

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

**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 de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Marcelo Campos de Almeida Benevides

Orientadora

Profa. Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios

Agosto de 2007

Marcelo Campos de Almeida Benevides

**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 de Mestrado  
apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas do Centro de  
Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do  
Espírito Santo, para obtenção  
do título de Mestre em  
Ciências Fisiológicas.

Agosto de 2007

Benevides, Marcelo Campos Almeida

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. Marcelo Campos de Almeida Benevides. 2007

86 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ester Miyuki Nakamura Palacios. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Biomédico.

1. Córtex Pré-Frontal Medial. 2. Sistema Dopaminérgico. 3. Etanol. 4. Memória Operacional. 5. Labirinto Radial. 6. Sulpirida.

# **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**

Marcelo Campos de Almeida Benevides

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

---

**Profa. Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios – Orientadora, UFES**

---

**Prof. Dr. Sidarta Tollendal Gomes Ribeiro – IINN-ELS, RGN**

---

**Prof. Dr. José Guilherme Pinheiro Pires – UFES**

---

**Prof. Dr. José Geraldo Mill  
Coordenador do PPGCF – UFES**

**Agosto de 2007**

**Agradecimentos:**

A minha família onde encontro todo apoio de que preciso.

A minha orientadora Profa. Ester por sua dedicação e ensinamentos.

Aos meus amigos e professores da pós-graduação.

E a todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

“Uma mente aberta para o novo, jamais  
retorna ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

## RESUMO

O córtex pré-frontal (CPF) tem sido considerado por muitos autores o sítio anátomo-funcional para o processamento da memória operacional. Sua porção medial (CPFm) pertence ao circuito de gratificação cerebral, essencialmente mediado pelo sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Este estudo, mediante o emprego do antagonista seletivo D<sub>2</sub>, sulpirida, examinou o envolvimento dos receptores D<sub>2</sub> do CPFm no prejuízo do etanol (ETOH) sobre a memória operacional de longa duração em tarefas envolvendo retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços. Ratos Wistar machos (n=26; 210-270g;  $\cong$  3 meses de idade), previamente treinados no labirinto radial de 8 braços, com cânulas bilaterais implantadas no CPFm (B: + 2,5 mm A; +/- 1 mm L; 2,7mm V), receberam administrações intracorticais (IC) de sulpirida divididos em dois experimentos: no primeiro 11 animais receberam administrações IC de sulpirida (0,32, 1,0 e 3,2  $\mu$ g) ou ácido clorídrico 0,05M (HCl) 10 minutos antes da administração IC de salina (SAL) ou etanol (ETOH) 100  $\mu$ g. Cinco minutos após a última administração, os animais foram submetidos ao teste de desempenho no labirinto com retardos de 1 hora; no segundo experimento 22 animais receberam infusões IC de sulpirida 1  $\mu$ g ou HCl 0,05 M diretamente no CPFm uma vez por dia durante quatro dias consecutivos, após a última administração, os animais receberam administrações IC agudas de SAL ou ETOH 100  $\mu$ g no terceiro dia e a seguir a intervalos de 4 dias (dias sete, onze e quinze), e submetidos ao teste de desempenho no labirinto com retardos de 1 hora, após 5 minutos da administração. O ETOH IC após HCl ou sulpirida (3,2  $\mu$ g) IC produziu significativamente ( $p < 0,01$ ) maior número de erros quando comparado à combinação controle HCl e SAL. Animais tratados com a dose de sulpirida (0,32  $\mu$ g ou 1,0  $\mu$ g) combinada ao ETOH apresentaram significativamente ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) menor número de erros comparado ao tratamento combinado de HCl e ETOH (100  $\mu$ g) e sulpirida (3,2  $\mu$ g) e ETOH (100  $\mu$ g) no pós-retardo de 1 hora. Administrações prévias repetidas de Sulpirida no CPFm não modificam substancialmente os efeitos de prejuízo do ETOH sobre a memória operacional espacial dentro do período de 15 dias, porém reduziram significativamente estes efeitos após latência de 15 dias, sugerindo que a diminuição prévia da função dos receptores D<sub>2</sub> pode modificar os efeitos do ETOH no CPFm. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem a participação do sistema dopaminérgico, mais especificamente dos receptores do tipo D<sub>2</sub>, nos efeitos do etanol sobre a memória operacional espacial no CPFm.

## ABSTRACT

The prefrontal cortex (PFC) has been considered as the anatomical site for working memory processing. Its medial portion (mPFC) is part of a brain reward circuitry, essentially mediated by the dopaminergic mesocorticolimbic pathway. The present study examined the involvement of dopaminergic D<sub>2</sub> receptors in the mPFC, by means of a selective antagonist of D<sub>2</sub> receptors, sulpiride, in the disruptive effects of ethanol (ETOH) on long-term spatial working memory measured by 1-h delayed task performance in an 8-arm radial maze. Male Wistar rats (n=26, 210-270g,  $\cong$  3 months of age), previously trained in the 8-arm radial maze and with bilateral cannulae implanted in the mPFC (B: + 2.5 mm A, +/- 1 mm L, 2.0 mm V), received intracortical (IC) administration of sulpiride in two different experiments: in the first experiment, 11 animals received IC administration of different doses of sulpiride (0.32, 1.0 or 3.2  $\mu$ g) or chloride acid 0,05M (HCl) 10 minutes before IC administration of saline (SAL) or ETOH 100  $\mu$ g. Five minutes after the second administration, animals were submitted to the 1-h delayed task in the radial maze. In the second experiment, 22 animals received IC infusions of sulpiride 1  $\mu$ g or HCl 0,05 M directly in the mPFC once a day for 4 consecutive days. After the last (4<sup>th</sup>) administration, animals received acute IC administration of SAL or ETOH 100  $\mu$ g in the 3<sup>rd</sup> day, followed by 4-days intervals (days 7, 11 and 15), and tested in 1-h delayed task in the radial maze, after a 5 minutes interval. ETOH IC with previous administration of HCl or sulpiride (3.2  $\mu$ g) IC yielded significantly larger ( $p < 0.01$ ) number of errors as compared to the combination of HCl and SAL. Animals treated with lower doses of sulpiride (0.32  $\mu$ g or 1  $\mu$ g) combined with ETOH showed significantly ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively) smaller number of errors as compared to the combination of HCl and ETOH (100  $\mu$ g) and of sulpiride (3.2  $\mu$ g) and ETOH (100  $\mu$ g) in the 1-h post-delay performance. Previous repeated administration of sulpiride into the mPFC did not affect substantially the disruptive effects of ETOH on spatial working memory over the 15 days period, but it significantly reduced the ETOH disruptive effect after the latency of 15 days, suggesting that reduced dopaminergic D<sub>2</sub> receptors in the mPFC could change the effects of ETOH in the mPFC. Taken all together, these results suggest the involvement of the dopaminergic system, more specifically the D<sub>2</sub> dopaminergic receptors, in ethanol effects on spatial working memory in the mPFC.



**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANOVA	Análise de Variância
ATV	Área Tegmentar Ventral
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CPF	Córtex Pré-Frontal
CPFm	Córtex Pré-Frontal Medial
DA	Dopamina
DOPAC	Dihidroxifenilalanina
e.p.m	Erro padrão da média
ETOH	Etanol
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HCl	Ácido Clorídrico
HVA	Ácido homovalínico
MAO	Monoamina oxidase
MD	Núcleo médio-dorsal do tálamo
NAcc	Núcleo Accumbens
SAL	Salina
SN	Substância negra
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO - 12
  - 1.1 CORTEX FRONTAL - 12
    - 1.1.1 A estrutura Frontal - 12
    - 1.1.2 Funções Frontais - 16
  - 1.2 MEMÓRIA OPERACIONAL - 19
    - 1.2.1 Memória Operacional e o CPF - 22
  - 1.3 A NEUROTRANSMISSÃO NO CPF - 23
  - 1.4 DOPAMINA - 24
    - 1.4.1 Vias dopaminérgicas - 26
    - 1.4.2 Receptores Dopaminérgicos - 27
    - 1.4.3 Receptores D<sub>2</sub> e CPF - 29
  - 1.5 EFEITOS DO ETANOL SOBRE O SNC - 30
  - 1.6 SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOCORTICOLIMBICO, MEMÓRIA OPERACIONAL E O ALCOOL - 32
2. OBJETIVOS - 34
  - 2.1 OBJETIVOS GERAIS - 34
  - 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS - 34
3. MATERIAIS E MÉTODOS - 35
  - 3.1 ANIMAIS - 35
  - 3.2 DROGAS - 35
  - 3.3 LABIRINTO RADIAL DE 8 BRAÇOS - 36
  - 3.4 AQUISIÇÃO DA TAREFA - 37
  - 3.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA - 39
  - 3.6 ADMINISTRAÇÃO INTRACORTICAL DE DROGAS - 40
  - 3.7 EXPERIMENTOS - 41
    - 3.7.1 Experimento I - Efeitos da Combinação Aguda do Antagonista D<sub>2</sub> Seletivo Sulpirida e Etanol sobre a Memória Operacional Espacial de Ratos -41

3.7.2 Experimento II - Efeitos das Administrações repetidas do Antagonista D <sub>2</sub> Seletivo, Sulpirida, sobre os Efeitos do Etanol sobre a Memória Operacional Espacial de Ratos - 42	
3.8 HISTOLOGIA - 44	
3.9 ANALISE DOS RESULTADOS - 44	
4. RESULTADOS - 46	
4.1 LOCALIZAÇÃO DAS CÂNULAS – 46	
4.2 AQUISIÇÃO DA TAREFA - 47	
4.2.1 Fase IV - sem Período de Retardo - 47	
4.2.2 Fase V - Com Retardo de 5 s - 48	
4.3. PESOS CORPORAIS DURANTE AS FASES DE TREINAMENTO - 50	
4.4 EXPERIMENTOS - 51	
4.4.1 Experimento I - Efeitos da Combinação Aguda do Antagonista D <sub>2</sub> Seletivo Sulpirida e Etanol sobre a Memória Operacional Espacial de Ratos - 51	
4.4.2 Experimento II - Efeitos das Administrações repetidas do Antagonista D <sub>2</sub> Seletivo, Sulpirida, sobre os Efeitos do Etanol sobre a Memória Operacional Espacial de Ratos - 53	
4.4.2.1 Análise Entre-Grupos - 53	
4.4.2.2 Análise Intra-Grupo - 55	
5. DISCUSSÃO - 60	
5.1 PARADIGMA DO LABIRINTO RADIAL DE 8 BRAÇOS - 60	
5.2 ETANOL E CORTEX PRÉ-FRONTAL - 62	
5.3 SISTEMA DOPAMINÉRGICO PRÉ-FRONTAL E MEMÒRIA OPERACIONAL - 64	
5.3.1. Receptores D <sub>1</sub> e memória operacional - 65	
5.3.2. Receptores D <sub>2</sub> e memória operacional - 65	
5.4 RECEPTORES D <sub>2</sub> E ÁLCOOL - 68	
5.5 SENSITIZAÇÃO, CORTEX PRÉ- FRONTAL MEDIAL E RECEPTORES D <sub>2</sub> - 71	
6. CONCLUSÕES - 74	
7. REFERÊNCIAS - 75	

# 1. Introdução

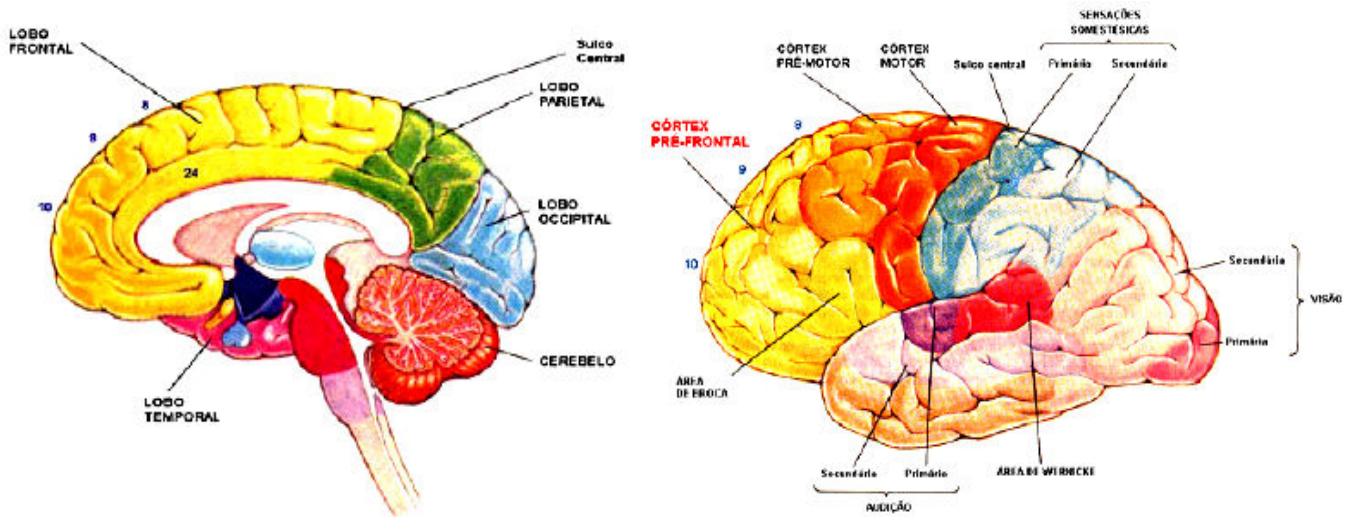
## 1.1. Córtex Frontal

### 1.1.1. A Estrutura Frontal

O córtex cerebral encontra-se dividido em vários lobos entre eles o córtex frontal ou lobo frontal. A região frontal do córtex cerebral corresponde a toda a área anterior ao sulco central e superior à fissura de Sylvius (Adams et al., 1997). Durante a ontogênese os lobos frontais são as últimas estruturas do hemisfério cerebral a se formarem, sendo pouco desenvolvidas em animais inferiores e consideravelmente grandes em primatas (Luria, 1981; Kolb, 1984; Adams et al., 1997). Enquanto no homem o número de circunvoluções e fissuras é bastante elevado, em animais inferiores isso não ocorre, estando essas áreas constituídas por uma camada fina e lisa (Reading, 1991; Machado, 2004).

Dividindo os lobos frontais encontramos duas porções distintas: uma região mais posterior, correspondente ao giro pré-central ou área motora primária em humanos, a qual produz movimentos quando eletricamente estimulada; e uma região mais rostral, anterior ao sulco pré-central, cuja estimulação elétrica não produz ativação motora ou sensorial, sendo denominada córtex pré-frontal (CPF) ou córtex granular frontal (Fig. 1) (Kolb, 1984; Adams et al., 1997).

No homem o CPF pode ser dividido em quatro áreas: oculomotora (área 8 de Brodmann); dorsolateral (áreas 9 e 10 de Brodmann); orbitofrontal lateral (área 10 de Brodmann) e área do cíngulo anterior ou córtex pré-frontal medial (CPFm) (área 24 de Brodmann) (Fig. 1) (Cumings, 1993).

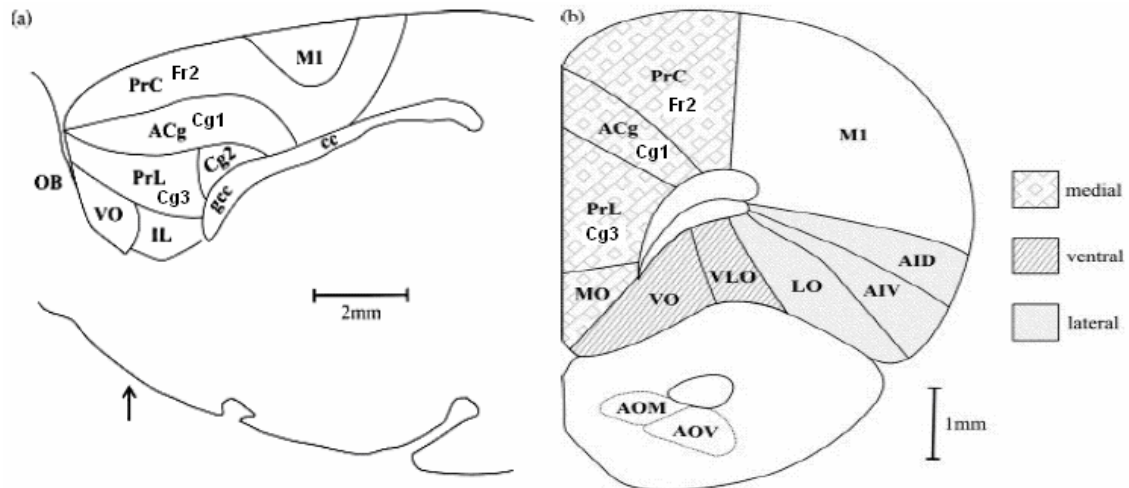


**Figura 1.** Áreas do CPF da espécie humana, numeradas segundo o mapa citoarquitetônico de Brodmann.

**Fonte:** Neurociências: desvendando o sistema nervoso, Mark et al. 2002.

O CPF em roedores, não pode ser definido por suas características citomorfológicas como ocorre em animais de espécies superiores (Kolb, 1984). A diferença é que nestes animais o córtex é pouco granular ou mesmo agranular. Por esta razão, para se definir a localização anátomo-funcional do CPF nesses animais, Rose e Woolsey em 1948 propuseram ser a área que recebe maciça projeção do núcleo médio-dorsal do tálamo à semelhança do que é observado em primatas não-humanos e no homem.

Deste modo em roedores, o CPF pode ser subdividido em áreas infralímbica (IL), pré-límbica (PrL ou Cg3), cíngulo anterior (Cg1) e ventral (ACg e Cg2); área pré-central (PrC ou Fr2), área orbital (medial- MO, ventral- VO, ventro-lateral- VLO e lateral- LO); e em área agranular insular ventral e dorsal (AIV e AID) que compõe o córtex gustatório (Fig. 2) (Paxinos e Watson, 1986; Dalley et al., 2004).



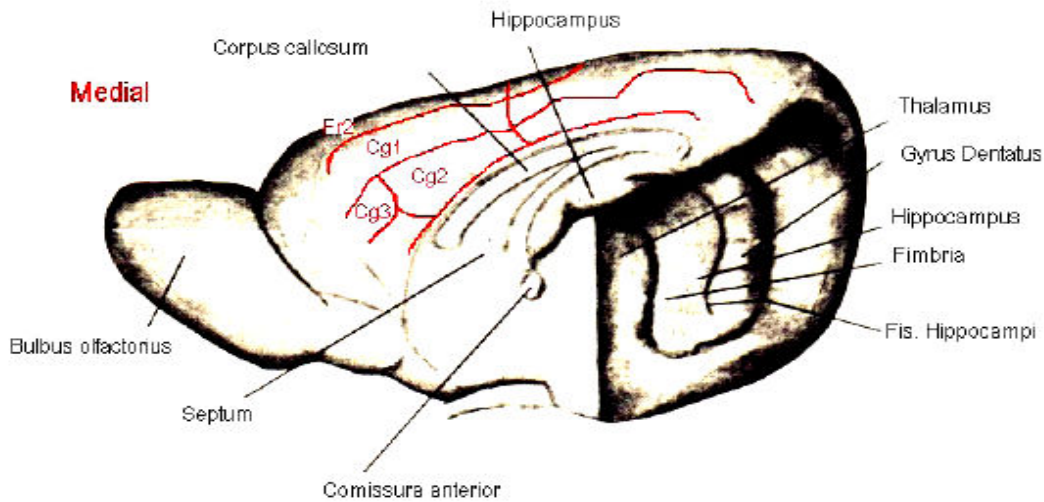
**Figura 2.** Subregiões do CPF de roedores. a) Secção sagital: 0,9 mm da linha média. b) Secção coronal unilateral: 3,5 mm anterior ao bregma. Os sombreados diferentes indicam as três principais divisões do CPF de roedores (medial, ventral e lateral). Abreviaturas: ACg, córtex cingulado anterior (ou Cg1); AID, córtex agranular insular dorsal; AIV, córtex agranular insular ventral; AOM, núcleo olfatório anterior medial; AOV, núcleo olfatório anterior ventral; cc, corpo caloso; Cg2, área 2 do córtex cingulado; gcc, joelho do corpo caloso; IL, córtex infralímbico; LO, córtex orbital lateral; M1, área motora primária; MO, córtex orbital medial; OB, bulbo olfatório; PrL, córtex pré-límbico (ou Cg3); PrC, córtex pré-central (ou Fr2); VLO, córtex orbital ventro-lateral; VO, córtex orbital ventral.

**Fonte:** Adaptado de Neuroscience and Biobehavioral Reviews. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. Dalley et al., 2004

Em roedores, assim como em primatas, a porção medial do CPF ou córtex pré-frontal medial (CPFm) corresponde ao córtex do cingulado anterior (Cg1 e Cg2), córtex pré-límbico (Cg3) e parte do córtex frontal (Fr2) (Fig. 3) (Kolb, 1984; Zilles & Wree, 1985).

O CPF é uma área de associação terciária, não recebendo as aferências sensoriais diretamente da periferia, mas processando as informações sensoriais através de suas conexões com outras regiões corticais e subcorticais (Barbas, 2000). É uma das regiões que apresenta o sistema mais rico de conexões de todo o neocórtex, recebendo aferências do tronco cerebral, hipotálamo, sistema límbico (hipocampo e amígdala), núcleos da base, através dos núcleos de retransmissão do tálamo, tálamo (especialmente núcleos anterior e dorsomedial), além de outras áreas do neocórtex, especialmente áreas de associação (Fuster, 1999; Miller e Wallis, 2003).

### CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL = Cg1 + Cg2 + Cg3 + Fr2

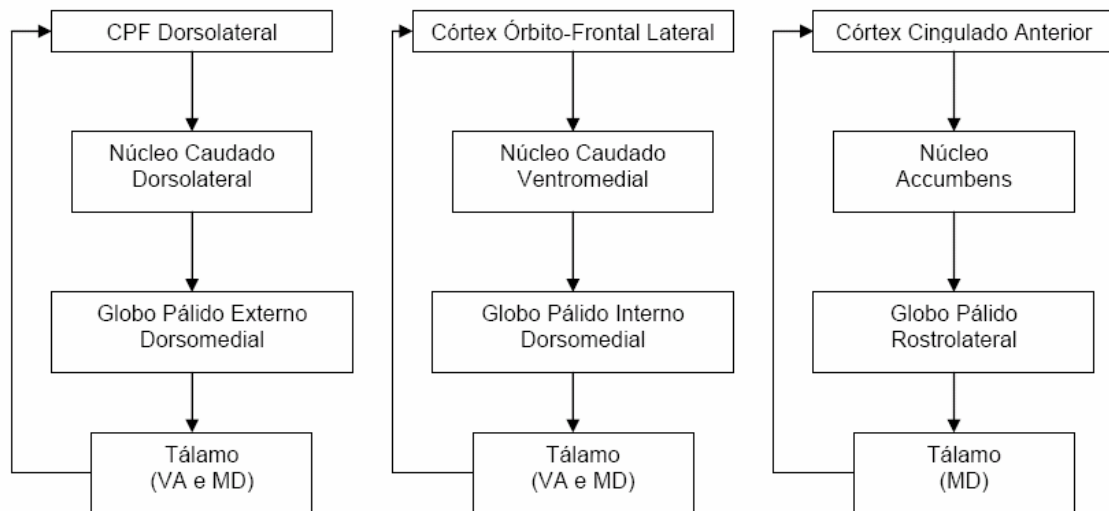


**Figura 3:** Visão medial do cérebro de rato. Observa-se em destaque em vermelho as áreas Cg1, Cg2 e Cg3 do cingulado anterior e Fr2 do córtex frontal motor, que compõem o córtex pré-frontal medial em roedores.

