

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PÓS GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA DO COMPORTAMENTO

UM ESTUDO SOBRE A INTERAÇÃO DOS SISTEMAS COLINÉRGICO NICOTÍNICO E
DOPAMINÉRGICO NA PERSISTÊNCIA DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

RAMÓN HYPOLITO LIMA

PORTO ALEGRE
2012

RAMÓN HYPOLITO LIMA

UM ESTUDO SOBRE A INTERAÇÃO DOS SISTEMAS COLINÉRGICO NICOTÍNICO E
DOPAMINÉRGICO NA PERSISTÊNCIA DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria
e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARTÍN CAMMAROTA

PORTO ALEGRE

2012

L732u Lima, Ramón Hypolito
Um estudo sobre a interação dos sistemas colinérgico
nicotínico e dopaminérgico na persistência de memórias
aversivas. / Ramón Hypolito Lima. – Porto Alegre, 2012.
25 f.

Tese (Doutorado em Gerontologia Biomédica) – Instituto de
Geriatria e Gerontologia, PUCRS.
Orientação: Prof. Dr. Martín Cammarota.

1. Memória. 2. Persistência. 3. Área Tegmental Ventral. 4.
Receptores Colinérgicos Nicotínicos.
I. Cammarota, Martín. II. Título.

CDD 618.97689

**Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária:
Cíntia Borges Greff - CRB 10/1437**

RAMÓN HYPOLITO LIMA

UM ESTUDO SOBRE A INTERAÇÃO DOS SISTEMAS COLINÉRGICO NICOTÍNICO E
DOPAMINÉRGICO NA PERSISTÊNCIA DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria
e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à
obtenção do grau de doutor.

Aprovada em ____ de _____ de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

Dr. Fabrício Simão - PUCRS

Profa. Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula - UFRGS

Prof. Dr. Irênio Gomes da Silva Filho (Suplente) - PUCRS

PORTO ALEGRE

2012

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador **Martín Cammarota**. Obrigado pelos ensinamentos, preocupação e carinho nestes anos de convivência. À **Lia** pelo carinho e pela honestidade nos conselhos.

À **Janine**, a **Andressa** e ao **Cristiano** que foram imprescindíveis para a conclusão desta tese.

Aos meus colegas e amigos de laboratório que foram importantes para a conclusão de meus experimentos: **Gerard, Felipe, Germana e Camila**.

À **minha família** que sempre estava presente nos momentos mais importantes da minha vida.

À **Scheila** que é a pessoa mais importante na minha vida.

Aos demais, não citados, que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta tese.

Ao **programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica** e à **CAPES** (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) pelo suporte e pelo financiamento de minha bolsa neste período.

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”

Charles Darwin

Resumo

Embora o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na consolidação da memória tem se expandido nos últimos anos, continuamos sem saber como e por que algumas memórias duram mais que outras. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a ativação de um circuito funcional dopaminérgico área tegmental ventral (VTA)-Hipocampo é essencial para o armazenamento persistente de uma memória de longo prazo (LTM). Sabe-se que através da ativação de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR), a nicotina modula a funcionalidade da VTA. Desta forma, nós utilizamos como ferramenta comportamental a tarefa de Esquiva Inibitória (EI) para investigar o papel da modulação nicotínica nos neurônios dopaminérgicos da região VTA em uma LTM persistente. Nossos resultados sugerem que, a infusão intra-VTA de nicotina 12 horas após um treinamento fraco na tarefa comportamental facilita a retenção de uma memória persistente 14 dias, mas não 2 dias após o treino. De maneira inversa, infusões intra-VTA de mecamilamina (antagonista não específico dos nAChR), assim como infusões de Metilcaconitina, um antagonista de nAChR específicos para subunidades $\alpha 7$, 12 horas após um treino forte na tarefa de EI, prejudicaram a retenção persistente de uma memória aversiva. A infusão intra-VTA de Dihidro- β -Eritroidina, um antagonista de nAChR com subunidades $\alpha 2/\beta 4$, 12 horas após o treinamento não possui efeito algum na persistência da memória. Infusões de SCH23390 (antagonista dopaminérgico D1/D5), 12 horas após o treino bloqueia o efeito pró-mnésico causado pela administração de nicotina intra-VTA. Inversamente, infusões de SKF38393 (agonista dopaminérgico D1/D5) 12 horas após o treino reverte o efeito pró-mnésico causado pela administração de mecamilamina intra-VTA. As modulações da transmissão sináptica excitatória necessitam da interação entre o Núcleo Tegmental pedunculopontino (PPN), o córtex pré-frontal medial e a VTA. Entretanto, o PPN controla a liberação glutamatérgica do mPFC sustentando a atividade dopaminérgica dos neurônios da VTA. Desta forma, nós descobrimos que a inativação reversível do PPN 12 horas após um treinamento forte prejudica o armazenamento persistente de uma LTM. Infusões de nicotina intra-VTA e de SKF38393 intra-CA1 revertem o efeito amnésico induzido pela inativação do PPN. Da mesma forma, uma inativação temporária do mPFC 12 horas após um treinamento forte prejudica a persistência de uma LTM. Este efeito amnésico é revertido pelas infusões intra-VTA de nicotina e NMDA (Agonista de receptores NMDA), assim como pelas infusões intra-CA1 de SKF38393 e BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro) na mesma janela temporal do experimentos anteriores.

Os nossos resultados sugerem que o recrutamento do sistema colinérgico nicotínico, derivado do PPN, regule a persistência do traço mnemônico aversivo através da ativação específica dos nAChR com subunidades $\alpha 7$, modulando positivamente a atividade dos neurônios dopaminérgicos localizados na região VTA. Esta modulação promove um aumento na liberação de dopamina na região CA1, ativando os receptores dopaminérgicos D1/D5 e aumentando a liberação de BDNF, o qual é essencial para o armazenamento de longa duração de uma memória aversiva.

Palavras-Chave: Memória, Persistência, Área Tegmental Ventral, Receptores Colinérgicos Nicotínicos.

Abstract

Long-term memory (LTM) storage requires activation of the ventral tegmental area (VTA)-hippocampus dopaminergic loop and synthesis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) late after learning (Bekinschtein et al., 2007; Rossato et al., 2009). Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) modulate VTA function. Therefore, we analyzed the involvement of these receptors on the lasting storage of fear memory in adult male Wistar rats. Intra-VTA infusion of nicotine 12 h after a weak inhibitory avoidance (IA) training session facilitated LTM retention 14 days but not 2 days later. Conversely, administration of the non-subtype specific nAChR antagonist mecamylamine, or of the $\alpha 7$ -nAChR antagonist methyllycaconitine 12 h after a strong IA training session impaired LTM persistence. The $\alpha 2/\beta 4$ -nAChR antagonist dihydro- β -erythroidine had no effect on memory. Intra-CA1 infusion of the D1/D5 receptor antagonist SCH38393 blocked the promnesic action of intra-VTA nicotine. On the contrary, intra-CA1 administration of the D1/D5 receptor agonist SKF38393 reversed the amnesia induced by intra-VTA mecamylamine. Modulation of excitatory synaptic transmission requires interaction between the pedunculo pontine tegmental nuclei (PPN), the VTA, and the medial pre-frontal cortex (mPFC). Particularly, PPN controls glutamate release from mPFC, sustaining the activity of dopaminergic neurons in the VTA. We found that reversible inactivation of the PPN 12h after strong training impaired IA LTM persistence. Intra-VTA infusion of nicotine and intra-CA1 infusion of SKF38393 reversed the amnesia induced by PPN inactivation. Likewise, temporary inactivation of the mPFC hindered LTM persistence, and this effect was reversed by infusion of nicotine and NMDA in the VTA and also by SKF38393 and BDNF given in dorsal CA1 12 h posttraining. Together with previous results, this set of experiments indicates that PPN/mPFC interactions mediated by $\alpha 7$ -nAChR control the activation state of the VTA-hippocampus dopaminergic loop and the expression of hippocampal BDNF to modulate the persistent storage of aversive memories.

Keywords: Memory, Persistence, Ventral Tegmental Area, Nicotinic Acetylcholine Receptors.

Lista de Ilustrações

- Figura 1:** Desenho esquemático do protocolo de treinamento e teste na tarefa de esquiva inibitória...7
- Figura 2:** Ilustração dos diferentes tipos de treinos e testes utilizado neste estudo, assim como a janela de intervenção farmacológica utilizada nos experimentos.....8
- Figura 3:** O treinamento com choques de diferentes intensidades altera a durabilidade do traço mnemônico.....10
- Figura 4:** Infusões bilaterais de nicotina 12 horas após o treino melhoram a persistência de uma memória aversiva.....11
- Figura 5:** Infusões bilaterais de mecamilamina 12 horas após o treinamento prejudicam a durabilidade do traço mnemônico.....12
- Figura 6:** O bloqueio dos receptores nicotínicos composto por subunidades do tipo $\alpha 7$ 12 horas após o treinamento prejudica a persistência da memória.....13
- Figura 7:** O efeito pró-mnésico da infusão intra-VTA de nicotina é revertido pelo bloqueio da atividade dos receptores dopaminérgicos D1/D5 na região CA1.....14
- Figura 8:** O efeito amnésico da infusão intra-VTA de mecamilamina é revertido pela ativação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 no hipocampo dorsal.....14
- Figura 9:** A inativação tardia do mPFC prejudica a persistência da memória de longa duração e este efeito pode ser revertido pela estimulação da alça VTA-hipocampo ou pela administração de BDNF.....15
- Figura 10:** A inativação reversível do PPN prejudica a persistência do traço mnemônico e pode ser revertida pela ativação da alça VTA-hipocampo.....16

Lista de Tabelas

Tabela 1: A Infusão de nicotina intra-VTA não apresenta efeito sobre a atividade locomotora e exploratória ou sobre o estado de ansiedade.....9

