Andreas Betz

Papel da Atividade Física Espontânea no
Comportamento e na Neurotransmissão em
Áreas do Circuito Mesocorticolímbico de Reforço
e do Hipocampo em Ratos Durante a
Administração Crônica de Nicotina.

São Paulo

2006

Andreas Betz

Papel da Atividade Física Espontânea no
Comportamento e na Neurotransmissão em
Áreas do Circuito Mesocorticolímbico de Reforço
e do Hipocampo em Ratos Durante a
Administração Crônica de Nicotina.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Rejane Fior
Chadi

São Paulo

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SERVIÇO DE BIBLIOTECA DO INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS / USP**

B 565p

Betz, Andreas

Papel da atividade física espontânea no
comportamento e na neurotransmissão em áreas do
circuito mesocorticolímbico de reforço e do hipocampo
em ratos durante a administração crônica de nicotina /

Andreas Betz. –

São Paulo : A. B., 2006.

p. 145 : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São
Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de
Fisiologia, 2006.

1.Neurotransmissores 2.Nicotina 3.
Exercício físico espontâneo 4.Circuito
mesocorticolímbico 5.Comportamento

I. Universidade de São Paulo.

Instituto de Biociências. Departamento de
Fisiologia. II. Título.

LC: QP 364.7

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr.(a):

Prof(a). Dr(a).:

Profa. Dra. Débora Rejane Fior Chadi

A meus pais, Germano e Graça e aos meus irmãos Erich e Vivian, por acreditarem nos meus sonhos e darem muito mais do que todo o suporte para que eu pudesse realizá-los.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profa. Dra. Débora Rejane Fior Chadi pela oportunidade de ingresso no laboratório, ter me mostrado o caminho da pesquisa e me orientado.

Ao pessoal do laboratório: Daniel, Emerson, Renato, Sergio Macedo, Sergio, Karen, Vagner, João Paulo e Beatriz pelos auxílios, socorros e idéias para a conclusão deste, e um agradecimento especial para a Regiane, pelas dicas, conversas e ótimos momentos juntos e Merari e Jessica, que me ajudaram imensamente nestes anos, sempre dispostas a responderem minhas perguntas e rirem das minhas piadas insanas. Foram muito bons estes momentos que passamos juntos!

Ao Prof. Dr. Gerson Chadi por disponibilizar gentilmente o espaço e aparelhos do seu laboratório, dos quais seria impossível a realização deste projeto.

Aos colegas do laboratório de Neurologia Experimental, principalmente às alunas Juliana Pedroso e Tatiana Oliveira pela ajuda e amizade.

As professoras doutoras Regina Pekelmann Markus e Zulma Felisbina da Silva Ferreira pela disponibilização do aparelho de HPLC.

Aos meus amigos de Guará e de São Paulo pelos grandes momentos de descontração que contribuíram muito para este.

Aos meus familiares, principalmente a Tia Monika, que sempre torceram por mim.

Aos funcionários e colegas do Instituto de Biociências pelo ótimo convívio e bons momentos de descontração e tensão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fundamental apoio financeiro.

E a todas as pessoas que participaram de alguma forma neste período da minha vida me ajudando a vencer os obstáculos ou simplesmente jogando conversa fora.

OBRIGADO!

<u>RESUMO</u>	X
<u>ABSTRACT</u>	XII
<u>INTRODUÇÃO</u>	01
I- NICOTINA E VÍCIO	02
II- SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO	03
III- NICOTINA E COMPORTAMENTO	10
IV- NICOTINA E ATIVIDADE FÍSICA	12
<u>OBJETIVOS</u>	18
I- OBJETIVOS GERAIS	19
II- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	21
I- ANIMAIS	22
II- TRATAMENTO CRÔNICO COM NICOTINA	22
III- TREINAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS	23
IV- QUANTIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE NICOTINA E COTININA PLASMÁTICAS	24
V- MENSURAÇÃO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS CARDIOVASCULARES E PESO	28
VI- TESTES COMPORTAMENTAIS	29
<i>VI.I- Labirinto em T elevado</i>	29
<i>VI.II- Atividade motora</i>	30
VII- RETIRADA E CONGELAMENTO DO ENCÉFALO	32

VIII- HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	32
IX- ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
<u>RESULTADOS</u>	38
I- TREINAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS	39
II- CONCENTRAÇÃO DE NICOTINA E COTININA PLASMÁTICAS	39
III- EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS CARDIOVASCULARES E PESO	40
IV- ANÁLISE COMPORTAMENTAL	48
<i>IV.I- Labirinto em T elevado</i>	48
<i>IV.II- Atividade motora</i>	52
V- ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	64
<i>V.I- Tirosina hidroxilase</i>	64
<i>V.II- Glutaminase</i>	66
<i>V.III- Fator neurotrófico derivado do cérebro</i>	73
DISCUSSÃO	79
I- TREINAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS	80
II- TRATAMENTO CRÔNICO COM NICOTINA	82
III- EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS CARDIOVASCULARES E PESO	83
IV- ANÁLISE COMPORTAMENTAL	85
<i>IV.I- Labirinto em T elevado</i>	86
<i>IV.II- Atividade motora</i>	89

V- ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	91
<i>V.I- Tirosina hidroxilase</i>	91
<i>V.II- Glutaminase</i>	93
<i>V.III- Fator neurotrófico derivado do cérebro</i>	96
<u>CONCLUSÕES</u>	99
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	101

Resumo

A nicotina é um alcalóide encontrado em cigarros de tabaco sendo um dos maiores responsáveis pelo vício e por problemas associados ao tabagismo. Com relação ao vício, que é um fenômeno comportamental complexo, ressaltamos a ação da nicotina como um potente agente viciante que altera não só mecanismos celulares como também comportamentais e de aprendizagem.

O trabalho para a reversão do vício a drogas como a nicotina é bastante difícil de modo que intervenções alternativas, como o exercício físico, são práticas que têm estado cada vez mais em evidência.

Após tratarmos cronicamente ou não ratos com nicotina durante 60 dias e submetê-los ou não a atividade física espontânea por 7 semanas, verificamos que nem o tratamento crônico com a droga e nem a atividade física alteraram parâmetros como o peso e a pressão arterial média dos ratos bem como a marcação para o RNA_m da enzima tirosina hidroxilase na Área Tegmental Ventral e da glutaminase no Córtex Pré-Frontal. Porém, verificamos alterações na frequência cardíaca e na ansiedade dos ratos, além do RNA_m da glutaminase e do fator neurotrófico derivado do cérebro em áreas hipocampais, sugerindo que ambos o treinamento físico espontâneo e o tratamento crônico com nicotina podem alterar o comportamento, a ansiedade e a memória dos ratos utilizados.

ABSTRACT

Nicotine is an alkaloid found in cigarettes of tobacco which is the most responsible for the addiction and cardiovascular diseases. Addiction is an elaborated behavior with complex causes and effects. We pointed that nicotine is a powerful addictive agent that changes cellular mechanisms, behaviours and learning.

The efforts to revert drug addiction, like nicotine, are very hard and alternative interventions, like the exercise training, may be on evidence nowadays.

After treating the rats chronically with nicotine or placebo for 60 days and submit them to spontaneous wheel running for 7 weeks, we observed that, neither the chronic treatment with nicotine nor spontaneous wheel running altered the weight and the mean arterial pressure of the rats, and neither the mRNA for tyrosine hydroxylase on the Ventral Tegmental Area and the glutaminase on the Pre-Frontal Cortex. However, we verified alterations on heart rate and anxiety level of the rats and alterations in the glutaminase and the brain derived neurotrophic factor mRNA on hippocampal areas, suggesting that both, spontaneous wheel running and chronic treatment with nicotine may alter the behaviour, the anxiety and the memory of the rats.

***I*NTRODUÇÃO**

I- Nicotina e vício

A nicotina é um alcalóide encontrado em cigarros de tabaco, sendo um dos maiores responsáveis pelo vício e pelos problemas cardiovasculares associados ao tabagismo. Dentre os principais efeitos da nicotina, podemos citar o aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, da frequência respiratória, da atividade motora, vasoconstrição, diminuição do apetite, náuseas, entre outros (McBride *et al.*, 1998).

O vício é um fenômeno comportamental complexo com causas e efeitos que vão desde mecanismos moleculares até interações sociais (Mansvelder e McGehee, 2002). O processo do vício à droga começa com interações moleculares que alteram a atividade e o metabolismo de neurônios que são sensíveis à droga. Ao longo do tempo isto altera as propriedades de neurônios individuais e de circuitos, os quais induzem comportamentos complexos como dependência, tolerância, sensibilização e o desejo pela droga (Koob *et al.*, 1997; Nestler e Aghajanian, 1997). Durante a fase inicial de exposição à droga e a aquisição do vício, as redes neuronais das áreas envolvidas com o reforço, como a Área Tegmental Ventral (VTA), o Nucleus Accumbens (NAc), e o Córtex Pré-Frontal (PFC), sofrem grandes adaptações que levam à mudanças comportamentais (Vanderschuren e Kalivas, 2000).

Sabe-se que a nicotina influencia a atividade, a comunicação sináptica e o comportamento neuronal, além de alterar a morfologia neuronal, a sobrevivência e a expressão gênica de quase todos os sistemas já examinados, incluindo os sistemas colinérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e adrenérgico (Slotkin, 2002) através de sua ação em receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no sistema nervoso central. Estes receptores são proteínas pentaméricas de membrana que permitem a passagem de íons pelo poro resultando em despolarização e aumento da excitabilidade. As proteínas que formam o receptor são variáveis podendo ser α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) e β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (McGehee e Role, 1995). Embora esses receptores estejam distribuídos por todo o encéfalo, aqueles encontrados na Área Tegmental Ventral e em outras áreas associadas ao vício, como o Nucleus Accumbens e o Núcleo Tegmental Pedunculopontino (PPTg), bem como o Córtex Pré-Frontal, contribuem para os efeitos viciantes da nicotina (Mansvelder *et al.*, 2002; Lanca *et al.*, 2000).

II- Sistema mesocorticolímbico

O sistema mesocorticolímbico de reforço é o principal sistema responsável pela adição às drogas. Ele é composto principalmente por três núcleos: Área Tegmental Ventral, Nucleus Accumbens e Córtex

Pré-frontal. Desta forma, os neurônios contendo dopamina, portanto positivos à enzima tirosina hidroxilase (Figura 1), localizados na Área Tegmental Ventral, se projetam tanto para o Nucleus Accumbens quanto para o Córtex Pré-frontal, ativando neurônios destes dois núcleos através da liberação de dopamina nos mesmos. Esta é a principal via envolvida no comportamento de reforço e, diversas drogas além da nicotina, induzem ao vício pela ativação deste sistema (Di Chiara e Imperato, 1988). O Nucleus Accumbens por sua vez, possui neurônios GABAérgicos que fazem sinapses com neurônios da Área Tegmental Ventral inibindo a ativação dos neurônios dopaminérgicos. Já o Córtex Pré-frontal, que possui importante papel nas funções comportamentais tendo uma grande responsabilidade no desenvolvimento do vício (Mansvelder *et al.*, 2002), envia projeções glutamatérgicas tanto para a Área Tegmental Ventral quanto para o Nucleus Accumbens. Estas projeções para a Área Tegmental Ventral parece ser o principal controle excitatório da atividade dos neurônios da mesma e, por conseguinte, da liberação de dopamina no Nucleus Accumbens (Kalivas *et al.*, 1989; Sesack e Pickel, 1992; Taber *et al.*, 1995).

Comportamentos de reforço natural como comer, correr, algumas formas de estresse e o sexo induzem uma liberação aguda de dopamina no Nucleus Accumbens (Hernandez e Hoebel, 1988;

Damsma *et al.*, 1992; Wilson e Marsden, 1995), sugerindo uma via de reforço bioquímica em comum ativada por drogas e também por comportamentos de reforço naturais (Werme *et al.*, 2000).

Quando drogas como a nicotina chegam na Área Tegmental Ventral, há estimulação tanto de terminais glutamatérgicos quanto de neurônios dopaminérgicos, que podem mimetizar o padrão pré e pós sináptico de estimulação elétrica pareada. Assim, a potenciação da transmissão excitatória na Área Tegmental Ventral é favorecida pela droga (Mansvelder e McGehee, 2002), levando à potenciação de longo prazo (LTP).

Foi observado que a administração de nicotina intraperitonealmente, nas mesmas concentrações encontradas no soro durante a auto-administração desta droga, aumenta os níveis de dopamina no Nucleus Accumbens (Stolerman e Jarvis, 1995; Dani e Heinemann, 1996; Imperato *et al.*, 1986; Benwell *et al.*, 1994; Pontieri *et al.*, 1996; Dani e De Biasi, 2001), o que ocorre em decorrência do aumento da estimulação dos neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral (Pontieri *et al.*, 1996). Uma evidência de que o nível de dopamina no Nucleus Accumbens é importante para o reforço da droga são os estudos com lesão na Área Tegmental Ventral e microperfusão com antagonistas de receptores de dopamina no Nucleus Accumbens, ambos causando redução da auto-administração

da droga (Balfour, 1991; Corrigall e Cohen, 1991; O'Neil *et al.*, 1991; Corrigall *et al.*, 1992; Vezina *et al.*, 1994; Museo e Wise, 1995; Louis e Clarke, 1998).

Figura 1: Esquema da cadeia de síntese das catecolaminas. O aminoácido tirosina é convertido em L-DOPA através da enzima tirosina hidroxilase, a Dopa desxcarboxilase converte a L-DOPA em dopamina que é o substrato da enzima DBH para a formação da noradrenalina, e finalmente através da PNMT a noradrenalina é transformada em adrenalina.

O alvo em potencial da nicotina no sistema mesolímbico inclui nAChRs localizados nos corpos celulares de neurônios dopaminérgicos e não dopaminérgicos na Área Tegmental Ventral e em terminais no Nucleus Accumbens (Clarke, 1990). Além disso, nAChRs são também expressos por inter-neurônios GABAérgicos da Área Tegmental Ventral e pelos terminais axônicos glutamatérgicos que chegam à Área Tegmental Ventral (Mansvelder e McGehee, 2002). Os efeitos da nicotina na Área tegmental Ventral parecem ser decorrentes principalmente da ativação dos subtipos $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ dos nAChRs (Mansvelder e McGehee, 2002). Dessa forma, a liberação de dopamina pelas projeções da Área Tegmental Ventral é devida principalmente a um balanço dos impulsos excitatórios e inibitórios sobre a Área Tegmental Ventral, bem como da atividade intrínseca desses neurônios dopaminérgicos (Mansvelder e McGehee, 2002).

Sabe-se que um dos mecanismos associados ao vício em drogas, incluindo a nicotina, é a indução de mudanças funcionais nos neurônios da Área Tegmental Ventral que contém dopamina, levando ao aumento da atividade neuronal e a um aumento na liberação de dopamina dos terminais nervosos desses neurônios para o Nucleus Accumbens (Spanagel e Weiss, 1999; Rinaldi e Wise, 2001; Volkow *et al.*, 1999). Foi observado que a nicotina altera a recaptação de dopamina (Izenwasser e Cox, 1992), sua liberação (Pontieri *et al.*,

1996; Rowel, 1995) e seu metabolismo (Tsai e Lee, 1995) (Figura 2). A nicotina também aumenta a atividade espontânea e os disparos dos neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral *in vivo* (Mereu *et al.*, 1987). A comprovação da ação da nicotina na Área Tegmental Ventral foi também demonstrada pela injeção de mecamilamina, um antagonista de nAChRs, nesta area, levando ao bloqueio do aumento na liberação de dopamina no Nucleus Accumbens.

Uma única exposição à nicotina aumenta a liberação de dopamina no Nucleus Accumbens por mais de uma hora *in vivo* (Di Chiara e Imperato, 1988). No entanto, os nAChRs dos neurônios dopaminérgicos se dessensibilizam muito rapidamente na presença de concentrações relevantes de nicotina encontradas em fumantes (Pidoplichko *et al.*, 1997), de forma que outros mecanismos devem ser responsáveis pela excitação prolongada desencadeada pela droga. Alguns resultados sugerem que a transmissão glutamatérgica na Área Tegmental Ventral contribui para a excitação de longo-prazo do sistema dopaminérgico pela nicotina (Schilstron *et al.*, 1998). Já foi inclusive demonstrado que a exposição aguda à nicotina, pode induzir potenciação de longo-prazo nos terminais glutamatérgicos que fazem sinapse com os neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral (Mansvelder and McGehee, 2000).

