

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE (ICBS)**

Programa de Pós-graduação em Neurociências

**ESTUDO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE
EMPREGANDO O AGONISTA CP55,940 NO HIPOCAMPO:
EFEITOS SOBRE A CONSOLIDAÇÃO E A EVOCAÇÃO
DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO AO CONTEXTO
E SOBRE A POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO**

FABIANA SANTANA DOS SANTOS

Orientador: Prof. DR. JORGE ALBERTO QUILLFELDT

Dissertação apresentada ao PPG-
Neurociências como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Neurociências.

Porto Alegre, março de 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de estar aqui e possuir minha família e amigos tão especiais.

À minha mãe, pelo ensinamento de vida, coragem e sabedoria.

A meu pai e meu irmão Fábio por todo apoio e carinho.

Aos meus queridos amigos do LPBNC pela atenção, paciência e ensinamentos: Ana, Felipe, Josué, Lindsey, Mariana, Rodrigo, D. Zelma. Em especial ao Lucas que tanto me socorreu em todas as fases deste projeto.

E agradeço, principalmente, ao professor Jorge que me aceitou em seu laboratório, pelos conselhos, grandes ensinamentos e dicas durante este trabalho.

Aos professores do PPG Neurociências.

Agradeço a CAPES pela bolsa.

Por fim, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Sabe-se que o sistema canabinóide endógeno está envolvido com os processos de formação e evocação da memória. Agonistas dos receptores CB1 exibem diferentes efeitos conforme a via de infusão, seja ela sistêmica, seja local, atingindo estruturas específicas do encéfalo. Neste estudo pretendemos estabelecer o perfil farmacológico-comportamental e eletrofisiológico do agonista CP55,940 quando administrado no hipocampo dorsal de ratos, estrutura em que há poucos estudos prévios com este fármaco: diferente de outros agonistas como a WIN55,212 e mesmo a pouco seletiva anandamida, o CP55,940 restringe-se a receptores canabinóides e chega a ser mais potente que o Δ^9 -THC, embora não discrimine entre os receptores CB1 (central) e CB2 (periférico). Os fármacos foram infundidos bilateralmente, em diferentes concentrações, na área CA1 do hipocampo, imediatamente após o treino ou antes do teste na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC), visando estudar seus efeitos, respectivamente, na consolidação e na evocação da memória. A CP55,940 pós-treino foi amnésica apenas na concentração de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, e esse efeito foi revertido pelo antagonista AM251, seletivo para CB1, em concentração sem efeito próprio, comprovando tal efeito dever-se à ação sobre os receptores CB1. O mesmo efeito foi observado 24h após o treino, na infusão pré-teste, se bem que agora a CP55,940 foi efetiva também em concentrações mais baixas, sugerindo que os receptores desse sistema endógeno tenham ficado mais sensíveis a seus ligantes em função do aprendizado; a seletividade por CB1 neste caso, porém, não ficou

claramente atestada pois o efeito de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de CP55,940 só foi revertido com uma concentração maior de AM251. Na eletrofisiologia, uma concentração de CP55,940 comparável à efetiva sobre a CAC (10 μM), não foi capaz de inibir a indução da LTP, já que a potenciação só se sustentou por cerca de 30min – não passou de uma LTP. Esses resultados reforçam e diversificam estudos anteriores, inclusive de nosso grupo, que comprovam a participação dos receptores CB1 na formação e/ou evocação de novas memórias aversivas, bem como possíveis alterações plásticas na densidade desses receptores em função da experiência cognitiva, embora não necessariamente mediadas por eventos sinápticos plásticos como a LTP.

ABSTRACT

The endogenous cannabinoid system is known to be involved memory formation and retrieval processes. CB1 agonists may cause different effects according to the administration pathway, be it systemic or local/intrastructure. Here we try to establish the behavioral-pharmacologic and electrophysiologic profile of the agonist CP55,940 infused into the rat dorsal hippocampus, a structure less studied with this drug: different from other agonists such as WIN55,212 or even the poorly selective anandamida, CP55,940 sticks only to cannabinoid receptors and is more potent than Δ^9 -THC, but does not distinguish between central CB1 and peripheral CB2 receptors. The drug was infused bilaterally in different concentrations into the CA1 area of the hippocampus, right after training or pre-test in the Context Fear Conditioning (CFC) task, in order to study its effects upon memory consolidation and retrieval, respectively. Post-training CP55,940 was amnesic only at 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, and the CB1-selective antagonist AM251 reverted this effect in a concentration without action *per se*, which proves that the original effect is mediated by CB1 receptors. The same amnesic effect was observed 24h after training, in the pretest infusion, only that now CP55,940 was affective also with lower concentrations, suggesting that these receptors are now more sensitive to its endogenous ligands due to learning; CB1-selectivity, however, is not clearly proven here since 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of CP55,940 was reverted only by a higher concentration of AM251. In electrophysiology, a concentration of CP55,940 compatible with that found effective upon CFC (10 μM), was not able to block LTP induction, since the potentiation was not sustained for more than 30min – it was only a STP. These

results reinforce and diversify previous findings, including some from our own lab, that prove the involvement of CB1 receptors in memory consolidation and/or recall, as well as possible plastic changes in receptor density due to the cognitive experience, despite not necessarily mediated by plastic synaptic events such as LTP.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Memória e Aprendizagem	2
1.2. Classificação da Memória	4
1.2.1. Memória Declarativa	4
1.2.2 Memória Não-Declarativa	5
1.2.3. Memória de Curta e Longa Duração	5
1.2.4. Memória de Trabalho	6
1.3. Amnésia	7
1.4. Estruturas Cerebrais Envolvidas com a Memória – Engrama	8
1.4.1. Hipocampo	9
1.5. Potenciação de Longa Duração – PLD	10
1.6. Sistema Endocanabinóide	12
1.7. Sistema Endocanabinóide e Memória	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Animais para teste comportamental	20
3.2. Anestesia	20
3.3. Procedimentos cirúrgicos para comportamento	21
3.3.1. Pós-operatório: Recuperação dos animais	24
3.3.2. Tarefa Comportamental de CAC	24
3.3.3. Preparação e Administração dos fármacos	27
3.3.4. Controle do posicionamento das cânulas	28
3.3.5. Análise estatística	30
3.4. Procedimento eletrofisiológico	30
3.4.1. Animal	30
3.4.2. Procedimentos cirúrgicos	31
3.4.3. Posicionamento dos eletrodos	33
3.4.4. Indução da potenciação de longa duração (PLD)	35
3.4.5. Preparação dos fármacos	36
3.4.6. Análise eletrofisiológica	36
3.4.7. Análise estatística	36
3.5. Aprovação do projeto e considerações bioéticas	37
4. RESULTADOS	38
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	64
7. BIBLIOGRAFIA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mecanismo de ação do endocanabinóide sobre o receptor CB1	13
Figura 1.2: Formação e inativação dos endocanabinóides	14
Figura 1.3: Agonistas e antagonistas do receptor de endocabinóide	17
Figura 3.1: Cirurgia estereotáxica	13
Figura 3.2: Tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto	26
Figura 3.3: Fotografia do hipocampo corado pela técnica de Nissl	29
Figura 3.4 Fatias de hipocampo	32
Figura 3.5: Esquema da posição dos eletrodos	34
Figura 3.6: Esquema de indução da PLD	35
Figura 4.1: Efeitos da CP55940 na tarefa de CAC sobre a consolidação da memória	39
Figura 4.2: Efeitos da CP55940 e CP55,940+AM251 na tarefa de CAC Contexto sobre a consolidação da memória	41
Figura 4.3: Efeitos da CP55940 em baixas concentrações na tarefa de CAC sobre a consolidação da memória	43
Figura 4.4: Efeitos da CP55940 na tarefa de CAC sobre a evocação da memória	45
Figura 4.5: Efeitos da CP55940 e CP55,940+AM251 0,2 μ M na tarefa de CAC evocação da memória	47
Figura 4.6: Efeitos da CP55,940 e CP55,940+AM251 1 μ M CAC	49
Figura 4.6: Efeitos da CP55940 sobre a PLD	51

Lista de abreviatura

2-AG – 2- araquidonoilglicerol
AMPA – Receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc – Adenosina Monofosfato cíclico
Ca⁺² – Cálcio
CA1 – Corno de Amon 1
CA3 - Corno de Amon 3
CAC – Condicionamento Aversivo ao Contexto
CaMKII – Proteína cinase dependente de Ca⁺²-calmodulina do tipo 2
CB1 – Receptor de Canabinóide tipo 1
Cb2 – Receptor de Canabinóide tipo 2
CREB
DAG lípase – diacilglicerol lipase
DLD – Depressão de Longa Duração
FAAH – enzimas hidrolase ácida amina graxa
GluR2
LPBNC – Laboratório de Psicobiologia e Neurociências
LTP – long term potentiation
MAG Lipase – monoacilglicerol lípase
MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno
Mg⁺² – Magnésio
NAPE-PLD – N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva
NMDA – Receptores de N-metil-D-aspartato
PEPSc – Potencial excitatórios pós-sinápticos de campo
PKA – proteína cinase A
PKMζ□□□proteína cinase Mζ
PLD – Potenciação de Longa Duração
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
TBS – *theta burst stimulation*
THC - Tetra-hidrocanabinol

1. INTRODUÇÃO

A memória é o processo cujas experiências comportamentais formam um traço duradouro. Ou seja, é a capacidade que um indivíduo tem de armazenar as informações. Mas para que esse processo ocorra, é necessário um tempo para que o traço de memória se consolide em algumas regiões do encéfalo. As fases do processamento da memória são divididas em três etapas: aquisição, consolidação e evocação (Quillfeldt, 1994).

A *Aquisição* é o momento em que o indivíduo responde aos estímulos que levarão à formação de uma memória, também conhecido como “aprendizagem”. Em seguida, vem a *consolidação*, período em que o traço de memória é relativamente instável e está sendo modulado por várias informações sobre o ambiente (McGaugh, Roozendaal & Cahill, 1999).

O hipocampo é a principal estrutura onde se formam as memórias declarativas. A função dos receptores metabotrópicos CB1 no hipocampo está relacionada a mudanças plásticas e memórias de experiências comportamentais. Os receptores canabinóides do tipo CB1 são os mais abundantes receptores metabotrópicos do encéfalo, sendo encontrados principalmente em áreas classicamente relacionadas com o aprendizado e memória como hipocampo, córtex, núcleos da base e cerebelo (Wilson e Nicoll, 2002; Ameri, 1999; Hampson & Deadwyler, 1998, 2000; Marsicano et al., 2002).

Em função de trabalhos anteriores de nosso grupo, acreditamos que esses receptores modulam tanto a plasticidade sináptica no hipocampo, quanto a consolidação e evocação da memória. Para investigar essa hipótese, foram microinjetados AM251 (antagonista do receptor CB1) e anandamida (agonista do receptor CB1), o que acarretou um efeito amnésico e facilitatório sobre a consolidação, respectivamente. Entretanto, a administração pré-teste de AM251 provocou um efeito facilitatório sobre a evocação da memória (De Oliveira Álvares et al., 2006, 2008).

Neste trabalho, então, investigamos a ação do sistema endocanabinóide sobre a consolidação e evocação da memória utilizando outro fármaco, o agonista não seletivo CB1 conhecido como CP55,940, administrado intrahipocampalmente seja pós-treino (efeito na consolidação), ou pré-teste (efeito na evocação), em diferentes concentrações. Para verificar sua especificidade aos receptores CB1, tentar-se-á reverter os efeitos encontrados com a infusão concomitante do antagonista seletivo CB1 AM251 em concentrações sem efeito próprio.

Além disso, estudamos as propriedades elétricas do hipocampo (eletrofisiologia), pois o aprendizado e a memória ocorrem através das modificações das funções sinápticas, em particular envolvendo fenômenos como a potenciação de longa duração na região envolvida com a consolidação do traço de memória.

1.1. MEMÓRIA E APRENDIZAGEM

A memória é uma das funções cognitivas mais complexas que a natureza produziu e as evidências científicas sugerem que o aprendizado de novas informações e o seu armazenamento causem alterações estruturais no sistema nervoso (Reis, 2009).

Grande parte do processo de consolidação da memória ocorre nas primeiras horas após o aprendizado e envolve uma série de mudanças na conectividade sináptica em circuitos locais do hipocampo. Mas a estabilização das informações é um processo mais prolongado, que depende de uma gradual reorganização e progressivamente torna-se independente do hipocampo, passando a ser armazenada difusamente no córtex cerebral, o que é conhecido como consolidação sistêmica da memória (Frankland et al., 2005).

Sempre que nos lembramos de algo, ou seja, evocando uma memória, estamos tendo acesso ao que foi armazenado e, geralmente, adicionam-se novas informações àquela memória: conseqüentemente, trata-se de uma constante reconstrução (Dalmaz & Neto, 2004).

1.2. CLASSIFICAÇÃO DA MEMÓRIA

A memória pode ser classificada em diferentes formas com base nas suas características. Entre as classificações, podemos citar quanto ao tipo, que pode ser

entre declarativa e não-declarativa, ou quanto à duração, que pode ser de trabalho ou imediata, curta duração, longa duração e remota (McGaugh et al., 2000).

1.2.1. MEMÓRIA DECLARATIVA

A memória declarativa, também classificada como explícita, é a capacidade que o indivíduo tem de expressar um fato ou evento. Por isso, ela se subdivide em semântica ou episódica. A memória semântica refere-se a fatos, ou seja, conceitos que aprendemos durante a graduação, ensino médio e fundamental (português, matemática...). Enquanto a memória episódica refere-se a eventos do passado, por exemplo, o dia do seu casamento, o nascimento de um filho. Esse tipo de memória é frequentemente fácil de formar e também de ser esquecida e, geralmente, é disponível para evocação consciente (Agrest, 2001).

Cabe ressaltar que a memória do tipo declarativa depende da integridade do lobo temporal e do diencéfalo (Barense et al., 2010).

1.2.2 MEMÓRIA NÃO-DECLARATIVA

A memória não-declarativa refere-se à capacidade de reter informações que não podem ser verbalizadas. Ela também pode ser chamada de memória de procedimento, ou seja, que armazena informações relacionadas à aquisição de

habilidades, hábitos e comportamentos motores: por exemplo, andar de bicicleta, nadar, tocar um instrumento. A formação de uma memória não-declarativa tende a requerer repetição e prática durante um período mais longo, mas essas memórias têm menor probabilidade de serem esquecidas (Setlow et al, 2000)

A aprendizagem e o armazenamento das memórias de procedimentos do tipo motor dependem das aferências corticais de áreas sensoriais de associação para os núcleos da base, principalmente o estriado (Kreitzer et al, 2008).

De modo a adaptar esse conceito ao uso em animais, que não utilizam a verbalização, hoje emprega-se mais o termo memória implícita para referir-se à memória não-declarativa, e memória explícita como equivalente da memória declarativa (Squire et al.,1987).

1.2.3. MEMÓRIA DE CURTA E LONGA DURAÇÃO

A memória também pode ser classificada de acordo com o tempo em que uma determinada informação fica armazenada.

As memórias de curta duração são memórias que duram segundos ou horas e que estão vulneráveis a perturbações. A memória de longa duração pode ser recordada após dias, meses ou anos depois de serem armazenadas (Izquierdo et al., 1998).

Para armazenar uma informação de longo prazo, é necessária a consolidação das informações (Dudai, 2004). Desde 1893, através de estudos de Ramón & Cajal, postula-se que essa ação obedece a uma certa dinâmica morfológica nas sinapses.

