

## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA A VARENICLINA NA MEMÓRIA DE RATOS WISTAR

Gabriel Ramos de Abreu (IC) e Esther Lopes Ricci Adari Camargo (Orientador)

**Apoio:** PIBIC Mackenzie

### Resumo

A vareniclina é uma substância sintética utilizada no tratamento do tabagismo, comercializada pela Pfizer com o nome de Champix®, que atua como agonista parcial nos receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs)  $\alpha 4\beta 2$  e  $\alpha 3\beta 4$  e como agonista total no receptor  $\alpha 7$ . Estudos indicam que a vareniclina melhorou a atenção e a memória de trabalho em pacientes com esquizofrenia e a hipótese para tal efeito é de que ao atuar nos nAChRs, há um aumento na liberação dos neurotransmissores GABA, acetilcolina e dopamina, modulando, assim, a memória. Considerando que há uma tendência de ampliação do uso clínico da vareniclina e que há poucos estudos relacionados com os efeitos dessa substância na memória, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da exposição prolongada a vareniclina na memória de ratos Wistar. Para tal, foram utilizados 40 ratos machos divididos em quatro grupos iguais (N=10): um grupo controle e três grupos experimentais. O tratamento foi feito por via oral (gavagem) por 33 dias. Durante o tratamento, o consumo de água e de ração, bem como o ganho de peso dos animais foi mensurado semanalmente. Os animais foram submetidos aos testes do labirinto de Barnes, reconhecimento de objetos, e à esquiva passiva. Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a vareniclina não causou alteração na memória dos ratos.

**Palavras-chave:** Vareniclina. Receptores Colinérgicos Nicotínicos. Funções Cognitivas.

### Abstract

Varenicline is a synthetic substance used in the treatment of smoking. This compound is marketed by Pfizer under the name Champix® and acts as a partial agonist at nicotinic cholinergic receptors  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 4$  and as a full agonist on  $\alpha 7$  receiver. Preclinical studies indicate that varenicline improved attention and working memory in patients and the hypothesis for this effect is that by acting on the nAChRs there is an increased release of GABA, acetylcholine and dopamine neurotransmitters, therefore modulating memory. Whereas there is a tendency to expand the clinical use of varenicline for smoking cessation but only a few studies in the context of neurological consequences related to memory. Therefore, this work aimed to study the effects of prolonged exposure to varenicline in Wistar rat's memory. To this

end, 40 male rats divided into four equal groups (N=10) were used: control and the groups treated with its respective doses of varenicline for 33 days by gavage. During treatment, water and food consumption as well as weight gain of the animals was measured weekly. Animals were submitted to Barnes maze, object recognition and passive avoidance tests. Based on the obtained results it's possible to conclude that varenicline wasn't able to cause memory impairment nor improvement in rats.

**Keywords:** Varenicline. Nicotinic cholinergic receptors. Cognitive functions

## 1. INTRODUÇÃO

Cerca de seis milhões de pessoas morrem por ano devido ao tabagismo. No Brasil, mais de 23 milhões de pessoas acima de 15 anos são fumantes ativos (WHO, 2015a), e para diminuir o tabagismo, o Brasil adotou medidas como proibir propagandas e colocar avisos dos males causados nas caixas de cigarro e fumo, porém a dificuldade apresentada na cessão do fumo impede que muitas pessoas consigam parar, e o uso de medicamentos podem dobrar as chances de sucesso (WHO, 2015b).

A vareniclina, substância utilizada no tratamento do tabagismo, possui taxa de cessão de fumo maior do que outros métodos, como adesivos e goma de nicotina e outros medicamentos (COE et al., 2005; KING et al, 2011; NOCENTE et al, 2013; ERWIN; SLATON, 2014). Considerando que há uma tendência de ampliação do uso clínico da vareniclina para o tratamento do tabagismo e que há poucos estudos no âmbito das consequências neurológicas relacionadas à memória, tornam-se necessários mais estudos sobre seus efeitos farmacológicos. Desse modo, este trabalho visou estudar os efeitos da exposição prolongada a essa substância na memória de ratos Wistar utilizando os testes labirinto de Barnes, reconhecimento de objetos e esQUIVA passiva.

## REFERENCIAL TEÓRICO

A vareniclina, substância sintética produzida a partir do alcaloide citisina da planta *Cytisus Laburnum L.*, é utilizada no tratamento do tabagismo (COE et al., 2005; DUBOIS et al., 2013; CAHILL; STEAD; LANCASTER, 2012), tendo sido aprovado para uso terapêutico em 2006 pela U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2016). Segundo a Pfizer (2008), laboratório fabricante, os efeitos colaterais mais comuns do medicamento são: náusea, insônia, dor de cabeça, flatulência, distúrbios do sono, vômito e constipação. Há relatos de depressão, pensamentos suicidas, comportamento anormal, psicose e hostilidade, assim como o agravamento de doenças psiquiátricas preexistentes e acidentes cardiovasculares (FREEDMAN, 2007; SVANSTROM; PASTERNAK; HVIID, 2012). Ainda segundo a Pfizer (2012), os sintomas estão possivelmente relacionados à abstinência da nicotina, e não ao medicamento.

A vareniclina atua nos receptores colinérgicos nicotínicos (*nAChRs*) (DUBOIS et al., 2013; LANGE-ASSCHENFELDT et al., 2016). Esses receptores estão envolvidos em diversas funções ligadas à cognição, ao aprendizado, à memória, à recompensa e a atenção (MILLAR; GOTTI, 2009; KALECHSTEIN et al., 2014). Devido a essas funções, estudos vêm sendo realizados para o possível uso no tratamento de dependência a drogas, dor, ansiedade,

depressão, esquizofrenia, Alzheimer e Parkinson (JENSEN et al., 2005; ARIAS et al., 2015; HAMOUDA et al., 2016).