Figura 2: Esquema da ação da nicotina em neurônios dopaminérgicos que contém nAChRs. A nicotina atua aumentando a síntese e liberação de dopamina, bem como inibindo a recaptação da mesma.

Além disso, foi observado que a administração de antagonista do receptor N-methyl-D-aspartato (NMDA) do glutamato na Área Tegmental Ventral, *in vivo*, inibiu o aumento de dopamina liberada no Nucleus Accumbens (Schilstron *et al.*, 1998). Estas projeções glutamatérgicas citadas acima, que chegam aos neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral provém principalmente do

Córtex Pré-Frontal (Sesack e Pickel, 1992; Carr e Sesack, 2000; Taber *et al.*, 1995).

Os neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral estão, também, sob o controle inibitório GABAérgico. Essas projeções GABAérgicas provêm de interneurônios locais e de fibras provenientes de neurônios do Nucleus Accumbens e do Pallidum Ventral (Walaas e Fonnum, 1980; Kalivas *et al.*, 1993; Steffensen *et al.*, 1998). Uma amostra deste controle foi demonstrado por Ikemoto e colaboradores (1997) e por Westerink e colaboradores (1996) que bloquearam os receptores GABA_A na Área Tegmental Ventral tendo como resultado um aumento dos níveis de dopamina no Nucleus Accumbens. Assim, a redução da transmissão GABAérgica seguida de dessensibilização dos nAChRs na Área Tegmental Ventral contribuem para reforçar os efeitos da nicotina (Mansvelder e McGehee, 2002), aumentando a liberação de dopamina no Nucleus Accumbens e no Córtex Pré-Frontal.

III- Nicotina e comportamento

A nicotina altera vários tipos de parâmetros comportamentais, incluindo ansiedade, cognição, ingesta alimentar, atividade locomotora (Imperato *et al.*, 1986; Clarke *et al.*, 1988; Di Chiara e Imperato, 1988; Nakamura *et al.*, 1993; Vezina *et al.*, 1994), atenção e memória

(Mansvelder *et al.*, 2006), possuindo efeitos complexos na performance humana. Indivíduos privados de nicotina por 12 horas mostraram déficit de atenção e de habilidade cognitiva, enquanto que a administração de nicotina revertia esses déficits a níveis pré-abstinência (Ernst *et al.*, 2001). Lawrence e colaboradores (2002), utilizando ressonância magnética funcional, mostraram que há um aumento na ativação de redes neuronais frontais causada pela administração de nicotina durante testes de atenção, melhorando a atenção em fumantes. Estas redes neurais podem estar relacionadas com o Córtex Pré-Frontal já que este está envolvido no controle de comportamento (Everitt *et al.*, 2001). A nicotina pode exercer seus efeitos cognitivos e de atenção (Coull, 1998; Sarter *et al.*, 2001) não somente no Córtex Pré-Frontal (Cabeza e Nyberg, 2000; Rueckert e Grafman, 1996, 1998) como também no hipocampo (Levin, 2002; Newhouse *et al.*, 2004). A ação comportamental da nicotina é atribuída em parte, à sua habilidade de induzir a liberação de neurotransmissores e/ou neuromoduladores via nAChRs nos terminais nervosos e/ou corpos celulares dentro do Sistema Nervoso Central (SNC) (Goshima *et al.*, 1996).

Baseado nisso, houve um interesse em analisar sistematicamente o padrão comportamental dos nossos animais. O interesse foi intensificado com a possibilidade de se poder observar

uma atenuação e/ou diminuição da ansiedade/medo e hiper-atividade dos animais em enfoque neste estudo, pois, este resultado pode vir a ser benéfico para indivíduos acometidos pelo vício à droga. Desta forma, foram propostos e realizados testes que avaliam comportamentos como o de medo condicionado (aprendido) e incondicionado (inato) no Labirinto em T Elevado. Este teste foi escolhido, pois, sabe-se que a ansiedade é heterogênea e existem modelos animais que não discriminam tipos específicos de ansiedade (Graeff *et al.*, 1998).

IV- Nicotina e atividade física

Picciotto e colaboradores (1998) sugerem que as subunidades $\alpha 4/\beta 2$ dos nAChRs são importantes para a atividade locomotora. Injeções locais de nicotina na VTA resultam em aumento desta atividade locomotora (Leikola-Pelho e Jackson, 1992; Museo e Wise, 1995; Panagis *et al.*, 1996), mostrando um aumento de longa duração na locomoção em animais experimentais, através da ativação da via dopaminérgica (Bonci *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 1988).

O tratamento para a reversão do vício a drogas psicoestimulantes como a nicotina é bastante difícil de modo que intervenções alternativas na iniciação, manutenção e recuperação no

consumo de drogas tem recebido atenção especial atualmente (Bur *et al.*, 2005; deRuiter e Faulkner, 2006).

Uma prática que tem estado cada vez mais em evidência com relação às mais diversas abordagens do sistema nervoso é o desenvolvimento da atividade física. Alguns autores observaram uma menor prevalência do hábito de fumar em jovens que fazem atividade física e um menor consumo de cigarros em fumantes que praticam esportes (Bergamaschi *et al.*, 2002; Escobedo *et al.*, 1999). Há muito se sabe que a prática regular de atividade física tem como resultado diversas adaptações orgânicas decorrentes de alterações metabólicas, endócrinas e neuro-humorais, que melhoram a saúde física e mental do praticante (Ferreira *et al.*, 2001).

Restrições éticas limitam o estudo em seres humanos, portanto, estudos animais que usam rodas de corrida espontânea são modelos que podem elucidar a base neural dos efeitos psicológicos do exercício (Eikelboom, 1999). Exercícios físicos espontâneos podem melhorar e proteger funções cerebrais por induzir a expressão de genes no encéfalo que levam à síntese de neurotransmissores e/ou de fatores neurotróficos, importantes para a sobrevivência e fisiologia neuronal (Cotman e Engesser-César, 2002). A capacidade da atividade física regular em induzir a neuroplasticidade é um dos mais importantes achados obtidos recentemente. Os efeitos benéficos do exercício na

saúde e função cerebral já foram evidenciados em idosos em relação à melhora nas funções cognitivas, bem como na redução da probabilidade de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Friedland *et al.*, 2001).

Um argumento para o uso de exercícios no abandono do vício em nicotina é que o exercício modera o efeito de variáveis negativas da retirada da droga (Hughes *et al.*, 1994) reduzindo a vontade de ingestão da mesma (Grove *et al.*, 1993), reduzindo também os distúrbios de humor (Byrne e Byrne, 1993), os distúrbios do sono (O'Connor e Youngstedt, 1995), tensão (Devries, 1987), estresse (King *et al.*, 1993) e o ganho de peso após o abandono do vício (Kawachi *et al.*, 1996).

É provável que alguns efeitos benéficos do exercício sejam decorrentes mais de alterações diretamente na maquinaria molecular das células nervosas do que de alterações na saúde em geral. Em humanos a prática de exercícios em indivíduos com abstinência ao tabaco não mostrou grandes alterações na diferença de peso e de gordura corporal, porém mostrou melhora na tensão, stress e irritabilidade do grupo treinado (Ussher, 2002).

Vários sistemas moleculares podem, potencialmente, estar envolvidos com os benefícios do exercício no cérebro. Estudos mostraram que o aumento da exigência metabólica no exercício

resulta na adaptação de diversas vias neurais, destacando como os principais resultados uma menor taxa basal de catecolaminas, a normalização dos níveis de noradrenalina e dopamina nas áreas de atenção, memória e controle motor, aumento dos níveis de serotonina nas áreas de humor e diminuição nas áreas do controle motor e aumento na síntese e liberação de endorfinas (Dishman, 1997; McArdle *et al.*, 1998; Meeusen e De Meirleir, 1995). Além disso, os fatores neurotróficos, pelas suas características, poderiam ser os grandes responsáveis pelos efeitos benéficos do exercício (Cotman e Berchtold, 2002), não só pela sua ação direta na fisiologia neuronal, uma vez que é sabido que neurônios de roedores submetidos a exercícios físicos espontâneos em rodas de correr tiveram um aumento geral em seus prolongamentos (Molteni *et al.*, 2004), como através da modulação de sistemas de neurotransmissão.

A capacidade de uma droga de abuso induzir o vício pode ser vista como uma forma de plasticidade neuronal. Algumas adaptações observadas em resposta à exposição crônica à droga, como redução de neurofilamentos e inclusão de filamentos gliais são semelhantes à situação de injúria neuronal. Isto sugere a possibilidade de que fatores neurotróficos possam estar envolvidos em algumas respostas de longo-prazo associados à exposição à droga. Já foi observado que infusão do fator neurotrófico derivado do cérebro ou neurotrofinas

relacionadas na Área Tegmental Ventral bloqueou a capacidade da morfina e cocaína em produzir seus efeitos bioquímicos e morfológicos característicos nessa região cerebral (Berhow *et al.*, 1995; Sklair-Tavron *et al.*, 1996). No entanto, esse efeito farmacológico do fator neurotrófico derivado do cérebro, exógeno, pode ser diferenciado de um possível papel endógeno deste fator, em mediar algumas respostas de longo-prazo a exposição à droga no sistema mesocorticolímbico.

O principal foco de estudo das ações do exercício no sistema nervoso tem sido a indução de fatores neurotróficos no hipocampo (Neeper *et al.*, 1995), pela sua importância na cognição e memória. O fator neurotrófico derivado do cérebro é um dos mais estudados, pois está relacionado com a sobrevivência e crescimento de vários tipos de neurônios, incluindo os glutamatérgicos, além de sua importância como mediador de eficiência sináptica, conectividade sináptica e plasticidade dependente de uso (Schinder e Poo, 2000; McAllister *et al.*, 1999).

Sabendo-se que o stress crônico leva ao aumento da atividade da tirosina hidroxilase, que é um indicativo do aumento da síntese de dopamina e norepinefrina (Fillenz, 1990), o fato de a atividade física melhorar a resposta do stress no que se refere a modificações na via dopaminérgica já é um indicativo de que ele pode modular esta via

também nos mecanismos associados ao vício, além de induzir a neurogênese, por exemplo, no giro denteado (Van Praag *et al.*, 1999). Então, a principal pergunta do presente estudo é: Será que a prática de atividade física espontânea pode alterar a expressão gênica de neurotransmissores e de fatores neurotróficos no circuito mesocorticolímbico de reforço melhorando a resposta neural à droga de modo a reduzir as ações viciantes da nicotina a longo-prazo neste circuito e também reduzindo a ansiedade/medo nos ratos experimentais? Tendo isso como ponto fundamental, este estudo avaliou alguns aspectos da neurotransmissão no circuito mesocorticolímbico de reforço bem como o comportamento relacionado à ansiedade e medo nos animais, somente após tratamento crônico com nicotina e após tratamento com nicotina associado a atividade física espontânea.

Objetivos

I- Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho foi analisar alguns aspectos da neurotransmissão do sistema mesocorticolímbico de reforço e do hipocampo e também avaliar aspectos comportamentais e da memória em ratos, após tratamento crônico com nicotina por 60 dias e avaliar estes mesmos aspectos em animais submetidos à atividade física espontânea por 7 semanas. Este protocolo nos permitiu analisar se a nicotina alterou a neurotransmissão da via mesocorticolímbica, no Hipocampo e aspectos comportamentais e se a atividade física espontânea modulou os parâmetros analisados, que possa ser considerado benéfico para o usuário de nicotina.

II- Objetivos Específicos

- Avaliar a evolução de parâmetros fisiológicos cardiovasculares como pressão arterial média e frequência cardíaca bem como a evolução da massa corpórea total dos ratos submetidos somente ao tratamento crônico com nicotina ou placebo e daqueles submetidos também à atividade física espontânea.
- Avaliar padrões comportamentais, tais como ansiedade/medo e atividade motora dos ratos submetidos somente ao tratamento crônico

com nicotina ou placebo e daqueles submetidos também à atividade física espontânea.

- Analisar quantitativamente a expressão gênica da enzima tirosina hidroxilase através da hibridização in situ na Área Tegmental Ventral de ratos submetidos somente ao tratamento crônico com nicotina ou placebo e daqueles submetidos também à atividade física espontânea.
- Analisar quantitativamente a expressão gênica da glutaminase através da hibridização in situ no Córtex Pré-Frontal e no Hipocampo de ratos submetidos somente ao tratamento crônico com nicotina ou placebo e daqueles submetidos também à atividade física espontânea.
- Analisar quantitativamente a expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro através da hibridização in situ, no Hipocampo de ratos submetidos somente ao tratamento crônico com nicotina ou placebo e daqueles submetidos também à atividade física espontânea.

MATERIAE e MÉTODOS

I- Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo com idade inicial de 60 dias. Os ratos, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas durante todo o experimento e tratados com água e ração *ad libitum*, foram separados ao acaso em 4 grupos: nicotina-treinado (n=8); nicotina sedentário (n=7); placebo-treinado (n=8) e placebo-sedentário (n=7). Alguns animais de cada grupo permaneceram em ciclo invertido de claro/escuro de 12 horas (n=4 ou 3)

II- Tratamento crônico com nicotina

Os ratos foram submetidos ao tratamento crônico (60 dias) com nicotina ou placebo na forma de pastilhas de 100mg (Innovative Research of América, Toledo, Ohio), implantadas subcutâneamente, na região lateral do pescoço dos animais. O implante das pastilhas foi feito através de uma pequena cirurgia onde os ratos foram anestesiados com éter e sob o efeito deste foi feita uma incisão na região lateral do pescoço do rato onde a pastilha foi implantada. O corte foi fechado com dois pontos utilizando agulha e linha cirúrgicas.

Os animais também receberam uma dose de 0,1ml de Pentabiótico veterinário intramuscular, para evitar possível ação infecciosa.

A dose de nicotina foi estabelecida com base nos trabalhos de Bui e colaboradores (1994) e foi de 75 µg/h durante 8 semanas.

III- Treinamento físico dos Animais

Os animais foram treinados no sistema de rodas de corrida espontânea (Columbus, Oxymax Equal Flow System, EUA) pertencente ao Laboratório de Neurologia Experimental, sob responsabilidade do Prof. Dr. Gerson Chadi. O treinamento em rodas de corrida espontânea foi escolhido por ser um procedimento sem estresse para o rato. Além disso, já se estabeleceu uma correlação positiva entre a distância percorrida pelo rato e a síntese de fatores neurotróficos (Cotman and Berchtold, 2002).

Os ratos do grupo treinado foram colocados em caixas acrílicas onde tiveram livre acesso à roda de correr na fase escura por um período de 12 horas. Durante a fase clara, permaneceram acomodados em caixas individuais desprovidas das rodas de correr. Os ratos do grupo sedentário permaneceram em gaiolas individuais desprovidas das rodas de correr durante todo o treinamento.

Os ratos foram submetidos ao treinamento físico espontâneo durante 7 semanas. Por causa da quantidade de animais utilizados, o treinamento foi repetido, somando 14 semanas totais de treinamento. Este período de 7 semanas já foi determinado previamente no nosso Laboratório, e mostrou-se adequado no que se refere ao desenvolvimento de treinamento físico dos animais (Moraes, 2005).

O equipamento utilizado fornece a distância percorrida e a velocidade média adquirida por cada rato durante o período de treinamento físico espontâneo no período de 12 horas. Esses dados foram armazenados automaticamente pelo programa no computador. O treinamento físico espontâneo foi iniciado uma semana após o implante das pastilhas de nicotina.

IV- Quantificação da concentração de nicotina e cotinina plasmáticas

Para a certificação de que a pastilha de nicotina realmente liberou a dose desejada da droga, foi feita a determinação da concentração plasmática da nicotina e seu principal metabólito, a cotinina. Para isso, amostras de sangue (1mL) foram retiradas através da punção da veia caudal de cada animal utilizando-se seringas

individuais e heparinizadas, e este sangue foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), adaptado do método desenvolvido por Hariharan e colaboradores (1988) e Nakajima e colaboradores (2000).

O princípio básico do HPLC (Shimatzu) de fase reversa é a retenção, pela coluna de separação, das moléculas hidrofóbicas e seu fracionamento por soluções contendo solventes como o metanol. Dependendo do grau de hidrofobicidade, a substância irá se deslocar da coluna mais ou menos facilmente. Se a substância for menos hidrofóbica, irá passar rapidamente, ou seja, seu tempo de retenção é baixo. Por outro lado, se a substância for mais hidrofóbica, sua interação com a coluna será mais forte e será mais difícil sua passagem; com isso, o tempo de retenção será maior. A partir do momento da eluição, as substâncias passam por um detector, neste caso, luz ultravioleta (256nm, Shimadzu), utilizando-se coluna Supelco Hipersil ODS 5m 25cm x 4,6mm em forno (Shimadzu) a 35°C e fluxo de 1,5ml/min da fase móvel para separação dos componentes a serem analisados, que envia um sinal para o computador formando os picos referentes às moléculas que passaram.

