

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**  
*INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE*  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**PARTICIPAÇÃO HIPOCAMPAL DO SISTEMA  
CANABINÓIDE ENDÓGENO SOBRE A AQUISIÇÃO,  
CONSOLIDAÇÃO E EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA E  
SOBRE A INDUÇÃO DA POTENCIAÇÃO DE LONGA  
DURAÇÃO**

**LUCAS DE OLIVEIRA ALVARES**

**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 2007.**

## **Agradecimentos**

Ao prof. Jorge Quillfeldt pela confiança, grande apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório pela grande ajuda, em especial à Bruna que realizou comigo a maior parte dos experimentos.

À Zelma, pela grande dedicação aos ratos.

À minha família que sempre me apoiou.

## **RESUMO**

Os receptores canabinóides do tipo CB1 estão presentes em grandes quantidades no sistema nervoso central, especialmente no hipocampo, estrutura encefálica essencial para a formação de memórias e local onde o fenômeno eletrofisiológico da potenciação de longa duração (LTP) tem sido mais extensamente estudado. Neste trabalho, estudamos os efeitos da administração intrahipocampal de AM152, um antagonista seletivo para os receptores canabinóides CB1, ou da Anandamida, um agonista canabinóide endógeno, (a) sobre as etapas de aquisição, consolidação e evocação da memória, e (b) sobre a indução da LTP. Nossos resultados mostram que o antagonista CB1 prejudicou a consolidação, porém facilitou a evocação da memória; foi, também, capaz de inibir a indução da LTP. Já o endocanabinóide anandamida facilitou a consolidação da memória. As evidências sustentam um claro envolvimento do sistema CB1 endógeno na modulação dos processos plásticos subjacentes ao processamento do aprendizado e da memória.

## **ABSTRACT**

CB1 cannabinoid receptors are abundantly present in the brain, with large concentration in the hippocampus, an essential structure for the memory processes and extensively studied in LTP experiments. Here, we have studied the effect of the dorsal hippocampus infusion of the selective CB1 receptor antagonist AM251, or the endogenous cannabinoid anandamide, (a) upon the memory acquisition, consolidation and retrieval of the step-down inhibitory avoidance task in rats, and (b) upon LTP induction. Our results show that AM251 has caused a memory consolidation deficit, but a retrieval facilitation; it has also blocked the LTP induction. The endocannabinoid anandamide, otherwise, has caused a facilitation of the consolidation. Our evidence support a clear role for the CB1 endogenous cannabinoid system in the modulation of plastic events underlying the learning and memory processes.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. MEMÓRIA.....</b>	<b>1</b>
<i>MEMÓRIA DE TRABALHO.....</i>	<i>3</i>
<i>MEMÓRIAS DECLARATIVAS E NÃO-DECLARATIVAS.....</i>	<i>3</i>
<i>MEMÓRIAS DE CURTA E DE LONGA DURAÇÃO.....</i>	<i>4</i>
<i>POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (LTP).....</i>	<i>5</i>
<b>1.2. CANNABIS SATIVA E O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 SISTEMA CANABINÓIDE E MEMÓRIA .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1. ANIMAIS E ACONDICIONAMENTO.....	20
3.2. PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS	
3.3. PROCEDIMENTOS ELETROFISIOÓLGICOS.....	219
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>76</b>

## Índice de figuras

FIGURA 1. FASES DA MEMÓRIA .....	2
FIGURA. 2 – <i>CANNABIS SATIVA</i> .....	8
FIGURA 3. HISTÓRICO DO USO E DESCOBERTAS DA CANNABIS. ADAPTADO DE CHILDERS 1998. ....	10
FIGURA 4. RECEPTORES CANABINÓIDES ADAPTADO DE CHILDERS 1998.....	10
FIGURA 5. AGONISTAS E ANTAGONISTAS CANABINÓIDES. ADAPTADO DE CHILDERS 1998.....	11
FIGURA 6. MECANISMO DE TRANSDUÇÃO. ADAPTADO DE CHILDERS 1998.....	12
FIGURA 7. DSI (SUPRESSÃO DA INIBIÇÃO INDUZIDA PELA EXCITAÇÃO). ADAPTADO DE WILSON E NICOLL 2002 .....	16
FIGURA 8. MODELO DE LIBERAÇÃO, AÇÃO E INATIVAÇÃO DOS ENDOCANABINÓIDES. ADAPTADO DE MC DONALDS 2001. ....	17
FIGURA 9. DESENHO REPRESENTANDO O PLANO AP –4,3MM, ADAPTADO DO ATLAS DO PAXINOS E WATSON (1998), MOSTRANDO O HIPOCAMPO DORSAL (SETAS ) DE RATO. ....	22
FIGURA 10. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA. ....	244
FIGURA 11. VISTA GERAL DA CAIXA DE CONDICIONAMENTO AUTOMATIZADA UTILIZADA NO TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA.....	288
FIGURA 12. VISTA GERAL DA CAIXA DE CONDICIONAMENTO DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO .....	29
FIGURA 13. SOLUÇÕES UTILIZADAS .....	311
Figura 14. Obtenção das fatias cerebrais dos grupos de ratos.....	32
FIGURA 15. FATIAMENTO DO ENCÉFALO NO VIBRÁTOMO .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b> 2
FIGURA 16. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DOS REGISTROS .....	344
FIGURA 17. LOCAIS ONDE ERAM COLOCADOS OS ELETRODOS .....	35
FIGURA 18. FOTO DA CUBA DURANTE O EXPERIMENTO .....	355
FIGURA 19. EFEITOS DO AM251 E ANANDAMIDA NA TAREFA DA ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA. ....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b> 8

FIGURA 20. EFEITOS DO AM251 E ANANDAMIDA NA TAREFA DA ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA. ....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.0</b>
FIGURA 21. EFEITOS DA ANANDAMIDA NA TAREFA DA ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA. ....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.2</b>
FIGURA 22. EFEITOS DO AM251 E ANANDAMIDA NA TAREFA DA ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A EVOCÇÃO DA MEMÓRIA. ....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.4</b>
FIGURA 23. EFEITOS DO AM251 E ANANDAMIDA SOBRE O DESEMPENHO MOTOR NA TAREFA DA HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO.....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.6</b>
FIGURA 24. EFEITOS DO AM251 SOBRE A LTP FIGURA . ....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.8</b>
FIGURA 25. MODELO PROPOSTO . ....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre todas as funções exercidas pelo cérebro, a mais fascinante é a sua capacidade de reter informações de fatos e eventos. Pois em consequência disso (e as informações inatas presentes em nosso genótipo) cada um de nós é um indivíduo único. Portanto, é a memória que garante nossa individualidade e personalidade, além de permitir a repetição de momentos agradáveis e evitarmos situações desadaptativas.

### 1.1. MEMÓRIA

#### FASES DA MEMÓRIA

Pode-se definir memória como o registro de informações adquiridas através de experiências. Ao adotarmos uma abordagem fenomenológica do estudo dos processos da memória, existe a expectativa de que esta nos auxiliará a desvendar a natureza do engrama. Este processo ocorreria em duas instâncias: *formação* e *evocação*. A formação de memórias incluiria três fases bem definidas: a *aquisição*, período que se dá durante a exposição à experiência; a *consolidação*, período em que o traço mnemônico é relativamente instável e, portanto, suscetível a modificações/modulações; o *armazenamento*, onde ocorre a real internalização do traço.

A *evocação* corresponde ao processo que nos permite avaliar a memória; nos animais ela é observada de duas maneiras: pela supressão de um comportamento inato (como deixar de explorar um ambiente devido a um estímulo aversivo encontrado nesse



ambiente) ou aquisição de um comportamento não natural (como acionar uma alavanca diversas vezes mediante estímulos apetitivos); no homem pode se estender ao reconhecimento de pessoas, palavras, lugares, etc. (Izquierdo, 1989).

Durante a evocação, dois processos antagônicos podem ocorrer (dependendo do “valor” da informação), se a informação é importante, essa memória vai ser reconsolidada, caso contrário ela tenderá a ser extinta. Ou seja, a evocação da memória não é um processo passivo, ela recruta diversas cascatas bioquímicas para “resolver” o rumo dessa memória recém-evocada. O sentido biológico da reconsolidação da memória é manter e acrescentar novas informações à memória antiga, enquanto a extinção é de formar uma nova memória com significado distinto à memória original.

Devemos ter em mente que a formação de memórias não é um evento instantâneo, mas sim, um processo dependente do tempo, que obedece a seqüência da figura 1. Podemos interferir com todos esses processos (com a administração de fármacos por exemplo) sobre as distintas fases da memória.



FIGURA 1. FASES DA MEMÓRIA

As memórias podem ser classificadas de diferentes maneiras, de acordo com sua função, conteúdo e duração.

## MEMÓRIA DE TRABALHO

É um tipo de memória de curtíssima duração (de segundos a poucos minutos). Sua função é de reter informações por um período de tempo necessário para que possamos dar continuidade à atividade que estamos executando. O exemplo clássico de memória de trabalho (também chamada por alguns autores de memória operacional) é quando guardamos mentalmente o número de telefone pelo tempo necessário para discarmos, e em seguida o esquecemos.

A memória de trabalho tem características distintas dos outros tipos de memória, principalmente pelo fato de não deixar nenhum traço duradouro no encéfalo. Além disso, é processada pelo córtex pré-frontal, região mais anterior do lobo frontal. Este tempo de memória depende simplesmente do disparo de alguns neurônios dessa região (Izquierdo, 2002).

## MEMÓRIAS DECLARATIVAS E NÃO-DECLARATIVAS

As memórias declarativas, também conhecidas como explícitas, são assim chamadas pelo fato de podermos declará-las verbalmente, diferente das não-declarativas como veremos adiante. Elas podem ainda ser subdivididas em duas classes, memórias episódicas (eventos ocorridos em determinado tempo e local, autobiografia, como por exemplo: “Quinta-feira almocei com minha namorada no restaurante...”) e semânticas (conhecimento de fatos e conceitos, como por exemplo: “Grêmio campeão brasileiro em 1981”).

Tanto as memórias episódicas como as semânticas, requerem para seu correto funcionamento uma boa memória de trabalho, e portanto, um funcionamento adequado do córtex frontal. As principais estruturas nervosas responsáveis pela aquisição, consolidação e evocação de memórias declarativas são o hipocampo e o córtex entorrinal (Fuster, 1995). Ambas comunicam-se entre si e com o córtex cingulado e córtex parietal.

Além dessas áreas, outras estruturas possuem um papel fundamental na modulação dessas memórias, a amígdala, o núcleo magnocefaloso basal, *locus coeruleus* e núcleos da base, os quais regulam emoções, ansiedade, estados de alerta, entre outros (Izquierdo 2002).

Memórias não-declarativas, também chamadas de implícitas ou procedurais, correspondem a hábitos e habilidades motoras. Esse tipo de memória, ao contrário das declarativas, são de mais difícil aquisição, porém depois de aprendida tornam-se praticamente eternas. Evocamos memórias implícitas de forma inconsciente e automática. O exemplo clássico é andar de bicicleta, não precisamos ficar prestando atenção em cada movimento que precisaremos realizar em cada instante. Mesmo que ficássemos muitos anos sem andar, rapidamente seríamos capazes de subir em uma bicicleta e pedalar. As estruturas responsáveis pela formação dessa memória são principalmente: o estriado (Bear, 2002) e o cerebelo (Izquierdo, 2002).

## MEMÓRIAS DE CURTA E DE LONGA DURAÇÃO

As memórias de longa duração podem durar de horas até o resto de nossas vidas, se essas informações irão ou não ser armazenadas por tanto tempo, vai depender da importância atribuída às informações, da concentração, estado de alerta, ansiedade,

influência de fármacos, etc. Logo após a aquisição, ou seja, durante a consolidação, é um momento onde as informações recém adquiridas são muito vulneráveis a modificações, tanto reforçadoras positivas como negativas, por muitos agentes, como o eletro-choque convulsivo, traumas, drogas e estresse.

Memórias de curta duração são aquelas que duram de minutos até horas, e sua função é de manter as informações enquanto a memória de longa duração não está pronta.

Durante muito tempo não se sabia se a memória de curta duração era parte da memória de longa duração imatura ou eram processos paralelos. Em 1998 Iván Izquierdo e colaboradores mostraram que são eventos separados, e que apesar das estruturas nervosas serem as mesmas, possuem mecanismos distintos (Izquierdo 1998a,b, 1999).

Conceitos e classificações de memória variam muito conforme o autor; além disso, elas são classificadas de forma didática, algumas memórias declarativas possuem traços de memórias não-declarativas. Neste trabalho, medimos a retenção de memórias declarativas de longa duração em ratos.

## POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (LTP)

Os fenômenos da potenciação de longa duração e depressão de longa duração – cujas siglas, LTP e LTD, derivam do inglês, respectivamente, *long term potentiation* e *long term depression* - foram considerados como possíveis bases dos processos de aprendizagem e memória. Consistem de formas persistentes de aumento (LTP) ou diminuição (LTD) da eficiência das respostas neuronais a uma breve estimulação tetânica (no caso da LTD, de

baixa frequência) de um axônio ou conjunto de axônios (Bear *et al.*, 2002). Essa “plasticidade sináptica” é o conjunto de processos fisiológicos em nível subcelular e/ou molecular que explica a capacidade dos neurônios de mudar suas respostas em resposta a determinados estímulos.

O fenômeno da potenciação de longa duração (LTP) foi descrito pela primeira vez por Lømo (1966) no giro denteado da formação hipocampal de coelhos vivos mantidos sob anestesia (apresentado sob a forma de pôster num congresso de fisiologia na Finlândia). Este estudo foi aprofundado e relatado por Bliss e colaboradores, em 1973, também com coelhos anestesiados (Bliss & Lømo, 1973). Nestes estudos foi descrito um aumento relativamente duradouro no tamanho dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS), registrado em células individuais ou em populações neuronais, depois de um breve período de estimulação elétrica de alta frequência (tetânica) sobre a via perforante, e registrados nas células granulares do giro denteado. Tais experimentos foram repetidos posteriormente em preparações *in vitro* de fatias das regiões do CA1 do hipocampo (Schwartzkroin & Wester, 1975; Lynch *et al.*, 1977), CA3 (Alger & Teyler, 1976) e giro denteado (Alger & Teyler, 1976), praticamente sem diferenças com relação aos registros *in vivo* (Teyler *et al.*, 1977). Apesar de ser mais conhecida e estudada na circuitaria trissináptica do hipocampo, a LTP também manifesta-se em diferentes regiões do cérebro (Teyler & DiScenna, 1987).

## ***1.2. CANNABIS SATIVA E O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE***

A *Cannabis sativa* (classificada por Carolus Linnaeus em 1753) (fig. 2), popularmente conhecida como maconha ou haxixe, entre muitos outros nomes, vem sendo

utilizada há milhares de anos por seus efeitos psicoativos (Elphick, 2001), tanto para usos medicinais, como recreativos (Wilson & Nicoll, 2002). A folha e a flor da *Cannabis sativa* secretam cerca de 60 compostos terpenofenólicos chamados de canabinóides. Destes, o principal princípio ativo é o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), descrito em 1964 (Gaoni & Mechoulam, 1964). Devido à natureza lipofílica do THC, acreditava-se que seu mecanismo de ação seria pela interação com a membrana plasmática, modificando sua fluidez (Hillard *et al.*, 1985). O primeiro indício de que o mecanismo de ação da *cannabis* era mediado por receptores de membrana, surgiu quando Howlett demonstrou que canabinóides diminuíam a quantidade de AMPc em cultura de neuroblastoma, sugerindo que esses receptores eram acoplados a proteína  $G_i$  (Howlett, 1984). A busca por uma maior compreensão sobre os receptores continuaram, com a confirmação através de *binding* (Devane *et al.*, 1988), localização (Herkenham *et al.*, 1990), e finalmente a clonagem do receptor CB1 (Matsuda *et al.*, 1990).

Depois da identificação de receptores canabinóides específicos, a questão natural a ser pensada era: não possuímos esses receptores para a possibilidade de utilizar a *cannabis*, provavelmente deveria haver algum ligante endógeno que ativasse esses receptores. Em 1992, utilizando extratos de encéfalo de porcos isolou-se o primeiro canabinóide endógeno, o N-araquidonil-etanolamina (Devane *et al.*, 1992), (a qual foi chamada de anandamida, que significa “leveza”, do sânscrito). Três anos após, um segundo canabinóide endógeno foi identificado, o 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995).



