

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

**Estudo sobre a participação dos receptores canabinóides hipocampais na  
retenção da memória de reconhecimento**

Dissertação de Mestrado

Julia Helena Rosauero Clarke

Orientador: Prof. Dr. Iván Izquierdo

Co-Orientador: Prof. Dr. Lia Rejane Müller Bevilaqua

Porto Alegre, Março de 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**

**Estudo sobre a participação dos receptores canabinóides hipocampais na  
retenção da memória de reconhecimento**

**Julia Helena Rosauero Clarke**

**Orientador: Prof. Dr. Iván Izquierdo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Lia Rejane Müller Bevilaqua**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências  
como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, Março de 2008.

Dedico esta dissertação aos meus pais, que sempre me ofereceram apoio e carinho incondicionais e porque são os responsáveis pela formação de todas as doces memórias de longa duração que foram consolidadas desde a minha infância.

## ***Agradecimentos***

Em primeiro lugar, agradeço ao meu professor, orientador e mestre, Iván Izquierdo pela oportunidade que me deu de trabalhar sob sua orientação. Obrigada principalmente pelo exemplo de caráter científico e pessoal e pela atenção e preocupação incondicionais.

Aos professores Lia Bevilaqua e Martín Cammarota pelos conselhos e ensinamentos diários no laboratório e fora dele. Agradeço ainda pela amizade, confiança e liberdade concedida.

Aos meus pais, Dr. Robin e Dra. Nara, que souberam transmitir aos seus filhos o prazer que a pesquisa e a busca pelo conhecimento proporcionam. Mãe e Dad, vocês são o meu exemplo de sabedoria e humildade. Obrigada por me apontarem todos os caminhos possíveis, e por terem deixado que eu escolhesse entre todos eles.

Ao meu irmão, Thomas, que se aproxima muito mais da definição de amigo que da de irmão. Quero ser igual a ti, quando eu crescer.

Aos meus colegas e amigos de laboratório que me ajudaram muito na realização destes e outros experimentos: Janine, Jociane, Ramón, Cristiane, Carolina, Siomara, Natália, Lucas, Gabriela, Juliana, Weber, Fernando, Pâmela, Clarice, Andressa, Izadora e Larissa. Vocês formam o melhor grupo de trabalho que alguém poderia desejar e é excelente fazer parte disto.

Aos membros do Neurolab da PUC-RS pela acolhida nos diversos experimentos de eletrofisiologia que realizei durante o mestrado.

A todos os meus amigos de longa data, pela participação na consolidação da minha personalidade. Em especial: Jú, Aline, Carina, Letícia, Luiza, Rossana e Mariana.

Ao meu namorado, João, que apesar de envolver-se apenas recentemente, contribuiu para este trabalho mais do que pode imaginar.

A todos os demais que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração desta dissertação ou em outros momentos da minha vida.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento da minha bolsa nestes últimos dois anos.

Muito Obrigada  
Julia Helena Rosauo Clarke

*Amor fati*

Escolhe teu destino, ama teu destino

### **Siglas e Abreviaturas**

AC	enzima adenilato ciclase
ACEA	hidrato de araquidonil-2'-cloroetilamida. Agonista seletivo dos receptores CB1
2-AG	<b>2-araquidonil glicerol</b> . Ligante canabinóide endógeno
cAMP	adenosilil monofosfato cíclico. Do inglês: <i>cyclic adenosyl/monophosphate</i>
CA1	corno de Amon 1, região do hipocampo, que os primeiros anatomistas julgaram ter formato semelhante ao chifre presente em algumas representações de Amon, rei dos deuses da cidade de Tebas, na mitologia do Antigo Egito
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CB2	Receptor canabinóide tipo 2
CP-55,940	1R,3R,4R-3-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetilheptilfenil)-4-(3-hidroxipropil)ciclohexan-1-ol. Agonista canabinóide não-específico
$\Delta$ (9)-THC	Delta(9)-Tetrahidrocanabinol
DNA	ácido desoxirribonucléico. Do inglês: <i>desoxirribonucleic acid</i> .
EI	Paradigma da <b>Esquiva Inibitória</b>
FAAH	amidohidrolase de ácidos graxos. Do inglês: <i>fatty acid amido-hydrolase</i>
h	Horas
HU-210	Agonista canabinóide não seletivo
JNK	proteína cinase c-Jun N terminal. Do inglês: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
JWH-015	(2-Metil-1-propil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanona. Agonista seletivo dos receptores CB2
LAM	Paradigma do <b>Labirinto Aquático de Morris</b>
LTP	Potenciação de Longa Duração. Do inglês: <i>Long-term Potentiation</i>

MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno. Do inglês: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mg <sup>2+</sup>	molécula de Magnésio
min	Minutos
mm	Milímetros
NMDA	N-metil-D-aspartado. Do inglês: <i>N-methyl-D-aspartate</i> .
NMDAr	receptor NMDA. Do inglês: <i>NMDA receptor</i> .
PEA	palmitoiletanolamida. Agonista seletivo dos receptores CB2
seg	Segundos
SNC	<b>Sistema Nervoso Central</b>
SR141716A	N-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2, 4-dichlorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida hidrocloreto. Antagonista seletivo dos receptores CB1
STM	Memória de curta de duração. Do inglês: <i>Short-Term Memory</i> .
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro. Do inglês: <i>messenger ribonucleic acid</i> .
RO	Paradigma de avaliação para memória de <b>Reconhecimento de Objetos</b>
VDM-11	(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4-Hidroxi-2-metilfenil)-5,8,11,14-eicosatetraenamida N-(4-Hidroxi-2-metilfenil)arachidonilamida. Inibidor seletivo da receptação celular de anandamida
WIN-55,212-2	R-(+)-[2, 3-Dihidro-5-metil-3[morfolinil]metil-pirrolol[1,2,3]-1, 4-benzoxazinil-(1-naftalenil) metanona mesilato. Agonista canabinóide não específico

***Lista de Tabelas***

Tabela 1. Classificação das Memórias de Acordo com o tempo que perduram....	03
Tabela 2. Classificação das Memórias de Longa Duração de acordo com o conteúdo.....	04
Tabela 3. Infusão de WIN-55,212-2, ACEA ou VDM-11 na região CA1 do hipocampo dorsal não exercem efeito sobre as atividades locomotora e exploratória ou o estado de ansiedade.....	29

## ***Lista de Ilustrações***

Figura 1. Representação planar da estrutura química do canabinóide Delta(9)-Tetrahidrocanabinol.....	06
Figura 2. Representação do subtipo de receptor canabinóide CB1 humano.....	07
Figura 3. Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.....	14
Figura 4. Fotos do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.....	15
Figura 5. Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de Reconhecimento de Objetos.....	17
Figura 6. Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris.....	19
Figura 7. Fotografia de um rato explorando o Campo Aberto.....	21
Figura 8. Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.....	22
Figura 9. A ativação de receptores canabinóides imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração.....	26
Figura 10. A inibição da recaptção de endocanabinóides imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração.....	27
Figura 11. A ativação de receptores canabinóides ou a inibição da recaptção de endocanabinóides imediatamente após o treino não afetam a formação da memória de curta duração.....	28