As amostras de sangue foram transferidas para microtubos de centrífuga contendo 40 U.I. de heparina sódica (Liquemine, Roche) e submetidas a centrifugação (4500 rpm) durante 15 minutos a 4°C. O

plasma, aproximadamente 500µl foi separado para um novo tubo e armazenado a -80°C até seu processamento.

Antes da determinação plasmática de nicotina e cotinina, calibrou-se o aparelho com uma solução padrão formada por 10ng de nicotina (Sigma), cotinina (Sigma) e acetanilida (Merck) em fase móvel constituída de 30mM de citrato (Merck), 30mM de Na₂HPO₄ (Merck), 1mM de ácido heptano 1-sulfônico (Merck), 10% acetonitrila (OmniSolv, Merck), trietilamina (Merck), para ajustar em 5,7 o pH, e filtrada em membrana de 0,2µm de poro (Millipore). A partir da área dos picos de absorbância gerados pelos padrões, calculou-se a porcentagem de extração destas drogas no plasma de rato não tratado.

Para isso, adicionou-se, em 200µl de plasma de rato não tratado, nicotina, cotinina, e acetanilida em concentrações conhecidas (10ng de cada, como o procedimento descrito para o padrão), 200µl de uma solução 5M de NaOH (Merck) e 1M de NaCl (Merck), 700µl de diclorometano (Merck); após agitar em vórtex durante 1 minuto, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. Adicionou-se mais 700µl de diclorometano a cada tubo que foi agitado em vórtex por mais 1 minuto e centrifugados como anteriormente descrito. A fase contendo o diclorometano foi transferida para um novo tubo que foi colocado em liofilizador (DNA120 SpeedVac, Thermo

Savant) durante aproximadamente 25 minutos, até a completa evaporação do solvente orgânico.

As concentrações de nicotina e cotinina no plasma dos ratos com as pastilhas implantadas foram determinadas como descrito acima para o cálculo da porcentagem de extração; no entanto, sem a adição de nicotina ou cotinina. A área do pico do padrão interno, acetanilida, serviu como o parâmetro para o cálculo da porcentagem de extração da nicotina e cotinina do plasma dos ratos já que a concentração desta droga era conhecida. Cada animal teve a concentração de nicotina e cotinina determinadas em duplicata.

O método foi validado através da construção de curvas de calibração para os três componentes a serem analisados (nicotina, cotinina e acetanilida). Para isso, 5 concentrações destas substâncias foram submetidas a quantificação por HPLC: 2,5; 5; 10; 50 e 100ng. Cada uma das quantificações foi feita em triplicata, a média aritmética das áreas dos picos foi considerada para a construção das curvas de calibração. Cada curva de calibração foi construída através da plotagem das médias das áreas dos picos referentes a cada concentração de cada droga no eixo das ordenadas, pela respectiva concentração no eixo das abscissas. A correlação linear foi calculada para cada uma das curvas.

A retirada de sangue foi feita antes e depois da implantação das pastilhas e depois a cada 15 dias.

V- Mensuração de parâmetros fisiológicos cardiovasculares e peso

Os animais foram submetidos à pletismografia de cauda computadorizada para o acompanhamento dos valores de pressão arterial média e frequência cardíaca obtidos nas semanas antes e depois da implantação das pastilhas e depois de 15 em 15 dias. As medidas foram realizadas em um aparelho de medida de pressão arterial caudal não invasiva (IITC Inc., Modelo 31, Califórnia, USA, Life Science Instruments), na qual os ratos permaneciam conscientes e em repouso acomodados em contêntores de acrílico em câmara aquecida a $\pm 29^{\circ}\text{C}$.

Os dados foram obtidos através da oclusão da artéria caudal por um manguito conectado ao aparelho. Para evitar que o procedimento causasse estresse ao animal, e consequente alterações nos resultados, os ratos foram previamente aclimatados ao procedimento antes das mensurações.

O peso corporal dos ratos foi mensurado durante todas as semanas do experimento.

VI- Testes comportamentais

VI.1- Labirinto em T elevado

O labirinto em T elevado é composto por três braços de dimensões iguais (50 X 10cm) elevados a 50cm do chão. Um dos braços é fechado por barreiras de 40cm de altura e está posicionado perpendicularmente aos outros dois braços abertos opostos (Viana, *et al.*,1994). Detalhes podem ser observados na Figura 03.

FIGURA 03: Modelo esquemático do labirinto em T elevado. O braço fechado está disposto perpendicularmente a dois braços abertos.

Procedimentos:

No dia do teste, os animais foram levados em suas gaiolas individuais até a sala experimental. Para os procedimentos foi utilizado

o protocolo de Viana e colaboradores (1994). Cada animal foi gentilmente colocado no braço fechado do labirinto em T elevado. O tempo utilizado para o mesmo sair deste braço com as quatro patas foi computado. Este parâmetro foi chamado de latência basal (LB). O rato foi retirado imediatamente após esta mensuração e colocado na gaiola por 30 segundos. Este procedimento foi repetido por outras duas sessões denominadas esquiva 1 (E1) e esquiva 2 (E2). Após o treinamento da esquiva inibitória, colocou-se o animal no final do braço aberto e o tempo levado para deixar este braço com as quatro patas foi computado e denominado fuga 1 (F1).

A fim de se verificar a memória para estes comportamentos, os animais foram re-expostos, três dias depois, às mesmas situações nas quais foram obtidas a esquiva 3 (E3) e a fuga 2 (F2). O tempo máximo de permanência permitido em todas as sessões foi de 5 minutos. Em caso do animal não sair com as quatro patas de um dos braços, este era retirado e o tempo computado em 300 segundos.

VI.II- Atividade motora

O exercício físico voluntário em rodas de corrida por quatro semanas alterou o perfil comportamental de camundongos levando a uma diminuição da ansiedade e impulsividade de forma a proteger o organismo dos efeitos deletérios do estresse (Binder, *et al.*, 2004).

Com base nesta informação, decidimos acompanhar o comportamento motor dos animais treinados e sedentários. Para tanto, foi utilizado o sistema sensor de atividade motora por emissão de feixes de luz infra-vermelha em campo aberto (InfraRed Motion Sensor – Coulborn Instruments, USA). O rato é colocado individualmente em uma caixa de polietileno (37 x 17 x 30 cm) semelhante à gaiola moradia, que possui um sensor infra-vermelho acoplado em cima da mesma e assim, o registro é feito em blocos de observação de 2 minutos durante 30 minutos. Este sistema envia as informações do teste para um programa de computador específico.

Quatro parâmetros diferentes foram detectados, obtidos e analisados: tempo sem movimento (TSM), que é definido pela média de tempo (segundos) em que o animal não se move ou se move por um tempo menor que 0,01s durante o tempo de observação; número sem movimentos (NSM), que corresponde ao número médio de ocorrências sem movimento durante o tempo do teste; tempo de grandes movimentos (TGM) que é definido como a média de tempo (segundos) em que o rato se move em um intervalo de tempo superior a 1,5s; e o número de grandes movimentos (NGM) que corresponde ao número médio de ocorrências de grandes movimentos durante o tempo do teste.

VII. Retirada e congelamento do encéfalo

Vinte e quatro horas após o término do período de treinamento, os ratos foram decapitados e seus encéfalos removidos rapidamente e congelados em isopentano (Sigma-Aldrich) mantido em gelo seco a uma temperatura de -35°C . Em seguida, os encéfalos foram armazenados no freezer -80°C até o seccionamento.

VIII. Hibridização *in situ*

Após o armazenamento no freezer -80°C , os encéfalos foram seccionados em fatias frontais de $20\mu\text{m}$ obtidas em criostato à -20°C da Área Tegmental Ventral ($-4,80\text{mm}$ do bregma), do Córtex Pré-Frontal ($2,20\text{mm}$ do bregma), e do Hipocampo ($-3,30\text{mm}$ do bregma) de acordo com a orientação do atlas de Paxinos and Watson (1986). As secções foram então montadas em lâminas de vidro previamente cobertas com poli L-lisina (Sigma), pré-hibridizadas e armazenadas em freezer a -80°C até a utilização. Todos os procedimentos foram realizados em condições ideais de assepsia, com uso de luvas e materiais esterilizados evitando, assim, a contaminação do material por RNases.

Antes de iniciar o tratamento das secções, fez-se o preparo do material necessário para a hibridização in situ. Toda a vidraria, espátulas de pesagem e afins foram esterilizados em forno apropriado a 180°C durante no mínimo 8 horas. Ponteiras, tubos e demais materiais de polietileno, assim como as soluções necessárias para a pré-hibridização e hibridização foram devidamente autoclavados por 45 minutos à 120°C para esterilização.

Na pré-hibridização as secções foram submetidas à fixação com paraformaldeído (Merck) diluído a 4% em tampão fosfato à 4°C durante 30 minutos, lavadas em 3x PBS por 5 minutos à temperatura ambiente e em 1x PBS também por 5 minutos e submetidas a tratamento em uma série de álcoois 70, 90 e 100%. Uma vez finalizada a pré-hibridização, as lâminas contendo as secções de tecido foram submetidas à hibridização.

As sondas de oligonucleotídeos (Invitrogen, Life Technologies, USA) foram sintetizadas de acordo com a sequência escolhida após pesquisa bibliográfica onde obteve-se uma sequência de bases que melhor identifica o RNA_m de interesse dos núcleos aqui estudados. As sondas escolhidas possuem as seguintes sequências de bases do cDNA:

Tirosina hidroxilase: de 1351 à 1398 (Grima *et al.*, 1985. Shores *et al.*, 1995);

Fator neurotrófico derivado do cérebro: de 562 à 609 (Matsuki *et al.*, 2001);

Glutaminase: de 931 à 960 (Najlerahim *et al.*, 1990).

As sondas foram marcadas radioativamente através de incubação com uma solução contendo ^{35}S -ATP (Amersham), a enzima terminal transferase (Roche), responsável pela ligação do ATP radioativo ao oligonucleotídeo e seu tampão específico (Roche). Após breve centrifugação, a solução permaneceu em incubação por 20 minutos a 37°C. Após este período, adicionou-se tRNA de fungo (Gibco) e tampão TE ao oligonucleotídeo marcado. Para a extração da sonda purificada foram adicionados fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 25:24:1 (USB). Os tubos contendo a sonda e os reagentes foram centrifugados por 5 minutos e o sobrenadante foi removido para um novo tubo de polietileno e a este novo tubo foram adicionados NaCl 5M e álcool absoluto a -20°C. Esta solução permaneceu em freezer a -80°C por 30 minutos sendo centrifugada à 11000 rpm por mais 30 minutos. Houve a formação de um pellet que consiste da amostra de oligonucleotídeo marcado e purificado, o qual foi re-suspenso em tampão TE contendo ditioneitol (DTT, Sigma). Em seguida a atividade (cpm) de uma amostra contendo 2µl da solução contendo o oligonucleotídeo marcado, em líquido de cintilação, foi

medida em um contador de cintilação (Tri-carb 2100TR Liquid Scintillation Analyser, Packard).

Foi feito um tampão contendo o oligonucleotídeo complementar ao RNA_m do tecido marcado radioativamente e substâncias que favorecem a hibridização da sonda com o RNA_m de interesse ou que bloqueiam sítios inespecíficos. O tampão de hibridização foi constituído de formamida (Sigma), RNA_t de fungo (Life Tech), DNA de esperma de salmão (Amersham), DTT (Sigma), solução de Denhardt (USB), dextran sulfato (Amersham), HEPES (Sigma), cloreto de sódio (Merck) e EDTA (Sigma). O tampão juntamente com o oligonucleotídeo marcado na concentração ideal (7000cpm/ μ m) foi colocado sobre as secções que permaneceram hibridizando em estufa durante 20 horas à 42°C.

O controle da especificidade da marcação foi feito através do deslocamento da sonda radioativa pela adição da mesma sonda não marcada ao tampão de hibridização contendo a sonda marcada. A sonda de oligonucleotídeo não marcada foi adicionada numa concentração 100 vezes maior que aquela da marcada.

Para a lavagem das secções foram preparadas soluções de lavagem compostas de cloreto de sódio e citrato tri-sódico (SSC) em água com dietilpirocarbonato (DEPC) onde as lâminas permaneceram por 4 vezes de 15 minutos a 55°C. Em seguida as secções foram

lavadas em SSC à temperatura ambiente por 1 hora e desidratadas em etanol 70% seguido de etanol 90% e 100%.

Depois de secas, as lâminas foram montadas em cassetes para radioautografia (Amersham Biosciences) e expostas a filme radiosensível (Biomax MR, Kodak) por 12, 60 e 120 dias. Após este período, os cassetes foram abertos em câmara escura e os filmes retirados. A revelação do filme foi feita utilizando-se revelador GBX (Kodak) durante 5 minutos e fixador GBX (Kodak) por 10 minutos.

Os radioautogramas foram analisados utilizando-se um sistema de análise de imagen (Imaging Research Inc., Brock University, Canada, modelo M4/SK/ALU). A determinação da graduação dos tons de cinza dos filmes radioautográficos, marcado pela radioatividade liberada das secções, foi obtida através de medidas densitométricas semiquantitativas bilaterais das áreas encefálicas de interesse. A intensidade da luz que atravessa o filme radioautográfico foi fixada em 200 unidades densitométricas. O valor da marcação do filme fora da secção (background) foi subtraído da marcação das áreas em questão nas secções hibridizadas com oligonucleotídeo marcado a fim de se obter o valor específico dos tons de cinza (Benfenati *et al.*, 1986).

IX- Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram analisados através do teste t de Student, análise de variância (Anova) de uma via, análise de variância (Anova) de duas vias ou pela análise de variância (Anova) de medidas repetidas, dependendo do caso. A análise estatística foi feita através do programa GraphPad Prism, versão 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego – Califórnia, USA). Serão aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultar em um p menor ou igual a 0,05.

Resultados

I- Treinamento físico dos animais

Após 7 semanas de treinamento físico em rodas de corrida espontânea, podemos aferir sobre o perfil de corrida dos ratos tratados com nicotina e dos ratos tratados com placebo. Durante o ciclo escuro de 12 horas, os ratos nicotinizados obtiveram a média percorrida de 480,9m; já os placebos obtiveram a média percorrida de 395,7m, sendo que alguns animais chegaram a percorrer de 2000 a 2500m no período de 12 horas. A velocidade média de ambos os grupos variou de 0,01 a 0,68m/s. Os dados mostram que, apesar de não haver uma diferença significativa entre os grupos, o grupo tratado com nicotina mostrou uma maior média percorrida durante o treinamento.

A Tabela 01 mostra os valores agregados semanalmente de cada grupo treinado. A Figura 05 ilustra a média das distâncias percorridas por semana pelos dois grupos treinados.

II- Concentração de nicotina e cotinina plasmáticas

Através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi demonstrado que o tratamento com nicotina foi eficiente. Tanto a nicotina e o seu metabólito, cotinina, foram encontrados apenas no sangue dos ratos tratados com a droga, não aparecendo em amostras

de plasma de ratos tratados com placebo, sendo que a concentração média de nicotina e cotinina no plasma dos animais tratados foi, respectivamente, de $32 \pm 11 \text{ ng/ml}$ e $0,92 \pm 0,28 \text{ ng/ml}$.

FIGURA 04: Cromatogramas representativos ilustrando o perfil das curvas de absorbância da nicotina (1), cotinina (2) e acetanilida (3) em ratos tratados com placebo (A) ou nicotina (B).

III- Evolução dos parâmetros fisiológicos cardiovasculares e peso

Desde três dias antes da implantação das pastilhas de nicotina ou placebo e seguindo, durante o treinamento físico espontâneo, os parâmetros fisiológicos cardiovasculares tais como frequência cardíaca e pressão arterial média foram monitoradas em pletismógrafo caudal.

Tabela 01: Valores médios das distâncias percorridas pelos animais ao longo das semanas de treinamento nas rodas de corrida espontânea.

	Nicotina Treinado	Placebo Treinado
1º Semana	719,40 ± 152,90	554,70 ± 117,00
2º Semana	819,00 ± 201,00	559,70 ± 132,20
3º Semana	530,20 ± 94,99	488,30 ± 111,60
4º Semana	460,30 ± 74,45	436,70 ± 117,30
5º Semana	291,80 ± 42,62	261,60 ± 70,76
6º Semana	315,70 ± 51,59	268,20 ± 83,15
7º Semana	229,80 ± 20,40	200,90 ± 54,09

Valores expressos em metros (m) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student, n=7.