Posteriormente, estudos sugerem que as memórias seriam armazenadas na forma de memória de curta duração e, seletivamente dependendo da importância atribuída à informação, são convertidas em memória de longa duração através da consolidação da memória. Entretanto, a consolidação da memória não requer necessariamente a memória de curto prazo como intermediária. Tanto a memória de curta duração quanto a memória de longa duração podem existir em paralelo (Izquierdo, 1992).

1.2.4. MEMÓRIA DE TRABALHO

A memória de trabalho também é conhecida como memória imediata, onde o armazenamento de uma informação dura poucos segundos. Ela é utilizada em momentos que precisamos reter uma informação por um tempo limitado, por exemplo, repetir o número de telefone para si mesmo até discarmos, sendo que, no momento que falamos ao telefone, esquecemos o número (Cowan, 2008).

Esse tipo de memória não requer um traço de memória estável, ou seja, não necessita da plasticidade sináptica relativamente duradoura para que ocorra a consolidação. A memória de trabalho é processada principalmente no córtex pré-

frontal, cujos neurônios ficam ativados até a resolução do problema para manter o foco da atenção (Izquierdo, 2002).

1.3. AMNÉSIA

É normal esquecermos fatos ou eventos da vida diária. Porém, a amnésia é caracterizada como uma perda da memória e / ou da capacidade de aprender. Após uma alteração cerebral, a perda da memória pode se manifestar de duas formas, que são: amnésia retrógrada e amnésia anterógrada (Squire et al., 1997).

Amnésia retrógrada se refere à perda da memória para eventos antes do trauma. E a amnésia anterógrada é a incapacidade de formar novas memórias declarativas após a alteração cerebral (Milner et al., 2005).

1.4. ESTRUTURAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS COM A MEMÓRIA – ENGRAMA

O engrama é a localização da memória e também é conhecido como traço de memória (Gerber et al., 2004).

Evidências indicam que não existe apenas um *locus* para memória. Desde 1949, Hebb postula que o armazenamento da memória é distribuído em várias regiões do encéfalo (Hebb, 1949).

O lobo temporal medial é uma região importante de armazenamento da memória de longo prazo, pois possui um grupo de estruturas interconectadas que atuam no processamento e da memória declarativa, tais como: hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, córtex perirrinal e córtex para-hipocampal (Eichenbaum, 2004; Pelletier, 2008; Lima, 2009; Ramos, 2008; Alvarez & Squire 1994).

O diencéfalo também está envolvido com a memória e amnésia, principalmente o tálamo (núcleo anterior e dorsomedial) e o hipotálamo (corpos mamilares). Essas estruturas, além de participarem do processamento da memória, atuam na mediação e expressão da emoção (Carvalho-Netto et al., 2010).

Já a amígdala é fundamental para formação de memórias relacionadas com componentes de atenção e emoção (Lazzaro et al., 2010). A área septal medial tem função semelhante a do complexo amigdalóide, ou seja, regulação dos processos emocionais (Elvander et al., 2006).

O hipocampo, a amígdala e o córtex entorrinal são interconectados por vias aferentes e eferentes. O córtex entorrinal tem conexões com o córtex parietal posterior e córtex pré-frontal. Todas essas estruturas desempenham papéis de forma integrada na memória (Quillfeldt et al., 1996; Izquierdo et al., 1997; Lorenzini et al., 1999).

1.4.1. HIPOCAMPO

O hipocampo é uma estrutura localizada no córtex temporal medial e está envolvido, por exemplo, com a formação da memória declarativa. Ele é a principal região em que se formam as memórias complexas e é modulado por muitas estruturas encefálicas, tais como, amígdala, septo medial e núcleo basalis de Meynert.

Uma grande via de entrada de informações no hipocampo é proveniente do córtex entorrinal e a eferência do hipocampo é através do fórnix (Cooper & Lowenstein, 2001).

1.5. POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO – LTP

A eletrofisiologia consiste no estudo das propriedades elétricas em células e tecidos. A base biológica para o aprendizado e a memória ocorre principalmente através das modificações da função sináptica (Wang et al., 2006)

Sabendo que plasticidade é a capacidade do sistema nervoso de alterar o funcionamento do sistema motor e perceptivo baseado nas mudanças ambientais. Então, a plasticidade das funções sinápticas pode acarretar uma potenciação ou depressão de potenciação para uma posterior consolidação da memória (Zhang, 2010).

As informações chegam no hipocampo através do córtex entorrinal, pela via perforante, que faz sinapse com o giro denteado. Os axônios das células granulares do giro denteado formam as fibras musgosas que fazem sinapse com CA3. Em seguida, as células piramidais de CA3 se ramificam e formam feixes de axônios, chamados colateral de Schaffer, que seguem para CA1. Além disso, feixes das células piramidais de CA3 podem deixar o hipocampo através do fórnix (Izquierdo et al., 2002).

Estímulos elétricos na colateral de Schaffer podem provocar uma potenciação de longa duração que pode durar muitas horas, semanas e, acredita-se que até por toda a vida, assim como as memórias declarativas (Miller & Mayford, 1999).

A maioria das sinapses excitatórias cerebrais é glutamatérgica. Existem vários tipos de receptores de glutamato, tais como: AMPA, Cainato, NMDA e metabotrópicos (Genoux & Montgomery, 2007).

Após a liberação de glutamato na fenda sináptica, principalmente os receptores do tipo AMPA são ativados, permitindo a entrada de íons Na^+ , acarretando uma despolarização no neurônio pós-sináptico. A despolarização promove a saída do íon Mg^{+2} dos canais ionotrópicos dos receptores NMDA, que permite a passagem do Ca^{+2} (Burnashev, 1992). O aumento de Ca^{+2} no meio intracelular ativa várias enzimas, tais como: a proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase dependente de Ca^{+2} -calmodulina do tipo 2 (CaMKII). Essas proteínas cinases fosforilam uma série de proteínas; por exemplo, elas podem ativar os receptores AMPA e estimular a inserção desses receptores na membrana pós-sináptica. Esse

mecanismo é fundamental para que ocorra a LTP, um tipo de plasticidade que pode contribuir para a formação de memórias declarativas (Shifman et al., 2006).

Além disso, a proteína cinase A, a qual depende da ativação da adenilato ciclase que cataliza a conversão de ATP em AMPc, fosforila a proteína CREB, que encontra-se no núcleo da célula, a qual ativa vários *loci* gênicos e induz a síntese de RNAm de uma série de proteínas que são usadas posteriormente para constituir novos receptores, o que também contribui para a efetividade da LTP (Wang et al., 2006).

As proteínas cinases contribuem para a manutenção de uma modificação sináptica, mas provavelmente apenas por um tempo, minutos ou horas. Após esse tempo, um dos artefatos para a memória de longa duração é a síntese de novas proteínas que são usadas para organizar novas sinapses e possibilitar a retenção da memória. Por exemplo, a proteína cinase $M\zeta$ (PKM ζ) mantém as memórias através da regulação de GluR2 para ativar receptores AMPA. (Migues et al, 2010).

1.6. SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

A *Cannabis sativa* (maconha ou marijuana), conhecida como cânhamo, é cultivada há mais de cinco mil anos para a produção de cordas e fitas utilizadas na confecção de tecidos. Desde 2600 A.C. essa planta é consumida pelos chineses, para tratar câimbras, dores reumáticas e menstruais (Mechoulam et al, 1986). Anos

mais tarde, seu princípio ativo foi isolado e sua estrutura química pode ser descrita, o tetra-hidrocanabinol (THC) (Gaoni et al, 1964).

Atualmente, inúmeros análogos sintéticos da *C. sativa* são prescritos como antieméticos (para alívio dos sintomas relacionados com o enjôo, as náuseas e os vômitos), estimulantes do apetite aos pacientes com doenças oncológicas e em uso de quimioterápicos. (Aggarwal et al., 2009)

O sistema endocanabinóide é um sistema de sinalização endógena que atua fisiologicamente em várias funções do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), por exemplo, na emoção, controle alimentar, nas funções motoras, entre outros (Ameri, 1999).

O primeiro ligante fisiológico identificado dos receptores canabinóides foi a anandamina, em 1992. Os agonistas endógenos mais estudados são anandamina e 2- araquidonoilglicerol (2-AG).

O primeiro receptor do sistema endocanabinóide a ser identificado foi em 1988 (Devane et al, 1988). Porém, apenas em 1993 ele foi denominado receptor CB1. Em seguida, um outro receptor foi identificado e foi chamado de CB2 (Munro et al, 1993)

Os receptores CB1 e CB2 são do tipo metabotrópicos encontrados no SNC (Howlett et al, 2002), sendo que o mais abundante é o receptor CB1, e estão acoplados a uma proteína Gi/o. Quando o neuromodulador se liga neste receptor, ativa-se a Proteína G. Esta inibe a atividade da adenilato-ciclases e, conseqüentemente, os canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem ficam fechados. Além disso, a proteína G pode ativar a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK),

que atua sobre os canais de K⁺ permitindo sua abertura para o fluxo de íons (McAllister et al, 2002) (Figura 1.1).

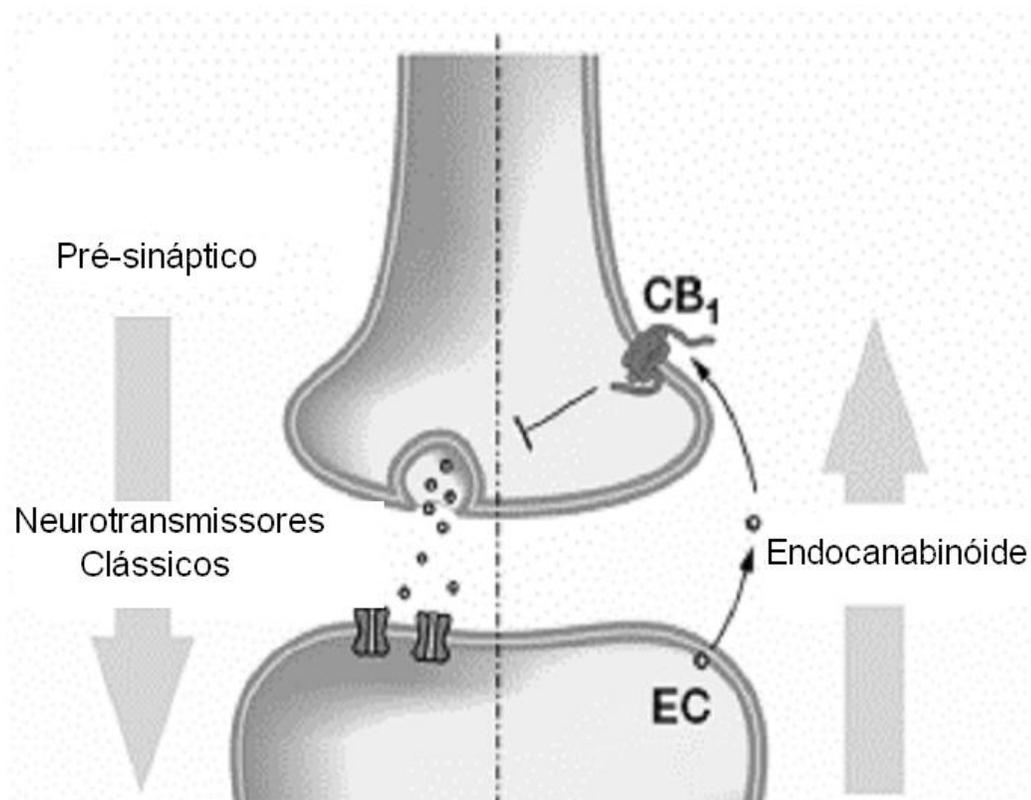


Figura 1.1

Mecanismo de ação do endocanabinóide sobre o receptor CB1

O neuromodulador do tipo endocanabinóide é clivado na membrana pós-sináptica e liberado para o neurônio pré-sináptico. Devido esse fato, os endocanabinóides são denominados mensageiros retrógrados regulando a transmissão sináptica (Wilson & Nicoll, 2002).

Os endocanabinóides são pequenas moléculas lipídicas derivadas de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, principalmente do ácido araquidônico. A anandamida e 2-AG são sintetizados a partir de fosfolipídios de membrana em neurônios pós-sinápticos, sendo o aumento de cálcio intracelular o fator desencadeante, através da ação das enzimas N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) e diacilglicerol lipase (DAG lipase), respectivamente. A hidrolização da anandamida ocorre através das enzimas hidrolase ácida amina graxa (FAAH) e do 2-AG pela monoacilglicerol lipase (MAG Lipase). Os endocanabinóides agem localmente e são produzidos sob demanda (Di Marzo et al, 1998), conforme mostrado na figura 1.2.

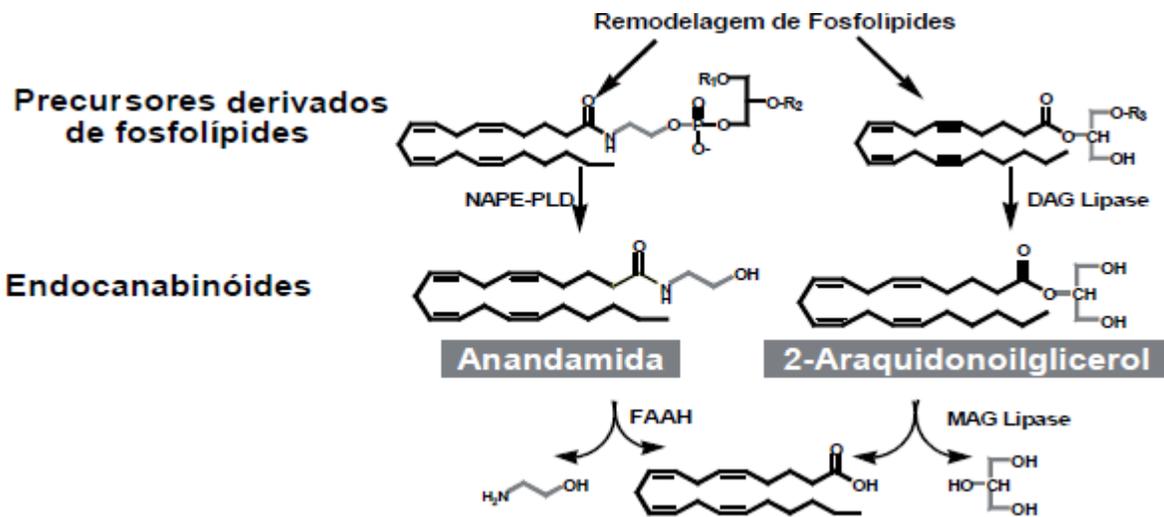


Figura 1.2

Formação e inativação dos endocanabinóide.

1.7. SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E MEMÓRIA

Evidências indicam que o sistema endocanabinóide está envolvido com comportamento. Vários estudos mostram que agonistas de canabinóides comprometem a aprendizagem e a memória (Lichtman et al, 1995; Pamplona & Takahashi, 2006; Abush & Aquirav, 2010).