Figura 12. O efeito amnésico causado pela ativação dos receptores canabinóides imediatamente após o treino não se deve ao estabelecimento de dependência de estado.....	30
Figura 13. A ativação de receptores canabinóides e a inibição da recaptação de endocannabinóides na região CA1 do hipocampo dorsal 24 h antes do treino não afetam a formação das memórias para Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris.....	31
Figura 14. A co-infusão de um antagonista dos receptores CB1 reverte o efeito amnésico da administração hipocampal de WIN-55,212-2 e VDM-11.....	33
Figura 15. O bloqueio dos receptores CB1 imediatamente após o treino não afeta a retenção da memória de longa duração.....	33
Figura 16. A ativação de receptores CB1 imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração.....	34
Figura 17. A ativação de receptores CB2 imediatamente após o treino não afeta a retenção da memória de longa duração.....	35
Figura 18. A co-infusão de AM-251 reverte o efeito amnésico da administração intra-hipocampal de ACEA.....	35

## **Resumo**

Distintas evidências indicam que os endocanabinóides estão envolvidos no processamento de memórias. No entanto, a participação dos distintos subtipos de receptores canabinóides na memória de reconhecimento não é, ainda, muito clara. Esta Dissertação tem como objetivo avaliar as conseqüências da ativação dos receptores canabinóides hipocampais na consolidação da memória de reconhecimento de objetos. Com este intuito, ratos com cânulas estereotáxicamente implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados em uma tarefa de reconhecimento utilizando dois objetos estímulo. A retenção da memória foi avaliada em diferentes tempos após o treino. Para isto, na sessão de teste, um dos objetos apresentados durante o treino foi substituído por um objeto novo. Quando infundidos na região CA1 imediatamente após o treino, o agonista canabinóide não seletivo WIN-55,212-2, e o inibidor da recaptção celular de endocanabinóides VDM-11, impediram a retenção da memória de longa duração de reconhecimento de maneira dose-dependente sem, no entanto, afetar a memória de curta duração, a atividade exploratória e locomotora, o estado de ansiedade nem a integridade funcional do hipocampo. Os efeitos do WIN-55,212-2 e VDM-11 foram completamente revertidos pela co-infusão de AM 251, um antagonista seletivo dos receptores CB1. Ainda, o agonista dos receptores CB1 ACEA, mimetizou os efeitos de WIN-55,212-2 e VDM-11, entanto que a administração intra-hipocampal de dois agonistas diferentes dos receptores CB2, JWH-015 e palmitoiletanolamida, não tiveram efeito algum na retenção da memória em questão. Estes dados indicam que a ativação de receptores CB1 hipocampais imediatamente após o treino bloqueia a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

## ***Abstract***

Evidence indicates that brain endocannabinoids are involved in memory processing. However, the participation of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in recognition memory has not been yet conclusively determined. Therefore, we evaluated the effect of the posttraining activation of hippocampal cannabinoid receptors on the consolidation of object recognition memory. Rats with infusion cannulae stereotaxically aimed to the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained in an object recognition learning task involving exposure to two different stimulus objects. Memory retention was assessed at different times after training. In the test session, one of the objects presented during training was replaced by a novel one. When infused in the CA1 region immediately after training, the non-selective cannabinoid receptor agonist WIN-55,212-2 and the endocannabinoid membrane transporter inhibitor VDM-11 blocked long-term memory retention in a dose-dependent manner without affecting short-term memory, exploratory behavior, anxiety state or the functionality of the hippocampus. The amnesic effect of WIN-55,212-2 and VDM-11 was completely reversed by co-infusion of the CB1 receptor antagonist AM-251 and mimicked by the CB1 receptor agonist ACEA but not by the CB2 receptor agonists JWH-015 and palmitoylethanolamide. These data indicate that activation of hippocampal CB1 receptors early after training hamper consolidation of object recognition memory.

## SUMÁRIO

<b>SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
I.1. MEMÓRIA – DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA .....	1
I.2. CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS .....	2
I.3. O HIPOCAMPO E SEU ENVOLVIMENTO NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS .....	4
I.4. O SISTEMA CANABINÓIDE .....	6
I.5. O SISTEMA CANABINÓIDE E A FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS.....	9
I.6. A TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS .....	10
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
II.1. OBJETIVO GERAL .....	12
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>III. METODOLOGIA.....</b>	<b>14</b>
III.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	14
III.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	14
III.3. MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS .....	15
III.4. PARADIGMA DO RECONHECIMENTO DE OBJETOS .....	16
III.5. TAREFAS COMPLEMENTARES .....	18
<i>III.5.A. Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris.....</i>	<i>18</i>
<i>III.5.B. O Paradigma do Campo Aberto .....</i>	<i>20</i>
<i>III.5.C. O Paradigma do Labirinto em Cruz Elevado .....</i>	<i>21</i>
III.6. DROGAS E INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA .....	22
III.7. CONTROLE HISTOLÓGICO DO LOCAL DAS CÂNULAS-GUIA E INFUSÃO .....	23
III.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>VI. CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>VII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>54</b>

# I. Introdução

## *I.1. Memória – Definição e Importância*

O aprendizado é o processo por meio do qual nós e outros animais adquirimos conhecimento sobre o mundo. No curso da evolução da vida na Terra, o surgimento da capacidade de armazenar informações permitiu que os seres vivos se beneficiassem de experiências passadas para resolver problemas apresentados pelo meio ambiente, tornando-os, assim, mais adaptáveis a mudanças. Coerentemente, verifica-se que os grupos taxonomicamente mais antigos, como os invertebrados, já apresentam alguma capacidade mnemônica. No caso específico dos seres humanos, a memória exerce um papel ainda mais nobre. Funcionando como um arcabouço que armazena nossa história pessoal, torna possível que crescamos e mudemos ao longo da vida (Kandel *et al.*, 2000).

Para que uma memória se forme, primeiramente deve haver a aquisição da informação relativa a esta memória, seja esta decorrente de fontes externas (experiências sensoriais oriundas da interação com o ambiente) ou internas (cognição, emoção). Esta etapa de aquisição corresponde à aprendizagem. Após a aprendizagem, segue a retenção da informação, que pode ser de curta ou de longa duração. Enquanto estiver retida, a informação pode ser recuperada, e esta etapa é também chamada de evocação, sinônimo de lembrança. A retenção de curta duração (minutos, horas) pode ser convertida em memória de longa duração (dias, semanas, anos), pelo processo denominado consolidação, que se inicia imediatamente após a aquisição (McGaugh 2000). Por fim, com o passar do tempo, mesmo as informações mais consolidadas podem desaparecer: trata-se do esquecimento. Atualmente, há extensas evidências de que todas essas funções envolvendo o armazenamento de informações, bem como

outras atividades mentais, emergem como resultado do funcionamento do sistema nervoso central.

