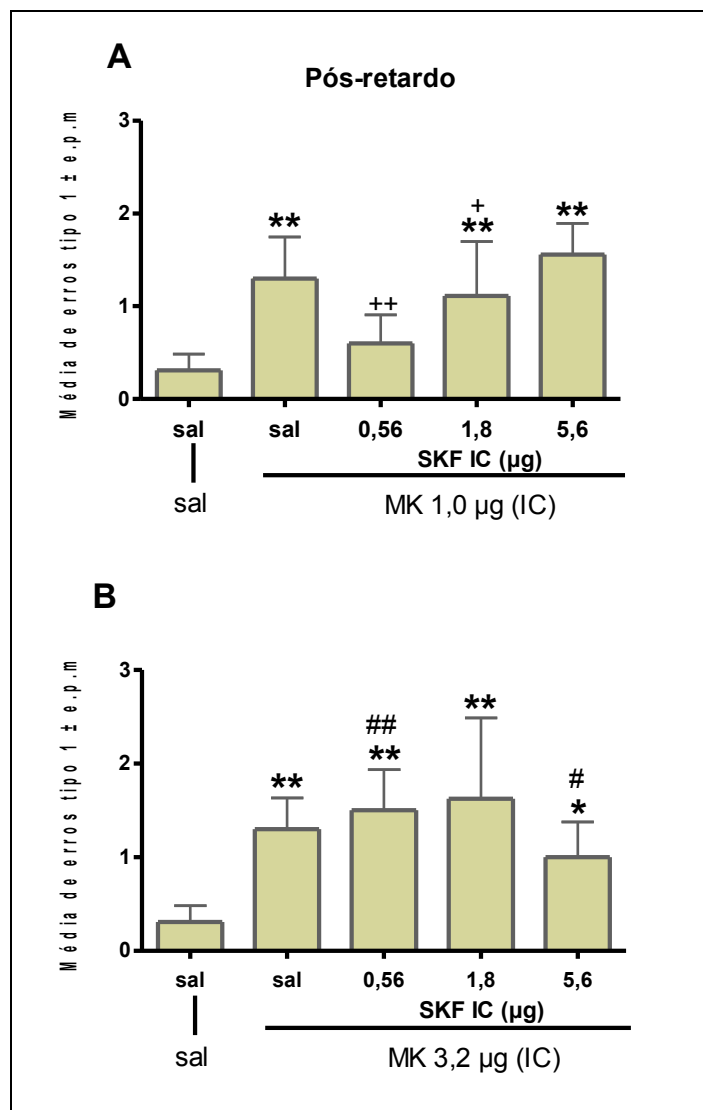
Visto que a maioria dos erros foram do tipo 1, as análises comparativas deste tipo de erro entre as diversas combinações de drogas revelaram-se bem próximas das comparações feitas com o número total de erros. Entretanto, alguns resultados foram diferentes e serão destacados a seguir.

Os tratamentos com sal seguida de MK 1,0 ou 3,2 µg promoveram maior número de erros do tipo 1, em relação ao grupo controle (  $P < 0,01$ ). É importante ressaltar que na análise do número total de erros (Fig. 17), a maior dose do MK não havia atingido significância estatística.

Outro resultado observado, foi que a infusão de MK na dose de 1,0 µg reverteu os prejuízos do SKF 1,8 µg em relação ao controle para os erros tipo 1 (  $P < 0,05$ ) (Fig. 19A). Na análise do número total de erros isto não foi observado (Fig. 20).

Outro fato a se destacar, foi que a dose de MK 1,0 µg, que promoveu prejuízos em relação ao tratamento controle (  $P < 0,01$ ) para erros tipo 1 (mas também no número total de erros), teve seus efeitos significativamente revertidos pela administração prévia de SKF na dose de 0,56 (  $P < 0,01$ ) e atenuado pela dose de 1,8 µg (  $P < 0,05$ ) (Fig. 24A). Já, a prévia infusão da maior dose de SKF 5,6 µg não alterou seus efeitos, produzindo uma quantidade de erros do tipo 1 equivalente (Fig. 24A). Por outro lado, os prejuízos obtidos com a maior dose de MK (3,2 µg) foram exacerbados com as doses de SKF 0,56 µg (  $P < 0,01$ ) (Fig. 24B). A dose de 5,6 µg reduziu significativamente o número de erros tipo 1 promovidos pela maior dose do

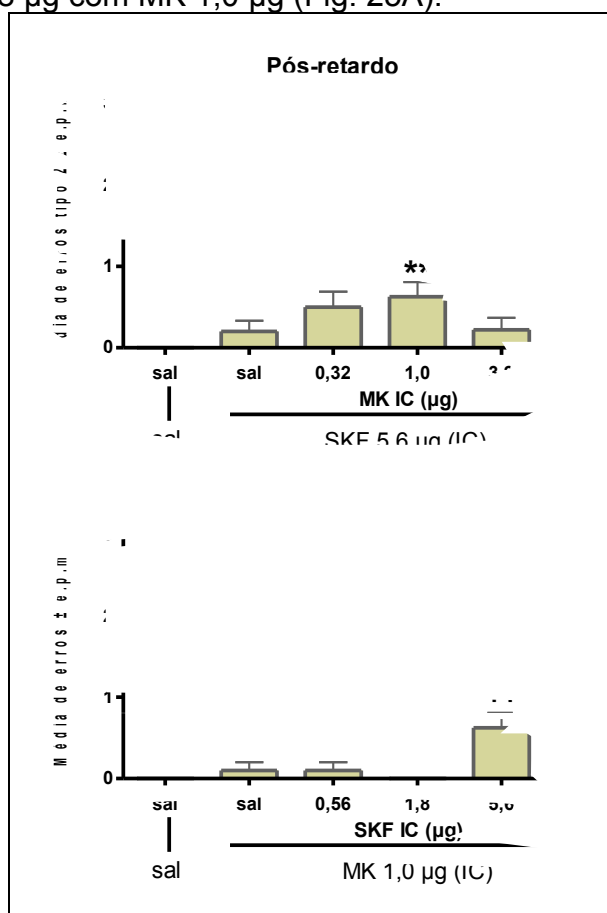
antagonista de receptores de receptores NMDA ( $P < 0,05$ ), porém não o suficiente para igualar-se ao tratamento controle ( $P < 0,05$ ) (Fig. 24B).



**Figura 24** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de SKF 38393 (SKF), seguido de sal ou das doses de MK-801 (MK) 1,0 ou 3,2 µg no desempenho de animais, considerando apenas os erros do tipo 1 (Média de erros tipo 1 ± e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços. No gráfico superior (**A**), é visto o efeito da combinação de sal ou das várias doses de SKF e sal ou MK 1,0 µg. No gráfico inferior (**B**), estão demonstrados os efeitos de sal ou SKF nas diferentes doses e sal ou MK 3,2 µg. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  comparado ao tratamento sal seguido de sal (controle); +  $P < 0,05$ , ++  $P < 0,01$  comparado ao tratamento sal seguido de MK 1,0 µg; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  comparado ao tratamento sal seguido de MK 3,2 µg.

#### 4.4.3.3) Erros do tipo 2 no Pós-retardo de 1 h nas combinações das diferentes doses de SKF38393 (SKF) e as diversas doses de MK-801 (MK)

Quando comparados ao grupo controle, somente o tratamento SKF 5,6  $\mu\text{g}$  seguida de MK 1,0  $\mu\text{g}$  aumentou o número de erros do tipo 2 de modo estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) (Fig. 25A). Além disso, este mesmo tratamento promoveu mais erros do tipo 2 do que a interação de sal seguida de MK na dose de 1,0  $\mu\text{g}$  ( $P < 0,05$ ) (Fig. 25A) e, ainda foi superior as interações de SKF 0,56 ou 1,8  $\mu\text{g}$  com MK 1,0  $\mu\text{g}$  (Fig. 25A).



**Figura 25** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou das diferentes doses de SKF 38393 (SKF), seguido de sal ou das diferentes doses MK-801 (MK) no desempenho de animais, considerando apenas os erros tipo 2 (Média de erros  $\pm$  e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços. No gráfico superior (A), são vistos os efeitos de sal ou SKF na dose de 5,6  $\mu\text{g}$  seguido de sal ou das diferentes doses de MK. No gráfico inferior (B), estão demonstradas as interações de sal ou das diferentes doses de SKF seguidas de sal ou MK na dose de 1,0  $\mu\text{g}$  de MK. \*  $P < 0,05$  comparado ao tratamento sal seguido de sal (controle); +  $P < 0,05$  comparado ao tratamento com sal seguido de sal (controle) e ao tratamento com sal seguido de MK 1,0  $\mu\text{g}$

#### 4.5) Experimento 2: SCH 23390 e SKF 38393

#### 4.5.1) Tempo de permanência no labirinto radial por braço visitado

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou alterações significativas no tempo de permanência dos animais tanto pré-retardo, quanto no pós-retardo de 1 h. As médias do tempo de cada interação estão expostas nas tabelas 09 (pré-retardo) e 10 (pós-retardo).

**Tabela 09** – Média  $\pm$  e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no desempenho do pré-retardo no labirinto radial de 8 braços sob as diferentes combinações de salina (sal) ou da dose de 1,0  $\mu$ g de SCH 23390 (SCH) seguido de sal ou das doses de 0,56 e 1,8  $\mu$ g de SKF38393 (SKF).

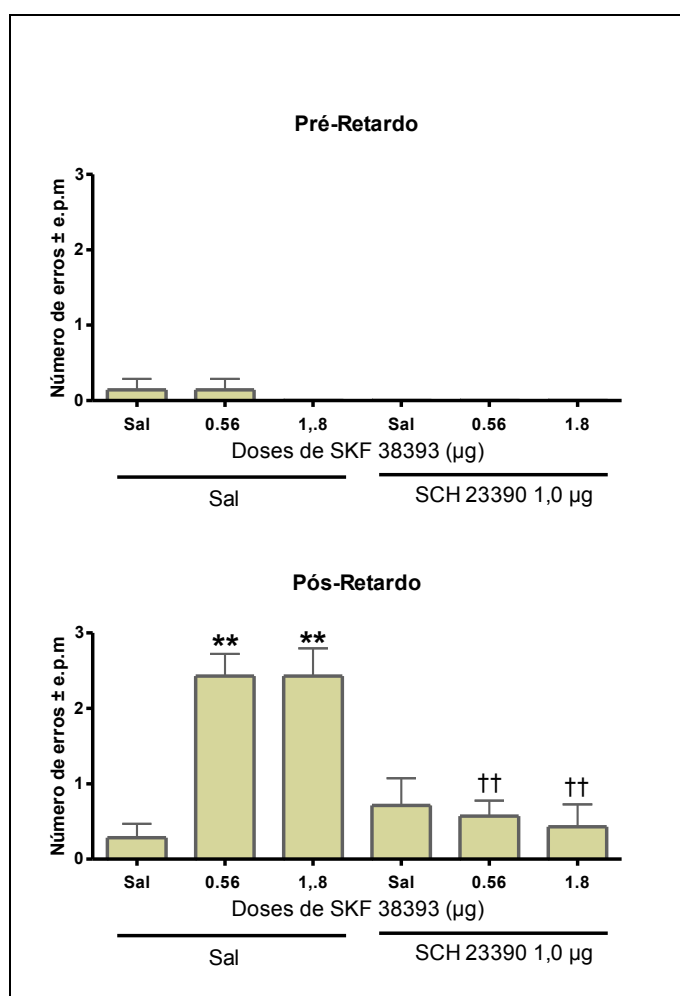
Tempo de permanência por braço visitado		
Doses de SKF ( $\mu$ g)	Pré-retardo	
	Doses de SCH ( $\mu$ g)	
	sal	1,0
sal	11,83 $\pm$ 2,39	15,16 $\pm$ 4,99
0,56	13,16 $\pm$ 7,51	10,5 $\pm$ 1,13
1,8	12,66,9 $\pm$ 2,73	14,66 $\pm$ 7,28

**Tabela 10** – Média  $\pm$  e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no desempenho do pós-retardo de 1 h no labirinto radial de 8 braços sob as diferentes combinações de salina (sal) ou 1,0  $\mu$ g SCH 23390 (SCH) seguido de sal ou das doses de 0,56 e 1,8  $\mu$ g de SKF38393 (SKF).

Tempo de permanência por braço visitado		
Doses de SKF ( $\mu$ g)	Pós-retardo	
	Doses de SCH ( $\mu$ g)	
	sal	1,0
sal	15,5 $\pm$ 5,5	14,66 $\pm$ 4,23
0,56	11,5 $\pm$ 4,23	10,16 $\pm$ 2,76
1,8	11,83 $\pm$ 2,87	12,33 $\pm$ 2,69

#### 4.5.2) Total de erros no pré-retardo e pós-retardo nas combinações de SCH23390 (SCH) e SKF38393 (SKF)

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou alterações significativas no número total de erros no pré-retardo (Fig. 26, gráfico superior). Por outro lado, no pós-retardo de 1 h, foram detectadas diferenças estatisticamente significantes nas análises entre os grupos [F(1,12) = 14,4; P = 0,0026], intra-grupos [F(2,24) = 10,17; P = 0,0006] e na interação entre os fatores [F(2,24) = 15,16; P < 0,0001] (fig. 26, gráfico inferior).

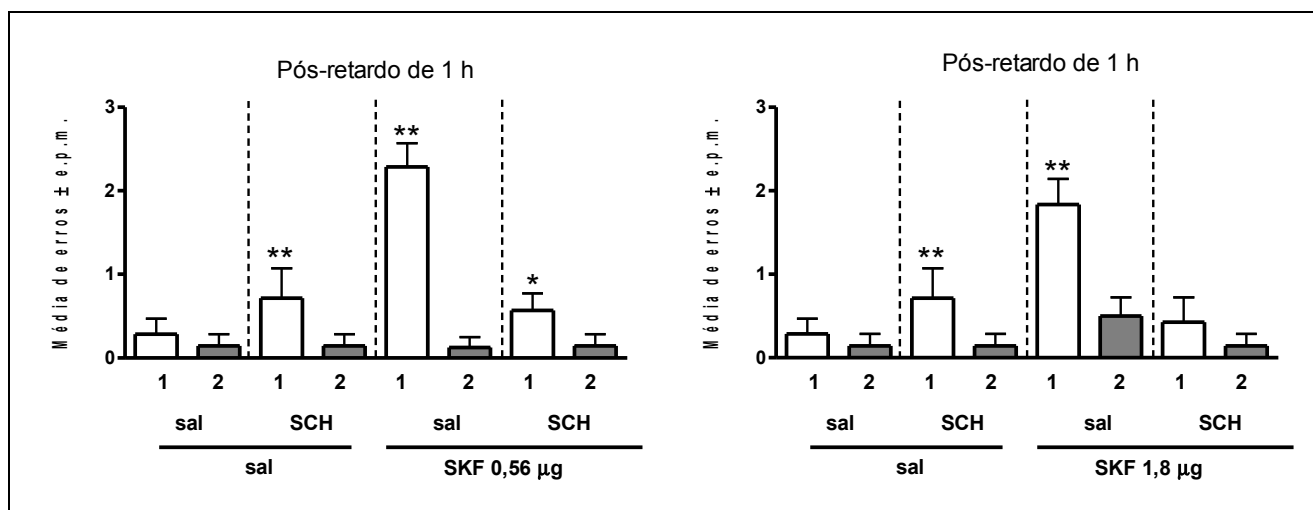


**Figura 26** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou SCH 23390 (SCH) na dose de 1,0 µg, seguido das diferentes doses de SKF 38393 (SKF) (sal, 0,56 ou 1,8 µg) no desempenho de animais (Média de erros ± e.p.m), submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h, considerando o número total de erros. No gráfico superior, é visto o pré-retardo e, no inferior, o pós-retardo. \*\* P < 0,01 comparado às combinações de sal e sal (controle) ou SCH e sal, †† P < 0,01 comparado às combinações de sal e SKF 0,56 ou 1,8 µg.

#### 4.5.3) Erros do tipo 1 e 2 no Pós-retardo de 1 h nas combinações de SCH23390 (SCH) e SKF38393 (SKF)

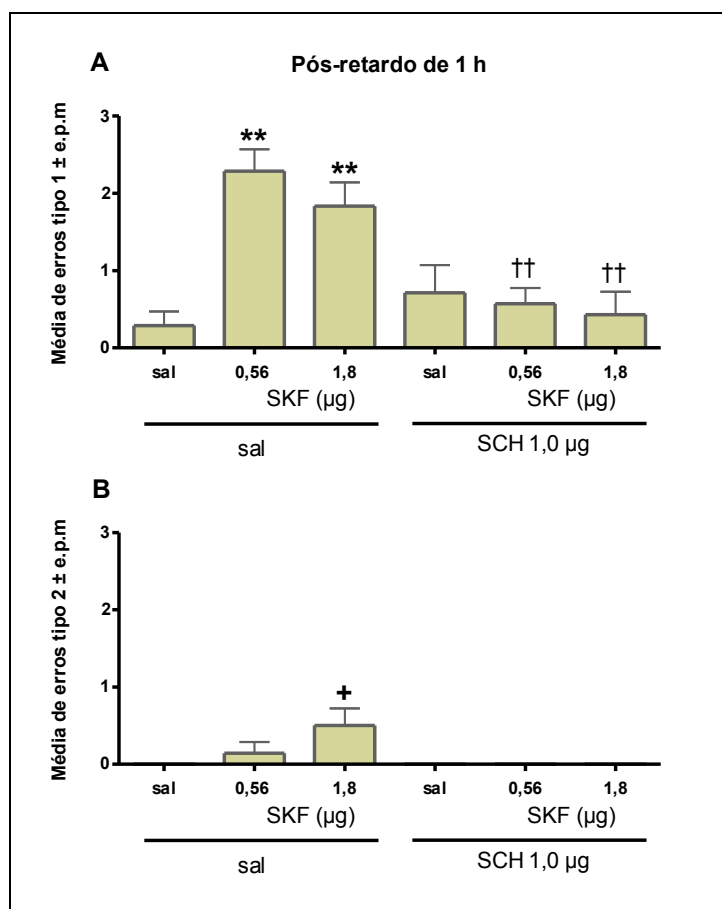
A ANOVA de três vias para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes nas análises entre os tratamentos com sal ou SCH [F(1,2) = 22,74; P < 0,0001], entre as doses de SKF [F(2,2) = 7,22; P = 0,0023] e, ainda, entre os tipos de erro [F(1,36) = 60,17; p < 0,0001]. Também houve interações significantes entre os tratamentos com sal ou SCH e as doses de SKF [F(2,2) = 10,77; P = 0,0002], entre os tratamentos com sal ou SCH e os tipos de erros [F(1,36) = 8,17; P = 0,007], entre as doses de SKF e os tipos de erro [F(2,36) = 4,54; p = 0,017], e ainda entre os três fatores [F(2,36) = 6,29; p = 0,0045].

A infusão de SKF na dose de 0,56 e 1,8 µg seguido de salina promoveu um maior número de erros do tipo 1 em relação aos erros do tipo 2 (P < 0,01). Do mesmo modo, os tratamentos com de SCH na dose de 1,0 µg seguido de sal apresentaram mais erros do tipo 1 (P < 0,01). Estes resultados são vistos na figura 27.



**Figura 27** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou de SCH 23390 (SCH) seguido de sal ou das diferentes doses de SKF 38393 (SKF), no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2 ± e.p.m.) submetidos a testes no labirinto radial de oito braços, com retardo de 1 h. São vistos os efeitos dos tratamentos com sal ou SCH na dose de 1,0 µg seguido de sal ou SKF na dose de 0,56 µg (à esquerda) ou 1,8 µg (à direita) no pós-retardo, evidenciando os erros do tipo 1 e 2. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 em relação aos erros do tipo 2 do mesmo tratamento.

O teste de Fisher evidenciou um padrão de significância para os erros do tipo 1 (Fig. 28A) semelhante ao observado no número total de erros (Fig. 26). Por outro lado, o tratamento com sal seguido de SKF na dose de 1,8 µg promoveu um maior número de erros do tipo 2, quando comparado ao tratamento controle e ao tratamento com SCH 1,0 µg seguido de sal ( $P < 0,05$ ) (Fig. 28B). O tratamento prévio com SCH 1,0 µg reverteu este efeito ( $P < 0,05$ ) (Fig. 28B).