Figura 05: Evolução das distâncias percorridas em metros (m) pelos animais ao longo das semanas de treinamento nas rodas de corrida espontânea durante as 7 semanas de treinamento. Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student, n=7.

Em relação aos valores da pressão arterial média, houve diferença significativa entre os grupos nicotina treinado e nicotina sedentário na quarta semana de treinamento e também houve diferença no grupo placebo sedentário, comparando a semana antes da implantação da pastilha com a sexta semana de treinamento (Tabela 02 e Figura 06).

PAM

Tabela 02: Valores da pressão arterial média (PAM) dos grupos experimentais ao longo das semanas de experimento.

	Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
	Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
Pré-nicotina	110,60 ± 3,89	109,10 ± 2,93	109,50 ± 3,56	101,00 ± 2,22
Pós-nicotina	115,60 ± 5,68	118,00 ± 4,13	111,60 ± 3,04	103,30 ± 2,02
2º Semana	108,60 ± 2,55	106,60 ± 2,83	114,40 ± 3,81	107,90 ± 1,42
4º Semana	104,80 ± 3,60	117,30 ± 1,77 [■]	107,40 ± 2,53	107,40 ± 1,49
6º Semana	108,30 ± 3,93	109,60 ± 6,06	106,90 ± 3,47	109,60 ± 1,59*

Valores expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de uma via [■]p<0,05 (difere do grupo nicotina treinado) e ANOVA de medidas repetidas *p<0,05 (difere da semana pré-nicotina); n=8 (grupos treinados) e n=7 (grupos sedentários).

Figura 06: Evolução da pressão arterial média em mmHg dos animais ao longo das semanas de experimento. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de uma via $\blacksquare p < 0,05$ (difere do grupo nicotina treinado) e ANOVA de medidas repetidas $*p < 0,05$ (difere da semana pré-nicotina); $n=8$ (grupos treinados) e $n=7$ (grupos sedentários).

Com relação à frequência cardíaca, houve uma diminuição significativa nos grupos Nicotina-treinado quando comparada a semana antes do tratamento com nicotina com a 4º e a 6º semana de treinamento físico e no grupo Placebo-treinado quando comparada a semana antes do tratamento com nicotina com a 2º, 4º e a 6º semana de treinamento físico, mostrando que o treinamento físico contribuiu

para a diminuição deste parâmetro neste dois grupos experimentais. Houve também uma diminuição da frequência cardíaca quando comparada a 6^o semana de treinamento entre os dois grupos nicotinizados (treinados e sedentários), mostrando uma menor frequência cardíaca em repouso nos animais treinados (Tabela 03 e Figura 07).

FC

Tabela 03: Valores da frequência cardíaca (FC) em repouso dos grupos experimentais ao longo das semanas de experimento.

	Nicotina Treinado	Nicotina Sedentário	Placebo Treinado	Placebo Sedentário
Pré-nicotina	396,70 ± 9,00 [■]	395,50 ± 6,50	395,70 ± 9,60 [♦]	402,30 ± 3,44
Pós-nicotina	377,10 ± 3,34	396,30 ± 8,52	373,60 ± 9,00	384,10 ± 11,64
2 ^o Semana	373,50 ± 7,65	376,00 ± 9,48	367,10 ± 3,50	376,30 ± 10,24
4 ^o Semana	360,00 ± 8,63	378,00 ± 6,95	352,50 ± 11,79	376,90 ± 9,12
6 ^o Semana	362,90 ± 9,75	395,40 ± 7,29*	350,00 ± 2,63	366,10 ± 8,15

Valores expressos em batimentos por minuto (bpm) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de uma via *p<0,05 (difere do grupo nicotina treinado) e ANOVA de medidas repetidas [■]p<0,05 (difere da 4^o e 6^o semanas) e [♦]p<0,01 (difere da 2^o, 4^o e 6^o semanas); n=8 (Nic-Trei) e n=7 (Nic-Sed, Pla-Trei e Pla-Sed).

Figura 07: Evolução da frequência cardíaca em batimentos por minuto (bpm) dos animais ao longo das semanas de experimento. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de uma via * $p < 0,05$ (difere do grupo nicotina treinado) e ANOVA de medidas repetidas • $p < 0,05$ (difere da 4º e 6º semanas) e ♦ $p < 0,01$ (difere da 2º, 4º e 6º semanas); $n=8$ (Nic-Trei) e $n=7$ (Nic-Sed, Pla-Trei e Pla-Sed).

Na mensuração do peso dos ratos, podemos observar um aumento de peso com o passar das semanas nos quatro grupos experimentais, porém, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 04 e Figura 08).

Peso

Tabela 04: Valores médios do peso dos grupos experimentais ao longo das semanas de experimento.

	Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
	Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
Pré-nicotina	259,50 ± 10,10	246,00 ± 11,03	249,60 ± 7,43	257,10 ± 9,43
Pós-nicotina	275,50 ± 7,39	268,30 ± 11,57	264,90 ± 6,32	277,80 ± 5,76
1º Semana	288,50 ± 8,34	292,80 ± 14,94	280,60 ± 9,50	297,10 ± 8,36
2º Semana	297,80 ± 8,46	309,50 ± 14,05	285,90 ± 9,22	309,70 ± 7,70
3º Semana	316,80 ± 9,35	324,00 ± 13,95	307,60 ± 7,00	326,10 ± 6,97
4º Semana	326,80 ± 8,83	327,50 ± 13,27	319,30 ± 7,54	333,10 ± 5,79
5º Semana	342,90 ± 9,43	343,50 ± 14,36	334,00 ± 7,20	341,70 ± 5,34
6º Semana	357,30 ± 10,41	348,80 ± 15,21	342,00 ± 6,67	350,00 ± 6,17
7º Semana	361,10 ± 9,96	350,80 ± 15,00	349,60 ± 7,56	352,00 ± 7,46

Valores expressos em gramas (g) como média ± erro padrão da média e analisados a cada semana pelo teste ANOVA de uma via; n=8 (Nic-Trei), n=7 (Pla-Trei e Pla-Sed) e n=6 (Nic-Sed).

Figura 08: Evolução do peso em gramas (g) dos animais ao longo das 9 semanas de experimento. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de uma via; $n=8$ (Nic-Trei), $n=7$ (Pla-Trei e Pla-Sed) e $n=6$ (Nic-Sed).

IV- Análise comportamental

IV.1- Labirinto em T elevado

Tendo em vista analisar diferentes tipos de ansiedade e verificar se o tratamento crônico com nicotina e/ou o treinamento físico pudessem alterar os padrões comportamentais dos ratos, utilizamos o labirinto em T elevado. A esQUIVA INIBITÓRIA representa o medo condicionado ou aprendido, enquanto a fuga representa o medo incondicionado ou inato. Para a obtenção dos dados, os animais foram colocados no braço fechado e no braço aberto e o tempo despendido por cada rato neles foi mensurado.

Na esQUIVA INIBITÓRIA, o grupo nicotinizado treinado apresentou uma latência basal menor em relação ao grupo nicotinizado sedentário. Houve também diferença significativa no grupo nicotinizado treinado quando comparadas a latência basal com as outras medidas subseqüentes e também na esQUIVA 1 com a esQUIVA 2. Foi visto também que o grupo placebo treinado possui a latência basal estatisticamente menor à esQUIVA 2 (Tabela 05 e Figura 09), indicando que os dois grupos treinados aprenderam se esQUIVAR.

A Tabela 06 e o Figura 10 mostram a performance dos grupos experimentais na fuga. Observou-se uma diminuição significativa em ambos os grupos de animais nicotinizados (treinados e sedentários)

quando comparadas a fuga 1 e a fuga 2 (realizada 3 dias depois), indicando que esses dois grupos de ratos parecem ter acessado a memória de fuga. Foi visto também que o grupo placebo sedentário apresenta maior latência quando comparado aos grupos nicotina sedentário e placebo treinado na fuga 1.

Esquivas

Tabela 05: Valores das latências das respostas de esquiva inibitória no labirinto em T elevado dos grupos experimentais.

	Nicotina Treinado	Nicotina Sedentário	Placebo Treinado	Placebo Sedentário
Latência Basal	36,71 ± 12,94 ^{•*}	255,40 ± 27,32	130,50 ± 42,17	249,80 ± 50,20
Esquiva 1	182,70 ± 55,30	252,60 ± 47,40	186,70 ± 51,60	300,00 ± 0,00
Esquiva 2	276,80 ± 23,17	285,60 ± 14,40	263,60 ± 18,52 [■]	300,00 ± 0,00
Esquiva 3	139,90 ± 41,78	272,30 ± 22,54	185,80 ± 52,70	300,00 ± 0,00

Valores expressos em segundos (s) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de uma via ^{*}p<0,01 (difere do grupo nicotina sedentário) e ANOVA de medidas repetidas [■]p<0,05 (difere da latência Basal), [•]p<0,001 (difere das esquivas 1, 2 e 3);); n=7 (Nic-Trei e Pla-Trei) e n=7 (Nic-Sed e Pla-Sed).

Figura 09: Evolução da latência de resposta em segundos (s), da esquivas inibitória no labirinto em T elevado. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de uma via * $p < 0,01$ (difere do grupo nicotina sedentário) e ANOVA de medidas repetidas ■ $p < 0,05$ (difere da latência Basal), • $p < 0,001$ (difere das esquivas 1, 2 e 3); $n=7$ (Nic-Trei e Pla-Trei) e $n=7$ (Nic-Sed e Pla-Sed).

Fuga

Tabela 06: Valores das latências das respostas de fuga no labirinto em T elevado dos grupos experimentais.

	Nicotina Treinado	Nicotina sedentário	Placebo Treinado	Placebo Sedentário
Fuga 1	27,29 ± 4,67 [•]	20,67 ± 5,04 ^{•*}	15,86 ± 4,73 ^{**}	48,80 ± 10,12
Fuga 2	9,57 ± 2,45	7,86 ± 1,83	14,63 ± 4,44	25,83 ± 8,75

Valores expressos em segundos (s) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student [•]*p*<0,05 e [•]*p*<0,01 (diferem da fuga 2) e teste ANOVA de uma via ^{*}*p*<0,05 e ^{**}*p*<0,01 (diferem do grupo Pla-Sed), *n*=7 (Nic-Trei e Pla-Trei) e *n*=6 (Nic-Sed e Pla-Sed).

Figura 10: Evolução da latência de resposta em segundos (s), da fuga no labirinto em T elevado. Valores expressos em segundos (s) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student [•]*p*<0,05 e [•]*p*<0,01 (diferem da fuga 2) e teste ANOVA de uma via ^{*}*p*<0,05 e ^{**}*p*<0,01 (diferem do grupo Pla-Sed), *n*=7 (Nic-Trei e Pla-Trei) e *n*=6 (Nic-Sed e Pla-Sed).

IV.II- Atividade motora

Utilizando o sistema sensor de atividade motora por emissão de feixes de luz infra-vermelha em campo aberto (InfraRed Motion Sensor – Coulborn Instruments, USA), foi verificado o comportamento motor dos 4 grupos de ratos experimentais por 30 minutos. Os dados foram plotados em intervalos de 10 minutos para verificação de habituação ao ambiente e em tempo total (30 minutos).

Com relação ao tempo sem movimento, que é o tempo em que os ratos não se movimentaram ou o fizeram em um tempo inferior a 0,01s, os 4 grupos experimentais mostraram um aumento significativo intra-grupo entre os tempos 00-10 minutos e 21-30 minutos, indicando habituação da atividade motora. Os dados também mostram que os grupos treinados parecem possuir um tempo sem movimento maior que os grupos sedentários no período de 00-10 minutos e 11-20 minutos (estatisticamente não significante), o que pode indicar uma tendência de habituação mais rápida da atividade motora. Na análise do tempo sem movimentos total, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 7 e Figuras 11 e 12).

Na análise do número sem movimentos, que se refere ao número médio de eventos sem movimento, não foram encontradas diferenças entre os 4 grupos experimentais (Tabela 8 e Figuras 13 e 14).

TSM

Tabela 07: Valores da atividade motora do tempo sem movimento (TSM) no sistema sensor de atividade motora Infra Red dos grupos experimentais.

	Nicotina Treinado	Nicotina Sedentário	Placebo Treinado	Placebo Sedentário
00-10 min.	321,80 ± 22,87	283,40 ± 43,84	314,60 ± 37,62	291,10 ± 29,58
11-20 min.	397,80 ± 18,83	368,30 ± 35,79	353,10 ± 38,84	342,70 ± 32,03
21-30 min.	403,40 ± 27,54*	448,00 ± 33,18 [•]	432,90 ± 30,87 [•]	356,60 ± 39,83 [•]
Total	1123,00 ± 66,65	1102,00 ± 101,20	1108,00 ± 96,15	990,40 ± 97,72

Valores expressos em segundos (s) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos.

**p*<0,001 (difere do 00-10 min.), [•]*p*<0,01 (difere do 00-10 min.); *n*=8 (grupos treinados) e *n*=7 (grupos sedentários).

Figura 11: Tempo sem movimento (TSM) dos grupos de animais tratados mensurado no sistema sensor de atividade motora Infra Red em intervalos de 10 minutos. Valores expressos em segundos (s) como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos. * $p < 0,001$ (difere do 00-10 min.), • $p < 0,01$ (difere do 00-10 min.); $n = 8$ (grupos treinados) e $n = 7$ (grupos sedentários).

Figura 12: Tempo sem movimento (TSM) dos grupos de animais tratados mensurado no sistema sensor de atividade motora Infra Red em tempo total (30 minutos). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student; $n = 8$ (grupos treinados) e $n = 7$ (grupos sedentários).

NSM

Tabela 08: Valores da atividade motora do número sem movimento (NSM) no sistema sensor de atividade motora Infra Red dos grupos experimentais.

	Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
	Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
00-10 min.	187,90 ± 9,3	190,30 ± 11,93	172,30 ± 11,10	197,90 ± 13,59
11-20 min.	188,30 ± 4,19	192,30 ± 4,84	181,10 ± 11,11	199,00 ± 9,04
21-30 min.	184,10 ± 7,29	168,00 ± 14,63	162,30 ± 12,34	193,30 ± 9,69
Total	563,30 ± 15,61	554,90 ± 25	525,60 ± 21,87	590,10 ± 30,42

Valores expressos em número como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos; n=8 (grupos treinados) e n=7 (grupos sedentários). Valores expressos em número como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos; n=8 (grupos treinados) e n=7 (grupos sedentários).

Figura 13: Número sem movimento (NSM) dos grupos de animais tratados mensurado no sistema sensor de atividade motora Infra Red em intervalos de 10 minutos. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste t de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos; $n=8$ (grupos treinados) e $n=7$ (grupos sedentários).

Figura 14: Número sem movimento (NSM) dos grupos de animais tratados mensurado no sistema sensor de atividade motora Infra Red em tempo total (30 minutos). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste *t*; $n=8$ (grupos treinados) e $n=7$ (grupos sedentários).

Na análise do tempo de grandes movimentos, que é a média de tempo em que o rato se move em um intervalo superior a 1,5s, houve uma diminuição significativa intra-grupo entre os tempos 00-10 minutos e 21-30 minutos, indicando que houve habituação da atividade motora dos ratos. Os dados também mostram que os grupos treinados possuem um tempo de grandes movimentos menor que os grupos sedentários no período de 00-10 minutos e 11-20 minutos (estatisticamente não significante), o que pode indicar uma tendência

de habituação da atividade motora mais rápida. Na análise do tempo total, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 09 e Figuras 15 e 16).

No número de grandes movimentos, que é o número médio de ocorrências de grandes movimentos, somente o grupo Placebo Sedentário não apresentou diferença entre os tempos de 0 a 10 e 11 a 20 minutos, indicando que este grupo não apresentou habituação. Na análise do tempo total, não houve diferença significativa entre os 4 grupos experimentais (Tabela 10 e Figuras 17 e 18).

TGM

Tabela 09: Valores da atividade motora do tempo de grandes movimentos (TGM) no sistema sensor de atividade motora Infra Red dos grupos experimentais.