Tabela 2: Infusões de muscimol no PPN não apresenta efeito sobre a atividade locomotora e exploratória ou sobre o estado de ansiedade.....9

Lista de Abreviaturas e siglas

- AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina, do inglês: *Cyclic adenosine monophosphate*
- ANOVA: Análise de variância, do inglês: *Analysis of Variance*
- BDNF: Fator-neurotrófico derivado do cérebro, do inglês: *Brain-derived neurotrophic factor*
- CA1: Corno de Amon 1, estrutura pertencente ao hipocampo dorsal
- CREB: Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc, do inglês: *AMPc response element-binding*
- D1/D5: Receptores dopaminérgicos do tipo D1/D5
- D2: Receptor dopaminérgico do tipo D2
- DH β E: Dihidro- β -Eritroidina, antagonista dos receptores colinérgicos nicotínicos compostos por subunidades α e β
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- EI: Tarefa de esquiva inibitória
- LDT: Núcleo tegmental laterodorsal, do inglês: *Laterodorsal tegmental nucleus*
- LTM: Memória de longa-duração, do inglês: *Long-term memory*
- LTP: Potenciação de longa duração, do inglês: *Long-term potentiation*
- MECA: Mecamilamina, antagonista dos receptores colinérgicos nicotínicos
- MLA: Metilicconitina, antagonista dos receptores colinérgicos nicotínicos compostos somente por subunidades α
- mPFC: Córtex pré-frontal medial, do inglês: *medial pre-frontal cortex*
- MUS: Muscimol, agonista dos receptores gabaérgicos tipo A
- nAChR: Receptores colinérgicos nicotínicos, do inglês: *nicotinic acetylcholine receptor*
- NICO: Nicotina, agonista dos receptores colinérgicos nicotínicos
- NMDA: N-metil D-Aspartato
- PKA: proteína cinase dependente de AMPc, do Inglês: *AMPc-dependent protein kinase*
- PPN: Núcleo tegmental pedunculopontino, do inglês: *Pedunculopontino tegmental nucleus*
- SCH: SCH23390, antagonista dos receptores dopaminérgicos tipo D1/D5
- SKF: SKF38393, agonista dos receptores dopaminérgicos tipo D1/D5
- SNC: Sistema nervoso central
- TrKB: Receptor tirosina cinase B, do inglês: *Tirosine kinase receptor type 2*
- VEH: Veículo, do inglês: *Vehicle*
- VTA: Área tegmental ventral, do inglês: *Ventral tegmental area*

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	1
2.1 Qualificação do principal problema a ser abordado.....	1
2.2 Como persistem as memórias.....	2
2.3 Envelhecimento e cognição.....	4
3. Objetivos	5
3.1 Objetivo Geral.....	5
3.2 Objetivos específicos.....	6
4. Metodologia	6
5. Resultados e discussão	10
6. Conclusões	16
Referências	17
Anexo	24

1. Introdução

Os últimos 25 anos têm presenciado um avanço notável na neurobiologia da cognição. O advento de novas tecnologias para análise bioquímica, eletrofisiológica e comportamental trouxe base para pesquisas que, com o desenvolvimento de fármacos cada vez mais específicos, permitiram elucidar os mecanismos básicos da consolidação das memórias. Entretanto, os processos que atuam sob as memórias já formadas, com especial destaque para aqueles que medeiam seu armazenamento persistente, sua modificação e seu desaparecimento ainda foram pouco estudados. Assim, acredita-se que o armazenamento persistente das memórias depende da detecção de sua saliência comportamental. Especulações de índole teórica sugerem que a área tegmental ventral (VTA) e o hipocampo desempenham um papel fundamental neste processo (1). De fato, nosso laboratório descreveu recentemente a existência de uma fase tardia no processamento mnemônico durante a qual se determina a duração da memória. Esta fase é regulada por um circuito dopaminérgico que compreende a VTA e o hipocampo e cuja funcionalidade controla a síntese e liberação do fator trófico derivado do cérebro (BDNF) na região CA1 (1). Esta tese analisa as modificações que ocorrem nos componentes do circuito funcional VTA/hipocampo durante a fase de persistência, bem como a influência que diferentes estruturas corticais como o Córtex Pré Frontal Medial (mPFC) e o Núcleo Tegmental Pedunculopontino (PPN) têm sobre este circuito, para tentar descobrir porque algumas memórias de longa duração perduram mais do que outras. Assim, ao final do presente estudo, pretende-se ter acumulado o conhecimento básico que permita o desenvolvimento futuro de fármacos e estratégias terapêuticas para o tratamento de transtornos onde o armazenamento persistente das memórias seja parte central da fisiopatologia.

2. Revisão de Literatura

2.1 Qualificação do principal problema a ser abordado

Por que algumas memórias perduram apenas dias, enquanto outras persistem durante a vida toda (2, 3)? Uma vez armazenadas, estas memórias permanecem imutáveis ou podem ser alteradas para incorporar nova informação? O que ocasiona a falha dos substratos neurais que suportam o armazenamento do engrama? Estas e outras perguntas fundamentais estão começando a ser respondidas, e trabalhos realizados no nosso laboratório ocupam um lugar de destaque neste processo de descoberta. Este projeto visa, justamente, aprofundar nosso conhecimento sobre as três questões levantadas acima, que, além de sua importância em nível básico, têm enormes implicações clínicas. Assim, a elucidação dos processos envolvidos no armazenamento duradouro, e na modificação e falha seletiva da informação adquirida permitirá o desenvolvimento de terapias e fármacos visando o tratamento de transtornos caracterizados pela persistência exacerbada ou pela ausência de lembranças específicas.

2.2 Como persistem as memórias?

Experimentos realizados no nosso laboratório indicam que por volta de 12 horas após o aprendizado inicia-se no hipocampo uma fase do processamento mnemônico na qual se determina a duração da memória em questão (4). Esta fase requer a expressão de BDNF, fenômeno que parece ser suficiente para promover o armazenamento persistente do traço mnemônico (5, 6). O BDNF é uma pequena proteína pertencente à família das neurotrofinas que cumpre um papel crítico na regulação dos processos plásticos associados ao aprendizado (7, 8). Assim, a incubação com BDNF modula a neurotransmissão excitatória no hipocampo, facilitando a potenciação de longa duração (LTP; (9-11)), um dos substratos celulares da formação de memórias (12, 13). O BDNF também é capaz de induzir modificações do tipo estrutural, incluindo a ramificação axonal e a formação de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais da região CA1 (14-18). Estas ações do BDNF são mediadas pelo seu receptor, a tirosina cinase TrkB (19) e, assim como outros fenômenos iniciados pelo BDNF, requer AMPc para acontecer (20). Contudo, o BDNF não ativa diretamente as vias de sinalização mediadas por AMPc, nem induz sua formação (21-23), indicando que este nucleotídeo possui um efeito permissivo na sinalização mediada pelo BDNF. De fato, o AMPc regula positivamente a autofosforilação de TrkB, promovendo sua inserção na densidade pós-sináptica e aumentando o número de espinhas dendríticas nos neurônios hipocámpais (24). Interessantemente, estes efeitos também são induzidos pela estimulação de receptores dopaminérgicos de tipo D1/D5, sugerindo a existência de uma relação funcional entre a ativação destes receptores e BDNF no hipocampo.

A interação, em distintos níveis, entre o sistema dopaminérgico e o BDNF está bem documentada. Sabe-se que a administração sistêmica de haloperidol diminui os níveis de BDNF e TrkB no hipocampo (25, 26), e que a dopamina aumenta a expressão de BDNF em diferentes regiões do cérebro mediante um mecanismo que requer a ativação da via de sinalização AMPc/PKA/CREB (27-29). Por sua vez, o BDNF regula a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (30), estimula a expressão dos distintos receptores desta catecolamina (31, 32) e induz sua liberação no hipocampo (33, 34). Além disto, a maioria dos antidepressivos de ação dopaminérgica provoca um aumento na síntese de BDNF e ativa a sinalização mediada por TrkB (35), sugerindo que a regulação dopaminérgica desta sinalização é fundamental no controle do processamento de informação. De fato, o número de terminais dopaminérgicos é particularmente elevado no stratum lacunosum-moleculare da região CA1 (36, 37). Esta região apresenta abundante marcação para receptores D1 (38, 39) e D2 (40, 41), bem como a maquinaria enzimática encarregada de controlar a neurotransmissão dopaminérgica, incluindo proteínas recaptadoras (42), enzimas inativadoras (43), enzimas biossintéticas (44) e proteínas reguladoras (45).

A dopamina desempenha um papel fundamental no estabelecimento duradouro da LTP no hipocampo (46-48). Assim, o antagonista D1, SCH23390, acelera o decaimento da LTP na região CA1 (49) enquanto a infusão intra-hipocámpal do agonista D1, SKF38393, aumenta sua duração (50). Os efeitos da dopamina na LTP devem-se principalmente à sua ação sobre a transcrição mediada pela via de sinalização AMPc/Rap1/ERK/CREB e a síntese dendrítica de proteínas (51-54). Neste

contexto, é importante destacar que o bloqueio da degradação de BDNF também aumenta a duração da LTP no hipocampo (55, 56). A maioria das aferências dopaminérgicas do hipocampo provém da VTA.