**Figura 28** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de salina (sal) ou SCH 23390 (SCH) na dose de 1,0 µg, seguido das diferentes doses de SKF 38393 (SKF) no desempenho do pós-retardo de 1 h (Média de erros tipos 1 ou 2 ± e.p.m) no labirinto radial de oito braços. No gráfico superior (**A**), são vistos os erros do tipo 1 e, no inferior (**B**), estão demonstrados os erros do tipo 2. \*\*  $P < 0,01$  comparado às combinações de sal e sal (controle) ou SCH e sal, ††  $P < 0,01$  comparado às combinações de sal e SKF 0,56 ou 1,8 µg; +  $P < 0,05$  comparado ao tratamento controle e ao tratamento SCH seguido de SKF 1,8 µg.

## 4.6) Experimento 3: Clozapina e MK-801

### 4.6.1) Tempo de permanência no labirinto radial por braço visitado

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou alterações significativas no tempo de permanência dos animais tanto pré-retardo, quanto no pós-retardo. As médias do tempo de cada interação estão expostas nas tabelas 11 (pré-retardo) e 12 (pós-retardo).

**Tabela 11** – Média  $\pm$  e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no labirinto radial de 8 braços do pré-retardo das diferentes combinações de salina (sal) ou das diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK).

Tempo de permanência por braço visitado Pré-retardo				
Doses de CZP ( $\mu$ g)	Doses de MK ( $\mu$ g)			
	sal	0,32	1,0	3,2
sal	13,6 $\pm$ 3,5	12,8 $\pm$ 1,98	12,4 $\pm$ 1,87	14,4 $\pm$ 3,97
0,32	11,8 $\pm$ 1,78	12,2 $\pm$ 2,86	13,7 $\pm$ 4,74	13,8 $\pm$ 3,7
1,0	14,0 $\pm$ 6,65	14,5 $\pm$ 7,61	13,2 $\pm$ 3,49	14,3 $\pm$ 5,09
3,2	13,9 $\pm$ 3,4	12,1 $\pm$ 1,53	14,1 $\pm$ 4,19	13,1 $\pm$ 3,33

**Tabela 12** – Média  $\pm$  e.p.m. do tempo (em segundos) gasto em cada braço visitado no labirinto radial de 8 braços do pós-retardo das diferentes combinações de salina (sal) ou das diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de sal ou das diferentes doses de MK-801 (MK).

Tempo de permanência por braço visitado Pós-retardo				
Doses de CZP ( $\mu$ g)	Doses de MK ( $\mu$ g)			
	sal	0,32	1,0	3,2
sal	12,0 $\pm$ 2,5	11,7 $\pm$ 1,22	11,9 $\pm$ 1,45	11,9 $\pm$ 2,42
0,32	10,6 $\pm$ 1,5	11,8 $\pm$ 1,85	12,0 $\pm$ 2,5	14,3 $\pm$ 4,38
1,0	11,6 $\pm$ 1,5	12,3 $\pm$ 2,6	11,8 $\pm$ 1,09	11,6 $\pm$ 2,77
3,2	13,1 $\pm$ 3,98	13,7 $\pm$ 3,57	12,9 $\pm$ 2,75	12,4 $\pm$ 4,03

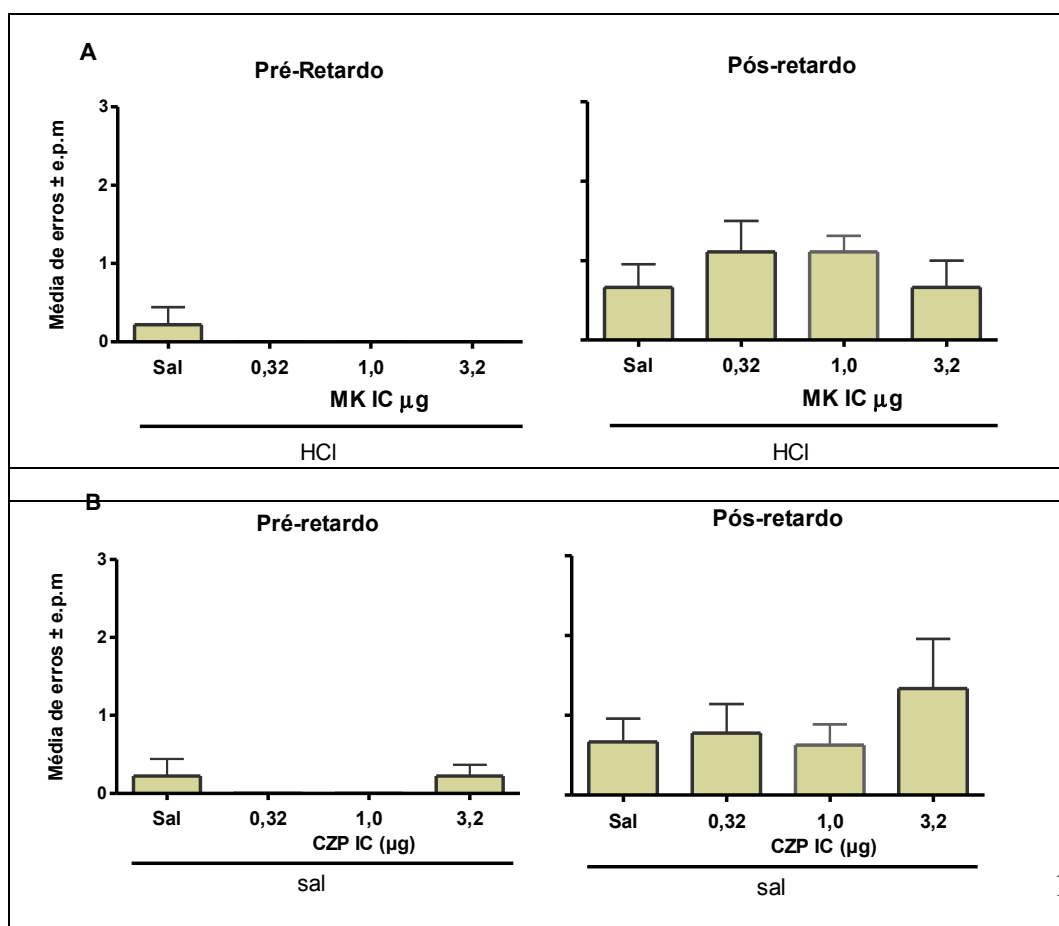


A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no número de erros no pré-retardo. Entretanto, no pós-retardo de 1 h, foram detectadas diferenças estatisticamente significantes mas somente nas comparações entre os grupos [ $F(3,111) = 3,32$ ;  $P = 0,0316$ ].

#### 4.6.2) Total de erros no pré-retardo e pós-retardo de 1 h

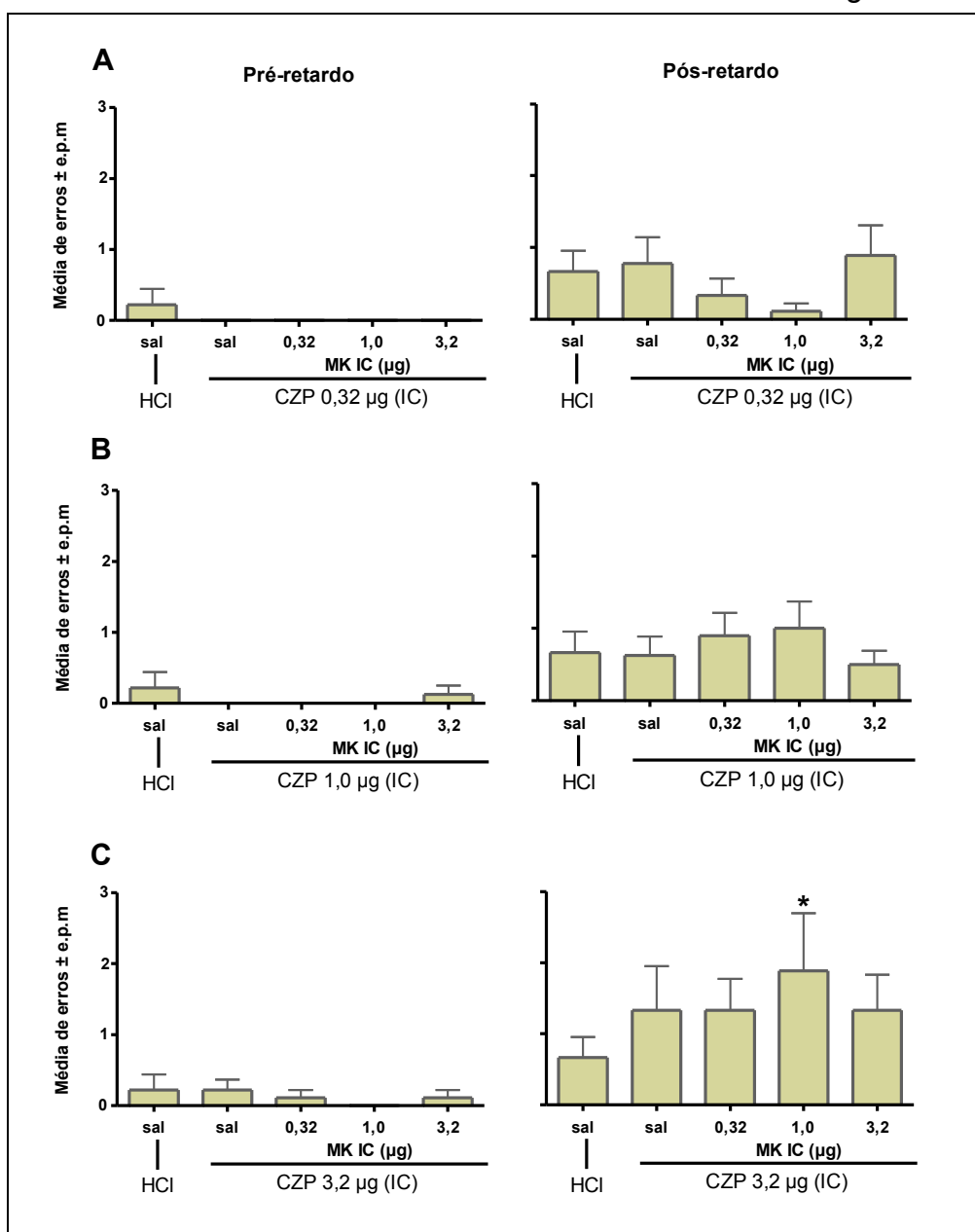
A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no número de erros no pré-retardo. Entretanto, no pós-retardo de 1 h, foram detectadas diferenças estatisticamente significantes, mas somente nas comparações entre os grupos [ $F(3,111) = 3,32$ ;  $P = 0,0316$ ] (Fig. 29).

Não houve diferenças nos tratamentos com administração prévia de HCl seguido das doses variadas de MK (Fig. 29A). Do mesmo modo, os tratamentos precedidos de CZP em suas diferentes doses, seguidas de sal não apresentaram alterações, de acordo com o teste de Fisher (Fig. 29B).



**Figura 29** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl seguido de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK) (**A**) e, ainda, dos tratamentos com HCl ou as diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de sal (**B**), no desempenho de animais (Média de erros  $\pm$  e.p.m), no pré-retardo (painéis da esquerda) e pós-retardo de 1 h (painéis da direita), no labirinto radial de oito braços.

O único tratamento que apresentou um resultado estatisticamente significativo em relação ao controle, promovendo um aumento no número total de erros ( $P < 0,05$ ) foi aquele que combinou CZP na dose de 3,2  $\mu\text{g}$  seguido de MK 1,0  $\mu\text{g}$ . Os efeitos das diferentes combinações de HCl ou CZP nas diversas doses com sal ou MK nas diferentes doses são mostrados na figura 30.

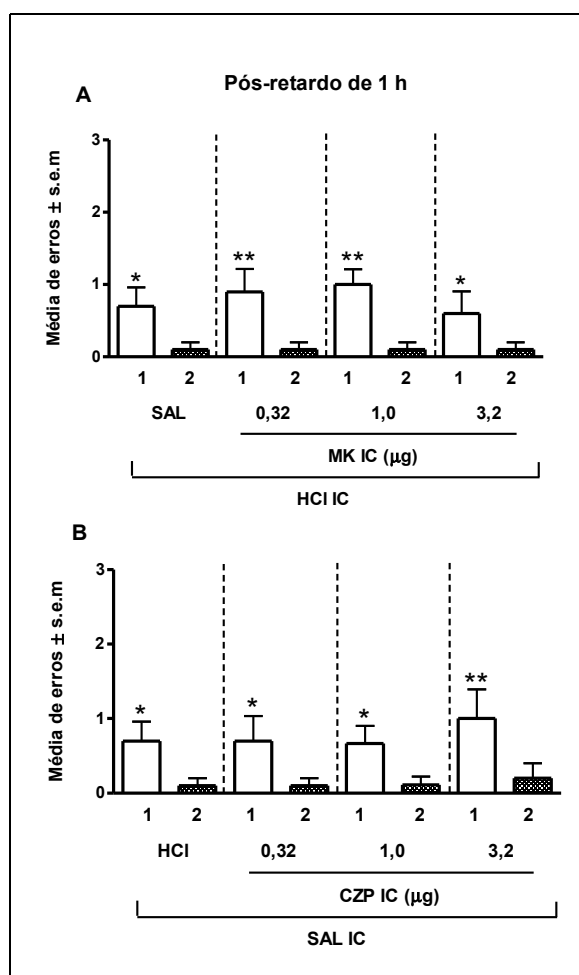


**Figura 30** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl ou das diferentes doses de clozapina (CZP) seguida de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK), no desempenho de animais (Média de erros  $\pm$  e.p.m) no pré-retardo (painéis da esquerda) e pós-retardo de 1 h (painéis da direita) no labirinto radial de oito braços. O painel superior (**A**) mostra as combinações de HCl ou da dose de CZP na dose de 0,32  $\mu$ g seguida de sal ou das diferentes doses de MK. O painel central (**B**) mostra os tratamentos com HCl ou com CZP na dose de 1,0  $\mu$ g seguida de sal ou das diferentes doses de MK. O painel inferior (**C**) demonstra as combinações de HCl ou de CZP na dose de 3,2  $\mu$ g seguida de sal ou das diferentes doses de MK. \*  $P < 0,05$  em relação ao tratamento controle (HCl seguido de sal).

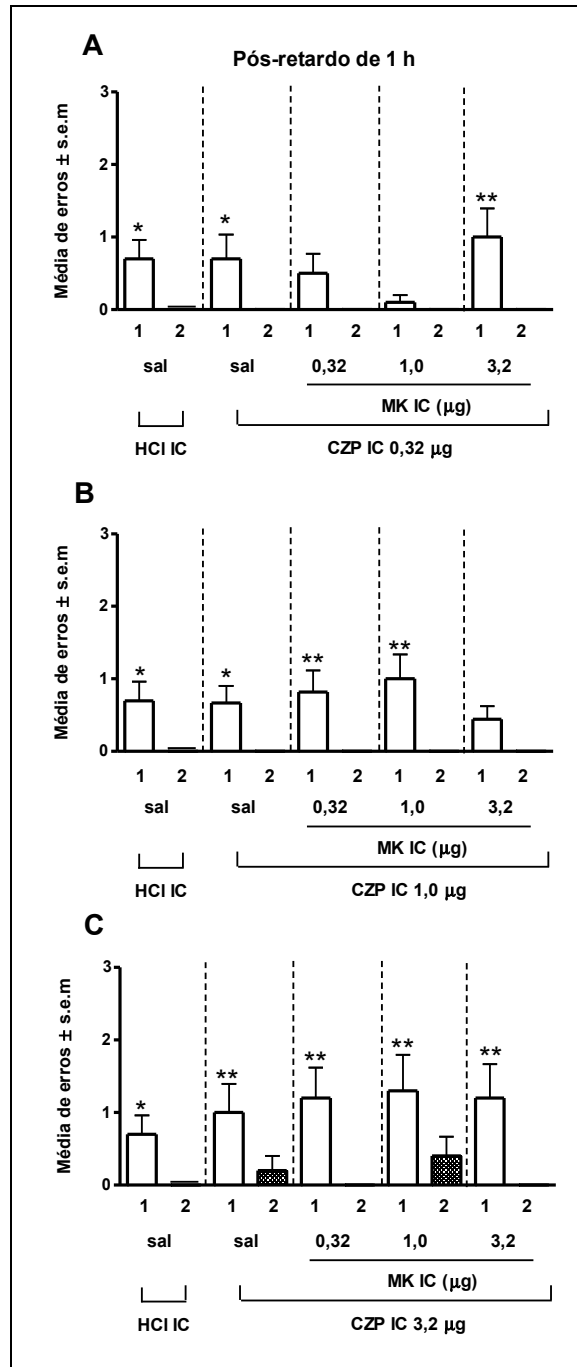
#### 4.6.3) Erros do tipo 1 e 2 no pós-retardo de 1 h nas combinações de clozapina (CZP) e MK-801 (MK)

A ANOVA de 3 vias para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes nas análises entre os grupos [ $F(3,127) = 3,59$ ;  $P = 0,0225$ ] e entre os tipos de tipos de erros [ $F(1,37) = 120,33$ ;  $P < 0,0001$ ].

Novamente, os erros do tipo 1 corresponderam a grande maioria dos erros. O teste de Fisher localizou diferenças estatísticas em relação na maioria dos tratamentos, conforme ilustrado nas figuras 31 e 32.

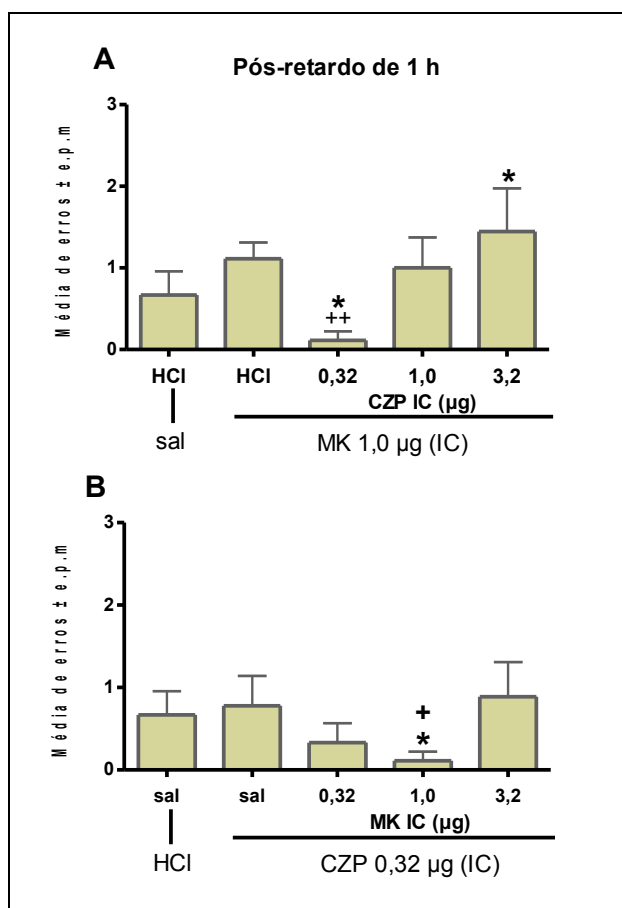


**Figura 31** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl seguido de salina (sal) ou MK-801 (MK) em diferentes doses (**A**) e HCl ou clozapina (CZP) em diferentes doses seguido de sal (**B**) no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2  $\pm$  e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  em relação aos erros do tipo 2 do mesmo tratamento.



**Figura 32** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl ou das diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de salina (sal) ou das diferentes doses de MK-801 (MK), no desempenho de animais quanto ao tipo de erro (Média de erros tipo 1 ou 2  $\pm$  e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços. Efeitos dos tratamentos com HCl ou CZP na dose de 0,32 (A) ou 1,0 (B) ou 3,2 (C)  $\mu$ g seguido de sal ou das diferentes doses de MK no pós-retardo, evidenciando os erros do tipo 1 e 2 \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  em relação aos erros do tipo 2 do mesmo tratamento.

Assim como na análise do número total de erros (Fig. 30), o tratamento com CZP 3,2  $\mu$ g seguida de MK 1,0  $\mu$ g aumentou o número de erros do tipo 1 em relação ao grupo controle ( $P < 0,01$ ) (Fig. 33A). Por outro lado, o teste de Fisher detectou que o tratamento com CZP 0,32  $\mu$ g seguida de MK 1,0  $\mu$ g promoveu uma redução significativa do número erros do tipo 1, em relação ao tratamento controle ( $P < 0,05$ ). Este mesmo tratamento melhorou o desempenho dos animais em relação à interação CZP 0,32  $\mu$ g seguida de Sal ( $P < 0,05$ ) e, ainda, ao tratamento com sal seguido de MK 1,0  $\mu$ g ( $P < 0,01$ ). Deve-se chamar a atenção que este fato não foi observado na análise com o número total de erros. A figura 33 demonstra estes resultados.