A vareniclina atua nos receptores mais abundantes dentre os *nAChRs*: os receptores  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$  e o  $\alpha 7$  (MOCKING et al., 2013; WING et al., 2013; KALECHSTEIN et al., 2014; TERRY JR; PLAGENHOEF; CALLAHAN, 2016). Ela atua nos receptores  $\alpha 4\beta 2$  e  $\alpha 3\beta 4$  como um agonista parcial, ou seja, ela se liga nesses receptores e mimetiza os efeitos endógenos da nicotina, porém não sendo tão eficaz – efeito agonista –, e impedindo que outras moléculas se liguem nos receptores – efeito antagonista. No receptor  $\alpha 7$ , a vareniclina atua como um agonista total (GOODMAN; GILMAN, 2003; JORENBY et al., 2006; ROLLEMA et al., 2010; IIDA et al., 2012;).

Essa substância atua, portanto, diminuindo o fator de recompensa e o efeito de abstinência associado ao uso da nicotina através da competição com a molécula de nicotina no sítio de ligação, impedindo assim, o seu efeito. A vareniclina também estimula a liberação de acetilcolina, dopamina e GABA, gerando os mesmos efeitos da nicotina, porém em intensidade menor (JORENBY et al., 2006; ROLLEMA et al., 2010; IIDA et al., 2012).

Por ser semelhante à nicotina, substância que modula a memória de forma positiva (PUMA et al., 1999; KENNEY; GOULD, 2008; FROELIGER; GILBERT; MCCLERNON, 2009; TIAN et al., 2011), a vareniclina seria capaz de melhorar funções cognitivas através da liberação de alguns neurotransmissores (LOUGHEAD et al, 2010; TIAN; PAN; YOU, 2015). A hipótese para esse efeito é de que, ao atuar nos *nAChRs*, presentes em grande quantidade nos neurônios GABAérgicos e dopaminérgicos do hipocampo e do córtex pré-frontal, há aumento na liberação pré-sináptica dos neurotransmissores GABA, acetilcolina e dopamina (BIRD; BURGESS, 2008; SON; WINZER-SERHAN, 2008; ROLLEMA et al, 2011; DUBOIS et al., 2013).

Estudos de Patterson et al. (2009), Rollema et al. (2009) e Mocking et al. (2013) indicaram que a vareniclina melhorou a atenção e a memória de trabalho em roedores. Estudos de Smith et al. (2009) e Shim et al. (2012), também demonstraram uma melhora cognitiva após o tratamento com vareniclina em seres humanos com esquizofrenia, e estudos de Gould et al. (2011) mostraram uma melhora na memória de macacos Rhesus.

A memória é a capacidade de armazenar, processar e relembrar pensamentos produzidos por sinais aferentes no sistema nervoso. Para que ela ocorra são necessárias três etapas obrigatórias: aquisição, seleção e retenção. Podem ainda ocorrer as etapas de consolidação e modulação (LENTE, 2005).

Primeiramente deve ocorrer a aquisição, ou seja, a entrada de um estímulo em qualquer um dos sistemas nervosos sensoriais do corpo, como um som, um objeto através da visão, emoções, movimentos, entre muitos outros (GUYTON; HALL, 2006).

Durante a aquisição ocorre também a seleção, permitindo que apenas aspectos mais importantes sejam armazenados durante o processo de retenção (CINGOLANI; HOUSSAY, 2004; LENT, 2005). Este armazenamento criado pelo processo de retenção pode durar desde alguns segundos até muitos anos, sendo classificada como memória de curta duração ou de longa duração (GUYTON; HALL, 2006; JAEGER, 2010).

No processo de consolidação da memória, pode ocorrer a modulação, que permite uma memória ainda mais duradoura e marcante, normalmente ligada ao estado emocional da pessoa durante a aquisição (LENT, 2005; PÔRTO, 2006). Tal modulação pode ser feita por diversos neurotransmissores e hormônios atuantes naquele instante (IZQUIERDO, 1989). Ao serem lembradas, as memórias passam pelo chamado efeito de evocação, que ocorre através das diversas estruturas cerebrais, como o hipocampo, a amígdala, o córtex parietal e o pré-frontal, o tálamo, entre outras. Estudos indicam que durante a evocação da memória pode ocorrer um reforço, sendo ela suscetível aos mesmos processos envolvidos na consolidação (IZQUIERDO, 1989; JAEGER, 2010). Esse processo de reforço é denominado de reconsolidação (CINGOLANI; HOUSSAY, 2004; BIRD; BURGESS 2008; BARATTI, 2009;). Com o uso de drogas é possível reforçar artificialmente, através de moléculas exógenas, memórias recém consolidadas e evocadas, aumentando sua reconsolidação sem influenciar a aquisição de novas memórias (BARATTI, 2009; SOARES, et al., 2011).

Neurotransmissores como a acetilcolina modulam a memória, uma vez que seus receptores estão amplamente distribuídos pelo hipocampo, contribuindo de forma positiva ou negativa para os processos de consolidação e reconsolidação (GOLD, 2003; JAEGER, 2010). A dopamina também atua na modulação da memória, uma vez que essa molécula pode ser liberada em grandes quantidades em estados emocionais e, dessa forma, facilitar todo o processo de formação de memória (CINGOLANI; HOUSSAY, 2004; LENT, 2005; RETONDO; RETONDO, 2006; OLSZEWER, 2008). O GABA, principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso, modula a memória com sua capacidade amnésica (IZQUIERDO, 1989; SOARES, et al. 2011), e novos estudos sugerem que esse neurotransmissor tem um papel importante na modulação da memória para conservá-la, e não para inibi-la, uma vez que ele estimula a síntese proteica no cérebro (THANAPREEDAWAT, 2013).