	Nicotina Treinado	Nicotina Sedentário	Placebo Treinado	Placebo Sedentário
00-10 min.	238,40 ± 24,55	272,00 ± 48,76	243,80 ± 39,46	265,90 ± 34,98
11-20 min.	152,10 ± 20,39*	186,30 ± 37,30 [•]	191,30 ± 33,85 [°]	207,60 ± 35,57 [•]
21-30 min.	152,30 ± 28,66*	102,00 ± 31,01 ^{•♦}	123,90 ± 30,84 ^{°♦}	194,90 ± 44,88 [•]
Total	541,50 ± 69,61	560,30 ± 108,10	562,90 ± 99,08	646,40 ± 121,00

Valores expressos em segundos (s) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos.

*p<0,001 (difere do 00-10 min.), [•]p<0,01 (difere do 00-10 min.), [°]p<0,05 (difere do 00-10 min.), [♦]p<0,05 (difere do 11-20); n=8 (grupos treinados) e n=7 (grupos sedentários).

Figura 15: Tempo de grandes movimentos (TGM) dos grupos de animais tratados mensurado no sistema sensor de atividade motora Infra Red em intervalos de 10 minutos. Valores expressos em segundos (s) como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos. * $p < 0,001$ (difere do 00-10 min.), * $p < 0,01$ (difere do 00-10 min.), ° $p < 0,05$ (difere do 00-10 min.), * $p < 0,05$ (difere do 11-20); $n = 8$ (grupos treinados) e $n = 7$ (grupos sedentários).

Figura 16: Tempo de grandes movimentos (TGM) dos grupos de animais tratados mensurado no sistema sensor de atividade motora Infra Red em tempo total (30 minutos). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student; $n=8$ (grupos treinados) e $n=7$ (grupos sedentários).

NGM

Tabela 10: Valores da atividade motora do número de grandes movimentos (NGM) no sistema sensor de atividade motora Infra Red dos grupos experimentais.

	Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
	Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
00-10 min.	89,63 ± 3,21	84,14 ± 6,90	82,88 ± 7,15	94,14 ± 7,16
11-20 min.	64,75 ± 4,71*	72,14 ± 8,47	69,63 ± 8,60	77,00 ± 8,80 ^o
21-30 min.	63,13 ± 7,43*	44,57 ± 10,10 ^{•#}	53,25 ± 9,61 ^{•#}	80,29 ± 7,91
Total	217,50 ± 13,19	200,90 ± 17,80	205,80 ± 21,41	244,30 ± 22,67

Valores expressos em número como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos. **p*<0,01 (difere do 00-10 min.), [•]*p*<0,05 (difere do 00-10 e do 11-20 min.), ^o*p*<0,05 (difere do 00-10 min.), [•]*p*<0,01 (difere do 00-10 min.), [#]*p*<0,05 (difere do grupo Pla-Sed); n=8 (grupos treinados) e n=7 (grupos sedentários).

Figura 17: Número de grandes movimentos (NGM) dos grupos de animais experimentais mensurado no sistema sensor de atividade motora Infra Red em intervalos de 10 minutos. Valores expressos em número como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student pareado intra-grupos e não pareado inter-grupos. * $p < 0,01$ (difere do 00-10 min.), • $p < 0,05$ (difere do 00-10 e do 11-20 min.), ° $p < 0,05$ (difere do 00-10 min.), * $p < 0,01$ (difere do 00-10 min.), # $p < 0,05$ (difere do grupo Pla-Sed); $n = 8$ (grupos treinados) e $n = 7$ (grupos sedentários).

Figura 18: Número de grandes movimentos (NGM) dos grupos de animais tratados mensurado no sistema sensor de atividade motora Infra Red em tempo total (30 minutos). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student; $n=8$ (grupos treinados) e $n=7$ (grupos sedentários).

V- Análise da expressão gênica

V.1- *Tirosina hidroxilase*

Não foi observada alterações na expressão do RNA_m da tirosina hidroxilase (TH) nos ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e também dos ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo.

TH-VTA

Tabela 11: Valores da densidade óptica relativa, em unidades arbitrárias, referentes à marcação do RNA_m da tirosina hidroxilase na Área Tegmental Ventral dos grupos experimentais.

Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
0,086 ± 0,016	0,058 ± 0,005	0,053 ± 0,008	0,053 ± 0,006

Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias; n=8 (Nic-Trei), n=7 (Nic-Sed, Pla-Trei e Pla-Sed).

Figura 19: Densidade óptica relativa da marcação, no filme radiosensível, pela sonda radioativa complementar ao RNA_m da TH na Área Tegmental Ventral de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias; n=8 (Nic-Trei), n=7 (Nic-Sed, Pla-Trei e Pla-Sed).

Figura 20: Imagem do filme radioautográfico ilustrando a secção do encéfalo de rato marcada pela sonda complementar ao RNA_m da tirosina hidroxilase na Área Tegmental Ventral (VTA).

V.II- Glutaminase

Não foram observadas alterações na expressão do RNA_m da glutaminase (GLU) no Córtex Pré-Frontal dos ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e também dos ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo.

GLU-PFC

Tabela 12: Valores da densidade óptica relativa, em unidades arbitrárias, referentes à marcação do RNA_m da glutaminase no Córtex Pré-Frontal dos grupos experimentais.

Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
0,435 ± 0,030	0,478 ± 0,037	0,492 ± 0,029	0,444 ± 0,024

Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias; n=8 (Nic-Trei), n=7 (Nic-Sed), n=6 (Pla-Trei e Pla-Sed).

Figura 21: Densidade óptica relativa da marcação, no filme radiosensível, pela sonda radioativa complementar ao RNA_m da GLU no Córtex Pré-Frontal de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo. Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias; n=8 (Nic-Trei), n=7 (Nic-Sed), n=6 (Pla-Trei e Pla-Sed).

Foram encontradas diferenças na expressão do RNA_m da glutaminase no Giro Denteado (GD) e na região CA3 do Hipocampo, não havendo diferença na região CA1. No Giro Denteado, o grupo nicotina treinado apresentou uma maior expressão do RNA_m da glutaminase que o grupo nicotina sedentário. Na região CA3 do Hipocampo, o grupo placebo treinado mostrou uma maior expressão do RNA_m da glutaminase que os grupos placebo sedentário e nicotina treinado, e o grupo nicotina sedentário apresentou uma menor expressão deste RNA_m quando comparado com o grupo Placebo sedentário.

GLU-GD

Tabela 13: Valores da densidade óptica relativa, em unidades arbitrárias, referentes à marcação do RNA_m da glutaminase no Giro Denteado dos grupos experimentais.

Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
0,374 ± 0,013*	0,363 ± 0,012	0,367 ± 0,010	0,368 ± 0,007

Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. *p< 0,05; n=8 (Pla-Trei), n=7 (Nic-Sed), n=6 (Nic-Trei e Pla-Sed).

Figura 22: Densidade óptica relativa da marcação, no filme radiosensível, pela sonda radioativa complementar ao RNA_m da GLU no Giro Denteado de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo. Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. *p< 0,05; n=8 (Nic-Trei), n=7 (Nic-Sed), n=6 (Pla-Trei e Pla-Sed).

GLU-CA1

Tabela 14: Valores da densidade óptica relativa, em unidades arbitrárias, referentes à marcação do RNA_m da glutaminase na região CA1 do hipocampo dos grupos experimentais.

Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
0,217 ± 0,010	0,191 ± 0,008	0,215 ± 0,008	0,203 ± 0,005

Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias; n=8 (Nic-Trei), n=7 (Nic-Sed, Pla-Trei e Pla-Sed).

Figura 23: Densidade óptica relativa da marcação, no filme radiosensível, pela sonda radioativa complementar ao RNA_m da GLU na região CA1 do Hipocampo de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo. Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias; n=8 (Nic-Trei), n=7 (Nic-Sed, Pla-Trei e Pla-Sed).

GLU-CA3^{1,2,3}

Tabela 15: Valores da densidade óptica relativa, em unidades arbitrárias, referentes à marcação do RNA_m da glutaminase na região CA3 do hipocampo dos grupos experimentais.

Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
0,223 ± 0,010 [•]	0,191 ± 0,008 [♦]	0,370 ± 0,010 [#]	0,364 ± 0,006

Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. [•]p < 0,001 (difere do grupo Pla-Trei); [#]♦p < 0,001 (diferem do grupo Pla-Sed). O ¹tratamento, o ²treinamento e a ³interação entre o tratamento e o treinamento influenciam a expressão gênica da GLU na região CA3 do Hipocampo; n=7 (Nic-Trei, Nic-Sed e Pla-Sed), n=6 (Pla-Trei).

Figura 24: Densidade óptica relativa da marcação, no filme radiosensível, pela sonda radioativa complementar ao RNA_m da GLU na região CA3 do Hipocampo de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo. Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. •p < 0,001 (difere do grupo Pla-Trei); #♦p < 0,001 (diferem do grupo Pla-Sed). O ¹tratamento, o ²treinamento e a ³interação entre o tratamento e o treinamento influenciam a expressão gênica da GLU na região CA3 do Hipocampo; n=7 (Nic-Trei, Nic-Sed e Pla-Sed), n=6 (Pla-Trei).

Figura 25: Imagem do filme radioautográfico ilustrando secções de encéfalos de ratos marcadas pela sonda complementar ao RNA_m da glutaminase em (A) áreas do Hipocampo (HIP) e em (B) Córtex Pré-Frontal (PFC).

V.III- Fator neurotrófico derivado do cérebro

Foram encontradas diferenças na expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no Giro Denteado e nas regiões CA1 e CA3 do Hipocampo. No Giro Denteado, o grupo Pla-Trei apresentou uma maior expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro que o grupo Pla-Sed. Na região CA1 do Hipocampo, tanto o grupo Pla-Trei como o grupo Nic-Sed mostraram uma maior expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro que o grupo Pla-Sed. Já na região CA3 do Hipocampo, o grupo Pla-Trei também mostrou uma maior expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro que o grupo Pla-Sed.

BDNF-GD¹

Tabela 16: Valores da densidade óptica relativa, em unidades arbitrárias, referentes à marcação do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no Giro Denteado dos grupos experimentais.

Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
0,276 ± 0,010	0,270 ± 0,018	0,286 ± 0,009*	0,237 ± 0,007

Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. *p < 0,05 (difere do Pla-Sed). ¹O tratamento influenciou a expressão gênica do BDNF no Giro denteado; n=8 (Pla-Trei), n=7 (Nic-Trei e Nic-Sed), n=6 (Pla-Sed).

Figura 26: Densidade óptica relativa da marcação, no filme radiosensível, pela sonda radioativa complementar ao RNA_m do BDNF no Giro Denteado de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo. Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. * $p < 0,05$ (difere do Pla-Sed). ¹O tratamento influenciou a expressão gênica do BDNF no Giro denteado; $n=8$ (Pla-Trei), $n=7$ (Nic-Trei e Nic-Sed), $n=6$ (Pla-Sed).

BDNF-CA1^{1,2}

Tabela 17: Valores da densidade óptica relativa, em unidades arbitrárias, referentes à marcação do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na região CA1 do Hipocampo dos grupos experimentais.

Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
0,046 ± 0,004	0,048 ± 0,002*	0,055 ± 0,003***	0,036 ± 0,004

Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. *p< 0,05 e ***p< 0,001 (diferem do Pla-Sed). O ¹treinamento e a ²interação entre o tratamento e o treinamento influenciam a expressão gênica do BDNF na região CA1 do Hipocampo; n=7 (Pla-Trei e Pla-Sed), n=6 (Nic-Trei e Nic-Sed).

BDNF-CA3¹

Tabela 18: Valores da densidade óptica relativa, em unidades arbitrárias, referentes à marcação do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na região CA3 do Hipocampo dos grupos experimentais.

Nicotina	Nicotina	Placebo	Placebo
Treinado	Sedentário	Treinado	Sedentário
0,151 ± 0,006	0,142 ± 0,005	0,147 ± 0,006*	0,125 ± 0,005

Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. *p< 0,05 (difere do Pla-Sed). ¹O treinamento influenciou a expressão gênica do BDNF na região CA3 do Hipocampo; n=8 (Pla-Trei), n=7 (Nic-Sed), n=6 (Nic-Trei e Pla-Sed).

Figura 27: Densidade óptica relativa da marcação, no filme radiosensível, pela sonda radioativa complementar ao RNA_m do BDNF na região CA1 do Hipocampo de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo. Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (diferem do Pla-Sed). O ¹treinamento e a ²interação entre o tratamento e o treinamento influenciam a expressão gênica do BDNF na região CA1 do Hipocampo; $n=7$ (Pla-Trei e Pla-Sed), $n=6$ (Nic-Trei e Nic-Sed).

Figura 28: Densidade óptica relativa da marcação, no filme radiosensível, pela sonda radioativa complementar ao RNA_m do BDNF na região CA3 do Hipocampo de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e de ratos tratados cronicamente com nicotina ou placebo e submetidos ao treinamento físico espontâneo. Valores expressos como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste Anova de duas vias. * $p < 0,05$ (difere do Pla-Sed). ¹O treinamento influenciou a expressão gênica do BDNF na região CA3 do Hipocampo; $n=8$ (Pla-Trei), $n=7$ (Nic-Sed), $n=6$ (Nic-Trei e Pla-Sed).

Figura 29: Imagem do filme radioautográfico ilustrando a secção do encéfalo do rato marcada pela sonda complementar ao RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro em áreas do Hipocampo (HIP).

Discussão

I- Treinamento físico dos animais

Existem vários modelos de treinamento físico de animais de laboratório. Dentre eles, podemos destacar o treinamento físico forçado e o espontâneo. O treinamento físico forçado em esteiras ou a natação são, junto com o espontâneo, muito usados, porém alguns de seus resultados no âmbito de adaptações cardiovasculares e outras podem sofrer grandes alterações por causa do estresse a que o animal experimental é submetido. Foi observado um aumento de serotonina e diminuição de noradrenalina no cérebro de ratos após exercício de natação exaustiva (Barchas e Friedman, 1963; Moore e Lariviere, 1964), que pode ser devido ao estresse a que o animal foi submetido, o que não ocorre em exercício espontâneo, que demonstra um aumento nos níveis cerebrais de serotonina, noradrenalina e dopamina (Chaouloff, 1989). Tendo isto em mente, e sabendo também que protocolos de treinamento físico em rodas de corrida espontânea são bastante variados no que diz respeito à semanas de treinamento, a utilização de um protocolo de 7 semanas de treinamento físico espontâneo é considerado eficaz no que diz respeito à bradicardia de repouso e a alterações periféricas em ratos espontaneamente hipertensos, que são adaptações importantes do treinamento físico aeróbio (Moraes, 2005).

A bradicardia de repouso é uma adaptação hemodinâmica do organismo de sujeitos submetidos a exercícios aeróbios onde o mesmo adquire um trabalho cardíaco mais eficiente, podendo manter o débito cardíaco com uma frequência menor de batimentos por minutos.

Podemos observar que o treinamento físico espontâneo de ratos Wistar por 7 semanas apresenta um padrão de diminuição de metros percorridos ao longo das semanas de treinamento, com uma maior quantidade de metros percorrida nas 2 primeiras semanas e decaindo a 1/3 na 7ª semana (Tabela 01). O treinamento físico mostrou-se eficaz em relação a bradicardia de repouso observada a partir da 2ª semana de treinamento (Tabela 03), além de alterar padrões comportamentais.

Esses dados podem ser atribuídos exclusivamente ao exercício físico espontâneo, já que os animais tiveram livre acesso à água e comida e este método permite ao animal se exercitar quando e com a intensidade que ele desejar, não causando assim nenhum estresse físico ou psicológico, o que pode ocorrer quando se utiliza métodos como a corrida em esteira ou a natação forçada.

II- Tratamento crônico com nicotina

Com a quantificação da nicotina e cotinina plasmáticas através do HPLC, podemos inferir que o tratamento crônico com nicotina mostrou-se eficiente no que diz respeito à quantidade de nicotina liberada pela pastilha implantada nos animais durante todo o período do experimento.

O tratamento para largar o uso do cigarro está focado na aliviação da síndrome de abstinência causada sempre que o sujeito tenta parar de fumar (Balfour *et al.*, 2000), sendo que a maneira mais eficaz de parar com o uso do cigarro envolve métodos alternativos de reposição de nicotina (Buisson e Bertrand, 2000).