**Figura 33** – Efeitos das infusões intracorticais (IC) de HCl ou diferentes doses de clozapina (CZP) seguido de salina (sal) ou MK-801 (MK) 1,0 µg (**A**) ou de HCl ou CZP 0,32 µg seguido de sal ou diferentes doses de MK (**B**), no desempenho de animais em relação aos erros tipo 1 (Média de erros ± e.p.m) no pós-retardo de 1 h no labirinto radial de oito braços. \* P < 0,05 em relação ao tratamento HCl seguido de sal (controle); + P < 0,05 em relação ao tratamento CZP 0,32 µg seguido de sal; \*\* P < 0,01 em relação ao tratamento HCl seguido de MK 1,0 µg e ao tratamento com CZP 3,2 µg seguido de MK 1,0 µg. .

## 5.0) Discussão

## 5.1) Drogas e dosagens

O SCH e o SKF são compostos muito utilizados na investigação científica, pois são altamente seletivos para os receptores da família D<sub>1</sub>. O SCH age como um potente antagonista competitivo, impedindo a ação da DA. Por outro lado, o SKF utilizado no presente estudo (SKF38393) atua como um agonista parcial, ativando D<sub>1</sub>, com intensidade de 45 a 70%, quando comparado a DA. Desta forma, sua ação como agonista depende da dose, bem como da situação fisiológica em que o animal se encontra. Em condições basais, o uso de baixas doses promove agonismo dos receptores D<sub>1</sub>, visto que sua atuação em receptores livres pode aumentar efetivamente a ativação global destes receptores. Entretanto, em altas doses ou em situações de alta liberação de DA, tal como estresse agudo ou uso de substâncias que aumentam a transmissão dopaminérgica, o SKF pode atuar como antagonista por competir com a DA e diminuir efetivamente a ativação global destes receptores. Esta característica bifásica é interessante, pois pode-se observar diferentes efeitos a medida que se altera a dose, o que enriquece as análises das observações experimentais (Bloom e Kupfer, 1995).

A CZP é utilizada, clinicamente, no tratamento da esquizofrenia, sendo considerada um antipsicótico atípico. Possui alta afinidade por vários tipos de receptores, como por exemplo, D<sub>2</sub>, D<sub>4</sub>, 5HT<sub>2A</sub> e alfa<sub>2</sub> (Xun Wang et al., 2002). Não se sabe ao certo, qual o mecanismo de ação desse fármaco no alívio dos sintomas da esquizofrenia, porém tem sido sugerida a participação do receptor

dopaminérgico do tipo D<sub>4</sub> em, pelo menos, alguns aspectos desse processo. O uso desta droga possibilitou visualizar uma possível ação de receptores da família D<sub>2</sub>, especialmente D<sub>4</sub>, sobre a MO, como será melhor discutido adiante.

O MK é um antagonista não-competitivo de NMDA altamente seletivo. Liga-se fortemente ao sítio da PCP, por longo período, entretanto sua atuação depende de uma prévia ativação do receptor, pois sem a liberação do Mg<sup>++</sup> que bloqueia o canal em receptores não ativados, o MK não pode acessar o seu sítio de ação (Watkins, 1994). Como não compete com o GLU sua ação antagônica independe de uma maior ou menor liberação glutamatérgica, o que dificulta respostas compensatórias deste sistema (Bressan e Pilowsky, 2003).

A ordenação das drogas durante o processo de infusão foi determinada de modo a proporcionar o bloqueio dos receptores NMDA pelo MK. Sabe-se que a estimulação de receptores D<sub>1</sub> aumenta a ativação dos receptores NMDA (Greengard, 2001; Scott et al., 2006), sendo assim a utilização prévia de SKF poderia facilitar a atuação do MK como antagonista. Caso o MK fosse administrado anteriormente ao SKF, poder-se-ia questionar se o MK estaria promovendo seu antagonismo na plenitude, pois durante o intervalo de 10 minutos entre sua administração e a infusão do agonista D<sub>1</sub>, este fármaco poderia ser removido do tecido neural por mecanismos enzimáticos ou por simples difusão antes de seu acoplamento ao sítio da PCP.

A CZP, por outro lado, poderia diminuir a ativação dos receptores NMDA via segundo-mensageiro nos terminais pré-sinápticos. Entretanto, alguns dados na literatura demonstram que a utilização deste antipsicótico aumenta a liberação de GLU no CPF (Millan, 2005), o que por sua vez poderia ativar receptores NMDA, liberando o canal para o acoplamento ao seu sítio de ação. Além disso, a administração prévia de CZP e posterior de MK foi realizada para manter congruente o protocolo experimental, facilitando possíveis comparações entre os resultados dos experimentos.

As dosagens de cada droga foram determinadas por escala logarítmica, abrangendo assim uma grande amplitude de suas ações. Já as escolhas das doses foram baseadas em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, as quais sabidamente promovem efeitos relevantes aos objetivos deste estudo.

## **5.2) Labirinto radial de oito braços**



Dois modelos mais importantes são utilizados para analisar os aspectos visuoespaciais da cognição: o labirinto aquático de Morris e o labirinto radial de oito braços. Em ambos, pode-se analisar o efeito de fármacos ou de qualquer outro procedimento nos processos de aprendizagem, memória ou qualquer outro processo cognitivo que utilize informações espaciais do ambiente. Entretanto, diferentes protocolos experimentais têm sido desenvolvidos com o objetivo de se melhor especificar a função cognitiva avaliada nos testes. Desta forma, o uso de um mesmo aparato tal como o labirinto radial não implica, necessariamente em uma mesma avaliação, devendo-se considerar o protocolo como um todo utilizado em cada estudo. Pequenas alterações nos procedimentos podem modificar toda ou qualquer análise dos resultados obtidos.

No presente estudo, o modelo utilizado para verificar a MO dos animais foi o labirinto radial de 8 braços. Este foi inicialmente proposto por Olton e Samuelson (1976), atendendo a, então, crescente necessidade de se criar mecanismos para a avaliação cognitiva, o que era estimulada por uma das concepções comportamentais emergente da época (“behaviorismo”) (Olton e Samuelson, 1976).

Esse modelo de labirinto baseia-se na “aprendizagem de lugar”, permitindo avaliar características visuoespaciais da MO. Para desempenhar nesse tipo de labirinto, os animais utilizam pistas visuais (quadros, fotografias, móveis, etc.) localizadas externamente ao labirinto para mapear o ambiente e diferenciar os braços a serem visitados. Assim, os animais conseguem reter informações de quais braços foram visitados em uma sessão. Eles não escolhem braços adjacentes, nem utilizam marcações internas para desempenhar a tarefa, apenas fazem uso de suas capacidades mnemônicas, mesmo porque a escolha dos braços abertos no pré-retardo é aleatória (Olton e Samuelson, 1976).

Podem ser diferenciados dois tipos de memórias necessárias para desempenhar nesse labirinto: a memória de referência e a MO. O primeiro tipo se refere à memória de procedimentos, relativa às regras existentes em cada sessão. Por exemplo, o conhecimento de que há apenas um pedaço de amendoim em cada braço e que uma repetição dos mesmos implicaria em um

não reforçamento. O segundo tipo seria responsável pela memorização dos braços já visitados, sendo específica para cada sessão (Olton, 1977). Ambas as memórias são determinantes no desempenho do animal.

Quando se utilizam elementos (drogas, estresse, idade, etc.) no experimento que influenciam o desempenho no labirinto, um prejuízo ou uma melhora obtida no teste, pode ocorrer em função de alterações, tanto na MO, quanto na memória de referência. Todavia, pode-se planejar uma metodologia, na qual o teste se torna mais específico para um dos tipos mnemônicos. Por exemplo, a introdução de um período de retardo durante o desempenho dos animais, torna a sessão pós-retardo mais sensível à MO. Esta pode ser verificada em curto prazo, através de retardos mais curtos (segundos) ou, ainda, avaliar a MO de longa duração, através de retardos mais prolongados (horas) (Nakamura et al., 1991; Nakamura-Palacios e Roelke, 1997). No presente estudo, foi utilizado apenas retardos de 1 h. Alguns trabalhos utilizam períodos de retardo ainda maiores (4-18 h).

Mesmo no pós-retardo, erros podem acontecer devido a prejuízos na memória de referência. Logicamente, é difícil dissociar os dois tipos de memórias envolvidos na execução da tarefa, entretanto pode-se reconhecer dois tipos de erros no pós-retardo: erros caracterizados pela reentrada em um braço visitado no pré-retardo (chamados do erro tipo 1); erros por reentrada em braços visitados no próprio pós-retardo (chamados do erros tipo 2). Quando um animal aprende a tarefa, alcançando os critérios para a inclusão nos experimentos, os erros do tipo 2 são raros. Com o aumento do período de retardo aumenta-se a probabilidade desses erros acontecerem, ainda assim os erros do tipo 1 são os que predominam.

Os erros do tipo 2 podem ser analisados por duas abordagens: déficit na memória de referência ou perseveração. Pela primeira análise, ao se considerar que os animais dificilmente cometem este erro, seu surgimento parece indicar que houve um equívoco na análise das “regras” do teste. Ele busca reforçamento em um braço a pouco visitado, sendo que durante o processo de aprendizagem a regra da não reentrada em um braço foi claramente estabelecida. Por uma outra análise, a repetição de um mesmo braço a pouco visitado parece indicar um comportamento típico de algumas

síndromes pré-frontais, a perseveração de erros. As duas análises são possíveis e serão consideradas aqui. Mais adiante serão melhor discutidos.

Por outro lado, os erros do tipo 1 são mais associados a prejuízos na MO. Ao que tudo indica, o que está prejudicado neste caso é a manutenção das informações referente ao pré-retardo, que deveriam ser mantidas durante o período de retardo. Estas são as informações variáveis em cada teste, sendo assim não compõem as memórias de procedimento.

No presente estudo, foram feitas duas análises: do número total de erros e dos tipos de erros. A primeira análise possibilita avaliar de modo mais global o desempenho dos animais, pois considera os dois tipos de erros. Esta é uma análise mais clássica, realizada por todos os outros trabalhos em nosso laboratório e que foi inicialmente proposta por Olton e Samuelson (1976). Por outro lado, alguns autores recentemente (Floresco et al., 1997) tem distinguido os dois tipos de erros comentados acima e, argumentam de forma pertinente suas análises individuais. Estas análises podem levar a discussões mais profundas dos efeitos das drogas nas funções executivas e, ainda, diminuir a influência de outras alterações cognitivas nas análises dos resultados.

### **5.3) Treinamento dos animais**

Os animais utilizados nesse estudo obtiveram, ao final do período de treinamento, uma aprendizagem satisfatória, atingindo o critério previamente estabelecido na literatura. Segundo Olton e Samuelson (1976) os animais apresentam uma melhora gradativa durante as dez primeiras sessões no labirinto, permanecendo estáveis nas dez sessões subsequentes. Esses autores sugerem que os dados obtidos nas dez primeiras sessões refletem a aprendizagem dos procedimentos necessários para o desempenho no teste, enquanto que nas dez sessões seguintes esse resultado deve-se ao aperfeiçoamento nesse desempenho.

### **5.4) A infusão de drogas e o teste no labirinto radial**

O protocolo utilizado para a infusão das drogas segue modelos baseados em dados de literatura, sendo padronizado em todos os experimentos realizados em nosso laboratório. A manipulação prévia dos animais pelos treinadores, bem como sua habituação ao ambiente do labirinto, diminui qualquer interferência de estresse pela manipulação durante os testes.

Embora os animais sejam treinados com retardo de 5 segundos, a introdução do retardo de 1 h nos testes, somente dificulta a tarefa no pós-retardo, associando-se a um aumento no número de erros dos animais, sem, entretanto, impedir ou alterar significativamente o procedimento em si. Isto indica que, a princípio, o aumento do período de retardo interfere essencialmente na MO, tendo pouco efeito na memória de referência dos animais. Como normalmente mais erros são verificados com o aumento do período de retardo, fica mais evidente qualquer interferência farmacológica na MO.

Um mesmo animal pode, a princípio, receber todos os tratamentos realizados em um experimento. Este fato poderia caracterizar uma exposição crônica aos fármacos utilizados ou mesmo um efeito de seqüenciamento ao longo do experimento. Para minimizar este efeito, alguns procedimentos foram realizados, tal como um intervalo de sete dias entre os testes e o uso do quadrado latino conforme descrito em materiais e métodos. Tais procedimentos demonstram ser efetivos no alívio de possíveis vieses experimentais gerados pelo seqüenciamento de drogas.

## **5.5) Discussão das curvas dose respostas**

### **5.5.1) Tempo de permanência no labirinto**

Em nenhuma das curvas dose-efeito realizadas no presente estudo, se obteve diferenças do tempo de permanência nos braços visitados, quando comparados ao tratamento controle ou mesmo entre as diferentes doses. Esses resultados indicam que nenhuma das drogas produziu alterações motoras nas doses empregadas e, sendo assim, os efeitos observados foram essencialmente cognitivos.

### 5.5.2) Análise dos efeitos do MK sobre a MO

No presente estudo, dentre os tratamentos que utilizaram sal seguido de MK nas diferentes doses, somente aquele que utilizou a dose de 1,0 µg prejudicou o desempenho dos animais no pós-retardo de 1 h na análise do número total de erros. A menor e a maior dose não foram diferentes em relação ao tratamento controle. Entretanto, na análise específica dos erros do tipo 1 houve prejuízo significativo do desempenho sob as doses de 1,0 e 3,2 µg em relação ao tratamento controle. Não houve alterações significativas dos erros do tipo 2. Sendo assim, estes dados sugerem que o bloqueio dos receptores NMDA prejudica a MO, sem interferir na memória de referência dos animais, apontando para uma importante modulação glutamatérgica nesta função frontal, fato este bem estabelecido na literatura de um modo geral ( Enomoto et al., 2007; Aura and Riekkinen, 1999; Verma and Moghaddam, 1996).

Entretanto, quando se utilizou HCl precedendo a administração de MK, tais diferenças não foram verificadas, embora o padrão da curva tenha sido semelhante. É possível que o uso de HCl tenha interferido no desempenho dos animais e, conseqüentemente, influenciado as análises estatísticas. Este argumento é reforçado quando se compara as médias de erros do controle do primeiro (sal seguido sal) com o do segundo experimento (HCl seguido de sal). Verifica-se que há um claro aumento na média de erros dos animais ao se infundir HCl diretamente no CPFm, ainda que tenha sido na menor concentração possível.

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Anhoque, 2007; Bazzarella, 2004) não foram verificados prejuízos com o uso das mesmas doses de MK em ratos submetidos a retardos de 1 h no labirinto radial. Porém deve-se considerar que os diferentes lotes de animais utilizados nos trabalhos podem justificar, pelo menos em parte, as divergências nos resultados.

Por outro lado, Anhoque (2007) verificou que o tratamento com memantina, um antagonista não-competitivo de receptores NMDA, prejudicou a MO de ratos submetidos a testes com retardo de 1 h no labirinto radial. Os prejuízos foram encontrados somente na dose intermediária da memantina, sugerindo uma curva em U invertido. Desta forma, o padrão verificado foi

semelhante ao obtido aqui com o MK. Logicamente, há diferenças importantes entre o MK e a memantina, principalmente nos aspectos farmacodinâmicos. Todavia, estes dados sustentam a relação dos receptores NMDA com a MO.

Na literatura há diversos trabalhos que demonstram prejuízos na MO com o MK (Aura and Riekkinen, 1999; Verma and Moghaddam, 1996). Em trabalho recente, Enomoto et al. (2007) demonstraram que o tratamento sistêmico com MK prejudicou a MO e a memória de referência de ratos no labirinto radial de oito braços. É importante destacar, que seu protocolo experimental foi bem diferente ao utilizado em nosso estudo, o que pode explicar os diferentes efeitos do MK sobre a memória de referência. O mesmo autor verificou também prejuízos do MK no desempenho de animais submetidos a testes no labirinto aquático de Morris e, ainda, déficits na aquisição das tarefas durante o treinamento.

Li et al. (1997) também encontrou prejuízos na MO de ratos com o uso de MK em testes com retardos no labirinto radial. Entretanto, o uso de um antagonista de receptores AMPA não interferiu no desempenho dos animais, sugerindo que a ação modulatória do GLU na MO é mais fortemente ligada aos receptores NMDA.

Em primatas não humanos, o uso de antagonistas não-competitivos, tais como a PCP e o MK também promovem prejuízos em diversas tarefas cognitivas, inclusive na MO (Castner e Williams, 2007). Ogura e Aigner (1993), encontraram prejuízo do desempenho em teste com retardo em macacos submetidos a administrações agudas de MK. Em um estudo recente, Tsukada et al. (2005), observaram que administrações sistêmicas de MK nas doses de 0,03; 0,1; 0,3 mg/kg promoveram prejuízos no desempenho de macacos no teste de resposta oculomotora.

Deste modo, os prejuízos observados com o uso de MK em nosso estudo estão de acordo com diversos trabalhos encontrados na literatura. Entretanto, dados anteriores colhidos em nosso laboratório ou mesmo os dados obtidos com HCl seguido de MK no presente estudo, indicam cautela nas conclusões. Mesmo porque, a magnitude dos prejuízos aqui observados, embora significativa, não é tão robusta.

#### *5.5.2.1) Aspectos funcionais dos receptores NMDA no CPF*

Sem dúvida, as vias glutamatérgicas proveniente das mais diversas regiões do SNC são essenciais para as diversas funções do CPF. Suas ações dependem especialmente de receptores AMPA e NMDA. Teoricamente, qualquer alteração no funcionamento destes receptores é potencialmente prejudicial às funções frontais, porém a importância funcional destes dois receptores nas sinapses glutamatérgicas não são as mesmas (Seamans e Yang, 2007; Li et al., 1997).

Estudos na área CA1 do hipocampo demonstram que o uso de agonistas de receptores AMPA aumenta a LTP estimulada pelo tratamento prévio com NMDA. Entretanto, o antagonismo deste mesmo receptor não impede a LTP de células hipocâmpais em resposta ao NMDA. Este mesmo padrão está presente em diversas regiões do sistema nervoso, inclusive no CPF. Embora a inter-relação funcional de ambos os receptores seja bem estabelecida na literatura, os receptores NMDA parecem exercer suas ações com certa independência da ativação dos receptores AMPA (Seamans e Yang, 2007; Li et al., 1997).

Diversos modelos de animais utilizados no estudo da esquizofrenia utilizam antagonistas não-competitivos de receptores NMDA, tais como a PCP e a Ketamina. Nestes modelos, os animais demonstram sintomas semelhantes aos observados em pacientes esquizofrênicos, a se destacar prejuízos funcionais atribuídos a uma disfunção frontal. Estas alterações não se restringem a MO, mas sim as mais diversas funções do CPF, o que coloca os receptores NMDA como estruturas chave para o perfeito funcionamento desta área cortical (Castner e Williams, 2007).

A LTP promovida pelos receptores NMDA pode ser essencial para a MO. O bloqueio deste processo por inibição intracelular da ação do  $Ca^{++}$  ou por bloqueio de receptores NMDA, atenua ou até mesmo impede o aumento dos disparos de neurônios frontais, tipicamente observados durante o período de retardo em condições normais. As alterações funcionais destes neurônios estão diretamente relacionadas com prejuízos em testes cognitivos (Castner e Williams, 2007).

Baseando-se nestes dados, pode-se supor que os prejuízos observados com o uso do MK no presente estudo podem ser atribuídos a diminuição

funcional dos neurônios corticais relacionados a MO. Possivelmente, houve uma diminuição da facilitação ou da intensidade da LTP induzida pelas aferências glutamatérgicas. Entretanto, deve-se lembrar que diversos outros processos paralelos compensatórios podem ser ativados, o que justificaria um prejuízo funcional mais modesto do que o esperado e, até mesmo, os aspectos em U da curva obtida com o tratamento com MK, como será melhor discutido mais adiante.

### **5.5.3) Análise do efeito do SKF sobre a MO**

O tratamento com SKF prejudicou acentuadamente o desempenho dos animais nas doses de 0,56 e 1,8 µg, porém a maior dose não diferiu do controle. Isto foi observado quando o SKF foi administrado previamente a sal (experimento 1) ou na ordem inversa (experimento 2). Tais efeitos ocorreram ao se analisar tanto o número total de erros, quanto nas análises dos erros do tipo 1 isoladamente. Estes dados reforçam a ação deste fármaco na modulação da MO, como previamente constatado em nosso laboratório.