**Fonte:** Adaptado de Academic Press. Cortex: Areal and laminar structure. Zilles e Wree, 1985.

Estudando as aferências do CPF foram descritos três circuitos subcorticais que expressam a organização topográfica entre os núcleos da base, o tálamo e o CPF, divididos da seguinte maneira: 1) cingulado anterior (CA); 2) pré-frontal dorso-lateral (PFDL) e; 3) órbito-frontal lateral (OFL) (Fig. 4) (Cummings, 1993). Os circuitos indiretos, onde as conexões do *striatum ventral* se dirigem para o globo pálido externo e o núcleo subtalâmico antes de chegar ao tálamo, não estão representados no diagrama, bem como suas conexões com o córtex de associação e o córtex límbico. Essas evidências sugerem que todas as áreas do CPF têm acesso a sistemas especializados de controle motor, consistente com o seu importante papel nas funções executivas centrais (Barbas, 2000).

Além disso, o CPF, tanto em primatas quanto em ratos, também possui amplas conexões com os córtices pré-motor, somatossensorial, auditivo, visual, olfatório, gustatório e límbico, estando envolvido, portanto, em diferentes funções e aspectos do comportamento (Uylings e Van Eden, 1990).



**Figura 4.** Circuitos pré-frontais subcorticais (VA= núcleo ventral anterior do tálamo; MD= núcleo médio-dorsal do tálamo).

**Fonte:** Archives of Neurology. Frontal-subcortical circuits and human behavior. Cummings, 1993

### 1.1.2. Funções Frontais

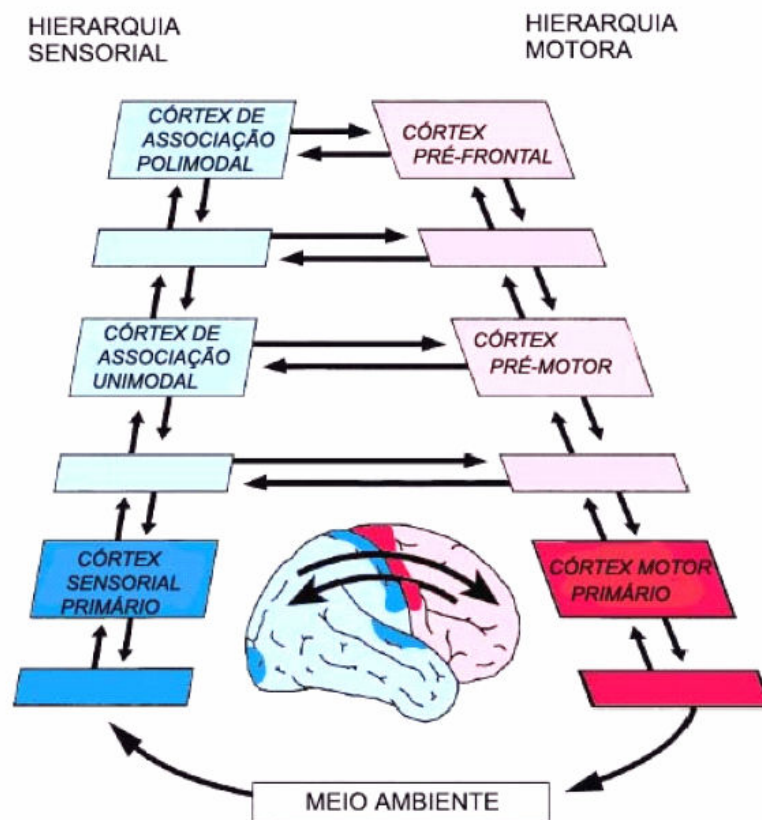
Os lobos frontais encontram-se divididos em quatro distintos setores funcionais: 1) o córtex motor primário que executa o movimento; 2) o córtex pré-motor, relacionado à preparação para o movimento voluntário; 3) a área de Broca, relacionada à linguagem escrita e falada, e 4) o córtex pré-frontal, envolvido em funções como a iniciativa, organização temporal do comportamento, raciocínio, planejamento e criatividade (Reading, 1991; Fuster, 1991).

Desta forma, o córtex frontal além de suas funções motoras, exerce também importantes funções cognitivas, comportamentais e de linguagem que se encontram hierarquicamente organizadas dentro de um ciclo percepção-ação onde existe um fluxo circular de informação do ambiente para áreas sensoriais, e destas para áreas motoras, que por sua vez retornam a informação para o ambiente sob a forma de expressão comportamental (Fuster, 2004) (Fig. 5). Assim as áreas posteriores do córtex são responsáveis pela percepção das informações do meio e as áreas frontais pelas funções executivas do comportamento, seguindo um gradiente ontogenético do córtex sensorial primário para áreas de associação multimodais (Fuster, 2001). O nível mais inferior dessa hierarquia é o córtex motor primário que



executa o movimento planejado em áreas associativas através de grupos musculares envolvidos em determinada ação. O nível mais elevado é o córtex pré-frontal (CPF), o qual integra as informações mais elaboradas da percepção e da execução do comportamento (Fig. 5) (Fuster, 2000; 2001; 2004). O processamento das informações neste ciclo percepção-ação ocorre tanto em série como em paralelo (Koechlin et al., 2003).

Neste ciclo percepção-ação, o CPF é uma área de associação multimodal localizada em seu topo cuja função é primariamente integrativa, não sendo exclusivamente sensorial ou motora (Luria, 1981; Fuster, 2001; Machado, 2004). De fato, ele tem sido considerado uma região que sintetiza a informação sobre o mundo interno e externo com o propósito de produzir comportamentos dirigidos a um objetivo (Miller e Wallis, 2003). O CPF seria então responsável pela formação de planos e intenções estáveis capazes de controlar o comportamento subsequente do indivíduo (Luria, 1981).



**Figura 5.** Estágios do ciclo percepção-ação no córtex frontal cerebral, representando as hierarquias sensorial e motora.

**Fonte:** Experimental Brain Research. Executive frontal functions. Fuster, 2000.

Por ser uma área que integra informações de diversas regiões corticais e subcorticais, o CPF exerce influência nos estados de alerta, estresse e humor, bem como em funções específicas como a mediação da recompensa ou gratificação, atenção seletiva e memória (Robbins, 2000).

Kolb (1984), inicialmente considerou o lobo frontal como o sítio da inteligência mais elevada, ou seja, com funções tão variadas como o “comportamento abstrato”, previsibilidade, síntese intelectual, auto-consciência, comoção, comportamento ético e raciocínio. Posteriormente baseado em diversas evidências experimentais, propôs uma função principal para o CPF, que seria a organização temporal do comportamento.

Dada a importância do CPF, não surpreende observar que lesões em suas áreas levam a um profundo distúrbio de personalidade, do afeto, do controle motor, da linguagem, da memória, da atenção e da resolução de problemas.

Estudos realizados em animais e no homem sugerem que diferentes regiões do CPF respondem por diferentes funções mentais. Por exemplo, os distúrbios de personalidade e afetivos estão associados a lesões pré-frontal orbital, enquanto que os distúrbios de linguagem à área de Broca e os distúrbios de memória às lesões pré-frontal dorsolateral (Shimamura, 1997).

O CPFm de ratos possui funções específicas similares às encontradas nas regiões dorsolateral e, possivelmente, cingulado anterior de primatas, estando portanto, relacionado ao controle das funções executivas centrais (Kesner, 2000; Uylings et al., 2003). Dentre essas funções, incluem a capacidade de detectar novos estímulos (Dias e Honey, 2002), a organização temporal do comportamento (Fuster, 2000), os processos atencionais (Birrel e Brown, 2000) e memória (Kesner, 2000). A função cognitiva do CPF mais explorada, tanto em roedores quanto em primatas, é a memória operacional (Goldman-Rakic, 1990; Baddeley, 2003).

A maior parte dos estudos funcionais têm focado sua atenção no CPFm, cuja lesão está consistentemente associada com disfunções cognitivas e de memória, particularmente aquelas que envolvem o procedimento de retardo (Delatour e

Gisquet-Verrier, 1999), ou seja, a interposição de um intervalo de tempo (segundos, minutos ou horas) geralmente no meio da realização de uma tarefa cognitiva.

As ações do CPF seriam mediadas por 3 funções cognitivas que permitem a organização temporal do comportamento: uma função temporalmente retrospectiva de duração breve para a informação sensorial (memória operacional), uma função temporalmente prospectiva para a resposta motora (planejamento) e uma função responsável por controle inibitório de interferência (atenção) (Fuster, 1999).

## **1.2. Memória Operacional**

A memória operacional é caracterizada por ser um sistema que processa e armazena temporariamente uma determinada informação durante a realização de tarefas cognitivas que envolvem aprendizado, compreensão e raciocínio. Após a conclusão da tarefa esta informação é descartada ou substituída por uma nova informação necessária para a tarefa que esteja em atividade no momento. Dessa forma, o período de tempo em que a informação fica armazenada na memória operacional é uma função da ação à qual ela está relacionada (Baddeley, 1992, 1997, 2003; Goldman-Rakic, 1992; Olton, 1979). Um exemplo comum do funcionamento da memória operacional é o armazenamento temporário de um número de telefone até que o mesmo seja discado e, então, imediatamente esquecido. Este critério distingue a memória operacional das memórias semântica, procedural e de referência (Goldman-Rakic, 1990).

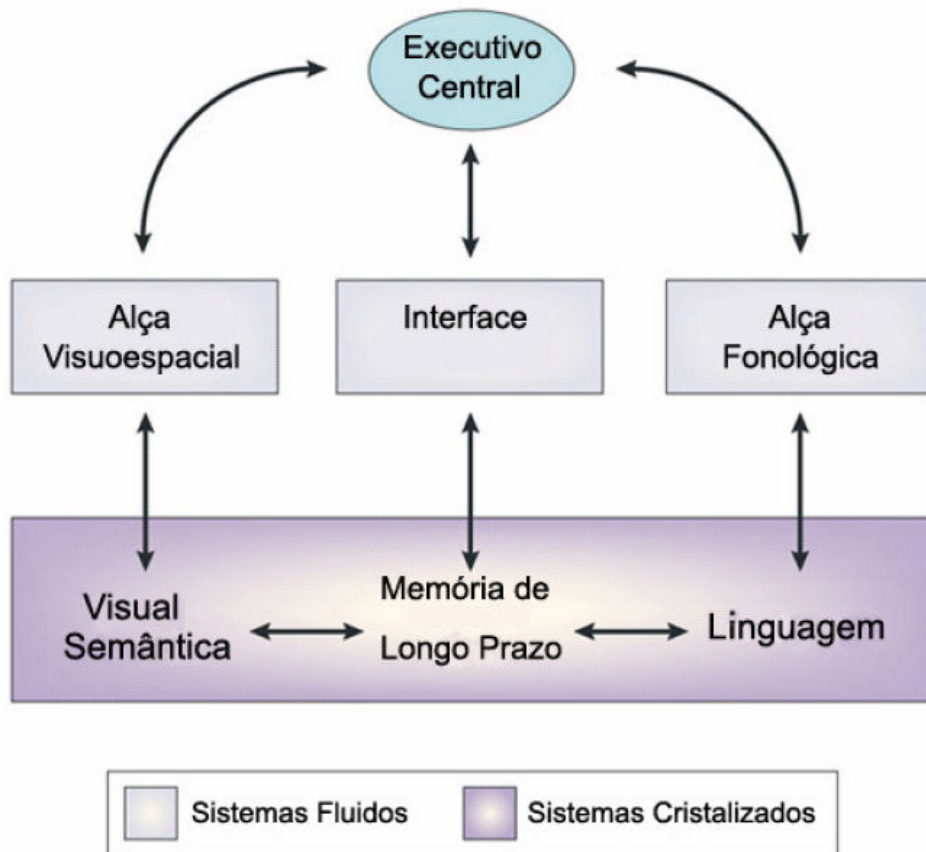
Este tipo de memória é processado fundamentalmente pelo CPF e depende particularmente da atividade elétrica dos neurônios dessa região cortical. Os primatas não-humanos têm uma capacidade de memória operacional tão boa quanto o homem. Em todas as espécies, o CPF processa a memória operacional interagindo com o córtex entorrinal, parietal superior e cíngulo anterior e com o hipocampo (Izquierdo et al., 1998; Artiges et al., 2000). Estas regiões cerebrais atuam em conjunto por meio da troca de informações através de suas conexões.

Portanto, a memória operacional é polimodal, ou seja, é ativada por vários estímulos sensoriais (visual, auditivo, olfativo, tátil, etc.), não podendo ser definida pelo seu conteúdo nem pela sua duração e sim como sendo uma memória em ação e para uma ação. A memória pré-frontal está intimamente relacionada com o ciclo percepção-ação controlando a transferência da informação sensorial à ação através do tempo (Fuster, 1991).

O termo “memória operacional” foi proposto inicialmente por Miller et al., em 1960 . Contudo ao longo do tempo foi modificado e complementado por outros autores. Atkinson e Shiffrin, em 1968 propuseram que a memória operacional seria um sistema unitário e de curta duração (citado por Baddeley, 2001).

Entretanto, Baddeley e Hitch, 1974 propuseram que a memória operacional seria um sistema de múltiplos componentes (Fig. 6), a saber: a **central executiva**, um controlador atencional de capacidade limitada, responsável por tomada de decisões, planejamento de estratégias, raciocínio e controle do comportamento, e cuja atividade está relacionada ao funcionamento do lobo frontal. Este sistema é auxiliado por dois subsistemas envolvidos no arquivamento temporário e manipulação de informações: a **alça fonológica**, que traz informações acústicas e verbais, e a **alça visuoespacial** que fornece informações tanto visuais quanto espaciais. Assim como já mencionado anteriormente, a memória operacional é polimodal, recebendo, portanto, informações de vários sistemas sensoriais (Baddeley, 1996; Baddeley, 2001).

Recentemente, Baddeley, 2001 propôs um quarto componente de memória operacional, o “**buffer**” **episódico**, que representa um sistema de armazenamento que utiliza uma codificação multimodal. Seria episódico por utilizar episódios ou cenas e um “buffer” por fornecer uma interface de capacidade limitada entre sistemas que utilizam diferentes códigos. Desta forma, a central executiva assume o papel atencional como sua principal função e o “buffer” responderia pela função mnemônica .



**Figura 6.** Multi-componentes da memória operacional revisados.

**Fonte:** Nature Reviews Neuroscience, Working memory: looking back and looking forward. Baddeley, 2003.

O termo “memória operacional”, no entanto, é utilizado de diferentes formas por diferentes comunidades de pesquisadores. No campo da neurociência comportamental e comportamento animal, por exemplo, o termo está frequentemente associado ao paradigma do labirinto radial (Shah e Miyake, 1999).

O modelo do labirinto radial foi proposto por Olton e Samuelson em 1976, e tem como fundamento a “aprendizagem de lugar”. Este modelo avalia a memória operacional no seu aspecto visuoespacial, o qual possui um dado número de braços (8 ou mais), ao final dos quais é colocado um reforço e o animal é treinado para alcançá-lo. Neste método, o animal deverá evitar visitar um braço já visitado em uma sessão no qual o reforço já não é mais oferecido, indicando a existência de alguma forma de retenção de informações que é melhor avaliada quando, após o animal ter percorrido um dado número de braços, se interpõe um período de retardo

(intervalo de retenção) com a duração breve (segundos) ou mais prolongada (horas) e é então permitido ao animal concluir a tarefa, sendo registradas as re-entradas em braços visitados anteriormente (Olton, 1979; Baddeley, 1983; Baddeley, 1997).

Vale ressaltar que o labirinto radial pode ser utilizado em diferentes protocolos experimentais em diferentes versões, que estariam avaliando funções cognitivas distintas. Essa metodologia é também bastante sensível para a investigação do efeito de drogas psicoativas e de lesões cerebrais sobre a memória operacional e tornou-se um paradigma muito empregado para estes fins (Olton & Samuelson, 1976; Olton, 1979; Gibson, 1985; Nakamura-Palacios et al., 1996; Baddeley, 1997; Nakamura-Palacios & Roelke, 1997).

A memória de referência ou de procedimento também é avaliada no paradigma do labirinto radial. Ela é um tipo de memória de longo prazo que armazena informações independentes de contexto, sendo necessário o registro de regras para a correta execução da tarefa. Seus mecanismos cerebrais são diferentes do processamento da memória operacional, no entanto eles se associam para o desempenho no labirinto radial (Olton et al., 1977).

### **1.2.1. Memória Operacional e o CPF**

A correlação entre CPF e memória operacional foi inicialmente observada na avaliação da atividade de neurônios pré-frontais do córtex de macacos durante tarefas com retardo. As células do CPF permaneciam ativadas, mantendo a informação “on-line” (ativa), na ausência do estímulo e durante o tempo variável do retardo até o término da tarefa (Goldman-Rakic, 1990).

O CPF é o gerenciador dos vários processos envolvidos na memória operacional. Fuster, 2002 ao mencionar as funções cognitivas do lobo frontal, evidenciou a associação do CPF com outras regiões cerebrais, de forma a manter um circuito de reverberação durante a execução da memória operacional, um processo crucial para sustentação da informação enquanto durar a função.

A memória operacional, em primatas e roedores, tem sido objeto de estudo para investigação dos principais sistemas de neurotransmissão envolvidos em funções executivas pré-frontais. O sistema dopaminérgico é o mais explorado em atividades envolvendo retardo, pois os níveis de dopamina (DA) encontram-se elevados durante a execução da tarefa e o período de retardo, momentos nos quais as informações estão sendo processadas *em e para* a ação (Fuster, 1991; Phillips et al., 2004).

### **1.3. A Neurotransmissão no CPF**

O CPFm possui uma variedade de células, incluindo neurônios piramidais glutamatérgicos, eferências colinérgicas, interneurônios gabaérgicos e interneurônios colinérgicos. A principal eferência do CPFm dá-se através dos neurônios piramidais glutamatérgicos, os quais são regulados por um complexo sistema de neurotransmissão que se encontra conectado a inúmeras regiões: áreas corticais diversas, núcleo accumbens, corpo amigdalóide, hipocampo, hipotálamo, núcleo médio-dorsal do tálamo e outros núcleos talâmicos (aferências glutamatérgicas); área tegmentar ventral (aferências DAérgicas); núcleos medial e dorsal da rafe (aferências serotoninérgicas); locus coeruleus (aferências noradrenérgicas); núcleo basal magnocelular e núcleo dorsolateral mesopontino (aferências colinérgicas); feixe prosencefálico medial (aferências peptidérgicas) (Steketee, 2003).

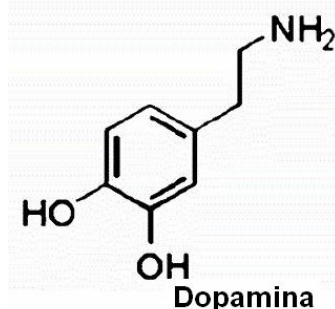
Os neurônios DAérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos, provenientes, respectivamente, da área tegmentar ventral (ATV), dos núcleos medial e dorsal da rafe e do locus coeruleus, modulam a eferência glutamatérgica do CPFm, controlando, dessa forma, a atividade destes neurônios sobre as estruturas subcorticais como o núcleo accumbens (NAcc) e o striatum (Thierry et al., 1990). Enquanto as aferências glutamatérgicas oriundas principalmente do núcleo médio-dorsal do tálamo, do hipocampo e da amígdala estabelecem sinapses excitatórias sobre os dendritos dos neurônios piramidais eferentes (glutamatérgicos) e dos interneurônios inibitórios (gabaérgicos) do CPFm (Steketee, 2003).

Groenewegen e Uylings (2000) relatam que os padrões de inervação e os níveis de neurotransmissores são específicos a cada subregião do CPFm, sugerindo que a manipulação de distintas regiões podem levar a diferentes efeitos sobre a resposta comportamental.

Tzschentke (2000) demonstrou o envolvimento do CPFm no circuito de gratificação cerebral como uma estrutura mediadora dos efeitos reforçadores de algumas drogas, presumivelmente devido à sua influência modulatória no sistema DAérgico mesolímbocortical. Inicialmente, foi utilizada a estimulação elétrica para verificar qual área estaria envolvida nos processos de gratificação cerebral. A auto-administração de drogas diretamente no CPFm (Carlezon e Wise, 1996), o condicionamento de reforço alimentar à resposta comportamental (Richardson e Gratton, 1998) e lesões de áreas pré-frontais (McGregor et al., 1996) têm sido utilizadas para investigar as regiões cerebrais e os sistemas de neurotransmissores envolvidos no reforçamento da resposta comportamental.

#### 1.4. DOPAMINA

A DA (Fig. 7) é uma catecolamina, composto orgânico que apresenta um núcleo catecol (um anel benzênico com duas hidroxilas adjacentes) e um grupamento amina. Sua síntese se inicia com a captação ativa do aminoácido L-tirosina nos terminais nervosos, o qual é transformado em L-Dopa pela ação da enzima tirosina hidroxilase. Esta etapa é limitante na síntese da DA, posteriormente, a enzima L-Dopa descarboxilase converte L-Dopa em dopamina, a qual é armazenada nas vesículas sinápticas (Halbach & Dermietzel, 2002).



**Figura 7.** – Fórmula estrutural da dopamina.

**Fonte:** <http://www.chemistry.emory.edu/justice/research/dopamine.jpg>



A liberação de DA na fenda sináptica ocorre quando o potencial de ação chega aos terminais nervosos. Com a chegada do potencial de ação, canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem-dependente são abertos e ocorre influxo de  $\text{Ca}^{++}$  para o interior do terminal pré-sináptico, levando à exocitose das vesículas e liberação de DA na fenda (Bear et al., 2002). A quantidade de DA liberada depende da frequência e do padrão de disparo do potencial de ação bem como da ativação de auto-receptores pré-sinápticos (Cooper, 2003).

O principal mecanismo da retirada de DA da fenda sináptica é a sua recaptação pelo terminal nervoso através de transportadores acoplados à membrana plasmática (DAT), os quais transportam a DA para dentro ou para fora da célula, dependendo do gradiente de concentração existente (Cooper, 2003). Este processo é dependente de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , sendo, portanto, um transporte ativo secundário. O transportador da DA é bastante eficiente, pois cerca de 80% da DA liberada é recapturada por este mecanismo de transporte, modulando a sua concentração na fenda sináptica e a sua interação com os receptores pré- e pós-sinápticos (Halbach & Dermietzel, 2002; Cooper, 2003).