De todas as informações processadas pelo sistema nervoso, apenas algumas são de fato retidas por longos períodos. A maioria nem sequer é adquirida, sendo filtrada por mecanismos atencionais e emocionais. Dentre aquelas que são adquiridas, apenas algumas são consolidadas como memórias de longa duração, e mesmo dentre estas, muitas são esquecidas. Apenas as informações mais relevantes para a cognição, mais marcantes emocionalmente, mais focalizadas pela atenção ou mais fortes sensorialmente perduram por longo tempo. Vale citar aqui o escritor argentino Jorge Luis Borges (1899-1986) e seu personagem Funes, do conto “Funes, o Memorioso”. Este último, incapaz de esquecer, tornou-se também incapaz de pensar, pois como Borges mesmo afirma, “...Pensar é esquecer diferenças, é generalizar, abstrair. No abarrotado mundo de Funes não havia senão pormenores,...”. Vale, portanto, frisar que o esquecimento, muito longe de ser reduzido a apenas um vilão ou uma anormalidade das funções mnemônicas do sistema nervoso, na verdade desempenha um papel muito importante como mecanismo de prevenção de sobrecarga nos sistemas cerebrais dedicados à memorização. Sem esquecer, torna-se impossível ignorar detalhes para generalizar alguma coisa, deste modo limitando o pensamento e o raciocínio.

## *1.2. Classificação das Memórias*

As memórias podem ser classificadas de acordo com diversos critérios, como função, conteúdo e tempo de duração. Quanto ao tempo que permanecem armazenadas, as memórias são ditas de curta duração, com duração de poucas horas; de longa duração, com duração de horas ou dias; ou ainda memórias remotas, que são as memórias de longa duração que persistem por muitos meses ou anos (Tabela 1).

	<b><i>Tempo de permanência</i></b>	<b><i>Características</i></b>
<b>Memórias Sensoriais</b>	Poucos segundos	Retêm a breve impressão de um estímulo após este ter desaparecido, ou seja, depois que o sistema sensorial correspondente deixa de enviar informação ao cérebro.
<b>Memórias de Curta Duração (STM)</b>	Poucas horas	Permite manter “na mente” e em um estado ativo e facilmente acessível, uma pequena quantidade de informação.
<b>Memórias de Longa Duração (LTM)</b>	Dias, meses, anos ou até mesmo toda a vida	Contêm informações de índole diversa, os quais se encontram armazenados de maneira mais ou menos permanente constituindo um sistema de arquivo dinâmico.

**Tabela 1. Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram.** (Izquierdo, 2002; ver também McGaugh, 2000).

Quanto ao seu conteúdo, as memórias são chamadas declarativas se forem referentes a fatos, eventos ou conhecimentos que possam ser contados ou relatados por nós; e procedimentais, quando forem referentes a capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais difíceis de serem declaradas ou descritas (Tabela 2). Andar de bicicleta, dirigir um automóvel e digitar são exemplos de memórias procedimentais. As memórias declarativas podem ser subdividas em episódicas ou semânticas. As episódicas são aquelas referentes a eventos aos quais assistimos ou participamos, ou seja, são as memórias autobiográficas. As memórias semânticas carregam informações que são de conhecimento geral, como nosso conhecimento em medicina, língua portuguesa ou história. As memórias, no entanto, não são adquiridas imediatamente na sua forma definitiva, e durante os primeiros minutos ou horas são suscetíveis à

interferência por outras experiências, drogas ou tratamentos (McGaugh, 2000; Izquierdo *et al.*, 2002).

<b>Características</b>		<b>Subdivisões e características</b>	
<b>Explícitas/ Declarativas</b>	Contêm informação que usualmente sabemos que possuímos e à qual temos acesso consciente.	<i>Episódicas</i>	Guardam informação acerca de nossas próprias vidas e eventos.
		<i>Semânticas</i>	Armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos.
<b>Implícitas/ Não-declarativas</b>	Contêm informação à qual não temos acesso consciente, tal como o conhecimento procedimental e a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles produzidos pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação.		

Tabela 2. Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo. (Izquierdo, 2002)

### 1.3. O hipocampo e seu envolvimento na formação de memórias

O hipocampo é uma estrutura encefálica bilateral localizada no lobo temporal e é um importante componente do sistema límbico. Seu nome deriva de seu formato curvado apresentado em secções coronais do cérebro humano, se assemelhando a um cavalo marinho (Grego: *hippos* = cavalo, *kampi* = curva). O hipocampo desempenha um

papel fundamental na formação de memórias de curto e longo prazo (Izquierdo *et al.*, 1998a), e diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com o hipocampo para regular a aquisição e o armazenamento de nova informação (Izquierdo *et al.*, 1998b).

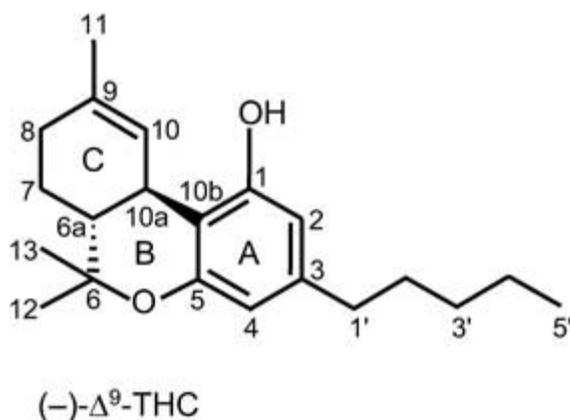
A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais que compreendem diversas fases e que requerem entre três e oito horas. Enquanto esses processos não estiverem concluídos, as memórias de longa duração encontram-se lábeis. O conjunto desses processos e o seu resultado final são chamados consolidação. Os mecanismos neurofisiológicos e neuroquímicos que subjazem os processos mnemônicos são um dos temas mais fascinantes das neurociências e objeto de estudo de pesquisadores há muito tempo.

Acredita-se que a formação de memórias e o aprendizado envolvam alterações na representação neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre os neurônios (Dudai *et al.*, 1989). Estes eventos plásticos podem incluir alterações na estrutura, na distribuição e no número de sinapses e também alterações morfológicas (Rusakov *et al.*, 1997; Woolf, 1998; Geinisman, 2000).

Avaliações neurofisiológicas de pacientes amnésicos e experimentos com animais de laboratório mostraram que a integridade do lobo temporal, que inclui a formação hipocampal, é essencial para o processamento de memórias espaciais e de reconhecimento (Ennaceur e Delacour, 1988; Logothetis e Sheinberg, 1996; Clark *et al.*, 2000; Riesenhuber e Poggio, 2002). Em concordância com estas observações, estudos prévios mostraram que a consolidação da memória de reconhecimento de objetos depende da síntese de proteínas e da iniciação do processo de transcrição do DNA a RNAm (Rossato *et al.*, 2007; Myskiw *et al.*, 2007).