Por outro lado, houve alterações significativa dos erros do tipo 2 na dose de 1,8 µg no experimento 2. Sendo assim, parte dos erros observados, pelo menos nesta dose, podem ser atribuídos a disfunções na memória de referência ou mesmo em outras funções do CPF, promovendo a perseveração de erros por exemplo. Entretanto, deve-se ressaltar que o número de erros do tipo 1 nesta dose foi bem superior aos do tipo 2.

Estes dados replicaram exatamente a curva obtida anteriormente em nosso laboratório, na qual as mesmas doses de SKF foram utilizadas. No estudo prévio, não houve administração prévia ou posterior de qualquer outra droga e os animais foram submetidos a intervalos de 5 segundos e 1 hora. Os prejuízos foram observados somente nas curvas com retardos mais longos (Valentim, 2003). Deste modo, os prejuízos obtidos com o SKF são bastante consistentes.

No presente estudo, não foi feita uma dose menor que 0,56 µg. Entretanto, em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Galvão, 2006; Silva de Melo et al., 2005) foi utilizada a dose de 0,18 µg e verificado que



seus efeitos não são diferentes do tratamento controle. Estes dados reforçam a padrão em U, característico da ativação  $D_1$  no CPF.

Na literatura, há diversos trabalhos que obtiveram resultados parecidos. Zart et al. (1997) obteve um aumento significativo no número de erros em testes de retardo alternado, utilizando um agonista total  $D_1$ , o SKF81297, na dose de 0,1  $\mu\text{g}$  infundido bilateralmente no CPF de ratos. Esse prejuízo foi revertido com administrações sistêmicas de SCH na dose de 0,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Porém, o uso isolado deste antagonista, sistemicamente, não produziu prejuízos, mantendo-se semelhante ao tratamento controle. Isso demonstrou que, mesmo em concentrações suficientes para bloquear a ação do agonista, o SCH sozinho não produziu alterações no desempenho dos animais.

Floresco et al. (2001), também obteve prejuízo com infusões de SKF no CPF de ratos. Utilizando o labirinto radial de 8 braços e retardos de 30 min., os animais tiveram um aumento significativo do número de erros nas doses de 0,1 e 0,2  $\mu\text{g}$ . Apesar de algumas diferenças metodológicas, como por exemplo o período de retardo e as doses, eles obtiveram um prejuízo semelhante.

Estudo com primatas não-humanos também demonstram resultados semelhantes. Doses elevadas de SKF podem prejudicar a MO. Entretanto, a área cortical envolvida com tais prejuízos é a região dorsolateral do CPF, área filogeneticamente relacionada ao CPFm de roedores (Goldman-Rakic, 2000).

Portanto, nossos resultados com o SKF são altamente consistentes e condizentes com a vasta literatura da área. Os receptores  $D_1$  presentes no CPF são inegavelmente essenciais para diversos aspectos funcionais desta região, principalmente para a MO.

#### *5.5.3.1) Aspectos funcionais dos receptores $D_1$ no CPF*

A influência da ativação  $D_1$  sobre a MO apresenta um aspecto em U invertido. Em baixa ativação, simulada por altas doses de antagonistas, verifica-se prejuízos em testes com animais ou humanos. À medida que estes receptores se tornam mais ativos, o desempenho dos animais nos testes melhoram de modo crescente, até que se atinja um nível ótimo. Neste ponto,

obtêm-se os melhores desempenhos dos animais. Um aumento da ativação  $D_1$  a partir daí produz prejuízo progressivo (Goldman-Rakic et al., 2000).

Em condições normais, o sistema mesocortical funciona em um nível de atividade um pouco abaixo deste ponto ótimo. Zahrt et al. (1997), sugere que o uso de 0,0001  $\mu\text{g}$  de SKF81297, bilateralmente infundido no CPF, poderia promover um nível supranormal de desempenho em ratos. Entretanto, um aumento da dose sugerida poderia produzir um prejuízo progressivo (Zahrt et al., 1997).

Um fato que chama a atenção em nossos resultados foi verificado na curva do SKF, na qual é demonstrada uma progressiva diminuição do prejuízo com o aumento da dose. Pode-se explicar este fato pelo agonismo parcial, realizado pelo fármaco. Outros agonistas  $D_1$  que realizam agonismo total possuem um efeito diferente sobre a MO, através dos quais doses mais elevadas prejudicam ainda mais o desempenho dos animais (Goldman-Rakic, 2000). Porém, quando se utiliza um agonista parcial, o aumento das doses resulta em efeito inverso sobre o desempenho. Doses baixas potencializam o efeito da DA, pois atua em receptores livres (como observado na doses de 0,56 e 1,8  $\mu\text{g}$ ). Entretanto, a medida que se aumentam as doses, a droga passa a competir com a DA endógena. Como sua potência é menor, produz uma diminuição da resposta (observado na dose de 5,6  $\mu\text{g}$ ), pois reduz a ativação global de  $D_1$  e, conseqüentemente, o efeito prejudicial observado.

#### **5.5.4) Reversão dos Prejuízos do SKF pelo SCH**

No presente estudo, os prejuízos tipicamente vistos nas doses de 0,56 e 1,8  $\mu\text{g}$  de SKF sobre a MO, foram revertidos pela administração prévia do antagonista seletivo de receptores  $D_1$  (SCH). Estes dados demonstram definitivamente que os efeitos do SKF observados se devem à ação exclusiva em receptores  $D_1$ , refutando qualquer outra especulação sobre o sítio de ação deste fármaco. Além disso, por se tratar de um agonista parcial, pode-se questionar se os prejuízos vistos são realmente de uma ação estimulatória sobre estes receptores. Logicamente, que a reversão realizada pelo SCH fecha

a questão, comprovando que os prejuízos observados se devem a uma ação como agonista em receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub>.

Reversão semelhante foi realizado por Zart et al. (1997). Entretanto, ele utilizou um agonista total (SKF81297) e a administração do SCH foi sistêmica, o que põe em questionamento o local de ação do SCH para promover tal reversão. As administrações aqui realizadas foram intracorticais e, assim, comprovadamente promovidas no CPFm.

Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (Valentim, 2003), a administração de SCH nas doses de 0,01; 0,32; 1,0 e 3,2 µg infundido diretamente no CPFm de ratos, não alterou o desempenho dos animais. Portanto, os efeitos semelhantes ao controle da dose de 1,0 µg de SCH sozinho, já era esperado. Esta dose foi escolhida por ser intermediária as outras previamente testadas e, por isso, se necessário poderia ser utilizada outras dosagens do SCH para uma melhor visualização da curva. Porém isto não foi requerido, já que os objetivos foram alcançados com a dose escolhida.

#### **5.5.5) Efeitos das Interações entre SKF e MK**

No presente estudo, a administração de MK nas doses de 0,32 µg e 1,0 µg reverteu os prejuízos da dose de 0,56 µg de SKF e atenuaram os déficits promovidos pela dose de 1,8 µg do agonista D<sub>1</sub>. A maior dose de MK (3,2 µg) não alterou estes efeitos. Por outro lado, a dose de SKF que não havia promovido prejuízos (5,6 µg), ao se combinar com a dose de 1,0 µg de MK aumentou significativamente o número total de erros em relação ao controle. Isto não foi observado nas suas interações com a menor ou a maior dose do MK, produzindo novamente uma curva em U.

É importante ressaltar que, ao se analisar isoladamente os erros do tipo 1, pôde-se verificar uma atenuação dos prejuízos produzidos pelas doses de 1,0 e 3,2 µg de MK, quando se administrou previamente a dose de 0,56 µg de SKF. O mesmo não foi observado com as demais doses deste agonista parcial D<sub>1</sub>. Este fato reforça ainda mais a relação entre os dois tipos de receptores na modulação da MO.

Na interação SKF 5,6 µg seguida de MK 1,0 µg também foi observado aumento significativo dos erros do tipo 2. Desta forma, os prejuízos obtidos

neste tratamento podem ter sido em função de alterações na memória de referência dos animais. Curiosamente, o aumento ou a diminuição da dose do MK, interagindo com a mesma dose de SKF não diferiu do tratamento controle, o que também caracteriza uma curva em U para este tipo de erro, associado à memória de referência.

Ao se analisar conjuntamente esses dados, pode-se concluir que os efeitos prejudiciais da estimulação  $D_1$  sobre a MO, estão diretamente ligados a um aumento funcional de receptores NMDA no CPF, já que sua inibição reverte este efeito. Além disto, pode-se supor uma forte ação sinérgica entre estes receptores nesta área cortical. Diversos trabalhos demonstram, do ponto de vista molecular ou eletrofisiológico, esta estreita relação, porém na literatura não há registros de trabalhos analisando do ponto de vista farmacológico a interação destes sistemas durante a realização de testes que avaliam a MO. Portanto, os resultados aqui obtidos são inéditos nesta abordagem e corroboram com a vasta literatura existente sobre o assunto com outras abordagens.

#### *5.5.5.1) Aspectos funcionais da interação dos receptores $D_1$ e NMDA*

Cepeda et al. (1993) foi o primeiro a demonstrar claramente que a estimulação de receptores  $D_1$  aumentava a excitação de neurônios estriatais tratados com NMDA. Demonstrou também que a estimulação  $D_2$  promovia efeitos opostos, porém menos intensos que os efeitos via receptores  $D_1$ . Em seguida, diversos autores corroboraram este estudo e, com a crescente busca pelos mecanismos envolvidos, delineou-se os principais aspectos intracelulares responsáveis por esta interação. Baseado no fato de que a principal via de ação intracelular dos receptores  $D_1$  ocorre pela estimulação da adenilil ciclase, buscou-se intensamente a correlação do aumento intracelular do AMPc e a facilitação de receptores NMDA. Greengard (2001) demonstrou em neurônios estriatais o envolvimento da DARPP-32 e da PP-1 neste processo, dando forte embasamento para a inter-relação destes receptores. Posteriormente, ficou evidente que estes mesmos mecanismos ocorriam também no córtex cerebral, inclusive no CPFm (Castner e Willams, 2007).

Paralelamente, outras evidências demonstravam que o aumento do cálcio intracelular também é importante para esta interação. O bloqueio farmacológico de canais de cálcio do tipo L impede a facilitação dos receptores NMDA via estimulação  $D_1$  (Cepeda et al., 1999). Chen, Greengard e Yan (2004) comprovaram que o cálcio extracelular é importante para este efeito, mas que, pelo menos em parte, a ativação da proteína cinase C participava desta modulação. Sendo assim, parece haver uma ativação da fosfolipase C por estimulação dos receptores  $D_1$ .

Curiosamente, a estimulação de receptores NMDA também pode aumentar funcionalmente os efeitos de  $D_1$  em neurônios estriatais. Scott et al. (2006), verificou que ao se aumentar a corrente de cálcio dos receptores NMDA, aumentava-se também a translocação de receptores  $D_1$ , aumentando assim sua quantidade na membrana. Trabalhos posteriores (Scott et al., 2006) sugeriram a formação de um complexo funcional entre os receptores  $D_1$  e os receptores NMDA, o que reforça uma ação sinérgica entre eles. Este sinergismo parece essencial para processos cognitivos, tais como aprendizagem e memória (Caster e Williams, 2007).

Os resultados obtidos no presente estudo são, portanto, embasados do ponto de vista funcional pelos trabalhos citados acima. Pode-se supor que os prejuízos obtidos nas doses de 0,56 e 1,8  $\mu\text{g}$  ocorreram indiretamente por uma exacerbação da corrente iônica dos receptores NMDA, de modo que o bloqueio deste receptor pelo MK reverteu tais efeitos.

Em uma análise hipotética da curva obtida pela interação do SKF com o MK pode-se verificar a coerência de nossos resultados com as evidências obtidas nos estudos anteriormente citados. A dose de 0,56  $\mu\text{g}$  promoveu um aumento funcional dos receptores  $D_1$  que por sua vez, através das vias intracelulares discutidas anteriormente, aumentou a condutância dos receptores NMDA corticais além do ponto ótimo, prejudicando assim a MO. Com a infusão de MK, os receptores NMDA ativos foram bloqueados, o que restaurou a ativação do sistema, pelo menos nas doses de 0,32 e 1,0  $\mu\text{g}$ . A medida que se aumentou a dose de MK (3,2  $\mu\text{g}$ ) a inibição dos receptores NMDA foi intensa, de modo que o sistema ficou abaixo do ponto basal, produzindo prejuízos na mesma magnitude dos promovidos pelo SKF na dose de 0,56  $\mu\text{g}$  sozinha. Este último efeito pode ser explicado pelo fato de que o

agonismo  $D_1$  aumenta o número de receptores NMDA ativos, aumentando assim os possíveis sítios de atuação do MK nesta dose, que só age em receptores previamente ativados. Isto aumenta sua capacidade de antagonizar mais receptores NMDA, do que quando administrado sozinho.

#### **5.5.6) Efeitos da CZP na MO**

No presente estudo, o uso das diferentes doses de CZP não se diferiu estatisticamente do tratamento controle, embora a dose de 3,2  $\mu$ g tenha aumentado o número de erros dos animais. Nem mesmo ao se analisar isoladamente os erros tipo 1 houve diferenças estatísticas. Também não houve alteração dos erros do tipo 2. Estes dados diferem de resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório (Valentim, 2003), no qual o uso de CZP prejudicou consistentemente nas doses de 1,0 e 3,2  $\mu$ g o desempenho de animais submetidos a testes no labirinto radial com retardos de 1 hora. Além disso, a dose de 3,2  $\mu$ g prejudicou a MO em testes com retardo de 5 segundos.

Addy e Levin (2002 e 2005), utilizando CZP administrada sistemicamente, nas doses de 1,25 e 2,5 mg/kg encontraram prejuízos significativos no desempenho de ratos no labirinto radial de 8 braços. O protocolo realizado nesse estudo difere do nosso em alguns aspectos, por exemplo, não houve período de retardo e as administrações das drogas foram sistêmicas, o que pode explicar a diferença nos resultados.

É provável que os resultados contraditórios aqui obtidos com a CZP tenham sido influenciados pela metodologia utilizada. É importante ressaltar que o trabalho anteriormente realizado em nosso laboratório, utilizou-se da infusão de CZP sozinha e que os animais eram testados 5 minutos após o processo de infusão. No presente estudo, 10 minutos após a infusão da CZP, os animais passaram por uma infusão de sal e eram testados 5 minutos depois. Desta forma, o tempo entre a administração da CZP e o início do teste foi três vezes maior. É bem verdade que nos testes com o SKF não se observou a influência do aumento do intervalo entre as administrações e o teste, entretanto deve-se considerar que são fármacos diferentes e podem sofrer diferentes metabolizações no tecido neural, possuindo, ainda, diferentes farmacodinâmicas.

Outro fato que diferencia os dois experimentos, é que o tratamento controle dos dois trabalhos apresentam desempenhos bem diferentes. No primeiro trabalho, os animais que receberam HCl tiveram médias de erros bem abaixo dos animais que passaram pelo tratamento HCl seguido de salina do presente estudo. Portanto, o elevado número de erros em nosso tratamento controle pode ter interferido nas análises estatísticas.

#### *5.5.6.1) Aspectos funcionais da ação da CZP no CPF*

O exato mecanismo de ação da CZP sobre a MO é de difícil determinação. Ela possui alta afinidade por inúmeros receptores. Porém, pode-se dizer que os receptores D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub> correspondem a sítios de ação importantes deste fármaco no SNC. Sua afinidade por D<sub>4</sub> é pelo menos dez vezes maior do que por D<sub>2</sub> (Xun Wang et al., 2002; Oak et al., 2000). Desta forma, é altamente sugestiva uma participação D<sub>4</sub> em sua ação sobre a MO.

#### **5.5.7) Efeitos da Interação de CZP e de MK na MO**

Ao se analisar o número total de erros na curva que interagiu CZP e o MK, o único tratamento que diferiu do controle, sendo observado um prejuízo do desempenho após o retardo de 1 h, foi aquele que utilizou a dose de 3,2 µg de CZP seguida de 1,0 µg de MK. Curiosamente, na menor (0,32 µg) e na maior (3,2 µg) dose de MK quando administrados posteriormente à mesma dose de CZP, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes. Novamente, uma curva em U invertido pode ser observada, sugerindo uma ação sinérgica destas drogas nos prejuízos em questão, pelo menos nestas doses.

Analisando-se somente os erros tipo 1, além de se observar o mesmo efeito do tratamento citado acima, verificou-se que o tratamento com CZP na dose de 0,32 µg seguido de MK 1,0 melhorou o desempenho dos animais em relação ao controle e ao tratamento com HCl seguido de MK 1,0 µg. Estes dados corroboram com a ação sinérgica das duas drogas, porém em um sentido oposto.

Marcus et al. (2005) verificou que o uso de Clozapina sistemicamente administrada reverteu os prejuízos promovidos pela administração de MK, também sistemicamente, em ratos testados no labirinto radial. Além disso, Addy e Levin (2005) verificou que a CZP é efetiva em aliviar prejuízos na MO gerados por lesões septo-hipocampais em ratos adultos. Clinicamente, diversos autores descrevem melhoras na cognição, principalmente na MO, em pacientes esquizofrênicos. Desta forma, há dados na literatura que embasam uma melhora no desempenho ao se interagir estes dois fármacos (Marcus et al., 2005).

Em uma análise global, a CZP parece prejudicar a MO em animais normais. Entretanto, em situações nas quais há um prejuízo já instalado, este antipsicótico parece melhorar o desempenho, revertendo os prejuízos. Este efeito benéfico foi observado também em modelos experimentais que avaliam aspectos atencionais em ratos (Baviera et al., 2008). Além disso, outros antipsicóticos atípicos, tais como a lurasidona e olanzapina, tem efeitos semelhantes na cognição (Enomoto et al., 2008), o que não acontece com os antipsicóticos típicos (Dunn e Killcross, 2006).

Murphy et al. (1997), verificou os efeitos da CZP nos prejuízos da MO promovidos pelo uso de um agonista parcial de receptores GABA<sub>A</sub> (FG7142). Curiosamente, foi verificado que este antipsicótico reverteu os prejuízos somente em pequenas doses. Quando os animais eram tratados com doses maiores, foi verificado prejuízo ainda maior no desempenho. Este efeito bifásico da CZP pode ter sido observado em nosso trabalho, porém interagindo com o MK.

#### *5.5.7.1) Aspectos funcionais da modulação dos receptores NMDA pela CZP*

Wang et al. (2003) demonstrou que a administração do agonista seletivo de receptores D<sub>4</sub>, PD168077, diminuiu a corrente iônica mediada por receptores NMDA em neurônios do CPFm *in vitro*. Além disso, foi demonstrado também que este efeito depende da inibição tanto da PKA, quanto da proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II (CaMKII). Desta forma, a ação dos receptores D<sub>4</sub> promove efeitos opostos à estimulação D<sub>1</sub> sobre os receptores NMDA. Segundo o autor, este parece ser um mecanismo cortical importante no



controle do grau de ativação glutamatérgica no CPFm e pode participar da manutenção normal do fluxo de informações manipuladas pelas funções executivas. Um desequilíbrio deste sistema poderia levar à disfunções cognitivas e, ainda, sintomas típicos da esquizofrenia.

Em um trabalho publicado em 2006, Wang demonstrou que esta regulação D<sub>4</sub> sobre os receptores NMDA não acontece adequadamente com uso de PCP em ratos. Aparentemente isto acontece por uma maior liberação de DA no CPF. O tratamento com CZP restaura esta capacidade regulatória. O autor sugere que na esquizofrenia há uma disfunção basal dos receptores NMDA semelhante à simulada em seus experimentos. Conseqüentemente, há uma hiperdopaminergia no CPF, o que sabidamente relaciona-se com sintomas positivos da esquizofrenia. Possivelmente, os antipsicóticos atípicos, tal como a CZP podem aliviar esta disfunção por antagonizar receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>4</sub>, restaurando o sistema.

Obviamente, nossos resultados não nos permitem construir qualquer modelo teórico para a interação entre a CZP e o MK. Entretanto, chama a atenção que a dose de 0,32 µg de CZP seguida de 1,0 µg de MK tenha melhorado o desempenho dos animais e que o aumento da dose da CZP interagindo com esta mesma dose de MK tenha promovido prejuízos. É provável que esta regulação D<sub>4</sub> sobre os receptores NMDA esteja envolvida em nossos resultados.