O metabolismo da DA ocorre por 2 vias principais: intraneuronal, através da enzima monoaminoxidase (MAO), e extraneuronal, através da enzima catecoloximetiltransferase (COMT), as quais convertem a DA liberada em ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e em ácido homovanílico (HVA), respectivamente. Esses metabólitos são utilizados como parâmetros para investigação da atividade dopaminérgica em determinadas regiões do SNC (Cooper, 2003).

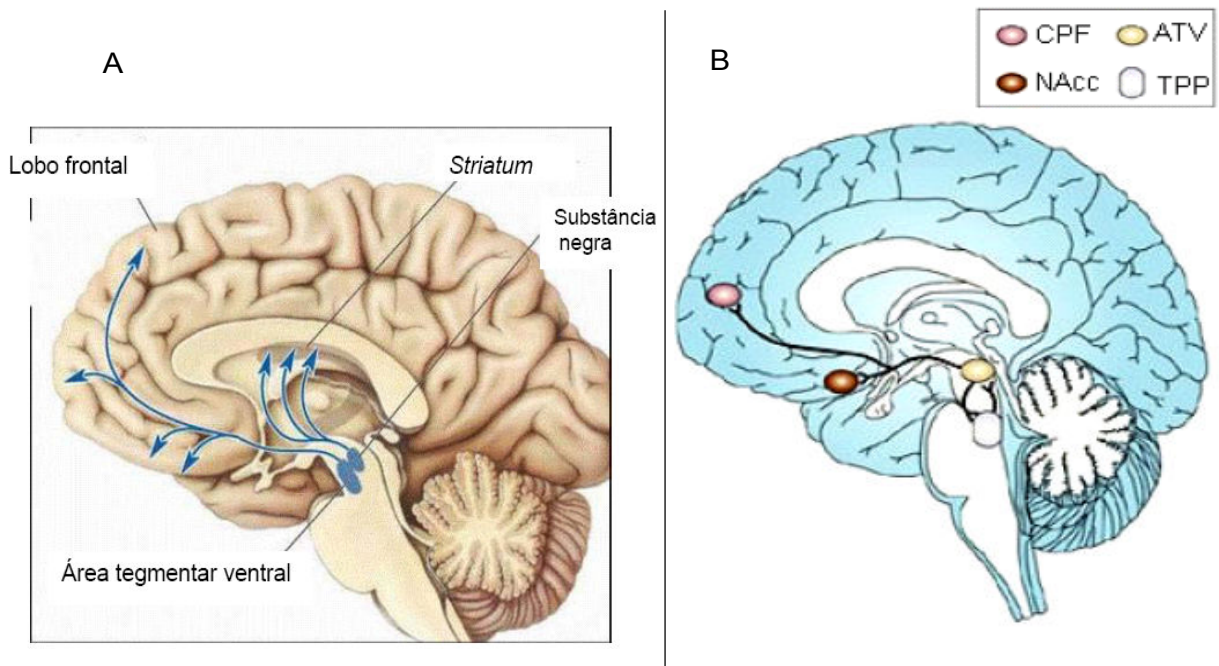
Diferentes drogas atuam nesses processos. Por exemplo, a cocaína e a anfetamina se ligam ao DAT, impedindo a recaptação de DA, que permanece por mais tempo e em maior quantidade na fenda sináptica. Do mesmo modo age a nomifensina, também disponibilizando uma maior quantidade de DA na fenda. Já a reserpina, droga cuja utilização atualmente é restrita a investigações científicas, age bloqueando a entrada de DA nas vesículas sinápticas; no citoplasma, a DA será degradada pela enzima monoamina oxidase (MAO), o que reduz seus estoques (Graeff et al., 2000).

### 1.4.1. Vias dopaminérgicas

Os neurônios dopaminérgicos formam nove grupos celulares (A8-A16), que ao longo do desenvolvimento se transformaram em três principais núcleos: substância negra (SN), área tegmentar ventral (ATV) e núcleo hipotalâmico. Grupos menores de neurônios são encontrados na retina e no bulbo olfatório (Jucaite, 2002). As zonas de projeção dos terminais dopaminérgicos vão determinar o papel funcional destes neurônios. Os neurônios da substância negra (grupo A9) se projetam para estruturas subcorticais, como núcleo caudado e putâmen. A via nigroestriatal detém a maior parte do sistema dopaminérgico central e é importante no controle dos movimentos. A degeneração de neurônios dessa via é o provável causador da doença de Parkinson (Cooper, 2003).

Os neurônios da área tegmentar ventral (A8 e A10) formam duas vias: a via mesolímbica, com neurônios que se projetam para regiões subcorticais límbicas (núcleo *accumbens*, septo, corpo amigdalóide) estando envolvida na regulação de emoções e motivação; e a via mesocortical, cujos terminais se distribuem para áreas corticais límbicas, como o córtex piriforme, o córtex entorrinal e principalmente para o CPF. Alguns autores consideram que estas duas vias comporiam uma única via dopaminérgica mesocorticolímbica ou mesolímbocortical (Fig. 8A) (Tzschentke, 2001; Cooper 2003). Desde as primeiras investigações dos processos de gratificação cerebral com auto-estimulação intracraniana, tem-se confirmado inequivocamente o papel relevante do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico na mediação não somente dos efeitos reforçadores agudos das drogas, como também nos aspectos motivacionais na retirada da droga (Fig. 8B) (Koob e Nestler, 1997). De fato, a DA parece modular a maioria das funções cognitivas do CPF, onde está amplamente distribuída (Jucaite, 2002).

Finalmente, os neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos que se projetam para a glândula pituitária formando a via tuberinfundibular, cujo papel funcional é suprimir a liberação de prolactina (Jucaite, 2002).



**Figura 8:** A) Principais vias dopaminérgicas. Cérebro humano.

**Fonte:** Neurociências: desvendando o Sistema nervoso, 2002

B) O circuito de gratificação cerebral no homem: CPF, córtex pré-frontal; ATV, área tegmentar ventral; NAcc, núcleo accumbens; TPP, núcleo tegmentar pedúnculo pontino.

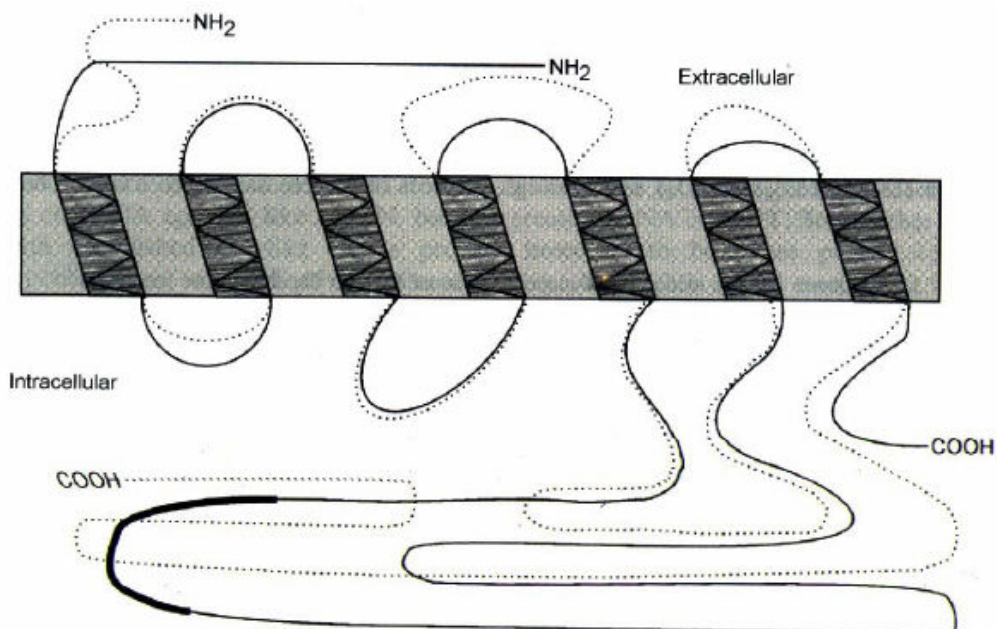
**Fonte:** Nature Reviews Neuroscience. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behavior. Laviolette, 2004.

#### 1.4.2. Receptores Dopaminérgicos

Classificados quanto à localização, propriedades bioquímicas e farmacológicas os receptores dopaminérgicos dividem-se em duas famílias: família  $D_1$ , na qual são incluídos  $D_1$  e  $D_5$ ; e família  $D_2$ , formada pelos tipos  $D_2$  (longo e curto),  $D_3$  e  $D_4$ . Suas ações biológicas se diferenciam, principalmente, pelo tipo de proteína G a qual estão acopladas nos domínios intracelulares (Webster, 2001). A família  $D_1$  está acoplada a proteína  $G_s$  e, portanto, estimula a adenil ciclase. A família  $D_2$  acopla-se a proteína  $G_i$ , inibindo a adenil ciclase (Cooper, 2003). A exceção é feita ao tipo  $D_3$  que parece não se acoplar à proteína G. Seu mecanismo de ação ainda não está bem determinado (Webster, 2001). Ao tipo  $D_2$ , atribuem-se outras ações fisiológicas

importantes. Pode atuar, diretamente, na abertura de canais de potássio (efeito hiperpolarizante) ou na inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes como autorreceptores que vão diminuir a síntese e liberação da DA pelo terminal sináptico (Cooper, 2003).

Quando se considera a estrutura primária dos receptores, há diferenças entre todos os subtipos, porém, 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>. 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 (Fig. 9). 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 (tabela 1) (Levesque et al., 1992). Esses fatos demonstram uma semelhança farmacológica entre os tipos de receptores de uma mesma família.



**Figura 9.** Topologia molecular das famílias de receptores D1 e D2. Linha pontilhada = D1. Linha contínua= D2.

A tabela 1 demonstra os respectivos agonistas e antagonistas para diversos sistemas de neurotransmissão s em diferentes subtipos de receptores.

Neurotransmissor	Subtipos dos Receptores	Agonistas Seletivos	Antagonistas Seletivos
GABA	GABA A	Muscimol Isoguvacina THIP	Bicuculina Picrotoxina SR 95531
	GABA B	Baclofen Ácido 3-Aminopropilfosfinico	2-hidroxi-s-Saclofen CGP 35348 CGP 55845 CPG 64213
Glicina	$\alpha$ e $\beta$	$\beta$ -Alamina; taurina	Estricnina
Glutamato	AMPA	Quisqualato	NBQX, LY215490
Aspartato	KA	Ácido Domóico	MK801; AP5; LY223053
	NMDA	-	$\alpha$ -Me-4-carboxifenilglicina
Acetilcolina	Nicotínico	-	$\alpha$ -Bungarotoxina Me-Licacnitina
	Muscarínico	-	M1: Pirenzepina M2: Metoctramina M3: Hexahidrosiladifenidol M4: Tropicamida
Dopamina	D 1-5	D1: SKF 38393 D2: Bromocriptina D3: 7-OH-DPAT	D1: SCH 23390 D2: Sulpirida;Espiperona

**Fonte:** Adaptado de GOODMAN & GILMANS The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman, 2001

### 1.4.3. Receptores D<sub>2</sub> e CPF

Os receptores do tipo D<sub>2</sub> estão presentes numa densidade pelo menos 20 vezes menor no CPF do que o receptor do tipo D<sub>1</sub> (Goldman-Rakic et al., 2000). Entretanto, apesar de se apresentar numa menor densidade, os receptores D<sub>2</sub> parecem contribuir para algumas funções do CPF, sendo demonstrado em alguns estudos um papel mediado pelo receptor do tipo D<sub>2</sub> no controle de aprendizagem motora relacionada a tarefas de reforço (Vincent et al., 1993; Wang e Pickel, 2002).

No CPF de primatas os receptores D<sub>2</sub> estão localizados em estruturas pré- e pós-sinápticas (espículas e dendritos) e em terminais axônicos tanto excitatórios quanto inibitórios. Estão localizados em interneurônios inibitórios gabaérgicos e células excitatórias piramidais glutamatérgicas, que por sua vez se projetam para o estriado, núcleo acumbente, ATV e outras (Steketee e Walsh, 2005).

A bromocriptina é um agonista de receptores do tipo D<sub>2</sub>, com alta afinidade pelos subtipos D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>. O quinpirole é um agonista com alta afinidade pelo receptor do tipo

D<sub>2</sub> e o 7-OH-DPAT é agonista de receptores do tipo D<sub>3</sub>. Dentre os antagonistas, destacam-se a racloprida e a sulpirida, com grande afinidade por D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> comparada a D<sub>4</sub>; e a clozapina (CZP) e o YM 43611, com alta afinidade por receptores do tipo D<sub>4</sub> (Webster, 2001).

### **1.5. Efeitos do etanol sobre o SNC**

O etanol (ETOH), ou mais popularmente conhecido por álcool, é um depressor do sistema nervoso central (SNC), apresentando um efeito ansiolítico assim como barbitúricos e benzodiazepínicos. Seu uso pode produzir uma extraordinária diversidade de efeitos comportamentais no homem e também em animais, incluindo desinibição comportamental, alterações de visão e equilíbrio, lentificação do tempo de reação, disforia e prejuízos evidentes sobre a aprendizagem e memória (Macieira, 1996; Adams et al., 1997; Fleming, et al, 2001).

O uso crônico está relacionado ao desenvolvimento de uma desordem denominada Alcoolismo ou Síndrome de Dependência ao Álcool (SAD), caracterizada pelo consumo repetido de etanol em quantidades progressivas acompanhado quase sempre de tolerância, dependência e avidez pelo álcool. Trata-se de uma doença na qual seu uso crônico leva à atrofia cerebral pela perda de substância branca e cinzenta (Kril e Halliday, 1999), os lobos frontais são particularmente mais sensíveis ao dano pelo álcool contribuindo assim para os déficits de função cognitiva e de discernimento observados em alcoolistas (Fleming, et al, 2001).

Existem várias teorias sobre os mecanismos de ação do ETOH no sistema nervoso central, sendo todas plausíveis, mas pouco fundamentadas. O ETOH age sobre a permeabilidade das membranas celulares e a maioria dos sistemas de neurotransmissão. O correto seria dizer que o ETOH exerce seu efeito depressor não apenas por um efeito isolado, mas pela junção de todas essas alterações.

A molécula do ETOH deve suas propriedades hidrofílicas ao seu grupamento hidroxila enquanto sua porção hidrocarboneto fornece algumas de suas propriedades lipofílicas (Tabakoff & Hoffman, 1992). Esta capacidade de solubilidade em água e lipídios é a propulsora maior da hipótese que atribuiu os efeitos do ETOH

no SNC a um mecanismo de ação envolvendo a perturbação da bicamada lipídica da membrana celular.

Várias evidências indicam que o ETOH age sobre o sistema do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), aparentemente através de um sítio alostérico. Sua ação parece modular o complexo-receptor GABA, potencializando o efeito hiperpolarizante do GABA (em baixas doses) ou atuando diretamente na abertura de canais de íon cloreto (em doses elevadas). Importantes dados bioquímicos, eletrofisiológicos e comportamentais sugerem o receptor GABA<sub>A</sub> como um importante alvo para as ações *in vivo* do etanol. Esta ação estaria implicada nos efeitos ansiolíticos e sedativo/hipnóticos do ETOH (Tabakoff & Hoffman, 1992; Macieira, 1996; Edwards et al., 1999).

O ETOH também parece inibir a ação do glutamato sobre os receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e Cainato através de prováveis sítios alostéricos (Weiner et al, 1999). A neurotransmissão glutamatérgica está envolvida em diversos processos cognitivos, com destaque para a formação e consolidação de novas memórias. De fato, estudos neuropsicofarmacológicos mostraram que os efeitos de prejuízo do álcool sobre a memória operacional foram revertidos com o uso da memantina um antagonista parcial de receptores NMDA no CPFm (Fiorin, 2007)

Além desses, o ETOH parece afetar vários outros sistemas de neurotransmissão. Existem, por exemplo, evidências que apontam para a modulação serotoninérgica sobre os efeitos do álcool. De fato, estudos eletrofisiológicos demonstram um aumento funcional do receptor 5-hidroxitriptamina (5-HT) do tipo 5-HT<sub>3</sub> induzido pelo etanol envolvido nos seus efeitos reforçadores (Lovinger, 1999). O sistema noradrenérgico parece envolvido com uma aparente diminuição de *turnover* de noradrenalina no cérebro. Há também evidências do envolvimento de receptores nicotínicos e outros tipos de canais iônicos nos efeitos do ETOH (Tabakoff & Hoffman, 1992; Fleming, et al, 2001). E, há também um importante envolvimento do sistema dopaminérgico nos efeitos do ETOH, que será abordado no ítem que se segue, juntamente com a implicação deste sistema na modulação da memória operacional no CPF.

## **1.6. Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico, Memória Operacional e o Álcool**

O sistema dopaminérgico tem recebido especial atenção devido ao seu papel no circuito de gratificação cerebral (Balfour et al., 1998). Experimentos utilizando o bloqueio da função dopaminérgica, por lesões com hidroxidopamina ou através de antagonistas dos receptores dopaminérgicos, demonstram que a DA está envolvida nos efeitos comportamentais que reforçam o uso de drogas (Di Chiara, 2000). Várias áreas cerebrais participam do controle destas ações, incluindo o CPF, o qual recebe aferências dopaminérgicas da área tegmentar ventral (ATV). Esta via, como vimos anteriormente, faz parte do circuito mesocorticolímbico, envolvendo ainda a amígdala e o núcleo accumbens (Peters et al., 2000; Abekawa et al., 2000). Muitas drogas que produzem dependência como os opiáceos, a nicotina, o etanol e a cocaína, aumentam a liberação de dopamina no núcleo accumbens e também no CPFm (Fadda et al., 1985).

As estruturas do circuito de recompensa cerebral, como o CPFm, o Nacc e a ATV parecem ser particularmente vulneráveis aos efeitos do ETOH (Tabakoff e Hoffman, 1992; Di Chiara, 1995), sendo levados a um estado de hiperdopaminergia (Fadda et al., 1985).

Como já mencionado, o CPF é o sítio anatômico para o processamento da memória operacional, e a via dopaminérgica mesolímbocortical apresenta grande importância em suas funções cognitivas, demonstrando que a DA exerce um papel crítico na modulação de suas funções inclusive da memória operacional (Solowij, 1998; Iversen, 2000). Portanto, o efeito de prejuízo da memória operacional produzido pelo ETOH poderia envolver diretamente a atividade da DA no CPF.

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram que o haloperidol, um antagonista DAérgico  $D_1/D_2$ , exacerbou os efeitos de prejuízo da memória operacional após testes com retardos de 1 hora produzido pelo ETOH quando administrado diretamente no CPFm (Oliveira e Nakamura-Palácios, 2003). A administração prévia de SCH 23390 e SKF 38393, antagonista e agonista DAérgico de receptores do tipo  $D_1$ , respectivamente, quando administrados diretamente no



CPFm reduziram significativamente os efeitos de prejuízos sobre a memória operacional produzidos pelo ETOH após retardo de 1 hora (Galvão, 2005) sugerindo uma participação do sistema DAérgico na modulação do prejuízo da memória operacional produzido pelo ETOH.

Tendo em vista os resultados encontrados em nosso laboratório citados no parágrafo anterior, foram levantadas algumas dúvidas sobre a ação dos receptores dopaminérgicos  $D_2$  na modulação da memória operacional e no efeito do prejuízo do etanol sobre esta. De posse desses resultados resolvemos investigar então a função dos receptores  $D_2$  no CPFm de roedores.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

- Investigar a modulação dopaminérgica, via receptores do tipo  $D_2$ , nos efeitos do etanol no córtex pré-frontal medial (CPFm) sobre a memória operacional de ratos.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos agudos de diferentes doses do antagonista seletivo de receptores  $D_2$ , Sulpirida, administrado IC sobre os efeitos de prejuízo de desempenho produzido pelo álcool IC em testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços.
- Investigar o efeito de repetidas doses (doses diárias) do antagonista seletivo  $D_2$ , sulpirida, administrado IC sobre os efeitos de prejuízo de desempenho produzido pelo álcool IC em testes e com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Animais

Foram utilizados 31 ratos Wistar machos com peso inicialmente variando entre 210 - 270g provenientes da colônia do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências da Saúde – UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em uma sala com temperatura controlada com ciclo claro-escuro natural de aproximadamente 12 horas. Tiveram livre acesso a água e acesso restrito à alimentação, sendo mantidos sob privação alimentar parcial, de modo a mantê-los com o peso corporal em aproximadamente 80 – 85% do seu peso inicial, sendo o mesmo ajustado ao crescimento.

### 3.2. Drogas

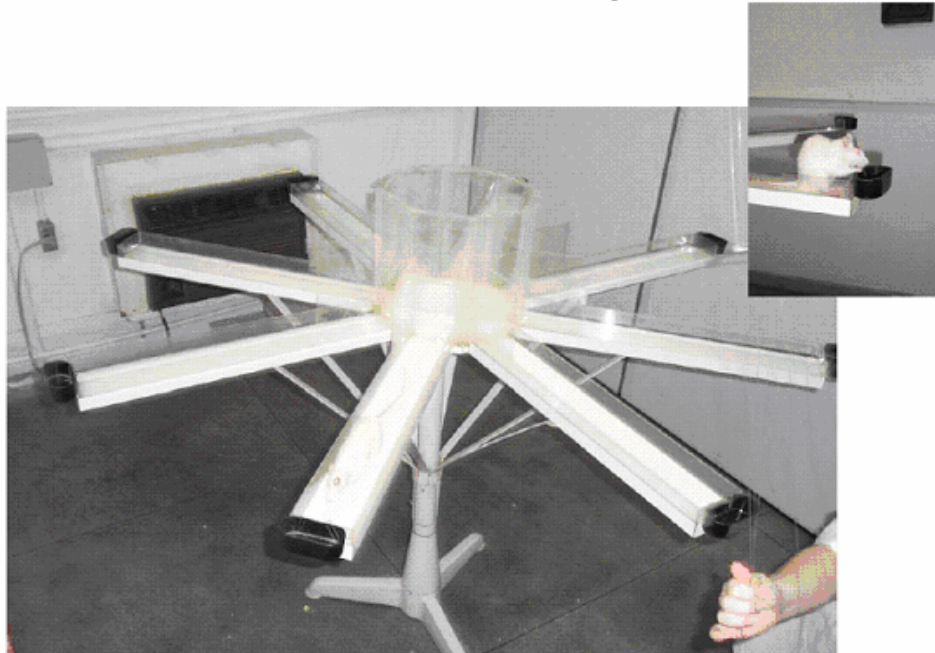
- **Sulpirida** ([±]-N-1-[Etilpirrolidina-2-ilmetil)-2-methoxi-5-sulfamoilbenzamida) (Sigma-Aldrich, Inc., SL, EUA), um antagonista seletivo de receptores do tipo D<sub>2</sub>, diluído em ácido clorídrico (HCl) 0,05 molar (M), nas concentrações de 0,64, 2,0 ou 6,4 mg/ml para administrações IC nas doses de 0,32, 1,0 ou 3,2 µg, respectivamente.
- **Álcool etílico (ETOH)**, absoluto pró-análise (Jand Química IND. COM. LTDA., São Paulo, SP, Brasil) diluído em água destilada, v/v, na concentração de 200 mg/ml para as administrações intracorticais (IC) na dose de 100 µg.
- **Solução fisiológica a 0,9% (SAL)**, solução controle para o ETOH.
- **HCl 0,05 M**, solução controle para a sulpirida.