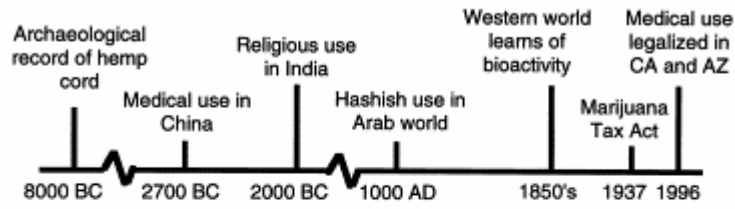
FIGURA. 2 – *CANNABIS SATIVA*

Nos seres humanos, o THC produz euforia, antinocicepção, dificulta a concentração, entre outros efeitos (Ameri, 1999). Exerce seus efeitos ligando-se aos receptores canabinóides CB1 e CB2 (fig. 3 e 4). Os receptores CB1 estão localizados principalmente no SNC, e os CB2, em células do sistema imunitário - principalmente em linfócitos B e T, mastócitos e macrófagos (Iversen *et al.*, 2001), embora um recente trabalho demonstrou a presença de CB2 no tronco encefálico (o qual pode estar envolvido no controle da êmese) (Van *et al.*, 2005).

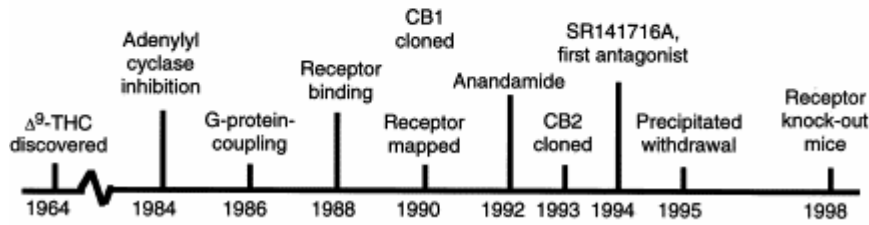
Os receptores CB1 são os receptores metabotrópicos mais abundantes no SNC (Howlett *et al.*, 2002; Herkenham *et al.*, 1991) e estão localizados principalmente nos núcleos da base, córtex, cerebelo e hipocampo (Wilson & Nicoll 2002). Esses pertencem a família de receptores acoplados à proteína  $G_{i/o}$ , a qual inibe a adenilato ciclase e os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N e P/Q, e estimulam canais de potássio e a enzima MAPK (Ameri 1999) (fig.6) .



### Timeline of Cannabis use and scientific advances



### The Ancient World to the present



### Cannabis Research Developments

FIGURA 3. HISTÓRICO DO USO E DESCOBERTAS DA CANNABIS. EXTRAÍDO DE CHILDERS 1998.

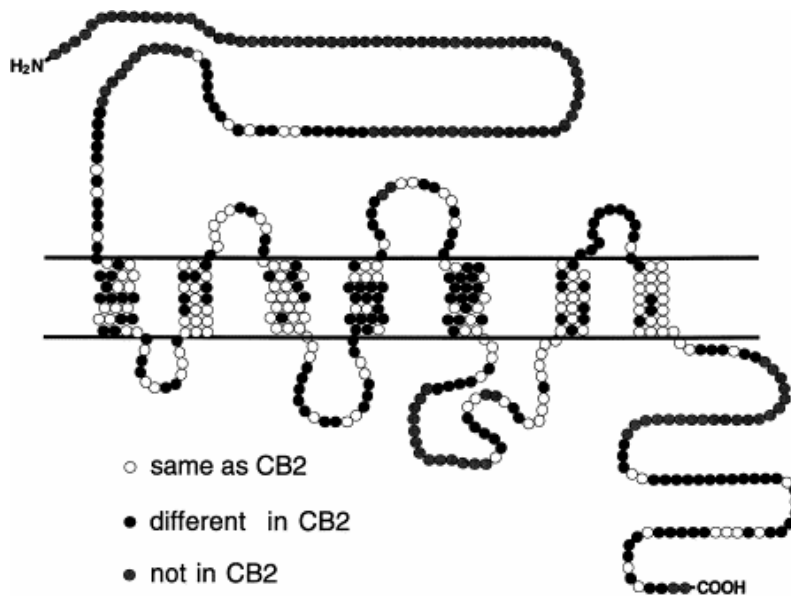


FIGURA 4. RECEPTORES CANNABINÓIDES ADAPTADO DE CHILDERS 1998.

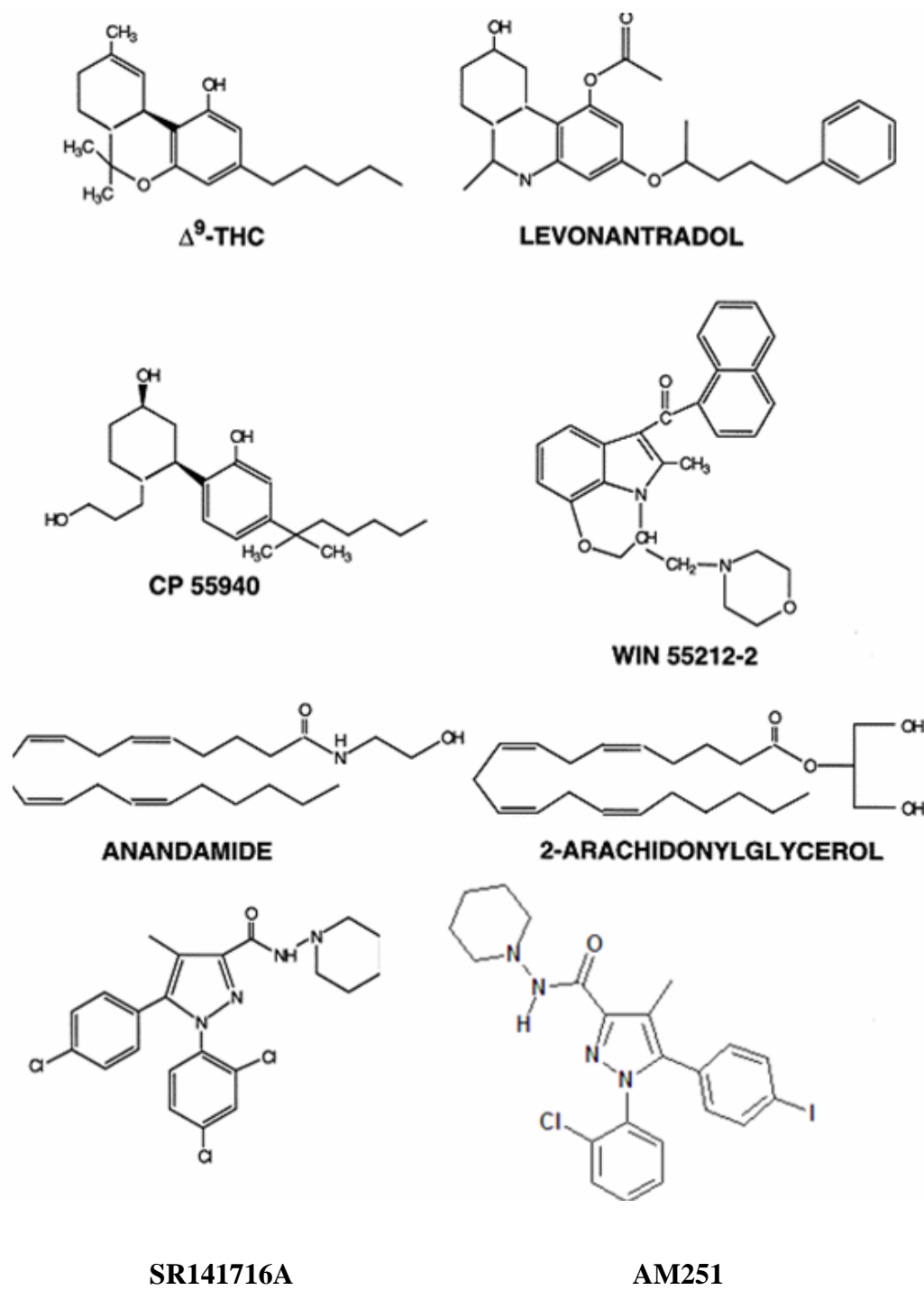


FIGURA 5. AGONISTAS E ANTAGONISTAS CANABINÓIDES. ADAPTADO DE CHILDERS 1998.

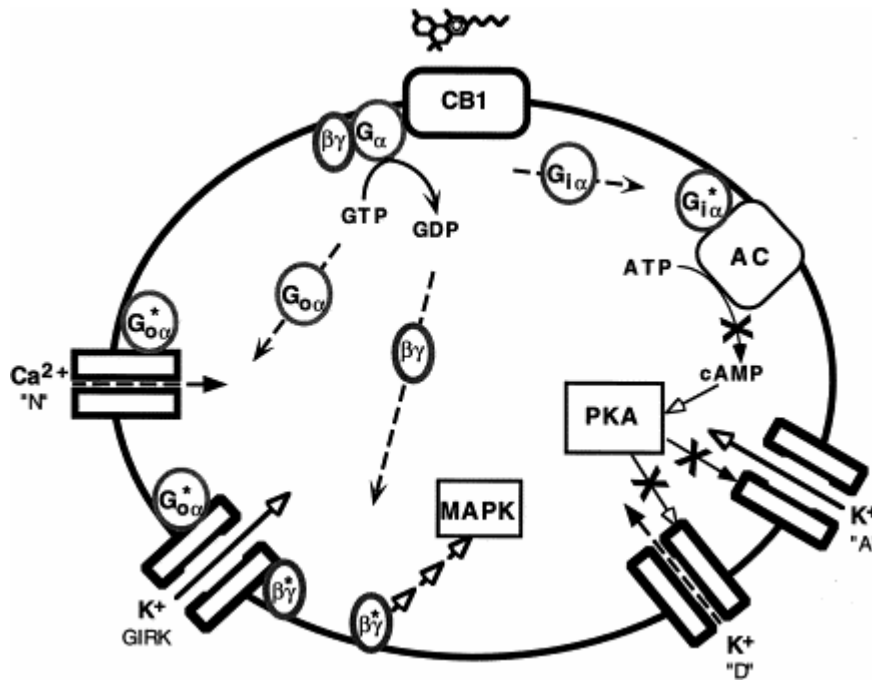


FIGURA 6. MECANISMO DE TRANSDUÇÃO. ADAPTADO DE CHILDERS 1998.

Dois principais canabinóides endógenos, ou endocanabinóides, foram, até hoje, identificados: a n-araquidoniletanolamina (anandamida) (Devane *et al.*,1992) e 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*,1995), ambos eicosanóides. Outras moléculas endógenas que se ligam aos receptores já foram identificadas, como a noladina éter (2-araquidonilglicerol éter), a virodamina (O-araquidonil-etanolamina) e a N-araquidonil-dopamina (Bisogno *et al.*, 2005, Hanus *et al.*, 2001, Porter *et al.*, 2002), porém pouco se sabe sobre elas. Os endocanabinóides clássicos (anandamida e 2-AG) são sintetizados a partir de fosfolípeidos de membrana e liberados por neurônios pós-sinápticos (mensageiros retrógrados) de forma dependente de cálcio (conseqüente da atividade neuronal). São inativados principalmente por recaptação (por neurônios e glia) e

posteriormente hidrolisados por enzimas específicas: a anandamida é metabolizada pela ácido graxo amida hidroxilase (FAAH) em etanolamina e ácido araquidônico (Mechoulam *et al.*, 1998) e o 2-AG por uma lipase de monoacilglicerol (embora também pela FAAH) (Goparaju *et al.*, 1999) (fig. 8).

Vários achados sugerem que os canabinóides possam modular a liberação e ação de distintos neurotransmissores. Desta forma, foi verificada uma interação entre canabinóides e sistemas gabaérgicos, glutamatérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos e colinérgicos (Chaperon & Thiebot, 1999).

No hipocampo, os receptores CB1 parecem estar localizados basicamente nos terminais pré-sinápticos de neurônios gabaérgicos, principalmente nas células em cesta que co-liberam colecistocinina (CCK) (Katona *et al.*, 1999; Tsou *et al.*, 1999; Wilson & Nicoll, 2002). De fato, uma vez que agonistas CB1 reduzem fortemente a liberação de GABA no hipocampo, e que, nesta estrutura, tal efeito é revertido pelo antagonista seletivo CB1 SR141716A (Katona *et al.*, 1999), a inibição da neurotransmissão excitatória teria de ser mediada por algum outro receptor canabinóide – tentativamente denominado “CB3” (Hajos & Freund, 2002). Trabalhos muito recentes mostraram, independentemente, a presença de receptores CB1 em terminais de neurônios piramidais glutamatérgicos no hipocampo (Katona *et al.*, 2006; Takahashi & Castillo, 2006; Kawamura *et al.*, 2006.), embora com uma concentração 20 vezes maior em interneurônios inibitórios (Kawamura *et al.*, 2006).

Muitos efeitos atribuídos à maconha em usuários crônicos (muitas vezes por jornalistas e outros leigos, sem conhecimento para interpretar alguns resultados) não foram comprovados em estudos em humanos e modelos animais, ou tais resultados são muito

contraditórios: é o caso de muitos relatos acerca do desenvolvimento de tolerância e dependência, toxicidade, lesões em estruturas encefálicas, alterações hormonais ou na produção de gametas, mutagênese e carcinogênese - pelo menos em doses normais, próximas às consumidas por usuários (Iversen, 2001).

### ***1.3 SISTEMA CANABINÓIDE E MEMÓRIA***

O déficit de atenção, aprendizado e memória com a administração aguda de canabinomiméticos em mamíferos têm sido mostrados há bastante tempo na literatura. A infusão de agonistas canabinóides sintéticos WIN55,212-2, CP55940, HU-210 e naturais como o THC, e mesmo daquelas moléculas que depois vieram a ser detectadas como sendo endocanabinóides, administrados de forma sistêmica antes do treino, tiveram efeitos prejudiciais sobre a memória em diferentes tarefas espaciais: labirinto radial de oito braços (Molina-Holgado *et al.*, 1995, Lichtman *et al.*, 1995 e 1996), alternância espacial no labirinto em T (Jentsch *et al.*, 1997), campo aberto no labirinto aquático de Morris (Ferrari *et al.*, 1999) ou DMTP (Mallet *et al.*, 1996; Hampson *et al.*, 1998, 1999, 2000). Entretanto esses experimentos não demonstraram conclusivamente até que ponto tal efeito se deve à ação dos canabinóides sobre o hipocampo. Uma exceção foi o trabalho de Lichtman (1995), com administração intrahipocampal, que encontrou resultados similares com CP55,940 (agonista CB1), porém exclusivamente sobre a memória de trabalho. Estudos com antagonistas canabinóides administrados sozinhos (i.p.) não mostraram efeitos deletérios (Da Silva & Takahashi, 2002; Davies *et al.*, 2002), ou, por outro lado, encontraram até mesmo facilitação da memória de curta duração no labirinto radial de 8 braços (Lichtman *et*

*al.*, 2000). A administração sistêmica pós-treino de anandamida prejudicou a memória na tarefa da esquiwa inibitória em ratos (Murillo-Rodrigues *et al.*, 1998) e camundongos (Castellano *et al.*, 1997, 1999). A administração crônica de THC causou um déficit de memória espacial na tarefa do labirinto radial de oito braços (Stiglick *et al.*, 1982) e, por outro lado, uma facilitação na esquiwa ativa (Stiglick *et al.*, 1984). Dois trabalhos recentes mostraram uma facilitação da aquisição da memória com a inibição da FAAH na tarefa do labirinto aquático de Morris (Varvel *et al.*, 2006) e um déficit sobre a aquisição e evocação com o antagonista-CB1 AM251 na tarefa do medo condicionado (Arenos *et al.*, 2006).