### ***5.6) Papel do sistema mesocorticolímbico nas funções do CPF: novas perspectivas e abordagens***

A importância do CPF nas funções executivas é bem evidente. Embora muitos dos aspectos funcionais desta área cortical ainda sejam desconhecidos ou mesmo controversos, muitos estudos recentes tem dado suporte a uma melhor compreensão de seu papel na manipulação de informações utilizadas para guiar o comportamento organizado e coerente de mamíferos. Cada vez mais, o sistema mesocorticolímbico insere-se neste aspecto, mostrando-se bastante complexo e multifuncional (Phillips et al., 2007). Estas múltiplas funções se devem as várias sub-regiões do CPF inervadas pelas fibras

dopaminérgicas provenientes da ATV e, ainda, a diferentes ações da DA em uma mesma região. Por exemplo, por alterações físicas em sua liberação ou mesmo pelo tipo de receptor ativado (Castner e Willams, 2007; Phillips et al., 2007).

### **5.6.1) Circuitaria neuronal do CPF relacionada às interações dopaminérgicas e glutamatérgicas no controle das funções pré-frontais**

Nos neurônios piramidais do CPF, são encontradas altas densidades de receptores dopaminérgicos. O tipo D<sub>1</sub> encontra-se distribuído nos dendritos e no soma, espalhando-se desta forma por todas as camadas corticais. Atualmente, tem-se evidenciado que os receptores D<sub>1</sub> possuem uma importante distribuição extra-sináptica (Castner e Willams, 2007). Já, os receptores D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub> possuem uma distribuição mais restrita ao corpo celular, restringindo-se assim na camada V (Goldman-Rakic, 2000). Os receptores NMDA e AMPA são mais densamente observados nas regiões dendríticas dos neurônios piramidais, porém também podem ser encontrados em densidades elevadas no soma. Os terminais dopaminérgicos e glutamatérgicos estão em sua maioria co-localizados neste tipo celular (Goldman-Rakic et al., 1989, 2000).

Nos interneurônios gabaérgicos também são encontrados essa mesma interação, porém em menor quantidade. Ocorre principalmente no soma, onde é observada, uma grande população de receptores dopaminérgicos, principalmente do tipo D<sub>1</sub> (Goldman-Rakic, 2000; Tzschentke, 2000).

Segundo Goldman-Rakic (2000) há um circuito neuronal básico envolvido no funcionamento do CPF. Nestes circuitos, envolvem-se os neurônios piramidais da camada V do córtex que respondem por boa parte das eferências corticais e projetam-se para diversas áreas do SNC. Estes neurônios são modulados pelas diversas aferências que atingem esta área cortical e, ainda, pelos interneurônios gabaérgicos. O grau de ativação dos neurônios piramidais seria essencial para as funções corticais, pois podem tanto recrutar a ativação de circuitos reverberativos em diversas outras áreas corticais, como também ativar vias hipocámpais relacionadas a memórias consolidadas. Além disso, podem controlar a atividade de diversas regiões sub-corticais, inclusive da ATV, controlando assim seu próprio efluxo

dopaminérgico. Segundo a autora, existe um ponto ótimo de ativação destes neurônios, abaixo ou acima do qual, há uma menor eficiência das funções corticais, mais especificamente da MO. Foi sugerido que o sistema dopaminérgico, especialmente via D<sub>1</sub>, e o sistema glutamatérgico atuariam conjuntamente para influenciar o funcionamento destes neurônios e, assim controlariam as funções do CPF.

Este modelo foi de extrema importância como ponto de partida para se investigar as funções do CPF. Experimentos mais recentes acrescentaram diversos elementos a este modelo, demonstrando que a fisiologia da MO é bem mais complexa, do que inicialmente proposta por Goldman-Rakic (2000). Além disso, novas diretrizes conduzem para modelos diferentes que incluem outros receptores dopaminérgicos em um contexto mais ativo durante o processo da MO. Até mesmo os receptores D<sub>1</sub> parecem ser muito mais complexos e cheios de nuances, do que inicialmente pensado (Castner e Willams, 2007; Phillip et al., 2007; Seamans e Yang, 2004).

### **5.6.2) Aspectos funcionais da via mesocortical durante a execução de tarefas**

Phillips et al. (2004), realizando microdiálise *in vivo*, verificou que as concentrações extracelulares de DA no CPFm alteram-se nas diferentes fases do teste no labirinto radial de oito braços. Seu protocolo experimental foi bem parecido com o nosso, no qual os animais eram treinados para realizar uma “sessão treino” (equivalente ao pré-retardo) seguido de um retardo de 30 minutos, com uma posterior “sessão teste” (equivalente ao pós-retardo). Foi constatado que a liberação de DA aumentou 79% durante a sessão teste e permaneceu elevada nos cinco minutos iniciais do retardo, restaurando a linha de base após vinte e cinco minutos do início do retardo. Ao retornar ao labirinto na sessão teste, o efluxo de DA voltou a subir, atingindo uma concentração extracelular 87% maior do que o valor basal. Finalizado o teste, a concentração deste neurotransmissor voltou ao normal novamente após cinco minutos. Estes dados sugerem que o sistema mesocortical participa mais efetivamente da aquisição, retenção e utilização das informações referentes ao teste.

Algumas questões podem ser levantadas em relação a esse experimento. Por exemplo, a liberação de DA poderia ter ocorrido pelo reforçamento em si, estando relacionado aos aspectos hedônicos e não a função cognitiva. Entretanto, o autor demonstrou em outro experimento que a liberação dopaminérgica ocorre mesmo na ausência de reforço, ou seja, quando os animais eram submetidos a sessões sem a presença do alimento. Por outro lado, a liberação de DA poderia ter ocorrido simplesmente pela execução em si da tarefa. Porém, foi verificado que o aumento do período de retardo associava-se a uma menor liberação de DA na sessão teste, de modo que após um retardo de seis horas não havia aumento na liberação de DA significativamente. Além disso, houve uma associação correspondente com déficits no desempenho dos animais. Desta forma, a ação dopaminérgica parece estar envolvida realmente com os aspectos cognitivos do teste (Phillips et al., 2004).

No mesmo trabalho, Phillips et al. demonstrou que a infusão de SKF 81297 no CPF após o retardo de seis horas aliviou parcialmente estes prejuízos, demonstrando que a representação neural da informação ainda estava, pelo menos em parte, preservada. Assim, a menor liberação de DA não está associada à perda das informações referentes ao teste, indicando que o CPF não necessita de um aumento funcional sustentado do sistema mesocortical para manter a informação em si, porém mostra-se extremamente importante para sua manipulação. Além disso, a DA interfere na aquisição da informação, pois o bloqueio farmacológico de receptores D<sub>1</sub> ou impedimento da liberação dopaminérgica, antes da fase de treinamento, prejudica a aquisição da informação e o desempenho de animais (Phillips et al., 2007).

### **5.6.3) Manutenção da informação “on line”: novas diretrizes**

Muitos autores sustentam que a MO corresponderia apenas à manutenção da informação por segundos, no máximo poucos minutos. Esta hipótese ganhou força com os trabalhos eletrofisiológicos realizados no CPF, que demonstraram que os neurônios corticais se tornam mais ativos, durante o período de retardo, porém este aumento só se mantém por segundos ou minutos (Fuster, 1991). Visto que estes neurônios são considerados o sítio

anatômico da MO, alega-se que o CPF não é capaz de manter a informação por um tempo maior. Assim, qualquer informação utilizada após esse curto período deve ser considerada como função de outras áreas cerebrais, como por exemplo, o hipocampo. Segundo estes autores, o CPF apenas realiza a evocação da informação sem qualquer papel na manutenção das mesmas (Izquierdo, 2000). Entretanto, outra análise pode emergir deste mesmo processo.

A participação do hipocampo na formação de memórias é inquestionável, seja no processo de consolidação ou mesmo na manutenção da informação. Em poucos minutos após a fase de aquisição, o hipocampo promove a LTP que, sabidamente, facilita vias neurais nas próprias áreas hipocâmpais. Esta facilitação inicia-se com estímulos tetânicos e pode manter-se por curtos períodos (poucos minutos ou horas) pelas etapas iniciais (LTP precoce) ou serem sustentadas por longos períodos (dias, meses ou anos) por processos posteriores (LTP tardia). Sem dúvida estes processos constituem a base da consolidação e manutenção de memórias (Izquierdo, 2000).

Entretanto, conforme exposto anteriormente, a LTP não é restrita as áreas hipocâmpais. Ela é encontrada nas mais diversas áreas, inclusive no CPF, no qual o papel da LTP ainda é questão controversa. Entretanto parece envolver-se com a MO e outras funções, pois a facilitação gerada por este processo pode explicar a sustentação da informação pelo próprio CPF independente dos disparos neuronais iniciais, vistos somente nos primeiros segundos após a fase de aquisição. Na verdade, este aumento funcional dos neurônios pode funcionar com os estímulos tetânicos para o desenvolvimento da LTP em diversas áreas, tais como no hipocampo ou até mesmo no próprio CPF por circuitos reverberativos (Castner e Willams, 2007; Seamans e Yang, 2004). Portanto, pode-se sugerir que a manutenção das informações realizadas pelo CPF ocorre em seus próprios neurônios por alterações bioquímicas típicas da LTP, o que exclui a necessidade da manutenção dos disparos dos neurônios corticais.

A LTP no CPF ocorre especialmente em neurônios piramidais que se projetam para as mais diversas áreas do SNC, inclusive para o hipocampo. Essas projeções são recíprocas e aparentemente é a base anatômica da conexão funcional entre estas duas estruturas. Assim, a facilitação destes

neurônios pela LTP pode levar a conexão funcional de informações já consolidadas pelo hipocampo com outras mantidas pelo próprio CPF em seus circuitos locais, integrando as diversas informações a um contexto mais global.

Pelo exposto acima, o CPF possui bases fisiológicas para sustentar informações e, assim, manipulá-las quando necessário. Este processo é uma das bases funcionais da MO. Este fato elimina o limite temporal das funções do CPF sugeridas por alguns autores e, ainda, coloca em questão o aspecto funcional das informações. Desta forma, pode-se supor que o CPF armazena um dos aspectos mais importante das informações: seu contexto operacional e comportamental momento a momento. Fato sustentado pelas observações das lesões frontais, cujos principais déficits se relacionam com estes aspectos da cognição.

#### **5.6.4) Papel da interação funcional dos receptores dopaminérgicos e NMDA na facilitação e LTP dos circuitos locais do CPF**

A estimulação dos receptores  $D_1$  pode aumentar funcionalmente os receptores NMDA ou mesmo as sinapses glutamatérgicas, como visto anteriormente. Através da ativação das vias metabólicas que envolvem as PKAs e PKCs, aumenta-se o grau de fosforilação dos receptores glutamatérgicos, o que intensifica suas condutâncias. Além disso, estas mesmas vias metabólicas podem recrutar novos receptores internalizados em vesículas. Todos esses eventos levam a um aumento funcional das sinapses glutamatérgica, influenciando deste modo eventos como a LTP (Castner e Willams, 2007; Seamans e Yang, 2004).

Por outro lado, a estimulação de receptores  $D_1$  por si só parece desencadear eventos importantes de facilitação neuronal independentes do GLU. Sua ativação diminui o efluxo de  $K^+$  pelo fechamento de canais vazantes e, ainda, aumenta a condutância de canais de cálcio do tipo L. Além disso, parece aumenta a condutância de canais de  $Na^+$  vazante. Entretanto, estas ações sozinhas aparentemente não são robustas, mas podem ser exacerbadas pela ativação paralela de receptores NMDA. Desta forma, a ação modulatória entre estes receptores é bidirecional, o que caracteriza um forte sinergismo que, aliás, é também verificado em outras regiões cerebrais, tais como no

estriado e núcleo accumbens (Castner e Willams, 2007; Seamans e Yang, 2004).

Os receptores dopaminérgicos  $D_2$  e  $D_4$  influenciam a excitação neuronal promovida pelo GLU e os processos de LTP de modo oposto à estimulação  $D_1$ . Este fato é condizente com os mecanismos celulares de ação destes receptores, já que inibem a adenilil ciclase e, desta forma, diminuem a ação de PKAs. Possuem ainda mecanismos paralelos de inibição neuronal, tal como o aumento da condutância de canais de potássio. Entretanto, as ativações destes receptores não necessariamente inibem as células piramidais, pois, devido a seus padrões de distribuição pelas células do CPF, suas ativações podem levar a um controle dos circuitos cerebrais de modo complexo. Sendo assim, pode-se sugerir uma função diferente (mas não necessariamente oposta) para esses receptores, em relação aos receptores do tipo  $D_1$ . Este fato pode explicar por que a manipulação farmacológica de receptores da família  $D_2$  não promovem alterações da MO na mesma magnitude que os receptores da família  $D_1$  (Laruelle et al., 2005).

Além disso, os próprios receptores  $D_1$  parecem apresentar uma ação bifásica na regulação dos receptores NMDA. Em doses baixas a moderada, agonistas  $D_1$  promovem aumento da corrente destes receptores. Por outro lado, o aumento da dose deste mesmo agonista atenua a condutância do canal. Este efeito é pouco compreendido, porém pode envolver uma inibição pré-sináptica na liberação do GLU que só ocorre com altos níveis de estimulação  $D_1$ . De qualquer forma, sua estimulação exacerbada pode atenuar a transmissão glutamatérgica, funcionando como um “ajustador” do sistema (Seamans e Yang, 2004).

Outro aspecto importante, é que a ação da DA nos neurônios corticais parece depender do estado prévio de excitação neuronal. Quando estes neurônios estão em um estado elevado de ativação, os efeitos da estimulação  $D_1$  são claramente excitatórios, porém caso este mesmo neurônio esteja em baixo estado de ativação, as ações de  $D_1$  são opostas. Sendo assim, a ação dopaminérgica não depende só de si, mas também do estado funcional dos neurônios corticais, que são, por sua vez, modulados por vários outros sistemas de neurotransmissores (glutamatérgico, gabaérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, etc.) (Seamans e Yang, 2004).

As ações da DA sobre os interneurônios gabaérgicos também são de extrema importância para a circuitaria local. Os receptores D<sub>1</sub> promovem ativação destes neurônios, sobretudo os interneurônios de disparos rápidos que inibem as células piramidais perissomaticamente. Por sua vez, a estimulação D<sub>2</sub> promove efeito oposto. Além disso, o controle da DA sobre esta inibição gabaérgica local também acontece diretamente nos próprios neurônios piramidais, nos quais a estimulação D<sub>1</sub> aumenta a condutância dos receptores GABA<sub>A</sub>. A ativação da família D<sub>2</sub>, novamente, promove o oposto. Este efeito tem se mostrado bastante robusto no controle da ação gabaérgica no CPF (Gonchar e Burkhalter, 2003).

#### **5.6.5) A informação codificada pelo sistema mesocortical**

Segundo Schultz (1997), um dos papéis mais relevantes do sistema mesocortical envolve-se com a predição de erros. Toda vez que um reforço é dado a um animal em situações não previsíveis, há um aumento funcional desta via, liberando DA nos neurônios do CPF e do núcleo accumbens. Segundo o autor, esta ativação codifica as informações relacionadas a eventos imediatamente prévios e posteriores ao reforço como sendo benéficos. Desta forma, a DA liberada promoveria alterações na circuitaria local, a fim de manter as referidas informações facilitadas ou reforçadas. Na literatura, está bem demonstrado que a predição de erros tem uma estreita relação com aspectos cognitivos e aditivos.

Entretanto, as características dos neurônios dopaminérgicos mesocorticais e da própria DA não são completamente compatíveis com este modelo. Garris et al. (1994), verificou que a estimulação da ATV promove um aumento das concentrações dopaminérgicas no CPF de forma crescente, à medida que se aumenta a estimulação, podendo alcançar valores várias vezes maior do que o estado basal. Porém, este aumento ocorre de forma relativamente lenta. Além disso, o tempo de permanência da DA no CPF é elevado, aparentemente devido a um baixo número de recaptadores e, ainda, baixo número de autorreceptores (pois não limitam a liberação). Sendo assim,



a DA pode se difundir e agir em receptores fora das sinapses, o que está condizente com a grande quantidade de receptores D<sub>1</sub> extra-sinápticos. Em outras palavras, a cinética do sistema mesocortical é incompatível com as alterações rápidas requeridas para modular informações que se alteram em grande velocidade.

Seamans e Yang (2004) propuseram um modelo funcional para o CPF baseado em estudos eletrofisiológicos e farmacológicos recentes. Este modelo baseia-se no estado funcional dos neurônios piramidais do CPF que podem apresentar-se em: baixo estado de excitação (chamado de estado 1) ou alto estado de excitação (chamado de estado 2). Segundo os autores, as duas situações ocorrem normalmente nas funções do CPF, porém envolvem-se com aspectos diferentes destas mesmas funções.

Quando os neurônios estão no estado 2, há um fortalecimento das representações neurais. Deste modo, acredita-se que este estado favoreça a manutenção das informações representadas nos neurônios do CPF, sendo essencial para o início da MO e sua estabilização. Além disso, relaciona-se com o foco atencional, sabidamente importante para a execução de tarefas, pois neste estado o CPF estaria menos sujeito as possíveis interferências. O estado 1, por outro lado, pode ser essencial para a alteração das informações manipuladas pelo CPF. Neste estado, os circuitos neurais anteriormente fortalecidos seriam mais facilmente desfeitos, abrindo a possibilidade de novas representações corticais. Pode ser importante também para a alteração do foco atencional (Seamans e Yang, 2007).

O GLU é neurotransmissor essencial para determinar o estado funcional dos neurônios corticais. Uma maior liberação de GLU tenderia a levar os neurônios para o estado 2. Suas ações são mais rápidas, ocorrendo em poucos milissegundos e, ainda, é metabolizado intensamente no CPF. Desta forma, enquadra-se no perfil fásico necessário para rapidamente alterar os diferentes estados funcionais. Boa parte das aferências para o CPF são glutamatérgicas e todas elas atuam em conjunto para influenciar este sistema (Seamans e Yang, 2007).

Há fortes evidências de que o GLU seja liberado por fibras provenientes da ATV e que a ativação destas promoveriam uma rápida alteração funcional dos neurônios corticais, de modo a torná-los mais facilitados. Estas fibras, que

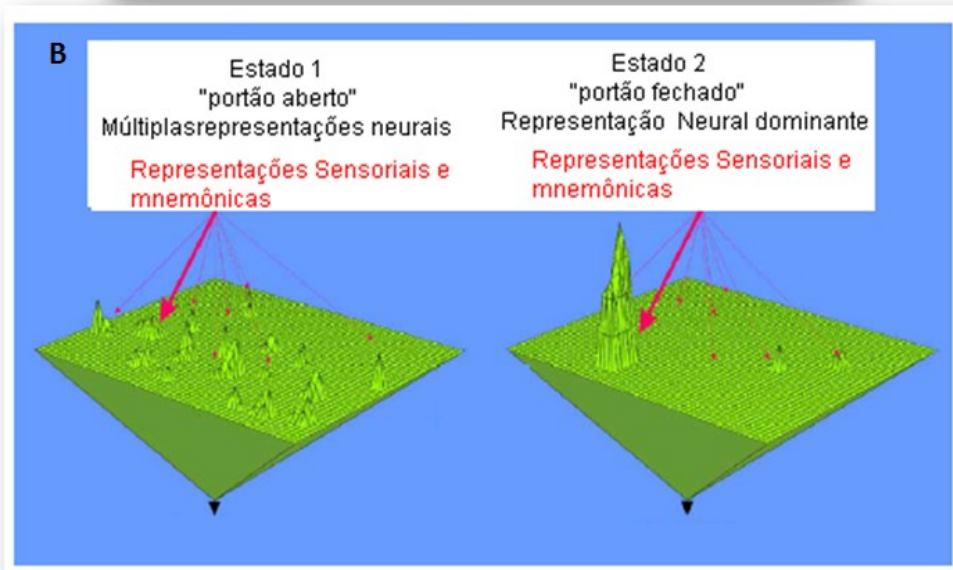
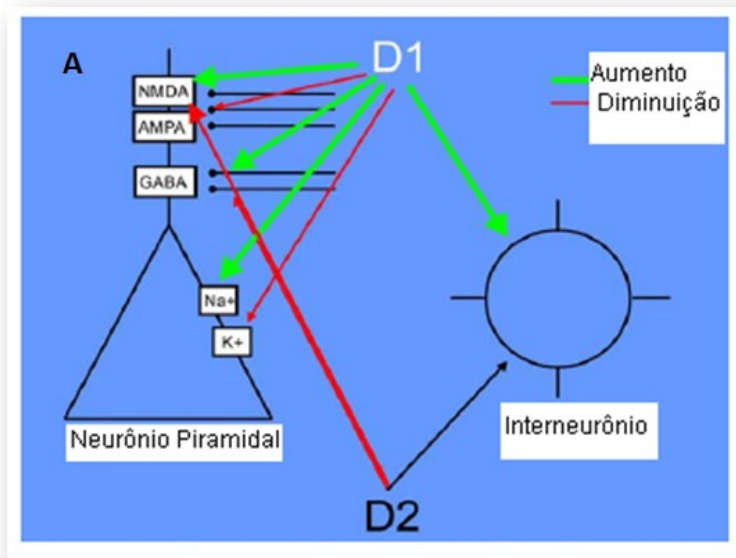
são miélicas, liberam o GLU no CPF transitoriamente. Aparentemente, são estas as fibras que trazem, pelo menos em parte, as informações de predição de erros e estão envolvidas com a informação a respeito do contexto comportamental e motivacional das informações representadas pelo CPF. Por exemplo, se o animal recebe um reforço não esperado, a ATV é ativada, levando os neurônios para o estado 2 pela rápida liberação de GLU. Isto fortalece a circuitaria cortical ativada imediatamente antes e depois, que obviamente contém informações que podem servir de pistas para uma recompensa futura (Seamans e Yang, 2007).