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizados 40 ratos machos Wistar, com cerca de 90 dias de idade, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram alojados no biotério central da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM) em gaiolas de polipropileno 43 cm x 23 cm x 16 cm e mantidos em estantes ventiladas com temperatura constante de 23°C ( $\pm$  2°C), em sala com ciclo de luz de 12 horas, ascendendo as luzes às 7h00 e apagando às 19h00. Os ratos tiveram comida e água *ad libitum* durante todo o procedimento experimental. O consumo de água e ração, assim como o ganho de peso, foram mensurados semanalmente.

A fim de atender as normas éticas no uso de animais, o projeto foi submetido para análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UPM, protocolo número 132/11/2015, e da FMVZ-USP, protocolo número 3304041214

O tartarato de vareniclina (Champix®, Pfizer) foi diluído em água filtrada e administrado nos animais por via oral – gavagem. Foram empregadas três diferentes doses: a menor dose utilizada foi a maior dose terapêutica para seres humanos – 0,03mg/kg; as outras duas doses foram múltiplas desta – 0,1mg/kg e 0,3mg/kg. O grupo controle recebeu água de torneira via oral no volume 1,0 mL/kg.

Os animais receberam por gavagem diferentes doses de vareniclina (0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg) ou água (controle) por 33 dias (N=10 animais por grupo). Do 24º ao 28º dia de tratamento os animais passaram pelo labirinto de Barnes, do 29º até o 31º dia de tratamento foi realizado o teste de reconhecimento de objetos e do 32º ao 33º dia de tratamento, o teste da esquiva passiva. Em todos os testes os aparatos e objetos foram limpos com álcool 5% entre um animal e outro, afim de evitar interferência olfativa.

O labirinto de Barnes consiste em uma plataforma circular, com 120 cm de diâmetro e 90 centímetros de altura do chão. Na plataforma, 18 furos de 9 cm de diâmetro se encontram equidistantes, sendo que um dos furos possui uma caixa de escape acoplada, que consiste em uma caixa escura, com maravalha, onde o animal pode se refugiar (BARNES et al., 1979). O labirinto possui cor branca e fica localizado em uma sala com paredes também brancas. Em uma das paredes, logo acima da caixa de escape, foram colocadas duas formas geométricas de cor preta, servindo de indicação visual para o animal.

Os animais foram colocados no centro da plataforma, dentro de uma caixa de ambiente escuro de 18cm x 12cm x 11cm, durante trinta segundos. Em seguida, a caixa foi retirada e o comportamento do animal foi observado por cinco minutos ou até que ele entre na caixa de escape. Os parâmetros avaliados foram a latência para entrar na caixa de escape e o número de erros, ou seja, quantos furos o animal fareja antes de entrar na caixa de escape. O teste

possui duração de cinco dias, tendo sido realizado duas vezes por dia, no período da manhã e no período da tarde. Nos quatro primeiros dias foi realizado o treinamento e no quinto dia o teste em si.

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado no aparato de campo aberto, que consiste em uma arena circular de 61 cm de diâmetro com paredes de 50 cm de altura, dividida em 10 quadrantes. O teste visa identificar o reconhecimento de objetos novos pelos animais num ambiente já familiar, dessa forma avaliando a memória declarativa do animal, que, por possuir hábitos exploratórios, tende a interagir mais com objetos novos ao invés de objetos já familiares (ANTUNES; BIALA, 2012).

O teste foi realizado em três dias na parte da manhã. No primeiro dia, o de habituação, o animal foi colocado no centro do campo aberto para habituação no ambiente por 5 minutos. No segundo dia, o animal foi colocado no campo aberto para a habituação com dois objetos idênticos por 5 minutos. No terceiro dia o teste em si foi realizado. Para tal, um dos objetos foi trocado por um novo e o comportamento do animal foi observado por 5 minutos. Vale destacar que os objetos foram mantidos na mesma posição durante todo o experimento. Os parâmetros avaliados foram o tempo e frequência de interação com o objeto novo e com o objeto familiar.

O teste de esQUIVA passiva ocorre em uma caixa com duas câmaras, uma clara e outra escura, divididas por uma porta tipo guilhotina. O teste é realizado em dois dias. No primeiro dia, o animal foi colocado na câmara clara durante 30 segundos. A porta, então, foi baixada e o animal pôde se locomover para a câmara escura. Ao adentrar na câmara escura, um estímulo aversivo de choque de 0,5 mA foi aplicado nas patas. No segundo dia, o animal foi colocado novamente na câmara clara por 30 segundos e então, a porta foi baixada. Porém, ao adentrar a câmara escura, não houve a aplicação do choque. Foi observada a latência para o animal entrar na câmara escura em ambos os dias, com um tempo máximo de cinco minutos. O teste foi realizado no período da manhã.

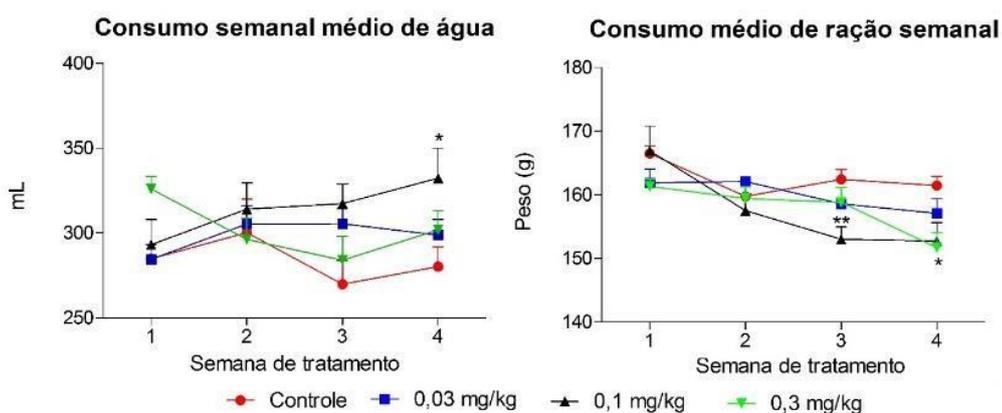
A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 5.03® (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados foi utilizado o teste de Bartlett. Os testes utilizados para os dados paramétricos foram a ANOVA de uma via com pós teste de Dunnett quando só havia um fator a ser avaliado – tratamento – e ANOVA de duas vias com pós teste de Bonferroni quando havia mais de um fator a ser avaliado – tratamento e tempo. O nível de significância para todas as análises foi considerado  $p < 0,05$  e os dados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão.