O hipocampo, se conecta com o núcleo accumbens, o qual modula diretamente ou através do globo pálido a atividade dos neurônios dopaminérgicos da VTA, estabelecendo assim uma alça funcional que, acredita-se, regula a entrada da informação na memória de longa duração (1). A atividade desta alça estaria modulada pela novidade e relevância comportamental da informação adquirida, sugerindo que a regulação de sua funcionalidade poderia constituir um dos mecanismos mediante os quais o cérebro determina o armazenamento duradouro das memórias. A este respeito, nosso grupo recentemente demonstrou que, em ratos, uma memória aversiva que em condições normais deveria perdurar durante vários dias decai rapidamente quando se administra um antagonista de receptores D1 na região CA1 do hipocampo 12 horas, mas não imediatamente após o treino. Em contrapartida, a infusão de um agonista D1 no mesmo período crítico pós-treino, permite que uma memória que normalmente decairia rapidamente venha a persistir por mais de 14 dias (4). O efeito facilitador produzido pela ativação dos receptores D1 é acompanhado pela ativação da via AMPc/PKA/CREB e da tirosina hidroxilase, sendo mediado pelo BDNF na região CA1 do hipocampo dorsal e regulado pela dopamina liberada pelos terminais de neurônios provenientes da VTA tanto no momento do aprendizado como 12 horas após o mesmo. Isto sugere que a alça VTA/hipocampo é ativada especificamente durante o aprendizado de experiências emotivas relevantes e determina durante quanto tempo as memórias a elas associadas vão persistir. Este processo inicia-se no mesmo momento em que ocorre o evento a ser lembrado, dura pelo menos 12 h, e culmina com o aumento da funcionalidade da sinalização mediada pelo BDNF no hipocampo. Contudo, ainda não sabemos se a natureza do mesmo é cíclica ou fásica, e se envolve ou não a ocorrência de modificações plásticas dependentes da atividade como, por exemplo, a LTP. Fenômenos semelhantes à LTP, mas que demoram várias horas para se desenvolver, já foram descritos na VTA após a administração de drogas de abuso (57, 58) incluindo a nicotina (59, 60).

O sistema colinérgico é largamente distribuído no SNC, porém alguns locais são caracterizados por possuir vias colinérgicas específicas, como o estriado e o tronco cerebral (61). Dentre estas as estruturas que pertencem ao tronco cerebral, o núcleo tegmental laterodorsal (LDT) e o PPN se destacam por suas interações em processos cognitivos como aprendizado, atenção e recompensa (62). De fato, sabe-se que as aferências colinérgicas para a VTA provém do PPN e atuam sobre distintos subtipos de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) (63-65). Os nAChR neuronais podem ser homoméricos ou heteroméricos, dependendo da composição de suas subunidades (66), onde os complexos mais estudados são os receptores apenas com subunidades $\alpha 7$ ou conjuntos de subunidades α e β ($\alpha 4 \beta 2$) (67, 68). A interação do PPN com a região VTA parece também influenciar outros sistemas de neurotransmissores, podendo aumentar a resposta sináptica glutamatérgica na VTA (69) e regular a sinalização dopaminérgica em distintas áreas alvo, como o hipocampo dorsal (70). Estudos recentes sugerem que esta modulação glutamatérgica é derivada da interação entre as conexões sinápticas do mPFC para a VTA, atuando sobre receptores colinérgicos nicotínicos com subunidades $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) localizados nos terminais pré-sinápticos (59). Além de

ser o sistema excitatório mais abundante no SNC, estando presente entre 80 a 90% das sinapses (71), o sistema glutamatérgico possui uma importância vital para a plasticidade sináptica, já que a LTP depende da interação do neurotransmissor glutamato com o receptor NMDA para que se estabeleça um fortalecimento sináptico duradouro (72). Atualmente as teorias do aprendizado que melhor explicam a representação e armazenamento da memória no cérebro são os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na LTP (73).

2.3 Envelhecimento e Cognição

Envelhecimento é o acúmulo de modificações que acontecem em um organismo com o passar dos anos (74). Em humanos, esse processo refere-se a alterações de ordem física, psicológica e social. A senescência significa o envelhecimento normal, o qual nos permite conviver em harmonia com as limitações impostas pela idade avançada, mantendo-nos ativos e saudáveis até as fases tardias da vida. Porém, o conjunto de mudanças ocorridas durante o envelhecimento pode apresentar um padrão “anormal”, afetando progressivamente a qualidade de vida do idoso. Nesse caso, considera-se que existe um processo diferente, ao qual chamamos senilidade. É importante que se possa distinguir entre as alterações que fazem parte da individualidade de cada pessoa e não causam grandes males ao bem-estar daquelas com características patológicas (75).

Estudos experimentais em animais e humanos sugerem que os declínios cognitivos associados ao envelhecimento normal, isto é, à senescência, são derivados de alterações estruturais e moleculares específicas, como modificações na morfologia e na sobrevivência neuronal.

A morte neuronal relacionada à senescência parece limitar-se a uma diminuição leve (<10%) em regiões específicas do SNC (76), não ocorrendo morte neuronal generalizada (77). As evidências sobre modificações pontuais na morfologia neuronal ainda são escassas, porém alguns estudos a este respeito são muito relevantes, uma vez que demonstram que durante o envelhecimento há diminuição no número e no comprimento dos espinhos dendríticos, assim como redução na densidade axonal e degradação estrutural nas bainhas de mielina (78). Além disso, há indícios de que o acúmulo de alterações ocorre com maior intensidade em algumas regiões do cérebro como, por exemplo, em áreas do prosencéfalo (79).

Diferentes sistemas de neurotransmissores como o dopaminérgico, o glutamatérgico e principalmente o colinérgico estão envolvidos com o envelhecimento e suas consequências.

A hipótese colinérgica das disfunções mnemônicas associadas ao envelhecimento proposta por Bartus e colaboradores em 1982, hipotetiza que os distúrbios da transmissão colinérgica em pacientes com demência sejam os responsáveis ou desempenham um papel importante nos déficits de memória e problemas cognitivos (80).

Desde esta publicação, muitos esforços estão sendo feitos para esclarecer como as alterações que ocorrem durante o envelhecimento afetam o sistema colinérgico, e se estas mudanças interferem no processamento cognitivo. Estudos sugerem que manipulações farmacológicas do sistema colinérgico podem causar alterações no padrão de ativação de estruturas cerebrais, porém

dependem da tarefa realizada (81, 82). Neste mesmo contexto, outros trabalhos indicam que a idade altera o perfil da atividade cerebral o que também depende da tarefa experimental empregada (83). As inervações colinérgicas são originados a partir de núcleos do prosencéfalo basal e do tronco cerebral, comunicando-se com grandes regiões corticais (e.g. córtex cingulado), o hipocampo, o tálamo e áreas dopaminérgicas do mesencéfalo (e.g. VTA) (84-86).

A conexão entre o PPN e a VTA acontece basicamente através da transmissão colinérgica. Com isso, alterações na comunicação entre estas regiões durante o envelhecimento podem trazer danos à transmissão colinérgica e interferir no processo de aprendizado e na formação do traço mnemônico (87). Estas evidências mostram a importância do sistema colinérgico no processamento sensorial e mnemônico durante o envelhecimento.

Alterações em outros sistemas de neurotransmissores ligados diretamente a VTA também possuem importância fisiológica, como é o caso dos sistemas dopaminérgico (88, 89) e glutamatérgico (90). Acredita-se que ao longo do processo de envelhecimento ocorram modificações na densidade cerebral de marcadores de atividade dopaminérgica, como os receptores D1 e D2 e o transportador de dopamina (91), assim como alterações no padrão de liberação de dopamina (92, 93).

As alterações no sistema glutamatérgico estão relacionadas em grande parte com a atividade do mPFC, o qual é muito vulnerável à influência do envelhecimento (94). Mesmo durante o envelhecimento normal, as funções cognitivas dependentes desta região cortical são afetadas como, por exemplo, a memória de trabalho em humanos (95-98), em primatas (99, 100) ou até mesmo em roedores (101, 102).

Estudos sobre a fisiologia dos processos cognitivos associados ao envelhecimento têm sido muito importantes para aumentar o conhecimento sobre os mecanismos básicos que mudam ao longo do tempo.

A busca de esclarecimentos a este respeito ajuda também a entender o mecanismo de doenças neurodegenerativas com ou sem déficits cognitivos associados. Mesmo com a evolução da pesquisa básica, os mecanismos destas interações sobre o processo do envelhecimento continuam desconhecidos, sendo necessários mais estudos para solucionar questões dúbias.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo central desta tese é aprofundar o conhecimento a respeito da fase de persistência da memória, estudando especialmente o papel desempenhado pelas conexões dopaminérgicas entre a VTA e o hipocampo, e sua regulação pelo mPFC, e PPN. Para tanto avaliamos as seguintes hipóteses:

A alça dopaminérgica VTA/hipocampo controla o armazenamento da informação mediante a potenciação da eficácia da regulação glutamatérgica dos neurônios da VTA que liberam

dopamina na região CA1 do hipocampo. Esta potenciação é regulada pela neurotransmissão colinérgica nicotínica e pela neurotransmissão glutamatérgica proveniente do mPFC.

A potenciação iniciar-se-ia no momento do aprendizado e alcançaria sua plenitude aproximadamente 12h mais tarde, induzindo no hipocampo a ativação da maquinaria transcricional e traducional que levaria à expressão tardia de BDNF e facilitaria o estabelecimento de novas conexões sinápticas entre a VTA e os neurônios piramidais da região CA1.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da estimulação e do bloqueio do sistema nicotínico de maneira não específica em VTA, assim como a sua interação com o sistema dopaminérgico na região CA1 do hipocampo dorsal, sobre a persistência de uma memória aversiva.
- Analisar as alterações comportamentais provenientes das modulações farmacológicas na VTA, analisando a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, bem como a participação do sistema colinérgico nicotínico de tipo $\alpha 7$ neste processo.
- Determinar o efeito da inativação temporária do PPN na persistência da memória, analisando o efeito destas manipulações do ponto de vista comportamental sobre a persistência de uma memória aversiva.
- Determinar o efeito da inativação temporária do mPFC na persistência da memória, analisando o efeito destas manipulações sobre a liberação de acetilcolina na VTA e de dopamina na região CA1 do hipocampo dorsal.