A grande maioria dos estudos - com exceção de dois trabalhos publicados em nosso laboratório (de Oliveira Alvares *et al.*, 2005 e 2006) – consistem de administrações sistêmicas, e, como os receptores CB1 estão presentes por todo o SNC em grande quantidade, tais tratamentos interagem com muitos sistemas de neurotransmissão em diversas estruturas do encéfalo, podendo apresentar falsos resultados positivos sobre determinadas funções mentais.

No estudo do fenômeno DSI (supressão da inibição induzida pela despolarização) (fig. 7), os endocanabinóides como a anandamida e o 2-AG, foram propostos como mensageiros retrógrados, inibindo transitoriamente a liberação de GABA (Wilson & Nicoll, 2002). Um outro fenômeno muito parecido com a DSI (porém mais duradoura, a DSI dura em torno de 1min) é a iLTD, a qual atuaria aumentando a excitabilidade de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo através da LTD de interneurônios inibitórios - efeito suprimido com antagonistas CB1 (o protocolo utilizado nesse experimento foi de 2 trens de 100Hz na colateral de Schaffer) (Chevaleyre & Castillo, 2003). Os endocanabinóides também facilitam a indução da potenciação de longa duração (LTP)

mediante DSI (Carlson *et al.*, 2002), porém existem muitos resultados conflitantes com esse, os quais injeta-se canabinóides exógenos e inibe-se a indução da LTP (Terranova *et al.*, 1995; Stella *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 2002), provavelmente inibindo diretamente a liberação de glutamato.

Estudos recentes mostraram que os receptores CB1 são necessários para a extinção, mas não para a aquisição e consolidação na tarefa do medo condicionado (Marsicano *et al.*, 2002).

O hipocampo forma parte do lobo temporal medial, estrutura fortemente relacionada com o aprendizado e memória (Squire, 1987, 1992), e é uma das estruturas onde existe uma alta expressão dos receptores CB1. Apesar de existirem muitos trabalhos envolvendo canabinóides e memória, surpreendentemente pouco se sabe a respeito do papel do hipocampo nestes processos.

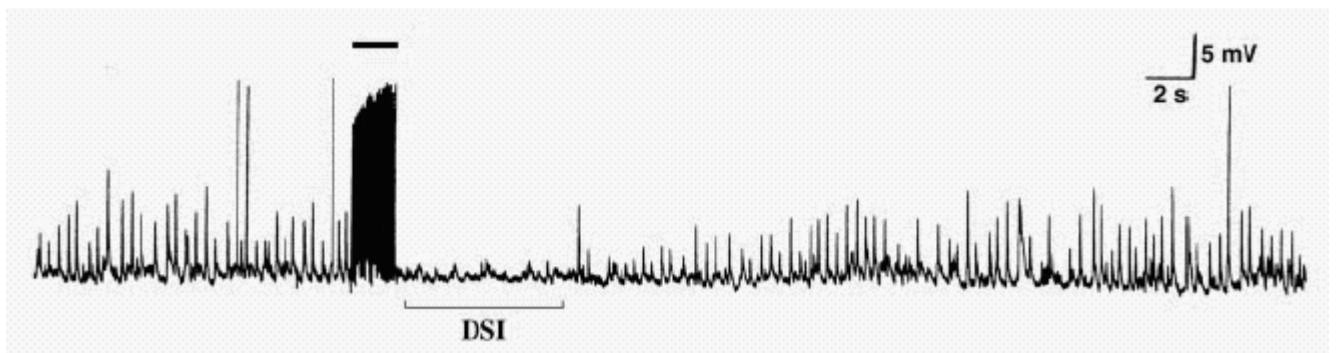


FIGURA 7. SUPRESSÃO DA INIBIÇÃO INDUZIDA PELA EXCITAÇÃO (DSI). ADAPTADO DE WILSON E NICOLL 2002

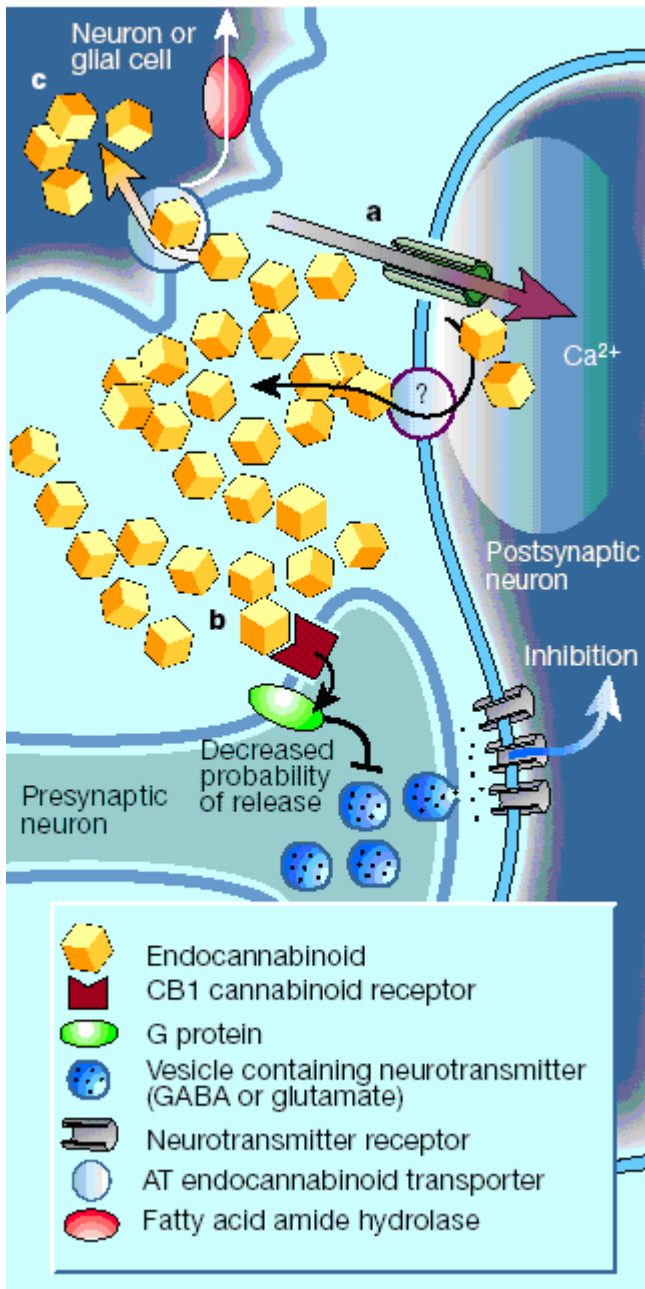


FIGURA 8. MODELO DE LIBERAÇÃO, AÇÃO E INATIVAÇÃO DOS ENDOCANABINÓIDES. ADAPTADO DE MC DONALDS 2001.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho é contribuir para a compreensão da participação do sistema canabinóide endógeno hipocampal dorsal nos processos de memória aversiva em ratos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. *Estudar os efeitos da administração intrahipocampal bilateral **pré-treino** de **AM251** e de **anandamida** na tarefa de Esquiva Inibitória;*

2.2. *Estudar os efeitos da administração intrahipocampal bilateral **pós-treino** de **AM251** na tarefa de Esquiva Inibitória;*

2.3. *Estudar os efeitos da administração intrahipocampal bilateral **pós-treino** de **anandamida** na tarefa de Esquiva Inibitória;*

2.4. *Estudar os efeitos da administração intrahipocampal bilateral **pré-teste** do **AM251** e de **anandamida** na tarefa de Esquiva Inibitória;*

2.5. Estudar os efeitos da administração intrahipocampal bilateral **pré-treino** de **AM251** e de **anandamida** sobre a deambulação no Campo Aberto;

2.6. Estudar os efeitos do **AM251** sobre a **indução** da Potenciação de Longa Duração.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### *3.1. ANIMAIS E ACONDICIONAMENTO*

Foram utilizados trezentos e dez (310) ratos Wistar machos, com idade de 2 a 3 meses, pesando entre 250 e 300 gramas, fornecidas pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos no ratário de nosso laboratório (Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação - LPBNC), no Departamento de Biofísica, e acondicionados em caixas plásticas de dimensões 65 x 25 x 15 cm (comprimento X largura X altura), cobertas com grades metálicas. No assoalho era espalhada maravalha seca e autoclavada, trocada a cada 3 dias. Cada caixa continha 4-5 ratos. O ciclo de iluminação do ratário do LPBNC foi de 12h (luzes acesas 7-19 hs). A ração padronizada e a água fresca tinham oferta livre. A temperatura do ambiente foi mantida em média a 24 °C.

Os experimentos seguiram as recomendações dos protocolos de experimentação animal segundo a SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento) e o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

## 3.2. PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

### 3.2.1. Cirurgias Estereotáxicas:

#### *Anestesia*

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados usando-se um anestésico geral, Ketamina (“Dopalen”, da Agribrands) juntamente com Xilazina (“Anasedan”, da Agribrands), que é um sedativo/miorrelaxante/analgésico, administrados intraperitonealmente (ip), nas doses de 75mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

#### *Coordenadas da Estrutura*

As coordenadas estereotáxicas, foram adaptadas a partir do atlas de Paxinos & Watson (1998) (fig. 9) e confirmadas em cirurgias-piloto prévias para nossos animais. As coordenadas finais para a ponta das cânulas guia(1 mm acima da região alvo), tendo como ponto de referência o bregma, foram as seguintes:

#### Hipocampo:

Coordenadas: Ântero-Posterior = - 0,42

Látero-Lateral = +/- 0,30

Dorso-Ventral = - 0,18

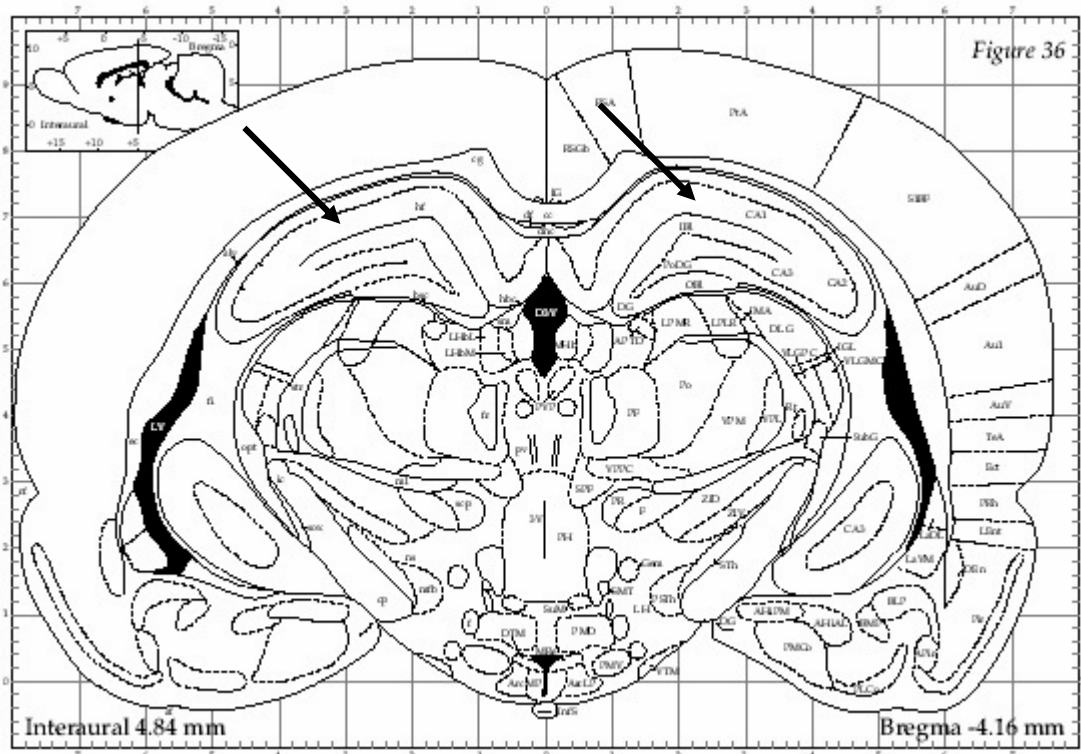


FIGURA 9. DESENHO REPRESENTANDO O PLANO AP -4,3MM, ADAPTADO DO ATLAS DO PAXINOS E WATSON (1998), MOSTRANDO O HIPOCAMPO DORSAL (SETAS) DE RATO.

### *Craniotomia e colocação das cânulas*

Quando anestesiado o animal era colocado num aparelho estereotáxico (Fabricação: David Kopf, modelo 1404) (Fig.10). O topo do crânio era exposto através de incisão com bisturi nº 20/21, seguida de uma craniotomia bilateral usando uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas ântero-posteriores (AP) e látero-laterais (LL) do hipocampo dorsal. Uma cânula guia de aço inoxidável (diâmetro externo de 0,7mm, calibre 27 e diâmetro interno de 0,3 mm) era posicionada, sobre cada orifício feito na calota

craniana, com o emprego da torre móvel do estereotáxico, que era então abaixada lentamente até encostar na dura-máter quando, então, posicionava-se a cânula na coordenada dorso-ventral (DV).

Através das cânulas foram introduzidas agulhas finas (“mizzy”, calibre 30), por onde injetava-se as substâncias. A “mizzy” penetrava 1 mm a mais que a cânula, o que evitava 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. Sobre a calota craniana, imediatamente acima do cerebelo, foi posicionado um parafuso para aumentar a fixação do capacete sobre o crânio. Este procedimento não afetou o comportamento dos animais nos experimentos e diminuiu a perda pós-cirúrgica de capacetes para 3 %.



FIGURA 10. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.

### *Pós-operatório*

Imediatamente após a cirurgia, os animais eram mantidos levemente aquecidos sob uma lâmpada vermelha de 40W, durante 2h, colocada acima da gaiola. Os animais não enxergam no comprimento de onda da luz vermelha evitando, com isso, interferir no ciclo

claro/escuro. Após 48-72 hs de recuperação da cirurgia, os animais iniciavam as tarefas comportamentais.

#### *Controle do posicionamento das cânulas*

Após o término dos experimentos todos os animais foram sacrificados por guilhotinamento. Em seguida, administrávamos 0,5 µl de azul de metileno em cada uma das cânulas (visando aumentar o contraste das marcas das cânulas no tecido cerebral); a seguir, os cérebros foram rapidamente retirados e estocados em solução de formaldeído a 10% . Após alguns dias para a fixação, os cérebros eram analisados para conferir o posicionamento das cânulas. Apenas os animais que apresentaram o posicionamento correto das cânulas foram considerados para a análise estatística.

#### *3.2.2. Preparação e Administração dos fármacos*

Os animais eram divididos em dois grupos que recebiam a infusão bilateral de 0,5µl/lado de AM251 (Tocris) nas doses de 5,5 ng/lado, ou anandamida, nas doses de 17,5 , 1,75 e 0,17ng /lado ou seus veículos (tampão fosfato salino (TFS), NaCl a 0,9% em tampão fosfato sódico 0,1M, com um pH ajustado para 7,4 (Brioni *et al.*, 1990; da Cunha *et al.*, 1991) com dimetil-sulfóxido (DMSO) 8%).

A forma de injeção era igual para o grupo droga e o seu correspondente grupo controle. A administração dos fármacos foi feita através de uma agulha fina (“mizzy”), conectada através de uma pequena mangueira de polietileno a uma microsseringa Hamilton



de 10  $\mu$ l. A injeção foi feita com uso de um sistema propulsor automático de microseringas Hamilton (com motor de passo), com fluxo de 20  $\mu$ l/hora (0,5  $\mu$ l/90 segundos). Completada a infusão de 0,5  $\mu$ l, aguardava-se mais 30 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 aquisição da memória, os fármacos eram administrados 15min antes do treino; 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.

### *3.2.3. Tarefas Comportamentais:*

Avaliamos a memória, isto é, a lembrança do “aprendizado” dos animais, ao medir uma alteração comportamental. Para isso utilizamos tarefas padronizadas e quantificamos algum aspecto que possa demonstrar o “aprendizado” do animal. Neste trabalho utilizaram-se duas tarefas comportamentais: Esquiva Inibitória (fig. 11) e Habituação ao Campo Aberto (como controle motor) (fig. 12).