Todas as soluções foram mantidas sob refrigeração a 4°C após as diluições.

### 3.3. Labirinto Radial de 8 Braços

Montado sobre uma armação de madeira compensada revestida de fórmica branca e sustentado por um suporte de metal a 100 cm do assoalho o LR-8 é construído em acrílico transparente, possuindo uma área central de base octogonal com 33 cm de diâmetro, de onde partem 8 braços simétricos e removíveis com 70 cm de comprimento, 10 cm de largura e paredes laterais de 4 cm de altura (Fig. 10). No final de cada braço estão fixados receptáculos de acrílico preto com 11 cm de comprimento, 5 cm de largura e 3 cm de profundidade para colocação do reforço (pedaços de amendoim). A plataforma central é constituída, em suas margens, de paredes de acrílico transparente de 30 cm de altura, nas quais encontram-se portas deslizantes em forma de guilhotina que permitem o acesso aos braços. As portas estão presas a fios de nylon que ficam sob o controle do examinador, o qual encontra-se à distância do labirinto para abertura e fechamento das mesmas. Placas de acrílico transparente com 20 cm de altura estão fixadas na entrada das portas para evitar que o animal atravesse de um braço a outro.

O labirinto radial de 8 braços



**Figura 10** – Fotografia do labirinto radial de 8 braços. No canto superior direito o animal encontra-se no final de um dos braços do labirinto para a obtenção do reforço (amendoim).

Neste estudo, a versão de labirinto radial utilizada para a avaliação de memória operacional foi a espacial. Por isso, no local onde se encontrava o labirinto foram colocados estímulos visuais distais fixos (figuras, armários, mesa, etc.) que favoreciam a orientação espacial do animal.

### **3.4. Aquisição da Tarefa**

Os animais foram submetidos a sessões de treinamento no LR-8 sob privação parcial de alimento como mencionado anteriormente, para possibilitar a aquisição das tarefas no decorrer dos treinos. Os pesos foram ajustados de acordo com o desempenho do animal nas seguintes fases para aquisição da tarefa:

**Fase I** – Os animais foram colocados no centro do labirinto com todas as portas abertas para exploração e adaptação no ambiente durante 10 minutos por dois dias consecutivos.

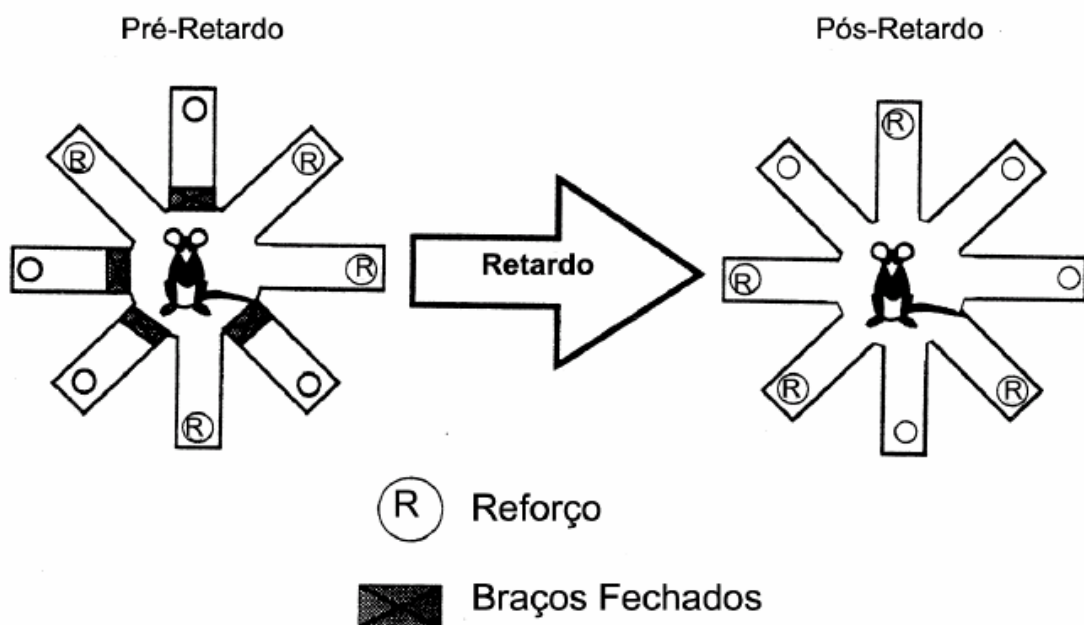
**Fase II** – Pedacos de amendoim (reforço) foram colocados nos receptáculos nos finais dos braços. Essa fase perdura até que o animal encontre o reforço nos receptáculos.

**Fase III** – Uma vez que o animal localizou o reforço, o mesmo foi colocado no centro do labirinto com todas as portas abertas. Após entrar em um dos braços, a porta que permitia o acesso àquele braço foi fechada e o animal colocado novamente no centro do labirinto com livre acesso aos outros braços. Esta fase termina quando o animal percorre todos os braços em até 10 minutos.

**Fase IV** – É a fase de aquisição da tarefa propriamente dita, onde o animal aprende a entrar em cada braço apenas uma vez. Todas as portas foram abertas a cada recolocação do animal no centro do labirinto. O mesmo deveria aprender a visitar cada um dos braços apenas uma única vez em cada sessão. Considerou-se erro de desempenho a repetição de um braço já visitado pelo animal. Os animais foram treinados até atingirem o critério de 0 a 1 erro por sessão, nas últimas 3 sessões de

treinamento. Foram requeridas 10 sessões, no mínimo, para possibilitar a análise da aprendizagem de cada animal.

**Fase V** – Nesta fase, ainda para aquisição da tarefa no labirinto radial, foi introduzido um intervalo de 5 segundos (período de retardo) entre o 4º e o 5º braços visitados (Fig. 11). Para este procedimento, 4 portas eram abertas aleatoriamente, permitindo a entrada do animal e o alcance do reforço ao final de cada braço. Denomina-se este período de **primeira corrida** ou **pré-retardo**. Após o intervalo de 5 segundos (**retardo**), durante o qual o animal permanecia em sua gaiola-casa, retornava-se com o mesmo novamente para o centro do labirinto onde lhe era permitido o acesso a todos os braços. O reforço encontrava-se apenas nos braços que ainda não tinham sido visitados pelo animal. Este período é denominado de **segunda corrida** ou **pós-retardo**. Os animais foram treinados até atingirem o critério de 0 a 1 erro por sessão no pré- e/ou no pós-retardo, por 3 sessões consecutivas, durante, no mínimo, 6 sessões de treinamento.



**Figura 11** - Ilustração da fase V do treinamento, com a interposição de retardo (5 s) entre o 4º e o 5º braços. R= reforço (pedaço de amendoim) No presente estudo os retardos de 5 segundos foram empregados apenas na aquisição da tarefa com retardo. Um retardo longo, como o de 1 hora foi empregado nas sessões de testes com drogas, procurando examinar uma memória operacional de longa duração.

**Fonte:** Modificado de J Neurosci, Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. Floresco, 1997.

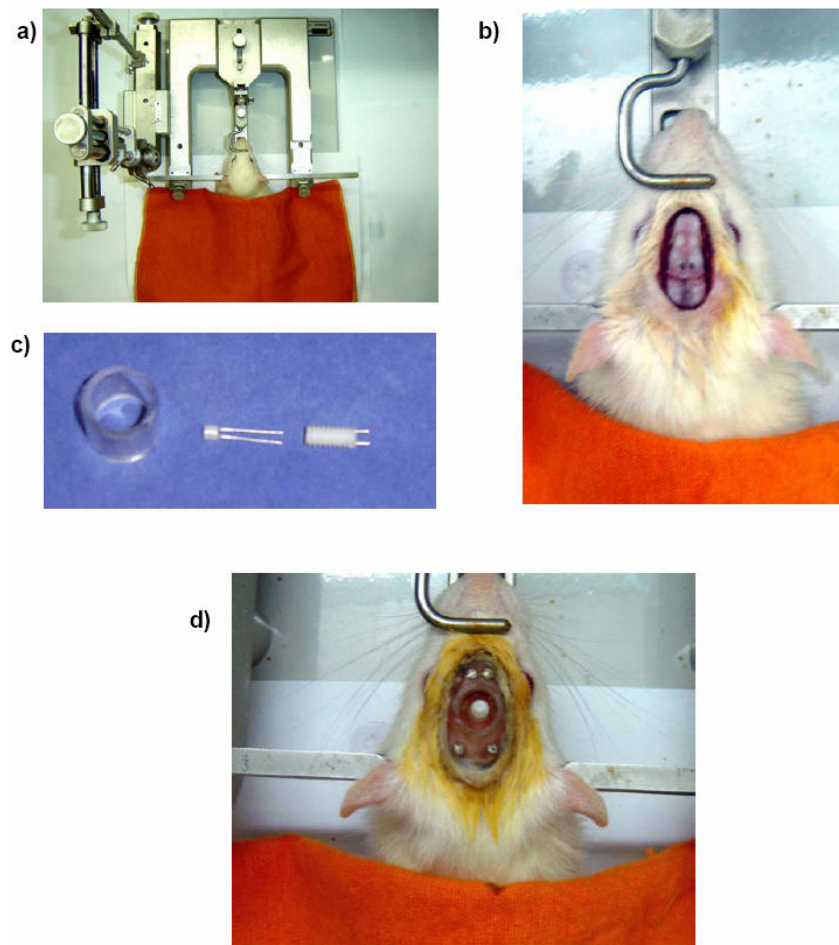
### 3.5. Cirurgia Estereotáxica

Uma vez atingido o critério de aprendizagem, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas bilaterais no córtex pré-frontal medial (CPFm).

Inicialmente os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (10%) por via intraperitoneal (400 mg/kg). Após a tricotomia da porção superior da cabeça os animais eram fixados no aparelho estereotáxico (Modelo 51600, Stoelting, USA). A seguir, realizava-se anestesia local subcutânea de 0,2 ml de lidocaína a 1% com epinefrina uma vez formado o botão anestésico, este era retirado expondo a calota craniana na altura do bregma. Após limpeza e secagem da área exposta, 4 orifícios eram feitos na superfície óssea (2 no osso frontal e 2 no osso parietal) com o auxílio de uma mini-furadeira (Dremel multipro + kit, Stoelting, IL, USA) para a fixação de 4 parafusos de metal, que serviam para a ancoragem da prótese cirúrgica. Em seguida, o crânio era posicionado de modo que bregma e lambda ficassem no plano horizontal e implantava-se cânulas bilaterais de 2 mm de comprimento (Plastics One, 26 GA, VA, USA) nas coordenadas + 2,5 mm AP, +/- 1 mm L e - 2,0 mm V em relação ao bregma de modo a se localizarem no CPFm. Após limpeza e secagem, o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica auto-polimerizável de secagem rápida (polímero de metilacrilato, JET, São Paulo, SP, Brasil) soldando as peças numa prótese sólida. Foram colocados pinos de proteção interna e externa nos orifícios das cânulas implantadas (Fig. 12).

Ao término da cirurgia os animais receberam 24000 UI (0,2ml) de penicilina G benzatina via intramuscular, permanecendo em uma câmara aquecida por uma lâmpada até se recuperarem da anestesia. A seguir eram transferidos para gaiolas individuais onde permaneceram até o final do protocolo experimental.

Após aproximadamente 3 dias de recuperação os animais voltaram às sessões diárias de treinamentos no labirinto radial de 8 braços para retorno à linha de base comportamental, ou seja, 0 a 1 erro por sessão, tanto no pré- como no pós-retardo, em 3 sessões consecutivas.



**Figura 12** - Cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas bilaterais no CPFm. a) Animal fixo no estereotáxico; b) região do Bregma, com marcação dos pontos (B: + 2,5 mm A e +/- 1 mm L); c) da esquerda para a direita: protetor externo, protetor interno e cânula bilateral; d) cânula bilateral implantada com trepanação de 4 pontos.

### 3.6. Administração Intracortical de Drogas

Em vista da realização anterior de curvas dose-efeito de administrações intracorticais, com diferentes doses de etanol, seguindo um padrão logarítmico de doses, foi possível verificar um efeito de prejuízo em um padrão de curva em U invertido, sendo a dose de 100  $\mu\text{g}$  a de efeito de prejuízo máximo do desempenho de testes com retardos, especialmente o de 1 hora, possibilitando sugerir o envolvimento do CPFm nos prejuízos do etanol sobre a memória operacional de longa duração (Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003; Galvão, 2005). Por esta razão no presente estudo foram escolhidos a dose de 100  $\mu\text{g}$  do etanol e a tarefa com



retardo de 1 hora no labirinto radial para a realização de todos os experimentos que serão descritos a seguir.

As administrações IC foram realizadas através de um injetor bilateral de 1,0 cm de comprimento acoplado a um sistema de infusão composto por 1 conector constituído de 2 cânulas de polietileno (PE 50), 2 seringas Hamilton de 10 µl (Stoeling 53431, CO, IL, EUA) e 1 bomba de infusão contínua (Stoeling CO., IL, EUA), na qual as seringas estavam fixadas. Para as micro-infusões das drogas, as extremidades do injetor bilateral deveriam atingir -2,7 mm V ao Bregma, desta forma, deveria estender-se em 0,7 mm das extremidades da cânula bilateral já implantada no CPFm, de modo a evitar o refluxo das drogas para o interior das cânulas e garantir que a droga difundisse no tecido neural.

O volume de administração das drogas foi de 0,5 µl em cada lado do CPFm, infundidos durante 90 segundos, permanecendo o animal conectado ao sistema de infusão por mais 90 segundos para melhor difusão da droga.

A avaliação dos animais no LR-8 ocorreu da seguinte forma: após os 5 minutos da administração IC o animal era submetido à primeira corrida ou pré-retardo com a abertura aleatória de 4 portas. Ao terminar esta fase, o animal era recolocado em sua gaiola-casa, onde permanecia durante 1 hora. Após este retardo, era devolvido ao centro do LR-8 com as 8 portas abertas para a avaliação da memória operacional. Os braços visitados, os erros e o tempo gasto no pré- e pós-retardo de 1 h foram anotados para posterior análise.

### **3.7. Experimentos**

#### **3.7.1. Experimento I - Efeitos da Combinação Aguda do Antagonista D<sub>2</sub> Seletivo Sulpirida e Etanol sobre a Memória Operacional Espacial de Ratos**

Durante o protocolo de administração aguda foram utilizados 11 animais (n = 11). Os animais foram submetidos a 8 combinações de drogas de forma semi-aleatória para realização da curva dose-efeito. Para que não houvesse um único seqüenciamento

de combinações, foi empregado um *contrabalanceamento parcial* determinado por método de *quadrado latino padrão incompleto*, possibilitando, desta forma, que cada animal fosse submetido a uma ordem individual de combinações no decorrer do experimento (Mackenzie, 2002). Este procedimento também foi empregado para compensar as possíveis interferências entre as combinações e minimizar o efeito de aprendizagem dos animais no decorrer do procedimento com retardos de 1 h.

Os ratos receberam as infusões intracorticais (IC) contendo as drogas diretamente na região do CPFm, sendo submetidos a uma única sessão de administração de drogas por semana, escolhidos, de preferência, o mesmo horário e dia da semana. Como mencionado anteriormente, os efeitos das drogas foram examinadas em testes com retardos de 1 h. Nos intervalos entre as administrações de drogas, era sempre realizada uma sessão inter-droga com retardo de 5 s para verificar se havia algum efeito residual da droga sobre o desempenho do animal, e também para manter a linha de base comportamental. Só estariam aptos a uma nova administração de drogas aqueles que mantivessem o critério de 0 a 1 erro por sessão na sessão inter-droga.

Sendo assim, os animais previamente treinados no LR-8, já com cânulas bilaterais implantadas no CPFm, receberam administrações agudas de Sulpirida (0,32 µg; 1 µg; 3,2 µg) ou HCl 0,05M seguidas, 10 minutos depois, de ETOH na dose de 100 µg ou SAL. Cinco minutos após a última administração, os animais foram submetidos a testes com retardos de 1 h no labirinto radial.

### **3.7.2. Experimento II - Efeitos das Administrações repetidas do Antagonista D<sub>2</sub> Seletivo, Sulpirida, sobre os Efeitos do Etanol sobre a Memória Operacional Espacial de Ratos**

Neste protocolo, os animais receberam infusões intracorticais (IC) de sulpirida 1 µg ou HCl 0,05 M diretamente no CPFm uma vez por dia durante quatro dias consecutivos. Após a última administração, os animais receberam administrações IC agudas (desafios) de SAL ou ETOH 100 µg no terceiro dia e a seguir a intervalos de 4 dias (dias sete, onze e quinze).

Durante o período de administração de sulpirida ou HCl 0,05 M os animais apenas recebiam a infusão das drogas IC e logo após eram devolvidos a sua gaiola. Nos desafios agudos, após a administração IC de SAL ou ETOH, eram esperados 5 minutos e os animais eram levados ao LR-8 para realizarem o pré-retardo e após 1 h o pós-retardo. Os erros e o tempo gasto no pré- e pós-retardo de 1 h foram anotados para posterior análise.

Para este protocolo de administrações repetidas do antagonista D<sub>2</sub> foram utilizados 22 animais (n= 22), divididos em quatro grupos independentes:

**Grupo I – HCl/SAL (n = 5):**

- Os animais receberam administração IC de HCl 0,05 M durante 4 dias e no decorrer do 3º, 7º, 11º e 15º dias recebeu desafios IC de SAL. Neste grupo foi realizado um desafio com ETOH 100 µg no 16º dia com a intenção de se verificar a ocorrência de aprendizagem dos testes com retardo de uma hora durante as administrações.

**Grupo II – HCl/ETOH (n = 6):**

- Os animais receberam administração IC de HCl 0,05 M durante 4 dias e no decorrer do 3º, 7º, 11º e 15º dias desafios IC de ETOH 100 µg.

**Grupo III – Sulpirida/SAL (n= 5):**

- Os animais receberam administração IC de Sulpirida 1µg durante 4 dias e no decorrer do 3º, 7º, 11º e 15º dias desafios IC de SAL. Neste grupo foi realizado um desafio com ETOH 100 µg no 16º dia também com a intenção de se verificar a ocorrência de aprendizagem dos testes com retardo de uma hora durante as administrações.

**Grupo IV – Sulpirida/ETOH (n= 6):**

- Os animais receberam administração IC de Sulpirida 1 µg durante 4 dias e no decorrer do 3º, 7º, 11º e 15º dias desafios IC de ETOH 100µg.

A dose escolhida da sulpirida de 1 µg para este protocolo baseou-se nos resultados do experimento anterior (Experimento I) de administrações agudas, no qual foi

observado que esta foi uma das doses do antagonista D<sub>2</sub> que reduziu significativamente o efeito de prejuízo do álcool sobre a memória operacional.

### **3.8. Histologia**

Após completarem o protocolo de drogas, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% IP e submetidos à administração IC de azul de metileno a 1% (Biotec, PR, Brasil) no CPFm, semelhante à administração das drogas. Em seguida, receberam uma dose mais elevada do anestésico para a perfusão intracardíaca com solução salina e, posteriormente, solução de formaldeído a 8%.

Os encéfalos foram retirados e conservados em solução de formaldeído a 8%, por, no mínimo, 48 horas. Os mesmos foram seccionados em cortes de aproximadamente 80-100 µm de espessura em um vibrátomo (Série 1000 Plus – sistema de secção tecidual – St. Louis, MO, EUA). As lâminas obtidas foram coradas com vermelho neutro e a localização das cânulas foi feita através da visualização em um microscópio óptico assinalada em diagramas do Atlas de Paxinos & Watson (1986).

### **3.9. Análise dos Resultados**

Os pesos corporais, o número de erros cometidos e o tempo gasto em cada braço foram analisados durante o treinamento e o protocolo de administração IC. A análise do número de erros cometidos foi realizada através da entrada do animal em braços já visitados numa mesma sessão de treinamento, enquanto a análise de tempo gasto em cada braço foi avaliada pela relação entre o tempo total de permanência no labirinto (em segundos) e o número de braços visitados naquela sessão.

Os pesos (gramas), os dados de desempenho (erros) e os de tempo de permanência nos braços (em segundos) foram representados pela média ± erro padrão da média (e.p.m.).

Na fase de aquisição das tarefas no labirinto radial, todos os animais foram submetidos a uma ordem crescente de sessões de treinamento tanto na fase IV (10 sessões) quanto na fase V (6 sessões). Desta forma, para as análises da aprendizagem e do tempo gasto nestas fases foram empregadas análises de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas seguidas de teste de Fisher para localização das diferenças estatisticamente significantes. Como análise complementar, também foram empregadas análises de regressão linear, considerando todos os dados coletados, complementados pela análise de variância da curva.

Para análise dos resultados coletados no Experimento I, foi empregada ANOVA de uma via para medidas repetidas seguidas do teste de Fisher para comparações múltiplas e determinação das diferenças estatisticamente significantes, considerando que a maior parte dos animais (amostra dependente) foram submetidos às diferentes combinações (um fator), ainda que fosse dado um intervalo de 7 dias entre as administrações e que a ordem das combinações tivesse sido determinada por um quadrado latino.

Para análise entre os diferentes grupos experimentais (entre-grupos) dos resultados coletados no Experimento II foi empregado ANOVA de uma via para amostras independentes seguida do teste de Fisher para comparações múltiplas e determinação das diferenças estatisticamente significantes. Para a análise intra-grupo, ou seja, entre os desafios (administrações) agudos realizados no 3º, 7º, 11º e 15º dias em um mesmo grupo, foi realizado ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do teste de Fisher para comparações múltiplas e determinação das diferenças estatisticamente significantes.

Na comparação das administrações de ETOH IC feitas em duas amostras no 16º dia foi empregado um teste *t* de student para amostras independentes.