4. Metodologia

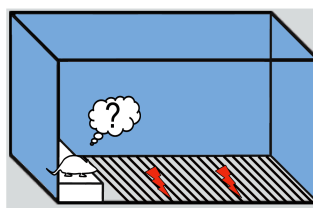
Para cumprir os objetivos propostos utilizamos a tarefa de esquiva inibitória de sessão única (EI) como modelo experimental. O conhecimento que o nosso grupo acumula a respeito dos sistemas neurais envolvidos no processamento deste tipo de memória, com suas características metodológicas, fazem da tarefa de EI uma escolha obrigatória. Dentre essas características destacam-se:

- Esta tarefa está baseada em um comportamento universal e inato: a aversão produzida pelo medo (103).
- Para a aquisição da resposta de esquiva é necessário somente uma sessão de treino, o que permite distinguir claramente entre os eventos relacionados com a consolidação e aqueles envolvidos com a persistência do traço, o que é impossível utilizando paradigmas de múltiplas sessões (3).
- A intensidade e a duração da sessão de treino podem ser controladas com conseqüências previsíveis na magnitude e persistência da resposta aprendida, o qual facilita a análise correlativa dos dados comportamentais (5, 6).

O treino foi realizado em uma caixa de madeira (50 x 25 x 25 cm) com um painel frontal de acrílico e um piso formado por uma grade de barras metálicas conectadas a uma fonte de corrente elétrica (Figura 1). Em um extremo desta caixa e sobre a mencionada grade localiza-se uma plataforma de 5 cm de altura e 8 cm de largura. Durante a sessão de treino o rato é colocado na plataforma. Respondendo a uma tendência inata, o rato desce da plataforma para explorar o restante da caixa de treino e, no momento em que coloca suas quatro patas sobre a grade, recebe um choque elétrico. Assim, em apenas uma sessão, os animais aprendem a não descer da plataforma para evitar o choque. Durante a sessão de teste os animais foram expostos ao mesmo ambiente, e o aprendizado foi medido pelo tempo em que o animal leva para descer da plataforma (latência; (5)). O tempo máximo da sessão de teste é de 300 segundos, onde o animal explora livremente a plataforma. Nesta etapa os animais são retirados da caixa sem receber qualquer tipo de choque.

Esquiva Inibitória

Treino



Teste

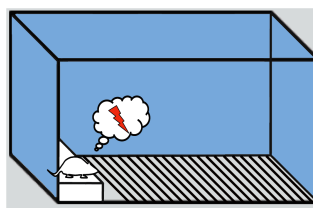


Figura 1: Protocolo de treinamento e teste na tarefa de esquiva inibitória.

Em todos os experimentos utilizamos ratos Wistar machos de 3 meses de idade. Cânulas foram implantadas bilateralmente mediante a utilização de um aparelho de cirurgia estereotáxica (Kopf® Instruments). Durante o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos anestesiados e sedados empregando-se xilazina (13 mg/kg; i.p.) e ketamina (100 mg/kg; i.p.). As coordenadas utilizadas neste trabalho foram (em mm): CA1 (AP -4,2/ LL \pm 3,0/ DV -3,0), VTA (AP -4,8/ LL \pm 1,0/ DV -9,0), mPFC (AP +3,2/ LL \pm 0,8/ DV -4,0) e PPN (AP -8,0/ LL \pm 2,0/ DV -8,0), as quais foram definidas em estudos prévios (ver *curriculum vitae* do orientador) a partir de um atlas anatômico para ratos (104). Todos os animais passaram por um período de recuperação pós cirúrgico de aproximadamente 5 dias para se recuperar do procedimento cirúrgico e para que o efeito analgésico não interferisse nos experimentos comportamentais.

Os animais foram divididos em dois grupos onde a intensidade do choque durante o treino foi variada: um grupo recebeu um choque fraco (0,4 mA) e o outro, um choque forte (0,8 mA) durante 2 s (Figura 2). Demonstrou-se previamente que este procedimento induz a formação de traços mnemônicos de durações diferentes (5). Os animais receberam, então, microinjeções bilaterais através das cânulas posicionadas previamente nas regiões de interesse. Os fármacos que foram infundidos na região CA1 do hipocampo dorsal são: SCH23390 (SCH; 1,5 µg/lado), SKF38393 (SKF; 12,5 µg/lado) e BDNF (0,25 µg/lado); na VTA foram infundidos: nicotina (NICO; 0,5, 3 e 6 µg/lado), mecamilamina (MECA; 1, 5 e 10 µg/lado), metilicaconitina (MLA; 30 µg/lado), dihidro-β-eritroidina (DHβE; 30 µg/lado) e NMDA (0,2 µg/lado); no mPFC e no PPN o fármaco infundido foi muscimol (MUS) na concentração de 0,5 µg/lado. Todos os fármacos utilizados neste estudo foram infundidos 12 horas após o treinamento na tarefa de esquivas inibitória. Os volumes infundidos em cada hemisfério foram variados: 1 µl na região CA1, 0,5 µl na VTA, no mPFC e no PPN.

Os animais foram testados 2 e/ou 14 dias após o treinamento na tarefa descrita acima, para que se pudessemos discernir entre o período de formação/consolidação da memória e o período que consideramos longo o suficiente para que possamos chamá-lo de persistência (Figura 2).

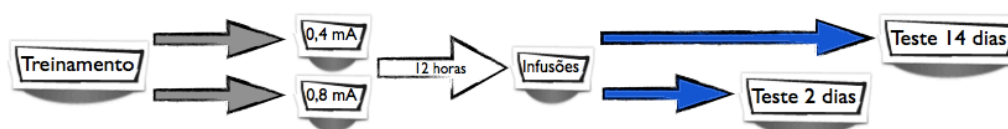


Figura 2: Ilustração dos diferentes tipos de treinos (setas cinza) e testes (setas azuis) utilizado neste estudo, assim como a janela de intervenção farmacológica utilizada nos experimentos (seta branca).

Para determinar se algum efeito observado não é devido à influência dos estados de ansiedade ou atividade locomotora e exploratória, foram empregadas as tarefas de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Para a tarefa do campo aberto, os animais foram colocados em um aparato comportamental que consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente. O assoalho da caixa é dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície. Durante o experimento, o animal é gentilmente colocado na arena do campo aberto, a qual ele pode explorar livremente por 5 min. Durante este tempo registraram-se o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras (em inglês rearings), comportamentos que nos roedores denotam exploração (105). Já a tarefa do labirinto em cruz elevado consiste em uma plataforma em cruz com 40 cm de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura. Dois braços do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. O animal é colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5

min. Registra-se, então, o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados (naturalmente menos aversivos a roedores) e maior também o número de entradas nestes braços (106). Estas tarefas comportamentais são utilizadas corriqueiramente nos trabalhos do nosso grupo de pesquisa, com isso os resultados que serão apresentados nesta tese são relativos aos grupos experimentais que nunca haviam sido submetidos a estes testes. Os grupos experimentais testados são: animais que receberam infusões de nicotina na VTA (Tabela 1) e os animais que receberam infusões no PPN (Tabela 2).

	VEH	NICO
1	15.2 ± 0.9	13.65 ± 0.9
2	8.5 ± 0.8	7.0 ± 0.7
3	41.6 ± 3.7	46.9 ± 8.3
4	42.0 ± 7.9	48.6 ± 8.4
5	16.7 ± 2.0	20.2 ± 3.6

Tabela 1: A Infusão de NICO na VTA não apresenta efeito sobre a atividade locomotora e exploratória ou sobre o estado de ansiedade. NICO (6µg/lado) ou veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) foram infundidos na VTA 14 dias antes da exposição às tarefas de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Os dados são expressos como média ± erro padrão do número total de entradas (1), número de entradas nos braços abertos (2) e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (3), Labirinto em cruz elevado; n = 8 por grupo, e o número de cruzamentos e elevações (4 e 5), Campo aberto; n = 8 por grupo, teste *t* de Student. Diferentes grupos de animais foram utilizados para cada teste comportamental.

	VEH	MUS (PPN)
1	13.9 ± 0.8	13.0 ± 0.8
2	8.0 ± 0.7	7.5 ± 0.8
3	44.3 ± 7.4	45.4 ± 7.9
4	48.3 ± 8.1	45.2 ± 7.9
5	19.8 ± 3.1	21.9 ± 3.3

Tabela 2: Infusões de MUS no PPN não apresenta efeito sobre a atividade locomotora e exploratória ou sobre o estado de ansiedade. MUS (1µg/lado) ou veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) foram infundidos no PPN 14 dias antes da exposição às tarefas de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Os dados são expressos como média ± erro padrão do número total de entradas (1), número de entradas nos braços abertos (2) e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (3), Labirinto em cruz elevado; n = 8-10 por grupo, e o número de cruzamentos e elevações (4 e 5), Campo aberto; n = 8-10 por grupo, teste *t* de Student. Diferentes grupos de animais foram utilizados para cada teste comportamental.

Os animais utilizados nos experimentos foram submetidos a análise histológica para determinação exata do posicionamento das cânulas, e os animais onde o posicionamento das cânulas foi incorreto, foram excluídos das análises. Para o procedimento histológico, os animais

foram infundidos com azul de toluidina 5% e, após 15 minutos, os cérebros foram removidos e congelados em isopentano resfriado a -80°C em nitrogênio líquido. Foram obtidos cortes seriados de $40\ \mu\text{m}$ em um criostato (CM3050S, Leica Microsystems, Munique, Alemanha), os quais foram montados em lâminas seguindo o protocolo histoquímico de acetilcolinesterase (104, 107). As lâminas foram analisadas em um microscópio (Leica DM5000B), onde as estruturas cerebrais foram visualizadas com o auxílio do atlas (104). Foi identificada a lesão causada pela cânula, e o ponto das infusões determinado pelo corante previamente infundido nos animais.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Os dados obtidos na tarefa de esquiva inibitória foram expressos como mediana \pm intervalo interquartilico, e analisados mediante estatística não paramétrica (teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn, dependendo do número de grupos comparados), já que a variável em estudo (i.e. a latência de descida da plataforma) não segue uma distribuição normal nem cumpre com o requerimento de homocedasticidade (igualdade das variâncias). Os dados da tarefa de campo aberto e do labirinto em cruz elevado foram expressos como média \pm erro padrão e foram analisados utilizando-se testes paramétricos (teste *t* de Student ou ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnet, dependendo do número de grupos comparados). Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados e Discussão

Um treinamento leve ($0,4\ \text{mA}$, $2\ \text{s}$) na tarefa de EI gera uma memória de aversão que decai rapidamente, durando não mais de 2 dias. Entretanto, o treinamento forte ($0,8\ \text{mA}$, $2\ \text{s}$) induz uma LTM com maior durabilidade, persistindo por 14 dias ou mais (Figura 3).