A literatura cita que, animais que receberam doses de nicotina apresentam mudanças em vários parâmetros comportamentais, incluindo atividade motora e escovação do pêlo (grooming) (Imperato *et al.*, 1986; Clarke *et al.*, 1988; Di Chiara e Imperato, 1988; Nakamura *et al.*, 1993; Vezina *et al.*, 1994), e que a exposição crônica a nicotina causa um aumento de longa duração na arborização dendrítica e na densidade dos espinhos dendríticos no Nucleus Accumbens e no Córtex Pré-Frontal (Robinson e Kolb, 2004). Espanagel e Weiss (1999) citam que a exposição de longo prazo a drogas de abuso diminui a atividade basal de neurônios, mediada pela

dopamina, de maneira a equilibrar a estimulação crônica causada pela droga. Portanto, a exposição crônica à nicotina pode causar uma regulação para baixo dos neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral podendo também causar mudanças morfológicas em neurônios que recebem essas aferências dopaminérgicas, que poderia ser uma alternativa destas células em manter a maior estimulação causada pela administração crônica da droga.

III- Evolução dos parâmetros fisiológicos cardiovasculares e peso

Indivíduos, após a auto-administração de nicotina, apresentam um aumento na pressão arterial causada em grande parte pela ação da nicotina no sistema nervoso periférico, levando assim a uma vasoconstrição periférica (Henningfield *et al.*, 1985) e consequente aumento da pressão arterial.

As diferenças encontradas na pressão arterial média (Tabela 05) entre os grupos experimentais podem ser pouco significativas, já que a diferença encontrada entre os grupos nicotinizados (treinados e sedentários) na 4^o semana de treinamento não se manteve e a diferença encontrada no grupo placebo sedentário na 6^o semana de treinamento não difere dos valores da pressão arterial média dos

outros grupos, mostrando-nos que ela se manteve nos mesmos níveis para os quatro grupos, ou seja, que nem o tratamento crônico com nicotina e nem o treinamento físico espontâneo alteraram a pressão arterial média dos ratos.

Os resultados da frequência cardíaca (Tabela 03) nos indica que o exercício físico espontâneo na roda de correr leva a uma melhora nas funções cardiovasculares dos animais treinados diminuindo a frequência cardíaca tanto em animais nicotinizados quanto em animais placebo, indicando que este protocolo se mostrou eficiente no que diz respeito ao treinamento dos animais, e que a nicotina parece atrasar esta melhora, já que os animais nicotinizados treinados apresentaram diferença na frequência cardíaca só a partir da 4^o semana enquanto os placebos treinados apresentaram diferença a partir da 2^o semana de treinamento. Este dado confirma a hipótese de que fumantes demonstram uma pior performance no treinamento atlético (Escobedo *et al.*, 1999) e que esta diminuição da performance atlética pode não só estar relacionada ao ato de fumar, mas também ligada à ingestão de nicotina.

A verificação da variação do peso dos animais foi feita durante todas as semanas do experimento sempre no primeiro dia de treinamento e antes dos animais serem colocados nas gaiolas com as rodas de correr. O tratamento crônico com nicotina não causou

diferença significativa de peso entre os grupos (Tabela 04), o que pode nos levar à idéia de que a perda de peso pelos fumantes pode estar relacionada aos picos de nicotina que ocorrem todas as vezes que o indivíduo fuma e não com a administração crônica de nicotina (Swislocki *et al.*, 1997), sendo que alguns autores atribuem a redução de peso não à nicotina, mas sim a outras substâncias presentes nos cigarros (Assali *et al.*, 1999).

A atividade física *per se* também não alterou o peso dos animais comparando-os com os grupos sedentários. Esta ausência na diferença de peso entre os grupos treinados e sedentários pode ser explicada por uma possível alteração na relação entre músculo e gordura, sendo que a possível maior massa muscular dos animais treinados pode mascarar a perda de gordura corporal.

IV- Análise comportamental

As drogas aditivas e o treinamento físico induzem a sensação de bem estar e euforia. A abstinência de drogas é associada com sintomas psicológicos como ansiedade e depressão. Interessante também é que a privação do exercício em sujeitos que o fazem regularmente levam a distúrbios de humor caracterizados pela ansiedade, tensão e depressão (Mondin *et al.*, 1996). Portanto, é

possível que as mudanças bioquímicas causadas por ambos os comportamentos de corrida e de adição a drogas podem alterar o sistema mesolímbico dopaminérgico (Werme *et al.*, 2000).

IV.1- Labirinto em T elevado

O labirinto em T elevado é um teste que avalia, no mesmo rato, o medo condicionado (relacionado à ansiedade) e o medo inato (relacionado ao pânico) através da exposição do animal ao estímulo do braço aberto, já que ratos possuem um medo inato de altura e espaços abertos (Montgomery, 1955; Pellow *et al.*, 1985; Treit *et al.*, 1993).

Os dados do labirinto em T elevado nos mostram que o tratamento com nicotina não altera o padrão de esquia do grupo tratado com a droga, mostrando o mesmo padrão de esquia do grupo controle, ou seja, uma latência muito alta desde a 1^o exposição ao braço fechado.

Zangrossi e Graeff (1997) postularam que as latências de esquia no braço fechado do labirinto em T elevado tendem a aumentar gradualmente ao longo das repetidas sessões, indicando que o animal apresenta habituação da atividade exploratória e menor ansiedade. O treinamento físico espontâneo mostrou que os grupos submetidos a este aprenderam a se esquivar através da re-exposição

ao estímulo, mostrando um aumento gradual na latência das sessões. Porém, o grupo nicotinado treinado apresentou mais rapidamente o aprendizado de esquiva, mostrando alterações já na esquiva 1. O grupo nicotinado treinado também mostrou diferença na esquiva após 3 dias da primeira exposição ao teste, indicando boa memória de esquiva, além de diferir do grupo nicotinado sedentário na latência basal. O aumento da latência nas sessões dos animais treinados (placebo e nicotina) indicam que o exercício físico pode estar relacionado com o aprendizado de lidar com o medo condicionado, mostrando animais menos ansiosos ao serem expostos a um ambiente novo e de possível perigo e que a associação da nicotina com o treinamento físico pode potencializar esse efeito ansiolítico causado pelo treinamento físico espontâneo.

A exposição ao braço aberto do labirinto em T elevado é considerada uma situação de pânico, já que drogas ansiolíticas não alteram a latência de fuga destes animais (Viana, *et al.*, 1994; Graeff *et al.*, 1998). Quando o rato é exposto ao estímulo de pânico, ele pode ter o comportamento de fuga desabalada ou congelamento (freezing). Quanto maior o estado de pânico dos ratos, maior o comportamento de congelamento. Na fuga, somente o grupo placebo sedentário não mostrou uma boa performance na latência para deixar o braço aberto, além de demonstrar maiores sinais aversivos como os

comportamentos de congelamento, micção, defecação, pilo-ereção e corpo arqueado, e portanto, maior medo ao ser exposto a uma situação de perigo inato. Foi observado também que ambos, o tratamento com nicotina e o treinamento físico, alteram o padrão de fuga dos animais submetidos a eles, indicando valores inferiores à metade do tempo gasto pelo grupo controle, sendo que a nicotina associada ao treinamento físico parece não influenciar no comportamento de fuga. No entanto, a administração crônica de nicotina parece melhorar a memória quando os animais são re-expostos ao estímulo de medo inato três dias após a primeira exposição ao procedimento, já que ambos os grupos nicotina (treinado e sedentário) apresentaram uma diminuição no tempo de latência.

Estes dados sugerem que a administração crônica de nicotina e o treinamento físico espontâneo podem melhorar as respostas dos animais submetidos à situações de medo inato e que o exercício físico espontâneo associado ou não a nicotina causam uma melhora das respostas em situações de ansiedade. Além disso, a nicotina parece promover um maior acesso a memória em resposta a situações de pânico e, junto com o treinamento físico, promover um maior acesso a memória em resposta a situações de ansiedade e de pânico.

IV.II- Atividade motora

Utilizando o sistema sensor de atividade motora por emissão de feixes de luz infra-vermelha podemos verificar o comportamento motor dos ratos submetidos aos protocolos experimentais e avaliar se os mesmos permaneceram sem se movimentar (tempo e número sem movimento) ou se os ratos apresentaram padrões diferentes de locomoção (tempo e número de grandes movimentos). Avaliando os quatro parâmetros no tempo total de 30 minutos do protocolo, não foi observada diferença entre os 4 grupos experimentais. Dividindo o tempo ou o número total em 3 blocos de 10 minutos cada, observamos que ambos os grupos apresentaram habituação quando comparados o 1º e o 3º bloco de 10 minutos do tempo sem movimentos, mostrando um aumento desse tempo, ou seja, um maior tempo sem explorar o novo ambiente no decorrer do tempo do teste (Tabela 07).

Com relação ao tempo de grandes movimentos, os dados nos mostram que, ambos os grupos apresentaram habituação, diminuindo o tempo gasto em explorar o ambiente, comparando o 2º e 3º blocos de 10 minutos com o 1º bloco de 10 minutos, sendo que os grupos nicotina sedentário e placebo treinado apresentaram também uma diminuição do 3º bloco quando comparado com o 2º bloco de 10 minutos, indicando uma habituação maior ao ambiente.

Com relação ao número de grandes movimentos, o grupo placebo sedentário apresentou uma diminuição comparando-se o 1º com o 2º bloco de 10 minutos, mantendo esse número de grandes movimentos no 3º bloco. Já o grupo placebo treinado mostra uma diminuição entre o 1º e o 3º bloco de tempo, sugerindo uma maior habituação decorrente do treinamento físico, porém mais demorada. No grupo nicotina sedentário, a nicotina causou uma boa habituação já que o 3º bloco de 10 minutos difere do 1º e do 2º blocos de tempo, mostrando uma habituação gradual. Já no grupo nicotina treinado, foi observado que os 2 últimos blocos diferem do 1º, mostrando uma habituação mais rápida. Foi verificado também que os grupos nicotina sedentário e placebo treinado diferem do grupo placebo sedentário no último bloco de 10 minutos, sugerindo um menor número de locomoção causada pelo treinamento físico e também pelo treinamento crônico com nicotina.

Estes resultados mostram que os quatro grupos experimentais apresentaram o mesmo padrão de tempo sem se locomover, mas apresentaram diferença no comportamento de locomoção, indicando que o tratamento crônico com a droga e o treinamento físico espontâneo parecem alterar a locomoção exploratória dos ratos.

V- Análise da expressão gênica

V.1- *Tirosina hidroxilase*

É sabido que a exposição aguda à nicotina causa um aumento na liberação de dopamina no Nucleus Accumbens bem como outras áreas do encéfalo de ratos (Imperato *et al.*, 1986; Di Chiara e Imperato, 1988; Mereu *et al.*, 1987; Fagen *et al.*, 2003), o que sugere uma maior expressão de genes na Área Tegmental Ventral para que essa demanda extra de dopamina seja produzida.

Inversamente, a exposição crônica a vários tipos de drogas, inclusive nicotina, causa uma deterioração do sistema dopaminérgico, o que é visto como uma resposta homeostásica à frequente ativação do sistema pela droga, ou seja, levando a tolerância. Após o uso crônico da droga, os níveis basais de dopamina são reduzidos, sendo que a estimulação posterior pela mesma quantidade de droga vai ser menos efetiva em ativar a transmissão dopaminérgica (Nestler, 2005).

É sabido também que o treinamento em rodas de corrida espontânea induz mudanças na expressão gênica e ligação de receptores NMDA na Área Tegmental Ventral e no Córtex Pré-Frontal (Schwendt *et al.*, 2002), modulando o sistema dopaminérgico de reforço. O exercício físico também altera a concentração de catecolaminas circulante através da alteração da biossíntese da cadeia

catecolaminérgica que se inicia com o aminoácido tirosina, que é convertida em L-DOPA pela tirosina hidroxilase que, através da dopa descarboxilase, é convertida em dopamina. A dopamina pode ser convertida em noradrenalina pela dopamina β -descarboxilase e por fim, converter a noradrenalina em adrenalina através da enzima fentolamina N-metiltransferase.

A administração crônica de nicotina durante 8 semanas ininterruptamente mostrou não causar alterações na quantidade de RNA_m para a enzima tirosina hidroxilase na Área Tegmental Ventral, enzima esta indispensável para a formação da dopamina. Também foi observado que a atividade física espontânea por sete semanas não alterou a quantidade de RNA_m desta enzima nesta mesma área.

Esta falta de alteração da expressão do RNA_m da tirosina hidroxilase nos leva a interpretar que ambos, o tratamento e o treinamento não surtiram efeito na expressão do RNA_m da tirosina hidroxilase na Área Tegmental Ventral após 8 semanas de exposição à droga. Este dado deve-se talvez por causa de que a exposição crônica à nicotina causa desensibilização dos neurônios dopaminérgicos (Benwell *et al.*, 1995) ou reduz a ação estimulatória da nicotina em terminais dopaminérgicos no Núcleo Accumbens (Nisell *et al.*, 1994) através da regulação para baixo do subtipo $\alpha 4\beta 2$ dos receptores nicotínicos de acetilcolina (Buisson e Bertrand, 2001) ou até mesmo

pela inativação destes receptores (Pidoplicko *et al.*, 1997), além de diminuir a atividade neuronal dos mesmos (Buisson e Bertrand, 2002). Porém, isto não quer dizer que não possa ter havido uma maior liberação de dopamina pelos terminais sinápticos dos neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral, já que pode ocorrer alterações no RNA_m de neurotransmissores porém sem causar alterações de proteína e vice-versa (Ferrari, 2006). Portanto, pode ter havido uma alteração na liberação de dopamina no Nucleus Accumbens, pelo menos logo após o implante das pastilhas porém, após algum tempo, esta liberação pode ter diminuída por alterações fisiológicas intrínsecas do próprio sistema.

V.II- Glutaminase

O Córtex Pré-Frontal e outras regiões frontais do córtex controlam funções executivas como memória, atenção e inibição comportamental e são importantes no controle da resposta do indivíduo aos estímulos do meio ambiente através de projeções glutamatérgicas para o Nucleus Accumbens e Área Tegmental Ventral (Nestler, 2005). A exposição crônica a drogas causa mudanças complexas nestas áreas corticais alterando a liberação de glutamato, caracterizando estados de vício (Volkow *et al.*, 2004; Everitt e Wolf, 2002; Hyman e Malenka, 2001; Kalivas *et al.*, 2005). Pierce e

colaboradores (1998) mostraram que lesões bilaterais no Córtex Pré-Frontal preveniram a sensibilização comportamental à cocaína. As projeções glutamatérgicas induzem rajadas de disparos dos neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral (Murase *et al.*, 1993), enquanto uma diminuição nos níveis de glutamato induz padrões de disparos regulares (Mansvelder, 2005).

A análise da expressão do RNA_m da glutaminase no Córtex Pré-Frontal não mostrou nenhuma diferença entre os 4 grupos experimentais. Talvez a falta de alterações no RNA_m da glutaminase no Córtex Pré-Frontal possa ser explicada em parte pela falta de alterações no RNA_m da tirosina hidroxilase nos neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral, já que estes neurônios dopaminérgicos se projetam para o Córtex Pré-Frontal e este envia projeções glutamatérgicas para a Área Tegmental Ventral, modulando a ação destes neurônios dopaminérgicos. Este resultado também pode estar relacionado com o fato de que a exposição crônica à droga causa alterações fisiológicas como desensibilização dos neurônios dopaminérgicos (Benwell *et al.*, 1995) ou até mesmo inativação de receptores (Pidoplicko *et al.*, 1997), levando o organismo a se modificar para manter a sua homeostase.

Já na região hipocampal, a expressão do RNA_m da glutaminase mostrou-se alterada, sendo que há uma maior expressão deste RNA_m

no grupo nicotina treinado comparando-o com o grupo nicotina sedentário no Giro Denteado, podendo indicar que o treinamento físico espontâneo aumenta a expressão da glutaminase quando o rato é tratado cronicamente com nicotina. Na região CA3 do Hipocampo, há alterações na expressão do RNA_m da glutaminase, mostrando uma maior expressão no grupo placebo treinado quando comparado com o grupo placebo sedentário. Os grupos nicotinizados apresentam uma menor expressão do RNA_m da glutaminase, quando comparados os grupos treinados e os grupos sedentários entre si, indicando que o tratamento crônico com nicotina parece prejudicar a expressão do RNA_m da glutaminase na região CA3 do Hipocampo e que, mesmo sabendo que o treinamento físico espontâneo aumentou a expressão deste RNA_m, este mesmo treinamento não foi suficiente para modular a baixa expressão em ratos tratados cronicamente com nicotina.

Estas alterações do RNA_m da glutaminase em regiões do Hipocampo pode estar relacionada com uma melhor capacidade de aprendizado e aumento da neurogênese, melhorando a saúde neuronal (Cotman e Berchtold, 2002).