Pensando sobre o mesmo assunto, mas traçando caminhos diferentes sobre os efeitos de agonistas de canabinóides, nosso grupo postulou que a aprendizagem não segue, necessariamente, esses padrões simples. Principalmente quando os processos de memória emocionais estão envolvidos (por exemplo, o medo), podendo ter um efeito facilitatório sobre a consolidação da memória na tarefa da esquiva inibitória (De Oliveira Alvares et al, 2008). Neste trabalho, a microinfusão do agonista seletivo no hipocampo dorsal anandamida (0,17ng/lado) teve um efeito facilitatório sobre a consolidação da memória. Entretanto, não encontraram efeito sobre a evocação e aquisição da memória na mesma tarefa. Além disso, a micro infusão de antagonista do receptor CB1, AM251 (5,5 ng/lado), provocou um efeito facilitatório sobre a evocação da memória e amnésico sobre a consolidação. Porém, não houve efeito sobre a aquisição da memória (Tabela 1).

Tabela 1

	Aquisição	Consolidação	Evocação
AM251	∅	↓	↑
Anandamida	∅	↑	∅

∅ - Sem efeito

↑ - Efeito facilitatório

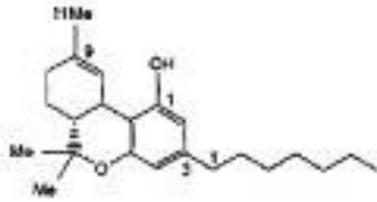
↓ - Efeito amnésico

Outros estudos postulam que administração do agonista de canabinóide induz déficit em várias tarefas dependente de hipocampo, tais como, labirinto radial e aquático (Iwasaki et al., 1992; Lichtman et al., 1995; Ferrari et al., 1999; Varvel et al., 2001; Da Silva & Takahashi, 2002).

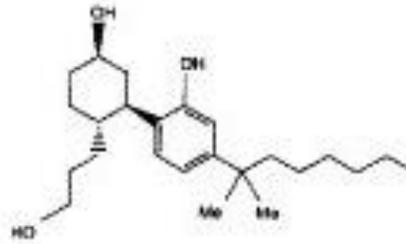
Além disso, microinfusão de agonista de receptor de canabinóide no hipocampo altera o desempenho dos animais no labirinto radial e no labirinto em T (Lichtman et al, 1995; Egashira et al, 2002; Suenega & Ichitani, 2004), sugerindo que os receptores CB1 hipocampais estejam envolvidos com o processamento da aprendizagem e memória.

Na Figura 1.3 podemos observar alguns agonistas e antagonistas do receptor CB1.

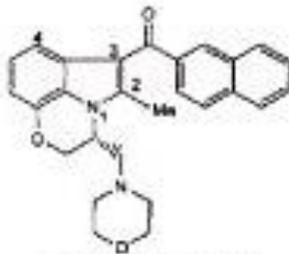
AGONISTAS CANABINÓIDES



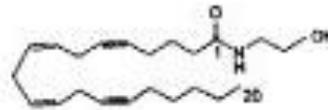
Δ^9 -THC
Clássico



CP 55,940
Não-clássico

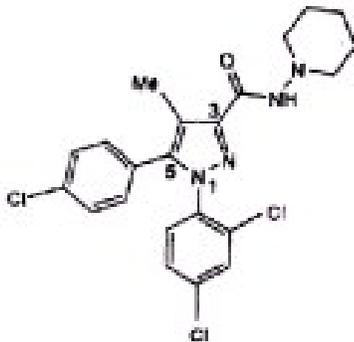


WIN 55,212-2
aminoalquilindol

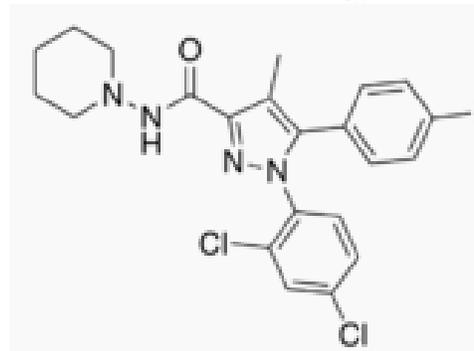


ANANDAMIDE
eicosanóide

ANTAGONISTAS CANABINÓIDES



SR141716A



AM251

Figura 1.3

Agonistas e antagonistas do receptor de endocanabinóides

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi verificar o efeito do agonista CP55,940 sobre os processos de consolidação e evocação da memória aversiva da tarefa de Condicionamento Aversivo Contextual (CAC), bem como seu papel na indução da potenciação de longa duração.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Estudar os efeitos da administração intrahipocampal **pós-treino** de diferentes concentrações de CP55,940 na tarefa de CAC - Condicionamento Aversivo ao Contexto (curva dose-resposta);
- 2.2.2. Estudar os efeitos da administração intrahipocampal **pós-treino** de concentração efetiva de CP55,940 concomitante a uma concentração sem efeito próprio de AM251 na tarefa de CAC;
- 2.2.3. Estudar os efeitos da administração intrahipocampal **pós-treino** CP55,940 em baixas concentrações na tarefa de CAC;
- 2.2.4. Estudar os efeitos da administração intrahipocampal **pré-teste** de CP55,940 na tarefa de CAC (curva dose-resposta);

- 2.2.5. Estudar os efeitos da administração intrahipocampal ***pré-teste*** de concentração efetiva de CP55,940 concomitante a uma concentração sem efeito próprio de AM251 na tarefa de CAC;
- 2.2.6. Estudar os efeitos de CP55,940 sobre a indução e manutenção da Potenciação de longa duração.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS PARA TESTE COMPORTAMENTAL

Foram utilizados ratos Wistar machos com 2 a 3 meses de idade e pesando de 250 a 300 gramas, fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação com Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Campus Centro), transportados e mantidos no Ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC) no Departamento de Biofísica (Campus do Vale).

O ambiente do ratário era climatizado (22-26°C, unidade constante) e submetido a um ciclo de iluminação de 12h claro / 12h escuro (luzes acesas das 6 às 18 h durante todo o ano). Ração padronizada e água fresca eram fornecidas *ad libitum*.

3.2. ANESTESIA

Antes de serem submetidos a um procedimento cirúrgico, os animais receberam anestesia intraperitoneal, com uma combinação de cetamina (Dopalen, da Agribrands) e Xilazina (Anasedan, da Agribrands), numa mistura de 75 e 10mg/Kg, respectivamente.

A cetamina é um anestésico geral de ação rápida produzindo uma profunda analgesia. Enquanto a Xilasina provoca um estado de sedação, analgesia e um acentuado relaxamento muscular.

Depois de confirmada a ausência de resposta a estímulos nociceptivos (perda de sensibilidade), iniciavam-se os procedimentos cirúrgicos.

3.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA COMPORTAMENTO

Após estarem anestesiados, os animais eram tricotomizados, colocados num esterotáxico para ratos (Figura 3.1) e uma incisão a bisturi expunha a calota craniana. Depois da retirada do periósteo, visualizávamos o Bregma, ponto que serve de referência para as coordenadas estereotáxicas adaptadas a partir do atlas de Paxinos & Watson (1997). Cabe ressaltar que essas coordenadas foram confirmadas com a realização de cirurgias-piloto previamente estabelecidas no LPBNC. Para a região hipocampal dorsal as coordenadas utilizadas foram, em centímetros:

ântero-posterior (AP) (posição com relação ao bregma)	- 0,40 cm
látero-lateral (LL) (posição com relação à linha sagital)	+/- 0,30 cm
dorso-ventral (DV) (posição abaixo da dura-máter)	- 0,16 cm

Em seguida, com a utilização de uma broca odontológica, foram realizados orifícios bilaterais nos locais correspondentes às coordenadas AP e LL do hipocampo dorsal.

Cânulas de aço, previamente autoclavadas, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas com calibre 22 e medindo 9 milímetros, eram posicionadas sobre cada orifício presas a uma cânula guia de aço inoxidável (diâmetro externo de 0,7mm, calibre 27 e diâmetro interno de 0,3 mm) que, por sua vez, estava fixada na torre do estereotáxico. Em seguida, as cânulas eram baixadas lentamente através da torre móvel do estereotáxico até encostarem na dura-máter, a partir da qual se calculava a coordenada DV.

Após as cânulas estarem no ponto correto, com a ponta a um milímetro acima da região do hipocampo dorsal, elas eram fixadas no crânio utilizando um acrílico autopolimerizante. Além disso, um parafuso também era colocado em um orifício feito no osso occipital para garantir a permanência do “capacete” na cabeça do animal durante todo o período experimental.

Através das cânulas eram introduzidas agulhas finas (Mizzy) com diâmetro externo de 0,3mm e 1 cm de comprimento, por onde as drogas foram injetadas. A mizzy penetrava 1 mm a mais que a cânula, evitando assim que a droga subisse por capilaridade no espaço entre a mizzy e a cânula, alterando a quantidade de substância administrada na estrutura.

Cada cânula era fixada com acrílico dentário que, quando seco, formava um “capacete” sobre o crânio.



Figura 3.1
Cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas no hipocampo dorsal.

3.3.1. PÓS-OPERATÓRIO: RECUPERAÇÃO DOS ANIMAIS

Imediatamente após a cirurgia, os animais eram colocados em uma caixa de recuperação, onde permaneciam aquecidos por meio de uma lâmpada incandescente vermelha (invisível para os roedores) até despertarem da anestesia. Em seguida, retornavam para a caixa de origem. Após um período de recuperação de 3 a 4 dias, os animais estavam prontos para os procedimentos comportamentais.

3.3.2. TAREFA DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO AO CONTEXTO

A tarefa de condicionamento aversivo (CAC) era realizada numa câmara de observação (29 X 19 X 29 cm³) com duas paredes de chapas galvanizadas, uma de madeira e outra de acrílico permitindo a visualização do animal. O assoalho é formado por barras metálicas, onde é possível a apresentação de choques ao animal. A iluminação era feita com uma lâmpada fluorescente branca (Figura 3.2).

Os animais foram retirados do ratário do LPBNC e colocados numa sala de experimento, também climatizada, por um período de aproximadamente 10 minutos antes de se iniciar o experimento.

Para o treino, o rato era colocado dentro da caixa sobre as barras metálicas e, após 3 minutos de exploração, eram aplicados 2 choques de 0,7 mA (2s). Após 30 segundos, eram aplicados mais 2 choques com o mesmo tempo e intensidade. O rato era retirado quando se completavam os 4 minutos.

O teste geralmente ocorria 24 horas após o treino. O animal foi colocado, novamente, no contexto aversivo por 4 minutos, onde o tempo de congelamento era quantificado.



Figura 3.2
Tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto

3.3.3. PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS

Para investigar tanto a *consolidação* quanto a *evocação* da memória eram infundidos fármacos nos animais, respectivamente, após o teste ou antes do treino. Os animais foram divididos em grupos e receberam infusão bilateral de CP 55940 (0,01µg/µl, 0,1 µg/µl, 1 µg/µl, 5 µg/µl ou 10 µg/µl, Tocris), AM251 (0,2µM ou 1µM, Tocris) ou veículo (DMSO 8% em TFS).

A droga era administrada através de uma microseringa Hamilton de 10µl conectada a uma mangueira de polietileno, onde a sua outra extremidade está conectada a uma agulha muito fina, mizzy.

Após o animal ser imobilizado, posicionava-se a mizzy cuidadosamente através da cânula que estava fixada na cabeça do animal e a injeção era feita pelo sistema propulsor automático que a Hamilton possibilita.

- Volume: 0,50 µl/hora
- Velocidade: 20,0 µl/hora

Completada a infusão de 0,5 µl, aguardava-se alguns segundos antes de se remover a mizzy, para se garantir a absorção/difusão dos fármacos no tecido, evitando o refluxo. Cada operação de injeção foi realizada simultaneamente em ambos os lados.

Dependendo da fase da memória a ser estudada, os fármacos eram administrados em tempos distintos: para avaliar a consolidação da memória, os

fármacos eram administrados imediatamente após o treino; para avaliar a evocação da memória, os fármacos eram administrados 15min antes do teste.

3.3.4. CONTROLE DO POSICIONAMENTO DAS CÂNULAS

No final de cada experimento, os animais eram sacrificados e injetava-se 0,5 µl de azul de metileno em cada uma das cânulas. Depois, os encéfalos eram dissecados e colocados em solução de formaldeído a 10%.

Após a fixação do tecido, cortavam-se os encéfalos e analisavam-se o posicionamento das cânulas. Os animais que apresentaram posicionamentos incorretos das cânulas eram excluídos da análise estatística.

Alguns encéfalos foram dissecados a partir de animais perfundidos intracardiacamente, seccionados em vibrátomo e impregnados com cresil violeta (técnica histológica de Nissl – ver Figura 3.3).

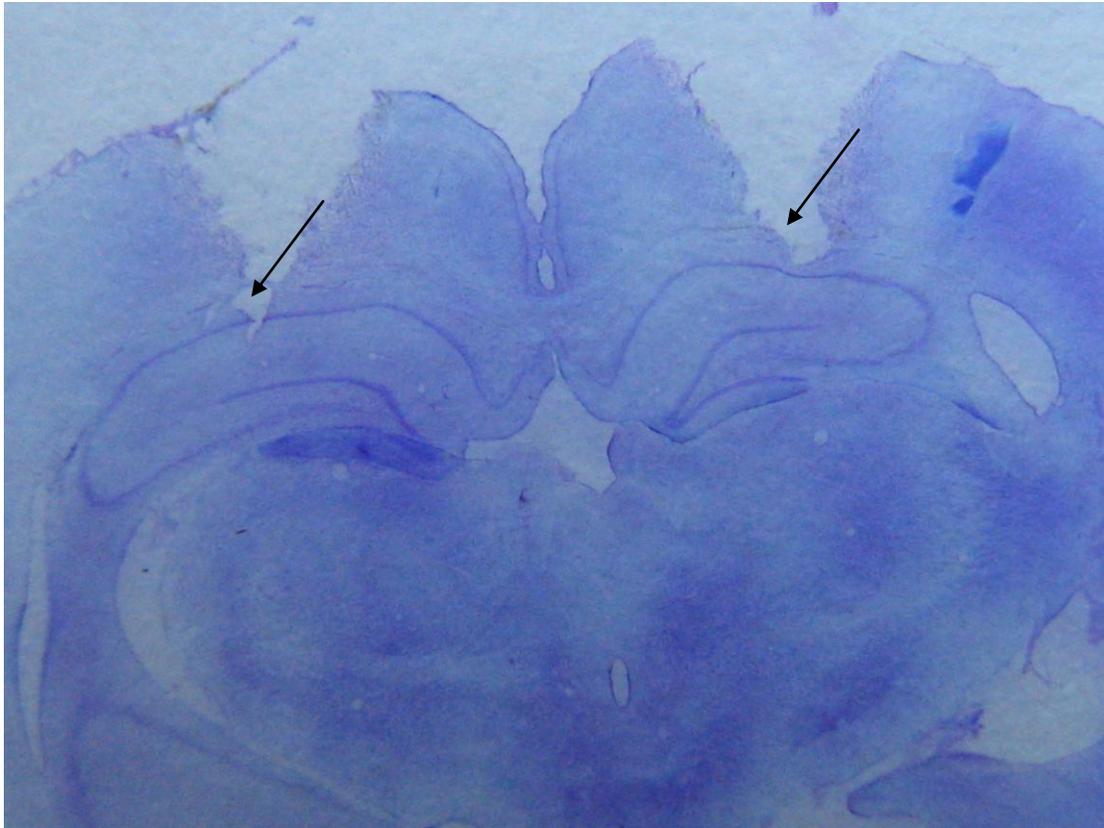


Figura 3.3

Fotografia de corte coronal do cérebro de rato no nível do hipocampo corado pela técnica de Nissl. As setas indicam o posicionamento das cânulas acima do hipocampo dorsal.