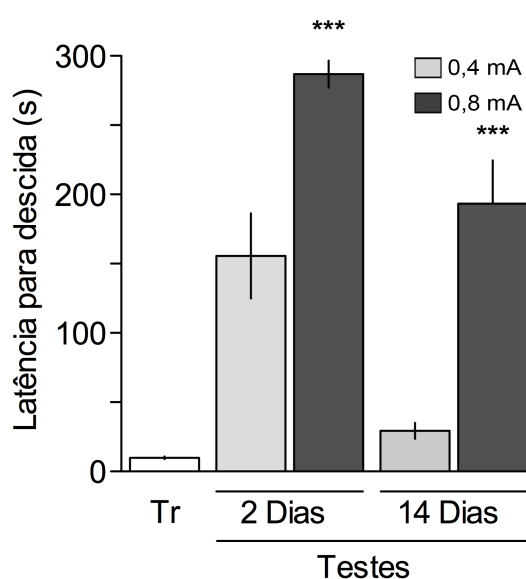


Figura 3. O treinamento com choques de diferentes intensidades altera a durabilidade do traço mnemônico. Os animais foram treinados na tarefa de EI com um choque leve ($0,4\ \text{mA}/2\text{s}$) ou um choque forte ($0,8\ \text{mA}/2\text{s}$) e a LTM foi medida por meio de testes 2 e 14 dias após o treino. Os dados estão apresentados como média \pm SEM; $n=8-10$ por grupo. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ no teste de Dunnet após ANOVA.

A infusão de nicotina intra-VTA, 12 horas após um treinamento leve na tarefa de EI, na dose de 12µg/µl, mas não em doses mais baixas (1 e 6µg/µl) melhora a persistência de uma memória aversiva nos animais testados aos 14 dias após o treino. Os animais que foram testados 2 dias após o treino não apresentaram diferença significativa (Figura 4). Estes resultados nos indicam que a ativação dos nAChR modulam positivamente a persistência do traço mnemônico, porém não interfere na consolidação e/ou formação do traço mnemônico. Outros trabalhos sugerem que a nicotina interfere diretamente na memória de curta duração (STM), aquisição e consolidação da LTM em macacos, ratos e camundongos (108), assim como em outros animais inferiores (109). Entretanto este resultado parece dever-se a janela temporal de administração das drogas.

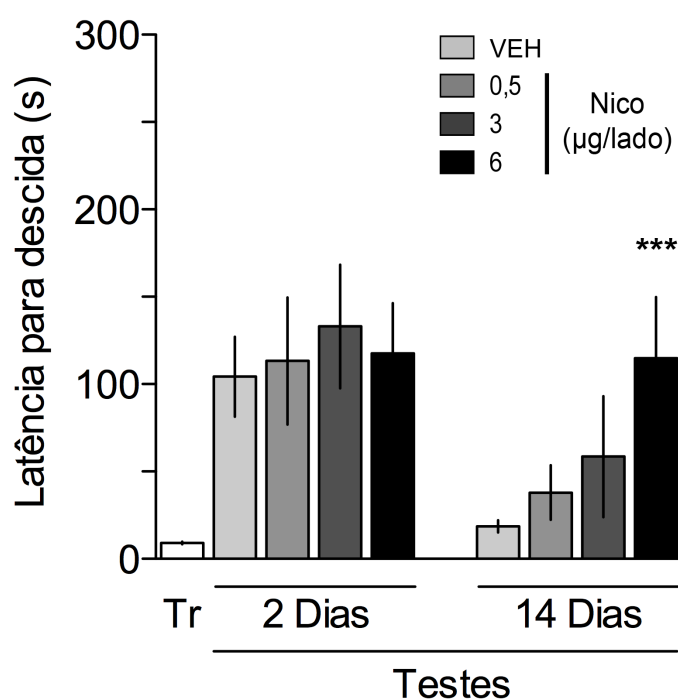


Figura 4. Nicotina melhora a persistência de uma memória aversiva. Os animais foram treinados na tarefa de EI, utilizando um choque leve (0.4mA/2s) e 12 horas mais tarde receberam infusões intra-VTA de nicotina (NICO) ou veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina). Os animais foram testados 2 ou 14 dias após o treinamento. Os dados estão apresentados como média \pm SEM; n=8-10 por grupo. ***P < 0.001, **P < 0.01 e *P < 0.05 no teste de Dunnet após ANOVA.

Inversamente, quando infundimos mecamilamina, um antagonista não-específico dos nAChR, na região VTA 12 horas após um treinamento forte na tarefa de EI, na dose de 20 µg/µl, mas não nas doses de 2 ou 10µg/µl. Da mesma forma que o experimento anterior, o grupo de animais testados 2 dias após o treinamento não apresentaram diferença significativa entre o grupo que recebeu a droga e o grupo controle (Figura 5). Este conjunto de resultados demonstram que a ativação dos nAChR 12 horas após o treinamento interferem no armazenamento duradouro do traço mnemônico, porém não interferindo na formação deste mesmo traço.

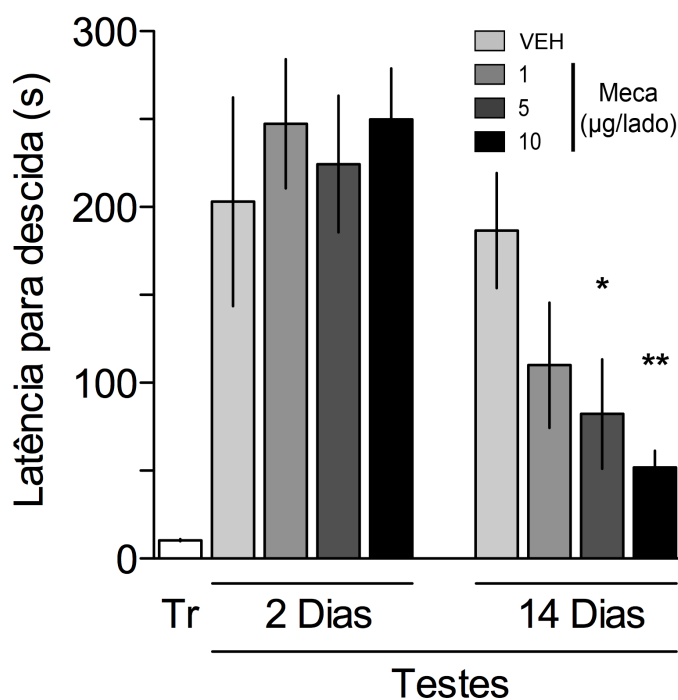


Figura 5. Mecamilamina prejudica a durabilidade do traço mnemônico. Os animais foram treinados na tarefa de EI com um choque forte (0.8mA/2s) e 12 horas após receberam infusões de veículo (VEH; 0.1 % de DMSO em salina) ou mecamilamina (MECA) intra-VTA. Os animais foram testados 2 ou 14 dias após o treinamento. Os dados estão apresentados como média \pm SEM; n=8-10 por grupo. ***P < 0.001, **P < 0.01 e *P < 0.05 no teste de Dunnet após ANOVA.

Porém, o efeito da ativação dos nAChR nos processos cognitivos parece dever-se a uma ativação específica de nAChR, de acordo com o conjunto de subunidades que compõe o receptor e com a localização desses receptores (110-112). Para comprovarmos esta hipótese, infundimos intra-VTA de MLA, um antagonista de nAChR com subunidades $\alpha 7$, na dose de 120 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 12 horas após um treinamento forte na tarefa de EI apresentaram um prejuízo na retenção persistente desta memória (Figura 6). Este mesmo resultado não se repetiu quando infundimos intra-VTA, DH β E, um antagonista de nAChR com combinações de subunidades alfa e beta na dose de 120 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durante a mesma janela farmacológica (Figura 6). Este resultado nos sugere que os receptores contendo somente subunidades $\alpha 7$ são responsáveis pela modulação da persistência do traço mnemônico. Ao ser ativada, a região VTA libera dopamina na região CA1 do hipocampo dorsal interagindo diretamente com receptores presentes nesta região e fortalecendo a retenção da memória (4). A presença de nAChR na VTA nos leva a crer que existe uma relação próxima entre o papel desempenhado pela dopamina na persistência da memória e os nAChR.