Somente alguns milissegundos depois, a DA é liberada de modo mais efetiva no CPF. Além disso, os efeitos dopaminérgicos ainda podem levar mais alguns milissegundos para se efetivarem via seus receptores. Ao fim do estímulo reforçador, os níveis de DA no CPF podem permanecer elevados por vários minutos, decaindo lentamente. Este comportamento sugere uma ação neuromodulatória da DA, influenciando as funções do CPF em uma escala de tempo maior que o GLU (Seamans e Yang, 2007).

De acordo com Castner e Willams (2007), alguns neurônios corticais do CPF apresentam sincronismo no disparo quando estão ativos. Foram detectados sincronismos entre neurônios piramidais, com outros do mesmo tipo e, ainda com interneurônios gabaérgicos. Estes disparos sincrônicos não parecem ser casuais e, por isso, deve haver um sistema que os sincronize. Este mecanismo pode ser essencial na interação temporal de diferentes informações. Os interneurônios gabaérgicos que são disparados sincronicamente parecem exercer uma papel importante na inibição lateral de outros neurônios piramidais que não estão sincronicamente ativados. Desta forma, a representação espacial e topográfica dentro do CPF é otimizada, impedindo possíveis interferências.

Um aspecto interessante neste modelo é que as várias aferências glutamatérgica que atingem o CPF podem influenciar o estado funcional dos neurônios corticais. Sendo assim, informações provenientes de áreas como o hipocampo, corpo amigdalóide e núcleo accumbens podem afetar este sistema. Isto faz do CPF um verdadeiro palco de convergências dos diversos aspectos das informações processadas, sendo que a atividade desta área cortical depende do somatório destas ações. O sistema mesocortical através da DA

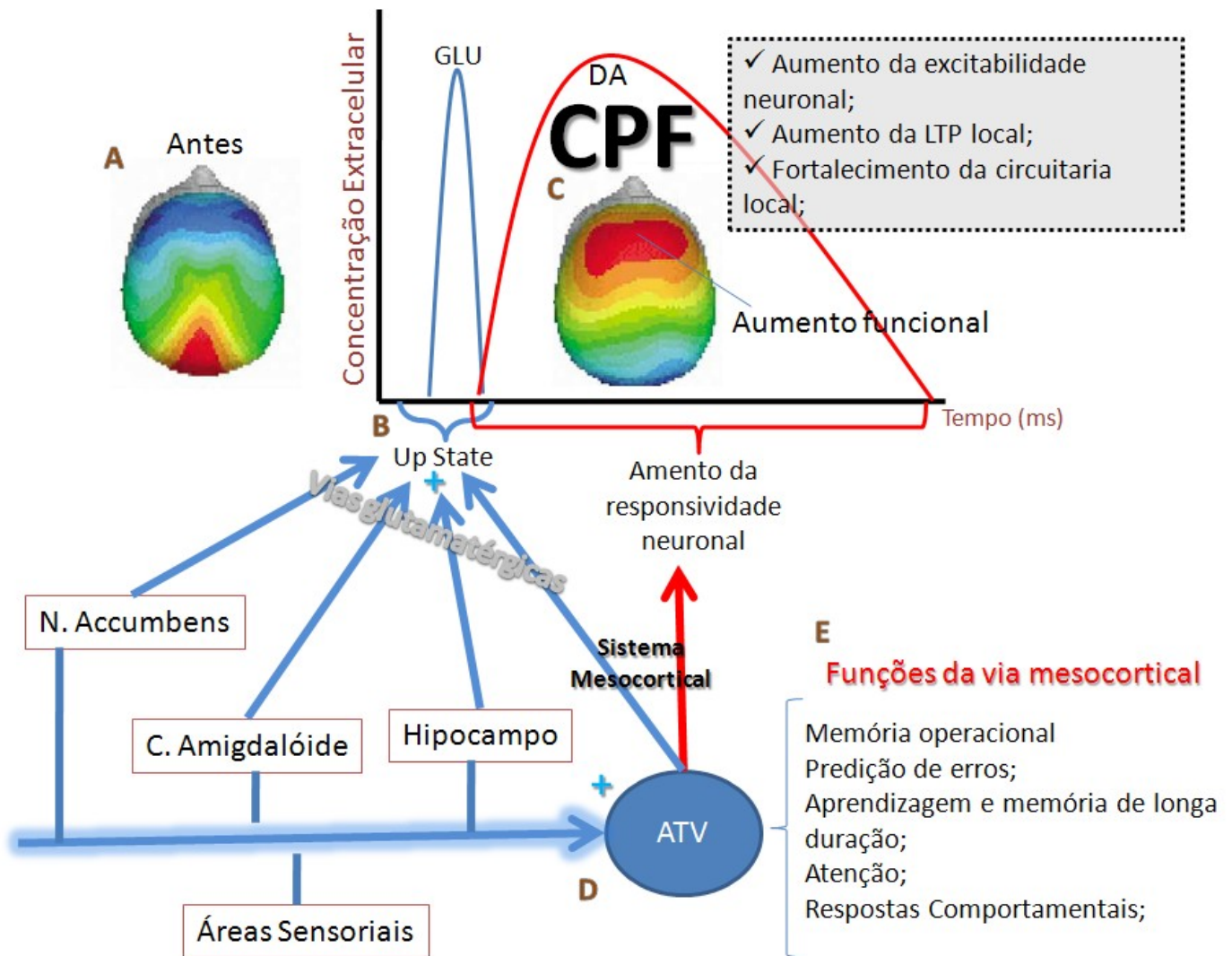
tem um papel importante em manter o estado responsivo dos neurônios. Suas variações fásicas desencadeada, por exemplo, pelo estresse agudo ou pela predição de erros aumentam a responsividade neuronal do CPF em situações nas quais as funções executivas são mais requeridas. Por outro lado, o excesso ou a baixa liberação de DA no CPF podem levar este sistema a uma disfunção, tal como supostamente acontece em algumas doenças. Nestas situações poderia aparecer estados 1 ou 2 extremos nos neurônios do CPF, dificultando a manipulação de informações (Phillips et al., 2007). As figuras 34 e 35 resumem este modelo.



- Estado 1**
- Menor Liberação de GLU
  - Maior ativação de  $D_2$
  - “Portão aberto”: Acesso fácil a estocagem da memória operacional
  - Múltiplas representações neurais, porém instáveis;
  - Exacerbação deste estado: interferências de estímulos diversos (déficit atencional);

- Estado 2**
- Maior Liberação de GLU
  - Maior ativação de  $D_1$
  - “Portão fechado”: início e estabilização de poucas representações
  - Múltiplas poucas neurais, porém estáveis;
  - Exacerbação deste estado: interferências de estímulos nas funções frontais (pensamentos e ações estereotipadas e obsessivas);

**Figura 34-** Ilustração e características do modelo proposto por Seamans e Yang (2004). Em A, os mecanismos de ação dos receptores  $D_1$  e  $D_2$  nos neurônios piramidais e interneurônios do córtex pré-frontal. Em B, um esquema representando as representações neurais nos estados 1 e 2. Em C, as principais características do estado 1. Em D, as principais características do estado 2 (extraído e modificado de Semans e Yang, 2004).



**Figura 35-** Ilustração do controle do estado funcional do CPF por diversas regiões do SNC, envolvendo o sistema mesocortical. Em A, está ilustrada a menor ativação funcional do CPF (azul) em condições basais. Em B, representa-se o aumento funcional promovido por projeções glutamatérgicas provenientes de diversas regiões do SNC. Notar que o aumento na ativação glutamatérgica é transitória e fugaz, porém é importante para promover o “up state”, ou seja” o aumento da excitabilidade dos neurônios corticais. Em C, ilustra-se o aumento na liberação de DA no CPF que ocorre logo após os estímulos glutamatérgicas. Destaque para maior duração da ação dopaminérgica que aumenta a responsividade neuronal no CPF por tempo mais prolongado. Neste momento, há maior integração e fortalecimento dos circuitos frontais. Em D, mostra-se que diversas áreas podem estimular paralelamente a ATV e, portanto, podem controlar a liberação de DA no CPF. Em E, cita-se algumas funções relacionadas a ativação da via mesocortical (Ilustração baseada nas propostas de Phillip et al., 2007; Seaman e Yang, 2004).

### **5.6.6) Aplicação das novas diretrizes da MO e a execução de testes com retardos**

O desempenho adequado de funções executivas não depende exatamente de um estado específico de excitação do CPF. Na verdade, a capacidade em alterar rapidamente os neurônios corticais bidirecionalmente entre os estados 1 e 2 parece ser essencial nas execuções de tarefas. Esta variação depende de vários fatores, dentre eles as informações sensoriais que trazem informações do ambiente e, ainda, das informações motoras a respeito do andamento da execução da tarefa. A atividade dopaminérgica é determinante na habilidade funcional deste sistema cortical (Phillips et al., 2007). Este modelo responde a várias questões observadas em testes que avaliam funções executivas. Pode, inclusive, ajudar a uma melhor compreensão de nossos resultados.

Como foi visto, a aplicação do SKF nas doses de 0,56 e 1,8 µg prejudicou a MO dos animais. Baseado no modelo anteriormente mencionado, pode-se supor que a ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub> tenha levado os neurônios corticais para um estado 2 exacerbado. Visto que a aplicação do agonista D<sub>1</sub> ocorreu antes do teste, durante a execução da tarefa em si os neurônios pré-frontais já estavam resistentes a novas representações. Possivelmente, este fato tenha dificultado a formação de uma representação neural das informações relacionadas aos braços visitados. Esta argumentação é reforçada quando se considera que a dose de 1,8 µg promoveu um maior número de erros do tipo 2 no segundo experimento que, segundo Seamans e Yang (2007), estão relacionados a um estado 2 extremo dos neurônios, situação na qual pode-se observar respostas perseverativas. Na dose de 0,56 µg, embora tenha produzido prejuízos consideráveis, a ativação do sistema pode não ter sido suficiente para aumentar comportamentos perseverativos e, deste modo, somente prejudicou a MO, refletido no aumento considerável dos erros do tipo 1.

Por outro lado, a administração posterior de MK reverteu tais prejuízos. Pode-se supor que sua utilização diminuiu a ativação dos receptores NMDA, levando o sistema para um nível adequado de ativação, pelo menos nas menores doses. Interessante lembrar que sua maior dose não reverteu os

prejuízos das doses de 0,56 e 1,8 µg, promovendo um aumento dos erros do tipo 1, aqueles associados a MO. Provavelmente, o estado 2 supostamente exacerbado pelo SKF tenha sido mantido. Por outro lado, a dose de 5,6 µg que sozinha não produz prejuízos, ao interagir com MK na dose de 1,0 µg aumentou o número de erros do tipo 1 e 2. Novamente, pode ter sido observado um estado 2 exacerbado. Sua interação com outras doses não promoveu prejuízos.

A CZP não promoveu prejuízos significativos no presente estudo. Entretanto, estudos anteriores (Valentim, 2003) verificaram tais efeitos. Acredita-se que o sítio de ação da CZP na modulação da MO sejam os receptores da família D<sub>2</sub>, cujas ativações levariam a um estado 1, o que prejudicaria a MO. Seu bloqueio, entretanto, pode promover uma tendência ao estado oposto.

Deve-se lembrar que somente em maiores concentrações a DA atua em receptores do tipo D<sub>2</sub>. Desta forma, seu bloqueio sozinho pode não influenciar o desempenho dos animais em testes para MO, pois em condições normais a ativação D<sub>2</sub> não parece ser um mecanismo importante utilizado pelo CPF para modular a representação neural das informações. Este argumento pode explicar os resultados de diversos trabalhos, nos quais não se observaram prejuízos com a utilização de agonistas ou antagonistas D<sub>2</sub>. Por outro lado, testes que avaliam a atenção mais seletivamente, parecem sofrer influências destes receptores. No homem, o uso de bromocriptina melhora o desempenho de indivíduos submetidos a testes de atenção seletiva. Da mesma forma, alguns estudos demonstraram que antagonistas D<sub>2</sub> prejudicam o desempenho atencional em animais. Estes fatos sugerem que tais receptores podem se envolver com a inibição de estímulos distrativos, diminuindo a interferência de informações irrelevantes para a tarefa (Yang et al., 2005).

## **5.7) Relevância dos Resultados Obtidos**

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com diversos outros na literatura, sobretudo os dados relacionados com os receptores D<sub>1</sub>. Há uma vasta literatura descrevendo o uso de agonistas e antagonistas

dopaminérgicos administrados sistemicamente ou IC. A relação de D<sub>1</sub> e dos receptores NMDA tem sido constantemente comprovada em estudos eletrofisiológicos, porém não há na literatura uma comprovação funcional, já que não se encontram estudos que tenham investigado a interação farmacológica de receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos durante a execução de tarefas. Desta forma, nosso estudo complementa de modo importante este tema.

### **5.7.1) Relevâncias Clínicas**

Prejuízos na MO podem ser observados em diversas desordens neuropsiquiátricas, bem como ao longo do envelhecimento. Muitas vezes são conseqüências de alterações diretas no sistema dopaminérgico mesocortical, porém podem envolver também outros sistemas de neurotransmissores. O aumento ou a diminuição do número de receptores, as alterações nas atividades das vias dopaminérgicas ou a deterioração de neurônios mesocorticais podem estar relacionadas à fisiopatologia destas desordens.

Fatores estressantes podem interferir na transmissão mesocortical. Agudamente, o estresse produz uma hiperatividade dopaminérgica, enquanto que cronicamente promove uma menor atividade neste sistema. Nos dois casos, há um prejuízo no desempenho em testes cognitivos que envolvem a MO. Há evidências de que, no homem, também ocorram tais processos, e estes podem ser responsáveis pelos déficits verificados em testes cognitivos de pessoas submetidas a condições estressantes (Zahrt et al., 1997).

Na esquizofrenia, alguns déficits cognitivos são atribuídos a uma insuficiente estimulação dos receptores dopaminérgicos (Davis et al., 1991) e, estão relacionados principalmente aos sintomas negativos dessa desordem neuropsiquiátrica. Esquizofrênicos não medicados submetidos a testes de fluência verbal e de Wisconsin apresentam um menor desempenho basal comparado a pessoas sem este diagnóstico (Owen et al., 1990).

Em diversos animais, têm-se verificado que, no envelhecimento, há uma progressiva redução do número de neurônios mesocorticais, bem como de receptores dopaminérgicos presentes no CPF, especialmente o tipo D<sub>1</sub>. Essa diminuição está relacionada aos prejuízos da MO observados em vários



modelos de testes cognitivos, nos quais o uso de agonistas seletivos  $D_1$ , em baixas doses, melhora o desempenho (Seamans et al., 1998). No homem, tanto as mudanças estruturais no sistema dopaminérgico, quanto os prejuízos da MO, também são verificados no envelhecimento. Essas características se desenvolvem progressivamente, a partir da meia idade, porém tornam-se evidentes na idade avançada (Arnsten et al., 1995).

Atualmente, não há agonistas seletivos de receptores  $D_1$  para uso clínico, disponíveis no mercado. Porém o uso de agonistas seletivos para  $D_2$ , como por exemplo, a quimpirole ou a bromocriptina, apresentam alguma melhora nas funções executivas, tanto em esquizofrênicos (Kimberg et al., 1997), quanto em idosos (Arnsten et al., 1995), o que sugerem o envolvimento desses receptores nas deficiências cognitivas observadas.

Nas situações patológicas acima consideradas, pode supor-se que a queda ou o excesso de liberação dopaminérgica, ou mesmo disfunções nos receptores de GLU, possam dificultar as alterações entre os estados funcionais do CPF. Um excessivo estado 2 pode supostamente associar-se a comportamentos obsessivos e compulsivos, nos quais idéias, pensamentos ou mesmo ações ficam altamente fixados nas circuitarias frontais-subcorticais, repedindo-se demasiadamente. Além disso, a perseveração de erros, típico de síndromes frontais, também pode ser explicada por este estado exacerbado. Por outro lado, um estado 1 extremo pode associar-se a dificuldades em sustentar o foco atencional, prejudicando as funções executivas em geral. Este mesmo estado pode estar relacionado ao isolamento social, visto que a interação com as informações acerca do ambiente estão prejudicadas. E ainda, relacionar-se com pensamentos fragmentados, típicos da esquizofrenia, pois a dificuldade em manter um foco nas informações processadas pode levar à perda de raciocínios lógicos e lineares, o que supostamente levaria o indivíduo a uma incapacidade de julgamento e do senso de realidade (Castner e Willams, 2007; Seamans e Yang, 2004).

### **5.7.2) Relevância na integração de diversos outros estudos**

Em nosso laboratório vários estudos foram desenvolvidos, utilizando o mesmo modelo experimental. Em geral, verificaram os efeitos de substâncias

envolvidas com abuso e dependência química sobre a MO, administradas sistemicamente ou IC. Alguns deles relacionaram estes efeitos com o sistema dopaminérgico ou glutamatérgico, cujos resultados apresentam-se, portanto, relacionados com o do presente estudo.

Ferreira (2001) verificou os efeitos da cocaína sistemicamente e IC sobre a MO de ratos. Foi demonstrado que o uso deste agonista indireto dopaminérgico, sistemicamente administrado, prejudica a MO de animais em testes com retardos de 1 h, entretanto quando infundido diretamente no CPF produziu uma melhora no desempenho averiguado em testes com retardos de 4 h. Estes dados sugerem que, localmente, o aumento do aporte de DA no CPF modula a MO, favorecendo-a.

Oliveira et al. (2003) verificou que a administração de álcool IC na dose de 100 µg prejudica a MO de ratos. As doses de 32 e 180 µg não alteraram o desempenho em relação ao controle. Desta forma, uma curva em U foi observada. A infusão de haloperidol IC exacerbou os efeitos prejudiciais do álcool na dose de 100 µg, o que sugere uma interação dos efeitos do álcool com o sistema dopaminérgico, mais precisamente com receptores D<sub>2</sub>. Por outro lado, Benevides (2007), que replicou exatamente a curva em U do etanol do estudo anterior, demonstrou que pequenas doses de sulpirida, um antagonista D<sub>2</sub>, revertem os prejuízos da dose de 100 µg do etanol.

Galvão (2005) verificou o mesmo efeito do álcool em U invertido obtido nos estudos anteriores, o que fortalece extremamente estes dados. O efeito prejudicial da dose de 100 µg foi revertido pelo uso de SHC na dose de 1,0 µg IC. Curiosamente, a infusão IC de SKF nas doses de 0,18 e 0,56 µg também reverteram este mesmo prejuízo.

Por outro lado, Bazzarela (2004) verificou que o uso de NMDA infundido diretamente no CPFm prejudicou a MO de animais em testes com retardo de 5 s na dose de 3,2 µg. As doses menores (1,0 µg) e maiores (10,0 µg) não prejudicaram, o que novamente sugere uma curva em U. Além disso, foi averiguado que o uso prévio de NMDA nas doses de 1,0 e 10, µg reverteu os prejuízos do álcool. Isto demonstra que seus efeitos prejudiciais também estão relacionados com os receptores NMDA. Complementando estes resultados, Anhoque (2007) verificou que a infusão prévia de antagonistas de receptores NMDA, MK-801, na dose de 0,32 µg, ou de memantina, na dose de 10 µg,

também reverteram tal efeito. Juntos estes resultados sugerem que, tanto a estimulação, quanto a inibição de receptores NMDA, assim como  $D_1$  são capazes de reverter os efeitos prejudiciais do etanol sobre a MO.

Aliado aos nossos resultados, os dados até aqui expostos se complementam. A reversão do prejuízo promovido pelo etanol tanto por estimulação, quanto por inibição dos receptores  $D_1$  são corroborados pelo mesmo padrão gerado na manipulação farmacológica dos receptores NMDA.