### 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Para a realização do presente estudo os animais foram divididos em quatro grupos: um controle e três grupos experimentais. As doses escolhidas estão de acordo com o protocolo de estudos toxicológicos em roedores, no qual a dose mais baixa não deve causar nenhuma toxicidade e a dose mais alta pode causar toxicidade leve nos animais, com a terceira dose sendo intermediária entre as duas (OECD, 2008). As doses utilizadas neste trabalho foram de 0,03; 0,1 e 0,3 mg/kg de vareniclina.

A Figura 1 mostra o consumo de água, em mililitros, e de ração, em gramas, dos ratos durante o tratamento prolongado com vareniclina. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferença significativa entre os grupos no quesito água em relação ao tratamento ( $F(3/108)=0,9467$ ,  $p>0,05$ ), mas apontou diferença significativa em relação ao tempo ( $F(3/108)=2,922$ ,  $p<0,05$ ) com interação entre os fatores ( $F(9/108)=7,800$ ,  $p<0,0001$ ). O pós-teste de Bonferroni apontou aumento no consumo de água na terceira semana ( $p<0,05$ ) do grupo 0,1 mg/kg quando comparado ao grupo controle. No quesito ração, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferença significativa entre os grupos em relação ao tratamento ( $F(3/108)=1,874$ ,  $p>0,05$ ), mas apontou diferença significativa em relação ao tempo ( $F(3/108)=28,93$ ,  $p<0,0001$ ) com interação entre os fatores ( $F(9/108)=5,000$ ,  $p<0,0001$ ). O pós-teste de Bonferroni apontou aumento no consumo de ração na terceira semana ( $p<0,01$ ) e na quarta semana ( $p<0,05$ ) do grupo 0,1 mg/kg quando comparado ao grupo controle.

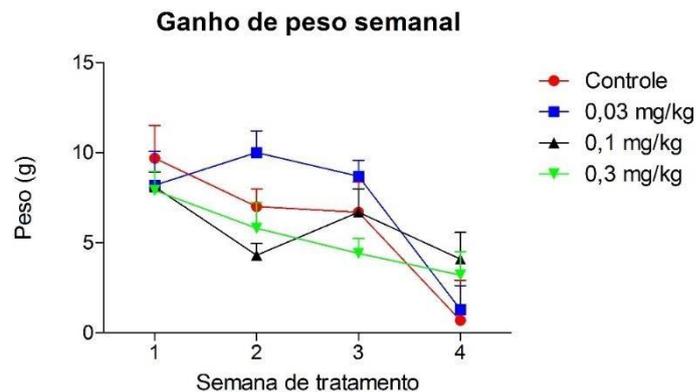
Figura 1 – Consumo médio de água, em mililitros, e de ração, em grama, durante o tratamento prolongado com vareniclina ou não – controle – em diferentes doses, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros padrões. N=10 animais por grupo.



$p<0,05$ , ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 2 mostra o ganho de peso dos ratos durante o tratamento prolongado com vareniclina. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferença significativa entre os grupos em relação ao tratamento ( $F(3/108)=1,093$ ,  $p=0,3645$ ) mas apontou diferença significativa em relação ao tempo ( $F(3/108)=14,86$ ,  $p<0,0001$ ), sem interação entre os fatores ( $F(9/108)=1,808$ ,  $p<0,0748$ ).

Figura 2 – Ganho de peso por animal, em gramas, durante o tratamento prolongado com vareniclina ou não – controle – em diferentes doses, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros padrões. N=10 animais por grupo.



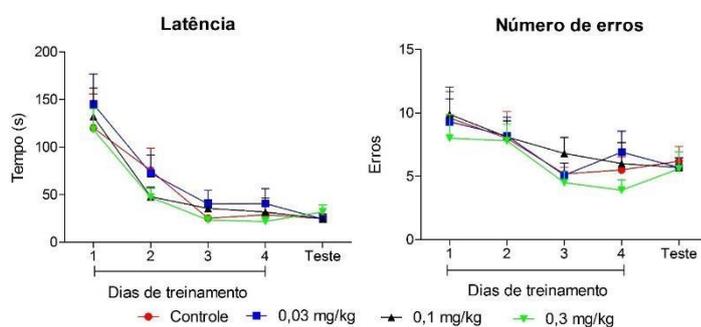
$p<0,05$ , ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a avaliação de toxicidade, o consumo médio de água e de ração e o ganho de peso foram mensurados semanalmente conforme protocolo da OECD (2008). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou alterações no consumo de água nos animais tratados em relação aos animais controle. O pós-teste de Bonferroni apontou que houve diferença estatística significativa no consumo de água na terceira semana do grupo 0,1 mg/kg, porém essa alteração não foi acompanhada pelo ganho de peso e se mostrou pontual, em apenas uma semana e em apenas um dos grupos. Para o consumo de ração, a ANOVA de duas vias não apontou diferença estatística significativa para os grupos tratados em relação ao grupo controle. O pós-teste de Bonferroni apontou diferença estatística significativa para o grupo 0,1 mg/kg quando comparado ao grupo controle para o consumo de ração na terceira e na quarta semana de tratamento. Apesar da recorrência na diferença, o consumo não foi acompanhado de alteração estatística significativa no ganho peso dos animais, indicando então, que a alteração do consumo não estava relacionada a uma possível toxicidade da vareniclina.