#### 1.4. O Sistema Canabinoide

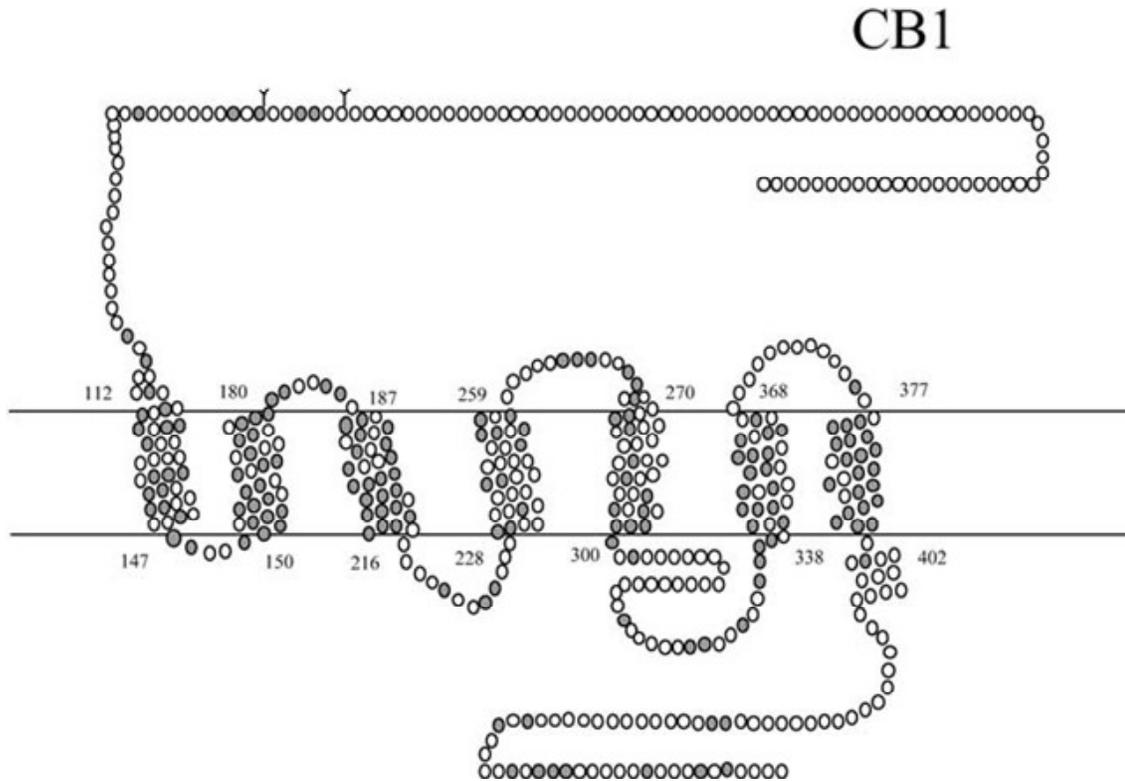
O Delta(9)-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta(9)$ -THC) (Figura 1), identificado em 1964, é considerado o principal constituinte psicoativo da marijuana (*Cannabis sativa*). Entre os diversos efeitos observados após seu consumo estão hipotermia, analgesia, hipoatividade locomotora, inibição da secreção de prolactina e estimulação da liberação de corticotropina. Efeitos cognitivos estão entre os mais onipresentes em relatos de intoxicações agudas com  $\Delta(9)$ -THC.



**Figura 1: Representação planar da estrutura química do canabinoide Delta(9)-Tetrahydrocannabinol.**  
(Pertwee, 2005a).

O interesse dos cientistas pelo  $\Delta(9)$ -THC renovou-se após a descoberta de receptores celulares protéicos para esta molécula. Seus efeitos biológicos se devem à sua interação com dois tipos de receptores protéicos, chamados CB1 (Howlett *et al.*, 1988; Matsuda *et al.*, 1990) e CB2 (Munro *et al.*, 1993) (Figura 2). CB1 e CB2 são receptores acoplados à proteína G, e atuam por meio da inibição da enzima adenilato ciclase celular (Bayewitch *et al.*, 1996; Rhee *et al.*, 1997; Steffens *et al.*, 2004). As cascatas de sinalização reguladas pelo receptor CB1 também levam à ativação das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs; Bouaboula *et al.*, 1995), p38MAPK e JNK (cinase do extremo N-terminal de *c-Jun*; Liu *et al.*, 2000). O

receptor CB1 encontra-se predominantemente no terminal pré-sináptico e sua função parece ser a de modular a liberação de neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, glutamato e serotonina na fenda sináptica (Ishac *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996; Kathmann *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1999).



**Figura 2: Representação do subtipo de receptor canabinoide CB1 humano.** Os aminoácidos em comum com o subtipo CB2 encontram-se sombreados. (Abood, 2005).

Na década de 1990, foram descobertos também canabinóides endógenos, principalmente a anandamida (Devane *et al.*, 1992) e o 2-araquidonil glicerol (2-AG; Mechoulam *et al.*, 1995). Um sistema de recaptção celular altamente específico para estas moléculas foi posteriormente encontrado em neurônios e astrócitos de ratos (Di Marzo *et al.*, 1994; Beltramo *et al.*, 1997). Mecanismos periféricos de recaptção celular da anandamida foram encontrados também em macrófagos e

células endoteliais humanas (Bisogno *et al.*, 1997; Maccarrone *et al.*, 2000). Uma vez no meio intracelular, a anandamida é rapidamente metabolizada a ácido araquidônico e etanolamida pela enzima amidohidrolase de ácidos graxos (FAAH; Cravatt *et al.*, 1996; Deutsch *et al.*, 2001).

A principal e mais conhecida localização dos receptores CB2 em seres vivos é em tecidos não-neuronais, principalmente no sistema imune e células hematopoiéticas. No entanto, a localização exclusivamente periférica dos receptores CB2 já vinha sendo questionada quando, em 2006, Gong e colaboradores confirmaram a existência destes receptores no sistema nervoso, ainda que em proporções bem inferiores àquela dos receptores CB1. Ainda, a concentração destes receptores parece estar aumentada em regiões cerebrais específicas em algumas patologias, como a Doença de Alzheimer (Benito *et al.*, 2003). Já os receptores CB1 estão em menor concentração nos tecidos periféricos, sendo mais recorrentes no Sistema Nervoso Central (SNC). De fato, os receptores CB1 estão entre os receptores metabotrópicos mais abundantes no encéfalo, localizando-se principalmente no hipocampo, córtices, gânglios da base e cerebelo (Herkenham *et al.*, 1991; Jansen *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 2002; Wilson e Niccol, 2002). Com base na distribuição central dos receptores canabinóides, poder-se-ia assumir que a grande maioria, porém não necessariamente a totalidade das funções neurofisiológicas dos endocanabinóides, é controlada por CB1. Há evidências, de fato, de que a ativação de receptores CB1 inibe o processamento de memórias. Os receptores CB1 estão envolvidos na modulação da dor, na resposta motora, na regulação de algumas respostas emocionais, no estresse e em condutas aditivas. A participação do receptor CB1 na modulação dos processos mencionados faz com que estes sejam de grande interesse como possíveis alvos terapêuticos.