#### *Esquiva Inibitória (EI)*

O aparelho de Esquiva Inibitória consisti em uma caixa de condicionamento de madeira, automatizada (Fabricação: Albarsch) (Figura 11), com medidas 50 x 25 x 25 cm

(comprimento x largura x altura). A parede frontal era de vidro transparente, para observação do animal, e o assoalho era uma grade de barras de bronze de 1mm de diâmetro cada barra, espaçadas entre si, por 1cm. No lado esquerdo da caixa, olhando-a de frente, havia uma plataforma de madeira revestida de acrílico com medidas 8 x 25 x 5 cm (comprimento x largura x altura). A caixa era iluminada por uma lâmpada de 7W no centro superior da parede posterior do aparelho. Tanto na sessão de treino (TR), quanto na sessão de teste (TT), o animal foi colocado gentilmente no canto posterior esquerdo do aparelho, sobre a plataforma, sendo, a tampa de acrílico translúcido imediatamente fechada. Na sessão de treino o animal ao descer da plataforma com as 4 patas, recebia durante 3s, um choque intermitente nas patas de 0,5 mA (60 Hz) através das barras de bronze do assoalho (com exceção do experimento para testar os efeitos da anandamida sobre a consolidação da memória, no qual foi utilizado um choque de 0,3mA) . Era medido o tempo de espera para a descida da plataforma (latência). Na sessão de teste, 24h após a sessão de treino, o animal era recolocado na plataforma do aparelho de EI, novamente, medindo-se a latência de descida. Na sessão de teste não foi aplicado choque. O teto máximo de latência era de 180s. A diferença das latências TT- TR foi tomada como uma medida de “memória” e referida nas tabelas como escore de retenção.



FIGURA 11. CAIXA DE CONDICIONAMENTO AUTOMATIZADA UTILIZADA NO TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA.

### *Habituação ao Campo Aberto (Hab)*

Esta tarefa é realizada em uma caixa de madeira envernizada, medindo 60 x 40 x 50 (comprimento x largura x altura), com a face anterior de vidro (Fig.12). O assoalho é recoberto com linóleo e dividido em 12 retângulos de 15,0 x 13,3 cm para fim de quantificação dos movimentos. As sessões de teste foram de 180s cada. Os animais eram colocados de frente para o canto posterior esquerdo da caixa e deixado livre para explorar o ambiente. Registrou-se o número de cruzamentos (*crossings*) pelas linhas pretas marcadas no assoalho da caixa.



FIGURA 12. CAIXA DE CONDICIONAMENTO DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

### *Análise Estatística dos Resultados Comportamentais*

*Esquiva Inibitória:* Por existir um “teto” de 180s para a latência nas sessões de treino e teste, os dados são classificados como “não-paramétricos” sendo, assim, expressos como mediana e intervalos interquartis. As latências dos grupos controle e droga foram comparadas pela Análise de Variância de Kruskal-Wallis ,  $P \leq 0,05$  – quando haviam mais de dois grupos- (Siegel, 1975; Downe & Heath, 1970), com ordenação posterior era feita

empregando-se o Teste post-hoc de Mann-Whitney , $P \leq 0,05$ . quando haviam apenas dois grupos, era utilizado o teste de Mann-Whitney.

*Habituação ao Campo Aberto:* Para análise dos índices de cruzamentos entre os grupos nas sessões de teste, utilizamos o Teste de ANOVA de uma via,  $P \leq 0,05$  (Downe & Heath,1970).

### 3.3. PROCEDIMENTOS ELETROFISIOLÓGICOS:

Ratos Wistar pesando entre 250 e 300g foram pesados e anestesiados com Tiopental (40mg por kg) e imediatamente decapitados com uma guilhotina especial para este fim.

Após a decapitação abria-se o crânio para remoção do cérebro. O cérebro dissecado era imerso numa solução Ringer (líquido cefalorraquidiano artificial) de dissecção (descrito na Fig. 13) mantida sob temperaturas de 4°C, sob constante oxigenação por aproximadamente 20 segundos para aumentar a consistência do tecido, tornando-o mais apto ao corte.

<ul style="list-style-type: none"> <li>• A solução salina de <b>Ringer</b> é também referida como líquido cefalorraquidiano artificial (ACFS)</li> </ul>	
<b>Meio de DISSECÇÃO</b>	<p>em mM: NaCl, 124; KCl, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25, NaHCO<sub>3</sub>, 26; glicose, 10; MgSO<sub>4</sub>, 5 e CaCl<sub>2</sub>, 0,2 ; e pH: 7.4; tais concentrações de Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> evitam o estresse celular.</p>
<b>RINGER NORMAL</b>	<p>em mM: NaCl, 124; KCl, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25, NaHCO<sub>3</sub>, 26; glicose, 10; MgSO<sub>4</sub> , 2 e CaCl<sub>2</sub>, 2 ; pH: 7.4 [14]; Durante o registro as fatias cerebrais foram constantemente perfundidas com Ringer normal, cuja fórmula já foi descrita anteriormente, porém pré-aquecido (34°C) e constantemente oxigenado.</p>

Figura 13. soluções utilizadas NOS EXPERIMENTOS ELETROFISIOLÓGICOS

A obtenção das fatias (Fig. 14) se dava através da montagem de blocos com o cérebro, e o fatiamento foi feito utilizando-se um vibrátomo; sentido do corte: horizontal/ 400µm de espessura (Fig. 15).

Os hipocampos foram separados do restante da fatia e imersos no Ringer normal (descrito na Fig. 13) em temperatura ambiente sob constante oxigenação (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) permanecendo por 1 hora descansando. Decorrido este período, o material era levado à câmara de incubação para os registros eletrofisiológicos.

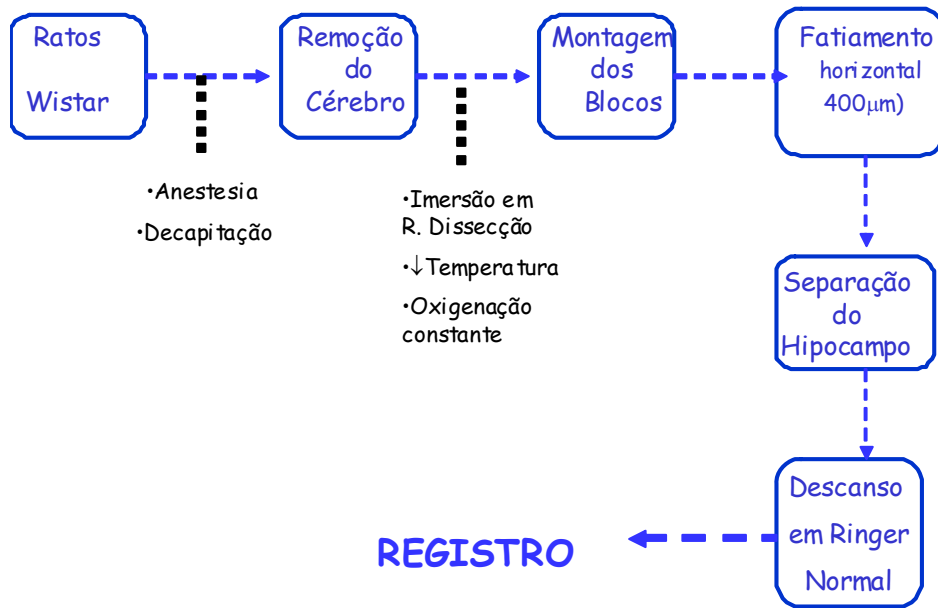


FIGURA 14. OBTENÇÃO DAS FATIAS CEREBRAIS DOS GRUPOS DE RATOS

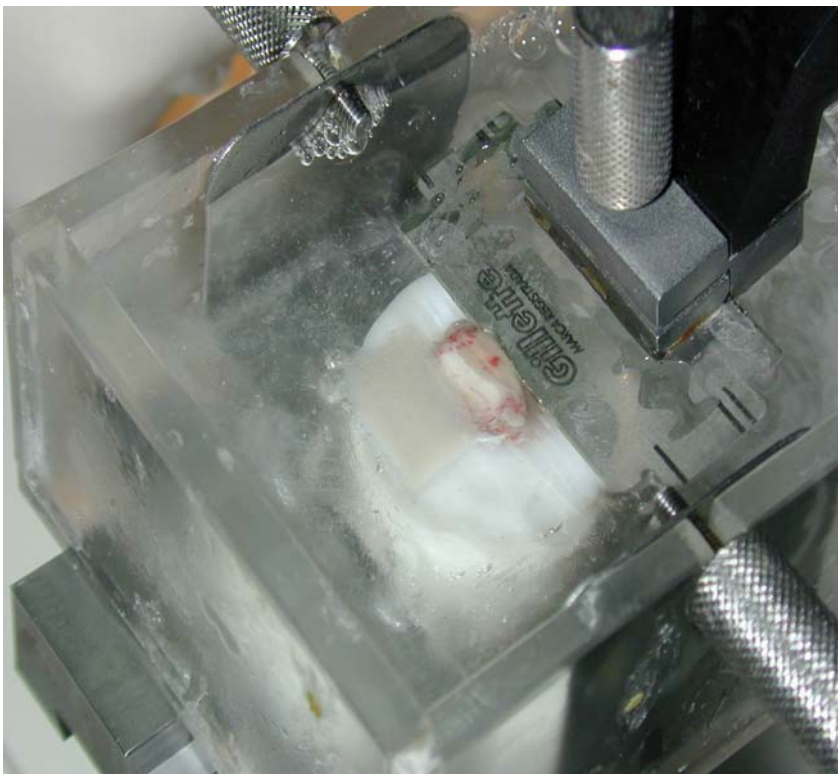


FIGURA 15. FATIAMENTO DO ENCÉFALO NO VIBRÁTOMO

Eletrodos de registro eram utilizados para captar os potenciais excitatórios pós sinápticos (PEPS) de campo da região dendrítica dos neurônios hipocâmpais em CA1 (stratum radiatum), em resposta à estimulação da colateral de Schaffer (Fig. 17). Estes eletrodos de registro eram fabricados com uso de um estirador de pipetas a partir de um capilar de vidro especial, e preenchidos com Ringer normal (impedância de 0,5-10 mΩ). Os sinais medidos, de muito baixa voltagem, eram amplificados, filtrados e exibidos na interface gráfica de um programa de computador que também controlava a geração dos estímulos (aplicados através dos eletrodos de estímulo, que consistiam de filamentos bipolares de platina-irídio).

Respostas basais (0,05Hz com a duração dos pulsos de 0,2ms) eram monitorados por cerca de 30 min. Depois de estável, era dado o estímulo tetânico (4 trens (20 seg de duração entre os trens) de 100Hz, 1 seg de duração, cada pulso com a duração de 0,2ms) e registrados por mais 50min. Através do eletrodo de estímulo sobre a colateral de Schaffer eram dados estímulos elétricos (60-120uA) a partir de um gerador de pulsos programáveis. O sinal obtido pelo eletrodo de registro era amplificado (1000x) por um amplificador conectado ao eletrodo através de um pré-amplificador. Os sinais eram convertidos de analógico para digital, e monitorados num microcomputador. (esquema mostrado com o nome comercial dos aparelhos na fig.16).



Foi realizada a análise a partir da amplitude dos PEPS (distância vertical em mV entre a linha de base e o pico mais negativo (Fig.16,foto de um registro num monitor).

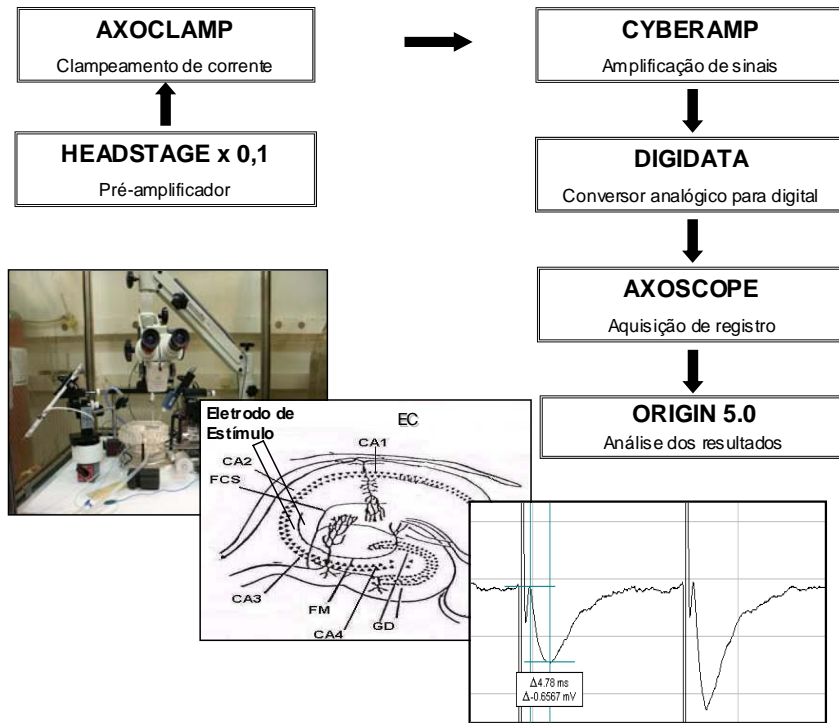


FIGURA 16. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DOS REGISTROS

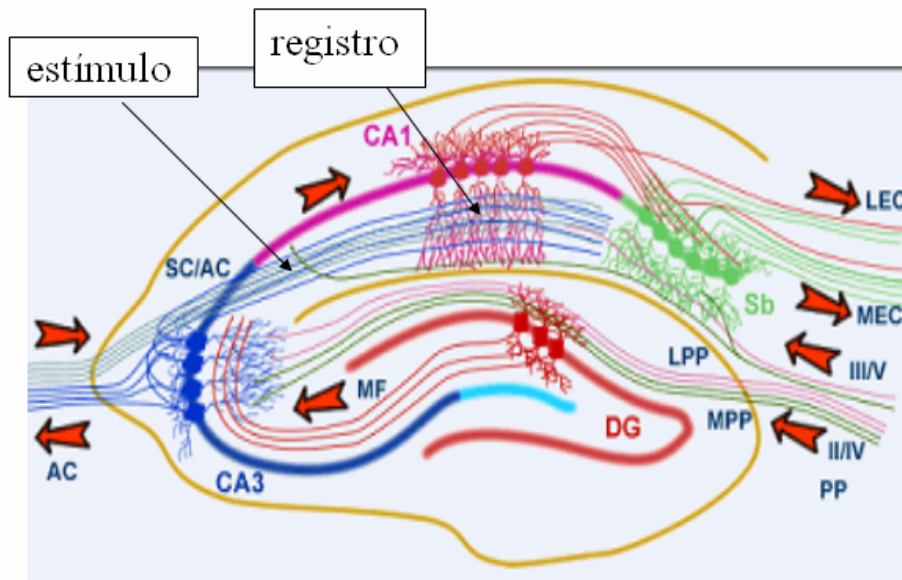


FIGURA 17. LOCAIS ONDE ERAM COLOCADOS OS ELETRODOS

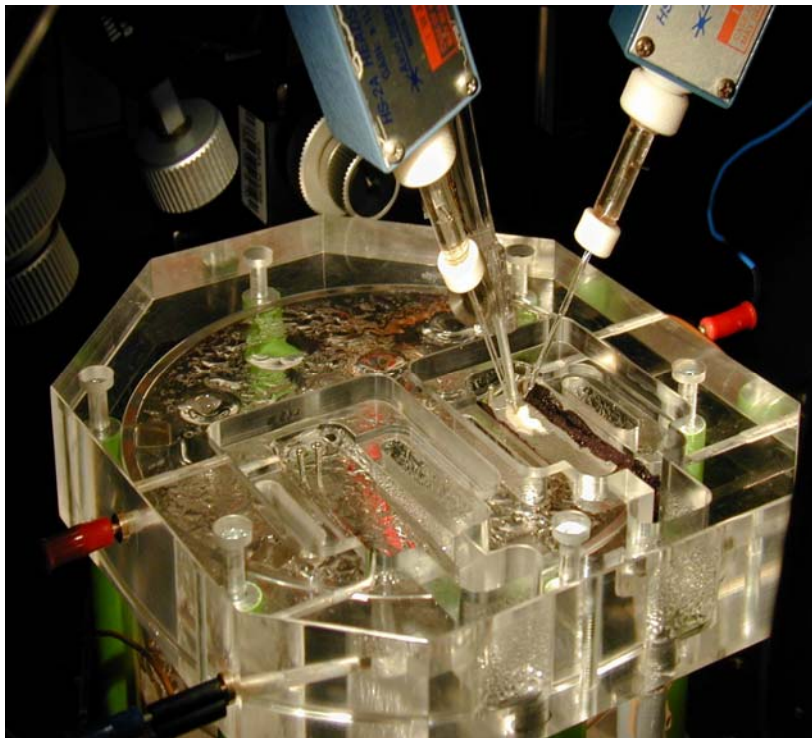


FIGURA 18. FOTO DA CUBA DURANTE O EXPERIMENTO

*Análise estatística os Dados Eletrofisiológicos:*

ANOVA para medidas repetidas dos PEPS eram registradas a cada 5 min antes e depois do trem de estímulo, em cada grupo, e então os dois grupos eram comparados. Era feita uma média dos últimos 10 min antes do estímulo tetânico para definir a resposta basal. Como critério de indução da LTP, era necessário que a resposta (a) aumentasse de, no mínimo, 40% com relação à resposta basal, e (b) durasse pelo menos uma hora.