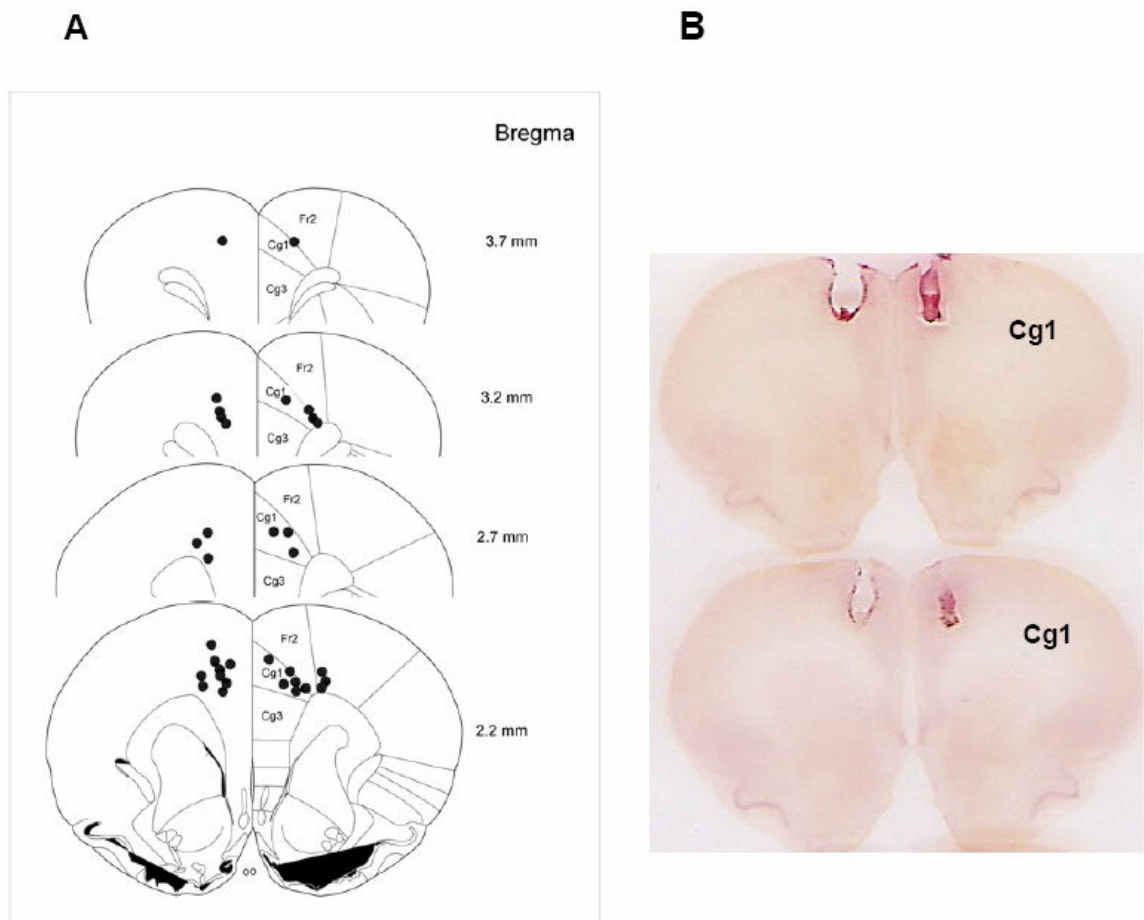
Para todas as análises estatísticas foi empregado um nível mínimo de significância com o P valor < 0,05 (Motulsky, 1995).

Foram utilizados os programas GB Stat versão 6.5 e GraphPad Prism versão 4.0 para as análises estatísticas e representação gráfica.

## 4. Resultados

### 4.1. Localização das cânulas

Os sítios cerebrais 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 na figura 13.



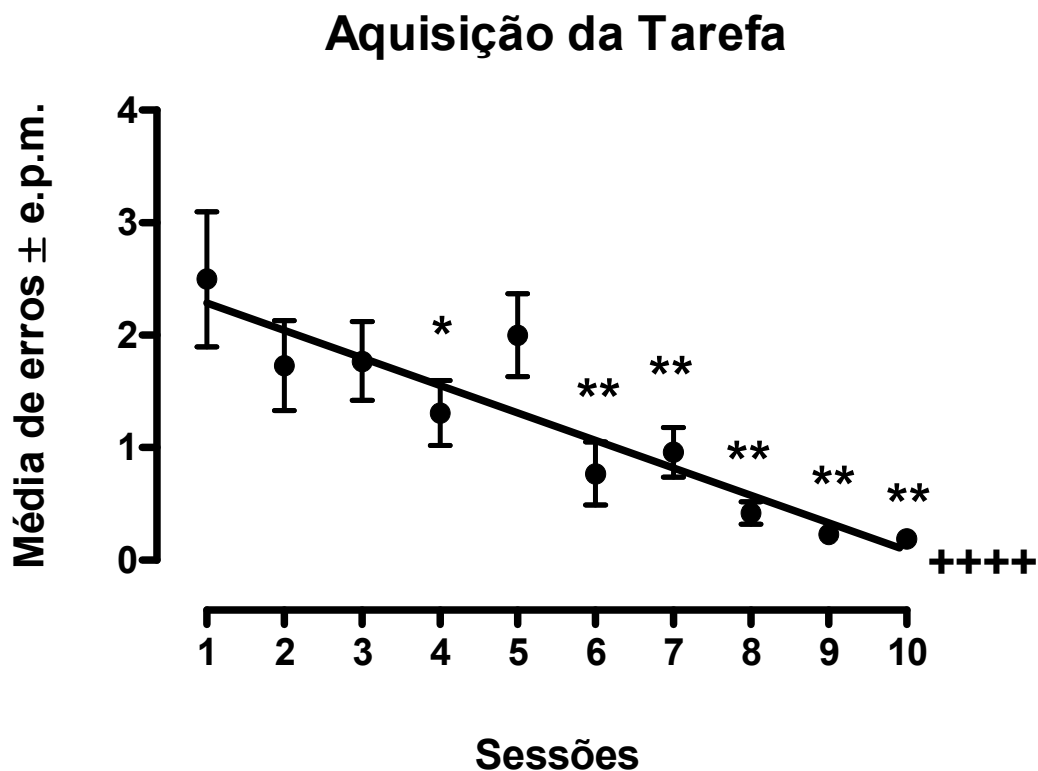
**Figura 13** – Cortes coronais do cérebro de rato.

- A** - Nota-se que as cânulas localizaram-se predominantemente na área Cg1 do cíngulo anterior, que constitui parte importante do CPFm em roedores.
- B** - Fotografia das fatias cerebrais coradas em vermelho neutro ilustrando as localizações bilaterais das cânulas destacadas pelo azul de metileno.

## 4.2. Aquisição da tarefa

### 4.2.1. Fase IV - sem Período de Retardo:

A fase IV é a fase de aquisição da tarefa propriamente dita, onde o animal aprende a entrar em cada braço apenas uma vez. Todos os animais ( $n = 31$ ) apresentaram melhora gradativa do desempenho no decorrer das últimas 10 sessões de treinamento. A análise de regressão linear demonstrou uma diminuição progressiva do número de erros até a última sessão, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem [ $Y = 2,53 - 0,24 X$ ;  $r = -0,85$ ;  $F(1,8) = 47,3$ ;  $P = 0,0001$ ] (Fig.14). A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do número de erros entre as sessões de treinamento [ $F(9,171) = 5,46$ ;  $P < 0,0001$ ]. O teste de Fisher detectou diferença na sessão 4 ( $P < 0,05$ ) e nas sessões 6, 7, 8, 9 e 10 ( $P < 0,01$ ) quando comparadas à primeira sessão.



**Figura 14.** Média de erros  $\pm$  e.p.m. dos animais ( $n = 31$ ) nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV no labirinto radial. +++++  $P = 0,0001$  (Análise de Regressão Linear). \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  quando comparada à primeira sessão (Teste de Fisher).

No tempo gasto em cada braço visitado na fase de aquisição da tarefa, a ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre as sessões de treinamento [ $F(9,180) = 2,87$ ;  $P = 0,0034$ ]. O teste de Fisher detectou diferença no tempo gasto nas sessões 3, 4 e 5 ( $P < 0,05$ ) e nas sessões 6, 7, 8, 9 e 10 ( $P < 0,01$ ) quando comparadas à primeira sessão (Tab. 2).

**Tabela 2.** Média do tempo gasto (segundos)  $\pm$  e.p.m. em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento da fase IV ( $n = 31$ ). \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  quando comparada com a primeira sessão.

<b>Tempo gasto em cada braço</b>			
<b>Sessões</b>	<b>Média <math>\pm</math> e.p.m</b>	<b>Sessões</b>	<b>Média <math>\pm</math> e.p.m</b>
1	16,05 $\pm$ 2,85	6	13,68 $\pm$ 0,64**
2	14,55 $\pm$ 1,32	7	12,93 $\pm$ 0,80**
3	15,26 $\pm$ 1,59*	8	12,90 $\pm$ 0,64**
4	13,73 $\pm$ 1,07*	9	12,18 $\pm$ 0,61**
5	13,85 $\pm$ 0,99*	10	11,95 $\pm$ 0,63**

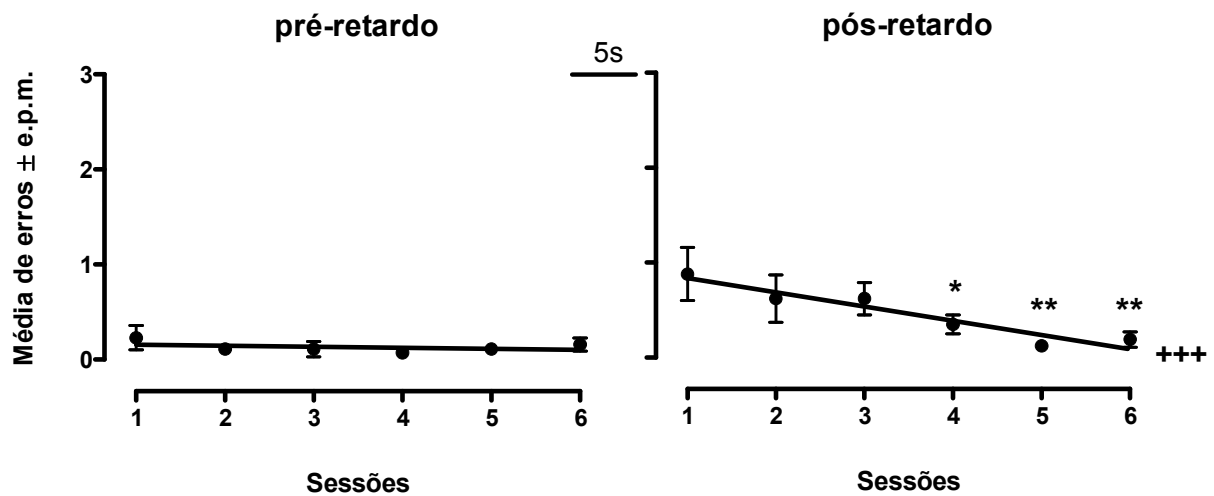
#### 4.2.2. Fase V - Com Retardo de 5 s:

Esta é a última etapa da aquisição da tarefa. Os animais também devem atingir um bom desempenho (0 a 1 erro) nas últimas 3 sessões de treinamento, tanto no pré-retardo quanto no pós-retardo, no mínimo em 6 sessões, como pré-requisito para o aprendizado na fase V.

A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do número de erros no pós-retardo no decorrer das últimas 6 sessões [ $Y = 0,98 - 0,15 X$ ;  $r = 0,90$ ;  $F(1,4) = 40$ ;  $P = 0,0032$ ] (Fig.15 à direita). A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes no número de erros entre as sessões de treinamento no pós-retardo [ $F(5,125) = 2,91$ ;  $P = 0,016$ ]. O teste de Fisher detectou diferença no número de erros na sessão 4 ( $P < 0,05$ ) e nas sessões 5 e 6 ( $P < 0,01$ ) quando comparadas à primeira sessão (Fig.15 à direita). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as 6 sessões no desempenho do pré-retardo (Fig. 15 à esquerda).



## Retardos de 5 s



**Figura 15.** Média de erros  $\pm$  e.p.m. dos animais ( $n = 31$ ) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 5 s nas sessões de treinamento da fase V para aquisição das tarefas no labirinto radial de 8-braços. +++  $P = 0,0032$  (Análise de Regressão Linear). \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  quando comparada a primeira sessão (Teste de Fisher).

Não houve diferenças estatisticamente significantes no tempo gasto em cada braço no decorrer das 6 sessões de treinamento que antecederam a cirurgia estereotáxica (Tab. 3).

**Tabela 3.** Média do tempo gasto (segundos)  $\pm$  e.p.m. pelos animais ( $n = 31$ ) em cada braço visitado no pré- e pós-retardo de 5 s no decorrer das últimas 6 sessões de treinamento na fase V.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos $\pm$ e.p.m)		
Sessões	Pré-Retardo	Pós-Retardo
1	11.75 $\pm$ 0.92	11.00 $\pm$ 0.75
2	11.50 $\pm$ 1.08	10.75 $\pm$ 0.85
3	11.38 $\pm$ 1.12	10.78 $\pm$ 0.81
4	11.88 $\pm$ 1.07	11.25 $\pm$ 0.79
5	12.50 $\pm$ 1.02	10.38 $\pm$ 0.68
6	11.88 $\pm$ 0.58	11.23 $\pm$ 0.96

### **4.3. Pesos corporais durante as fases de treinamento**

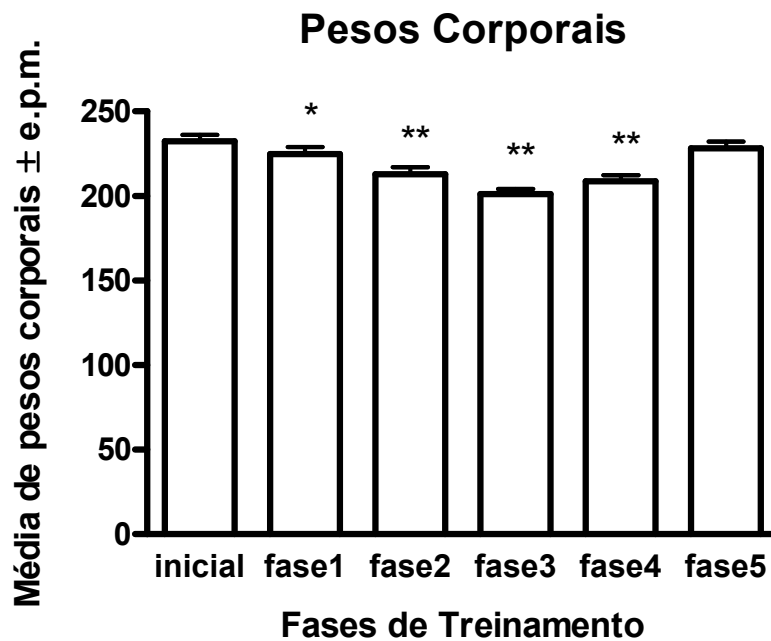
Antes do início do treinamento, a medida dos pesos corporais foi realizada para obtenção do peso inicial de cada animal. Os animais foram pesados semanalmente ao longo de todo o protocolo experimental, com o objetivo de que os mesmos mantivessem um peso corporal mínimo entre 80 e 85 % do peso inicial.

Os animais foram mantidos abaixo do peso inicial nas fases de I a IV, especialmente na fase III, imediatamente anterior ao processo de aprendizagem propriamente dita, quando a privação de alimentos é intensificada, pois o grau de motivação é crucial para que a mesma ocorra satisfatoriamente. Uma vez adquirido o desempenho de uma única entrada em cada braço em cada sessão, a privação era diminuída e os animais voltavam a adquirir peso de acordo com a idade.

Este aumento progressivo dos pesos corporais, ainda que sob privação parcial de alimento, é esperado, e mesmo desejado, de acordo com a curva de crescimento dos animais.

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação dos pesos corporais entre as fases de treinamento [ $F(5,125)= 35,6$ ;  $P < 0,0001$ ]. O teste de Fisher demonstrou que a perda de peso ocorrida na fase I ( $P < 0,05$ ) e fases II, III, IV ( $P < 0,01$ ) foram estatisticamente significantes em relação ao peso inicial (Fig.16).

Na última fase do treinamento (fase V), os animais eram retirados da privação e ganhavam peso no decorrer das sessões para serem submetidos à cirurgia estereotáxica sem riscos adicionais.



**Figura 16.** Média dos pesos corporais (g) ± e.p.m. antes do início do treinamento (peso inicial) e nas 5 fases de treinamento que antecedem a cirurgia estereotáxica. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  comparado ao peso inicial (Teste de Fisher).

## 4.4. Experimentos

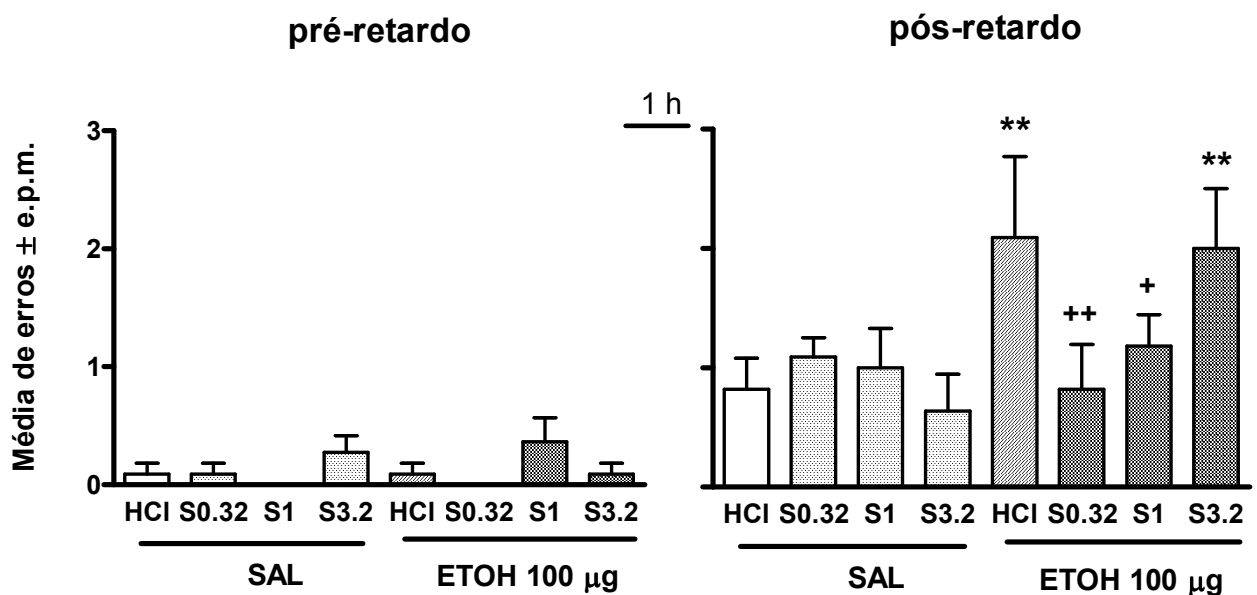
### 4.4.1. Experimento I - Efeitos da Combinação Aguda do Antagonista $D_2$ Seletivo Sulpirida e Etanol sobre a Memória Operacional Espacial de Ratos

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre as combinações [ $F(7,91) = 4,75$ ;  $P = 0,0001$ ] no desempenho do pós-retardo de 1 h (Fig.17, à direita). O Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que a administração IC aguda das combinações de HCl 0,05 M e ETOH 100  $\mu\text{g}$  e de Sulpirida 3,2  $\mu\text{g}$  e ETOH 100  $\mu\text{g}$  apresentaram significativamente ( $P < 0,01$ ) maior número de erros após o retardo de 1 hora comparada ao tratamento controle (HCl 0,05 M e SAL) (Fig. 17, à direita).

A combinação de Sulpirida 0,32  $\mu\text{g}$  e ETOH 100  $\mu\text{g}$  e de Sulpirida 1  $\mu\text{g}$  e ETOH 100  $\mu\text{g}$ , apresentaram significativamente ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente) menor

número de erros após o retardo de 1 hora quando comparados aos tratamentos de HCl 0,05 M e ETOH 100 µg e de Sulpirida 3,2 µg e ETOH 100 µg (Fig. 17, à direita).

Observe-se que as doses de Sulpirida (0,32, 1, 3,2 µg) combinadas à SAL não apresentaram efeito “per se” sobre o desempenho dos testes com retardos de 1 h, quando comparados ao controle HCl 0,05 M e SAL, tanto no pré- (Fig. 17, à esquerda) quanto no pós-retardo (Fig. 17, à direita).



**Figura 17.** Efeitos das combinações de Sulpirida (0,32, 1, 3,2µg) ou ácido clorídrico 0,05 M (HCl) com o etanol (ETOH) 100 µg ou SAL, ambos administrados no córtex pré-frontal medial, sobre o desempenho antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços (n = 11). \*\* P < 0,01 comparado ao tratamento controle de HCl e SAL. + P < 0,05 comparado à combinação de HCl e ETOH 100 µg e de Sulpirida 3,2 µg e ETOH 100 µg, e, ++ P < 0,01 comparado à combinação de HCl e ETOH 100 µg e de Sulpirida 3,2 µg e ETOH 100 µg (ANOVA de 1 via para medidas repetidas seguida do Teste de Fisher ).

Note-se que não houve diferenças estatisticamente significantes no desempenho antes dos retardos (pré-retardo) na comparação entre as combinações de drogas (Fig. 17, à esquerda).

O tempo gasto em cada braço antes e após o retardo de 1 hora durante as administrações está representado na Tabela 4. A ANOVA de 1 via para medidas

repetidas não identificou diferenças estatisticamente significantes entre o tempo em cada tratamento tanto no pré- quanto no pós-retardo de 1 h.

**Tabela 4.** Média do tempo gasto (segundos)  $\pm$  e.p.m. em cada braço visitado pelos animais antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços sob o tratamento combinado do antagonista seletivo de receptores  $D_2$ , Sulpirida (Sulp) nas doses de 0,32, 1 e 3,2  $\mu$ g, e Etanol 100 $\mu$ g (ETOH), ambos administrados no córtex pré-frontal medial (n = 11).