Outros estudos utilizaram nicotina IC e observaram efeitos interessantes. Marinho (2005) demonstrou que a menor dose de nicotina facilitou a MO de animais, sendo que as maiores doses não promoveram tais efeitos. Esta facilitação foi revertida pelo uso de SCH na dose de 1,0  $\mu\text{g}$ , implicando assim a estimulação de receptores  $D_1$  neste processo.

Outros estudos utilizaram THC e também avaliaram a MO de animais. Nakamura et al. (1991) verificou que o uso desta substância prejudica a MO de animais em testes com retardo de 5 segundos e 1 h. Outro estudo realizado por Silva de Melo et al. (2005) também demonstrou tais prejuízos sistemicamente nas doses de 0,32 e 1,0 mg/kg e IC na dose de 100  $\mu\text{g}$ , entretanto somente com retardos de uma hora. Em estudos subseqüentes, foi visto que o uso de SCH na dose de 1,0  $\mu\text{g}$ , mas também de SKF na dose de 1,8  $\mu\text{g}$  reverteu este prejuízo do THC, lembrando o padrão observado nos estudos com álcool (Melo, 2006). Além do mais, o uso de CZP também foi eficaz em promover tal reversão (Melo, 2006). Embora as ações primárias do THC sejam atribuídas a receptores canabinóides do tipo  $CB_1$ , pelos dados obtidos, pode-se implicar o sistema dopaminérgico na base de seus efeitos. Há dados na literatura que sugerem que os receptores canabinóides participam da regulação da liberação de DA, agindo pré-sinápticamente (Melo, et al., 2005).

Portanto, nossos resultados se relacionam direta ou indiretamente com basicamente todos os estudos citados acima. Pode-se a partir dos dados aqui obtidos construir uma melhor concepção teórica, acerca de todos estes estudos. Definitivamente, nossos resultados, sugerem fortemente que os efeitos da estimulação deste receptor dopaminérgico estão diretamente relacionados com os receptores NMDA no CPF. Além disso, caracteriza perfeitamente o padrão em U característico da MO, visto na grande maioria de nossos resultados.

### **7.7.3) Relevância do padrão em U da função do CPF**

O padrão em U é um efeito não linear observado em diversos estudos farmacológicos e não farmacológicos que envolvem a aprendizagem e memória. Tal padrão é muitas vezes controverso e pouco compreendido. Tipicamente, espera-se que o aumento das doses ou da estimulação promova efeitos progressivamente maiores ou menores. Entretanto, a resposta não linear da curva em U caracteriza-se pela inversão da tendência de resposta a partir de certo ponto. Este efeito é comprovado em muitos trabalhos que envolvem o SNC, mas também em outros aspectos fisiológicos dos organismos. Desta forma, espera-se que este padrão observado tenha algum significado biológico importante (Cook e Calabrese, 2006).

Os sistemas biológicos desenvolveram mecanismos homeostáticos para boa parte de seus principais elementos físicos e químicos. Na verdade, a manutenção dos principais fatores orgânicos dentro de faixas limitadas pode ser visto como um processo essencial à vida. Geralmente, quanto mais vital é um fator, mais regulação ele sofre e mais restrita fica sua faixa de variação. É assim com a temperatura corporal, pressão arterial, com a glicemia, com o Ph, natremia, calcemia, etc. Porém mesmos os fatores mais essenciais à vida sofrem usualmente alterações ao longo do ciclo circadiano de um animal. Os mecanismos homeostáticos são ativados à medida que estes fatores deslocam-se para os pontos extremos de suas faixas fisiológicas. Quando isto acontece, processos regulatórios que podem envolver enzimas, receptores, genes, hormônios, neurônios, etc. são ativados ou inibidos conforme o estímulo. Porém, obviamente, estes processos são limitados, não sendo capazes de compensar toda e qualquer variação. Dependem da intensidade e do tempo em que os estímulos aparecem (Cook e Calabrese, 2006; Guyton, 2006).

Pode-se supor que, as curvas em U observadas em nossos resultados decorrem simplesmente de respostas neurais homeostáticas. Provavelmente, elas envolvem circuitos neurais diversos, ou processos moleculares desencadeadas a nível celular. Quando o sistema neural do CPF é inibido e, conseqüentemente, fica em baixa atividade, medidas compensatórias são promovidas pelo organismo a fim de restaurar o sistema. Entretanto, ao se

utilizar de estímulos intermediários, os sistemas de homeostase não são acionados suficientemente para corrigir a manipulação experimental, o que permite variações em direção ao prejuízo ou a melhora. Por outro lado, ao se estimular em excesso, outras medidas compensatórias podem levar o sistema a uma nova estabilidade. Toda essa argumentação é corroborada pelo fato de que poucos fármacos podem potencialmente prejudicar as funções do CPF a ponto de impedir o desempenho no labirinto radial em animais normais bem treinados, mesmo em doses extremamente elevada.

Deve-se lembrar que as funções executivas são essenciais para a sobrevivência dos animais. Devem operar em um nível adequado nas atividades corriqueiras ou em situações extremas, quando diversos sistemas neurais inter-conectados com o CPF são ativados e poderiam supostamente levar as funções executivas a um colapso. Isto justifica a importância de se evitar ativações extremas ou muito baixas desta área cortical, que é essencial para as funções executivas tal como a MO.

## 6.0) Conclusões

- A ativação de receptores  $D_1$  por um agonista seletivo, o SKF38393, administrado no córtex pré-frontal medial prejudica a memória

operacional espacial de longa duração, de forma dose-dependente, sendo, este efeito, mais proeminente nas menores doses empregadas.

- O bloqueio dos receptores NMDA por um antagonista não-competitivo, o MK-801, administrado no córtex pré-frontal medial prejudica a memória operacional espacial de longa duração de forma dose-dependente.
- Os efeitos de prejuízos observados pela ativação dos receptores  $D_1$ , através do SKF23393 diretamente infundido no córtex pré-frontal medial, são revertidos pelo bloqueio dos receptores NMDA realizado pela administração também intracortical de MK-801 nas menores doses.
- A combinação do antagonista não-competitivo de receptores NMDA, o MK, e do antagonista de receptores  $D_2/D_4$ , a clozapina, administrados no córtex pré-frontal medial, altera a memória operacional de longa duração de forma dose-dependente, de modo que a dose de 0,32  $\mu\text{g}$  de clozapina seguida de MK na dose de 1,0  $\mu\text{g}$ , melhora esta função cognitiva. Por outro lado, a combinação de clozapina na dose de 3,2  $\mu\text{g}$  seguida de 1,0  $\mu\text{g}$  prejudica esta mesma função cortical.
- Portanto, a neurotransmissão dopaminérgica, notadamente pela ação de receptores  $D_1$  no córtex pré-frontal medial, modula a memória operacional espacial de longa duração. Estes efeitos estão associados consistentemente com os receptores NMDA, que, ainda, são provavelmente modulados pelos receptores da família  $D_2$  nesta mesma área cortical.

## 7.0) Referências



Adams, R.D.; Victor, M.; Ropper, A.H. Principles of neurology. 6<sup>a</sup> ed., McGrawHill, Inc., New York, USA, 1997.

Addy, N.; Levin, E.D. Nicotine Interactions with Haloperidol, Clozapine and Risperidone and Working Memory Function in Rats, *Neuropsychopharmacology*, vol. 27, 2002.

Addy, N.; Levin, E.D. Reversal of clozapine effects on working memory in rats with fimbria-fornix lesions. *Neuropsychopharmacology*, 30(6):1121-7, 2005.

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.

Arino, M.A.; Wang, J., Noblett, K.; Larson, E.R. Sibley, D.R. Cellular distribution of the rat D<sub>4</sub> dopamine receptor protein in the CNS using antireceptor antisera. *Brain Research*, 752: 26-34, 1997.

Arnesten, A.F.T. Adrenergic targets for the treatment of cognitive deficits in schizophrenia, *Psychopharmacology (Berl)*, 174 (1):25-31, 2003.

Arnesten, A.F.T. Dopamine D<sub>2</sub>-receptor mechanisms contribute to age-related cognitive decline: the effects of quinpirole on memory and motor performance in monkeys, *Journal of Neuroscience*, 15: 3429-3439, 1995.

Arnesten, A.F.T. Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends in cognitive Sciences*, 2: 436-447, 1998.

Arnesten, A.F.T.; Goldman-Rakic, P.S. Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys, *Arch. Gen. Psychiatric*, 55: 1551-162, 1998.

- Aujla, H; Beninger, R.J. Hippocampal-prefrontocortical circuits: PKA inhibition in the prefrontal cortex impairs delayed nonmatching in the radial maze in rats. *Behavioral Neuroscience*, 115:1204–1211, 2001.
- Baddeley, A. D.; Hitch, G. J. Working memory. *In: Recent advances in learning and motivation*, Bower, G.A. (Ed), New York: Academic Press, pp 47 – 90, 1974.
- Baddeley, A.D. Working memory. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 302: 311-324, 1983.
- Baddeley, A.D. Working memory. *In: Gazzaniga, MS. (ed.): The Cognitive Neuroscience*, New York, Bradford, 755-764, 1997.
- Baddeley, A.D. Is Working Memory Still Working? *American Psychologist*, 56 (11): 851-864, 2001.
- Baddeley, A.D. Is Working Memory Still Working? *Europe Psychologist*, 7(2): 85-97, 2002.
- Baddeley A.D. Working Memory: Looking Back and Looking Forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 4:829-839, 2003
- Bahlen, O.V.; Halbach, U.; Dermietzel, J. Neurotransmitters and Neuromodulators, editora Wiley, 52-63, 2001.
- Baviera, M.; Invernizzi, RW.; Carli, M. Haloperidol and clozapine have dissociable effects in a model of attentional performance deficits induced by blockade of NMDA receptors in the mPFC. *Psychopharmacology (Berl)*., 196(2):269-80, 2008.
- 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.

Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A. Sistemas de neurotransmissores. In: Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

Benes, F.M.; Vincent, S.L., Molloy, R. Dopamine-immunoreactive axon varicosities form non-random contacts with GABA-immunoreactive neurons of rat medial prefrontal cortex, *Synapse*, 15, 285-295, 1993.

Benevides, M.C.A. O Antagonista Seletivo Dopaminérgico D<sub>2</sub>, 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.

Berger, B.; Thierry, A.M.; Tassin, J.P., Moyne, M.A. Dopaminergic innervation of the rat prefrontal cortex: a fluorescence histochemical study, *Brain Research*, 106: 133-145, 1976.

Berger, B.; Trottier, S; Verney, C., Gaspar, P.; Alvarez, C. Regional and laminar distribution of the dopamine and serotonin innervation in the macaque cerebral cortex: a radioautografic study, *J. Comp. Neurol.*, 273: 99-119, 1988.

Berger, B.; Gaspar, P.; Verney, C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodent and primate, *Trends Neuroscience*, 14: 21-27, 1991.

Bjorklund A, Lindvall O. Dopamine-containing systems in the CNS, *In Bjorklund A, Hokfelt T*, eds. Classical transmitters in the CNS. Handbook of chemical neuroanatomy. Amsterdam: Elsevier, 1964; 55-122.

Bloom, F. E.; Kupfer, D.J. Psychopharmacology, *Raven Press*, New York, 1995.

Bressan, R.A.; Pilowsky, L. S. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr.*, 25(3):177-83, 2003.

Briand, L.A.; Gritton, H.; Howe, W.M.; Young, D.A.; Sarter, M. Modulators in concert for cognition: modulator interactions in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol.*, 83(2):69-91, 2007.

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

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

Bushnell, P.J.; Levin, E.D. Effects of dopaminergic drugs on Working and reference memory in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 45: 765-776, 1993.

Carlsson, A. The current status of dopamine hypothesis of schizophrenia, *Neuropsychopharmacology*, 1:179-186, 1988.

Carr, D.B.; Seasack, S.R. Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic target and relation to dopamine terminals, *Journal of Neurology*, 369: 1-15, 1996.

Carr, D.B.; O'donnell, P., Card, J.P, Sesach, S.R. Dopamine terminals in the prefrontal cortex synapse on pyramidal cells that project to the nucleus accumbens, *J. Neuroscience*, 19: 11049-11069, 1999.

Carter, A.J. Antagonists of the NMDA receptor-channel complex and motor coordination. *Life Sci*, 57: 917-929, 1995.

Castner, S.A.; Williams, G.V. Tuning the engine of cognition: A focus on NMDA/D1 receptor interactions in prefrontal cortex. *Brain and Cognition*, 63: 94-122, 2007.

Cepeda, C.; Buchwald, N.A.; Levine, M.S. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 15;90(20):9576-80, 1993.

Cepeda C.; Li, Z.; Cromwell, H.C. Altemus, K.L.; Crawford, C.A.; Nansen, E.A.; Ariano, M.A.; Sibley, D.R.; Peacock, W.J.; Mathern, G.W.; Levine, M.S. Electrophysiological and morphological analyses of cortical neurons obtained from children with catastrophic epilepsy: dopamine receptor modulation of glutamatergic responses. *Dev Neurosci*. 21(3-5):223-35, 1999.

Chen, G.; Greengard, P.; Yan, Z. Potentiation of NMDA receptor currents by dopamine D<sub>1</sub> receptors in prefrontal cortex. *PNAS*, 101(8):2596-2600, 2004.

Cook, R.; Calabrese, E.J. The importance of hormesis to public health. *Environ Health Perspect* 114(11):1631-1635, 2006.

Constantinidis, C; Williams, G.V., Goldman-Rakic, P.S. A role for inhibition in shaping the temporal flow of information in prefrontal cortex, *Nat Neurosci*, 5: 175-180, 2002

Creese, I.; Burt, D.R.; Snyder, S.H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs, *Science*, 192: 481-483, 1976..

Cooper, J.R.; Bloom, F.E.; Roth, R.H. The biochemical basis of Neuropharmacology (7<sup>a</sup> ed.), *Oxford, Inc.*, New York, USA, 1996.

Cooper, J.R.; Bloom, F.E.; Roth, R.H. The biochemical basis of Neuropharmacology (8<sup>a</sup> ed.), *Oxford, Inc.*, New York, USA, 2001.

Cummings, J.L. Frontal-subcortical circuits and human behavior, *Arch. Neurol.*, 50: 873-880, 1993.

Dalley, J.W.; Cardinal, R.N.; Robbins, T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28(7):771-784,2004.

Damásio, A.R. O Erro de Descartes, *Companhia das Letras*, São Paulo, 1994.

Danysz, W.; Parsons, C.G. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacological Review*, 50: 597-664, 1998.

Davis, K.L.; Kahn, R.S.; Grant, K; Davidson, M. Dopamine in Schizophrenia: a review and reconceptualization, *Journal of Psychiatry*, 148: 1474-1486, 1991.

D'Esposito M. From cognitive to neural models of working memory, **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, **29;362 (1481):761-72, 2007.**

Didriksen, M. Effects of antipsychotic on cognitive behavior in rats using the delayed non-match to position paradigm, *Journal of Pharmacology*, 201: 211-230, 1995.

Dickenson, A.H. Amino acids: Excitatory. *In: Webster, R.A. Neurotransmitter, drugs and brain function.* John Willey & Sons Ltd: Londres, Inglaterra, 2001.

Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.*, 51(1):7-61, 1999.

Dulawa, S.C.; Grandy, D.K.; Low, M.J.; Paulus, M.P.; Geyer, M.A. Dopamine D<sub>4</sub> receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli, *J. Neuroscience*, 19: 9550-9556, 1999.

Dunn, M.J.; Killcross, S. Clozapine, SCH 23390 and alpha-flupenthixol but not haloperidol attenuate acute phencyclidine-induced disruption of conditional discrimination performance. *Psychopharmacology (Berl)*. 190(4):403-14, 2006.

Enomoto T.; Ishibashi, T.; Tokuda, K.; Ishiyama, T.; Toma S.; Ito, A. Lurasidone reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the Morris water maze and radial-arm maze tests in rats. *Behav Brain Res.*, Jan 25;186(2):197-207., 2008.

Feenstra, M.G.; van der Weij, W.; Botterblom, M.H. Concentration-dependent dual action of locally applied N-methyl-D-aspartate on extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex in vivo. *Neurosci Lett* 201(2):175-8, 1995.

Ferreira, J.T.C. Cocaína administrada no córtex pré-frontal medial facilita enquanto sistemicamente prejudica a memória operacional espacial. Dissertação de Mestrado. PPG-CF, UFES, Vitória, 2001.

Ferreira, J.T.C. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH): avaliação neuropsicológica das funções frontais em crianças e adolescentes antes e após o tratamento com metilfenidato. Tese de Doutorado. PPG-CF, UFES, Vitória, 2006.

Floresco, S.B.; Seamans, J.K.; Phillips, A. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* 17(5):1880-1890, 1997.

Fisher, B.C. Frontal Lobe System. In: Attention Deficit Disorder Misdiagnosis, *CRC Press LLC*, 69-79, 1998.

Floresco, S. B.; Phillips, A.G. Delay-Dependent Modulation of Memory Retrieval by Infusion of a Dopamine D<sub>1</sub> Agonist Into the Medial Prefrontal Cortex, *The American Psychological Association, Inc.*, 115 (4): 934-939, 2001.

Floresco, S.B.; Ghods-Sharifi, S.; Vexelman, C.; Magyar, O. Dissociable roles for the nucleus accumbens core and shell in regulating set shifting. *The Journal of Neuroscience*, 26(9): 2449 – 2457, 2006.

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

Funahashi, S.; Chafee, M. Funahashi, S., Prefrontal neural activity in rhesus monkeys performing a delayed anti-saccade task. *Nature*, 365:753-756, 1993.

Funahashi, S., Inoue, M. Neuronal interactions related to working memory processes in the primate prefrontal cortex revealed by cross-correlation analyses. *Cerebral cortex*, 10: 535-551, 2000.

Funahashi, S. Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience*, 139:251-261, 2006.

Fuster, J.M. Network memory. *Trends Neuroscience*, 20:451-459, 1997.

Fuster, J.M. Proceedings of the Human Cerebral Cortex: From Gene to Structure and Function. Prefrontal neurons in networks of executive memory. *Brain Research Bulletin*, 5: 331 – 336, 2000.



Fuster J.M. The prefrontal cortex - an update: time is of the essence. *Neuron*, 30(2):319-333, 2001.

Gabrieli, J.D.; Poldrack, R.A.; Desmond, J.E. The role of left prefrontal cortex in language and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Feb 3;95(3): 906-13, 1998.

Garris, P. A.; Collins, L.B.; Jones, S.R.; Wightman, R.M. Evoked extracellular dopamine in vivo in medial prefrontal cortex, *J. Neurochemistry*, 61: 637-647, 1993.

Garris, P.A.; Wightman, R.M. Different Kinetic govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex and striatum: an in vivo voltammetric study, *J. Neuroscience*, 14: 442-450, 1994.

Galvão, M. Envolvimento da transmissão dopaminérgica D<sub>1</sub> do córtex pré-frontal medial no prejuízo da memória operacional espacial produzido pelo álcool. Dissertação de Mestrado. PPG-CF, UFES, Vitória, 2005.

Gazzaniga, M.S.; Ivry, R.B.; Mangun, G.R. Neurociência Cognitiva, 2° Ed., *artmed*, Porto Alegre, 2006.

Gonchar, Y.; Burkhalter, A. Distinct GABAergic targets of feedforward and feedback connections between lower and higher areas of rat visual cortex. *J Neurosci.*, 26;23(34):10904-12, 2003.

Goldman-Rakic, P.S.; Leranth, C., Willams, S.M., Mons, N., Geffard, M., Dopamine synaptic complex with pyramidal neurones in primate cerebral cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 9015-9019, 1989.

Goldman-Rakic, P.S.; Lidow, M.S; Gallanger, D.W. Overlap of dopaminergic, noradrenergic and serotonergic receptor and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex, *Journal of Neuroscience*, 10: 2125-2138, 1990.

Goldman-Rakic, P.S. Working memory and the mind, *Scientific American*, 267(3): 110-117, 1992.

Goldman-Rakic, P.S; Chafee, M; Friedman, H. Allocation of function in distributed circuits, *Oxford University Press*, 445-456, 1993.

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

Goldman-Rakic, P.S. The relevance of the dopamine-D<sub>1</sub> receptor in the cognitive symptoms of schizophrenia, *Neuropsychopharmacology*, 21(56): 171-180, 1999.

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

Greengard, P. The Neurobiology of Slow Synaptic Transmission, *Neuroscience*, 294: 1024-1030, 2001.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. (11<sup>a</sup>. Ed), Editora Guanabara, 2006.

Hamadan, A. C.; Bueno, O. F. Relationships Between executive control and verbal episodic memory in the mild cognitive impairment and Alzheimer-Type dementia, *Estu. Psic. (Natal)* volume 10 n° 1, 2005.