### *1.5. O Sistema Canabinóide e a Formação de Memórias*

Impulsionados pelo fato de que os receptores CB1 são tão abundantes em estruturas cruciais para a formação de memórias, diversos grupos têm se dedicado a estudar os efeitos do  $\Delta(9)$ -THC e outros canabinóides sintéticos sobre o processamento de informação. Observaram que o  $\Delta(9)$ -THC prejudica principalmente a formação da memória de trabalho no Labirinto em T (Nava *et al.*, 2000) e no Labirinto Radial (Lichtman e Martin, 1996; Nakamura *et al.*, 1991). Entre os agonistas sintéticos mais utilizados estão o CP-55,940 e o WIN-55,212-2 (Ver Seção *Siglas e Abreviaturas*). Estas drogas tiveram efeitos amnésicos em espécies como macacos (Winsauer *et al.*, 1999; Zimmerberg *et al.*, 1971) e roedores (Mishima *et al.*, 2002). Nestes últimos, inibiram a formação da memória em diversas tarefas (Lichtman *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2000, Hampson e Deadwyler, 2000, Mishima *et al.*, 2002, Barna *et al.*, 2007). Ainda, agonistas canabinóides inibiram a LTP, um provável mecanismo celular para a formação de memórias, *in vitro* (Mereu *et al.*, 2003, Hoffman *et al.*, 2007). A maioria destes trabalhos, no entanto, utiliza via de administração sistêmica e o faz de forma crônica, de modo que não se torna claro qual o real efeito de agonistas canabinóides sobre a formação de memórias no hipocampo e em qual momento da consolidação da memória o déficit ocorre.

A partir da observação de que o SR141716A, um antagonista dos receptores CB1, atenua os efeitos cognitivos danosos causados por agonistas incapazes de distinguir entre os subtipos de receptores canabinóides, surgiu a hipótese de que esses efeitos estariam ocorrendo por uma ação dos canabinóides sobre os receptores CB1 (Lichtman e Martin, 1996, Mallet e Beninger, 1998; Nava *et al.*, 2000; Hampson e Deadwyler, 2000; Pamplona e Takahashi, 2006; Barna *et al.*, 2007). Os efeitos prejudiciais de agonistas canabinóides sobre a LTP também parecem ser revertidos

com a administração de antagonistas CB1 (Terranova *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2007).

Agonistas canabinóides sintéticos específicos para os dois subtipos de receptores e inibidores da recaptção celular de anandamida já foram descritos (Hillard *et al.*, 1999; De Petrocellis *et al.*, 2000; Huffman, 2000; Pertwee, 2000). No entanto, sua ação sobre a formação de memórias ainda não foi estudada. Igualmente, nada se sabe acerca do envolvimento dos receptores CB2 nos processos cognitivos.

### *1.6. A tarefa de Reconhecimento de Objetos*

Em 1950, Berlyne destacou fatores como novidade e curiosidade como prováveis determinantes do comportamento exploratório de roedores. Anos mais tarde, Ennaceur e Delacour (1988) basearam-se nestas observações para propor um paradigma para o estudo da formação de memórias. Este novo paradigma, o Reconhecimento de Objetos (RO), baseia-se na observação de um comportamento exploratório inato destes animais, sem depender de nenhum sistema de recompensa. Outra das vantagens deste paradigma é que não se faz necessário um treinamento preliminar extenso já que o aprendizado se dá após uma única sessão. Recentemente foi descrito um protocolo específico de treinamento na tarefa de RO que, ao contrário de grande parte dos protocolos utilizados previamente, mostrou-se capaz de induzir a formação de uma memória robusta em animais normais, capaz de durar por cerca de 48 horas (Rossato *et al.*, 2007). Este protocolo provou-se muito útil para a avaliação da retenção da memória de reconhecimento de longa duração, e por tal razão foi adotado neste estudo.

Este paradigma, ainda, não expõe o animal a estímulos aversivos (como choque), não requer restrição a alimento ou água e já foi replicado em muitos

laboratórios, utilizando uma grande variedade de aparatos e objetos, tanto com ratos como com camundongos. No caso de estudos em que há administração de agonistas canabinóides, é ainda menos recomendado o emprego de paradigmas que dependam da restrição alimentar. Estas drogas são conhecidas por seu efeito de hiperfágico, e isto poderia interferir no desempenho dos animais ao realizarem a tarefa (Riedel e Davies, 2005).

Devido a todas estas vantagens, a tarefa de RO torna-se uma ferramenta útil para o estudo dos processos neurais e comportamentais envolvidos na formação ou evocação de memórias sem interferir no comportamento natural do animal, e por este motivo foi eleita como paradigma a ser utilizado neste estudo.

## II. Objetivos

### *II.1. Objetivo Geral*

Estudar, especificamente na área CA1 do hipocampo dorsal, o envolvimento dos receptores canabinóides e a ação de agentes canabinomiméticos exógenos no processo de formação da memória para a tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO).

### *II.2. Objetivos Específicos*

Buscar responder as seguintes questões:

1. Estudar o efeito do agonista canabinóide não-seletivo, WIN-55,212-2, em diferentes doses, infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, sobre a formação da memória de longa duração testada 24 h pós-treino.
2. Investigar o efeito do agente inibidor da recaptção celular de canabinóides, VDM-11, em diferentes doses, infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, sobre a formação da memória de longa duração testada 24 h pós-treino.
3. Avaliar se WIN-55,212-2 e VDM-11, infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, impedem a formação da memória de curta duração testada 180 min pós-treino.
4. Analisar se os efeitos de WIN-55,212-2 e VDM-11 sobre a formação da memória de longa duração para a tarefa de RO se devem a uma ação sobre um subtipo específico de receptor canabinóide. Verificar se estes efeitos podem ser revertidos com a co-infusão de um antagonista específico dos receptores CB1.

5. Estudar se os efeitos amnésicos de WIN-55,212-2 e VDM-11 sobre a formação da memória de longa duração na tarefa de RO se devem, na verdade, ao estabelecimento do fenômeno de dependência de estado.
6. Verificar se o agente antagonista de receptores CB1, AM-251, infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, possui efeito *per se* sobre a formação da memória de longa duração testada 24 h pós-treino.
7. Estudar se o agonista dos receptores CB1, ACEA, e os agonistas de receptores CB2, palmitoiletanolamida e JWH-015, infundidos bilateralmente em diferentes doses na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, impedem a formação da memória de longa duração testada 24 h pós-treino.
8. Investigar se o possível efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 do agonista de receptores CB1, ACEA, é revertido com a co-infusão do agente antagonista de receptores CB1, AM-251, imediatamente pós-treino.
9. Verificar se as substâncias amnésicas testadas o fazem devido a uma ação sobre o processo de consolidação da memória ou a uma lesão hipocampal permanente.
10. Analisar se as substâncias testadas, capazes de afetar a retenção da memória relativa ao RO, possuem algum efeito sobre as atividades locomotora e exploratória ou sobre o estado de ansiedade de ratos, 24 h após sua infusão bilateral intra-CA1.