3.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados comportamentais (% de tempo de congelamento no CAC) foram inicialmente avaliados para saber se estavam distribuídos normalmente (teste de Kolmogorov-Smirnov com correção Lilliefors, $P < 0,05$): como estavam, foi possível utilizar-se testes estatísticos paramétricos.

A seguir, os dados comportamentais - ou quantidade % de tempo de congelamento - foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de uma via, tendo como fatores os grupos e a sessão (avaliou-se apenas o teste). Os resultados eram, então, ordenados utilizando-se o teste *post hoc* de Tukey para múltiplas comparações com significância $P < 0,05$.

3.4. PROCEDIMENTO ELETROFISIOLÓGICO

3.4.1. ANIMAL

Eram utilizados ratos Wistar machos até 2 meses de idade e pesando de 100 a 150 gramas, fornecidos pelo Instituto de Biologia Celular e Neurociências da Facultad de Medicina da Universidade de Buenos Aires, onde estes experimentos foram realizados.

Os ratos ficavam confinados em gaiolas com no máximo 5 animais e eram limpas 2 vezes por semana. Os animais tinham acesso livre ao alimento.

3.4.2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Imediatamente após o rato ser decapitado, sua cabeça era introduzida no gelo com o focinho para cima para que o sangue escorresse. Em seguida, dissecava-se o encéfalo, que era mergulhado num recipiente com líquido cefalorraquidiano artificial e gás carbogênio (5% CO₂, 95% O₂) para que o sangue fosse lavado.

Cortava-se a parte frontal e cerebelar usando duas lâminas, e cortes coronais de 400µm de espessura eram obtidos no vibrátomo. Após separar-se o hipocampo do encéfalo cuidadosamente com um pincel, o mesmo era incubado em líquido cefalorraquidiano artificial (Selig e Malenka, 1997), borbulhando com gás carbogênio e em temperatura ambiente. (Figura 3.4)

Após duas horas de estabilização o corte era posicionado na câmara de registro, perfundido continuamente com líquido cefalo-raquidiano artificial e posicionavam-se os eletrodos de estímulo e registro no hipocampo.

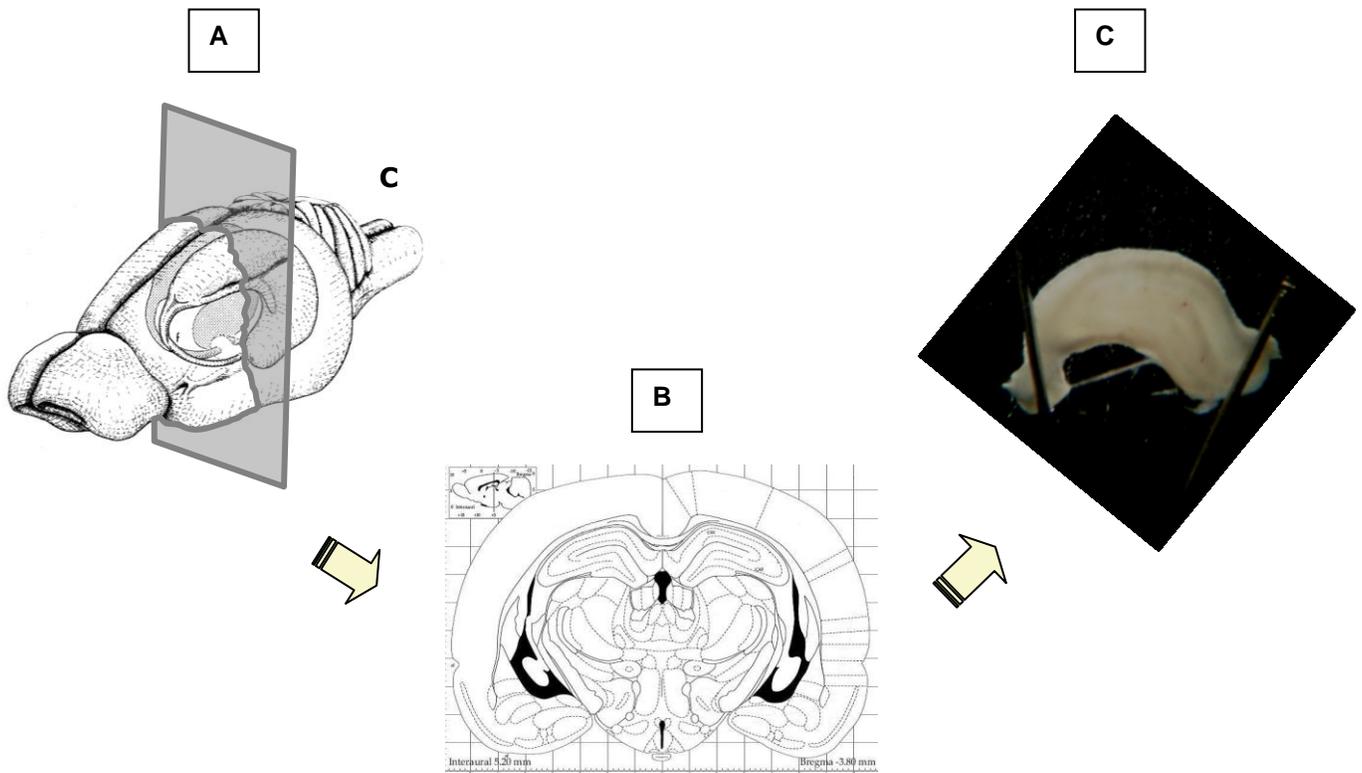


Figura 3.4

(a) Corte do encéfalo para obtenção das fatias de hipocampo. (B) Corte coronal mostrando a estrutura hipocampal. (C) Fatia do hipocampo de 400 μm fixado na câmara de registro.

3.4.3. POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS

Preparação do eletrodo de registro: o capilar de vidro era estirado no puxador de micropipeta (World Precision Instruments, modelo Pul-2). Depois, o líquido cefalorraquidiano artificial era inserido no interior do capilar de vidro. Em seguida, dobra-se cuidadosamente o capilar utilizando a chama de um isqueiro.

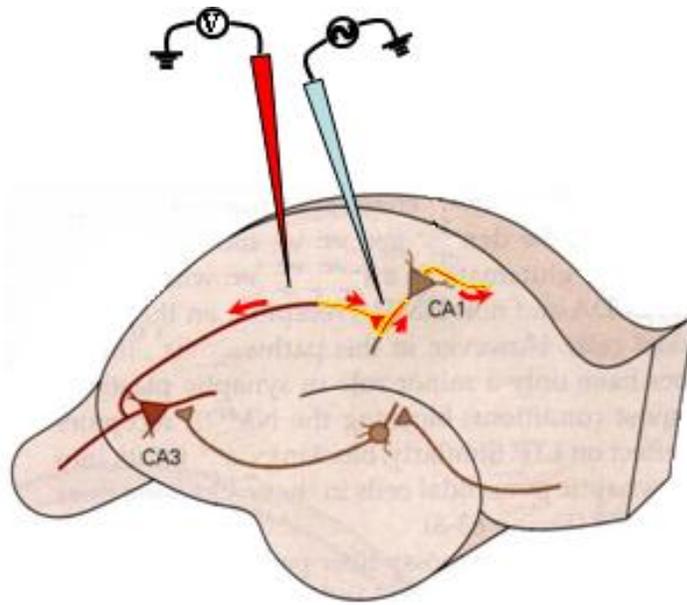
Posicionamento do eletrodo de estímulo (eletrodo bipolar de tungstênio) era nas Colaterais de Schaffer (*stratum radiatum*). (Figura 3.5.A)

O eletrodo de registro (capilar de vidro com resistência de aproximadamente 5MΩ) utilizado para captar os potenciais excitatórios pós- sinápticos (PEPS) de campo era localizado nos dendritos das células piramidais de CA1. (Figura 3.5.A)

Com o eletrodo de estimulação o estímulo era feito com pulso duplo (1-4mA, 50μs cada pulso). A frequência da estimulação utilizada era de 0,033Hz.

Em seguida, ajustávamos o tempo entre os pulsos buscando uma máxima facilitação por duplo-pulso. Essa facilitação consiste num aumento da resposta do segundo pulso em relação ao primeiro, devido a uma maior concentração de Ca²⁺ na região pré-sináptica em resposta a um pulso prévio, ou seja, o segundo aumento de Ca²⁺ é adicionado ao restante do primeiro permitindo a facilitação (Figura 3.5.B). Este protocolo de duplo pulso permite avaliar os eventuais efeitos pré-sináptica da droga a ser testada (Lynch e Schubert, 1980; Auerbach e Segal, 1996; 1997).

A



B

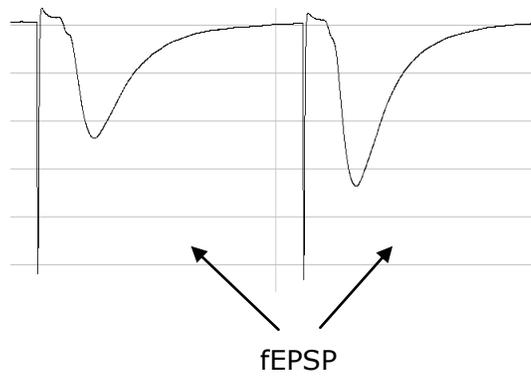


Figura 3.5

(A) Esquema da posição dos eletrodos: eletrodo de estímulo (vermelho) na colateral de Schaffer e de registro (azul) em CA1. (B) Exemplo de registro correspondente ao eletrodo azul, observa-se o aumento da amplitude do segundo pulso (facilitação por duplo-pulso)

3.4.4. INDUÇÃO DA POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (LTP)

Para a indução da LTP, utilizamos a estimulação do tipo teta (3 trens separados por 10 segundos, cada um com 25 rajadas a 5Hz de 4 pulsos cada um a 100hz) (Hernandez et al., 2005), que é um protocolo que simula os ritmos que aparecem espontaneamente no hipocampo quando se expõe o animal a uma tarefa comportamental, por exemplo, reconhecimento espacial (Buzsaki, 2002; O'Keefe, 1993) e, portanto, tem maior similaridade com os processos fisiológicos (Figura 3.6).

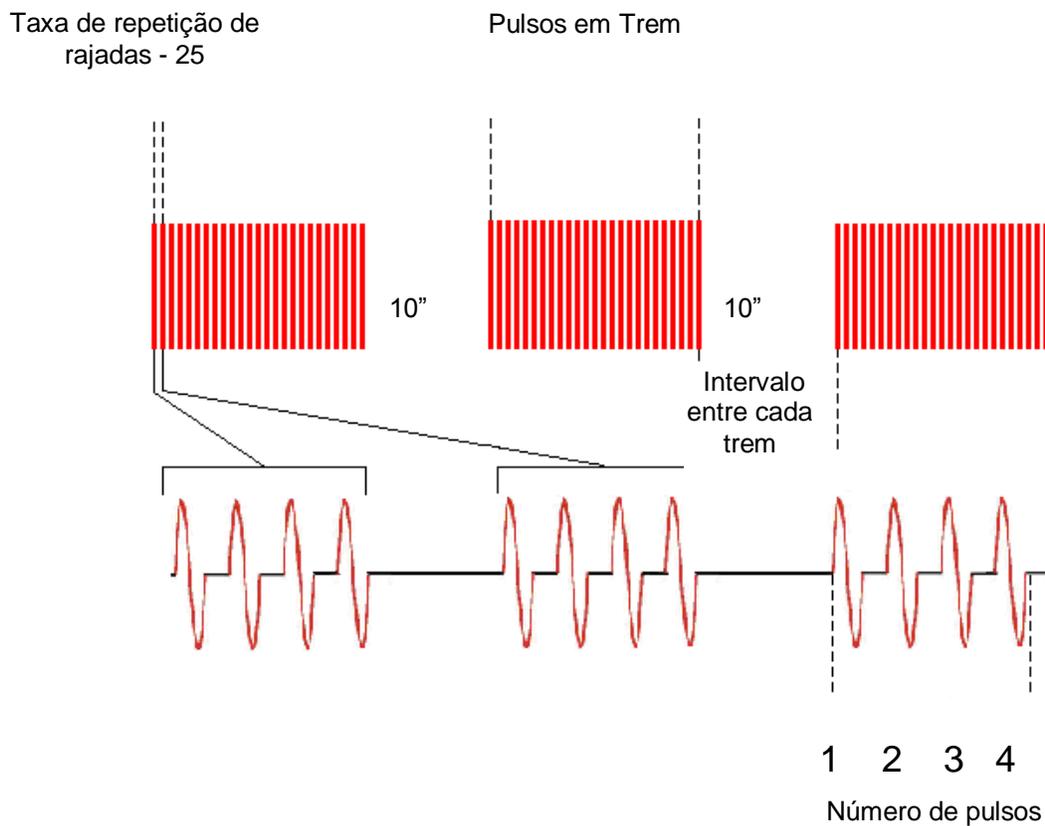


Figura 3.6
Esquema de indução da LTP

3.4.5. PREPARAÇÃO DOS FÁRMACOS

Utilizamos a mesma concentração de CP 55940 5µg/µl, diluída para chegar a 10µM em 20 ml de tampão (líquido cefalorraquidiano artificial). Esta foi a concentração utilizada para perfundir os cortes de hipocampo.

3.4.6. ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA

Para a análise eletrofisiológica utilizamos o programa WinLTP: trata-se de um programa de estimulação, aquisição e análise dos registros eletrofisiológicos de Potenciação de Longa Duração (PLD) e Depressão de Longa Duração (DLD) disponível em <http://www.ltp-program.com/indexWinLTP.htm>.

Para este trabalho analisamos a inclinação (*slope*) e a amplitude do primeiro pulso.

3.4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística dos resultados eletrofisiológicos, os dados foram previamente avaliados como paramétricos (teste de Kolmogorov-Smirnov com correção Lilliefors, $P < 0,05$), e, então, analisados mediante o teste *t* de Student para amostras independentes com significância $P < 0,05$.

3.5. APROVAÇÃO DO PROJETO E CONSIDERAÇÕES BIOÉTICAS

Este trabalho é parte do Projeto registrado no *Sistema Pesquisa* da UFRGS sob o Nº 17.862, intitulado “*Modulações convergentes endocanabinóide (CB1) e muscarínica colinérgica M4 em diferentes fases do processamento de memórias aversivas em ratos: interações, dependência do estresse e plasticidade sináptica*”, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS). Seus aspectos éticos e metodológicos, às Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente à Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da administração intrahipocampal bilateral pós-treino de CP55,940 em diferentes concentrações na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.

Animais foram infundidos na região dorsal do hipocampo, imediatamente após o treino, com o CP55,940 inicialmente nas seguintes concentrações: 0,01µg/µl, 0,1µg/µl, 1µg/µl, 5µg/µl e 10µg/µl. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(4,46)=4,021$, $P= 0,007$, com $N = 10, 10, 10, 12$ e 9 , respectivamente). Ver Figura 4.1.

O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferença significativa apenas na concentração de 5µg/µl comparado com o grupo controle ($P=0,006$).