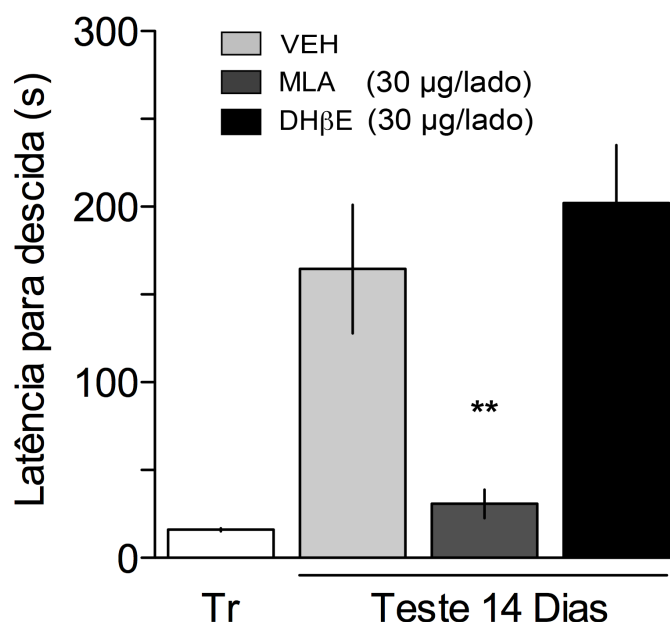


Figura 6. O bloqueio dos receptores nicotínicos compostos por subunidades do tipo $\alpha 7$ prejudica a persistência da memória. Os animais foram treinados na tarefa de EI com um choque forte (0.8mA/2s) e receberam infusões intra-VTA de veículo (VEH; 0.1% de DMSO em salina), metilcaconitina (MLA) ou Dihidro- β -Eritroidina (DH β E) 12 horas mais tarde. Os animais foram testados 14 dias após o treino. Os dados estão apresentados como média \pm SEM; n=8-10 por grupo. ***P < 0.001, **P < 0.01 e *P < 0.05 no teste de Dunnet após ANOVA.

Para isso, realizamos alguns experimentos com coinfusões de distintos fármacos em diferentes regiões do encéfalo. No primeiro experimento os animais foram infundidos com nicotina intra-VTA concomitante com a infusão intra-CA1 de SCH23390, um antagonista de receptores D1/D5, na dose de 1.5 μ g/ μ l, 12 horas após um treino leve na tarefa de esquiva inibitória. O bloqueio dos receptores D1/D5, pela infusão de SCH23390 reverte o efeito pró-mnésico que havíamos encontrado com a ativação dos nAChR (Figura 7). Da mesma forma, o prejuízo mnemônico causado pela infusão intra-VTA de mecamilamina, 12 horas após um treinamento forte, é revertido pela infusão intra-CA1 de um agonista de receptores D1/D5, SKF38393, na dose de 12.5 μ g/ μ l durante a mesma janela temporal (Figura 8).

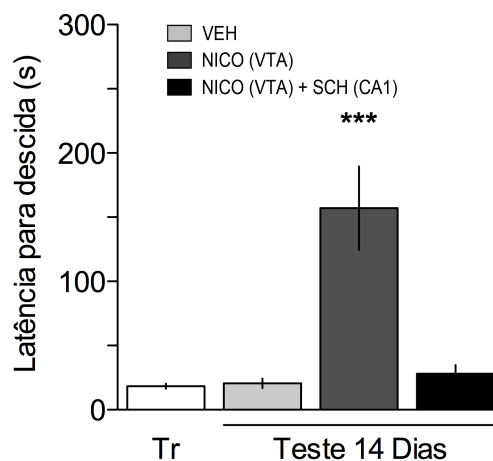


Figura 7. O efeito pró-mnésico da infusão intra-VTA de nicotina é revertido pelo bloqueio da atividade dos receptores dopaminérgicos D1/D5 no hipocampo dorsal. Os animais foram treinados na tarefa de EI com um choque leve (0.4mA/2s) e 12 horas mais tarde receberam infusões bilaterais de veículo (VEH; 0.1% de DMSO) na VTA e na região CA1 ou nicotina (NICO; 6 µg/lado) na VTA mais VEH na região CA1, ou NICO na VTA mais SCH23390 (SCH; 1.5 µg/lado) no hipocampo dorsal. Os animais foram testados 14 dias após o treino. Os dados estão apresentados como média ± SEM; n=8-10 por grupo. ***P < 0.001, **P < 0.01 e *P < 0.05 no teste de Dunnet após ANOVA.

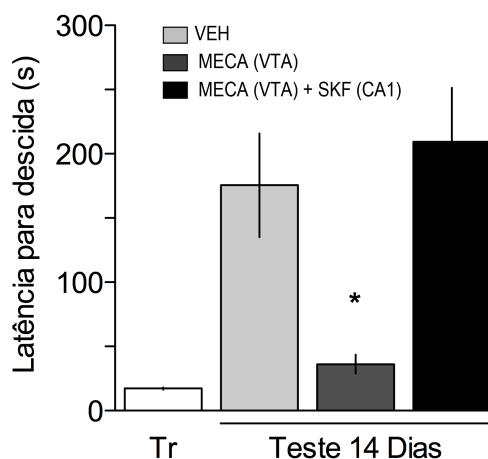


Figura 8. O efeito amnésico da infusão intra-VTA de mecamilamina é revertido pela ativação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 no hipocampo dorsal. Os animais foram treinados na tarefa de EI com um choque forte (0.8mA/2s) e 12 horas mais tarde receberam infusões bilaterais de veículo (VEH; 0.1% de DMSO) na VTA e na região CA1 ou mecamilamina (MECA; 10 µg/lado) na VTA mais VEH na região CA1, ou NICO na VTA mais SKF38393 (SKF; 12.5 µg/lado) no hipocampo dorsal. Os animais foram testados 14 dias após o treino. Os dados estão apresentados como média ± SEM; n=8-10 por grupo. ***P < 0.001, **P < 0.01 e *P < 0.05 no teste de Dunnet após ANOVA.

Alguns estudos neuroanatômicos demonstraram que os nAChR com subunidades $\alpha 7$ parecem estar localizados principalmente em terminais glutamatérgicos na região VTA enquanto os nAChR formados por subunidades α e β parecem estar localizados nos terminais pós-sinápticos em neurônios dopaminérgicos da VTA e também em neurônios gabaérgicos em pré-terminais ou até mesmo no soma destes neurônios (113). Para tentar entender a importância do sistema glutamatérgico na persistência de uma memória aversiva, inativamos de modo reversível o mPFC através da infusão de Muscimol, um agonista GABAa, na dose de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, na mesma janela temporal que realizamos todos os experimentos comportamentais. Esta inativação prejudicou a persistência desta memória aversiva. Este efeito prejudicial foi revertido com a coinfusão de NMDA, um agonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, intra-VTA na dose de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, simultaneamente com a administração de muscimol no mPFC (Figura 9A). O mesmo resultado foi encontrado quando coinfundimos muscimol no mPFC e nicotina intra-VTA (Figura 9A). Seguindo essa mesma linha de experimentos, coinfundimos muscimol no mPFC e SKF38393 ou BDNF (Neurotrofina Derivada do Cérebro) na região CA1 do hipocampo. Tanto a infusão de SKF38393, quanto a infusão de BDNF reverteram o prejuízo causado pela inativação do mPFC 12 horas após o treinamento (Figura 9B).

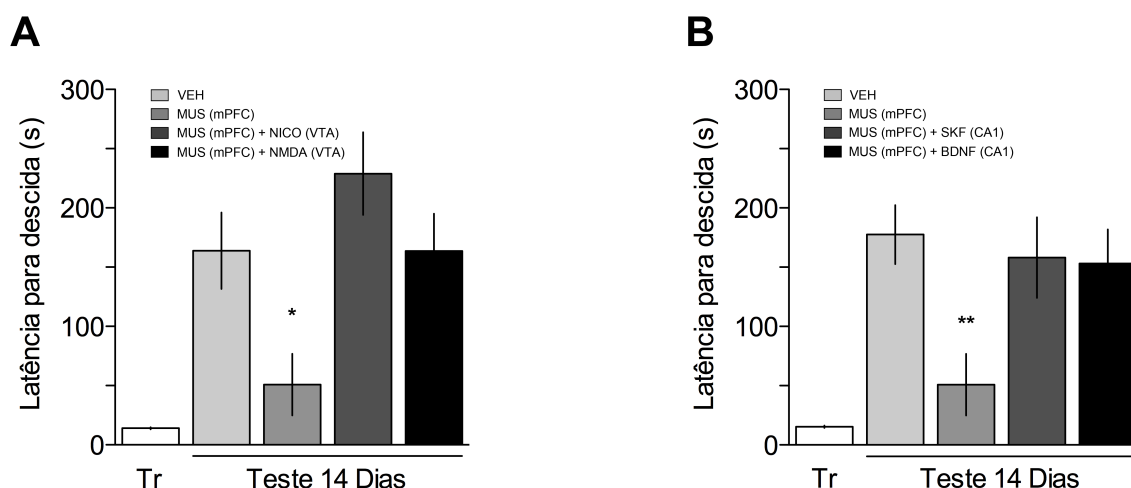


Figura 9. A inativação tardia do mPFC prejudica a persistência da LTM e este efeito pode ser revertido pela estimulação da alça VTA-hipocampo ou pela administração de BDNF. Os animais foram treinados na tarefa de EI com um choque forte. A LTM foi avaliada 14 dias após o treino. (A) 12 horas após o treinamento os animais receberam infusões de veículo (VEH; 0.1% de DMSO em salina) no mPFC e na VTA ou muscimol (MUS; 0.5 $\mu\text{g}/\text{lado}$) no mPFC mais VEH na VTA, ou MUS no mPFC mais nicotina (NICO; 6 $\mu\text{g}/\text{lado}$) intra-VTA, ou MUS no mPFC mais NMDA (0.2 $\mu\text{g}/\text{lado}$) na VTA. (B) 12 horas após o treinamento os animais receberam infusões de veículo (VEH; 0.1% de DMSO em salina) no mPFC e na região CA1 do hipocampo ou muscimol (MUS; 0.5 $\mu\text{g}/\text{lado}$) no mPFC mais VEH na região CA1, ou MUS no mPFC mais SKF38393 (SKF; 12.5 $\mu\text{g}/\text{lado}$) intra-CA1, ou MUS no mPFC mais BDNF (0.25 $\mu\text{g}/\text{lado}$) no hipocampo dorsal. Os dados estão apresentados como média \pm SEM; n=8-10 por grupo. ***P < 0.001, **P < 0.01 e *P < 0.05 no teste de Dunnet após ANOVA.