Esses resultados indicam que a vareniclina não foi capaz de causar toxicidade nos animais tratados por período prolongado.

A Figura 3 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no labirinto de Barnes. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferença significativa entre os grupos para o parâmetro de latência, em relação ao tratamento ( $F(3/144)=0,4581$ ,  $p=0,7133$ ), mas mostrou diferença em relação ao tempo ( $F(4/144)=31,70$ ,  $p<0,0001$ ), sem relação entre estes ( $F(12/144)=0,3252$ ,  $p=0,9837$ ). Também não houve diferença significativa entre os grupos para o parâmetro de número de erros, em relação ao tratamento ( $F(3/144)=0,6830$ ,  $p=0,5851$ ), mas mostrou diferença significativa em relação ao tempo ( $F(4/144)=12,36$ ,  $p<0,0001$ ), sem interação entre estes ( $F(12/144)=0,4914$ ,  $p=0,9978$ ).

Figura 3 – Avaliação no labirinto de Barnes de ratos em tratamento prolongado com vareniclina ou não – controle – em diferentes doses, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros padrões. N=10 animais por grupo.



$p<0,05$ , ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

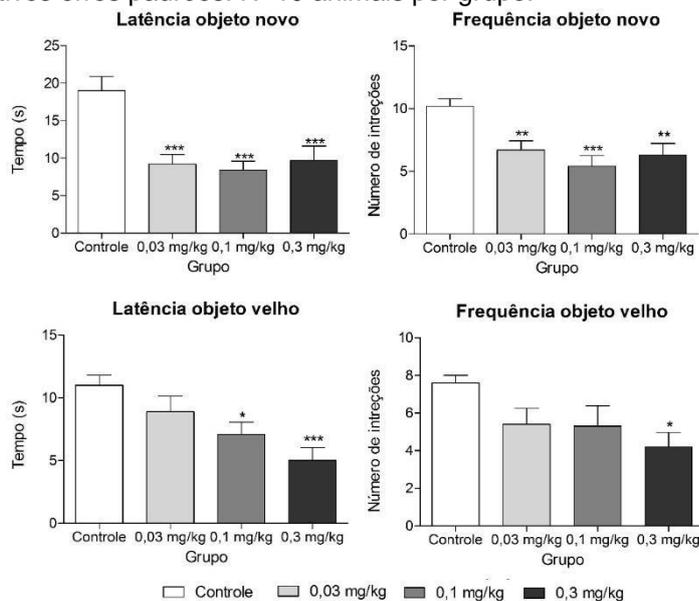
Os parâmetros avaliados no teste – número de erros e latência para encontrar a caixa de escape – visam demonstrar o progresso feito pelo animal no decorrer dos dias na procura da caixa de escape. Tal procura é auxiliada pela presença da indicação visual extra labirinto, acima do furo correto, estimulando a memória do animal, como demonstrado por Harrison et al. (2006) em camundongos. Estes, quando treinados no labirinto com a presença da dica visual extra labirinto, adotaram a estratégia de procurar o furo com a caixa de escape indo diretamente a ela, em vez de procurar aleatoriamente ou em sequência.

Os animais controles e os animais tratados se comportaram conforme o esperado (HARRISON et al., 2006; ROSENFELD; FERGUSON, 2014): com o passar das sessões de treino, os animais encontravam a caixa de escape mais rápido e com menor número de erros, como pode ser visto na curva de aprendizado dos animais, na Figura 3, especialmente no parâmetro de latência.

Os animais tratados apresentaram a mesma curva de aprendizado, sem alterações, evidenciando que a vareniclina não alterou a memória desses animais.

A Figura 4 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no reconhecimento de objetos. A ANOVA de uma via apontou diferença significativa entre os grupos nos seguintes parâmetros: tempo no objeto novo ( $F(743,7/1682)=9,513$ ,  $p<0,0001$ ), frequência no objeto novo ( $F(132,9/357,1)=7,113$ ,  $p=0,0007$ ), tempo no objeto familiar ( $F(196,2/574,0)=6,232$ ,  $p=0,0016$ ) e frequência no objeto familiar ( $F(60,88/305,4)=2,988$ ,  $p=0,0438$ ). O pós-teste de Dunnett mostrou que: os animais do grupo 0,03 tiveram diminuição no tempo de interação com o objeto novo ( $p<0,01$ ) e na frequência de interação com o objeto novo ( $p<0,01$ ); os animais do grupo 0,1 tiveram diminuição no tempo de exploração do objeto novo ( $p<0,001$ ), na frequência de exploração do objeto novo ( $p<0,001$ ) e no tempo de exploração com o objeto familiar ( $p<0,05$ ); e os animais do grupo 0,3 tiveram diminuição no tempo de exploração do objeto novo ( $p<0,001$ ), na frequência de exploração do objeto novo ( $p<0,01$ ), no tempo de exploração do objeto familiar ( $p<0,001$ ) e na frequência de exploração do objeto familiar ( $p<0,05$ ), quando comparado com os animais controles.

Figura 4 – Avaliação no reconhecimento de objetos de ratos em tratamento prolongado com vareniclina ou não – controle – em diferentes doses, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros padrões. N=10 animais por grupo.



\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ , ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste de reconhecimento de objetos é utilizado em primatas não-humanos para avaliar a memória declarativa episódica dos animais, pois apresenta um alto grau de precisão (JAEGER, 2010). Nos roedores, o reconhecimento de objetos pode estar relacionado ao hipocampo e ao córtex perirrinal (JAEGER, 2010; ANTUNES; BIALA, 2012), locais de atuação da vareniclina através dos *nAChRs*. Para o teste, a habituação – que é uma forma de aprendizagem não associativa também relacionada com o hipocampo – é essencial para que

o teste possa avaliar a memória declarativa de curto prazo e não a ansiedade do animal, pois o animal, ao estar em um local já familiar, tem diminuição dos estímulos exploratórios provocados pelo ambiente e pelo objeto familiar (JAEGER, 2010; ANTUNES; BIALA, 2012).