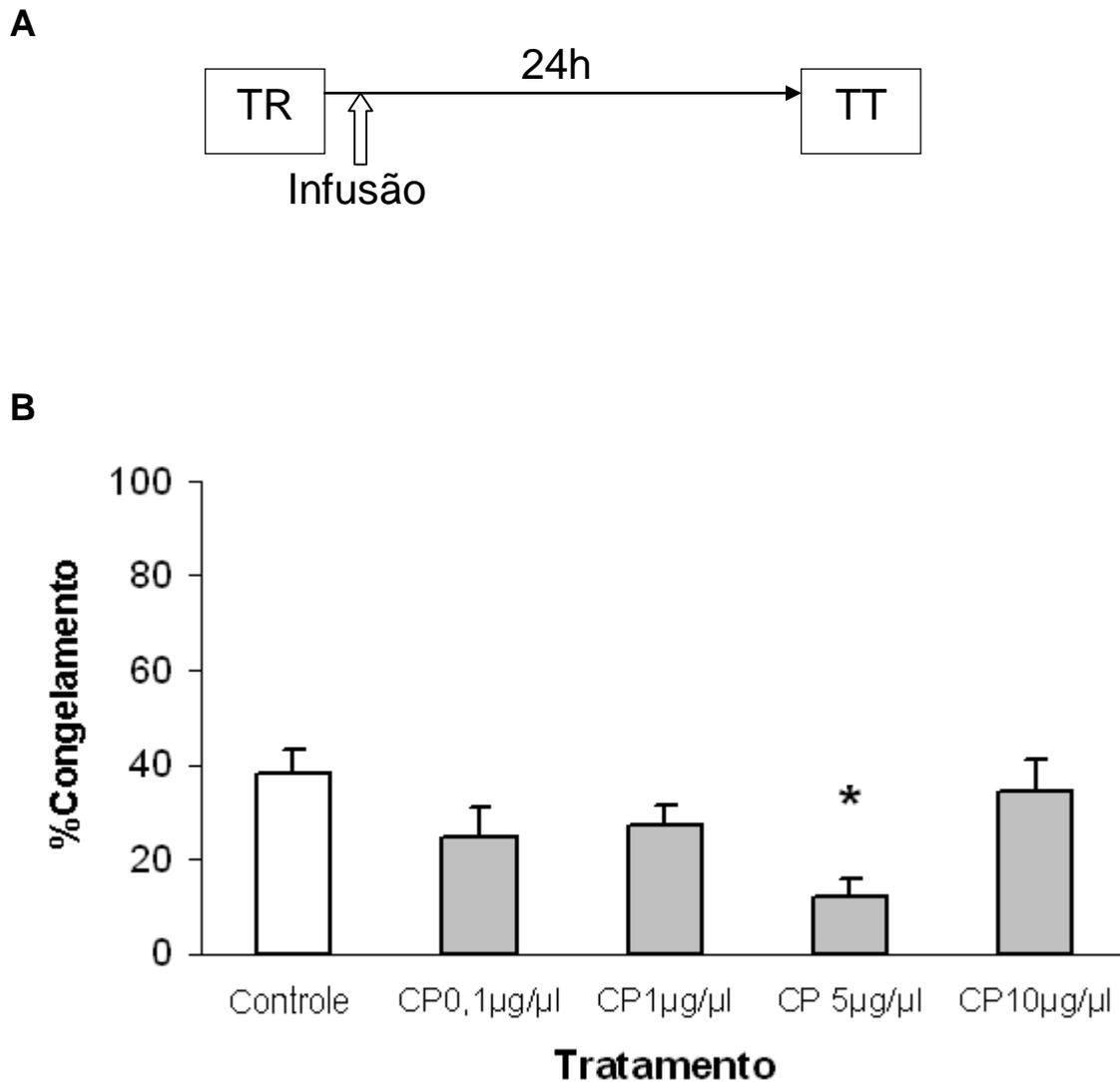


Figura 4.1

Efeito da infusão bilateral intrahipocampal imediatamente após o treino de CP55,940 na tarefa de Condicionamento aversivo ao contexto. (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Percentual de *freezing* (resposta de congelamento) na sessão de teste dos diferentes grupos experimentais: Veículo (n=10), CP 0,1µg/µl (n=10), CP 1µg/µl (n=10), CP 5µg/µl (12), e 10µg/µl (9). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste *post hoc* de Tukey, $P < 0,05$)

4.2. Efeito da administração intrahipocampal bilateral pós-treino de CP55,940, sem e com infusão concomitante de AM251 0,2 μ M na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.

Os animais foram infundidos na região dorsal do hipocampo, imediatamente após o treino, com o CP55,940 na concentrações de 5 μ g/ μ l, ou CP55,940 5 μ g/ μ l concomitante com 0,2 μ M do antagonista CB1 AM251. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,18)=4,421$, $P= 0,027$, com $N =7, 6$ e 8 , respectivamente). Ver Figura 4.2.

O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferença estatisticamente significativa entre o CP 55940 na concentração de 5 μ g/ μ l com o grupo controle ($P=0,022$).

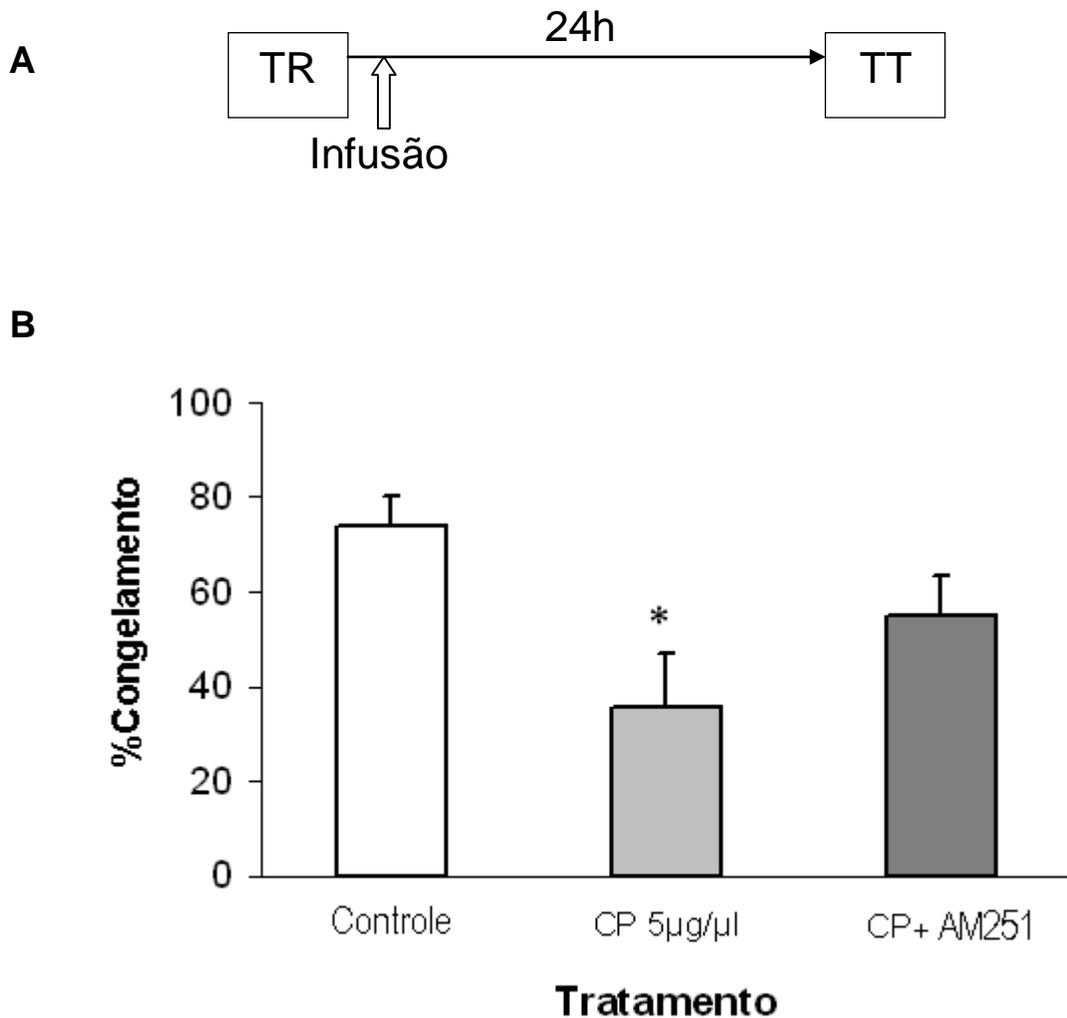


Figura 4.2

Efeito da infusão bilateral intrahipocampal imediatamente após o treino de CP55,940 ou CP55,940 + AM251 na tarefa de Condicionamento aversivo ao contexto. (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Percentual de *freezing* (resposta de congelamento) na sessão de teste dos diferentes grupos experimentais: Veículo (n=7), CP 5µg/µl (6), e CP 5µg/µl +AM251 0,2µM (8). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste *post hoc* de Tukey, P<0,05)

4.3. Efeitos da administração intrahipocampal bilateral pós-treino de várias concentrações baixas de CP55,940 na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.

Para saber se concentrações ainda menores de nosso agonista produzem algum efeito (por exemplo, facilitatório) não observado com as concentrações “maiores” empregadas no experimento 4.1 – a exemplo do efeito facilitatório registrado previamente por nosso grupo com a infusão de baixas concentrações do agonista Anandamida (De Oliveira Alvares et al., 2008) - os animais foram infundidos na região dorsal do hipocampo, imediatamente após o treino, com CP55,940 nas seguintes concentrações: 0,1ng/μl, 1ng/μl e 10ng/μl. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(3,26)=0,081$, $P= 0,970$, com $N =9, 7, 8$ e 6 , respectivamente). Ver Figura 4.3.

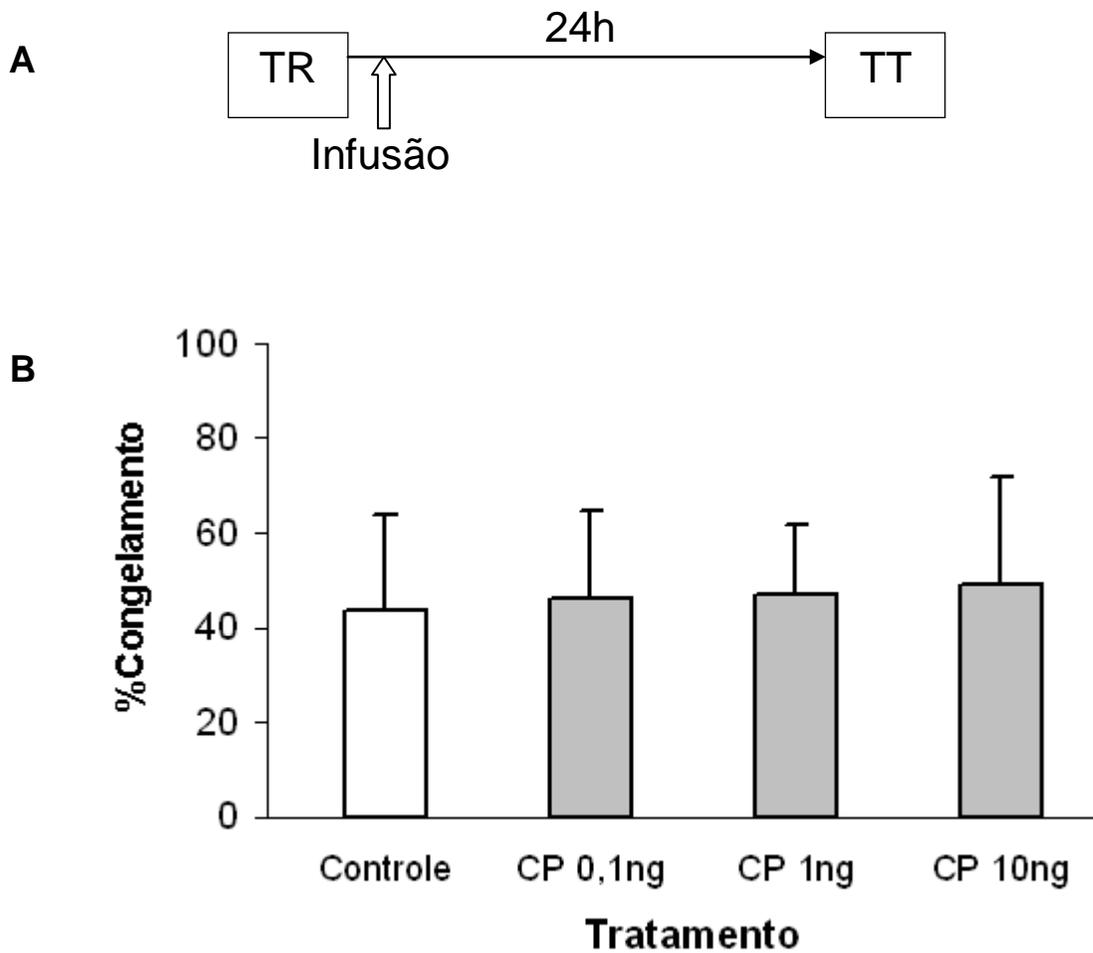


Figura 4.3

Efeito da infusão bilateral intrahipocampal imediatamente após o treino de CP55,940 na tarefa de Condicionamento aversivo ao contexto. (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Percentual de *freezing* (resposta de congelamento) na sessão de teste dos diferentes grupos experimentais: Veículo (n=9), 0,1ng/ μ l (n=7), 1ng/ μ l (8) e 10ng/ μ l (6). Não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA de 1 via, $P=0,970$).

4.4. Efeito da administração intrahipocampal bilateral pré-teste de CP55,940 em diferentes concentrações na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.

Animais foram infundidos na região dorsal do hipocampo, 15min antes do teste, com o CP55,940 nas seguintes concentrações: 0,1µg/µl, 1µg/µl e 5µg/µl. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(3,26)=7,838$, $P= 0,001$, com $N =7, 7, 8$ e 8 , respectivamente). Ver Figura 4.4.

O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferença significativa de cada concentração de CP55,940 com relação ao grupo controle: CP 0,1µg/µl ($P=0,002$), CP 1µg/µl ($P=0,015$) e CP 5µg/µl ($P=0,001$).