<b>Tempo gasto em cada braço (média em segundos <math>\pm</math> e.p.m)</b>		
<b>Combinações</b>	<b>Pré-Retardo</b>	<b>Pós-Retardo</b>
HCl e SAL	11.80 $\pm$ 3.28	11.60 $\pm$ 2.85
Sulp 0,32 e SAL	13.50 $\pm$ 1.68	11.60 $\pm$ 1.28
Sulp 1 e SAL	10.50 $\pm$ 1.76	10.60 $\pm$ 0.42
Sulp 3,2 e SAL	10,00 $\pm$ 0.90	11.75 $\pm$ 0.77
HCl e ETOH	12.50 $\pm$ 1.42	12.54 $\pm$ 2.63
Sulp 0,32 e ETOH	13.00 $\pm$ 1.80	11.75 $\pm$ 1.38
Sulp 1 e ETOH	12.50 $\pm$ 1.45	12.60 $\pm$ 1.36
Sulp 3,2 e ETOH	11.25 $\pm$ 1.22	12.20 $\pm$ 0.64

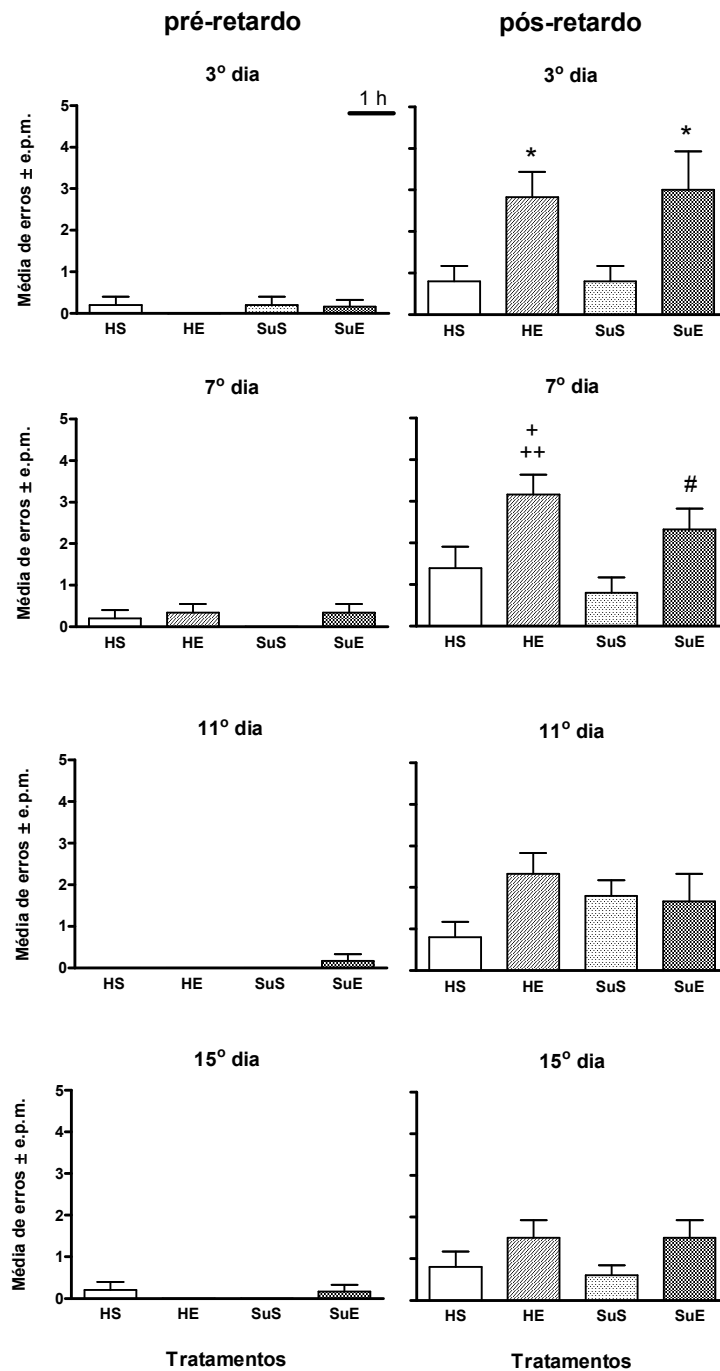
#### **4.4.2. Experimento II - Efeitos das Administrações repetidas do Antagonista $D_2$ Seletivo, Sulpirida, sobre os Efeitos do Etanol sobre a Memória Operacional Espacial de Ratos**

##### 4.4.2.1. Análise Entre-Grupos

Não houve diferenças no desempenho do pré-retardo em nenhuma das comparações entre os grupos HCl/SAL, HCl/ETOH, Sulpirida/SAL e Sulpirida/ETOH no 3º, 7º, 11º ou 15º dia após a última administração intracortical crônica da Sulpirida (Fig. 18, à esquerda).

A ANOVA de 1 via para amostras independentes (entre-grupos) detectou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no 3º dia [ $F(3,18) = 3,46$ ;  $P = 0,038$ ]. O Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que as administrações agudas de ETOH 100  $\mu$ g após administrações crônicas de HCl ou Sulpirida 1  $\mu$ g produziram significativamente ( $P < 0,05$ ) maior número de erros após o retardo de 1

hora comparada ao tratamento com salina nos grupos controles HCl/SAL e Sulpirida/SAL (Fig. 18, à direita).



**Figura 18.** Efeitos de administrações intracorticais (no córtex pré-frontal medial) agudas de etanol 100 µg (E) ou salina (S) no 3º, 7º, 11º e 15º dia após administrações intracorticais crônicas (4 dias consecutivos) de sulpirida 1 µg (Su) ou HCl 0,05 M (H), sobre o desempenho antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-brços. HS (n = 5), HE (n = 6), SuS (n = 5), SuE (n = 6). \* P < 0,05 comparado a HS e SuS (3º dia), + P < 0,05 comparado à HS, ++ P < 0,01 comparado à SuS, e, # P < 0,05 comparado à SuS (7º dia).

No 7º dia a ANOVA de 1 via para amostras independentes (entre-grupos) detectou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [ $F(3,18) = 4,72$ ;  $P = 0,012$ ]. O Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que os animais que receberam uma administração aguda de ETOH 100 µg após administração crônica de HCl apresentaram significativamente maior número de erros após o retardo de 1 hora quando comparado aos animais dos grupos controles HCl/SAL ( $P < 0,05$ ) e Sulpirida/SAL ( $P < 0,01$ ). Ainda no 7º dia o Teste de Fisher para múltiplas comparações demonstrou que a administração aguda de ETOH 100 µg após administração crônica de sulpirida produziu significativamente maior número de erros após o retardo de 1 hora quando comparado ao tratamento com salina no grupo Sulpirida/SAL ( $P < 0,05$ ) (Fig. 18, à direita).

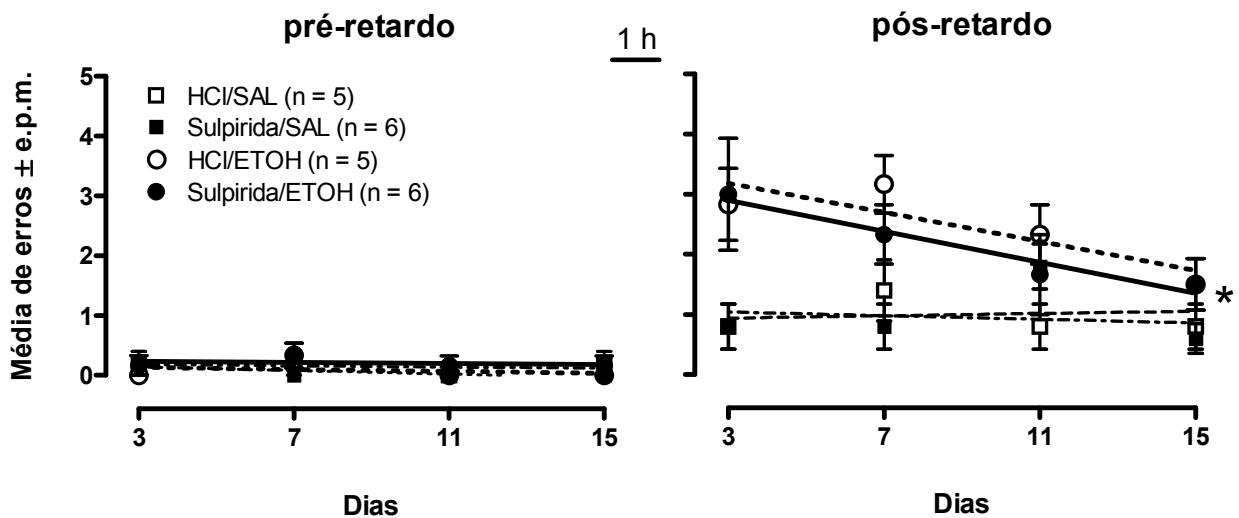
Observe-se que no 11º dia a administração aguda de ETOH 100 µg produziu um discreto aumento do número de erros no desempenho após o retardo de 1 hora comparado ao tratamento com salina principalmente no grupo tratado cronicamente com HCl (Fig.18, à direita), porém não sendo de forma estatisticamente significativa. A redução do efeito de prejuízo do ETOH 100 µg ficou ainda mais evidente no 15º dia, não havendo diferenças estatisticamente significantes nas comparações entre os grupos (Fig. 18, à direita).

Após caracterizada a redução do número de erros no decorrer do experimento, mais visível no grupo que recebeu administrações agudas de etanol, achamos necessário realizar uma análise intra-grupo, onde poderíamos analisar se a redução observada acima se deveria a uma diminuição do efeito da droga utilizada ou se deveria à alguma ocorrência de aprendizagem da tarefa com retardo de 1 hora.

#### 4.4.2.2. Análise Intra-Grupo

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas quando se realizou a análise intra-grupo, ou seja, entre as administrações agudas realizadas no 3º, 7º, 11º e 15º dias após administrações crônicas de HCl ou sulpirida em um mesmo grupo, não detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho do pré- ou pós-retardos (Fig.19).

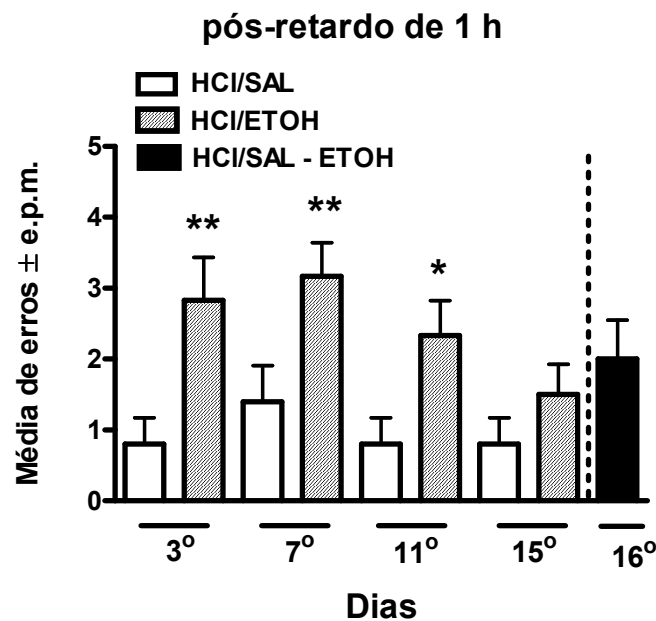
Entretanto, as análises de regressão linear do desempenho do pós-retardo de 1 h demonstraram que a redução do número de erros apresentados pelos animais que receberam administrações IC agudas de ETOH 100  $\mu\text{g}$  foi estatisticamente significativa, especialmente para o grupo tratado previamente com a sulpirida IC crônica ( $Y = 3,27 - 0,127 X$ ;  $r = -0,95$ ;  $F(1,2) = 38,83$ ;  $P = 0,02$ ) (Fig. 19, à direita).



**Figura 19.** Efeitos das administrações agudas de etanol 100  $\mu\text{g}$  (ETOH) ou salina (SAL) no córtex pré-frontal medial no 3º, 7º, 11º e 15º dia após administrações crônicas (4 dias consecutivos) de Sulpirida 1  $\mu\text{g}$  ou ácido clorídrico 0,05 M (HCl), sobre o desempenho antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços. \*  $P = 0,02$  para o grupo Sulpirida/ETOH (Análise de Regressão Linear).

Uma vez que houve redução progressiva dos erros cometidos pelos animais sob a administração IC aguda de ETOH 100  $\mu\text{g}$  nos testes com retardos de 1 hora, particularmente no grupo de animais que foi tratado cronicamente com a sulpirida, uma questão que surgiu foi se teria ocorrido uma aprendizagem da tarefa com este retardo ou se teria ocorrido uma redução do efeito intracortical do ETOH. Desta forma, foi realizada uma administração aguda de ETOH 100  $\mu\text{g}$  nos animais que pertenciam ao grupo controle HCl/SAL, cujo resultado no desempenho do pós-retardo de 1 hora, contrastando com os dados obtidos neste mesmo grupo (HCl/SAL) e no grupo HCl/ETOH no 3º, 7º, 11º e 15º dias após administração crônica de HCl 0,05 M, pode ser observado na figura 20.





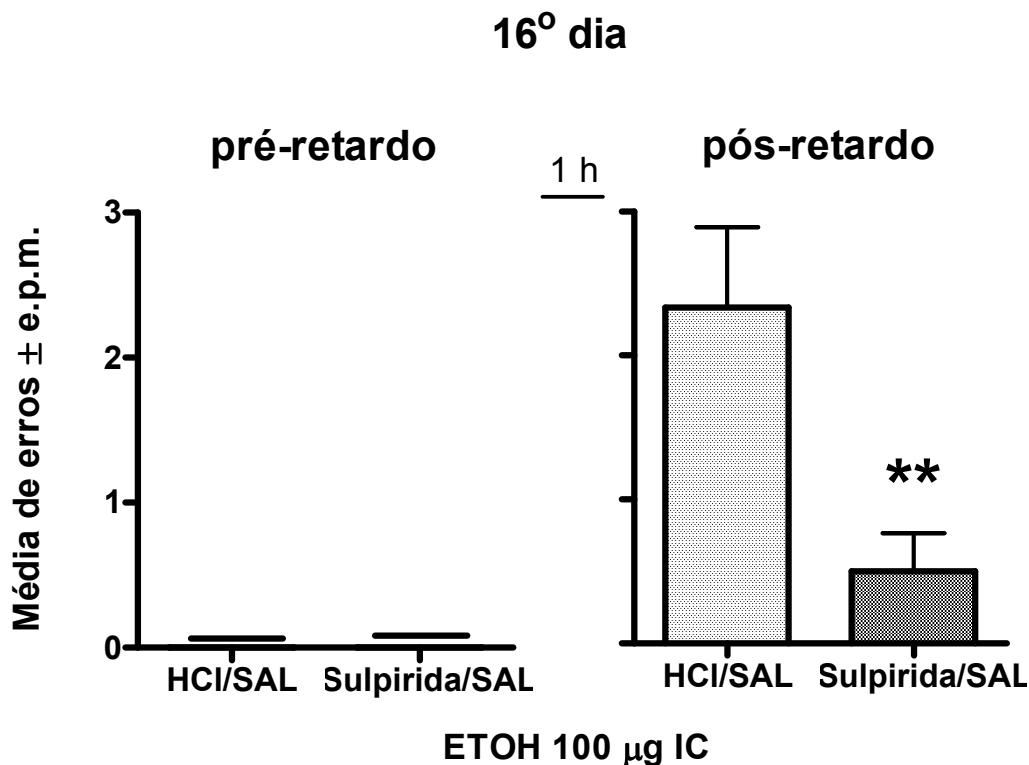
**Figura 20.** Efeitos das administrações agudas de etanol 100  $\mu$ g (ETOH) ou salina (SAL) no córtex pré-frontal medial no 3°, 7°, 11°, 15° e 16° dia após administração crônica (4 dias consecutivos) do ácido clorídrico 0,05 M (HCl), sobre o desempenho após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  comparado ao grupo HCl/SAL. Note-se que o ETOH foi administrado no grupo HCl/SAL no 16° dia após administração crônica de HCl.

Sendo realizada uma ANOVA de uma via para medidas repetidas comparando os dados obtidos sob a administração IC aguda de ETOH 100  $\mu$ g ou SAL no desempenho após os retardos de 1 hora no 3°, 7°, 11° e 15° dias após o tratamento crônico com HCl 0,05 M nos grupos HCl/SAL e HCl/ETOH, incluindo-se os dados obtidos com a administração IC do ETOH 100  $\mu$ g no 16° dia no grupo HCl/SAL, detectou-se uma diferença estatisticamente significante entre os tratamentos [ $F(8,40) = 4,20$ ,  $P = 0,001$ ]. O teste de Fisher para comparações múltiplas mostrou que o grupo HCl/ETOH apresentou significativamente maior número de erros no 3° e 7° para  $P < 0,01$  e no 11° dia para  $P < 0,05$  comparados ao grupo HCl/SAL, não sendo, no entanto, estatisticamente diferente do grupo HCl/SAL no 15° dia ainda que a média do número de erros tenha sido maior.

A administração IC aguda do ETOH 100  $\mu$ g no grupo controle HCl/SAL no 16° dia produziu um maior número de erros comparado ao desempenho deste mesmo grupo HCl/SAL nos testes anteriores sob a administração com SAL, no entanto, não de modo estatisticamente significante. Entretanto, observe-se que o desempenho deste

grupo sob o efeito do ETOH IC foi equivalente ao desempenho do grupo HCl/ETOH no 15º dia de teste, sugerindo que o ETOH ainda produz prejuízo do desempenho do pós-retardo de 1 hora, mas que é menos expressivo em função da aprendizagem da tarefa de 1 hora após sua sucessiva repetição a intervalos de aproximadamente 4 dias. Esta aprendizagem não se apresenta no grupo controle em função do desempenho já ser ótimo neste grupo, não sendo possível uma redução da média de erros.

À semelhança do que foi feito para o grupo controle HCl/SAL, foi feita uma administração IC de ETOH 100 µg no 16º após administração crônica de sulpirida para o grupo Sulpirida/SAL. Entretanto, curiosamente observamos que neste grupo os animais apresentaram significativamente menos erros ( $t = 3,220$ ;  $P < 0,001$ ) comparado aos do grupo HCl/SAL quando o ETOH foi administrado (Fig. 21).



**Figura 21.** Efeitos das administrações agudas de etanol (ETOH) 100 µg no córtex pré-frontal medial no 16º dia após administração crônica (4 dias consecutivos) do ácido clorídrico 0,05 M (HCl) ou Sulpirida 1 µg, sobre o desempenho antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços. HCl/SAL ( $n = 6$ ), Sulpirida/SAL ( $n = 8$ ). \*\*  $P = 0,0073$  comparado ao grupo HCl/SAL (teste  $t$  de student para amostras independentes).

O tempo gasto em cada braço antes e após o retardo de 1 hora durante todas as administrações agudas está representado na Tabela 5. A ANOVA de 1 via para medidas repetidas não identificou diferenças estatisticamente significantes entre o tempo em cada tratamento tanto no pré- quanto no pós-retardo de 1 h.

**Tabela 5.** Média do tempo gasto (segundos)  $\pm$  e.p.m. em cada braço visitado pelos animais antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços sob doses repetidas do antagonista seletivo de receptores D<sub>2</sub>, Sulpirida (Su) na dose de 1  $\mu$ g ou HCl (H), e administrações agudas de Etanol 100 $\mu$ g (E) ou Salina (S), ambos administrados no córtex pré-frontal medial (n = 22).

<b>Tempo gasto em cada braço (média em segundos <math>\pm</math> e.p.m)</b>		
<b>3º dia</b>		
<b>Combinações</b>	<b>Pré-Retardo</b>	<b>Pós-Retardo</b>
HS	12.50 $\pm$ 3.82	9.25 $\pm$ 0.85
HE	13.25 $\pm$ 0.71	12.00 $\pm$ 0.47
SuS	11.25 $\pm$ 2.24	10.00 $\pm$ 0.47
SuE	9.62 $\pm$ 0.82	11.25 $\pm$ 0.96
<b>7º dia</b>		
<b>Combinações</b>	<b>Pré-Retardo</b>	<b>Pós-Retardo</b>
HS	12.50 $\pm$ 2.13	10.00 $\pm$ 0.48
HE	13.00 $\pm$ 1.25	9.93 $\pm$ 0.89
SuS	15.25 $\pm$ 1.86	10.00 $\pm$ 0.94
SuE	11.65 $\pm$ 0.84	13.13 $\pm$ 0.79
<b>11º dia</b>		
<b>Combinações</b>	<b>Pré-Retardo</b>	<b>Pós-Retardo</b>
HS	14.00 $\pm$ 2.09	9.83 $\pm$ 1.62
HE	10.38 $\pm$ 0.91	11.63 $\pm$ 0.94
SuS	13.25 $\pm$ 1.70	13.25 $\pm$ 0.82
SuE	10.15 $\pm$ 1.46	10.75 $\pm$ 1.33
<b>15º dia</b>		
<b>Combinações</b>	<b>Pré-Retardo</b>	<b>Pós-Retardo</b>
HS	10.00 $\pm$ 1.86	9.50 $\pm$ 0.57
HE	11.73 $\pm$ 2.07	10.38 $\pm$ 0.88
SuS	12.00 $\pm$ 4.49	11.00 $\pm$ 0.26
SuE	11.35 $\pm$ 1.18	12.00 $\pm$ 1.07
<b>16º dia</b>		
<b>Combinações</b>	<b>Pré-Retardo</b>	<b>Pós-Retardo</b>
HS-E	12.58 $\pm$ 1.38	12.04 $\pm$ 1.56
SuS-E	13.19 $\pm$ 3.04	10.53 $\pm$ 0.92

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo corroboram achados anteriores obtidos em nosso laboratório, onde foi mostrado o efeito do prejuízo do etanol sobre a memória operacional espacial de longa-duração em roedores quando administrado diretamente no córtex pré-frontal medial, especialmente na dose de 100 µg IC (Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003; Galvão, 2005). Esse efeito de prejuízo do álcool na dose de 100 µg foi replicado em nosso experimento, o que foi essencial para que os resultados obtidos ficassem claros quando mensuramos os efeitos do antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub> em associação com o álcool.

### 5.1. Paradigma do Labirinto Radial de 8 Braços

O Labirinto Radial de 8 braços, modelo experimental utilizado neste estudo, inicialmente proposto por Olton e Samuelson (1976), continua sendo um aparato sensível e eficaz na avaliação da memória operacional espacial em roedores. Todos os animais inseridos no protocolo de administração de drogas atingiram o critério de aprendizagem, alcançando melhora gradativa do desempenho tanto nas tarefas sem o retardo quanto nas tarefas com o retardo de 5 segundos, utilizadas para avaliar o desempenho dos animais para inserção no protocolo de administração de drogas proposto.

Este modelo baseia-se na “aprendizagem de lugar”, permitindo avaliar características visuo-espaciais da memória operacional. Para desempenhar corretamente 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 discriminar quais braços já foram visitados e, então, armazenar essa informação em uma memória transitória (memória operacional). De acordo com Olton & Samuelson (1976), para o desempenho de tarefas neste modelo, os animais não escolhem braços adjacentes, nem utilizam marcações internas, mas fazem uso primordialmente de suas capacidades mnemônicas (Olton & Samuleson, 1976).

Podem ser diferenciados dois tipos de memória necessários para desempenhar tarefas no labirinto radial: a *memória de referência* que diz respeito à memória de procedimento, relativa às regras de aprendizagem da tarefa, como por exemplo, entrar somente uma vez em cada braço em uma dada sessão; e a *memória operacional* que está relacionada ao processamento de diversas funções cognitivas, dentre as quais o armazenamento temporário da informação, por exemplo, dos braços que já foram visitados em uma mesma sessão de treinamento, e a manutenção (evocação) dessa informação, para tarefas com a presença ou não de retardo (segundos, minutos ou horas) para que ocorra um desempenho apropriado e efetivo. Neste caso, a informação seria essencialmente para a sessão em andamento, não sendo necessária, portanto, para o desempenho das sessões seguintes tendo em vista que a memória operacional se caracteriza pela manutenção da informação enquanto ela é relevante (Fuster, 2000; Floresco e Phillips, 2001; Phillips et al., 2004). Neste contexto, o labirinto radial constitui um modelo animal clássico para avaliação da memória operacional (Shah e Miyake, 1999; Seamans et al., 1998).