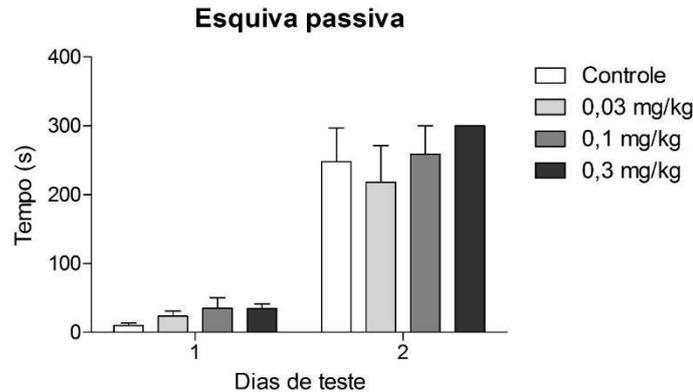
Os resultados mostram que os animais controles agiram conforme o esperado: interagiram mais vezes e por mais tempo com o objeto novo do que com o objeto familiar, indicando que o objeto familiar ficou na memória e não estimulou o hábito exploratório do animal da mesma forma que o objeto novo (ANTUNES; BIALA, 2012). Entretanto, os três grupos de animais tratados não apresentaram este comportamento, uma vez que não exploraram o objeto novo nem o familiar. Essa falta de preferência pode não estar relacionada com um déficit de memória, mas apenas uma mudança de preferência dos animais (ANTUNES; BIALA, 2012).

A diminuição da exploração dos objetos também poderia ser causada por ansiedade, uma vez que animais ansiosos tendem a ficar em locais mais fechados, escuros e conhecidos, sem se movimentar muito (BOURIN, 2003), contudo, a habituação do teste visa inibir essa ansiedade (JAEGER, 2010; ANTUNES; BIALA, 2012). Estudos do grupo indicaram que os animais tratados apresentaram um aumento de ansiedade no teste de interação social e no teste da caixa claro-escuro, o que poderia indicar que os animais, apesar da habituação, se mostraram mais ansiosos do que os animais controles e tiveram a exploração inibida. A ansiedade pode causar interferências na memória quando muito elevada (IZQUIERDO; MEDINA, 1997) como demonstrado por Arbabi et al., (2015), que correlacionou o déficit de memória com ansiedade em pacientes de uma clínica, podendo ser uma das hipóteses que explicam o resultado obtido.

Com base nos resultados obtidos, é possível verificar que o teste de reconhecimento de objetos não foi capaz de avaliar a memória episódica, uma vez que os animais tratados não exploraram nenhum dos objetos.

A Figura 5 mostra os resultados da esQUIVA passiva. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferença significativa entre os grupos em relação ao tratamento ( $F(3/22)=0,9001$ ,  $p=0,4569$ ), mas apresentou diferença significativa em relação ao tempo ( $F(1/22)=144,9$ ,  $p<0,0001$ ) sem interação entre estes ( $F(3/22)=0,5923$ ,  $p=0,6266$ ).

Figura 5 – Teste de esquiva passiva de ratos em tratamento prolongado com vareniclina ou não – controle – em diferentes doses, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros padrões. N=6-7 animais por grupo.



$p < 0,05$ , ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste de esquiva passiva visa avaliar o aprendizado e a memória de curto prazo associada a evento emocional do tipo não-declarativa (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013). O teste consiste na aplicação de um estímulo aversivo nas patas do animal ao adentrar a câmara mais escura do aparato; tal estímulo age como modulador da memória adquirida naquele instante, sendo essa a parte emocional não-declarativa (UKAI; WATANABI; KAYEMA, 2001).

É esperado que o animal, no primeiro dia, entre rapidamente na câmara escura, já que esses animais preferem ambientes mais escuros e fechados. Porém, no segundo dia, é esperado que o animal demore muito mais ou que nem sequer entre na câmara escura, uma vez que o estímulo aversivo nas patas deveria ser pior para o animal do que o ambiente claro. Desse modo, o animal deve aprender e se lembrar de suprimir a ação de passar para a câmara mais escura. Por se tratar de um teste de dois dias, que acontece num intervalo de 24h, a memória avaliada é a de curto prazo. (LENT, 2005; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2010).

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que não houve diferença estatística significativa entre os animais tratados e os animais controles no aprendizado e na memória, indicando que não auxilia nem inibi a modulação da memória de curto prazo associado a eventos emocionais.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho mostraram que a exposição prolongada a vareniclina não promoveu toxicidade, uma vez que não houve alteração no consumo de água e de ração, bem como no ganho de peso dos animais tratados quando comparados aos animais controles. A exposição prolongada a vareniclina não alterou a memória declarativa espacial avaliada no

teste do labirinto de Barnes e não alterou a memória de curto prazo associada a evento emocional avaliada no teste de esQUIVA passiva. Não foi possível avaliar a memória declarativa episódica no teste de reconhecimento de objetos, uma vez que os animais tratados não exploraram nenhum dos objetos.