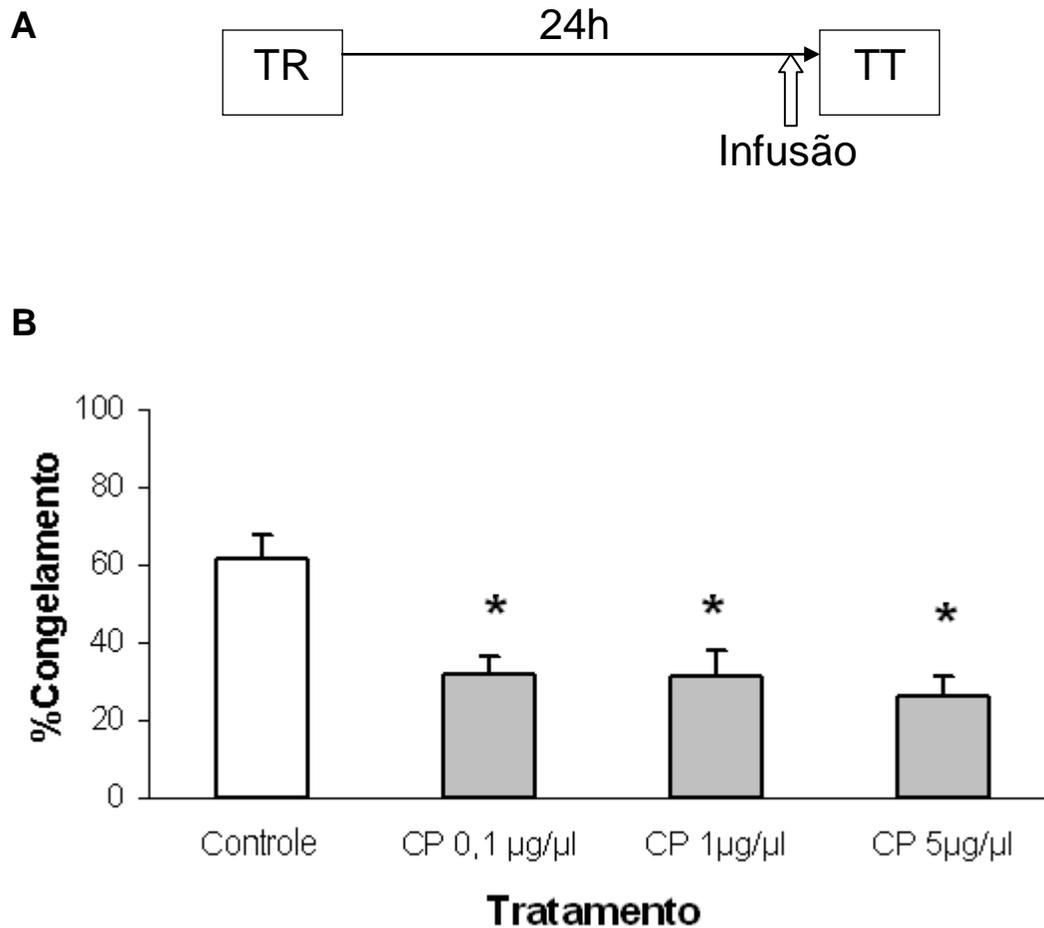


Figura 4.4

Efeito da infusão bilateral intrahipocampal 15min pré-teste de CP55,940 na tarefa de Condicionamento aversivo ao contexto. (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Percentual de *freezing* (resposta de congelamento) na sessão de teste dos diferentes grupos experimentais: veículo (n=7), 0,1µg/µl (n=7), 1µg/µl (8) e 5µg/µl (8). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste *post hoc* de Tukey, P<0,05)

4.5. Efeitos da administração intrahipocampal bilateral pré-teste de CP55,940, sem e com infusão concomitante de AM251 0,2 μ M na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.

Animais foram infundidos na região dorsal do hipocampo, 15min antes do teste, com o CP55,940 na concentrações de 5 μ g/ μ l, ou CP55,940 5 μ g/ μ l concomitante com **0,2 μ M** do antagonista CB1 AM251. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,19)=5,201$, $P= 0,016$, com $N =7, 7$ e 8 , respectivamente). Ver Figura 4.5.

O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferença estatisticamente significativa, com relação ao grupo controle, tanto do grupo CP55,940 5 μ g/ μ l ($P=0,035$) quanto o grupo CP 5 + AM251 0,2 μ M ($P=0,024$).

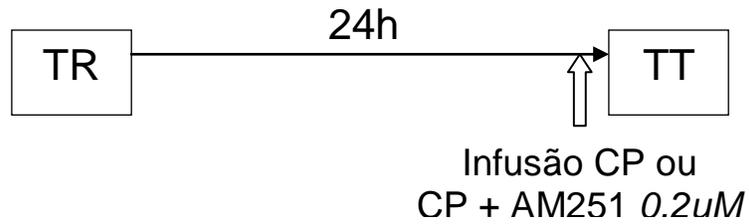
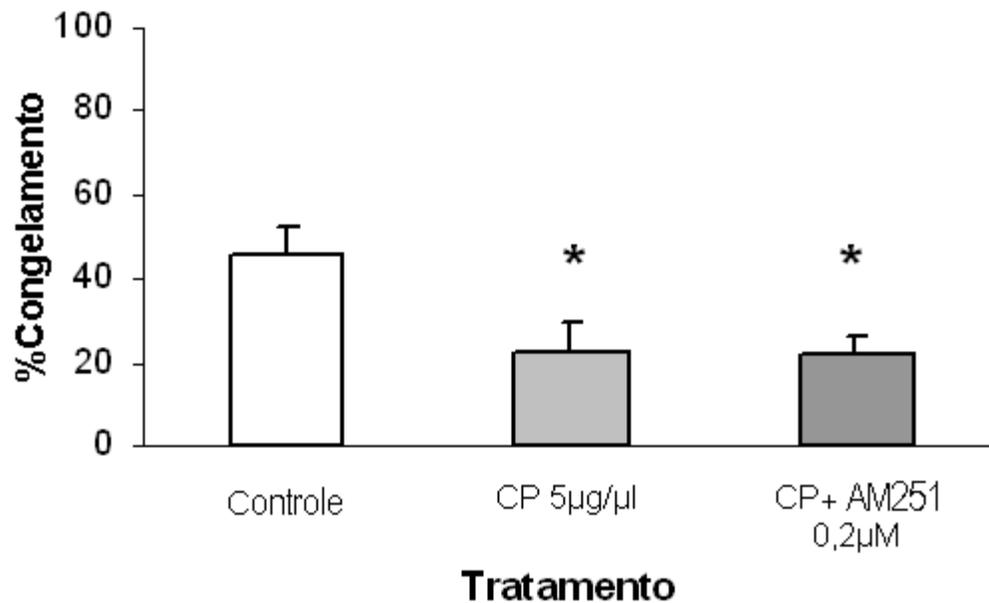
A**B**

Figura 4.5

Efeito da infusão bilateral intrahipocampal 15min pré-teste de CP55,94 ou CP55,940 + AM251 na tarefa de Condicionamento aversivo ao contexto. (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Percentual de *freezing* (resposta de congelamento) na sessão de teste dos diferentes grupos experimentais: Veículo (n=7), CP 5µg/µl (7), e CP 5µg/µl +AM251 **0,2µM** (8). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste *post hoc* de Tukey, P<0,05)

4.6. Efeitos da administração intrahipocampal bilateral pré-teste de CP55,940, sem e com infusão concomitante de AM251 1,0 μ M na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.

Animais foram infundidos na região dorsal do hipocampo, 15min antes do teste, com o CP55,940 na concentrações de 5 μ g/ μ l, ou CP55,940 5 μ g/ μ l concomitante com concentração mais alta (**1,0 μ M**) do antagonista CB1 AM251 para ver se assim revertíamos o efeito da CP. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,18)=4,504$ $P= 0,026$, com $N =7, 8$ e 6 , respectivamente). Ver Figura 4.6.

O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferença estatisticamente significativa do grupo CP55,940 5 μ g/ μ l com relação ao grupo controle ($P=0,031$), enquanto que o grupo CP 5 + AM251 0,2 μ M teve apenas *tendência* a diferir ($P=0,076$).

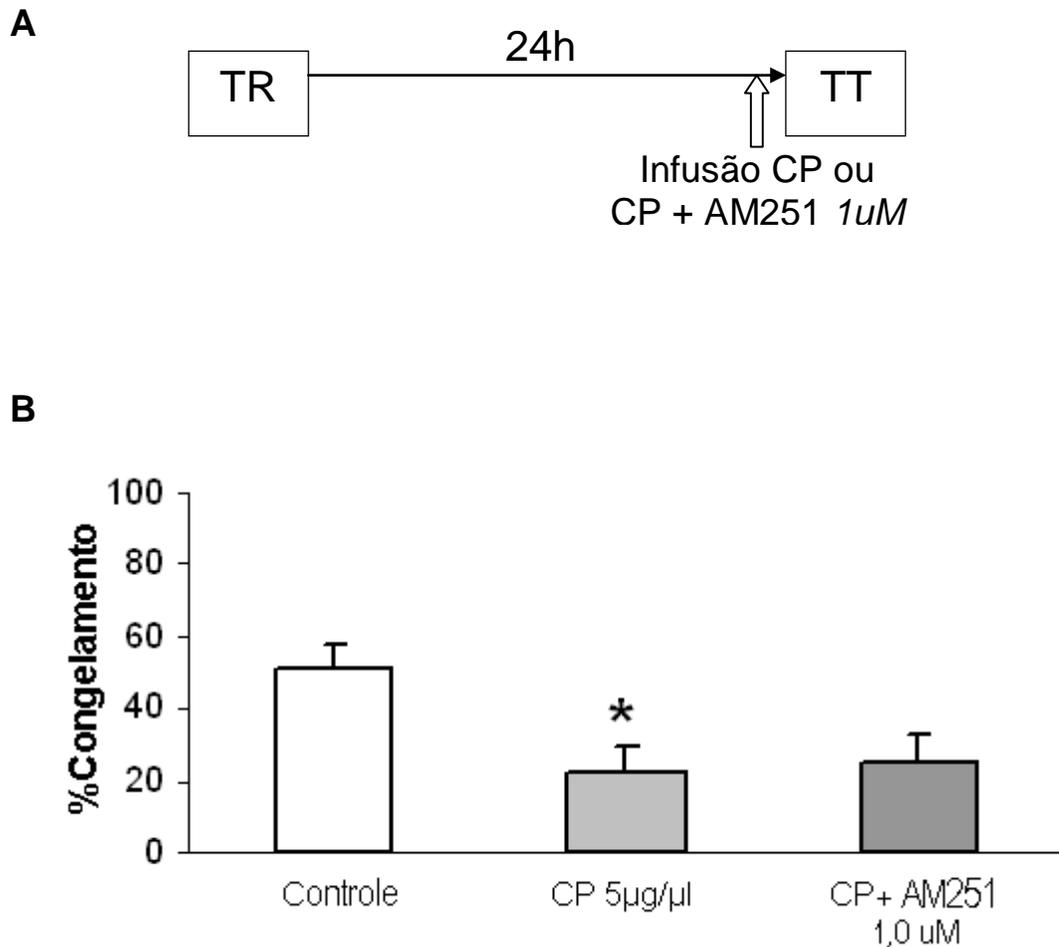


Figura 4.6

Efeito da infusão bilateral intrahipocampal 15min pré-teste de CP55,94 ou CP55,940 + AM251 na tarefa de Condicionamento aversivo ao contexto. (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Percentual de *freezing* (resposta de congelamento) na sessão de teste dos diferentes grupos experimentais: Veículo (n=7), CP 5µg/µl (8), e CP 5µg/µl +AM251 **1,0µM** (6). (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste *post hoc* de Tukey, P<0,05)

4.7. Efeitos do CP55,940 sobre a indução e manutenção da Potenciação de Longa Duração após estímulo *Teta* em fatia de hipocampo dorsal

Os resultados obtidos na eletrofisiologia encontram-se nas figuras 4.7A e 4.7B.

Na figura 4.7A observamos os Potenciais Excitatórios Pós-Sinápticos de Campo (*PEPSc*) dos primeiros pulsos variando com o tempo e mostrados 5 minutos antes, 25 minutos durante e 60 minutos depois da administração da droga (linha horizontal). O CP55,940 em concentração equivalente aos 5µg/µl das infusões intra-hipocampais (experimentos 4.1-6) foi preparado a 10 µM em 20ml de tampão, solução utilizada para perfundir o corte na câmara de registro. Após a aplicação do protocolo de indução da PLD (seta vertical), percebe-se redução da magnitude da indução da PLD apresentando uma diferença estatisticamente significativa nos últimos 5 minutos ($P=0,031$, teste t de Student).

O histograma da Figura 4.7B ilustra de forma simplificada a diferença no nível dos *PEPSc* ($P=0,031$ pelo teste t de Student) nos últimos 5 minutos do registro entre os grupos controle e tratado.

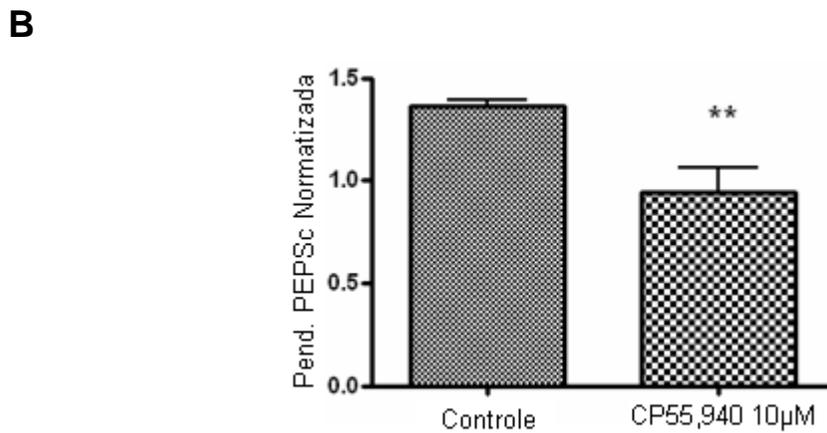
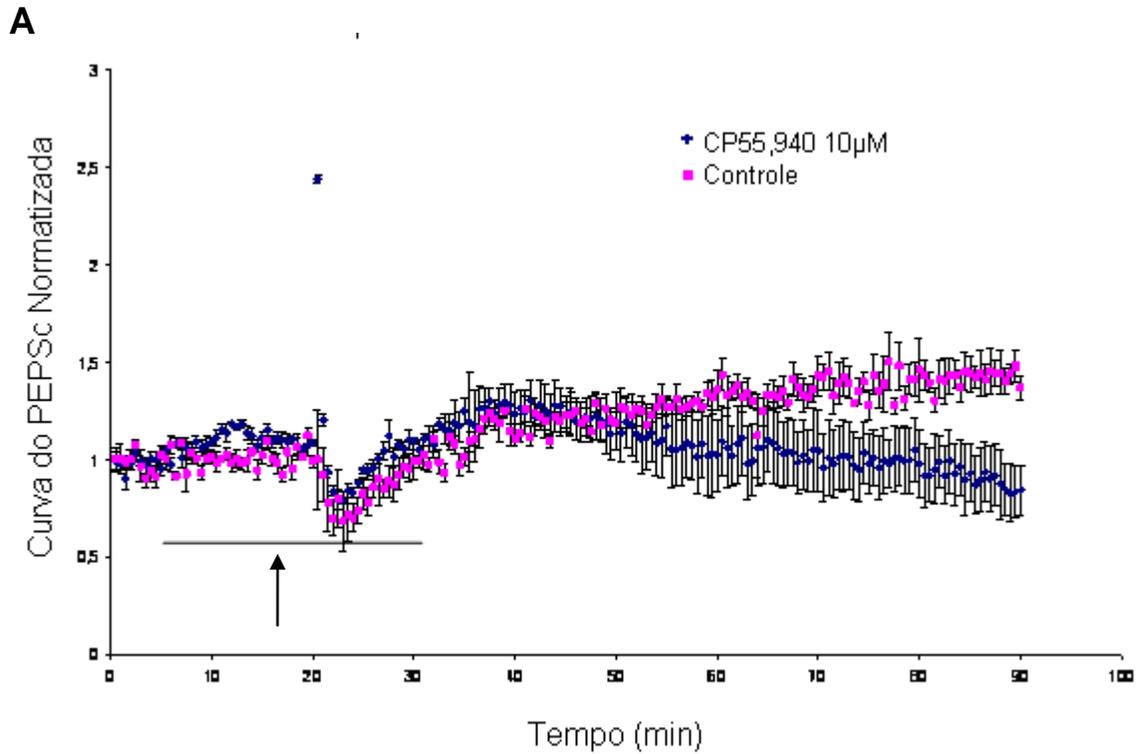


Figura 4.7

(A) Curso temporal das curvas de potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo (PEPSc) no primeiro pulso, antes, durante e depois da administração do agonista CP55,940 (linha horizontal), em função da aplicação de protocolo de indução de PLD (estimulação em ritmo Teta –TBS: *theta burst stimulation* - flecha vertical). Grupos Controle (N=6) e CP55,940 (N=4). (B) Média das curvas normalizadas dos 5 últimos minutos com relação ao primeiro pulso: diferença significativa pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos da CP55,940 sobre a consolidação da memória

Os resultados mostrados nas Figuras 4.1 a 4.7 sugerem que o CP55,940, um potente agonista não-seletivo do receptor CB1 (Gatley, 1997; Thomas, 1998; Ryberg, 2007) consideravelmente mais potente que Δ^9 -THC em testes comportamentais e em ensaios de ligação ao receptor, quando administrado no hipocampo dorsal, é capaz de (a) bloquear a consolidação (Figuras 4.1 e 4.2) e (b) a evocação (Figuras 4.4 e 4.5). A infusão de concentração sem efeito próprio de AM251 concomitantemente ao CP55,940 reverteu o efeito amnésico deste agonista em ambos os casos (Figuras 4.2 e 4.5), sugerindo que sua ação se deva especificamente aos receptores CB1.