Considerando-se a memória operacional como a capacidade de preferencialmente utilizar ao invés de armazenar uma informação, torna-se possível considerar a existência da função da memória operacional espacial após períodos longos de intervalo, como por exemplo, no período após o intervalo de retenção de 1 h no labirinto radial de 8 braços. Sob esse ponto de vista, o desempenho da memória operacional do animal estaria relacionado à habilidade de integrar a informação adquirida no pré-retardo, e sustentada durante o intervalo, à realidade do teste no pós-retardo, onde a resposta comportamental seria o resultado do processamento dessas informações (Baddeley, 2000).

Alguns autores questionam sobre o uso do termo “memória operacional de longa duração” para os resultados obtidos com retardos acima de alguns segundos. Eles alegam que, acima desse período de retardo, os mecanismos fisiológicos envolvidos em tal situação, pertenceriam à memória de longo prazo, não podendo ser atribuído o termo “memória operacional”, que ficaria restrito a eventos de curta duração, sendo o mesmo confundido freqüentemente com a memória de curto prazo. Porém, esse tipo de memória (memória operacional) é melhor definido, levando-se em

consideração não sua natureza temporal (curta ou longa), mas sim seus aspectos funcionais (Fuster, 1991). Por exemplo, a informação dos braços visitados na sessão pré-retardo no labirinto radial permanece ativa (“on-line”) por horas, até que a sessão pós-retardo ocorra. Após esse evento, a informação é descartada, não influenciando uma outra sessão realizada no dia seguinte.

Isso demonstra que não houve a consolidação da informação dos braços visitados naquela sessão e que ela não é mais sustentada após o período necessário. Considerando esses aspectos, os testes com retardos acima de uma hora de duração podem ser considerados avaliações da memória operacional espacial de longa duração.

## **5.2. Etanol e Córtex Pré-Frontal**

O ETOH, quando administrado diretamente no CPFm produz um aumento do número de erros, de forma dose dependente, em testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8-braços, sugerindo o envolvimento do CPFm nos prejuízos do ETOH sobre a memória operacional de longa-duração (Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003; Galvão, 2005).

Os efeitos prejudiciais do ETOH sobre a aprendizagem e memória, notadamente sobre a memória operacional, são bastante conhecidos e relatados por diversos autores, com evidências colhidas tanto em estudos realizados em animais experimentais quanto no homem (Gibson, 1985; Oliveira et al., 1990; Zhang et al., 1997; Gevins et al., 2002).

Também se tem demonstrado que há prejuízos da função frontal no alcoolismo, com alterações neurofisiológicas de diminuição da utilização de glicose e redução do fluxo sanguíneo cerebral nos lobos frontais evidenciadas em tomografias, bem como alterações cognitivas sugerindo prejuízos específicos das funções frontais em testes neuropsicológicos em pacientes alcoolistas (Moselhy et al., 2001).

Em estudo recente Goldstein et al. (2004) demonstraram que o álcool quando comparado a cocaína apresenta efeitos ainda mais prejudiciais sobre as funções atencionais e executivas, funções estas atribuídas ao córtex pré-frontal. Portanto, a introdução de agentes farmacológicos que possam bloquear os prejuízos cognitivos produzidos pelo etanol e, sobretudo, que poderiam impedir a progressão destes déficits pelo uso contínuo do etanol em pacientes com síndrome de dependência ao álcool seria de extraordinária importância clínica.

Nesse contexto Oliveira (2006) em ensaio clínico examinando a possível relação existente entre compulsão ao uso do álcool, as alterações cognitivas pré-frontais, e a tendência a recaídas ao uso do álcool, observou que alcoolistas do sexo masculino jovens, com média de idade de 34,5 anos, apresentando histórico de início de uso muito precoce (15 anos de idade), apresentaram comprometimentos importantes de diferentes funções cognitivas frontais (atenção, memória e funções executivas), sendo mais expressivos em alguns testes cognitivos, tais como a figura complexa de Rey que avalia a memória visuo-espacial e o teste de semelhanças que avalia a abstração, naqueles que recaíram ao uso do álcool em um período de 6 meses de avaliação, sugerindo que alcoolistas com disfunções cognitivas frontais mais severas tendem a apresentar maior tendência à recaídas ao uso de álcool.

Adicionalmente, Furieri (2005) demonstrou em um ensaio clínico randomizado, duplo cego, conduzido em um serviço municipal especializado com uma amostra de 60 pacientes (média de idade de 44 anos) dependentes do álcool (média de uso de 27 anos e de 17 doses ou 165-170 g por dia nos últimos 90 dias) do sexo masculino sem complicações clínicas ou psiquiátricas, prejuízos cognitivos expressivos, sobretudo as que envolvem as funções frontais. Neste estudo foi demonstrado que o tratamento com a gabapentina, um anticonvulsivante indicado como adjuvante para o tratamento de crises parciais, reduziu o consumo de álcool e diminuiu a compulsão do beber, favorecendo a permanência da abstinência e a melhora de algumas funções cognitivas, sobretudo a atenção e a memória de curto-prazo, mas, infelizmente não modificou algumas das disfunções frontais dos alcoolistas.

Portanto, o CPF e seus circuitos são particularmente vulneráveis aos efeitos do ETOH. Esta ação envolve o sistema dopaminérgico pré-frontal. Existem estudos correlacionando a administração de ETOH em ratos com aumentos da concentração de dopamina extracelular em vários terminais dopaminérgicos (Di Chiara, 1995), incluindo no núcleo accumbens, estrutura envolvida no circuito de gratificação cerebral, do qual o CPF também faz parte (Di Chiara, 1995; O'Brien et al., 1995).

### **5.3. Sistema Dopaminérgico Pré Frontal e Memória Operacional**

Em termos de memória operacional, a manutenção da atividade DAérgica no CPF é de fundamental importância para um bom desempenho dos animais em tarefas envolvendo retardo no labirinto radial de 8 braços (Phillips et al., 2004).

A importância da estimulação dos receptores DAérgicos sobre as funções de memória operacional espacial modulada pelo CPF foi primariamente relatada por Brozski et al. (1979), que observou que a depleção de DA da área dorsolateral do CPF em macacos prejudicava o desempenho da memória operacional espacial. As deficiências de memória operacional foram comparáveis àquelas induzidas pela ablação do CPF, e foram melhoradas com terapia de reposição com agonistas dopaminérgicos (Brozski et al., 1979).

Phillips et al. (2004), empregando o labirinto radial em um procedimento muito semelhante ao utilizado no presente estudo, observaram, por meio da técnica de microdiálise, que os níveis de DA no CPFm se elevavam no pré-retardo, e se mantinham elevados por mais 5 minutos, retornando aos níveis basais depois deste período, não se sustentando, portanto, durante um retardo longo superior a 30 minutos. Entretanto, o efluxo de DA aumentava novamente no pós-retardo quando os animais deveriam recuperar a informação do evento anterior ao retardo. Estes dados sugerem que a atividade DAérgica no CPF está presente durante a codificação e a utilização das informações armazenadas, mas não durante seu armazenamento. Esta observação é consistente com o papel do CPF, no caso dos roedores, do CPFm, em utilizar, ao invés de armazenar, diversas informações durante a realização de uma tarefa. Dessa forma, o CPF torna-se um gerenciador de



informações mnemônicas e não-mnemônicas, necessárias para o desempenho das tarefas cognitivas em animais e no homem.

### **5.3.1. Receptores D<sub>1</sub> e memória operacional**

Modelos envolvendo a modulação dopaminérgica sobre a Memória operacional *per se* foram avaliadas em nosso laboratório onde mostrou-se que o agonista parcial de receptores D<sub>1</sub>, o SKF 38393, administrado diretamente no CPFm produziu prejuízo do desempenho de tarefas com retardos de 1 h no labirinto radial (Valentim Jr, 2003). Infusões de antagonistas seletivos D<sub>1</sub> (SCH 23390 ou SCH 39166) no CPF de macacos (Sawaguchi e Goldman-Rakic, 1991) ou ratos (Seamans et al., 1995) prejudicam o desempenho de memória operacional espacial, sem alterar o desempenho motor (Sawaguchi e Goldman-Rakic, 1991). Estes dados demonstram que existe realmente uma importante modulação dopaminérgica D<sub>1</sub> responsável pela manutenção da memória operacional no córtex pré-frontal.

De fato, vários autores têm exaustivamente demonstrado que a função ótima da memória operacional parece se dar dentro de uma extensão limitada da transmissão DAérgica e da sinalização pelos receptores DAérgicos do tipo D<sub>1</sub> no córtex pré-frontal (Williams e Castner, 2006), delineando uma relação em “U” invertido (ou bifásica, ou em forma de sino) entre a transmissão DAérgica e a integridade da memória operacional (Goldman-Rakic, 1996; Zahrt et al., 1997; Arnsten, 1998; Seamans e Yang, 2004; Williams e Castner, 2006), na qual uma estimulação insuficiente ou excessiva dos receptores D<sub>1</sub> são prejudiciais a esta função cognitiva (Zahrt et al., 1997; Williams e Castner, 2006).

### **5.3.2. Receptores D<sub>2</sub> e memória operacional**

Há muita controvérsia quanto ao envolvimento dos receptores DAérgicos do tipo D<sub>2</sub> nos processos cognitivos. Na verdade, há várias evidências sugerindo que este tipo de receptor não apresentaria um envolvimento tão expressivo quanto o que tem sido observado para os receptores do tipo D<sub>1</sub>, nas funções cognitivas, notadamente no processamento da memória operacional.

Vários estudos têm demonstrado que o uso de antagonistas  $D_2$ , diretamente no CPF, não prejudica esse tipo de memória em diversos modelos (Seamans et al., 1998), enquanto que administrações sistêmicas de agonistas e antagonistas  $D_2$  podem produzir alterações das funções cognitivas, possivelmente envolvendo outras estruturas cerebrais, como o hipocampo e/ou estriado (Takahashi et al., 2007).

Em um estudo recente, Von Huben et al. (2006) investigaram as diferentes contribuições de receptores DAérgicos do tipo  $D_1$  e  $D_2$  em funções cognitivas complexas em macacos Rhesus por meio da verificação dos efeitos da administração sistêmica (intramuscular) de antagonistas  $D_1$  (SCH 23390) e  $D_2$  (racloprida) sobre o desempenho de várias tarefas cognitivas que incluíam testes que sugestivamente avaliavam a memória operacional espacial, a memória associativa visuo-espacial, a aprendizagem e a motivação. Ambos antagonistas prejudicaram a aprendizagem, memória, atenção e domínio motor. Entretanto, houve uma diferença substancial nos efeitos sobre as tarefas que envolviam a memória operacional visuo-espacial e a aprendizagem associativa visuo-espacial, sendo ambas prejudicadas significativamente pelo antagonista  $D_2$ , mas não pelo antagonista  $D_1$ , sugerindo que a memória associativa visuo-espacial dependeria mais da função do tipo  $D_2$  que da neurotransmissão do tipo  $D_1$  (Von Huben et al., 2006).

Takahashi et al. (2007) demonstraram que a quantidade de receptores  $D_2$  no hipocampo, mensurada pela tomografia por emissão de pósitrons (PET), correlacionou-se positivamente com as funções cognitivas em voluntários masculinos jovens e saudáveis, e também foi associado às funções do lobo frontal tais como as funções executivas e a fluência verbal, sugerindo a implicação de uma interação hipocampo-prefrontal nestas funções cognitivas.

Floresco et al. (2006) demonstraram recentemente que, diferente do que se tem obtido para a memória operacional em ratos, o bloqueio de receptores  $D_2$ , tanto quanto de receptores  $D_1$ , no CPFm prejudica a habilidade destes animais em realizar mudanças de estratégias de respostas para obter uma recompensa, ou seja, prejudica o uso flexível de informações de sistemas múltiplos de memória, uma função executiva tão dependente da integridade do CPF quanto a memória

operacional, sugerindo que os receptores  $D_1$  e  $D_2$  parecem atuar de forma cooperativa na modulação deste comportamento, e o balanço entre suas ações seria de essencial importância para a manutenção desta função pré-frontal (Floresco et al., 2006).

Ainda que o papel dos receptores  $D_2$  no CPF na memória operacional não tenha sido consistentemente comprovado em roedores, e que aparentemente a ativação destes receptores seria mais relevante, e até mesmo crucial, em outras funções executivas do CPF (Floresco et al., 2006), há alguns estudos que demonstram a sua participação também na memória operacional.

De fato, o bloqueio *per se* de receptores do tipo  $D_2$  especificamente no CPFm pode prejudicar a memória operacional como demonstrado em estudo recente realizado em nosso laboratório onde antagonistas de receptores DAérgicos do tipo  $D_1$  e  $D_2$ , como o haloperidol, ou de receptores  $D_2$  e  $D_4$ , como a clozapina, prejudicaram, de forma dose-dependente, o desempenho dos animais no labirinto radial envolvendo retardos de uma hora, sugerindo um prejuízo da memória operacional espacial de longa-duração (Valentim Jr., 2004).

Segundo Floresco et al. (2006), há evidências de que a ativação de receptores  $D_1$  apresenta efeitos tanto excitatórios quanto inibitórios sobre a atividade sináptica no CPF, aumentando as respostas excitatórias mediadas pelos receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) em células piramidais, mas também aumentando a transmissão pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Em contraste, os receptores do tipo  $D_2$ , que se localizam em células piramidais, em interneurônios de circuitos locais, e terminais pré-sinápticos, reduzem a excitabilidade de neurônios de projeção do CPF enquanto, ao mesmo tempo, atenua a atividade GABAérgica.

Wang et al. (2004) demonstraram as diferenças entre a ativação de receptores  $D_1$  e  $D_2$  na memória operacional, realizando registros de células únicas no córtex pré-frontal dorsolateral em primatas não-humanos desempenhando uma tarefa com retardo oculomotor. Eles observaram que, em contraste com o receptor  $D_1$ , que está relacionado à atividade de retardo dos neurônios pré-frontais, o receptor  $D_2$  está associado à atividade relacionada à resposta motora ocular na conclusão da tarefa,

sendo este efeito congruente com a sua expressão preferencial em camadas corticais de neurônios de projeção eferente (neurônios piramidais da camada V). Nesta resposta oculomotora, a estimulação de receptores  $D_2$  aumenta a atividade neural enquanto que a ativação de receptores  $D_1$  a diminui. Desta forma, estes autores demonstraram que os receptores DAérgicos  $D_1$  e  $D_2$  no CPF não somente se diferenciam farmacologicamente como também diferem substancialmente quanto aos circuitos celulares e à especificidade funcional, neste caso, da memória operacional. Estes autores ponderam que esta função do receptor  $D_2$  poderia ser uma descarga que naturalmente informa à rede pré-frontal que um comando motor foi completado (Wang et al., 2004).

No presente estudo, o emprego de um antagonista seletivo para os receptores do tipo  $D_2$ , a sulpirida, não apresentou efeito *per se* sobre a memória operacional espacial de longa duração em ratos desempenhando tarefas no labirinto radial. Pelo exposto acima, este resultado está de acordo com vários estudos em ratos, mas não em primatas não-humanos, na literatura. É possível, no entanto, que dada a baixa densidade de receptores  $D_2$  no CPFm o bloqueio  $D_2$ , pelo menos nas doses empregadas no estudo, não tenha sido suficiente para modificar substancialmente o desempenho dos animais. Contudo, este resultado obtido foi bastante adequado para a proposição principal do presente estudo, que seria o da verificação da ação do antagonista  $D_2$ , em doses que não apresentariam efeito *per se*, sobre os efeitos de prejuízo do etanol sobre a memória operacional espacial em ratos.

#### **5.4. Receptores $D_2$ e álcool**

Há vários estudos sugerindo uma associação entre os receptores  $D_2$  e o alcoolismo, mas há também estudos que não comprovam esta teoria.

Blum et al. (1990) foram os primeiros autores a relatarem a existência de associação entre receptores  $D_2$  e o alcoolismo, demonstrando que a presença do alelo  $A_1$  do receptor  $D_2$  classificou corretamente 77% dos alcoolistas, enquanto a sua ausência classificou 72% dos não-alcoolistas. Sugeriram ainda que um gene deste receptor que confere susceptibilidade a pelo menos uma forma de alcoolismo estaria localizado na região q22-q23 do cromossomo 11 (Blum et al., 1990).

Noble et al. (2000), considerando várias evidências experimentais e clínicas sugerindo que os receptores DAérgicos do tipo  $D_2$  na via mesolímbica seriam o substrato neural chave para o reforçamento e a recompensa relacionado ao álcool e outras drogas, demonstraram, em seu estudo, evidências significantes para a implicação dos genes de receptores  $D_2$  no alcoolismo mais severo.

Connor et al. (2002), examinaram a associação entre os alelos  $A_1^+$  (genótipos  $A_1/A_1$  e  $A_1/A_2$ ) e  $A_1^-$  (genótipo  $A_2/A_2$ ) dos receptores  $D_2$  em alcoolistas caucasianos internados em uma unidade de desintoxicação, e verificaram que aqueles que apresentavam o alelo  $A_1^+$  consumiam maiores quantidades de álcool, iniciaram o uso de álcool mais precocemente, apresentaram uma menor latência entre o primeiro uso de álcool e o início dos problemas com álcool, e, apresentavam elevadas pontuações na escala de dependência ao álcool, comparado ao alelo  $A_1^-$ . Desta forma, demonstraram que os alcoolistas que tinham o alelo  $A_1$  dos receptores  $D_2$  eram caracterizados por uma severidade maior da dependência ao álcool.

Os receptores DAérgicos do tipo  $D_2$  foram também associados ao alcoolismo em uma população américo-mexicana (Luo et al., 2005), e também parecem estar associados à dependência à nicotina, além da dependência ao álcool (Preuss et al., 2007). Além disso, Huang et al. (2007) recentemente observaram que o gene do receptor  $D_2$  estaria associado à alcoolistas com comorbidade de ansiedade e/ou depressão.

Por todas estas evidências, alguns autores têm sugerido que a disfunção dos receptores DAérgicos do tipo  $D_2$  estaria relacionada ao comportamento aberrante de busca de álcool, drogas, nicotina ou mesmo alimentos, e também a outros comportamentos patológicos relacionados como o jogo patológico, Síndrome de Tourette e Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (Blum et al., 1996). Blum et al. (1996) sugeriram que variantes dos genes de receptores  $D_2$  seriam importantes determinantes genéticos de uma “Síndrome de Deficiência da Recompensa”, uma síndrome que reúne comportamentos aditivo, impulsivo e compulsivo que caracterizam as várias condições acima mencionadas.

Em uma análise mais recente, Blum et al. (2007) sugerem que esta “Síndrome de Deficiência da Recompensa” estaria relacionada às aquelas condições fisiológicas na qual a presença do alelo  $A_1$  dos receptores  $D_2$  associada a uma diminuição da presença destes receptores, aumentaria o comportamento de compulsão em decorrência de um estado de hipodopaminergia fazendo com que o indivíduo procure substâncias que aumentem a liberação de dopamina para a ativação subsequente dos sítios  $D_2$  no núcleo *accumbens*, como por exemplo, o álcool.

Estas evidências constituíram uma das motivações para a investigação do envolvimento dos receptores  $D_2$  do CPFm nos efeitos de prejuízo do ETOH sobre a memória operacional espacial avaliada em um labirinto radial de 8-braços, ainda que estes receptores se apresentem em menor densidade que os receptores  $D_1$  nesta estrutura cortical, e que não se apresentem consistentemente envolvidos na mediação da memória operacional em roedores.

Adicionalmente, em estudos anteriormente realizados em nosso laboratório foi observado que a administração do haloperidol no CPFm, em doses que não apresentaram efeitos *per se* sobre o desempenho de testes com retardos de 1 hora no labirinto radial, aumentou significativamente o efeito de prejuízo do etanol na dose de 100  $\mu\text{g}$  também administrado no CPFm (Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003). Considerando que o haloperidol aumenta a atividade de neurônios DA no CPFm em função do bloqueio de receptores  $D_2$  (Gessa et al., 2000) estes resultados sugeriram o envolvimento deste tipo de receptor na mediação dos efeitos do ETOH sobre a memória operacional. Entretanto, ainda que haja evidências de que o haloperidol atue predominantemente em receptores do tipo  $D_2$  no CPFm, ele não é farmacologicamente seletivo para estes receptores, tendo também atuação em receptores do tipo  $D_1$ . Desta forma, o presente estudo procurou examinar o efeito da administração de um antagonista mais seletivo para os receptores do tipo  $D_2$ , a sulpirida.

Entretanto, ao contrário do que foi observado para o haloperidol, a sulpirida administrada no CPFm bloqueou, de forma dose-dependente, o efeito de prejuízo do ETOH sobre a memória operacional espacial de longa-duração. Desta forma, um dos questionamentos que poderia ser feito seria se os efeitos de potenciação dos prejuízos do ETOH pelo haloperidol se deveria de fato ao bloqueio  $D_2$  ou se teria

ocorrido uma interação com os receptores do tipo D<sub>1</sub>. Futuras investigações deverão ser realizadas para tentar elucidar esta questão.

Por outro lado, o bloqueio dos prejuízos do ETOH produzido pela sulpirida administrada no CPFm, principalmente nas doses menores, sugere que o bloqueio de receptores DAérgicos do tipo D<sub>2</sub> pode ser de potencial utilidade no tratamento farmacológico da síndrome de dependência ao álcool.

De fato, em recente estudo Hermann et al. (2006) observaram, através da ressonância magnética funcional em alcoolistas abstinentes e livres de medicação, que uma única dose da amisulpirida (400 mg) reduziu a ativação talâmica, uma região cerebral intimamente relacionada aos circuitos frontoestriatais que regulam o comportamento que pode influenciar o risco de recaídas. Marra et al. (2002), por outro lado, observaram que doses baixas da amisulpirida (50 mg/dia) durante 6 meses em alcoolistas produziram efeitos opostos, ou seja, aumentou os índices de recaída e de compulsão. Note-se, no entanto, que o bloqueio de receptores D<sub>2</sub> esteve relacionado à compulsão e ao risco de recaídas, parecendo aumentar estes riscos em pequenas doses e podendo diminuí-los em doses maiores.

### **5.5. Sensitização, Córtex Pré-frontal Medial e Receptores D<sub>2</sub>**

Recentes estudos sugerem que o CPFm exerce um importante papel no desenvolvimento da sensitização pela cocaína (Beyer e Steketee, 2002; Steketee e Walsh, 2005). Estes estudos sugerem que esta sensitização estaria associada a uma diminuição da função dos receptores DAérgicos do tipo D<sub>2</sub> no CPFm (Steketee e Walsh, 2005).