*Fármacos utilizados:*

AM251, um antagonista seletivo para os receptores CB1, foi utilizado na concentração de 0,2 $\mu$ M, ou seu veículo (DMSO 8%). Os fármacos eram administrados 2 minutos antes do estímulo tetânico, mediante ejeção (por uma bomba pneumática) diretamente sobre a região-alvo da fatia – o CA1 do hipocampo - num volume total de 3 $\mu$ l.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeitos da administração intrahipocampal bilateral **pré-treino** de **AM251** e de **anandamida** na tarefa de Esquiva Inibitória

Animais infundidos na região dorsal do hipocampo, 15 minutos antes do treino, com o AM251 na dose de 5,5ng/lado, **ou** com a anandamida nas doses de 1,75 ou 17,5ng/lado, ou seu veículo (TFS/DMSO 8%): a Figura 19 mostra os dados expressos como mediana [intervalos interquartis], adequados a uma análise estatística não-paramétrica, uma vez que sua distribuição não é normal ( $P>0,05$ , teste de Kolmogorov-Smirnov). O diagrama esquemático abaixo, ilustra o protocolo experimental utilizado.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as latências de descida da plataforma da sessão de **treino** ( $P>0,05$ , teste de ANOVA de Kruskal-Wallis), o que permite comparar os diferentes grupos

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as latências da sessão de **teste** dos diferentes grupos ( $P=0,866$ , teste de ANOVA de Kruskal-Wallis),

Em todos os grupos, a latência do treino diferiu significativamente da do teste, mostrando que estes animais aprenderam adequadamente a tarefa ( $P<0,05$ , teste de Wilcoxon).

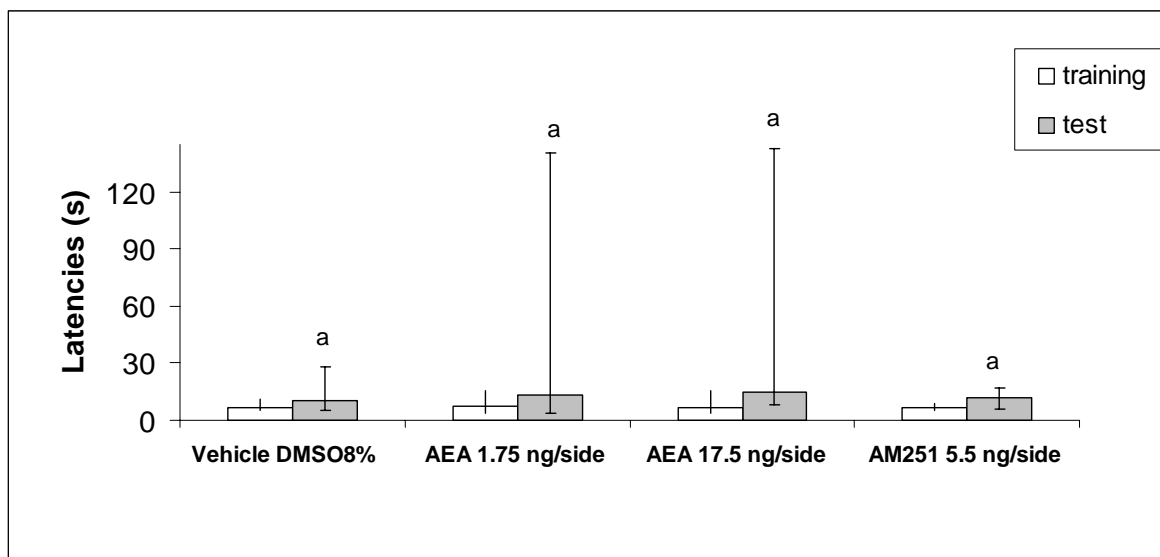
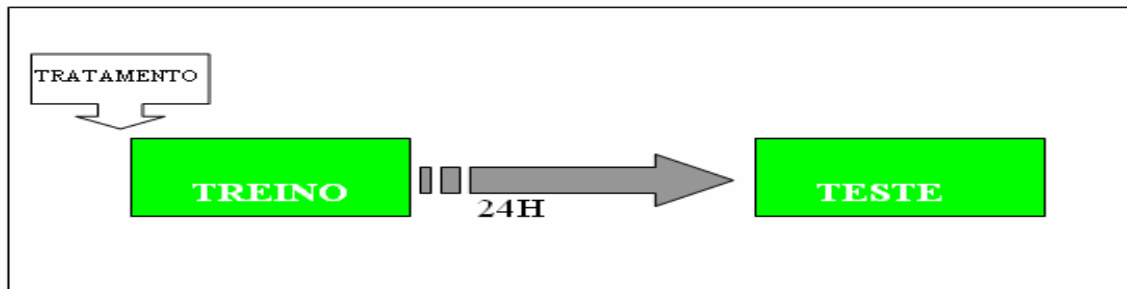


FIGURA 19. EFEITOS DO AM251 E ANANDAMIDA NA TAREFA DA ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA.

Dados expressos em mediana e intervalos interquartis (sessão de treino em branco e de teste em cinza). N de 8-14 por grupo. O teste de ANOVA de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa entre as sessões de treino ( $P=0,986$ ).

Não houve diferença significativa entre as sessões de teste ( $P=866$ , teste de ANOVA de Kruskal-Wallis)

(a) diferença significativa entre as sessões de treino e teste.

4.2. *Efeitos da administração intrahipocampal bilateral imediatamente pós-treino de AM25, na tarefa de Esquiva Inibitória*

Animais infundidos na região dorsal do hipocampo, imediatamente após treino, com o AM251 na dose de 5,5ng/lado, ou seu veículo (TFS/DMSO 8%): a Figura 20 mostra os dados expressos como mediana [intervalos interquartis], adequados a uma análise estatística não-paramétrica, uma vez que sua distribuição não é normal ( $P > 0,05$ , teste de Kolmogorov-Smirnov). O diagrama esquemático abaixo, ilustra o protocolo experimental utilizado.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as latências de descida da plataforma da sessão de *treino* ( $P > 0,05$ , teste de ANOVA de Kruskal-Wallis), o que permite comparar os diferentes grupos.

Em todos os grupos, a latência do treino diferiu significativamente da do teste, mostrando que estes animais aprenderam adequadamente a tarefa ( $P < 0,05$ , teste de Wilcoxon).

Houve diferença estatisticamente significativa entre as latências da sessão de *teste* dos diferentes grupos ( $P = 0,015$ , teste de Mann-Whitney).

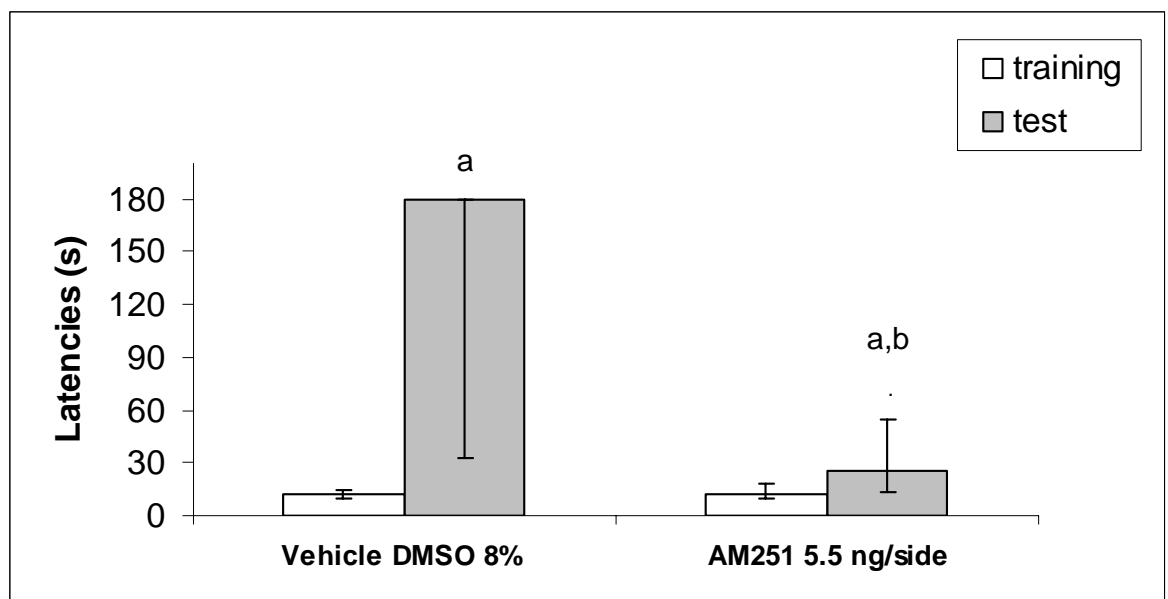
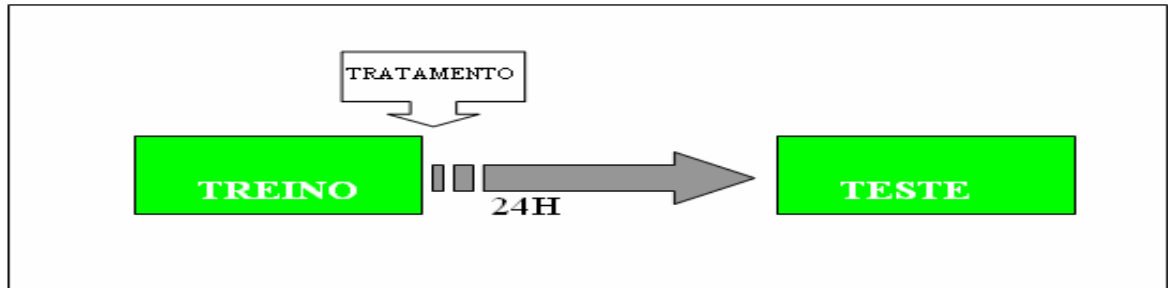


FIGURA 20. EFEITOS DO AM251 E ANANDAMIDA NA TAREFA DA ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA.

Dados expressos em mediana e intervalos interquartis (sessão de treino em branco e de teste em cinza). N de 15 e 16 por grupo. O teste de Mann-Whitney não mostrou diferença significativa entre as sessões de treino ( $P=0,861$ ).

(a) diferença significativa entre as sessões de treino e teste.

(b) o grupo tratado com AM251 apresentou diferença em relação ao grupo controle na latência de descida na sessão de teste ( $P=0,015$ , teste de Mann-Whitney).

4.3. *Efeitos da administração bilateral intrahipocampal, imediatamente **pós-treino**, de **anandamida**, na tarefa de Esquiva Inibitória*

Animais infundidos na região dorsal do hipocampo, imediatamente após o treino, com a anandamida nas doses de 0,17, 1,75 ou 17,5ng/lado, ou seu veículo (TFS/DMSO 8%): a Figura 21 mostra os dados expressos como mediana [intervalos interquartis], adequados a uma análise estatística não-paramétrica, uma vez que sua distribuição não é normal ( $P>0,05$ , teste de Kolmogorov-Smirnov). O diagrama esquemático abaixo, ilustra o protocolo experimental utilizado.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as latências de descida da plataforma da sessão de **treino** ( $P>0,05$ , teste de ANOVA de Kruskal-Wallis), o que permite comparar os diferentes grupos

Em todos os grupos, a latência do treino diferiu significativamente da do teste, mostrando que estes animais aprenderam adequadamente a tarefa ( $P<0,05$ , teste de Wilcoxon).

Houve diferença significativa entre as latências na sessão de teste dos grupos ( $P=0,037$ , teste de ANOVA de Kruskal-Wallis). O teste Post-hoc de Mann-Whitney mostrou que apenas as duas doses mais baixas (0,17 e 1,75ng/lado,  $p=0,009$  e  $0,043$ , respectivamente) apresentaram esse efeito, e não a dose maior (17,5ng/lado) ( $P=0,253$ ).



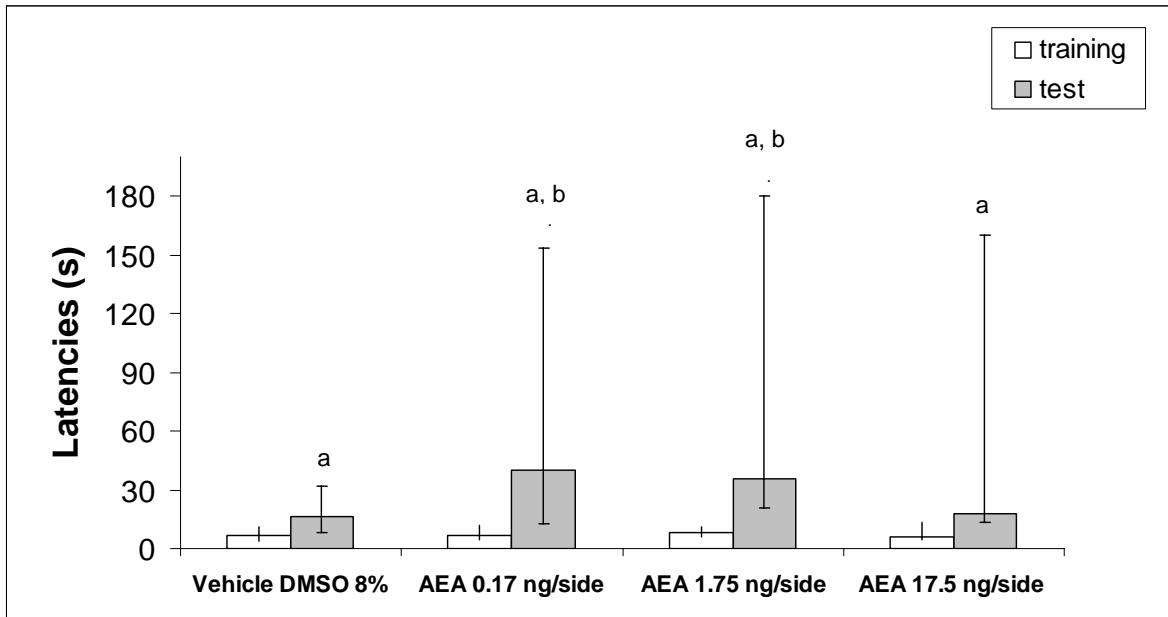
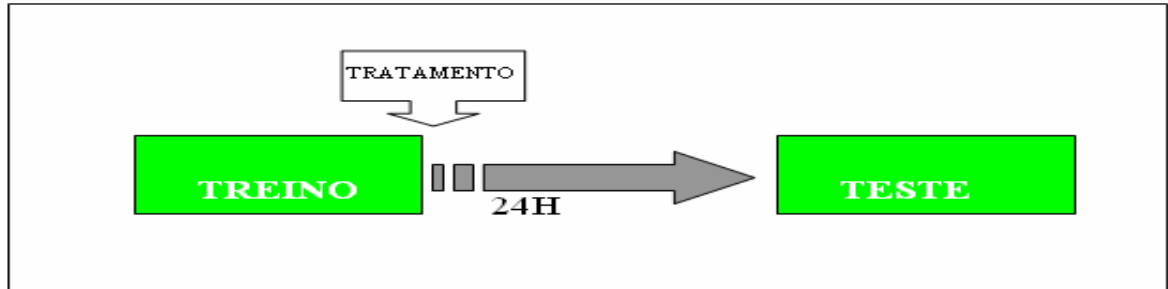


FIGURA 21. EFEITOS DA ANANDAMIDA NA TAREFA DA ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA.