O efeito amnésico pela estimulação dos receptores CB1 hipocampais sugere que estes atuem modulando negativamente em ambas etapas do processamento da memória da tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto em ratos, mas isso precisa ser analisado em comparação com outros estudos (inclusive nossos, anteriores) utilizando outros agonistas.

Assim, vemos, na figura 4.1, a curva dose-resposta do CP55,940, na qual a concentração de 5 μ g/ μ l microinjetada depois do teste provocou uma amnésia nos animais, prejudicando a **consolidação** da memória da CAC. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados em outros laboratórios, os quais

encontram um efeito amnésico pós-treino com administração de agonistas canabinóides em diferentes tarefas (Iwasaki et al., 1992; Lichtman et al., 1995; Ferrari et al., 1999; Varvel et al., 2001; Da Silva & Takahashi, 2002; Suenega & Ichitani, 2004), inclusive pouco aversivas, como o reconhecimento de objetos, onde a administração do agonista WIN-55,212-2 (1–10 nmol/lado) – mais seletivo aos receptores CB1 - no hipocampo dorsal prejudicou a consolidação da memória (Clarke, 2008).

Vários desses estudos, porém, foram feitos com infusão sistêmica, o que dificulta entender especificamente o papel do hipocampo na mediação dessa etapa do processamento da memória, como é o caso do estudo com ratos tratados pós-treino com 0,1 mg/kg i.p. do agonista CB1 HU-210 (ou 3-(1,1-dimetilheptil)-(-)-11-hidroxi-8-tetrahydrocannabinol), na mesma tarefa de CAC: também neste caso, porém, verificou-se uma amnésia, efeito que foi revertido com a infusão concomitante do antagonista AM251 (3 mg/kg, i.p. - MacKowiak et al., 2009).

Por outro lado, este achado *aparentemente contradiz* resultados anteriores de nosso laboratório empregando outro agonista, a anandamida, quando uma concentração baixa desse fármaco (0,17ng/lado), infundida imediatamente após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória, promoveu um efeito *facilitatório*. Naquele caso, utilizamos uma concentração baixa porque concentrações altas de um agonista pouco seletivo poderiam causar ações inespecíficas, com a droga atuando sobre outros alvos moleculares, e, assim, acarretando efeitos

inesperados. Esse mesmo raciocínio nos fez suspeitar que a concentração de CP55,940 que estávamos utilizando talvez fosse muito alta, de modo que resolvemos estender nossa curva dose-resposta para concentrações cada vez menores. A Figura 4.3 mostra essa varredura de baixas concentrações, onde, porém, não achamos nenhum efeito.

Cabe ressaltar que a anandamida tem um perfil farmacológico bem diferente da CP55,940, pois é ainda menos seletiva pelos receptores CB1 que esta: além de ser agonista do receptor CB1 é um agonista pouco seletivo dos receptores baunilhóides (*vanilloid*) do tipo TRPV1 (Soneji et al., 2010), NMDA (Hampson, 1998) e muscarínico (Christopoulos & Wilson, 2001; Goonawardena, 2010), entre outras ações. Assim sendo, a inespecificidade da anandamida não suporta facilmente uma conclusão mais generalizada acerca dos efeitos de agonistas, e nossos achados confirmam isso (Figuras 4.1-2). Como o efeito amnésico pós-treino da CP55,940 sobre a CAC na concentração de 5µg/µl foi revertido (Figura 4.2) pela infusão concomitantemente do antagonista seletivo CB1 AM251 em concentração sem efeito próprio (0,2µM), somos levados a pensar que a diferença entre esses resultados se deva antes à inespecificidade da anandamida do que a alguma característica particular da CP55,940, mesmo que esta droga também não seja muito seletiva (De Oliveira Alvares et al., 2008).

A propósito, Lichtman et al. (1995) observaram déficits de memória no labirinto radial de 8 braços com a infusão da mesma CP55,940, mas não com anandamida, em estrita coincidência com o conjunto dos achados de nosso

laboratório: a diferença é que, neste estudo, investigou-se memória de trabalho, e não memória explícita de longo prazo, como é o caso da CAC.

Em nossos estudos anteriores o *antagonista* CB1 AM251 (na concentração de 5,5 ng/lado) foi claramente amnésico quando administrado pós-treino no hipocampo (De Oliveira Alvares *et al.*, 2005, 2006, 2008), o que, ademais, era consistente com o efeito que observamos de inibição da indução da LTP em fatias do hipocampo perfundidas com 0,2 μ M de AM251 (De Oliveira Alvares *et al.*, 2006). Apesar de serem tarefas diferentes - esQUIVA inibitória com descida da plataforma *versus* CAC - não sabemos explicar como é possível obter-se um *mesmo* efeito farmacológico-comportamental, a amnésia, tanto com um antagonista seletivo CB1 quanto com um agonista que parece estar atuando através desses mesmos receptores. Uma possibilidade pode residir no fato de a AM251 poder ser antes um agonista-inverso que um antagonista puro e simples, a exemplo de seu análogo SR141716A (Landsman *et al.*, 1997; Pertwee, 2005), causando efeitos próprios ao invés de apenas bloquear farmacologicamente a ligação dos endocanabinóides liberados naquelas sinapses. Outra, mais plausível, pode residir na própria inespecificidade da CP55,940.

Sabe-se que a CP55,940 é um potente agonista para os receptores CB1, CB2 e moderado para GPR55 (Ryberg E, 2007). Já é conhecida a existência dos receptores CB1 no hipocampo. Porém, recentes estudos indicam a existência de receptor CB2 no hipocampo (Brusco, *et al.*, 2008A e 2008B, Ankur, 2009). Além disso, investigaram a existência de outro receptor transmembrana acoplado a

PTNG, sendo classificado como um terceiro receptor para endocanabinóide, GPR55.

No método *Northern blot*, detectaram RNAm de receptor GPR55 em encéfalos humano nos núcleos caudado e putamêm. Porém, não havia nenhuma evidência de expressão no hipocampo, tálamo, ponte, córtex frontal e cerebelo. A análise *in situ* de GPR55 em encéfalos de ratos encontraram em vasta expressão de RNAm no hipocampo, alguns núcleos talâmicos e regiões do mesencéfalo. (Sawzdargo, 1999).

Com isso, percebe-se que a microinfusão de CP55,940 no hipocampo dorsal de ratos ativa receptores CB1, CB2 e provavelmente GRP55, provocando um efeito característico de déficit na consolidação e evocação da memória. Entretanto, realizamos a micro infusão de CP55,940 concomitante com AM251 sabendo que este é antagonista do receptor CB1, mas agonista do receptor GPR55 (Pertwee R, 2007). Então, o CP55,940, quando bloqueado pelo AM251, continuou modulando os receptores CB2 e, provavelmente, o GPR55 permanecendo um efeito amnésico sobre a evocação da memória. Essa é uma das hipóteses do porque o AM251 não seja capaz de reverter o efeito amnésico. (Figura 4.5)

5.2. Efeitos da CP55,940 sobre a Evocação da memória

A seguir, realizamos o estudo dos efeitos sobre a **evocação** da memória da CAC: a figura 4.4 mostra que a CP55,940, quando administrada pré-treino no hipocampo dorsal de rato, alterou a evocação da memória na tarefa de CAC da mesma forma que o fizera pós-treino, ou seja, prejudicando-a. O efeito amnésico - resposta diminuída em comparação ao grupo controle - foi estatisticamente significativo em todas as diferentes concentrações estudadas (0,1µg/µl, 1µg/µl e 5µg/µl).

Como a tentativa de reverter o efeito da concentração mais alta de CP55,940 (5µg/µl) com a infusão concomitante de 0,2µM de AM251 não funcionou (Figura 4.5), aumentamos a concentração do antagonista para 1µM, o que finalmente funcionou (Figura 4.6). Neste ponto, esses experimentos ainda não estão completos para publicação, pois deveríamos ter tentado reverter a concentração mais baixa de CP55,940, que já era amnésica (0,1µg/µl), contornando o problema de sua baixa seletividade (*o que está sendo feito em paralelo com a apresentação desta dissertação*). Mesmo assim, o fato de 0,2µM de AM251 não ter conseguido reverter o efeito da CP55,940, como fez no experimento 4.2 pós-treino (mas uma quantidade maior, sim), sugere que a quantidade de receptores CB1 após o treino seja *maior* que na situação anterior, imediatamente pós-treino.

A possibilidade dessa alteração plástica (aumento no número de receptores) resultante do aprendizado aversivo não é meramente hipotética, pois já foi demonstrado que tarefas envolvendo certo nível de estresse são capazes de promover a liberação de endocanabinóides, no hipocampo (Kamprath et al. 2006) e outras estruturas relevantes, como a amígdala (Marsicano et al., 2002). Recentemente, aliás, nosso grupo mostrou que imediatamente após uma sessão de aprendizado aversivo – quando se inicia a consolidação da memória – ocorre um recrutamento de receptores CB1 que é mediado por glicocorticóides liberados pelo contexto comportamental (De Oliveira Alvares et al., 2010). Isso “fecha” a seguinte cadeia de eventos: estresse → liberação de glicocorticóides → liberação pós-sináptica de endocanabinóides → modificações plásticas decorrentes desse processo (por exemplo, aumento ou diminuição na densidade de receptores). Podemos, a princípio, descartar a hipótese de desensibilização, ou seja, diminuição da quantidade dos receptores-alvo CB1, pois o pulso de endocanabinóides ativado por demanda tem vida muito curto, restando a possibilidade muito interessante para explicar os presentes achados de que o que está acontecendo é um *aumento* na densidade de receptores CB1. Mas essa suposição ainda precisa ser demonstrada, o que ficará para trabalhos futuros.

Esses resultados pré-teste também estão de acordo com recentes estudos realizados em outros laboratórios, onde o agonista do receptor CB1 teve um efeito amnésico também sobre esta fase da memória (Nasehi et al., 2009; Davies et al., 2002; Hampson e Deadwyler, 1999; Hernandez-Tristan et al., 2000; Lichtman,

1995), contudo, *mais uma vez* não convergem com nossos achados anteriores utilizando a anandamida pré-teste, quando não verificamos qualquer efeito nas doses de 0,17ng/lado e 1,75ng/lado (De Oliveira Alvares et al., 2008).

Como já comentamos antes, é possível que a infusão de agonistas exógenos artificiais como a CP55,940, que possui afinidade por outros receptores (como CB2, já detectado no hipocampo, e GPR55, entre outros), promova efeitos que seriam mais de responsabilidade desses *outros alvos* que propriamente dos receptores CB1. É verdade que o fato de seu efeito ter sido revertido pela AM251 sugere terem sido os receptores CB1 os mediadores daquele efeito, mas embora a AM251 (IC₅₀ = 8 nM, K_i = 7.49 nM) seja 306 vezes mais seletiva pelos CB1 que pelos CB2, ela foi recentemente mostrada ser um potente agonista GPR55 (com EC₅₀ = 39 nM), o que pode complicar sua “pureza” enquanto ferramenta de discriminação farmacológica (Pertwee, 2005; Rydberg et al., 2007). Mas, considerando-se que apenas os receptores CB1 estejam envolvidos, o efeito pré-teste da CP55,940 poderia refletir um aumento na densidade dos mesmos em função dos eventos plásticos locais que se seguiriam a um aprendizado, hipótese também mencionada acima, mas cujo teste não estava entre os objetivos deste trabalho.

Já no caso de nosso estudo anterior com anandamida, como se tratava da infusão exógena da mesma molécula ligante endógena já naturalmente produzida pelo animal, é de se esperar que **somem** suas quantidades aumentando o *pool* endógeno de anandamida e, apenas em função disso, desloquem o estado do

sistema para outra região da curva de resposta fisiológica, onde o excesso de tônus pode estar recrutando outras respostas. Se considerarmos ambos fenômenos juntos – o aumento no *pool* de ligantes endógenos (anandamida) e o (suposto) aumento na densidade dos receptores CB1 pela plasticidade pós-aprendizado, um aumento poderia estar compensando fisiologicamente o outro, “neutralizando-o”. Infelizmente, não temos, até este ponto, elementos para decidir entre estas possibilidades.

5.3. Mecanismo possível dos efeitos observados da CP55,940

Considerando-se a circuitaria local da região-alvo, a área CA1 do hipocampo dorsal, acredita-se que após o treino do CAC ocorra um aumento da síntese de endocanabinóides na membrana pós-sináptica dos neurônios piramidais (Wilson e Nicoll, 2002) que, por sua vez - atuando como mensageiros retrógrados - se ligariam a receptores CB1 nos terminais pré-sinápticos, seja de neurônios gabaérgicos, seja de glutamatérgicos (Katona et al., 2006; Takahashi e Castilho, 2006; Kawamura et al., 2006). Os receptores CB1 localizados nos axônios terminais da colateral de Schaffer no hipocampo inibem a liberação de glutamato em neurônios piramidais CA1 (Hoffman, 2010), e esta talvez seja a causa do efeito amnésico, tanto na consolidação, quanto na evocação da memória.

A eletrofisiologia consiste no estudo das propriedades elétricas em células e tecidos, buscamos com essa ferramenta investigar a capacidade que o sistema nervoso tem de alterar o funcionamento de subsistemas como o hipocampal em função de mudanças no ambiente, ou seja, visamos estudar a dinâmica da plasticidade sináptica nesta estrutura.

Nossos resultados no experimento eletrofisiológico da Figura 4.7, mostram que o agonista CP55,940, na mesma concentração de 5µg/µl causa uma amnésia anterógrada em todos os experimentos comportamentais (Figuras 4.1-6), foi capaz de inibir a indução da potenciação de longa duração (LTP) em cortes horizontais de hipocampo dorsal de ratos.

A diminuição da amplitude das fatias perfundidas com CP55,940 sugere que os canabinóides exerçam seus efeitos sobre o potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) de campo mediante um mecanismo *pré-sináptico*, o que está de acordo outros resultados eletrofisiológicos utilizando agonistas dos receptores CB1 (Auclair et al., 2000).