Além disso, alguns estudos eletrofisiológicos demonstraram previamente que a ativação de nAChR com subunidades $\alpha 7$ aumentam a sinalização glutamatérgica na VTA (59, 114), em neurônios dopaminérgicos e não dopaminérgicos (69). Foi demonstrado que a VTA recebe inervações colinérgicas do Núcleo Tegmental Pedunculopontino em ratos e macacos (64, 65, 115). O PPN também envia projeções para o Tálamo, Núcleos da Base, entre outras regiões (63). A inativação

reversível do PPN através da infusão de muscimol, 12 horas após um treinamento forte prejudica a persistência do traço mnemônico. Este efeito amnésico causado pela inativação transitória do PPN é revertido quando coinfundimos nicotina intra-VTA, ou SKF38393 intra-CA1 12 horas após o treinamento (Figura 10).

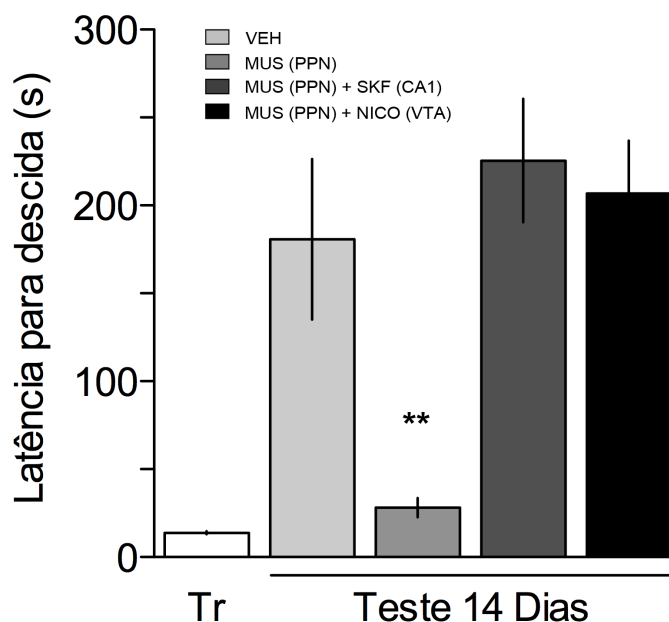


Figura 10. A inativação reversível do PPN prejudica a persistência do traço mnemônico e pode ser revertida pela ativação da alça VTA-hipocampo. Os animais foram treinados na tarefa de EI com um choque forte. A LTM foi avaliada 14 dias após o treino. 12 horas após o treinamento os animais receberam infusões de veículo (VEH; 0.1% de DMSO em salina) no PPN, na VTA e na região CA1 ou muscimol (MUS; 0.5 µg/lado) no PPN mais VEH na VTA, ou MUS no PPN mais nicotina (NICO; 6 µg/lado) intra-VTA, ou MUS no PPN mais SKF38393 (SKF; 12.5 µg/lado) na região CA1 do hipocampo. Os dados estão apresentados como média ± SEM; n=8-10 por grupo. ***P < 0.001, **P < 0.01 e *P < 0.05 no teste de Dunnet após ANOVA.

Conclusões

Os nossos resultados sugerem que o recrutamento do sistema colinérgico nicotínico, derivado do PPN, regula a persistência do traço mnemônico aversivo através da ativação específica dos nAChR com subunidades $\alpha 7$, modulando positivamente a atividade dos neurônios dopaminérgicos localizados na região VTA. Esta modulação promove um aumento na liberação de dopamina na região CA1, ativando os receptores dopaminérgicos D1/D5 e aumentando a liberação de BDNF, o qual é essencial para o armazenamento de longa duração de uma memória aversiva.

Referências Bibliográficas

1. Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*. 2005;46(5):703-13. Epub 2005/06/01.
2. McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science*. 2000;287(5451):248-51.
3. Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk L, Gonzalez C, Dorman G, Cammarota M, et al. Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotox Res*. 2010;18(3-4):377-85. Epub 2010/02/13.
4. Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*. 2009;325(5943):1017-20. Epub 2009/08/22.
5. Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*. 2007;53(2):261-77.
6. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato J, Goldin A, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2711-6.
7. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(1):24-32.
8. Lu L, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y. A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J Neurosci*. United States 2004. p. 1604-11.
9. Lessmann V, Gottmann K, Heumann R. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport*. 1994;6(1):21-5.
10. Takei N, Sasaoka K, Inoue K, Takahashi M, Endo Y, Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis-associated proteins in cultured cortical neurons from embryonic rats. *J Neurochem*. 1997;68(1):370-5.
11. Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 1996;381(6584):706-9.
12. Malenka RC. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1003:1-11.
13. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006;313(5790):1093-7.
14. Cohen-Cory S, Fraser SE. Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature*. 1995;378(6553):192-6.
15. Gallo G, Letourneau PC. Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *J Neurosci*. 1998;18(14):5403-14.
16. McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:295-318.

17. Cabelli RJ, Hohn A, Shatz CJ. Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science*. 1995;267(5204):1662-6.
18. Tyler WJ, Pozzo-Miller LD. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci*. 2001;21(12):4249-58.
19. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:609-42.
20. Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron*. 1995;15(4):805-19.
21. Gaiddon C, Loeffler JP, Larmet Y. Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. *J Neurochem*. 1996;66(6):2279-86.
22. Brewer GJ. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res*. 1995;42(5):674-83.
23. Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, Neale E, Pozzo-Miller L, Lu B. Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2001;276(40):37585-93.
24. Ji Y, Pang PT, Feng L, Lu B. Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat Neurosci*. 2005;8(2):164-72.
25. Angelucci F, Mathé AA, Aloe L. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor TrkB in rat brain are significantly altered after haloperidol and risperidone administration. *J Neurosci Res*. 2000;60(6):783-94.
26. Dawson NM, Hamid EH, Egan MF, Meredith GE. Changes in the pattern of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the rat brain after acute and subchronic haloperidol treatment. *Synapse*. 2001;39(1):70-81.
27. Fumagalli F, Racagni G, Colombo E, Riva MA. BDNF gene expression is reduced in the frontal cortex of dopamine transporter knockout mice. *Mol Psychiatry*. 2003;8(11):898-9.
28. Juric DM, Miklic S, Carman-Krzan M. Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Brain Res*. 2006;1108(1):54-62.
29. Zhang X, Andren PE, Svenningsson P. Repeated l-DOPA treatment increases c-fos and BDNF mRNAs in the subthalamic nucleus in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 2006;1095(1):207-10.
30. Pei Y, He X, Xie Z. Survival and differentiation of dopaminergic neurons can be regulated by soluble factors from cortex in vitro. *Neuroreport*. 2004;15(12):1847-50.
31. Brito V, Beyer C, Küppers E. BDNF-dependent stimulation of dopamine D5 receptor expression in developing striatal astrocytes involves PI3-kinase signaling. *Glia*. 2004;46(3):284-95.
32. Guillin O, Demily C, Thibaut F. Brain-derived neurotrophic factor in schizophrenia and its relation with dopamine. *Int Rev Neurobiol*. 2007;78:377-95.

33. Bustos G, Abarca J, Campusano J, Bustos V, Noriega V, Aliaga E. Functional interactions between somatodendritic dopamine release, glutamate receptors and brain-derived neurotrophic factor expression in mesencephalic structures of the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;47(1-3):126-44.
34. Paredes D, Granholm AC, Bickford PC. Effects of NGF and BDNF on baseline glutamate and dopamine release in the hippocampal formation of the adult rat. *Brain Res.* 2007;1141:56-64.
35. Castrén E, Vöikar V, Rantamäki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(1):18-21.
36. Gasbarri A, Packard MG, Campana E, Pacitti C. Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Res Bull.* 1994;33(4):445-52.
37. Gasbarri A, Sulli A, Packard MG. The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1997;21(1):1-22.
38. Gingrich JA, Dearry A, Falardeau P, Bates MD, Fremeau RT, Caron MG. Location and molecular cloning of D1 dopamine receptor. *Neurochem Int.* 1992;20 Suppl:9S-15S.
39. Huang YY, Kandel ER. D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(7):2446-50.
40. Mengod G, Villaró MT, Landwehrmeyer GB, Martínez-Mir MI, Niznik HB, Sunahara RK, et al. Visualization of dopamine D1, D2 and D3 receptor mRNAs in human and rat brain. *Neurochem Int.* 1992;20 Suppl:33S-43S.
41. Yokoyama C, Okamura H, Nakajima T, Taguchi J, Iyata Y. Autoradiographic distribution of [3H]YM-09151-2, a high-affinity and selective antagonist ligand for the dopamine D2 receptor group, in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol.* 1994;344(1):121-36.
42. Mennicken F, Savasta M, Peretti-Renucci R, Feuerstein C. Autoradiographic localization of dopamine uptake sites in the rat brain with 3H-GBR 12935. *J Neural Transm Gen Sect.* 1992;87(1):1-14.
43. Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, et al. Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience.* 2003;116(1):127-37.
44. Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I. ERK1/2 and CaMKII-mediated events in memory formation: is 5HT regulation involved? *Behav Brain Res.* 2008;195(1):120-8. Epub 2008/02/05.
45. Sakagami H, Ebina K, Kondo H. Re-examination of the ontogeny in the gene expression of DARPP-32 in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994;25(1-2):67-72.
46. Frey U, Huang YY, Kandel ER. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science.* 1993;260(5114):1661-4.