Halbach, O V.; Dermietzel, R. Neurotransmitters and Neuromodulators, *Wiley-VCH*, 52-64, 2001.

Hen, R.; Boschert, U.; Lemeur, M.; Dierich, A.; Ait Amara, D.; Buhot, M.C. Segu, L.; Misslin, R.; Saudou, F. 5-HT<sub>1B</sub> receptor “Knock out”: Pharmacological and Behavioral consequences, *Soc. Neurosc.*, 19: 632-643, 1993.

Heidbreder, C.A.; Groenewegen, H.J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev.*, Oct;27(6):555-79, 2003.

Hoffmann, I.S.; Talmaciu, R.K., Ferro, C.P., Cubeddu, L..X. Sustained High release at rapid stimulation rates and reduced functional autoreceptors characterize prefrontal cortex dopamine terminals, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 245: 761-772, 1988.

Izquierdo, I. ; McGaugh, J. L. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci.*, 21(6):208-10, 2000.

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

Jackson, M.E.; Homayoun, H.; Moghaddam, B. NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci*, 101(22):8467-8472, 2004.

Jentsch, J.D.; Redmond, J.; Elsworth, J.D.; Taylor, J.D.; Youngren, K.D.; Roth, RH. Enduring Cognitive Deficits and Cortical Dopamine Dysfunction in Monkeys After Long-term Administration of Phencyclidine, *Science*, 277: 953-955, 1997.

Kandel, E.R.; Schwartz, J.M.; Jessell, T.M. Princípios da Neurociência. Ed. Manole, 1999.

Katayama, S.; Takarada, T.; Shimizu, Y.; Endo C.; Takata, T.; Morita, K.; Dohi, T.; Sato, T.; Kawahara, M. MK-801 enhances gabaculine-induced loss of the righting reflex in mice, but not immobility. *Can J Anaesth.*, 54(12):998-1005, 2007.

Kebabian, J.W.; Calne, DB. Multiple receptor for dopamine, *Nature*, 277: 93-96, 1979.

Kimberg, D.Y.; D'Esposito, M.; Farah, M.J. Effects of the bromocriptine on human subjects depend on working memory capacity, *Neuroreport*,8: 3581-3585, 1997.

Kolb, B. Functions of the frontal cortex of the rat, *Brain Res. Rev.*, 8: 65-98, 1984.

Kolb, B. Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review, *Brain Research Reviews*, 8: 65-98, 1996.

Lacroix, L.; White, I.; Feldon, J. Effect of excitotoxic lesions of rat medial prefrontal cortex on spatial memory, *Behav Brain Res.*, 15;133(1):69-81, 2002.

Laranja, L.R. Envolvimento do córtex pré-frontal medial nos efeitos de prejuízo da memória operacional e ansiolíticos do diazepam. PPG-CF, UFES, Vitória, 2003.

Laruelle, M.; Frankle, W.G.; Narendran, R.; Kegeles, L.S.; Abi-Dargham, A. Mechanism of action of antipsychotic drugs: from dopamine D(2) receptor antagonism to glutamate NMDA facilitation. *Clin Ther.*; 27 Suppl A:S16-24, 2005.

Levesque, D.; Diaz, J.; Pilon, C. Identification characterization and localization of dopamine D<sub>3</sub> receptor in the brain using 7[H<sup>3</sup>]hydroxy-N-di-n-propyl-2-amino tetralin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8155-8159, 1992.

Lezak, D. M. Neuropsychological Assessment, II. A compendium of test and assessment techniques, 9. Orientation and Attention, 11. Memory: tests. 12. Memory II: Batteries, paired memory test. *Oxford University Press*, 3ª edição, 1995.

Leysen, J.E.; Awouters, F.; Kennis, L.; Laduron, P.M.; Vandenberg, J.; Janssen, P.A.J. Receptor binding profile of R41 468, a novel antagonist at 5HT<sub>2A</sub> receptors, *Life science*, 28: 10015-1022, 1981.

Li H.; Matsumoto, K.; Yamamoto, M.; Watanabe, H. NMDA but not AMPA receptor antagonists impair the delay-interposed radial maze performance of rats. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 58: 1, 249-253, 1997.

Lidow, M.S.; William, G.V.; Goldman-Rakic, P.S. The cerebral cortex: a case for a common site of action of antipsychotics. *Trends on Pharmacological Sciences*, 19(4): 136 – 140, 2003.

Luria, A. R. Fundamentos de Neuropsicologia, *Editores da USP*, São Paulo, 1981.

Machado, A. Neuroanatomia Funcional. 2ª ed., *Livraria Atheneu Editora*, São Paulo, 2000.

Mansour, A ; Meador-Woodruff, J.; Bunzow, J., Civelli O; Akil, H.; Watson, S. localization of dopamine D<sub>2</sub> receptor mRNA and D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis, *Journal of Neuroscience*, 10: 2587-2600, 1990.

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.

Mendonça, J. B. 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. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

Mesulan, M.M. Principles of behavioral and cognitive neurology, 2<sup>a</sup> ed., Oxford University Press, 41-54, 2000.

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.

Watson, S.; Civelli, O. Distribution of D<sub>5</sub> receptor mRNA in rat brain. *Proc., Neuroscience letters*, 145: 209-212, 1992.

Woodward, J.J. Ethanol and NMDA receptor signaling. *Crit Rev Neurobiol.*, 14(1):69-89, 2001.

Marcus, M.M.; Jardemark, K.E.; Wadenberg, M.L.; Langlois, X.; Hertel, P.; Svensson, T.H. Combined alpha2 and D2/3 receptor blockade enhances cortical glutamatergic transmission and reverses cognitive impairment in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 8(3):315-27, 2005.

Mizumori, S.J.Y.; Channon. V.; Rosenzweig, M.R.; Bennett, E.L. Short- and long-term components of working memory in the rat, *Behavioral Neuroscience*, 101(6): 782-789, 1987.

Miller, G.L.; Galanter, E.; Pribram, K.H. Plans and the structure of behavior. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1960.

Millan, M. J. N-Methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology*, 179(1):30-53, 2005.

Muller, U.; Von Cramon, D.Y.; Pollman, S. D<sub>1</sub> versus D<sub>2</sub> receptor modulation of visuospatial working memory in human, *J. Neurosci.*, 18: 2720-2728, 1998.

Murphy, B.L. Increased dopamine turn over in the medial prefrontal cortex impairs spatial working-memory performance in rats and monkeys, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 1325-1329, 1996.

Murphy, B.L.; Roth, R.H.; Arnsten, A.F. Clozapine reverses the spatial working memory deficits induced by FG7142 in monkeys. *Neuropsychopharmacology*, 16(6):433-7, 1997.

Nakamura, E.M.; da Silva, E.A.; Concílio, G.V; Wikinson, D.A.; Masur, J. Reversible effects of acute and long-term administration of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat, *Drug Alcohol Depend*, 28: 167-175, 1991.

Nakamura-Palacios, E.M.; Caldas, CK; Fiorini, A; Chagas, K.D.; Chagas, K.N.; Vasquez, E.C. Deficit of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rat, *Behavioral Brain Research*, 74: 217-221, 1996.

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.

Nicola, S.M.; Surmeier, J; Malenka, R.C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens, *Annual rev. Neuroscience*, 23: 185-215, 2000.

Nolte, J. Human Brain and Introduction to its Functional Anatomic. *Mosby Year Book*, St. Louis, Missouri, 1993.

Oak, J.N.; Oldenhof, J.; Van tol, H.H. The Dopamine D<sub>4</sub> Receptor: one decade of research, *Eur. Journal Pharmacology*, 405: 3003-327, 2000.

Ogura, H.; Aigner, T.G. MK-801 impairs recognition memory in rhesus monkeys: comparison with cholinergic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 266(1): 60-4, 1993.

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, *Brazilian J. Med Biol. Res.*, 23:547-553, 1990.

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

O' dowd, B.F.; Hnatowich, M; Caron M.G.; Lefkowitz, R.J; Bouvier, M. Palmitoylation of the human B-adernergic receptor, *J. Biology chermistry*, 264: 7564-7569, 1989.

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



Olton, D.S.; Collinson, C.; Werz, M.A. Spatial memory and radial arm maze performance of rats, *Learnig and Motivation*, 8: 289-314, 1977.

Olton, D.S. Mazes, maps and memory. *American Psychologist*, 34 (7): 583-596, 1979.

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

Owen, A.M.; Downes, B.J.; Sahakian, C.E. Planning and spatial working memory following frontal lobe lesions in man, *Neuropsychologia*, 28: 1021-1034, 1990.

Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in Stereotaxic coordinates, *Academic Press*, Nova York, 194, 1986.

Penna, A.M. Estimulação elétrica do córtex pré-frontal medial: Efeitos sobre o comportamento e sobre a aprendizagem e a memória, Vitória, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, 1996. 118 p. (Tese, Doutorado).

Penna, A.M.; Lee, S-Y.; Da Silva, L.S.; Oliveira, R.W.; Gomes, C.F.; Nakamura-Palacios, E.M. Behavioral and Cognitive Effects Produced by Electrical Stimulation in the Medial Prefrontal Cortex: Experimental Models for High Cortical Activation, *Neuropsychobiology*.38: 241-250, 1998.

Petralia, R.S.; Wang, Y.X., Wenthold, R.J. The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1, *J. Neuroscience*, 14: 6102-6120, 1994.

Phelan, T. W. TDA/TDAH – Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade: Sintomas Diagnósticos e Tratamentos, M. Books do Brasil Editora LTDA, 2005.

Phillips, A.G.; Vacca, G.; Ahn, S. A top-down perspective on dopamine, motivation and memory. *Pharmacol Biochem Behav.*, 90(2):236-49. Epub 2007.

Phillips, A.G.; Ahn, S.; Floresco, S.B. Magnitude of dopamine release in the medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *Journal of Neuroscience*, 24(2):547-553, 2004

Pirot, S.; Glowinski, J.; Thierry, A.M. Excitatory responses evoked in prefrontal cortex by mediodorsal thalamic nucleus stimulation: influence of anaesthesia, *Eur. J. Pharmacol.*, 285: 45-54, 1995.

Pough, F. H; Heiser, J. B.; McFarland, W. N. A vida dos Vertebrados (2ª edição), Editora Atheneu, 1999.

Porter, MC; Mair, RG. The effects of frontal cortical lesions on remembering depend on the procedural demands of tasks performed in the radial arm maze, *Behav Brain Res.*, 87(2):115-25, 1997.

Ray, J.P.; Fuller, F.T.; Price, J.L. Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the mediodorsal nucleus of the thalamus in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 320: 435-456, 1992.

Reading, P.J. Frontal lobe dysfunction in schizophrenia and Parkinson's disease-A meeting point for neurology, psychology and psychiatry: discussion paper. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 84: 349-353, 1991.

Repovš, G.; Baddeley, A. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience*, 139:5-21, 2006.

Rose, J.E.; Woolsey, C.N. The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat, *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, 27: 210-232, 1948.

Rubinstein, M.; Cepeda, C.; Hust, R.S.; Flores-Hernandez, J.; Ariano, M.A. Dopamine D<sub>4</sub> receptor-deficient mice displace cortical hyperexcitability, *Journal of Neuroscience*, 21: 3756-3763, 2001.

Ruotsalainen, S.; Jouni, S.; MacDolnald, E. Differential effects of three 5HT receptor antagonists on the performance of the rats in attentional and working memory tasks, *European Neuropsychopharmacology*, 7: 99-108, 1997.

Saboya, E.; Franco, C. A.; Mattos, P. Relationship among cognitive process in executive functions, *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, volume 51 n° 2, 2002.

Sahgal, A.; Keith, A.B. Combined Serotonergic-Cholinergic lesions do not disrupt memory in rats, *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 45: 995-1001, 1993.

Sawaguchi, T.; Goldman-Rakic, P.S. The Role of D<sub>1</sub> Dopamine Receptor in Working Memory: local injections of dopamine antagonists in the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an ocolomotor delayed-response task, *Journal Neurophysiology*, 71: 515-528, 1991.

Scott, H.L.; Braud, S.; Bannister, N.J.; Isaac, J.T. Synaptic strength at the thalamocortical input to layer IV neonatal barrel cortex is regulated by protein kinase C. *Neuropharmacology*. 52(1):185-92, 2006.

Seamans, J.K.; Floresco, S.B.; Phillips, D. D<sub>1</sub> Receptor Modulation of Hippocampal-Prefrontal Cortical Circuits Integrating Memory with Executive Functions in Rat, *The Journal of Neuroscience*, 18 (4): 1613-1621, 1998.

Seamans, J.K.; Gorelova, N.; Durstewitz, D. Yang C.R. Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 21(10):3628-3638, 2001

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*, 74:157,2004.

Seeman, P.; Lee, T.; Chan-Wong, M.; Wong, K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic / dopamine receptor, *Nature*, 261: 717-719, 1976.

Seeman, P.; Van Tol, H.H.M. Dopamine receptor pharmacology, *Trends Pharmacology*, 15: 264-270, 1995.

Sesack, S.R.; Melchitzky, D.S.; Lewis, D.A.; Dopamine innervation of a subclass of local circuit neurons in monkey prefrontal cortex: ultrastructural analysis of tyrosine hydroxylase and parvalbumin immunoreactive neurons, *Cereb. Cortex*, 8, 614-622, 1998.

Shallice, T. Specific of impairments of planning, *Phil. Trans. R. Soc.*, 298:199-209, 1982.

Simon, I.; Le Moal, M.; Calas, A. Effects of afferents of the ventral tegmental A10 region studied after local injection of [ $H^3$ ]leucine and horseradish peroxidase, *Brain Research*, 178: 17-40, 1978.

Skarsfeldt, T. Differential effects of antipsychotic on place navigation of rats in the water maze, *Psychopharmacology*, 124: 126-133, 1996.

Sokoloff, P.; Giros, B.; Martres, M.P., Bouthenet, M.L.; Schwatz J.C. Molecular cloning and characterization of novel dopamine receptor ( $D_3$ ) as a target for neuroleptics, *Nature*, 347: 146-151, 1990.

Suhara, T.; Fukuda, H.; Inoue, O. Age-related changes in human  $D_1$  dopamine receptors measured by positron emission tomography, *Psychopharmacol.*, 103: 41-45, 1991.

Steketee, J. D. Neurotransmitter Systems of the Medial Prefrontal Cortex: Potential role in Sensitization to Psychostimulants, *Brain Research Reviews*, 41: 203-228, 2003.

Steriade, M.; McCormick, D.A.; Sejnowski, T.J. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain, *Science*, 262: 679-685, 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.

Swanson, L.W. The projections of ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat, *Brain research*, 9: 321-353, 1982.

Schultz, W. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.*, 7(2):191-7, 1997.

Takeda, K; Funahashi, S. Prefrontal task-related activity representing visual cue location or saccade direction in spatial working memory tasks, *J. Neurophysiol.*, 87(1):567-88, 2002.

Tekin, S.; Cummings, J. L. Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry, *Journal of Psychosomatic Research*, 53, 647-654, 2002.

Tzschentke, T.M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system, *Progress in Neurobiology*, 63: 241-320, 2000.

Taylor, C.L.; Kozak, R.; Latimer, M.P.; Winn, P. Effects of changing reward on performance of the delayed spatial win-shift radial maze task in pedunculo-pontine tegmental nucleus lesioned rats. *Behavioural Brain Research*, 153 (2): 431 – 438, 2004.

Tsukada, H.; Nishiyama, S.; Fukumoto, D.; Sato, K.; Kakiuchi, T.; Domino, E.F. Chronic NMDA antagonism impairs working memory, decreases extracellular dopamine, and increases D1 receptor binding in prefrontal cortex of conscious monkeys. *Neuropsychopharmacology*, 30(10): 1861-9, 2005.

Uylings, H.B.; Groenewegen, H.J.; Kolb, B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 146(1-2):3-17, 2003.

Wang, X.J. Synaptic basis of cortical persistent activity: the importance of NMDA receptors to working memory. *Journal of Neuroscience*, 19(21): 9587-9603, 1999.

Wang, X.; Zhong, P.; Gu, Z.; Yan, Z..Regulation of NMDA receptors by dopamine D4 signaling in prefrontal cortex. *J. Neurosci.*, 29;23(30):9852-61, 2003.

Wang, Y.; Isoda, M.; Matsuzaka, Y.; Shima, K.; Tanji. Prefrontal cortical cells projecting to the supplementary eye field and presupplementary motor area in the monkey. *Neuroscience Research*, 53(1):1-7, 2005.

Wang, J.; Hamblet, N.S.; Mark, S.; Dickinson, M.E.; Brinkman, B.C.; Segil, N.; Fraser, S.E.; Chen, P.; Wallingford, J.B.; Wynshaw-Boris, A. Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development.*, 133(9): 1767-78, 2006.

Watkins, J.C. The NMDA receptor concept: origins and development. In: Collingridge, G.L.; Watkins, J.C. *The NMDA receptor*. 2nd ed. Oxford University Press, 1994.

Webster, R.A. Dopamine. In: Neurotransmitters, Drugs and Brain Function. London: Wiley, pp 138 – 161, 2001.

Williams, G.V.; Castner, S.A. Under the curve: critical issues for elucidating D<sub>1</sub> receptor function in working memory. *Neuroscience*, 139:263-276, 2006.

Yang, C.R.;Chen, L. Targeting prefrontal cortical dopamine D<sub>1</sub> and N-Methyl-D-Aspartate receptor interactions in schizophrenia treatment. *Neuroscientist*, 11(5): 452-470, 2005.

- Yuan, K.; Steedle, J.; Shavelson, R.; Alonzo, A.; Oppezzo, M. Working memory, fluid intelligence, and science learning. *Educational Research Review*, 1: 83-98, 2006.
- Valentim JR, S.J.R. Modulação dopaminérgica da memória operacional espacial no córtex pré-frontal medial em ratos: envolvimento de receptores dos tipos D<sub>1</sub> e D<sub>4</sub>. Dissertação de Mestrado. PPG-CF, UFES, Vitória, 2003.
- Van Tol, H.H.M.; Bunzon, J.R.; Guan, H.C. Cloning of human dopamine D<sub>4</sub> receptor gene with high affinity for the antipsychotic clozapine, *Nature*, 350: 610-614, 1991.
- Vincent, S.L.; Khan, Y.; Benes, F.M. Cellular distribution of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor in rat medial prefrontal cortex, *Journal of Neuroscience*, 13: 2551- 2564, 1993.
- Xun Wang; Ping Zhong; Zhen Yan. Dopamine D<sub>4</sub> receptor modulate Gabaergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex, *The Journal of Neuroscience*, 22(21): 9185-9193, 2002.
- Wang, X.; Gu, Z.; Zhong, P.; Chen, G.; Feng, J.; Yan, Z. Aberrant regulation of NMDA receptors by dopamine D<sub>4</sub> signaling in rats after phencyclidine exposure. *Mol Cell Neurosci.*, 31(1):15-25. Epub 2005.
- Zar, J.H. In: Biostatistical Analysis, *Prentice-Hall, Inc.*, New Jersey, USA, 1999.
- Zahrt, J.; Taylor, J.R.; Mathew, R.G.; Arnsten, A.F.T. Supranormal Stimulation of D<sub>1</sub> Dopamine Receptor in the Rodent Prefrontal Cortex Impairs Spatial Memory Performance, *The Journal of Neuroscience*, 17(21): 8528-8535, 1997.



Zilles, K. e Wree, A. Cortex: Areal and Laminar Struture. In: Paxinos, G. (ed.) The rat nervous system. Forebrain and midbrain, *Aca demic Press*, Inc. San Diego, California, 374-415, 1985.

Wang, X.; Zhong, P.; Yan, Zhen. Dopamine D<sub>4</sub> Receptor Modulate GABAergic Signaling in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex, *The Journal of Neuroscience*, 22: 9185-9193, 2002.

Webster, R.A. Neurotransmitters, Drugs and Brain Function, Editora Wiley, 138-161, 2001.

Weiner, D.M.; Brann, M.R. The distribution of the D<sub>2</sub> receptor mRNA in the rat brain, *Febs Letter*, 253: 207-213, 1989.

Werner, P.; Hussy, N.; Buell, G.; Jones, K.A.; North, R.A. D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus* oocytes, *Mol. Pharmacol.*, 49: 656-661, 1996.

Wilson, J.M.; Nobrega, J.N.; Corrigan, W.A.; Coen, K.M. Amygdala dopamine levels are markedly elevated after self-but not passive-administration of cocaine, *Brain Research*, 668: 39-45, 1994.