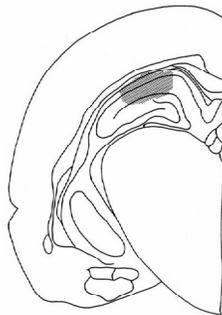
## III. Metodologia

### III.1. Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 2,5 a 3 meses de idade, pesando em média 250 g. Eles foram mantidos em caixas moradias contendo 5 animais por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de 22-24° C) submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h (início do ciclo claro às 7:00 AM), com água e comida *ad libitum*. Os animais foram obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, ou da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e mantidos no biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

### III.2. Procedimento Cirúrgico

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas (A -4.2, L 0.3, V +1.3) do Atlas de Paxinos e Watson (1986) (Figura 3).



**Figura 3. Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. (Paxinos e Watson, 1986).**

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados

com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com xilazina, um sedativo/miorrelaxante/analgésico (“Coopazine”; Coopers), administrados intraperitonealmente (*i.p.*), nas doses de 75mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente (Figura 4). Uma vez recuperados da anestesia, os animais foram recolocados em suas caixas-moradia, e não houve câmbios entre os animais em cada caixa ao longo de todo o experimento.



**Figura 4. Fotos do animal sendo submetido à cirurgia estereotóxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, vista geral do equipamento estereotóxico.**

### ***III.3. Manipulação dos Animais***

Dois a quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por duas sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante 5 min.

### *III.4. Paradigma do Reconhecimento de Objetos*

Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles passam uma maior porção de tempo explorando o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos (Ennaceur e Delacour, 1988), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (Reed *et al.*, 1999; Moses *et al.*, 2005; Mandolesi *et al.*, 2003). O aparato para estudar o reconhecimento de objetos consiste de um campo aberto retangular com 60 cm de comprimento por 40 cm de largura e 50 cm de altura o qual se encontra em uma sala com baixa luminosidade e isolada acusticamente. A parede da frente do campo aberto é construída de vidro, para a melhor observação do animal. Após o procedimento cirúrgico padrão (Ver Seção III.2.), os animais passaram por um processo de habituação à caixa e à sala experimental que teve duração de quatro dias. Tal habituação consistiu de uma sessão comportamental diária com duração de 20 min, na qual os animais eram colocados individualmente no campo aberto para que o explorassem livremente (Akirav e Maroun, 2006; Kelly *et al.*, 2003). Os objetos-estímulo utilizados no RO foram confeccionados em metal, vidro ou cerâmica. Nenhum dos objetos possui significância comportamental para os animais experimentais, os quais não demonstram preferência por nenhum deles, como comprovado em estudos piloto. Os objetos foram presos ao assoalho do campo aberto pela base. A arena do campo aberto, assim como os objetos estímulo, foram limpos com uma solução de etanol a 70 % entre a passagem de cada animal, para garantir a ausência de pistas olfativas. Foram considerados como comportamentos exploratórios os atos de cheirar ou tocar os objetos de estímulo com o focinho ou as patas dianteiras. Sentar-se no objeto, usá-lo como apoio para explorar o ambiente ou permanecer ao redor dele não foram

considerados comportamentos exploratórios. O tempo gasto explorando cada objeto foi medido por um observador e os dados expressos como porcentagem do tempo total de exploração (Figura 5).



**Figura 5. Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de Reconhecimento de Objetos.**

No dia 1 (Sessão de treino), os ratos foram individualmente colocados no campo aberto contendo dois objetos diferentes (A e B) para explorarem livremente durante 5 min. O teste de retenção foi realizado 180 min (para analisar a memória de curta duração) ou 24 h após a sessão de treino (para analisar a memória de longa duração). Nestas sessões de teste de 5 min de duração, os ratos foram individualmente re-introduzidos no campo aberto onde um dos objetos apresentados durante o treino havia sido aleatoriamente substituído por um objeto novo (C). A infusão dos fármacos estudados ocorreu nos seguintes momentos: exclusiva e imediatamente após a sessão de treino, nos experimentos que visaram avaliar os efeitos dos fármacos sobre a retenção da memória de longa duração; ou imediatamente após o treino e 15 min antes

do teste, nos experimentos que objetivaram avaliar um possível efeito de estabelecimento de dependência de estado.

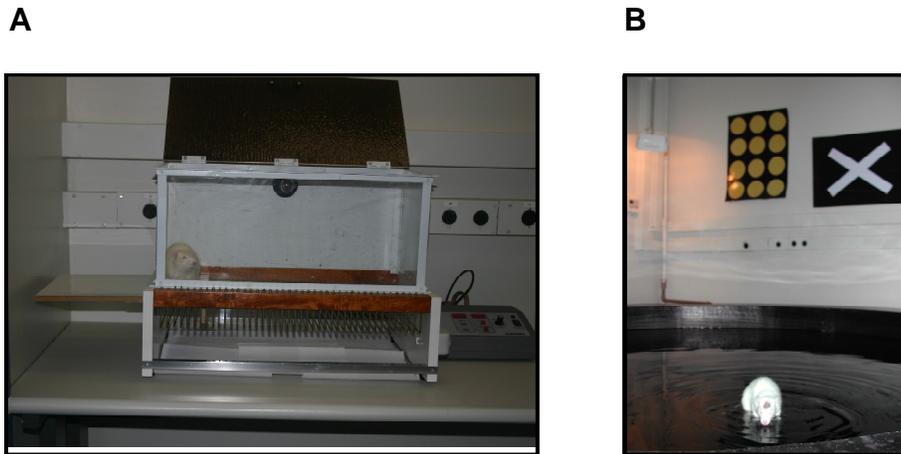
### *III.5. Tarefas Complementares*

#### **III.5.A. Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris**

Para verificar se as intervenções farmacológicas realizadas durante os experimentos no RO poderiam afetar de forma permanente a funcionalidade do hipocampo (em lugar de agir especificamente sobre o processo de consolidação da memória) animais previamente tratados com estas substâncias foram treinados em dois paradigmas distintos cuja memória, para ser formada, depende do funcionamento do hipocampo. Estes paradigmas, amplamente difundidos como métodos para avaliação dos processos mnemônicos, são o Labirinto Aquático de Morris (LAM) e a Esquiva Inibitória (EI) (Rossato *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2008).

O aparato utilizado para o treino em EI consiste em uma caixa de madeira de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico. O assoalho do aparelho é feito de barras de bronze paralelas. No lado esquerdo da caixa, há uma plataforma de 5,0 cm de altura por 7,0 cm de largura. Durante a sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados sobre a plataforma elevada (Figura 6 A). Quando desciam desta, e colocavam as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis, recebiam um choque elétrico de 0,5 mA por 2 seg (Cammarota *et al.*, 2003) sendo imediatamente recolocados nas caixas-moradia. Para avaliar a retenção da memória de esquiva de longa duração, os animais foram submetidos a uma sessão de teste comportamental 24 h após o treino. O procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico àquele empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para ambas as sessões, foram adotados tempos limite para a descida, sendo 20 seg para a sessão de treino e 180 seg para a sessão de teste.

Aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 20 seg foram eliminados do estudo.