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2015/05049-3), a coorientação da Julia Zaccarelli Magalhães e a colaboração da Bianca Maria Petrocelli neste trabalho.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.
- ARIAS, H. R.; FEUERBACH, D.; TARGOWSKA-DUDA, K.; KACKZOR, A. A.; POSO, A.; JOZWIAK, K. Pharmacological and molecular studies on the interaction of varenicline with different nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Potential mechanism underlying partial agonism at human  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 4$  subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1848, n. 2, p. 731-741, 2015.
- ARBABI, M.; ZHAND, N.; EYPBOOSH, S.; YAZDI, N.; ANSARI, S.; RAMEZANI, M. Correlates of memory complaints and personality, depression and anxiety in a memory clinic. **Acta Medica Iranica**, v. 53, n. 5, p. 270-275, 2015.
- BARATTI, C.M.; BOCCIA, M.M.; BLAKE, M.G. Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 2, p. 148-154, 2009.
- BARNES, C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **Journal of Comparative Physiology**, v. 93, n. 1, p. 74-104, 1979.
- BIRD, C.M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 182-194, 2008.
- BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B. N.; HASCÖET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 567–574, 2007.
- CAHILL, K.; STEAD, L.F.; LANCASTER, T. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, 2012
- CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia Humana de Houssay**, 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1124p.
- COE, J. W.; BROOKS, P. R.; VETELINO, M. G.; WIRTZ, M. C.; ARNOLD, E. P.; HUANG, J.; SANDS, J. B.; DAVIS, T. I.; LEBEL, L. A.; FOX, C. B.; SHRIKHANDE, A.; HEYM, J. H.; SCHAEFFER, E.; ROLLEMA, H.; LU, Y.; MANSBACH, R. S.; CHAMBERS, L. K.; ROVETTI, C. C.; SCHULZ, D. W.; TINGLEY, F. D.; O'NEILL, B. T. Varenicline: An  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Receptor Partial Agonist for Smoking Cessation. **Journal of Medical Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 3474-3477, 2005.

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSHIMA, S. (org), **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, 2010, 192-217

DUBOIS, D. W.; DAMBORSKY, J. C.; FINCHER, A. S.; FRYE, G. R.; WINZER-SERHAN, U. H. Varenicline and nicotine enhance GABAergic synaptic transmission in rat CA1 hippocampal and medial septum/diagonal band neurons. **Life Sciences**, v. 92, n. 6-7, p. 337-344, 2013.

ERWIN, B.L.; SLATON, R.M. Varenicline in the treatment of alcohol use disorders. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 48, n. 11, p. 1445-1455, 2014.

FDA – Food and Drug Administration. **Orange book: Approved drugs products with therapeutic equivalence evaluations**, 2016.

FREEDMAN, R. Exacerbation of schizophrenia by varenicline. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 8, p. 1269, 2007.

FROELIGER, B.; GILBERT, D. G.; MCCLERNON, F. J. Effects of nicotine on novelty detection and memory recognition performance: double-blind, placebo-controlled studies of smokers and nonsmokers. **Psychopharmacology**, v. 205, p. 625-633, 2009.

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 194-210, 2003.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 25-34.

GOULD, R. W.; CZOTY, P. W.; NADER, S. H.; NADER, M. A. Effects of varenicline on the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, p. 678-686, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2006. p. 619-631.

HAMOUDA, A. K.; DEBA, F.; WANG, Z. J.; COHEN, J. B. Photolabeling a Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR) with an ( $\alpha$ 4) $\beta$ 2 nAChR-Selective Positive Allosteric Modulator. **Molecular Pharmacology**, v. 89, n. 9, p. 575-584, 2016.

HARRISON, F. R.; REISERER, R. R.; TOMARKEN, A. J.; MCDONALD, M. P. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. **Learning and Memory**, v. 13, n. 6, p. 809819, 2006.

IIDA, M.; IIDA, H.; TAKENAKA, M.; TANABE, K.; IWATA, K. Preventive effect of varenicline on impairment of endothelial function in cerebral vessels induced by acute smoking in rats. **Journal of Anesthesia**, v. 26, p.928-931, 2012.

IZQUIERDO, I. Memórias. **Estudos avançados**, v. 3, n. 6, p. 89-112, 1989.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, p. 285–316, 1997.

JAEGER, X. **Modelos animais de disfunção colinérgica: papel da acetilcolina na cognição**. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

JENSEN, A. A.; FRØLUND, B.; LILJEFORS, T.; KROGSGAARD-LARSEN, P. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Structural Revelations, Target Identifications, and Therapeutic Inspirations. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 48, n. 15, p. 4705-4745, 2005.

JORENBY, D. E.; HAYS, J. T.; RIGOTTI, N. A.; AZOULAY, S.; WATSKY, E. J.; WILLIAMS, K. E.; BILLING, C. B.; GONG, J.; REEVES, K. R. Efficacy of Varenicline, an  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Partial Agonist, vs Placebo or Sustained-Release Bupropion for Smoking Cessation: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 1, p. 56-63, 2006.

KALECHSTEIN, A. D.; MAHONEY III, J. J.; VERRICO, C. D.; DE LA GARZA II, R. Shortterm, low-dose varenicline administration enhances information processing speed in methamphetamine-dependent users. **Neuropharmacology**, v. 85, p. 493-498, 2014.

KING, J.; HUANG, W.; CHEN, W.; HEFFERNAN, M.; SHIELDS, J.; RANE, P.; BIRCHER, R.; DIFRANZA, J.R. A comparison of brain and behavioral effects of varenicline and nicotine in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 223, n. 1, p.42-47, 2011.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 2, p. 175–183, 2013.

LANGE-ASSCHENFELDT, C.; SCHÄBLE, S.; SUVORAVA, T.; FAHIMI, E. G.; BISHA, M.; STERMANN, T.; HENNING, U.; KOJDA, G. Effects of varenicline on alpha4-containing nicotinic acetylcholine receptor expression and cognitive performance in mice. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 100-110, 2016.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2005. 698p.

LOUGHEAD, J.; RAY, R.; WILEYTO, E.P.; RUPAREL, K. SANBORN, P.; SIEGEL, S.; GUR, R.C.; LERMAN, C. Effects of the  $\alpha 4\beta 2$  partial agonist varenicline on brain activity and working memory in abstinent smokers. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 8, p. 715-721, 2010.

MILLAR N. S.; GOTTI, C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. **Neuropharmacology**. v. 56, n. 1, p. 237-246, 2009.