Os receptores de glutamato, mediante vias de sinalização intracelular, são fundamentais para a indução e manutenção da LTP e, portando, para a aprendizagem ou formação/evocação de memórias (Peng et al., 2011). São os receptores de glutamato os que possibilitam a transmissão excitatória pós-sináptica no hipocampo. Outra evidência de que é a modulação da atividade dos receptores glutamatérgicos, em especial dos receptores NMDA, que está associada à indução da LTP, aparece na doença de Alzheimer. Nesta patologia este receptor

altera sua funcionalidade e prejudica a indução da LTP e, conseqüentemente, a aprendizagem e a memória (Rammes et al., 2011). Como as sinapses glutamatérgicas da região CA1 são, em boa parte, moduladas pela liberação de endocanabinóides, este poderia ser o mecanismo básico de todos os efeitos aqui descritos.

6. CONCLUSÃO

Utilizando o potente agonista sintético CP55,940, ampliamos nosso entendimento acerca do sistema endocanabinóide hipocampal nos processos de formação e evocação de memórias aversivas. Em particular:

- 6.1. a CP55, 940, quando infundida no hipocampo dorsal de ratos *imediatamente após o treino* na tarefa de CAC, foi amnésica, mas apenas na concentração de 5µg/µl (experimentos 4.1 e 4.3), ou seja, o agonista foi capaz de bloquear a **consolidação** dessa memória aversiva;
- 6.2. em que pese esse fármaco ser pouco seletivo, o efeito parece ser mediado pelos receptores CB1, pois foi revertido pela infusão concomitante de AM251 em concentração sem efeito próprio (experimento 4.2);
- 6.3. a CP55,940, quando infundida no hipocampo dorsal de ratos *15 minutos antes do teste* na tarefa de CAC, *também* foi amnésica, porém em *todas* as concentrações estudadas (experimento 4.4), ou seja, o agonista *também* foi capaz de bloquear a **evocação** dessa memória aversiva; o fato de fazê-lo sob concentrações menores do agonista sugere que o sistema está sensibilizado em função dos processos plásticos resultantes do

aprendizado, possivelmente com um aumento na densidade dos receptores CB1;

6.4. o efeito pré-teste parece, novamente, ser mediado pelos receptores CB1, pois foi revertido pela infusão concomitante de AM251, apenas em uma concentração mais alta, reforçando a sugestão acima de que esteja aumentada a densidade de receptores CB1 nesta etapa de expressão de memórias já adquiridas (experimentos 4.5 e 4.6);

6.5. a mesma concentração de CP55,940 que foi amnésica em ambas fases da memória, foi capaz de inibir a indução e manutenção da potenciação de longa duração (LTP) em uma fatia de hipocampo de rato, sugerindo um mecanismo comum de ação em nível celular (experimento 4.7).

7. BIBLIOGRAFIA

Abush H, Akirav I. (2010) Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus*. (10):1126-38

Adams IB, Martin BR. (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*; 91:1585-1614.

Aggarwal SK, Carter GT, Sullivan MD, ZumBrunnen C, Morrill R, Mayer JD (2009) Medicinal use of cannabis in the United States: historical perspectives, current trends, and future directions. *J Opioid Manag* 5: 153-168.

Agrest M (2001) [Classification of memory systems: a revision]. *Vertex* 12: 261-267.

Alvarez P, Squire LR (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7041-7045.

Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. (1999) *Prog Neurobiol*; 58:315-348.

Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol.*; 83(6):3287-93.

Barense MD, Henson RN, Lee AC, Graham KS. (2010) Medial temporal lobe activity during complex discrimination of faces, objects, and scenes: Effects of viewpoint.; *Hippocampus.*; 20(3):389-401.

Brioni, J., Izquierdo, I., (1988) Retention enhancement by pre-test β -endorphin and oxotremorine and its reversal by scopolamine; *Behavioral and Neural Biology*; volume 50, Pages 251-254

Brusco,A.; Tagliaferro,P.A.; Saez,T.; Onaivi,E.S. (2008A) Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann N Y Acad Sci.*; 1139:450-7.

Brusco,A.; Tagliaferro,P.; Saez,T.; Onaivi,E.S. (2008B) Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse.*; 62(12):944-9.

Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Gunther W, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257: 1415-1419.

Buzsaki G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325-340.

Carvalho-Netto EF, Martinez RC, Baldo MV, Canteras NS (2010) Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. *Neurobiol Learn Mem* 93: 479-486.

Clarke JR, Rossato JI, Monteiro S, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M; (2008) Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory; *Neurobiol Learn Mem*; 90(2):374-81.

Christopoulos,A.; Wilson,K. (2001) Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res.*, 5;915(1):70-8.

Cooper, E.C., lowenstein, D.H. (2001). Hippocampus. In: *Encyclopedia of life sciences*, London: Nature Publishing Group.

Cowan N (2008) What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res* 169: 323-338.

Da Silva, G.E.,Takahashi RN, (2002)SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 26(2):321-5.

Dalmaz, C., Neto, C.A. Carlos Alexandre Netto (2004) A MEMÓRIA. *SBPC* v. 56, n. 1, pp. 30-31

Davies, S. N., Pertwee, R. G., & Riedel, G. (2002). Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 42(8):993-1007. Review

De Oliveira Alvares L, Genro BP, Diehl F, Quillfeldt JÁ, (2008) Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem*. 90(1):1-9

De Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA, (2006) AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res.*; 1075(1):60-7

Dell'Acqua ML, Smith KE, Gorski JA, Horne EA, Gibson ES, Gomez LL (2006) Regulation of neuronal PKA signaling through AKAP targeting dynamics. *Eur J Cell Biol* 85: 627-633.

Deshpande LS, Blair RE, Delorenzo RJ. (2011) Prolonged cannabinoid exposure alters GABA(A) receptor mediated synaptic function in cultured hippocampal neurons; *Exp Neurol.*; [Epub ahead of print]

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC.(1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*: 34:605–613.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, et al. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*; 258:1946-1949.

Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L.(1998) Endocannabinoid: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*; 21:521-528.

Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55: 51-86.

Eichenbaum H (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44: 109-120.

Elvander-Tottie E, Eriksson TM, Sandin J, Ogren SO (2006) N-methyl-D-aspartate receptors in the medial septal area have a role in spatial and emotional learning in the rat. *Neuroscience* 142: 963-978.

Ferrari F, Ottani A, Vivoli R, Giuliani D, (1999) Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. *Pharmacol Biochem Behav*, 64(3):555-61.

Frankland e Bontempi (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 119-130.

Frankland PW, Bontempi B. (2005) The organization of recent and remote memories; *Nat Rev Neurosci.*; 6(2):119-30.

Gaoni Y, Mechoulam R. (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*; 86:1646–1647.

Gatley SJ, Lan R, Pyatt B, Gifford AN, Volkow ND, Makriyannis A. (1997) Binding of the non-classical cannabinoid CP 55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sci*, 61(14):PL 191-7.

Genoux D, Montgomery JM (2007) Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34: 1058-1063.

Gerber B, Tanimoto H, Heisenberg M (2004) An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. *Curr Opin Neurobiol* 14: 737-744.

Goonawardena AV, Robinson L, Hampson RE, Riedel G (2010) Cannabinoid and cholinergic systems interact during performance of a short-term memory task in the rat. *17(10):502-1 Learn Mem.*, 17(10):502-11.

Hampson, A. J., Bornheim, L. M., Scanziani, M., Yost, C. S., Gray, A. T., Hansen, B. M., Leonoudakis, D. J., & Bickler, P. E. (1998) Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* 70, 671–676.

Hampson, R. E., & Deadwyler, S. A. (1999). Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sciences*, 65, 715–723.

Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior*. New York: Wiley & Sons

Hernandez-Tristan, R., Arevalo, C., Canals, S., & Leret, M. L. (2000). The effects of acute treatment with delta9-THC on exploratory behaviour and memory in the rat, *J Physiol Biochem.* 56(1):17-24.

Hoffman AF, Laaris N, Kawamura M, Masino SA, Lupica CR, Control of cannabinoid (2010) CB1 receptor function on glutamate axon terminals by endogenous adenosine acting at A1 receptors. *J Neurosci.* 13;30(2):545-55.

Hoistad M, Barbas H (2008) Sequence of information processing for emotions through pathways linking temporal and insular cortices with the amygdala. *Neuroimage* 40: 1016-1033.

Howlett,A.C.; Barth,F.; Bonner,T.I.; Cabral,G.; Casellas,P.; Devane,W.A.; Felder,C.C.; Herkenham,M.; Mackie,K.; Martin,B.R.; Mechoulam,R.; Pertwee,R.G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54(2):161-202.

Iwasaki K, Matsumoto Y, Fujiwara M, (1992) Effect of nebracetam on the disruption of spatial cognition in rats. *Jpn J Pharmacol*, 58(2):117-26.

Izquierdo, (2002) I. Memória. Editora Artmed. Porto Alegre. 95p.

Izquierdo, I. (1992) The Neurobiology of memory Consolidation; *Neuroscience*. N. 18, P. 1-11.

Izquierdo, I., Medina, J.H. (1997). Memory formation, the sequences of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*. 68, 285-346.

Izquierdo, I., Quillfeldt, J.A., Zanatta, M.S., Quevedo, J., Schaffer, E., Schmitz, P.K., Medina, J.H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval memory for inhibitory avoidance in rats. *European journal of neuroscience*. 9, 796-793.

Izquierdo, L.A., Medina, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 393, 635-636.

Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V, Lutz B, Wotjak CT. 2006 Christopoulos, A., & Wilson, R. I. (2001). Interaction of anandamide with the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Research*, 915, 70–78.

Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V, Lutz B, Wotjak CT. (2006) Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J Neurosci.*, 26(25):6677-86

Kawamura,Y.; Fukaya,M.; ; Maejima,T.; Yoshida,T.; Miura,E.; Watanabe,M.; Ohno-Shosaku,T.; Kano,M. (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci.* 15;26(11):2991-3001.

Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60: 543-554.

Landsman, R. S., Burkey, T. H., Consroe, P., Roeske, W. R., AND Yamamura, H. I. (1997). SR141716A is na inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *European Journal of Pharmacology*, 334, R1–R2.

Lazzaro SC, Hou M, Cunha C, LeDoux JE, Cain CK (2010) Antagonism of lateral amygdala alpha1-adrenergic receptors facilitates fear conditioning and long-term potentiation. *Learn Mem* 17: 489-493.

Lichtman, A. H., Dimen, K. R., & Martin, B. R. (1995). Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 119(3):282-90.

Lima RH, Rossato JI, Furini CR, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M (2009) Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation

but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 91: 466-472.

Lorenzini, C.G.A., Baldi, L.E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*. 71, 1-18

Lynch G., Schubert P. (1980) The use of in vitro brain slices for multidisciplinary studies of synaptic function. *Annual Reviews Neuroscience*, 3:1-22.

Maćkowiak M, Chocyk A, Dudys D, Wedzony K. (2009) Activation of Cb1 Cannabinoid Receptors Impairs Memory Consolidation And Hippocampal Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Expression In Contextual Fear Conditioning. *Neuroscience.*; 158(4):1708-16.

Marr, D. (1970). A theory for cerebral neocortex. *Proc. R. Soc. Lond. B* 176, 161–234.

Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 262, 23–81

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530–534.

McAllister SD, Glass M. (2002) CB1 and CB2 receptor mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*; 66:161-171.

McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287: 248-251.

Mechoulam R. (1986) in *Cannabis as Therapeutic Agent* (ed. Mechoulam, R.) 1-19 (CRC Press Boca Ranton).

Migues, P.V.; Hardt, O.; Wu, D.C.; Gamache, K.; Sacktor, T.C.; Wang, Y.T.; Nader, K. (2010) PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci*; 13(5):630-4.

Miller S, Mayford M (1999) Cellular and molecular mechanisms of memory: the LTP connection. *Curr Opin Genet Dev* 9: 333-337.

Milner B (2005) The medial temporal-lobe amnesic syndrome. *Psychiatr Clin North Am* 28: 599-611, 609.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*; 365,61-65.

Nasehi M, Sahebgharani M, Haeri-Rohani A, Zarrindast MR. (2009) Effects of cannabinoids infused into the dorsal hippocampus upon memory formation in 3-days apomorphine-treated rats 92, 391–399. *Neurobiol Learn Mem.*; 92(3):391-9.

Pamplona FA, Takahashi RN (2006) WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett* 397(1-2):88-92

Pelletier JG, Pare D (2004) Role of amygdala oscillations in the consolidation of emotional memories. *Biol Psychiatry* 55: 559-562.

Peng,S.; Zhang,Y.; Zhang,J.; Wang,H.; Ren,B. (2011) Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. *Mol.Biol.Rep.* 38: 453-460

Pertwee R (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 76(12):1307–1324.

Pertwee R, (2007) GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol.* 152(7):984-6.

Quillfeldt, J. A., (1994) O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas

Quillfeldt, J.A., Zanatta, M.S., Schimitz, P.K., Quevedo, J., Schaffer, E., De Lima, J.B., Medina, J.H. E Izquierdo, I. (1996). Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiology of Learning and Memory*. 66, 97-101.

Rammes G, Hasenjäger A, Sroka-Saidi K, Deussing J, ParsonsCG (2011) Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of β -amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology*. 2011 Feb 12. [Epub ahead of print]

Ramos JM (2008) Perirhinal cortex lesions produce retrograde amnesia for spatial information in rats: consolidation or retrieval? *Learn Mem* 15: 587-596.

Reis HJ, Guatimosim C, Paquet M, Santos M, Ribeiro FM, Kummer A, Schenatto G, Salgado JV, Vieira LB, Teixeira AL, Palotás A (2009). Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. 16(7):796-840

Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsaki G (2006). Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nature Neurosci.* 9(12):1526-33.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152(7):1092-1101.

Sawzdargo, M.; Nguyen, T.; Lee, D.K.; Lynch, K.R.; Cheng, R.; Heng, H.H.; George, S.R.; O'Dowd, B.F. (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 5;64(2):193-8.

Setlow, B., Roozendaal, B., McGAUGH, J.L. (2000). Involvement of a basolateral amygdala complex-nucleus accumbens pathway in a glucocorticoid-induced modulation of memory consolidation. *Eur. J. Neurosci.* 12, 367-375.

Shifman JM, Choi MH, Mihalas S, Mayo SL, Kennedy MB (2006) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is activated by calmodulin with two bound calciums. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13968-13973.

Soneji ND, Paule CC, Mlynarczyk M, Nagy I. (2010) Effects of cannabinoids on capsaicin receptor activity following exposure of primary sensory neurons to inflammatory mediators; *Life Sci* 87(5-6):162-8.2010

Squire LR, Zola SM (1997) Amnesia, memory and brain systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 1663-1673.

Squire, L.R. (1992). Memory and hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*. 99, 195-231.

Thomas BF, Gilliam AF, Burch DF, Roche MJ, Seltzman HH. (1998) Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.*, 285(1):285-92

Varvel SA, Hamm RJ, Martin BR, Lichtman AH, (2001) Differential effects of delta 9-THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)*., 157(2):142-50.

Wang H, Hu Y, Tsien JZ (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 79: 123-135.

Wilson, RI, Kunos, G, Nicoll, RA (2001). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 31: 453–62.

WILSON,R.I. & NICOLL,R.A. (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. Science, 296, pp. 678-682.

Ye L., Qi J., Qiao J. (2001) Long-term potentiation in hippocampus of rats is enhanced by endogenous acetylcholine in a way that is independent of N-methyl-D-aspartate receptors. Neuroscience Letters 300:145-148.

Zhang X, Poo MM (2010) Progress in neural plasticity. Sci China Life Sci 53: 322-329.