**Figura 6. Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris.** Fotografia da caixa de Esquiva Inibitória (A) e do Labirinto Aquático de Morris (B). Note-se o animal sobre a plataforma.

O LAM utilizado em nossos experimentos encontra-se em uma sala ampla, bem iluminada (iluminação indireta) e sem janelas. O labirinto em si consiste de uma piscina circular feita de concreto rebocado e impermeabilizado, pintada da cor preta (2 m de diâmetro e 0,6 m de altura). A piscina está conceitualmente dividida em 4 quadrantes imaginários idênticos. Dois centímetros abaixo da água (mantida entre 21–23°C durante todo o experimento) e oculta da vista do sujeito experimental encontra-se uma plataforma de escape de 12 cm de diâmetro. A superfície da plataforma é áspera para permitir que o animal suba nela assim que a detectar (Figura 6 B). O LAM está rodeado de numerosos elementos claramente visíveis, com cores e motivos contrastantes, ainda que comportamentalmente neutros (figuras, fotografias, desenhos geométricos e abstratos, etc.) pendurados nas paredes da sala. Estes elementos servem como dicas de localização espacial e sua posição pode ser mudada à vontade do experimentador. O treino na versão espacial do LAM consistiu de 1 sessão diária de 8 largadas durante

5 dias. A plataforma de escape foi mantida na mesma posição durante os 5 dias de treino. Cada uma das 8 largadas diárias foi iniciada de uma posição distinta da piscina de acordo com um padrão pseudo-aleatório gerado por um sistema computadorizado desenvolvido em nosso laboratório. A duração máxima da largada foi de 60 seg e se o animal não encontrasse a plataforma neste período de tempo era conduzido até ela pelo experimentador, permanecendo sobre a mesma durante 30 seg. Todas as sessões foram filmadas e as imagens armazenadas em um computador Pentium IV 2.8 GHz, e a diferença entre as latências para encontrar a plataforma de escape no primeiro e no último dia de treinamento foi utilizada como medida de aprendizagem.

### III.5.B. O Paradigma do Campo Aberto

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais utilizou-se um paradigma conhecido como campo aberto. O aparelho empregado para tal fim consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente. O assoalho da caixa é dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície. Durante o experimento, o animal é gentilmente colocado na arena do campo aberto, a qual ele pode explorar livremente por 5 min. Durante este tempo registram-se o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras (em inglês *rearings*), comportamentos que nos roedores denotam exploração (Bonini *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2006) (Figura 7).



**Figura 7. Fotografia de um rato explorando o Campo Aberto.** Observe-se o comportamento de elevação sobre as patas traseiras (“rearing”).

### III.5.C. O Paradigma do Labirinto em Cruz Elevado

Para avaliar o estado de ansiedade dos animais, utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado. Este labirinto consiste em uma plataforma em cruz com 40 cm de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura. Dois braços do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. O animal é colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5 min. Registra-se, então, o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados (naturalmente menos aversivos a roedores) e maior também o número de entradas nestes braços (Bevilaqua *et al.*, 2003; Kerr *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2006) (Figura 8).



Figura 8. Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.

### *III.6. Drogas e Intervenção Farmacológica*

Os compostos farmacológicos a serem testados ou os veículos utilizados na diluição dos mesmos foram infundidos bilateralmente na região de interesse com auxílio de uma bomba de infusão (KDScientific) e micro-seringas Hamilton imediatamente após a sessão de treino no RO, no Dia 1, ou 24 h antes do treino na EI, LAM, Campo Aberto ou Labirinto em Cruz Elevado. O volume administrado foi 0,8  $\mu$ l/lado, para todos os compostos. As cânulas de infusão foram mantidas dentro das cânulas-guia por pelo menos 60 seg após o fim da administração da droga, a fim de evitar refluxo de líquido.

WIN-55,212-2, ACEA, AM-251, VDM-11, JWH-015 e palmitoileanolamida foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Todas as drogas foram dissolvidas em DMSO e diluídas sucessivamente em concentrações decrescentes deste solvente, de forma que a solução infundida possuía concentração final de 0,1% DMSO em salina (pH 7.2). A infusão dos compostos foi realizada à temperatura ambiente e em uma sala com baixa luminosidade. As doses utilizadas foram determinadas em estudos piloto e em resultados prévios encontrados na literatura.

### *III.7. Controle Histológico do Local das Cânulas-Guia e Infusão*

A verificação do posicionamento anatômico das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada *post mortem*. Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, estes receberam 0,8 µl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das mesmas cânulas utilizadas para aplicação das drogas. Quinze minutos depois da infusão, os animais foram sacrificados por decapitação, seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias. Posteriormente, procedeu-se à análise histológica. Somente animais onde a localização da mancha de azul de metileno encontrava-se dentro de um raio de 2 mm do local desejado foram considerados na análise estatística dos dados. (Figura 3).

### *III.8. Análise Estatística*

A análise foi realizada em um computador Pentium IV 2.8 GHz utilizando os softwares Graph-Pad Prisma 4.1 e Microsoft Office Excel. Para a análise dos dados da tarefa de reconhecimento de objetos e para aqueles obtidos no LAM, no campo aberto e no labirinto em cruz foram utilizados testes de estatística paramétrica (ANOVA de uma ou duas vias seguidas do contraste adequado ou teste *t* de Student). Os dados são expressos como média ± erro padrão, e no caso dos gráficos referentes ao RO, são representados como porcentagem do tempo total de exploração de cada objeto naquela sessão de treino ou teste. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

Os dados obtidos na esQUIVA inibitória foram analisados mediante estatística não paramétrica (teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) já que a variável em estudo (i.e. a latência de descida da plataforma) não segue uma distribuição normal nem cumpre com o requerimento de homocedasia (igualdade das

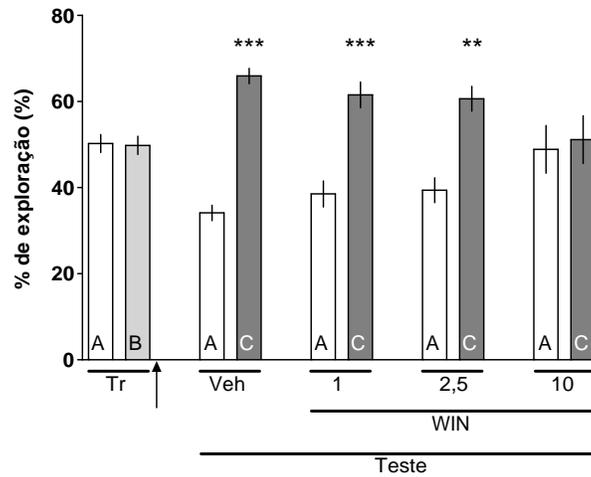
variâncias).