MOCKING, R. J. T.; PFLANZ, C. P.; PRINGLE, A.; PARSONS, E.; MCTAVISH, S. F.; COWEN, P. J.; HARMER, C. J. Effects of short-term varenicline administration on emotional and cognitive processing in healthy, non-smoking adults: a randomized, double-blind, study. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, p. 476-484, 2013.

NOCENTE, R.; VITALI, M.; BALDUCCI, G.; ENEA, D.; KRANZLER, H.R.; CECCANTI, M. Varenicline and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new approach to the treatment of co-occurring alcohol and nicotine addiction? **The American Journal on Addictions**, v. 22, n. 5, p. 453-459, 2013.

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, **OECD Publishing**, Paris, 2008.

OLSZEWER, E. **Neurotransmissores em Medicina (da clínica à prática ortomolecular em doenças afetivas e obesidade)**. São Paulo: Ícone, 2008. 200p.

PATTERSON, F.; JEPSON, C.; STRASSER, A.A.; LOUGHEAD, J.; PERKINS, K. A.; GUR, R.C.; FREY, J.M.; SIEGEL, S.; LERMAN, C. Varenicline improves mood and cognition during smoking abstinence. **Biological Psychiatry**, v. 65, p. 144-149, 2009

PFIZER. **CHANTIX® (varenicline) Tablets**. New York, 2008.

PFIZER. **Medication Guideline: Chantix® varenicline tablets**. New York, 2012.

PÔRTO, W. G. **Emoção e memória**. São Paulo: Artes Médicas, 2006. 156p

PUMA, C; DESCHAUX, O.; MOLIMARD, R.; BIZOT, J. C. Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 323-327, 1999.

RETONDO, C. G.; RETONDO, P. F. **Química das sensações**. Campinas: Átomo. 2006. 267p.

ROLLEMA, H.; WILSON, G.G.; LEE, T.C.; FOLGERING, J.H.A.; FLIK, G. Effect of coadministration of varenicline and antidepressants on extracellular monoamine concentrations in rat prefrontal cortex. **Neurochemistry International**, v.58, n. 1, p.78-84, 2011.

ROLLEMA, H; SHRIKHANDE, A.; WARD, K.M.; TINGLEY III, F.D.; COE, J.W.; O'NEILL, B.T.; TSENG, E.; WANG, E.Q.; MATHER, R.J.; HURST, R.S.; WILLIAMS, K.E.; DE VRIES, M.; CREMERS, T.; BERTRAND, S.; BERTRAND, D. Pre-clinical properties of the  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor partial agonists varenicline, cytisine and dianicline translate to clinical efficacy for nicotine dependence. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 334-345, 2010.

ROSENFELD, C. S.; FERGUSON, S. A.; Barnes Maze Testing Strategies with Small and Large Rodent Models. **Journal of Visualized Experiments**, v. 84, 2014.

SHIM, J. C.; JUNG, D. U.; JUNG, S. S.; SEO, Y. S.; CHO, D. M.; LEE, J. H.; LEE, S. W.; KONG, B. G.; KANG, J. W.; OH, M. K.; KIM, S. D.; MCMAHON, R. P.; KELLY, D. L. Adjunctive varenicline treatment with antipsychotic medications for cognitive impairments in people with schizophrenia: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 660-668, 2012.

SMITH, R. C.; LINDENMAYER, J. P.; DAVIS, J. M.; CORNWELL, J.; NOTH, K.; GUPTA, S.; SERSHEN, H.; LAJTHA, A. Cognitive and antismoking effects of varenicline in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. **Schizophrenia Research**, v. 110, n. 1-3, p. 149-155, 2009.

SOARES, J. C. K.; GALVÃO, S. M. P.; MOREIRA, K. D. M.; FERREIRA, T. L. Modelos Comportamentais para o Estudo da Aprendizagem e Memória em Roedores. p. 293-322. In: CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um Guia para a Pesquisa de Drogas com Ação sobre o SNC, com Ênfase nas Plantas Medicinais**. São Paulo: FAP-UNIFESP, 2011. 399p.

SVANSTROM, H.; PASTERNAK, B.; HVIID, A. Use of varenicline for smoking cessation and risk of serious cardiovascular events: nationwide cohort study. **British Medical Journal**, v. 345, 2012.

TERRY JR, A. V.; PLAGENHOEF, M.; CALLAHAN, P. M. Effects of the nicotinic agonist varenicline on the performance of tasks of cognition in aged and middle-aged rhesus and pigtail monkeys. **Psychopharmacology**, v. 233, p. 761-771, 2016.

THANAPREEDAWAT, P.; KOBAYASHI, H.; INUI, N.; SAKAMOTO, K.; KIM, M.; YOTO, A.; YOKOGOSHI, H. GABA affects novel object recognition memory and working memory in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 59, n. 2, p. 152-157, 2013.

TIAN, S.; PAN, S.; YOU, Y. Nicotine enhances the reconsolidation of novel object recognition memory in rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 129, p. 14-18, 2015.

UKAI, M.; WATANABE, Y.; KAMEYAMA, T. Endomorphins 1 and 2, endogenous m-opioid receptor agonists, impair passive avoidance learning in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, n. 2, p. 115-119, 2001.

WHO – World Health Organization. **Tobacco**. 2015a. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/156262/1/9789241564922\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/156262/1/9789241564922_eng.pdf?ua=1)> Acesso em: 15 mai 2016.

WHO – World Health Organization. **Tobacco**. 2015b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>>. Acesso em: 15 mai 2016.

WING, V. C.; WASS, C. E.; BACHER, I.; RABINS, R. A.; GEORGE, T. P. Varenicline modulates spatial working memory deficits in smokers with schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 149, p. 190-191, 2013.

**Contatos:** ramosabreug@gmail.com e esther.camargo@mackenzie.br