V.III- Fator neurotrófico derivado do cérebro

Desde que se sabe que a expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro no Hipocampo é regulada por vários neurotransmissores (Knipper *et al.*, 1994; Berninger *et al.*, 1995) que são sensíveis a nicotina, é possível que este seja um alvo chave para as ações da nicotina no comportamento (Kenny *et al.*, 2000). O tratamento crônico com nicotina reverte o prejuízo da potenciação de longo prazo em ratos, estabelecida pelo estresse, e que este tratamento crônico com nicotina previne estes efeitos inibitórios de um possível estresse futuro na potenciação de longo prazo (Aleisa *et al.*, 2006).

Nossos resultados mostram que na região Hipocampal CA1, o grupo nicotina sedentário possui um aumento na expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro em relação ao grupo placebo sedentário. Aleisa e colaboradores (2006) mostraram que os níveis basais do fator neurotrófico derivado do cérebro na área CA1 do hipocampo aumenta após tratamento crônico com nicotina. O tratamento crônico com nicotina também induz uma regulação para cima das sub-unidades $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ dos receptores nicotínicos de acetilcolina no Hipocampo (Mugnaini *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2004). Sabendo que a área CA1 do Hipocampo é crucial para a memória de curto e longo prazo (Izquierdo *et al.*, 2002), nossos dados podem,

portanto, indicar um aumento da plasticidade neuronal nesta região, que confirma os dados de Fuji e colaboradores (1999) que reportaram que a nicotina facilita a indução de potenciação de longo prazo na região CA1 do Hipocampo, levando a uma possível melhora na memória em situações de pânico.

É sabido que o exercício crônico mimetiza alguns efeitos observados no sistema nervoso central após a administração de drogas antidepressivas. Estes efeitos incluem elevação de monoaminas (Dunn *et al.*, 1996) e aumento na expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro (Neeper *et al.*, 1995, 1996). Além disso, o exercício induz o crescimento e desenvolvimento de novas células (Van Praag *et al.*, 1999), e protege contra danos neuronais no hipocampo (Stummer *et al.*, 1994).

A análise da expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro nos mostrou que o treinamento físico espontâneo por 7 semanas aumentou a expressão deste RNA_m tanto no Giro denteado como nas áreas CA1 e CA3 do Hipocampo. Nossos resultados estão de acordo com a literatura e podem indicar que o treinamento físico espontâneo pode estar, através do aumento da expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro, reforçando estruturas neuronais e facilitando a transmissão sináptica, levando também a uma diminuição da ansiedade destes animais e promovendo a

sobrevivência de novos neurônios (Arsenijevic e Weiss, 1998). Porém, o treinamento físico espontâneo associado ao tratamento crônico com nicotina não altera a expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro, que é um resultado inesperado, já que ambos os tratamentos promovem aumento deste RNA_m e, quando juntos, não mostraram alteração.

Conclusões

Com base nos dados obtidos após o tratamento crônico com nicotina e treinamento físico espontâneo dos ratos por 7 semanas, podemos concluir que:

- ❖ Os ratos treinados apresentaram bradicardia de repouso após 6 semanas, indicando que o treinamento físico em rodas de corrida espontânea foi eficiente;
- ❖ O treinamento físico espontâneo tem um efeito ansiolítico sobre os ratos e também reduz o medo, o estresse e altera a locomoção e memória destes;
- ❖ O tratamento crônico com nicotina reduz o medo e altera a locomoção e memória dos ratos e, associado ao treinamento físico reduz a ansiedade, o estresse e altera a memória destes;
- ❖ Não houve alteração da expressão gênica da tirosina hidroxilase na Área Tegmental Ventral e da glutaminase no Córtex Pré-Frontal dos grupos experimentais;
- ❖ As alterações da expressão gênica da glutaminase e do fator neurotrófico derivado do cérebro em áreas do Hipocampo sugerem uma modulação da memória e aprendizado dos grupos experimentais;

Referências Bibliográficas

ALEISA, A. M.; ALZOUBI, K. H.; ALKADHI, K. Chronic but not acute nicotine treatment reverses stress-induced impairment of LTP in anesthetized rats. **Brain Res.** 2006. Jun 30;1097(1):78-84. Epub 2006 May 24.

ALEISA, A. M.; ALZOUBI, K. H.; GERGES, N. Z.; ALKADHI, K. Chronic psychosocial stress-induced impairment of hippocampal LTP: possible role of BDNF. **Neurobiol. Dis.** 2006. Jun;22(3):453-62. Epub 2006 Mar 10.

ARSENIJEVIC, Y.; WEISS, S. Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. **J. Neurosci.** 1998. Mar 15;18(6):2118-28. Review.

ASSALI, A. R.; BEIGEL, Y.; SCHREIBMAN, R.; SHAFER, Z.; FAINARU, M. Weight gain and insulin resistance during nicotine replacement therapy. **Clin. Cardiol.** 1999. May;22(5):357-60.

BALFOUR, D. J. The influence of stress on psychopharmacological responses to nicotine. **Br. J. Addict.** 1991. May;86(5):489-93. Review.

BALFOUR, D. J.; WRIGHT, A. E.; BENWELL, M. E.; BIRRELL, C. E. The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence. **Behav. Brain. Res.** 2000. Aug;113(1-2):73-83. Review.

BARCHAS, J. D.; FRIEDMAN, D. X. Brain Amines: Response to physiological stress. **Biochem. Pharmacol.** 1963. 12:1232-123.

BENFENATI, F.; CIMINO, M.; AGNATI, L. F.; FUXE, K. Quantitative autoradiography of central neurotransmitter receptors: metodological and statistical aspects with special reference to computer-assisted image analysis. **Acta. Physiol. Scand.** 1986. v. 128(2), p. 129-146.

BENWELL, M. E.; BALFOUR, D. J.; KHADRA, L. F. Studies on the influence of nicotine infusions on mesolimbic dopamine and locomotor responses to nicotine. **Clin. Invest.** 1994. 72, 233-239.

BENWELL, M. E.; BALFOUR, D. J.; BIRRELL, C. E. Desensitization of the nicotine-induced mesolimbic dopamine responses during constant infusion with nicotine. **Br. J. Pharmacol.** 1995. Jan;114(2):454-60.

BERGAMASCHI, A.; MORRI, M.; RESI, D.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. Tobacco consumption and sports participation: a survey among university students in northern Italy. **Ann. Ig.** 2002. Sep-Oct;14(5):435-42.

BERHOW, M. T.; RUSSELL, D. S.; TERWILLIGER, R. Z.; BEITNER-JOHNSON, D.; SELF, D. W.; LIDSAY, R. M.; NESTLER, E. J. Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. **Neuroscience.** 1995. Oct;68(4):969-79.

BERNINGER, B.; MARTY, S.; ZAFRA, F.; da PENHA BERZAGHI, M.; THOENEN, H.; LINDHOLM, D. GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. **Development.** 1995. Aug;121(8):2327-35.

BINDER, E., et al. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behavior and impulsiveness in mice. **Behavior Brain Res.** 2004. v. Dez 6-155(2), p.197-206.

BONCI, A.; BERNARDI, G.; GRILLNER, P.; MERCURI, N.B. The dopamine-containing neuron: maestro or simple musician in the orchestra of addiction? **Trends. Pharmacol. Sci.** 2003. Apr;24(4):172-7. Review.

BUI, L. M.; KEEN, C. L.; DUBICK, M. A. Influence of 12-week nicotine treatment and dietary copper on blood pressure and indices of the antioxidant system in male spontaneous hypertensive rats. **Biol. Trace. Elem. Res.** 1994. Oct-Nov;46(1-2):67-78.

BUISSON, B.; BERTRAND, D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4(beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. **J. Neurosci.** 2001. Mar 15;21(6):1819-29.

BUISSON, B.; BERTRAND, D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. **Trends Pharmacol. Sci.** 2002. Mar;23(3):130-6. Review.

BUR, A.; JOUKHADAR, C.; KLEIN, N.; HERKNER; MITULOVIC, G.; SCHMID, R.; AGNETER, E.; MULLER, M.; BRUNNER, M. Effect of exercise on transdermal nicotine release in healthy habitual smokers. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.** 2005. May;43(5):239-43.

BYRNE, A.; BYRNE, D. G. The effect of exercise on depression, anxiety and other mood states: a review. **J. Psychosom. Res.** 1993. Sep;37(6):565-74. Review.

CABEZA, R.; NYBERG, L. Imaging cognition II: An empirical review of 275 PET and fMRI studies. **J. Cogn. Neurosci.** 2000. Jan;12(1):1-47. Review.

CARR, D. B.; SESACK, S. R. Projections from the rat pre-frontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. **J. Neurosci.** 2000. 20(10):3864-3873.

CHADI, G.; CAO, Y.; PETTERSON, R. F.; FUXE, K. Temporal and spatial increase of astroglial basic fibroblast growth factor synthesis after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. **Neuroscience.** 1994. 61, 891-910.

CHADI, G.; MÖLLER, A.; ROSÉN, L.; JANSON, A. M.; AGNATI, L. A.; GOLDSTEIN, M. O. Ö. S.; PETTERSON, R. F.; FUXE, K. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. **Exp. Brain Res.** 1993. 97, 145-158.

CHAOULOFF, F. Physical exercise and brain monoamines: a review. **Acta. Physiol. Scand.** 1989. Sep;137(1):1-13. Review.

CLARKE, P. B.; FU, D. S.; JAKUBOVIC, A.; FIBIGER, H. C. Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1988. Aug;246(2):701-8.

CLARKE, P. B. Mesolimbic dopamine activation—The key to nicotine reinforcement? **Ciba Foundation Symposium.** 1990. 152:153-162.

CORRIGALL, W. A.; COEN, K. M. Selective dopamine antagonists reduce nicotine self-administration. **Psychopharmacology (Berl).** 1991. ;104(2):171-6.

CORRIGALL, W. A.; FRANKLIN, K. B.; COEN, K. M.; CLARKE, P. B. The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. **Psychopharmacology (Berl)**. 1992. ;107(2-3):285-9.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends. Neurosci**. 2002. Jun;25(6):295-301. Review.

COTMAN, C.W.; ENGESSER-CESAR, C. Exercise enhances and protects brain functions. **Exerc. Sport Sci. Rev**. 2002. v. 30(2), p. 75-79.

COULL, J. T. Neural correlates of attention and arousal: insights from electrophysiology, functional neuroimaging and psychopharmacology. **Prog. Neurobiol**. 1998. Jul;55(4):343-61. Review.

DAMSMA, G.; PFAUS, J. G.; WENKSTERN, D.; PHILLIPS, A. G.; FIBIGER, H. C. Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. **Behav. Neurosci**. 1992. Feb;106(1):181-91.

DANI, J. A.; DE BIASI, M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. **Pharmacol. Biochem. Behav**. 2001. Dec;70(4):439-46. Review.

DANI, J.A.; HEINEMANN, S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. **Neuron**. 1996. May;16(5):905-8. Review.

DERUITER, W.; FAULKNER, G. Tobacco harm reduction strategies: the case for physical activity. **Nicotine Tob. Res.** 2006. Apr;8(2):157-68. Review.

DEVRIES, H. A. Tension reduction with exercise. **Exerc. Ment. Health**. 1987. 99-104.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increased synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1988. USA 85, 5274.

DISHMAN, R. K. Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: animal models. **Med. Sci. Sports Exerc.** 1997. Jan;29(1):63-74. Review.

DUNN, A. L.; REIGLE, T. G.; YOUNGSTEDT, S. D.; ARMSTRONG, R. B.; DISHMAN, R. K. Brain norepinephrine and metabolites after treadmill training and wheel running in rats. **Med. Sci. Sports Exerc.** 1996. Feb;28(2):204-9.

EIKELBOOM, R. Human parallel to voluntary wheel running: exercise. **Anim Behav.** 1999. Mar;57(3):F11-F12.

ERDTMANN-VOURLIOTIS, M.; MAYER, P.; RIECHERT, U.; HANDEL, M.; KRIEBITZSCH, J.; HOLLT, V. Rational design of oligonucleotide probes to avoid optimization steps in in situ hybridization. **Brain Res. Prot.** 1999. v. 4:, p. 82-91.

ERNST, M.; HEISHMAN, S. J.; SPURGEON, L.; LONDON, E. D. Smoking history and nicotine effects on cognitive performance. **Neuropsychopharmacology.** 2001. Sep;25(3):313-9.

ESCOBEDO, L. G.; MARCUS, S. E.; HOLTZMAN, D.; GIOVINO, G. A. Sports participation, age at smoking initiation, and the risk of smoking among US high school students. **JAMA.** 1999. Mar 17;269(11):1391-5.

EVERITT, B. J.; DICKINSON, A.; ROBBINS, T. W. The neuropsychological basis of addictive behaviour. **Brain. Res. Brain. Res. Rev.** 2001. Oct;36(2-3):129-38. Review.

EVERITT, B. J.; WOLF, M. E. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. **J. Neurosci.** 2002. May 1;22(9):3312-20. Review.

FAGEN, Z. M.; MANSVELDER, H. D.; KEATH, J. R.; McGEHEE, D. S. Short- and long-term modulation of synaptic inputs to brain reward areas by nicotine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2003. Nov;1003:185-95. Review.

FERRARI, M. F. R. Efeito modulatório da nicotina sobre a neurotransmissão em núcleos encefálicos responsáveis pelo controle cardiovascular em ratos geneticamente hipertensos e normotensos. Tese de doutorado.

FERREIRA, S. E.; TUFIK, S.; MELLO, M. T. Neuroadaptação: uma proposta alternativa de atividade física para usuários de drogas em recuperação. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.** 2001. 9 (1):31-39.

FILLENZ, M. Noradrenergic Neurons. **Cambridge University Press.** 1990. p. 1-238.

FRIEDLAND, R. P.; FRITSCH, T.; SMYTH, K. A.; KOSS, E.; LERNER, A. J.; CHEN, C. H.; PETOT, G. J.; DEBANNE, S. M. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2001. Mar 13; 98(6):3440-5.

FUJII, S.; JI, Z.; MORITA, N.; SUMIKAWA, K. Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. **Brain Res.** 1999. Oct 30;846(1):137-43.

GOSHIMA, Y.; MYIAMA, T.; NAKAMURA, S.; MIKI, K.; KOSAKA, K.; MISU, Y. Ventral tegmental injections of nicotine induces locomotor activity and L-DOPA release from nucleus accumbens. **European J. Pharm.** 1996. 309, 229-233.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, H. Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev.** 1998. v.23(2), p.237-246, Review.

GRIMA, B.; LAMOUREUX, A.; BLANOT, F.; BIGUET, N. F.; MALLET, J. Complete coding sequence of rat tyrosine hydroxylase mRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1985. 82, 617-621.

GROVE, J. R.; WILKINSON, A.; DAWSON, B. T. Effects of exercise on selected correlates of smoking withdrawal. **Int. J. Sport Psych.** 1993. 24, 217-236.

HARIHARAN, M; VAN NOORD, T; GREDEN, J. F. A high-performance liquid-chromatographic method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma. **Clin Chem.** 1988. Apr;34(4):724-9.

HENNINGFIELD, J. E.; MIYASATO, K.; JASINSKI, D. R. Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1985. Jul;234(1):1-12.

HERNANDEZ, L.; HOEBEL, B. G. Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. **Physiol. Behav.** 1988. 44(4-5):599-606.

HUGHES, J. R.; HIGGINS, S. T.; BICKEL, W. K. Nicotine withdrawal versus other drug withdrawal syndromes: similarities and dissimilarities. **Addiction.** 1994. Nov;89(11):1461-70. Review.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nat. Rev. Neurosci.** 2001. Oct;2(10):695-703. Review.

IKEMOTO, S.; KOHL, R. R.; McBRIDE, W. J. GABA(A) receptor blockade in the anterior ventral tegmental area increases extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens of rats. **J. Neurochem.** 1997. Jul;69(1):137-43.

IMPERATO, A.; MULAS, A.; DI CHIARA, G. Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. **Eur. J. Pharmacol.** 1986. 132, 337-338.

IZENWASSER, S.; COX, B. M. Inhibition of dopamine uptake by cocaine and nicotine: tolerance to chronic treatments. **Brain Res.** 1992. 573:119-125.

IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; VIANNA, M. R.; COITINHO, A.; deDAVID e SILVA, T.; CHOI, H.; MOLETTA, B.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cell. Mol. Neurobiol.** 2002. Jun;22(3):269-87. Review.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P.; BARROW, J. Regulation of the mesocorticolimbic dopamine system by glutamic acid receptor subtypes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1989. Oct;251(1):378-87.