Dados expressos em mediana e intervalos interquartis (sessão de treino em branco e de teste em cinza). N de 10-22 por grupo. O teste de ANOVA de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa entre as sessões de treino ( $P=0,921$ ).

(a) diferença significativa entre as sessões de treino e teste.

(b) os grupos tratados com as menores doses de anandamida (0,17 e 1,75ng/l) apresentaram diferença em relação ao grupo controle na latência de descida da plataforma na sessão de teste ( $P=0,009$  e  $0,043$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney).

#### 4.4. Efeitos da administração intrahipocampal bilateral **pré-teste** de **AM251** e de **anandamida** na tarefa de Esquiva Inibitória

Animais infundidos na região dorsal do hipocampo, 15 minutos antes do teste, com o AM251 na dose de 5,5ng/lado, **ou** com a anandamida nas doses de 1,75ng/lado, ou seu veículo (TFS/DMSO 8%): a Figura 22 mostra os dados expressos como mediana [intervalos interquartis], adequados a uma análise estatística não-paramétrica, uma vez que sua distribuição não é normal ( $P > 0,05$ , teste de Kolmogorov-Smirnov). O diagrama esquemático abaixo, ilustra o protocolo experimental utilizado.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as latências de descida da plataforma da sessão de **treino** ( $P > 0,05$ , teste de ANOVA de Kruskal-Wallis), o que permite comparar os diferentes grupos

Em todos os grupos, a latência do treino diferiu significativamente da do teste, mostrando que estes animais aprenderam adequadamente a tarefa ( $P < 0,05$ , teste de Wilcoxon).

O teste de ANOVA de Kruskal-Wallis revela uma diferença entre os grupos ( $P = 0,02$ ). O teste Post-hoc de Mann-Whitney indicou que o grupo que recebeu AM251 teve um tempo significativamente maior de latência de descida da plataforma, ( $P = 0,004$ ), mas não o grupo que recebeu anandamida ( $P = 0,549$ ), ambos quando comparado com o grupo controle.

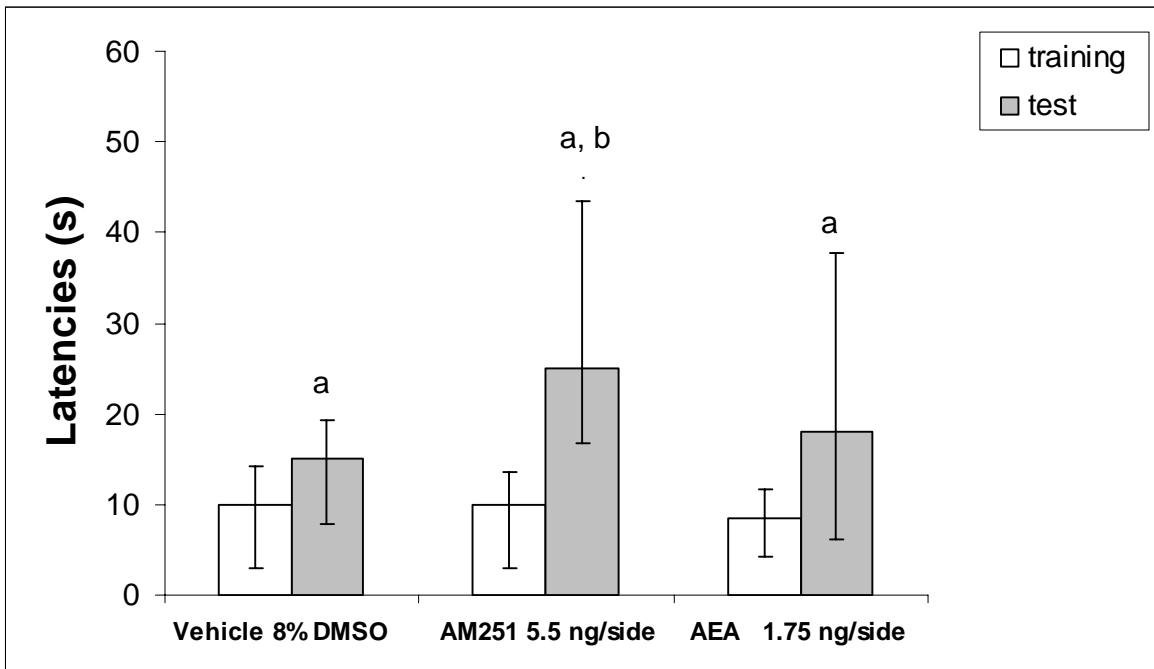
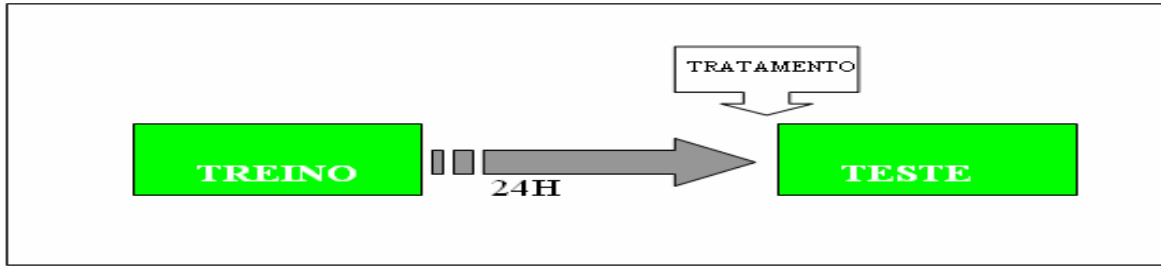


FIGURA 22. EFEITOS DO AM251 E ANANDAMIDA NA TAREFA DA ESQUIVA INIBITÓRIA SOBRE A EVOCÇÃO DA MEMÓRIA.

Dados expressos em mediana e intervalos interquartis (sessão de treino em branco e de teste em cinza). N de 8-17 por grupo. O teste de ANOVA de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa entre as sessões de treino ( $P=0,838$ ).

(a) diferença estatisticamente significativa entre as sessões de treino e teste.

(b) somente o grupo tratado com AM251 apresentou diferença em relação ao grupo controle na latência de descida na sessão de teste ( $P=0,004$ , teste de Mann-Whitney).

4.5. *Efeitos da administração intrahipocampal bilateral imediatamente **pré-treino** de **AM251** e de **anandamida** sobre a deambulação na caixa de Habituação ao Campo Aberto*

Os resultados estão apresentados na Figura 23. O grupo que recebeu anandamida em sua dose mais alta (17,5ng/lado), AM251 ou o grupo controle, injetados 15min antes da sessão de teste do campo aberto não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $P=0,646$ , teste de ANOVA de uma via).

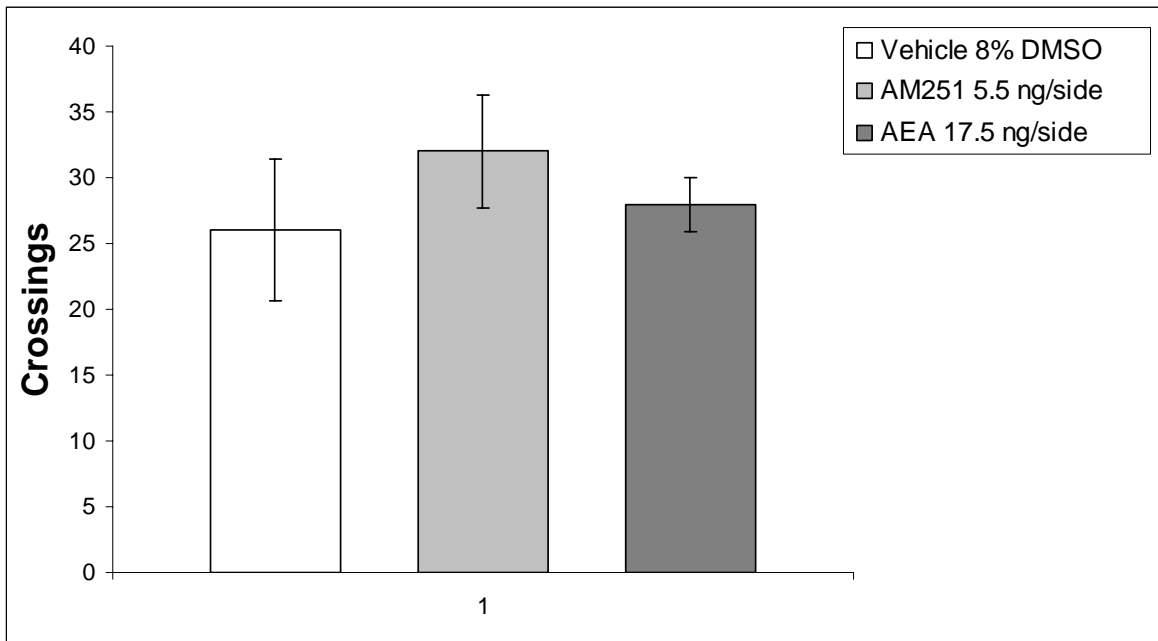
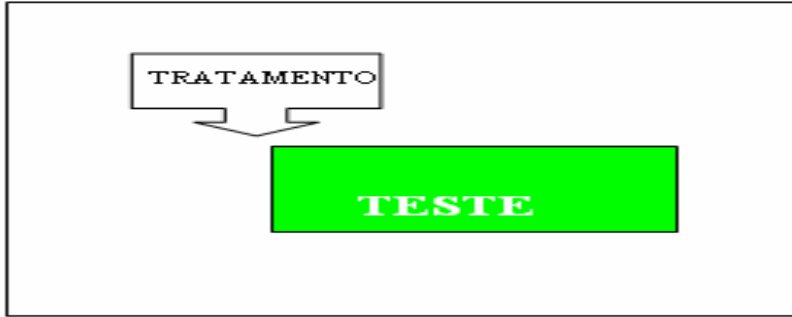


FIGURA 23. EFEITOS DO AM251 E ANANDAMIDA SOBRE O DESEMPENHO MOTOR NA TAREFA DA HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO.

Dados expressos em média e erro padrão da média do número de cruzamentos. O teste de ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos ( $P=0,646$ ). N por grupo: 10-11.

#### 4.6. Efeitos do **AM251** sobre a indução da Potenciação de Longa Duração:

A figura 24 mostra o curso temporal minuto a minuto antes e depois do trem de estímulo. Registros dos tempos -10, -5 e 0min antes do estímulo tetânico e 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50min após o trem de estímulo foram analisados pelo teste de ANOVA de medidas repetidas para comparar os registros das fatias tratadas com AM251 0,2uM ou seu veículo DMSO8%: existe diferença significativa entre os grupos ( $P=0,010$ ) e dentro deles, sobre o tempo ( $P=0,000$ ).

O grupo controle induziu uma potenciação do PEPS de  $107,4 \pm 4,9\%$ , enquanto o grupo que recebeu AM251 não induziu LTP, ficando praticamente no mesmo nível da resposta basal anterior ao estímulo tetânico ( $3,3 \pm 1,1\%$ ).

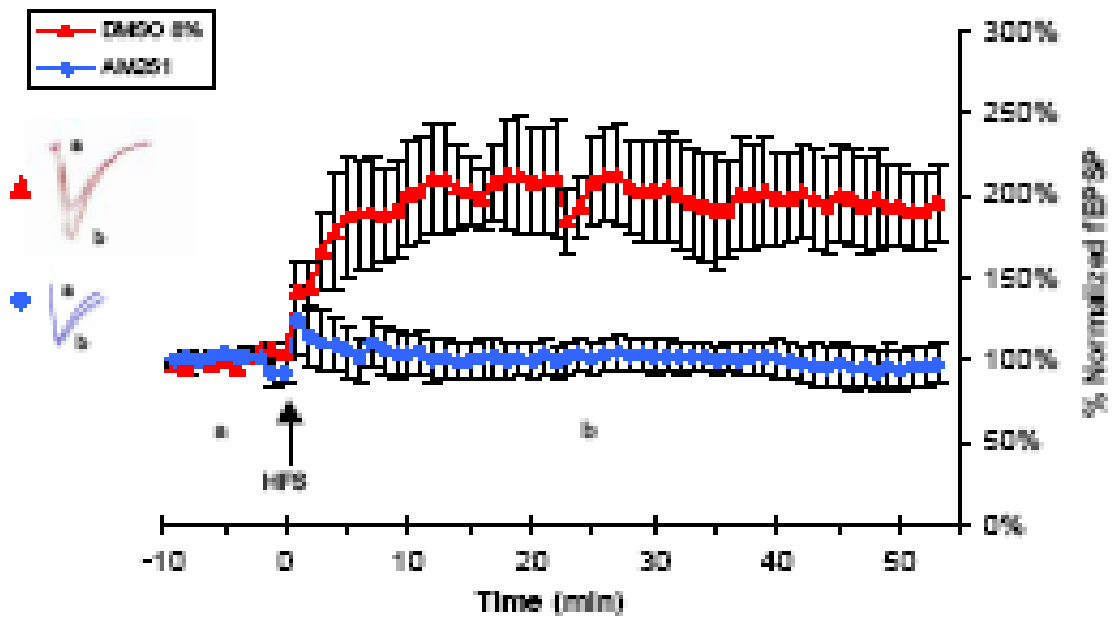


FIGURA 24. EFEITOS DO AM251 SOBRE A LTP.

(A) resposta basal dos PEPS antes do estímulo tetânico (seta preta).

(B) resposta dos PEPS após o trem de estímulo. Cada triângulo ou losângulo representa a resposta a cada min dos grupos controle (n=4) e tratado (n=5), respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados, mostrados nas Figuras 19 a 24, mostram que o bloqueio seletivo dos receptores CB1 (pela AM251) no hipocampo dorsal de ratos foi capaz de (a) impedir a *consolidação* (Figura 20), (b) facilitar a *evocação* (Figura 22), mas (c) não teve efeito sobre a *aquisição* da tarefa aversiva de Esquiva Inibitória (Figura 19), (d) nem sobre a *deambulação* no campo aberto (Figura 23). Interpreta-se que o AM251 está impedindo a operação normal do sistema canabinóide endógeno, que participa da modulação destas memórias. Por outro lado, a infusão de quantidades adicionais de um dos próprios agonistas endógenos - a anandamida, (e) causou facilitação da *consolidação* da memória (quando em baixas doses – Figura 21), porém (f) não teve qualquer efeito sobre a *aquisição* (Figura 19), a *evocação* (Figura 22) desta memória, nem sobre a *deambulação* no campo aberto (Figura 23). Consistente com os resultados “a” acima (e possivelmente com “e” também), o antagonista AM251, em concentração semelhante àquela que teve efeito amnésico, foi capaz de inibir a indução da potenciação de longa duração na região CA1 do hipocampo, também alvo das infusões nos estudos comportamentais (Figura 24).

Nossos resultados mostram que nem o antagonista seletivo para os receptores CB1 AM251, nem o canabinóide endógeno anandamida participam de forma decisiva quando administrados na região CA1 do hipocampo dorsal no processo de aquisição da memória na tarefa da esquiva inibitória em ratos. Esses dados contrastam com resultados encontrados em outros laboratórios, os quais encontraram um efeito amnésico com a administração de agonistas canabinóides antes do treino: Pamplona *et al.*, em 2006, encontraram efeito



amnésico com a administração sistêmica de WIN55212-2 na tarefa do medo condicionado contextual (vale a pena lembrar que apesar da administração ser sistêmica, é uma tarefa dependente de hipocampo) (Pamplona *et al.*, 2006); um outro trabalho, onde a diferença é mais intrigante, é o do grupo de Daniela Barros, pois foi utilizado o mesmo protocolo, com as mesmas doses de anandamida, na mesma estrutura, e encontrou-se um efeito amnésico (Barros *et al.*, 2004). Por outro lado, dois estudos recentes encontraram efeitos facilitatórios com um inibidor da enzima FAAH (que degrada a anandamida) sobre o labirinto aquático de Morris (Varvel *et al.*, 2006), ou um efeito amnésico utilizando o AM251 na tarefa do medo condicionado contextual (Arenos *et al.*, 2006). Uma hipótese para essa gama de resultados (os quais demonstram efeitos desde amnésicos até facilitatórios sobre a aquisição da memória) pode ser *a dose utilizada*: Barros e Pamplona encontraram em seus trabalhos um efeito amnésico com as doses mais altas, ou seja, com uma probabilidade maior de estarem se ligando em sítios inespecíficos (ou saindo da “janela fisiológica” na qual funcionaria o sistema canabinóide endógeno). Os outros dois trabalhos citados, os quais sugerem que os endocanabinóides facilitam a aquisição de uma informação, parecem mimetizar melhor um ambiente fisiológico (utilizando antagonistas e inibidores da enzima que degrada a anandamida).