Em um estudo recente esses autores (Steketee e Walsh, 2005) demonstraram que a administração aguda da sulpirida no CPFm aumentou a indução de ativação motora e do sobrefluxo de DA no núcleo accumbens pela cocaína. Também observaram que o pré-tratamento com administrações repetidas de sulpirida no CPFm durante quatro dias, produziu sensitização comportamental e neuroquímica cruzada com a cocaína administrada 7 dias após o tratamento com a sulpirida. Segundo estes

autores, estes resultados sustentariam a hipótese de que a sensibilização estaria associada à diminuição da função de receptores D<sub>2</sub>, neste caso devido ao bloqueio destes receptores pela sulpirida, no CPFm.

Considerando que a sulpirida pode ser empregada clinicamente no tratamento da dependência ao álcool e outras drogas, e que a exposição repetida a este agente no CPFm pode induzir uma sensibilização cruzada com a cocaína como vimos acima (Steketee e Walsh, 2005), questionamos qual seria o efeito de sua administração repetida no CPFm, e a possível diminuição da função dos receptores D<sub>2</sub>, nos efeitos do ETOH sobre a memória operacional.

Os resultados obtidos demonstraram que a administração repetida prévia da sulpirida não modificou substancialmente os efeitos de prejuízo do ETOH sobre a memória operacional espacial examinadas no 3º, 7º, 11º e 15º dias, ainda que tenha apresentado uma diminuição algo mais pronunciada destes efeitos ao longo destas administrações repetidas do ETOH comparado ao grupo que recebeu tratamento repetido com o veículo. Estes resultados sugerem que a diminuição da função dos receptores D<sub>2</sub> parece não estar relacionada ao prejuízo da memória operacional induzida pelo ETOH da mesma forma que se mostra relacionada à sensibilização induzida pela cocaína (Steketee e Walsh, 2005).

Como vimos na seção de resultados, a redução do número de erros observada durante as administrações agudas de ETOH no CPFm se deveram a uma aprendizagem das tarefas com retardos de 1 hora no labirinto radial e não a uma redução do efeito do ETOH propriamente dito, uma vez que animais submetidos ao mesmo procedimento no labirinto radial mas que receberam administrações de salina no CPFm, apresentaram prejuízo do desempenho do teste com retardos de 1 hora quando receberam ETOH no CPFm no 16º dia após administrações repetidas da sulpirida.

Entretanto, um resultado surpreendente ocorreu no teste do 16º dia quando se administrou ETOH no CPFm de animais tratados previamente com a administração repetida de sulpirida e que receberam salina no CPFm no 3º, 7º, 11º e 15º. O ETOH administrado no CPFm não apresentou o efeito de prejuízo característico na dose



empregada (100 µg), sendo o desempenho deste grupo significativamente diferente daquele grupo que recebeu veículo nas administrações repetidas, seguido de salina nos testes agudos, e testados com ETOH 100 µg no 16º dia. Ainda que este resultado tenha sido observado em um reduzido número de animais, ele sugere que a administração repetida prévia da sulpirida no CPFm produziu uma redução significativa dos prejuízos do ETOH sobre a memória operacional de longa-duração após uma latência de 15 dias.

Estes resultados requerem uma investigação mais pormenorizada, especialmente ampliando-se a amostra de animais, o que já está sendo feito, e estendida para outras drogas, pois uma vez confirmada, será interessante como alternativa terapêutica nas disfunções cognitivas conseqüentes ao uso prolongado de etanol ou outras drogas. Ressalte-se, no entanto, que provavelmente os benefícios terapêuticos somente serão evidenciados após um período de latência de forma equivalente ao que é observado para alguns fármacos já empregados clinicamente no tratamento de algumas desordens mentais.

A necessidade de uma latência de 15 dias para a ocorrência destes efeitos é também um dado curioso que se assemelha à necessidade de um período de ausência de droga para se observar um aumento da ativação locomotora e de respostas estereotipadas na retirada de uma administração crônica de haloperidol em ratos, pelo estabelecimento de uma supersensitização de receptores dopaminérgicos (Bernardi et al., 1981). Este é também um aspecto que deverá ser melhor investigado em estudos futuros.

## 6. CONCLUSÃO

- A dose de 100 µg de etanol administrada diretamente e bilateralmente no córtex pré-frontal medial (intracortical) no presente estudo, prejudicou a memória operacional espacial em ratos desempenhando testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8 braços, corroborando o envolvimento do córtex pré-frontal medial nos efeitos cognitivos do Etanol.
- A Sulpirida, antagonista D<sub>2</sub> seletivo, administrado bilateralmente no córtex pré-frontal medial nas menores doses (0,32 e 1 µg), mas não na maior dose (3,2 µg), reduziu o efeito de prejuízo do etanol sobre a memória operacional espacial em ratos desempenhando testes com retardos de 1 h no labirinto radial de 8 braços, sugerindo a participação desses receptores na modulação dos efeitos do etanol sobre o CPFm.
- Administrações prévias repetidas de Sulpirida no CPFm não modificaram substancialmente os efeitos de prejuízo do ETOH sobre a memória operacional espacial dentro de um período de 15 dias.
- Entretanto, estas administrações prévias repetidas de Sulpirida no CPFm produziram uma redução significativa dos prejuízos do ETOH sobre a memória operacional de longa-duração após latência de 15 dias, sugerindo que a diminuição prévia da função dos receptores D<sub>2</sub> parece modificar os efeitos do ETOH no CPFm.

## 7. REFERÊNCIAS

ABEKAWA, T.; Ohmori, T.; Ito, K.; Koyama, T. D<sub>1</sub> dopamine receptor activation reduces extracellular glutamate and GABA concentrations in the medial prefrontal cortex. *Brain Research*, 867 (1-2): 250 – 254, 2000.

ADAMS, R.D.; VICTOR, M.; ROPPER, A.H. Principles of Neurology. 6<sup>a</sup> ed., McGewHill, Inc., New York, USA, 1997.

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

ARTIGES, E.; Salame, P.; Recasens, C.; Poline, J.B.; Attar-Levy, D.; De La Raillere, A.; Paillere-Martinot, M.L.; Danion, J.M.; Martinot, J.L. Working memory control in patients with schizophrenia: a PET study during a random number generation task. *Am J Psychiatry*, 157(9):1517-9, 2000.

BADDELEY, A.D. Working memory. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 302: 311 – 24, 1983.

BADDELEY, A.D. Working memory. *Science*, 255: 556-559, 1992.

BADDELEY, A.D. The fractionation of working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 13468 – 13472, 1996.

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

BADDELEY, A. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends in Cognitive Science*, 4:417-423, 2000.

BADDELEY, A.D. Is Working Memory Still Working? *American Psychologist*, 56 (11): 851-864, 2001.

BADDELEY, A. Working memory: looking back and looking forward. *Nature Rev Neuroscience*, 4(10):829-39, 2003.

BALFOUR, D.J.K.; Benwell, M.E.M.; Birrell, C.E.; Kelly, R.J.; Al-Aloul, M. Sensitization of the mesoaccubens dopamine response to nicotine. *Pharmacological Biochemistry and Behavior*, 59(4):1021-1030, 1998.

BARBAS, H. Proceedings of the human cerebral cortex: from gene to structure and function. *Brain Research Bulletin*, 52:319-330, 2000.

BEAR, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BERNARDI, M. M.; Souza, H.; Neto P. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats. *Psychopharmacology*, 73: 171-175, 1981.

BEYER, C. E.; Steketee J. F.; Cocaine sensitization: modulation by dopamine D2 receptors. *Cerebral Cortex May*, 12:526-535, 2002.

BIRREL, J.M.; Brown, V.J. Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *Journal of Neuroscience*, 20:4320-4324, 2000.

BLUM K.; Noble E. P.; Sheridan P. J.; Montgomery A.; Ritchie T.; Jagadeeswaran P.; Nogami H.; Briggs A. H.; Cohn J. B. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *Jama*, 263(15): 2055-2060, 1990.

BLUM K.; Sheridan P. J.; Wood R. C.; Braverman E. R.; Chen T. J. H.; Cull J. G.; Comings D. E. The D<sub>2</sub> dopamine receptor gene as a determinant of reward deficiency syndrome. *Royal Society of Medicine*, 89(7): 396-400, 1996.

BLUM K.; Thomas J.H.; Meshkin B.; Waite R. L.; Downs B. W.; Blum S. H.; Mengucci J. F.; Arcuri V.; Braverman E. R.; Palomo T. Manipulation of catechol-O-methyl-transferase (COMT) activity to influence the attenuation of substance seeking behavior, a subtype of Reward Deficiency Syndrome (RDS), is dependent upon gene polymorphisms: A hypothesis. *Medical Hypotheses*, 2007.

BROZOSKI, T.J.; Brown, R.M.; Rosvold, H.E.; Goldman, P.S. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*, 31;205(4409):929-32, 1979.

CARLEZON, W.A.; Wise, R.A. Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accubens shell and frontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 16:3112-3122, 1996.

CONNOR J. P.; Young R. M.; Lawford B. R.; Ritchie T. L.; Noble E. P. D2 dopamine receptor (DRD2) polymorphism is associated with severity of alcohol dependence. *Eur Psychiatry* , 17 : 17-23, 2002.

COOPER, J.R.; Bloom, F.E.; Roth, R.H. Dopamine. The biochemical basis of Neuropharmacology, 8 ed. *Oxford, Inc.*, New York, USA, pp 225 – 270, 2003.

CUMMINGS, J.L. Frontal-subcortical circuits and human behavior. *Archives of Neurology*, 50:873-880, 1993.

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

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

DI CHIARA, G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its in motivation. *Drug Alcohol Depend.*, 38:95-137, 1995.

DI CHIARA, G. Role of dopamine in the behavioral actions of nicotine related to addiction. *European Journal of Pharmacology*, 393:295-314, 2000.

DIAS, R.; Honey, R.C. Involvement of the rat medial prefrontal cortex in novelty detection. *Behavioral Neuroscience*, 116:498-503, 2002.

EDWARDS, G.; Marshall, E.J.; Cook, C.C.H. O tratamento do alcoolismo. ARTMED, Porto Alegre, Brasil, 1999.

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

FLEMING, M.; Mihic, J.; Harris, R.A. *The Pharmacological basis of Therapeutics*. Mcgraw Hill, New York, 2001.

FLORESCO, S.B.; Phillips, A.G. Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D<sub>1</sub> agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behavioral Neuroscience*, 115:934-939, 2001.

FLORESCO, B.S.; Magyar, O. Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology*, 188: 567 – 585, 2006.

FIORIN C. A. Antagonistas NMDA, MK-801 e Memantina, no CPFm bloqueiam prejuízos da memória operacional espacial produzido pelo etanol. Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – UFES. Vitória-ES, 2007 (Dissertação de Mestrado).

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

FUSTER, J.M. Synopsis of function and dysfunction of the frontal lobe. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 395:51-7, 1999.

FUSTER, J.M. Executive frontal functions. *Experimental Brain Research*, 133: 66-70, 2000.

FUSTER, J.M. The prefrontal cortex – an update: time is of the essence. *Neuron*, 30:319-333, 2001.

FUSTER, J.M. Frontal lobe and cognitive development. *Journal of Neurocitology*, 31: 373–385, 2002.

FUSTER, J.M. Upper processing stages of the perception-action cycle. *Trends in Cognitive Sciences*, 8 (4):143-145, 2004.

FURIERI F. A. A gabapentina reduz a compulsão e o consumo de álcool, e melhora a atenção e a memória em alcoolistas. Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – UFES. Vitória-ES, 2005 ( Tese de Doutorado).

GALVÃO, M. Envolvimento do sistema dopaminérgico pré-frontal nos efeitos do álcool sobre a memória operacional espacial. Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – UFES. Vitória-ES, 2005 (Dissertação de Mestrado).

GESSA, G.L.; Devoto, P.; Diana, M.; Flore, G.; Meles, M.; Pistis, M. Dissociation of haloperidol, clozapine, and olanzapine effects on electrical activity of mesocortical dopamine neurons and dopamine release in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 22:642-649, 2000.

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

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

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex in nonhuman primates *Prog Brain Res.*, 85:325-36, 1990.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Working memory and the mind. *Sci Am.* 267:110-117, 1992.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Regional and fractioning of working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 13473 – 13480, 1996.

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

GOLDSTEIN, R.Z.; et al. Severity of neuropsychological impairment in cocaine and alcohol addiction: association with metabolism in the prefrontal cortex. *Neuropsychologia*, 42 1447 – 1458, 2004.

GRAEFF, F.G.; Guimarães, F.S.; Zuardi, A.W. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: Editora Atheneu, pp 69 – 91, 2000.

GREENGARD, P. The neurobiology of dopamine signaling. *Biosci Rep.*, 21(3): 247-69, 2001.

GROENEWEGEN, H.J.; Uylings, H.B.M. The prefrontal cortex and integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress in Brain Research*, 126:3-28, 2000.

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

HARDMAN, J.G.; Limbird, L.E. GOODMAN & GILMAN'S The Pharmacological Basis Of Therapeutics. 10<sup>o</sup> ed, USA. 305-307. 2001.

HERMANN D.; Smolka M. N.; Wrase J.; Klein S.; Nikitopoulos J.; Georgi A.; Braus D.F.; Flor H.; Mann K.; Heinz A. Blockade of Cue-induced Brain Activation of Abstinent Alcoholics by a Single Administration of Amisulpride as Measured With fMRI. *AlcoholismL*, 30(8), 2006

HUANG S.; Lin W.; Wan F. J.; Chang A.; Ko H.; Wang T. J.; Wu P. L. *Monoamine oxidase-A* polymorphisms might modify the association between the *dopamine D2 receptor* gene and alcohol dependence. *J Psychiatry Neurosci*, 32(3):185-92 2007.

IVERSEN, L. Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS drug discovery. *Mol Psychiatry*, 5(4):357-62, 2000.

IZQUIERDO, I.; Et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short- and long-term memory. *Behavioural Pharmacology*, 9, 421-427, 1998.

JUCAITE, A. Dopaminergic modulation of cerebral activity and cognitive functions. *MEDICINA*, 38: 357 – 362, 2002.

KESNER, R.P. Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat. *Psychobiology*, 28:219-228, 2000.

KOECHLIN, E.; Ody, C.; Kouneiher, F. The architecture of cognitive control in the human prefrontal cortex. *Science*, 302:1181-1185, 2003.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. *Brain Research Reviews*, 8: 65-98, 1984.

KOOB, G.F.; Nestler, E.J. The neurobiology of drug addiction. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 9:482-497, 1997.



KRIL, J.J.; Halliday, G.M. Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned? *Prog Neurobiol.*, 58(4):381-7, 1999.

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

LEVESQUE, D.; Diaz, J; Pilon, C. Identification characterization and localization of dopamine D<sub>3</sub> receptor in the brain using <sup>3</sup>[H]hydroxy-N-di-n-propil-2-amino tertralin. *Proceedings of the National Academy of Scences of the United States of America*, 89:8155-8159, 1992.

LOVINGER, D.M. 5-HT<sub>3</sub> receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. *Neurochem Int.*, 35(2):125-30, 1999.

LUO H. R.; Houb Z.; Wua J.; Zhang Y.; Wana Y. Y. Evolution of the DRD2 gene haplotype and its association with alcoholism in Mexican Americans. *Alcohol* , 36: 117–125, 2005.

LURIA, A.R. Fundamentos de Neuropsicologia. Editora da USP, São Paulo, 1981.

MACHADO, A. Neuroanatomia Funcional. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 257-274, 2004.

MACIEIRA, M.S. Avaliação das respostas de ansiedade e cardiovasculares na exposição prolongada ao álcool e na sua abstinência. Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – UFES. Vitória-ES, 1996 (Tese de Doutorado). .

MACKENZIE, S. Within-subjects vs. between-subjects designs: which to use? Department of Computer Science. Canada, 2002.

MARRA D.; Warot D.; Berlin I.; Hispard E.; Notides C.; Tilikete S.; Payan C.; Lépine J.; Dally S.; Aubin H. Amisulpride Does Not Prevent Relapse in Primary Alcohol Dependence: Results of a Pilot Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Alcoholism*, 26(10) 2002.

McGREGOR, A.; Baker, G.; Roberts, D.C.S. Effect of 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex on intravenous cocaine self-administration under a progressive ratio schedule of reinforcement. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 53:5-9, 1996.

MILLER, E.K.; WALLIS, J.D. The prefrontal cortex and executive brain functions. *Academic Press*, 1353 – 1376, 2003.

MOSELHY, H.F.; Georgiou, G.; Kahn, A. Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol*, 36(5): 357-68, 2001.

MOTULSKY, H. What is a P value? In: Motulsky, H. *Intuitive Biostatistics*. Oxford University Press: New York, 1995.

NAKAMURA, E.M.; Da Silva, E.A.; Concilio, G.V.; Wilkinson, 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, C.K.; Fiorine, A.; Chagas, K.D; Chagas, K.N.; Vasquez, E.C. Deficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural 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. *Drugs Alcohol Depend.*, 46: 181-190, 1997.

NOBLE E. P.; Zhang X.; Ritchie T. L.; Sparkes R. S. Haplotypes at the *DRD2* Locus and Severe Alcoholism. *American Journal of Medical Genetics*, 96:622–631, 2000.

O'BRIEN, G.E.; Eckardt, M.J.; Jarvik, M.E. *Psychopharmacology: The fourth Generation of Progress*. New York, Raven Press Ltd., p. 1745-1756, 1995.

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

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

OLIVEIRA, R.W.D. *Relações entre Alcoolismo e Funções Cognitivas Pré-Frontais: Dependência, Compulsão e Recaída*. Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas - UFES. Vitória-ES, 2006 (Tese de Doutorado).

OLTON, D.S.; Samuelson, R.J. Relembrence of places passed: special 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. *Learning and motivation*, 8: 289 – 314, 1977.

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

PAXINOS, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>a</sup> Ed. New York: Academic Press, 1986.

PETERS, Y.M.; Lewis, B.L.; O'Donnel, P. Synchronous activity in the ventral tegmental area and prefrontal cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 909: 267 – 269, 2000.

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

PREUS, U. W.; Zill P.; Koller G.; Bondy B.; Soyka M. D2 dopamine receptor gene haplotypes and their influence on alcohol and tobacco consumption magnitude in alcohol-dependent individuals. *Alcohol e alcoholism*, 42: 258-266, 2007.

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.

RICHARDSON, N.R.; Gratton, A. Changes in medial prefrontal cortical dopamine levels associated with response-contingent food reward: an electrochemical study in rat. *The Journal of Neuroscience*, 18:9130-9138, 1998.

ROBBINS, T.W. Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals. *Experimental Brain Research*, 133:130-138, 2000.

ROSE, J.E.; Woolsey, C.N. The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Research Publication Association for Research in Nervous Mental Disease*, 27:210-232, 1948.

- SAWAGUCHI, T.; Goldman-Rakic, P.S. D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science*, 22;251(4996):947-50, 1991.
- SEAMANS, J.K.; Floresco, S.B.; Phillips, A.G. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behav Neurosci.*, 109(6):1063-73, 1995.
- SEAMANS, J.K.; Floresco, S.B.; Phillips, A.G. D1 Receptor Modulation of Hippocampal–Prefrontal Cortical Circuits Integrating Spatial Memory with Executive Functions in the Rat. *The Journal of Neuroscience*, 18(4):1613–1621, 1998.
- SEAMANS, J.K.; Yang, C.R. The principals features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology*, 74:1-57, 2004.
- SHAH, P.; Miyake, A. The separability of working memory resources for spatial thinking and language processing: an individual differences approach. *Journal of Experimental Psychology*, 81:306-312, 1996.
- SHIMAMURA, A.P.; NIELSEN-BOHLMAN, L.; CIRANNI, M.; KNIGHT, R.T. Impaired word-stem priming in patients with temporal-occipital lesions. *Neuropsychologia*, 35(8):1087-92, 1997.
- SOLOWIJ, N.; Et al. Adverse effects of cannabis. *Lancet*, 14;352 (9140):1611-6, 1998.
- STEKETEE, D.J.; Walsh, J.T. Repeated injections of sulpiride into the medial prefrontal cortex induces sensitization to cocaine in rats. *Psychopharmacology*, 179: 753 – 760, 2005.
- STEKETEE, J.D. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain Research Reviews*, 41:203-228, 2003.
- TABAKOFF, B. ; Hoffman PL. Alcohol interactions with brain opiate receptors, *Life Sci.*, 17;32(3):197-204, 1983.
- TABAKOFF, B. ; Hoffman, P.L. Substance Abuse: A comprehensive Textbook. Baltimore, Willians & Wilkins, 152-185, 1992.

TAKAHASHI, H.; Kato M.; Hayashi M.; Okubo Y.; Takano A.; Ito H.; Suhara T. Memory and frontal lobe functions; possible relations with dopamine D2 receptors in the hippocampus. *NeuroImage*, 34:1643–1649, 2007.

THIERRY, A.M., Godbout, R.; Mantz, J.; Glowinski, J. Influence of the ascending monoaminergic systems on the activity of the rat prefrontal cortex. *Progress in brain research*, vol. 85. Amsterdam: Elsevier, p. 357-365, 1990.

TZSCHENTKE, T.M. The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. *Amino Acids*, 19:211-219, 2000.

TZSCHENTKE, T.M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in Neurobiology*, 63:241-320, 2001

UYLINGS, H.B.M., Van Eden, C.G. The prefrontal cortex: its structure, function and pathology. *Progress in brain research*, vol. 85, 31-62, 1990.

UYLINGS, H.B.M., Groenewegen, H.J. Kolb, B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioral Brain Research*, 146: 3-7, 2003.

VALENTIM, 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>. Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – UFES. Vitória-ES, 2003 (Dissertação de Mestrado).

VON HUBEN S. N.; Davis S. A.; Lay C.C.; Katner S. N.; Crean R. D.; Taffe M. A. Differential contributions of dopaminergic D1- and D2-like receptors to cognitive function in rhesus monkeys. *Psychopharmacology*, 188: 586–596, 2006.

WANG, H.; Pickel, V.M. Dopamine D<sub>2</sub> receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 442 (4): 392 – 404, 2002.

WANG, M.; Vijayraghavan, S.; Goldman-Rakic P. S. Selective D2 receptor actions on the functional circuitry of working memory. *Science*, vol 303, 2004.

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

WEINER, J.L.; Dunwiddie, T.V.; Valenzuela, C.F. Ethanol inhibition of synaptically evoked kainate responses in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Mol Pharmacol.*, 56(1):85-90, 1999.

WILLIAMS, G. V.; Castner S. A.; Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience*, 139: 263-276, 2006.

VINCENT, S.L.; Khan, Y.; Benes, F.M. Cellular distribution of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in rat medial prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 13: 2551–2564, 1993.

ZAHRT J.; Taylor R. J.; Mathew R. G.; Arnsten F.T. Supranormal Stimulation of D1 Dopamine Receptors in the Rodent Prefrontal Cortex Impairs Spatial Working Memory Performance. *The Journal of Neuroscience*, 21: 8528-8535, 1997.

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

ZILLES, K., Wree, A. Cortex: Areal and laminar structure. In: Paxinos, G. (ed.) The rat nervous system – forebrain and midbrain. *Academic Press*, 374-415, 1985.