KALIVAS, P. W.; CHURCHILL, L.; KLITENICK, M. A. GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. **Neuroscience.** 1993. Dec;57(4):1047-60, 1993.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N.; SEAMANS, J. Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. **Neuron.** 2005. Mar 3;45(5):647-50. Review.

KAWACHI, I.; TROISI, R. J.; ROTNITZKY, A. G.; COAKLEY, E. H.; COLDITZ, G. A. Can physical activity minimize weight gain in women after smoking cessation? **Am. J. Public. Health.** 1996. Jul;86(7):999-1004.

KENNY, P. J.; FILE, S. E.; RATTRAY, M. Acute nicotine decreases, and chronic nicotine increases the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 2000. Dec 28;85(1-2):234-8.

KING, A. C.; TAYLOR, C. B.; HASKELL, W. L. Effects of differing intensities and formats of 12 months of exercise training on psychological outcomes in older adults. **Health Psychol.** 1993. Jul;12(4):292-300.

KNIPPER, M.; da PENHA BERZAGHI, M.; BLOCHL, A.; BREER, H.; THOENEN, H.; LINDHOLM, D. Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. **Eur. J Neurosci.** 1994. Apr 1;6(4):668-71.

KOOB, G. F.; CAINE, S. B.; PARSONS, L.; MARKOU, A.; WEISS, F. Opponent process model and psychostimulant addiction. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1997. Jul;57(3):513-21. Review.

LANCA, A. J.; ADAMSON, K. L.; COEN, K. M.; CHOW, B. L.; CORRIGALL, W. A. The pedunculo pontine tegmental nucleus and the role of cholinergic neurons in nicotine self-administration in the rat: a correlative neuroanatomical and behavioral study. **Neuroscience.** 2000. 96:735-742.

LAWRENCE, N. S.; ROSS, T. J.; STEIN, E. A. Cognitive mechanisms of nicotine on visual attention. **Neuron**. 2002. Oct 24;36(3):539-48.

LEIKOLA-PELHO, T.; JACKSON, D. M. Preferential stimulation of locomotor activity by ventral tegmental microinjections of (-)-nicotine. **Pharmacol. Toxicol.** 1992. 70, 50-52.

LEVIN, E. D. Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. **J. Neurobiol.** 2002. Dec;53(4):633-40. Review.

LOUIS, M.; CLARKE, P. B. Effect of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on the locomotor stimulant action of nicotine in rats. **Neuropharmacology**. 1998. Dec;37(12):1503-13.

MANSVELDER, H. D.; McGEHEE, D. S. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. **Neuron**. 2000. Aug;27(2):349-57.

MANSVELDER, H. D.; McGEHEE, D. S. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. **J. Neurobiol.** 2002. Dec;53(4):606-17. Review.

MANSVELDER, H. D.; KEATH, J. R.; McGEHEE, D. S. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. **Neuron**. 2002 Mar 14;33(6):905-19.

MANSVELDER, H. D. Yin and yang of VTA opioid signaling. Focus on "both kappa and mu opioid agonists inhibit glutamatergic input to ventral tegmental area neurons". **J. Neurophysiol.** 2005. Jun;93(6):3046-7.

MANSVELDER, H. D.; VAN AERDE, K. I.; COUEY, J. J.; BRUSSAARD, A. B. Nicotinic modulation of neuronal networks: from receptors to cognition. **Psychopharmacology (Berl)**. 2006. Mar;184(3-4):292-305.

MATSUKI, H; SHIRAYAMA, Y; HASHIMOTO, K; TANAKA, A; MINABE, Y. Effects of age and gender on the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat retrosplenial cortex following administration of dizocilpine. **Neuropsychopharmacology**. 2001. Aug;25(2):258-66.

McALLISTER, A. K.; KATS, L. C.; LO, D. C. Neurotrophins and synaptic plasticity. **Annu. Rev. Neurosci.** 1999. 22:295-318. Review.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Fisiologia do exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano. 4º. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

McBRIDE, J. S.; ALTMAN, D. G.; KLEIN, M.; WHITE, W. Green tobacco sickness. **Tob Control**. 1998. Autumn;7(3):294-8. Review.

McGEHEE, D. S.; ROLE, L. W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. **Annu. Rev. Physiol**. 1995. 57:521-46.

MEEUSEN, R.; DE MEIRLEIR, K. Exercise and brain neurotransmission. **Sports Med**. 1995. Sep;20(3):160-88. Review.

MEREU, G.; YOON, K. W.; BOI, V.; GESSA, G. L.; NAES, L.; WESTFALL, T. C. Preferential stimulation of ventral tegmental area dopaminergic neurons by nicotine. **Eur. J. Pharmacol**. 1987. Sep 23;141(3):395-9.

MOLTENI, R.; ZHENG, J.Q.; YING, Z.; GÓMEZ-PINILLA, F.; TWISS, J. L. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 2004. U S A., Jun 1;101(22):8473-8.

MONDIN, G. W.; MORGAN, W. P.; PIERING, P. N.; STEGNER, A. J.; STOTESBERY, C. L.; TRINE, M. R.; WU, M. Y. Psychological consequences of exercise deprivation in habitual exercisers. **Med. Sci. Sports. Exerc.** 1996. Sep;28(9):1199-203.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.** 1955. Aug;48(4):254-60.

MOORE, K. E.; LARIVIERE, E. W. Effects of stress and *d*-amphetamine on rat brain catecholamines. **Biochem. Pharmacol.** 1964. Jul;13:1098-100.

MORAES, R. X. Análise da expressão gênica da tirosina hidroxilase e vasopressina em áreas do sistema nervoso central envolvidas com o controle cardiovascular em ratos espontaneamente hipertensos submetidos a treinamento físico espontâneo. Dissertação de mestrado. apresentada no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2005.

MUGNAINI, M.; TESSARI, M.; TARTER, G.; MERLO PICH, E.; CHIAMULERA, C.; BUNNEMANN, B. Upregulation of [3H]methyllycaconitine binding sites following continuous infusion of nicotine, without changes of alpha7 or alpha6 subunit mRNA: an autoradiography and in situ hybridization study in rat brain. **Eur. J. Neurosci.** 2002. Nov;16(9):1633-46.

MURASE, S.; GRENHOF, J.; CHOUVET, G.; GONON, F. G.; SVENSSON, T. H. Prefrontal cortex regulates burst firing and transmitter release in rat mesolimbic dopamine neurons studied in vivo. **Neurosci. Lett.** 1993. Jul 9;157(1):53-6.

MUSEO, E.; WISE, R. A. Cystidine-induced behavioral activation: delineation of neuroanatomical locus of action. **Brain Res.** 1995. 670, 257-263.

NAJLERAHIM, A.; HARRISON, P. J.; BARTON, A. J.; HEFFERNAN, J.; PEARSON, R. C. Distribution of messenger RNAs encoding the enzymes glutaminase, aspartate aminotransferase and glutamic acid decarboxylase in rat brain. **Brain. Res. Mol. Brain. Res.** 1990, 7, 317-33.

NAKAJIMA, M; YAMAMOTO, T; KUROIWA, Y; YOKOI, T. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**. 2000. May 26;742(1):211-5.

NAKAMURA, S.; GOSHIMA, Y.; YUE, J. L.; MIYAMAE, T.; MISU, Y. Endogenously released DOPA is probably relevant to nicotine-induced increases in locomotor activities of rats. **Jpn. J. Pharmacol**. 1993. May;62(1):107-10.

NEEPER, S. A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. W. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**. 1995. Jan 12;373(6510):109, 1995.

NEEPER, S. A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. W. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res**. 1996. Jul 8;726(1-2):49-56.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat. Neurosci**. 2005. Nov;8(11):1445-9. Review.

NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**. 1997. Oct 3;278(5335):58-63. Review.

NEWHOUSE, P. A.; POTTER, A.; SINGH, A. Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance. **Curr. Opin. Pharmacol**. 2004. Feb;4(1):36-46. Review.

NISELL, M.; NOMIKOS, G. G.; SVENSSON, T. H. Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area. **Synapse**. 1994. Jan;16(1):36-44.

O'NEILL, M. F.; Evidence for an involvement of D1 and D2 dopamine receptors in mediating nicotine-induced hyperactivity in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. 1991. ;104(3):343-50.

O'CONNOR, P. J.; YOUNGSTEDT, S. D. Influence of exercise on human sleep. **Exerc. Sport. Sci. Rev**. 1995. ;23:105-34. Review.

PANAGIS, G.; NISELL, M.; NOMIKOS, G. G.; CHERGUI, K.; SVENSSON, T. H. Nicotine injections into the ventral tegmental area increase locomotion and Fos-like immunoreactivity in the nucleus accumbens of the rat. **Brain Res.** 1996. 730, 133-142.

PARKER, S. L.; FU, Y.; McALLEN, K.; LUO, J.; McINTOSH, J. M.; LINDSTROM, J. M.; SHARP, B. M. Up-regulation of brain nicotinic acetylcholine receptors in the rat during long-term self-administration of nicotine: disproportionate increase of the alpha6 subunit. **Mol. Pharmacol.** 2004. Mar;65(3):611-22.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press.** 1996. Sidney.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods.** 1985. Aug;14(3):149-67.

PICCIOTTO, M. R.; ZOLI, M.; RIMONDINE, R.; LENA, C.; MARUBIO, L. M.; PICH, E. M.; FUXE, K.; CHANGEUX, J. P. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. **Nature.** 1988. 391:173-177.

PIERCE, R. C.; REEDER D. C.; HICKS, J.; MORGAN, Z. R.; KALIVAS, P. W. Ibotenic acid lesions of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine. **Neuroscience**. 1998. Feb;82(4):1103-14.

PIDOPLICHKO, V. I.; DE BIASI, M.; WILLIAMS, J. T.; DANI, J. A. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. **Nature**. 1997. Nov 27;390(6658):401-4.

PONTIERI, F. E.; TANDA, G.; ORZI, F.; DI CHIARA, G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. **Nature**. 1996. 382:255-257.

RAISMAN-VOZARI, R.; HIRSCH, E.; JAVOY-AGID, E.; VASSORT, C.; SAVASTA, M.; FEUERSTEIN, C.; THIBAUT, J.; AGID, Y. Quantitative autoradiography of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the rat brain. **J. Neurochem**. 1991. Oct;57(4):1212-22.

RANALDI, R; WISE, R. A. Blockade of D1 dopamine receptors in the ventral tegmental area decreases cocaine reward: possible role for dendritically released dopamine. **J. Neurosci**. 2001. Aug 1;21(15):5841-6.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**. 2004. ;47 Suppl 1:33-46. Review.

ROWELL, P. P. Nanomolar concentrations of nicotine increase the release of [3H]dopamine from rat striatal synaptosomes. **Neurosci. Lett**. 1995. 189:171-175.

RUECKERT, L.; GRAFMAN, J. Sustained attention deficits in patients with right frontal lesions. **Neuropsychologia**. 1996. Oct;34(10):953-63.

RUECKERT, L.; GRAFMAN, J. Sustained attention deficits in patients with lesions of posterior cortex. **Neuropsychologia**. 1998. Jul;36(7):653-60.

SARTER, M.; GIVENS, B.; BRUNO, J. P. The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up. **Brain. Res. Brain. Res. Rev.** 2001. Apr;35(2):146-60. Review.

SCHILSTRON, B.; NOMIKOS, G. G.; NISELL, M.; HERTEL, P.; SVENSSON, T. H. N-methyl-D-aspartate receptor antagonism in the ventral tegmental area diminishes the systemic nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. **Neuroscience**. 1998. Feb;82(3):781-9.

SCHINDER, A. F.; POO, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. **Trends Neurosci**. 2000. Dec;23(12):639-45. Review.

SCHWENDT, M.; DUNCKO R.; MAKATSORI, A.; MONCEK, F.; JOHANSSON, B. B.; JEZOVA, D. Involvement of glutamate neurotransmission in the development of excessive wheel running in Lewis rats. **Neurochem. Res**. 2003. Apr;28(3-4):653-7.

SESACK, S.R.; PICKEL, V.M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. **J. Comp. Neurol**. 1992. 320:145-160.

SHORES, M. M.; WHITE, S. S.; VEITH, R. C.; SCOT, P. Tyrosine hydroxylase mRNA is increased in old age norepinephrine uptake transporter mRNA is decreased in middle age in locus coeruleos of brown-norway rats. **Brain Res.** 1995. 826, 143-147.

SKLAIR-TAVRON, L.; SHI, W. X.; LANE, S. B.; HARRIS, H. W.; BUNNEY, B. S.; NESTLER, E. J. Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci., U S A.** 1996. Oct 1;93(20):11202-7.

SLOTKIN, T. A. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. **Neurotoxicol. Teratol.** 2002. May-Jun;24(3):369-84. Review.

SPANAGEL, R.; WEISS, F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. **Trends Neurosci.** 1999. Nov;22(11):521-7. Review.

STEFFENSEN, S. C.; SVINGOS, A. L.; PICKEL, V. M.; HENRIKSEN, S. J. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. **J. Neurosci.** 1998. Oct 1;18(19):8003-15, 1998.

STOLERMAN, I. P.; JARVIS, M. J. The scientific case that nicotine is addictive. **Psychopharmacology (Berl.)**. 1995. Jan;117(1):2-10; discussion 14-20. Review.

STUMMER, W.; WEBER, K.; TRANMER, B.; BAETHMANN, A.; KEMPSKI, O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. **Stroke**. 1994. Sep;25(9):1862-9.

SWISLOCKI, A. L.; TSUZUKI, A.; TAIT, M.; KHUU, D.; FANN, K. Smokeless nicotine administration is associated with hypertension but not with a deterioration in glucose tolerance in rats. **Metabolism**. 1997. Sep;46(9):1008-12.

TABER M.T.; DAS, S.; FIBIGER, H.C. Cortical regulation of subcortical dopamine release: mediation via the ventral tegmental area. **J. Neurochem**. 1995. 65:1407-1410.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1993. Feb;44(2):463-9.

TSAI, M. J.; LEE, E. H. Nicotine enhances brain biopterin concentration in rats. **Neurochem. Int.** 1995. 27:213-217.

USSHER, M.; WEST, R.; McEWEN, A.; TAYLOR, A.; STEPTOE, A. Efficacy of exercise counselling as an aid for smoking cessation: a randomized controlled trial. **Addiction**. 2003. Apr; 98(4):523-32.

VANDERSCHUREN, L. J.; KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000. Aug;151(2-3):99-120.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat. Neurosci**. 1999. Mar;2(3):266-70.

VEZINA, P.; HERVE, D.; GLOWINSKI, J.; TASSIN, J. P. Injections of 6-hydroxydopamine into the ventral tegmental area destroy mesolimbic dopamine neurons but spare the locomotor activating effects of nicotine in the rat. **Neurosci. Lett**. 1994. Feb 28;168(1-2):111-4.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol Biochem Behav**. 1994. Nov; 49(3):549-54.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; FOWLER, J. S.; LOGAN, J.; GATLEY, S. J.; WONG, C.; HITZEMANN, R.; PAPPAS, N. R. Reinforcing effects psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D(2) receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1999. 291, 409-415.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J.; SWANSON, J. M. Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. **Mol. Psychiatry.** 2004. Jun;9(6):557-69. Review.

WAALAS, I.; FONNUM, F. Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. **Neuroscience.** 1980. 5(1):63-72.

WERME, M.; THOREN, P.; OLSON, L.; BRENE, S. Running and cocaine both upregulate dynorphin mRNA in medial caudate putamen. **Eur. J. Neurosci.** 2000. Aug;12(8):2967-74.

WESTERINK, B. H.; KWINT, H. F; DeVRIES, J. B. The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. **J. Neurosci.** 1996. Apr 15;16(8):2605-11.

WILSON, W. M.; MARSDEN, C. A. Extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat during treadmill running. **Acta. Physiol. Scand.** 1995. Dec;155(4):465-6.

YIN, R.; FRENCH, E. D. A comparison of the effect of the nicotine on dopamine and non-dopamine neurons in the rat ventral tegmental area: An in vitro electrophysiological study. **Brain Res. Bull.** 2000. vol. 51 No. 6 p. 507-514.

ZANGROSSI, H. Jr.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain. Res. Bull.** 1997. ;44(1):1-5.

ZOLI, M.; ZINI, I.; AGNATI, L. F.; GUIDOLIN, D.; FERRAGUTI, F.; FUXE, K. Aspects of neuronal plasticity in the central nervous system. I. Computer-assisted image analysis methods. **Neurochem. Int.** 1990. 16, 383-418.