47. Frey U, Matthies H, Reymann KG. The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neurosci Lett.* 1991;129(1):111-4.
48. Frey U, Schroeder H, Matthies H. Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1990;522(1):69-75.
49. Morris RG, Moser EI, Riedel G, Martin SJ, Sandin J, Day M, et al. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358(1432):773-86.
50. Swanson-Park JL, Coussens CM, Mason-Parker SE, Raymond CR, Hargreaves EL, Dragunow M, et al. A double dissociation within the hippocampus of dopamine D1/D5 receptor and beta-adrenergic receptor contributions to the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience.* 1999;92(2):485-97.
51. Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, et al. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron.* 2002;34(3):447-62.
52. Barco A, Alarcon JM, Kandel ER. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell.* 2002;108(5):689-703.
53. Morozov A, Muzzio IA, Bourtchouladze R, Van-Strien N, Lapidus K, Yin D, et al. Rap1 couples cAMP signaling to a distinct pool of p42/44MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron.* 2003;39(2):309-25.
54. Smith WB, Starck SR, Roberts RW, Schuman EM. Dopaminergic stimulation of local protein synthesis enhances surface expression of GluR1 and synaptic transmission in hippocampal neurons. *Neuron.* 2005;45(5):765-79.
55. Dong C, Upadhyay SC, Ding L, Smith TK, Hegde AN. Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learn Mem.* 2008;15(5):335-47.
56. Argilli E, Sibley DR, Malenka RC, England PM, Bonci A. Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *J Neurosci.* 2008;28(37):9092-100.
57. Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science.* 2008;319(5870):1683-7.
58. Engblom D, Bilbao A, Sanchis-Segura C, Dahan L, Perreau-Lenz S, Balland B, et al. Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron.* 2008;59(3):497-508.
59. Mansvelder HD, McGehee DS. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron.* 2000;27(2):349-57.
60. Niehaus JL, Murali M, Kauer JA. Drugs of abuse and stress impair LTP at inhibitory synapses in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci.* 2010;32(1):108-17.

61. Mesulam MM, Geula C. Acetylcholinesterase-rich neurons of the human cerebral cortex: cytoarchitectonic and ontogenetic patterns of distribution. *J Comp Neurol.* 1991;306(2):193-220. Epub 1991/04/08.
62. Good CH, Lupica CR. Properties of distinct ventral tegmental area synapses activated via pedunclopontine or ventral tegmental area stimulation in vitro. *J Physiol. England*2009. p. 1233-47.
63. Sugimoto T, Hattori T. Organization and efferent projections of nucleus tegmenti pedunclopontinus pars compacta with special reference to its cholinergic aspects. *Neuroscience. England*1984. p. 931-46.
64. Oakman SA, Faris PL, Kerr PE, Cozzari C, Hartman BK. Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci.* 1995;15(9):5859-69. Epub 1995/09/01.
65. Charara A, Smith Y, Parent A. Glutamatergic inputs from the pedunclopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *J Comp Neurol. United States*1996. p. 254-66.
66. Itier V, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett.* 2001;504(3):118-25.
67. Meyer PM, Strecker K, Kendziorra K, Becker G, Hesse S, Woelpl D, et al. Reduced alpha4beta2*-nicotinic acetylcholine receptor binding and its relationship to mild cognitive and depressive symptoms in Parkinson disease. *Arch Gen Psychiatry.* 2009;66(8):866-77.
68. Thomsen MS, Hansen HH, Timmerman DB, Mikkelsen JD. Cognitive improvement by activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: from animal models to human pathophysiology. *Curr Pharm Des.* 2010;16(3):323-43.
69. Bonci A, Malenka RC. Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J Neurosci.* 1999;19(10):3723-30. Epub 1999/05/11.
70. Mansvelder HD, Mertz M, Role LW. Nicotinic modulation of synaptic transmission and plasticity in cortico-limbic circuits. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(4):432-40.
71. Braitenberg V AS. *Cortex: Statistics and geometry of neuronal connectivity.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1998.
72. Lomo T. The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358(1432):617-20. Epub 2003/05/13.
73. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993;361(6407):31-9. Epub 1993/01/07.
74. Bowen RL, Atwood CS. Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology.* 2004;50(5):265-90.
75. Albert MS, Heller HS, Milberg W. Changes in naming ability with age. *Psychol Aging.* 1988;3(2):173-8.

76. Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. 1997;278(5337):412-9. Epub 1997/10/23.
77. Keuker JI, de Biurrun G, Luiten PG, Fuchs E. Preservation of hippocampal neuron numbers and hippocampal subfield volumes in behaviorally characterized aged tree shrews. *J Comp Neurol*. 2004;468(4):509-17. Epub 2003/12/23.
78. Pannese E. Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain structure & function*. 2011;216(2):85-9. Epub 2011/03/25.
79. Dumas JA, Newhouse PA. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation. *Pharmacol Biochem Behav*. United States: 2011 Elsevier Inc; 2011. p. 254-61.
80. Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982;217(4558):408-14. Epub 1982/07/30.
81. Dumas JA, Hartman M. Adult age differences in the access and deletion functions of inhibition. *Neuropsychology, development, and cognition Section B, Aging, neuropsychology and cognition*. 2008;15(3):330-57. Epub 2009/02/21.
82. Dumas JA, Saykin AJ, McDonald BC, McAllister TW, Hynes ML, Newhouse PA. Nicotinic versus muscarinic blockade alters verbal working memory-related brain activity in older women. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2008;16(4):272-82.
83. Kukulja J, Thiel CM, Wilms M, Mirzazade S, Fink GR. Ageing-related changes of neural activity associated with spatial contextual memory. *Neurobiol Aging*. 2009;30(4):630-45.
84. Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007;47:699-729. Epub 2006/10/03.
85. Everitt BJ, Robbins TW. Central cholinergic systems and cognition. *Annual review of psychology*. 1997;48:649-84. Epub 1997/01/01.
86. Thiel CM, Fink GR. Visual and auditory alertness: modality-specific and supramodal neural mechanisms and their modulation by nicotine. *J Neurophysiol*. 2007;97(4):2758-68.
87. Thiel CM. Cholinergic modulation of learning and memory in the human brain as detected with functional neuroimaging. *Neurobiol Learn Mem*. 2003;80(3):234-44. Epub 2003/10/03.
88. Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley SJ, et al. Dopamine transporters decrease with age. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1996;37(4):554-9. Epub 1996/04/01.
89. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Gur RC, Gatley J, et al. Parallel loss of presynaptic and postsynaptic dopamine markers in normal aging. *Annals of neurology*. 1998;44(1):143-7. Epub 1998/07/17.
90. Mizoguchi K, Shoji H, Tanaka Y, Maruyama W, Tabira T. Age-related spatial working memory impairment is caused by prefrontal cortical dopaminergic dysfunction in rats. *Neuroscience*. 2009;162(4):1192-201.

91. Backman L, Nyberg L, Lindenberger U, Li SC, Farde L. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(6):791-807.
92. Cropley VL, Fujita M, Innis RB, Nathan PJ. Molecular imaging of the dopaminergic system and its association with human cognitive function. *Biol Psychiatry.* 2006;59(10):898-907.
93. Koeppe MJ, Gunn RN, Lawrence AD, Cunningham VJ, Dagher A, Jones T, et al. Evidence for striatal dopamine release during a video game. *Nature.* 1998;393(6682):266-8. Epub 1998/06/02.
94. Raz A, Vaadia E, Bergman H. Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine vervet model of parkinsonism. *J Neurosci.* 2000;20(22):8559-71.
95. Nielsen-Bohlman L, Knight RT. Prefrontal alterations during memory processing in aging. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991).* 1995;5(6):541-9. Epub 1995/11/01.
96. Schacter DL, Savage CR, Alpert NM, Rauch SL, Albert MS. The role of hippocampus and frontal cortex in age-related memory changes: a PET study. *Neuroreport.* 1996;7(6):1165-9. Epub 1996/04/26.
97. Albert MS. The ageing brain: normal and abnormal memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997;352(1362):1703-9. Epub 1998/01/07.
98. Chao LL, Knight RT. Age-related prefrontal alterations during auditory memory. *Neurobiol Aging.* 1997;18(1):87-95.
99. Rapp PR, Amaral DG. Evidence for task-dependent memory dysfunction in the aged monkey. *J Neurosci.* 1989;9(10):3568-76. Epub 1989/10/01.
100. Herndon JG, Moss MB, Rosene DL, Killiany RJ. Patterns of cognitive decline in aged rhesus monkeys. *Behav Brain Res.* 1997;87(1):25-34.
101. Ando S, Ohashi Y. Longitudinal study on age-related changes of working and reference memory in the rat. *Neurosci Lett.* 1991;128(1):17-20.
102. Bimonte HA, Nelson ME, Granholm AC. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiol Aging.* 2003;24(1):37-48.
103. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist.* 2008;14(2):147-56. Epub 2007/10/04.
104. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press; 1986.
105. Bonini JS, Bevilaqua LR, Zinn CG, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, et al. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav.* 2006;50(2):308-13. Epub 2006/05/16.
106. Bevilaqua LR, Rossato JI, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behav Pharmacol.* 2003;14(8):649-52. Epub 2003/12/11.
107. KOELLE GB, FRIEDENWALD JA. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949;70(4):617-22.

108. Bitner RS, Bunnelle WH, Anderson DJ, Briggs CA, Buccafusco J, Curzon P, et al. Broad-spectrum efficacy across cognitive domains by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism correlates with activation of ERK1/2 and CREB phosphorylation pathways. *J Neurosci*. 2007;27(39):10578-87.
109. Gauthier M. State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;683:97-115. Epub 2010/08/27.
110. Graef S, Schonknecht P, Sabri O, Hegerl U. Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: an overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011;215(2):205-29. Epub 2011/01/08.
111. Drever BD, Riedel G, Platt B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res*. 2011;221(2):505-14.
112. Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T, et al. Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn Mem*. 2004;11(1):60-9.
113. Jones IW, Wonnacott S. Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci*. 2004;24(50):11244-52.
114. Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*. 2002;33(6):905-19.
115. Geisler S, Zahm DS. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol*. 2005;490(3):270-94. Epub 2005/08/06.

Anexo

Artigo submetido à revista *Learning and memory* com número de identificação:

LEARNMEM2012/027755.

Título do artigo: **Nicotine modulates the long-lasting storage of fear memory**