O antagonista AM251 prejudicou a consolidação da memória quando administrado no hipocampo imediatamente após o treino, resultado que reproduzimos de um trabalho realizado em nosso laboratório (de Oliveira Alvares *et al.*, 2005). Nesse trabalho fizemos uma curva dose resposta, na qual nos baseamos para os experimentos em outras fases da memória deste presente estudo.

O endocanabinóide anandamida, em baixas concentrações, facilitou a consolidação da memória na tarefa da esQUIVA inibitória (e não houve efeito na concentração mais alta).

Nós propomos que logo após o treino, canabinóides endógenos sejam produzidos e liberados no hipocampo, aparentemente pelos próprios neurônios piramidais pós-sinápticos (glutamatérgicos – Wilson & Nicoll, 2002), atingindo os receptores CB1 localizados nos terminais pré-sinápticos gabaérgicos. Desta forma, inibe-se a liberação de GABA, facilitando, então, a transmissão sináptica no hipocampo. Quando os receptores CB1 são bloqueados pelo antagonista AM251, a inibição gabaérgica fica desbloqueada, prejudicando a transmissão glutamatérgica do hipocampo, e desta forma, comprometendo a formação da memória. A administração de baixas doses de anandamida utilizada nesse experimento, mimetizaria a liberação endógena do endocanabinóide, facilitando de forma semelhante à transmissão hipocampal glutamatérgica, essencial para a formação do traço de memória. Ver Figura 8, da Introdução, para fins ilustrativos, bem como a Figura 25, abaixo:

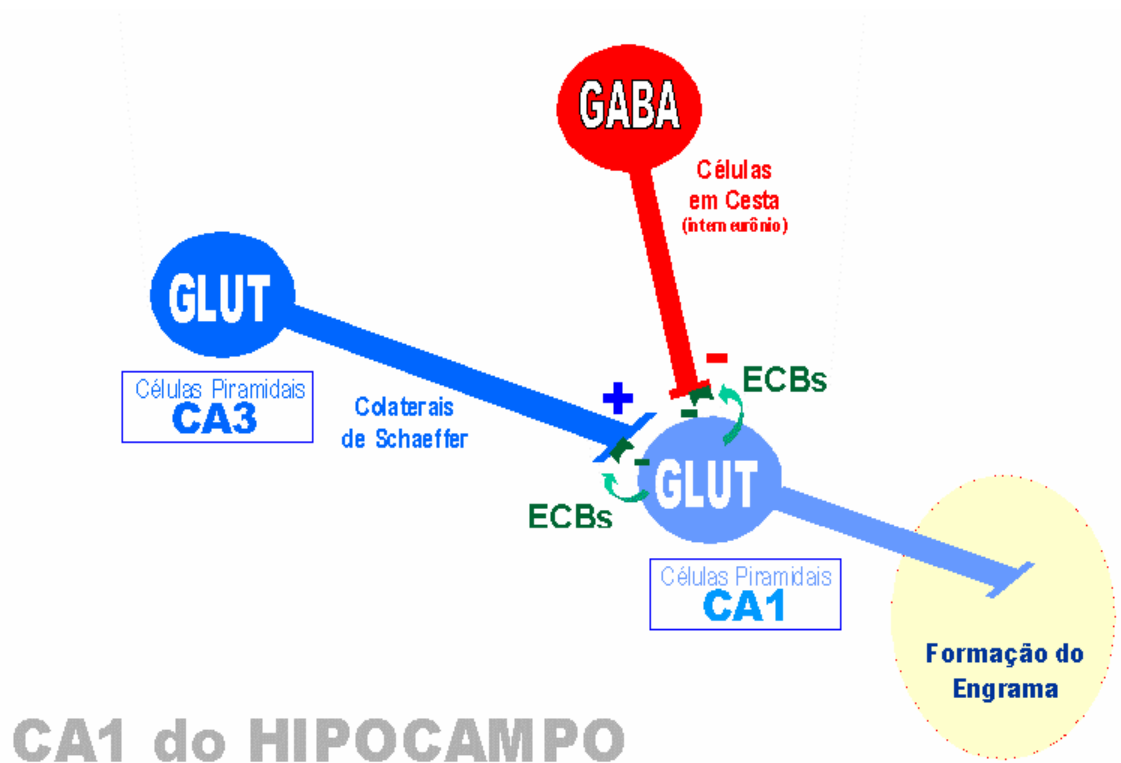


Figura 25 – modelo proposto – Explicações no texto.

É importante lembrar a localização neuroanatômica dos receptores CB1 para entender algumas diferenças sutis entre os resultados. Até muito pouco tempo atrás, era consenso entre os pesquisadores que os receptores CB1 estavam localizados exclusivamente em terminações inibitórias no hipocampo (Katona *et al.*, 1999, Wilson & Nicoll 2002, Tsou *et al.*, 1999). Em 2006, três grupos independentemente demonstraram a existência de receptores CB1 também em terminações glutamatérgicas no hipocampo, apesar de terem uma concentração em torno de 20x menor do que em interneurônios (Katona *et al.*, 2006; Takahashi & Castillo, 2006, Kawamura *et al.*, 2006). Até então a

explicação para a inibição de glutamato com a administração de agonistas canabinóides ficava por conta de receptores não-CB1, não-CB2, também chamados de CB3, ou devido a ligações em receptores *baunilhóides* - os quais também são ativados por canabinomiméticos (Hajos *et al.*, 2001; Hajos & Freund, 2002). Com esse quadro, podemos especular o porquê da ausência de efeitos da anandamida em sua maior dose e também de doses altas de AM251 (de Oliveira Alvares *et al.*, 2005).

Sobre a evocação da memória, nossos resultados mostraram que a administração intrahipocampal de anandamida não apresentou diferença significativa em comparação ao grupo controle. Porém o antagonista AM251 mostrou uma facilitação sobre a evocação da memória nessa tarefa aversiva da esquiva inibitória. Supostamente os processos de consolidação da memória e evocação ocorrem em células e sinapses semelhantes, e, apesar disso, possuem efeitos opostos. Sabe-se que tanto para o evento de consolidação da memória, como de evocação, a ativação da circuitaria hipocampal glutamatérgica é necessária. Pode-se conjecturar que essas vias glutamatérgicas são os “pilares fundamentais” para a transmissão neuronal de forma geral (inclusive nos processos de memória), e que os outros sistemas de neurotransmissão atuam como atores para modular esse sistema (o sistema gabaérgico está num nível igualmente importante, controlando intrinsecamente o sistema glutamatérgico). Sendo assim, uma hipótese para essa mudança é de que ocorra durante o aprendizado uma modificação plástica no sentido da eficiência sobre o controle da liberação da relação GABA/glutamato para que esta seja diminuída, ou seja, atuando em favor da inibição glutamatérgica (não ousa especular quais modificações plásticas de fato ocorrem, dessensitização dos receptores CB1 dos terminais gabaérgicos, incorporação de receptores CB1 em terminações glutamatérgicas, etc.). Resultados

semelhantes foram encontrados com o sistema colinérgico muscarínico (cujo ator principal parece ser o receptor M<sub>4</sub>) (Diehl *et al.*, 2007).

Apesar de a literatura apresentar resultados aparentemente contraditórios, muito pouco foi feito utilizando agonistas ou antagonistas seletivos para os receptores CB1 sobre os processos de memória administrando-os diretamente no hipocampo em tarefas aversivas.

A administração sistêmica de agentes canabinóides nos impede de concluir com precisão as funções do sistema canabinóide devido a grande quantidade de receptores CB1 presentes em todo o SNC, e assim, interferindo com muitos sistemas de neurotransmissores /neuromoduladores, e sobre diferentes processos mentais. De fato, em diversas estruturas encefálicas, o sistema canabinóide produz uma vasta gama de efeitos distintos (antinociceptivos, motores, sobre o apetite alimentar, atenção, entre outros), os quais podem ser de difícil interpretação quanto à causa da mudança comportamental observada. Por essa razão, um método mais seguro de se investigar o sistema canabinóide, é através de microinjeções de agonistas e antagonistas canabinóides em estruturas específicas relacionadas com a função mental a ser estudada.

Para tentar eliminar parcialmente tais dificuldades, fizemos um controle motor, utilizando os mesmos agentes canabinóides (e nas mesmas doses efetivas) usados nas tarefas de memórias neste trabalho. Nossos resultados mostraram uma ausência de efeitos motores. Ou seja, pelo menos no hipocampo (como era de se esperar) o sistema canabinóide não afeta o controle motor dos animais, tornando a interpretação dos resultados mais seguras.

Uma possível explicação para a diferença de resultados encontrados em relação a vários autores com agonistas canabinóides (Molina-holgado, 1995, Lichtman 1995 e 1996) (geralmente pré-treino), os quais encontraram déficit de memória em tarefas semelhantes à esquiva inibitória, seria a interferência dos canabinóides com outros sistemas (outros alvos bioquímicos e/ou outras estruturas), o que seria de se esperar, já que a maioria destes trabalhos foi realizado com administração sistêmica. Por exemplo, um rato sob efeito de canabinomiméticos no momento da aprendizagem na esquiva inibitória, não perceberia o choque da mesma forma que o grupo controle percebeu (devido ao efeito antinociceptivo), o que resultará na menor importância atribuída à informação do choque. Ou seja, na hora do teste, o rato tratado irá descer mais rapidamente porque o choque nas patas não foi tão marcante como foi para o grupo controle. Portanto, é muito provável que os resultados com administrações sistêmicas de agonistas canabinóides, além da dose adicional exógena, envolvam efeitos simultâneos em diferentes estruturas, onde ações em uma região podem ser contrabalançadas por ações noutra(s) parte(s).

A aparente existência de um terceiro receptor canabinóide – o “CB3” - como sugeriram Wilson e Nicoll (2002) pelo fato de alguns agentes canabinóides marcados se ligarem em receptores em camundongos nocaute para CB1 - também poderia explicar as diferenças de resultados entre diversos autores (devido a afinidades distintas dos fármacos a cada um desses receptores).

Mesmo que a onipresença de receptores CB1 no SNC implique em dificuldades de interpretação de experimentos sobre memória em modelos animais, é inegável que a administração sistêmica também atua sobre o hipocampo. E sendo assim, acreditamos que,

em algum grau, o déficit de memória apresentado nos resultados com agonistas canabinóides seja causada por influências sobre receptores dessa estrutura. Porém, isso só ocorreria com administrações exógenas, que além de inibir a liberação de GABA no hipocampo, também inibiria a liberação de neurotransmissores excitatórios, atuando sobre outro receptor, como sugere Hajos e colegas (2002), que demonstraram uma redução da LTP com a administração do agonista canabinóide WIN55,212-2 em camundongos nocaute para receptores CB1 (Hajos & Freund, 2002). Em concentrações fisiológicas, os endocanabinóides atuam nos receptores CB1, presentes principalmente em terminais pré-sinápticos de neurônios gabaérgicos no hipocampo, inibindo sua liberação e, dessa forma, deixando desinibidas as vias glutamatérgicas importantes para a formação da memória.

Nossos resultados no experimento eletrofisiológico mostraram que o antagonista AM251 inibiu a indução da potenciação de longa duração em fatias de hipocampo. Esses achados são condizentes com os resultados obtidos por Carlson (2002), em que os endocanabinóides facilitam a LTP no hipocampo através do comprometimento da transmissão gabaérgica (nesse estudo ele demonstrou o fenômeno DSI, e conseqüentemente desinibindo os neurônios piramidais). Hajos e Freund (2002), utilizando técnicas de fixação de membrana de célula inteira (*patch clamp whole cell / voltage clamp*), demonstraram que o agonista CB1 WIN55212-2 bloqueia correntes inibitórias pós-sinápticas (IPSC, do inglês inhibitory postsynaptic currents) em concentrações 10x menores do que para inibir correntes excitatórias pós-sinápticas (EPSC). Nesse mesmo estudo, eles demonstraram que o AM251 inibiu os efeitos do WIN55212-2 sobre o IPSC, mas não sobre o EPSC, sugerindo então que a inibição excitatória do agonista canabinóide WIN55212-2 fosse mediada pelo receptor “CB3” (Hajos *et al.*, 2001; Hajos & Freund, 2002).

A LTP é um excelente modelo para compreender quais sistemas de neurotransmissão e cascatas bioquímicas estão envolvidas na formação da memória. Desde o primeiro artigo descrevendo o fenômeno, já se especulava que poderiam ser estes os mecanismos celulares/moleculares do aprendizado e da memória (Bliss & Lømo, 1973). Desde então inúmeras evidências vêm reforçando essa tese através de correlações entre a LTP e a formação da memória (inclusive os resultados encontrados nesse trabalho; para uma ótima revisão: ver Izquierdo *et al.*, 2006). Acredito que durante o aprendizado ocorra um fenômeno igual ou muito parecido com a LTP no hipocampo – como foi recentemente demonstrado pelo grupo do pesquisador Mark Bear *in vivo* (Whitlock *et al.*, 2006), e esse, se propaga para o córtex. No momento em que essas vias são ativadas (através de dicas sensoriais ou mesmo por outras lembranças), elas respondem de maneira robusta (em consequência de uma facilitação ocorrida durante a formação da memória).



## 6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, procurou-se entender um pouco mais sobre o papel do sistema canabinóide endógeno sobre a neurobiologia da memória, utilizando agonistas endógenos e um antagonista seletivo, um enfoque um pouco diferente de muitos outros, os quais procuravam investigar os efeitos dos canabinóides exógenos sobre a memória. Abaixo estão as conclusões:

6.1. A administração bilateral **pré-treino** de AM251, antagonista seletivo dos receptores canabinóides CB1, ou do agonista endocanabinóide anandamida, na região CA1 do hipocampo, **não causou efeito sobre a aquisição** da memória na tarefa da Esquiva Inibitória em ratos;

6.2. A administração bilateral imediatamente **pós-treino** de **AM251**, antagonista seletivo dos receptores canabinóides CB1 na região CA1 do hipocampo, **teve efeito amnésico sobre a consolidação da memória** na tarefa da Esquiva Inibitória em ratos;

6.3. A administração bilateral **pós-treino** do agonista endocanabinóide **anandamida** em baixas doses na região CA1 do hipocampo, **causou efeito facilitatório sobre a consolidação da memória** na tarefa da Esquiva Inibitória em ratos;

6.4. A administração bilateral **pré-teste** de **AM251**, antagonista seletivo dos receptores canabinóides CB1, na região CA1 do hipocampo, **causou efeito facilitatório sobre a**

**evocação da memória** na tarefa da Esquiva Inibitória em ratos; já o agonista endocanabinóide anandamida não teve efeito pré-teste;

6.5. As doses efetivas de **AM251** ou de **anandamida**, nos experimentos anteriores não afetaram a deambulação dos animais na caixa de Habituação ao Campo Aberto, ou seja, não promovem efeitos motores per se;

6.6. A administração de **AM251**, antagonista seletivo dos receptores canabinóides CB1, **inibiu a indução da LTP** em fatias de hipocampo, consistentemente com os efeitos comportamentais observados, bem como com o papel proposto para esse fenômeno plástico na formação de memórias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alger BE, Teyler TJ. (1976) Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 110(3):463-80.

Ameri, A. (1999) The Effects Of Cannabinoids On The Brain. *Prog Neurobiol* **58**: 315-48

Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ (2006) Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *Eur J Pharmacol* 539:177-183.

Bear, MF., Connors, B.W. E Paradiso, M.A.(2002). *Neurociências: Desvendando O Sistema nervoso*. Segunda edição. Artmed. Porto Alegre.

Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. (2005) The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav.* 81(2):224-38

Bliss TV, Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232(2):331-56.

Bohme GA, Laville M, Ledent C, Parmentier M & Imperato A. (2000) Enhanced Long-Term

Potentiation In Mice Lacking Cannabinoid CB1 Receptors. *Neuroscience*. 95(1):5-7.

Brioni, J. D.; Decker, M. W.; Gamboa, L. P.; Izquierdo, I.; Mcgaugh, J. L. (1990). Muscimol Injections In The Medial Septum Impair Spatial Learning. *Brain Research*, 522, Pp 227-234.

Brioni, J.D. & Izquierdo, I. (1988). Retention Enhancement By Pretest  $\beta$ -Endorphine And Oxotremorine And Its Reversal By Scopolamine. *Behavioral And Neural Biology*, V. 50, P. 251-254,.

Carlson, G., Wang, Y., Alger, B.E. (2002). Endocannabinoids Facilitate The Induction Of LTP In The Hippocampus. *Nature Neurosci*. 5(8): 723-4.

Castellano, C.; Cabib, S.; Palmisano, A.; Di Marzo V.; And Puglisi-Allegra S. (1997). The Effects Of Anandamide On Memory Consolidation In Mice Involve Both D1 And D2 Dopamine Receptors. *Behavioral Pharmacology* 8, Pp. 707–712.

Castellano, C.; Ventura, R.; Caibb, S. And Puglisi-Allegra S. (1999). Strain-Dependent Effects Of Anandamide On Memory Consolidation In Mice Are Antagonized By Naltrexone. *Behavioral Pharmacology*, 10 Pp. 453–457.

Chaperon F & Thiebot MH. (1999) Behavioral Effects Of Cannabinoid Agents In Animals. *Crit Rev Neurobiol*. 13(3):243-81.

Chevalyere V, Castillo PE. (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability.

Neuron. 38(3):461-72.

Childers, S.R., Breivogel, C.S. (1998). Cannabis and endogenous cannabinoid systems. *Drug and alcohol dependence*. 51, 173-87.

Da Cunha, C.; De Paula, L.P.; Medina, J.H. & Izquierdo, I. (1991). The Amnestic Effect Of Pre And Post-Training Intra-Amygdala Muscimol. *Comunicaciones Biológicas*, V.9, P. 219-225.

Da Silva GE, 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

Davies SN, Pertwee RG, Riedel G (2002). Functions Of Cannabinoid Receptors In The Hippocampus. *Neuropharmacology*, 42: 993-1007.

De Almeida, M.A.M.R. & Izquierdo, I. (1984). Effect Of Intraperitoneal And Intracerebroventricular Administration Of ACTH, Epinephrine Or  $\beta$ -Endorphine On Retrieval Of An Inhibitory Avoidance Task In Rats. *Behavioral And Neural Biology*, V. 40, P. 19-22.

De Almeida, M.A.M.R.; Kapczinski, F.P. & Izquierdo, I. (1983). Memory Modulation By Post-Training Intraperitoneal, But Not Intracerebroventricular, Administration Of ACTH Or Epinephrine. *Behavioral And Neural Biology*, V, 39, P. 277-283.

De Oliveira Alvares L, de Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanzotti VB, Quillfeldt JA (2005) Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in

the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83:119-124.

De Oliveira Alvares L, Genro BP, Breda RV, 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* 1075:60-67.

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34(5):605-13.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A & Mechoulam R. (1992) Isolation And Structure Of A Brain Constituent That Binds To The Cannabinoid Receptor. *Science.* 258(5090):1946-9

Diehl F, Furstenu LO, Sanchez G, Camboim C, de Oliveira Alvares L, Lanzioti VB, Cervenansky C, Kornisiuk E, Jerusalinky D, Quillfeldt JA (2006) Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. *Behav Brain Res.* In press.

. Downe, N.M. & Heath, R.W. (1970). *Basic Statistical Methods*. Harper & Row., New York, P. 234-276.

Elphick, M.R., Egertová, M. (2001) the neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 356, 381-408.

Ferrari F., A. Ottani, R. Vivoli And D. (1999). Giuliani , Learning Impairment Produced In

Rats By The Cannabinoid Agonist HU210 In A *Water-Maze Task*. *Pharmacology Biochemistry And Behavior* 64, Pp. 555–561.

Fuster J.,(1995). *Memory In The Cerebral Cortex*. London. MIT Press

Gaoni Y., Mechoulam R.,(1964). Isolation, Structure And Partial Synthesis Of Na Constituent Of Haxish. *J. Am. Chem. Soc.*86, 1647-47

Gold, P.E. & Delanoy, R.I. (1981). Acth Modulation Of Memory Storage Processing. IN *Endogenous Peptides And Learning And Memory Processes*. Martinez, J.L.; Jensen, R.A. Messing. R.B.; Rigter, H.; Mcgaugh, J.L., Eds, New York, Academic Press, P. 79-98.

Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. (1999) Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 57(4):417-23.

Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE (1998). Dual Effect Of Anandamide On NMDA Receptors-Mediated Responses And Neurotransmission. *J Neurochem* **70**: 671-676.

Hampson, R.E. And Deadwyler, S.A. (1999). Cannabinoids, Hippocampal Function And Memory. *Life Sciences* 65, Pp. 715–723.

Hampson, R.E. And Deadwyler, S.A. (2000). Cannabinoids Reveal The Necessity Of Hippocampal Neural Encoding For Short-Term Memory In Rats. *Journal Of Neuroscience* 20, Pp. 8932–8942

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R.

(2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 98(7):3662-5.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in the rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J Neurosci 11:563-583.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(5):1932-6.

Hillard CJ, Harris RA, Bloom AS. (1985) Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. J Pharmacol Exp Ther. 232(3):579-88.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Ver.54(2):161-202.

Howlett AC. (1984) Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. Life Sci. 35(17):1803-10.



Iversen L. (2001). *Marihuana, Conocimiento Científico Actual*. Ariel.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 2006 Sep;29(9):496-505. Epub 2006 Jul 26

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

Izquierdo, I. & Dias, R.D. (1983 A). Endogenous State-Dependency: Memory Regulation By Post-Training And Pre-Testing Administration Of Acth,  $\beta$ -Endorphine, Adrenaline And Tyramine. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, V. 16, P. 55-64.

Izquierdo, I. & Dias, R.D. (1983 B). Memory As A State Dependent Phenomenon: Role Of Acth And Epinephrine. *Behavioral And Neural Biology*, V. 38, P. 144-149.

Izquierdo, I. & Dias, R.D. (1984). Involvement Of  $\alpha$ -Adrenergic Receptors In The Amnesic And Anti-Amnesic Action Of Acth,  $\beta$ -Endorphine And Epinephrine. *Psychoneuroendocrinology*, V. 9, P. 77-81.

Izquierdo, I. & Dias, R.D. (1985). Influence On Memory Of Posttraining Or Pre-Test Injections Of Acth, Vasopressin, Epinephrine And  $\beta$ -Endorphine, And Their Interaction With Naloxone. *Psychoneuroendocrinology*, V. 10, P. 165-172.

Izquierdo, I. (1979). Effect Of Naloxone And Morphine On Various Forms Of Memory In The Rat: Possible Role Of Endogenous Opiates In Memory Consolidation. *Psychopharmacology*,

V.66, P. 199-203.

Izquierdo, I. (1980). Effects Of A Low And High Dose Of  $\beta$ -Endorphin On Acquisition And Retention In The Rat. *Behavioral Na Neural Biology*, V. 30, P. 460-464.

Izquierdo, I. (1982 A). Role Of Opioid Peptides In Learning, Memory And Retrieval. In *Status Of Centrally Acting Peptides*. Dhawan, B.N., Ed., New York, Pergamon Press, P. 93-100.

Izquierdo, I. (1982 B.) The Role Of Na Endogenous Amnesic Mechanism Mediated By Brain  $\beta$ -Endorphin In Memory Consolidation. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, V. 15, P.119-134.

Izquierdo, I. (1991). Role Of Nmda Receptors In Memory. *Trends In Pharmacological Sciences*, V. 12, P. 128-129.

Izquierdo, I. The Neurobiology Of Memory Consolidation. (1992). *Neurosciences*, N.18, P.1-11.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., De sousa, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, j.H.,(1998 a). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393, 635-636.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., De sousa, M.M., Izquierdo, L.A., Quevedo, J., rodrigues, C., Sant'Anna, M.K.,Madruga, M., Medina, j.H.,(1998 b). Differential involvment of cortical receptor mechanisms in working short- and long-term memory. *Behavioural pharmacology*, 9, 421-427.

Izquierdo, I., Medina, j.H., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A. Barros, D.M.,(1999).Separate

mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain research*, 103, 1-11.

Jentsch, J.D.; Andrusiak, E.; Tran, A.; Bowers M.B.; And Roth R.H. (1997).  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Increases Prefrontal Cortical Catecholaminergic Utilization And Impairs Spatial Working Memory In The Rat: Blockade Of Dopaminergic Effects By HA966. *Neuropsychopharmacology* 16, Pp. 426–432.

Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES & Freund TF. (2000) Gabaergic Interneurons Are The Targets Of Cannabinoid Actions In The Human Hippocampus. *Neuroscience*. 100(4):797-804.

Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*. 26(21):5628-37.

Katona, I, Sperlagh, B, Sik, A, Kafalvi, A, Vizi, ES, Mackie, K, Freund, TF (1999). Presynaptically Located CB1 Cannabinoid Receptors Regulate GABA Release From Axonal Terminals Of Specific Hippocampal Interneurons. *J Neurosci* **19**: 4544–58.

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* 26:2991-3001.

Lichtman, A.H. (2000). SR141716A Enhances Spatial Memory Assessed In A Radial-Arm Maze Task In Rats. *European Journal Of Pharmacology* 404, Pp. 175–179.

Lichtman, A.H. And Martin, B.R. (1996).  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol Impairs Spatial Memory Through Cannabinoid Receptor Mechanism. *Psychopharmacology* 126, Pp. 125–131.

Lichtman, AH, Dimen, KR, Martin, BR (1995). Systemic Or Intrahippocampal Cannabinoid Administration Impairs Spatial Memory In Rats. *Psychopharm* **119**: 282–90.

Mac Donalds, C.J. , Vaughan, C.W. (2001). Cannabinoids act backwards. *Nature*. 410, 527-30.

Mallet And R.J. Beninger , (1996) The Endogenous Cannabinoid Receptor Agonist Impairs Memory In Rats. *Behavioral Pharmacology* 7, Pp. 276–284.

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, DI Marzo V, Lutz B (2002). The Endogenous Cannabinoid System Controls Extinction Of Aversive Memory. *Nature* **418**,:530-34.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346(6284):561-4.

Mcgaugh, J.L.; Liang, K.C.; Bennett, C.; Sternberg, D.B. (1984). Adrenergic Influences On Memory Storage: Interaction Of Peripheral And Central Systems. In *Neurobiology Of Learning And Memory*. Lynch, G.; Mcgaugh, J.L.; Weinberger, N.M., New York, Guilford, P. 313-332.

Mcgaugh, J.L.; Liang, K.C.; Bennett, C.; Sternberg, D.B.(1984). Adrenergic Influences On Memory Storage: Interaction Of Peripheral And Central Systems. In *Neurobiology Of Learning And Memory*. Lynch, G.; Mcgaugh, J.L.; Weinberger, N.M., New York, Guilford, P. 313-332,.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR & Compton DR. (1995) Identification Of An Endogenous 2-Monoglyceride Present In Canine Gut, That Binds To Cannabinoid Receptors. *Biochem Pharmacol.* 50(1):83-90.

Mechoulam R., Fride E., Di Marzo V.(1998) Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.*359:1-18.

Molina-Holgado, F.; Gonzalez M.I. And Leret M.L.(1995), Effect Of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol On Short-Term Memory In The Rat. *Physiology And Behavior* 57 Pp. 177–179.

Morris, R.G.M.; Anderson, E.; Lynch, G.S. & Baudry, M. (1986). Selective Impairment Of Learning And Blockade Of Long-Term Potentiation By An N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist, Ap-5. *Nature*, V. 319, P. 774-776.

Murillo-Rodriguez, E.; Sanchez-Alvarez, M.; Navarro, L.; Martinez-Gonzaluz, D.; Drucker-Colin R.; And Prospero-Garcia, O. (1998), Anandamide Modulates Sleep And Memory In Rats. *Brain Research* 812, Pp. 270–274.

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

Paxinos, G, Watson, C (1998). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, 4th Edition, San Diego: Academic Press.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 301(3):1020-4.

QUILLFELDT, J. (1994). *A Papel Dos Receptores Glutamatérgicos Do Tipo AMPA Na Expressão Da Memória No Córtex Entorrinal E Estruturas Relacionadas*. Porto Alegre: UFRGS. Tese (Doutorado Em Fisiologia) - Instituto De Biociências, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul.

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.

Schwartzkroin PA, Wester K. (1975) Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. *Brain Res.* 89(1):107-19.

Shen, M.X. And Thayer, S.A. (1998). , The Cannabinoid Agonist Win55,212-2 Inhibits Calcium Channels By Receptor-Mediated And Direct Pathways In Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Brain Research* 783, Pp. 77-84.

Siegel, S. (1975). *Estatística Não Paramétrica Para As Ciências Do Comportamento*. Tradução Por Alfredo Alves De Farias. São Paulo: Mcgraw-Hill.

Squire, L. R. (1992). Memory And The Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys And Humans. *Psychological Reviews*, **99**: 195–231.

Squire, L.R. (1987). *Memory And Brain*, New York, Oxford University Press.

Stella,N.;Schweitzer, P. And Piomelli, D. (1997). A Second Endogenous Cannabinoid That Modulates Long-Term Potentiation. *Nature* 388 Pp. 773–778.

Stiglick, A. And Kalant, H.(1982). Learning Impairment In The Radial-Arm Maze Following Prolonged Cannabis Treatment In Rats. *Psychopharmacology* 77, Pp. 117–123.

Stiglick, A. Llewellyn, M.E. And Kalant, H.(1984), Residual Effects Of Prolonged Cannabis Treatment On Shuttle-Box Avoidance In The Rat. *Psychopharmacology* 84 Pp. 476–479.

Takahashi KA, Castillo PE (2006) The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. *Neuroscience* 139:795-802.

Terranova, J.-P.; Michaud, J.-C.; Le Fur,; And Soubrie, P. (1995). Inhibition Of Long-Term Potentiation In Rat Hippocampal Slices By Anadamide And WIN55,212-2: Reversal By SR141716A, A Selective Antagonist Of CB1 Cannabinoid Receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology* 352 Pp. 576–579.

Teyler TJ, Alger BE, Bergman T, Livingston K. (1977) A comparison of long-term potentiation in the in vitro and in vivo hippocampal preparations. Behav Biol. 19(1):24-34.

Teyler TJ, DiScenna P. (1987) Long-term potentiation. Annu Rev Neurosci. 10:131-61.

Tsou K, Mackie K, Sanudo-Pena MC, Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. Neuroscience 93:969-975.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. Science. 310(5746):329-32.

Varvel SA, Wise LE, Niyuhire F, Cravatt BF, Lichtman AH (2006) Inhibition of Fatty-Acid Amide Hydrolase Accelerates Acquisition and Extinction Rates in a Spatial Memory Task. Neuropsychopharmacology. In press

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. Science.313(5790):1093-7.



Wilson RI, Nicoll RA (2002). Endocannabinoid Signaling In The Brain. *Science* **296**: 678-82.

Winkler, J., Suhr, S.T., Gage, F.H., Thal, L.J., Fisher, L.J. (1995). Essential Role Of Acetylcholine In Spatial Memory. *Nature*, 375, 484-487.

## ***Anexo I***

Além desses resultados mostrados, foram feitos muitos outros experimentos, os quais optei por não colocá-los nessa dissertação devido à resultados inconclusivos. O principal fator foi um solvente Tocrisolvent®, o qual tinha um efeito próprio que ‘camuflavam’ os efeitos dos outros fármacos.

## ***Anexo II***

Artigos produzidos com esses resultados.

*Anexo III*

Outros Artigos em que participei durante meu mestrado.