Para cada droga, também foram preparados gráficos que mostram a relação entre a variável %C-%A (diferença entre porcentagem de exploração dos objetos C e A, na sessão de teste) em função da dose testada. As curvas de resposta foram testadas para linearidade a partir de uma análise de regressão linear, e as inclinações encontradas foram calculadas, junto com os seus erros padrão. Uma Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para testar a significância desta inclinação a partir de um teste F da razão entre duas variâncias: (i) a variância associada à regressão linear, e (ii) a variância associada com os resíduos em torno da reta ajustada. Nos testes F foi testada a hipótese nula “a declividade é zero” (que indicaria que a droga não tem efeito sobre a retenção da memória) contra a hipótese alternativa “a declividade não é zero” (que indicaria que a droga tem efeito sobre a retenção da memória). A hipótese nula foi rejeitada quando a probabilidade p de observar uma razão F igual ou maior que a razão observada tinha probabilidade  $p < 0,05$ . Em termos gerais, as inclinações encontradas (que foram negativas) mostram a redução na diferença %C-%A, por unidade incremental da dosagem (ou, quando apropriado, por unidade incremental na escala logarítmica).

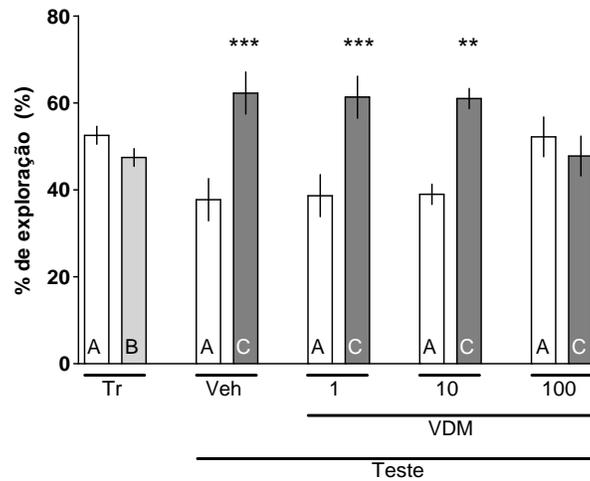
## IV. Resultados

Imediatamente após o treino na tarefa de Reconhecimento de Objetos, os animais receberam na região CA1 do hipocampo dorsal uma infusão de WIN-55,212-2, um agonista não-seletivo dos receptores canabinóides (1-10 pmol/lado; Showalter *et al.*, 1996; Hohmann *et al.*, 1999; Pop, 1999), VDM-11, um inibidor da recaptção celular de endocannabinóides (1-100 pmol/lado; De Lago *et al.*, 2004; D'Argenio *et al.*, 2006) ou veículo (0,1% DMSO em salina). A retenção da memória de longa duração foi avaliada em uma sessão de teste com 5 min de duração, realizada 24 horas após o treino. Nesta sessão, se substituiu um dos objetos utilizados durante o treino por um objeto novo, ao qual os animais jamais haviam sido expostos. Como pode se observar nas Figuras 9 e 10, os ratos que receberam veículo (Veh) exploraram o objeto novo por tempo significativamente maior que o objeto conhecido, mostrando que retiveram a memória de longa duração para o objeto apresentado na sessão de treino. No entanto, os ratos que receberam WIN-55,212-2 ou VDM-11 em CA1 nas doses de 10 pmol e 100 pmol por lado, respectivamente, passaram a mesma quantidade de tempo explorando o objeto novo e o familiar, sugerindo que a ativação dos receptores canabinóides por agentes exógenos logo após o treino bloqueia a retenção da memória de reconhecimento. Observa-se que, embora estes efeitos tenham sido encontrados apenas nos animais que receberam as doses mais altas de ambas as drogas, estas dosagens ainda são muito inferiores àquelas relatadas na literatura (Schneider e Koch, 2002; Yim *et al.*, 2008), o que descarta a necessidade de qualquer questionamento sobre a falta de seletividade do tratamento farmacológico com conseqüente ativação de outros sítios alvo. As inclinações das curvas traçadas utilizando os valores de %C-%A foram  $-2,656 \pm 0,902$  ( $p < 0,05$ ) por unidade de dosagem, para WIN, e  $-6,10 \pm 2,33$  ( $p < 0,05$ ) por unidade logarítmica de dosagem para VDM-11. As inclinações negativas

das curvas indicam um efeito de prejuízo dose-dependente destas substâncias sobre a retenção da memória.

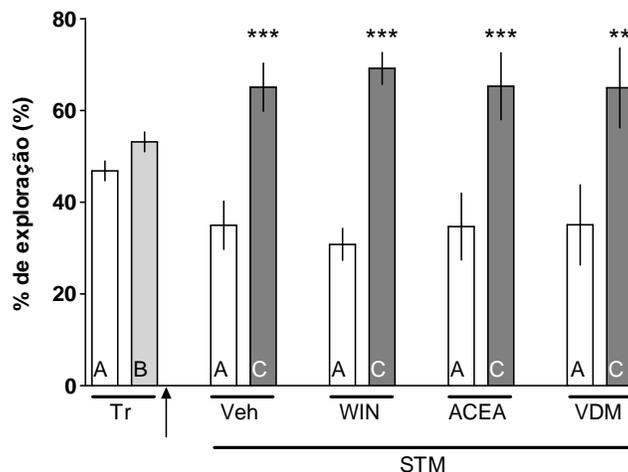


**Figura 9. A ativação de receptores canabinóides imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou WIN-55,212-2 (WIN; 1-10 pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Dados (média ± erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,05$  em teste *t* de Student. (n=9 por grupo).



**Figura 10. A inibição da recaptação de endocanabinóides imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8  $\mu$ l/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou VDM-11 (VDM; 1-100 pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Dados (média  $\pm$  erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\*\* $p$ <0,01 e \*\* $p$ <0,05 em teste  $t$  de Student. (n=9 por grupo).

WIN-55,212-2 e VDM-11, não exerceram efeito sobre a memória de reconhecimento de curta duração quando esta foi avaliada em uma sessão de teste realizada 180 min pós-treino (Figura 11).



**Figura 11. A ativação de receptores canabinóides ou a inibição da recaptção de endocanabinóides imediatamente após o treino não afetam a formação da memória de curta duração.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina), WIN-55,212-2 (WIN; 10 pmol/lado), ACEA (ACEA; 0,01 fmol/lado) ou VDM-11 (VDM; 100 pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Três horas depois do treino (STM), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da formação da memória de curta duração. Dados (média ± erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,05$  em teste *t* de Student. (n=9 por grupo).

Para analisar se a amnésia causada por WIN-55,212-2 e VDM-11 devia-se à sua ação sobre o processo de consolidação da memória, e eliminar a possibilidade de que os resultados obtidos estivessem relacionados com efeitos retardados sobre a ansiedade ou a atividade exploratória, capazes de impedir a evocação da memória de longa-duração, ratos foram expostos ao Labirinto em Cruz Elevado e ao Campo Aberto, 24 h após receberem infusão destes agentes.

Nenhuma das drogas testadas causou alterações no número total de entradas, no número de entradas nos braços abertos ou na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos durante sessão de 5 minutos no Labirinto em Cruz Elevado. Da mesma forma, WIN-55,212-2 e VDM-11 não afetaram o número total de

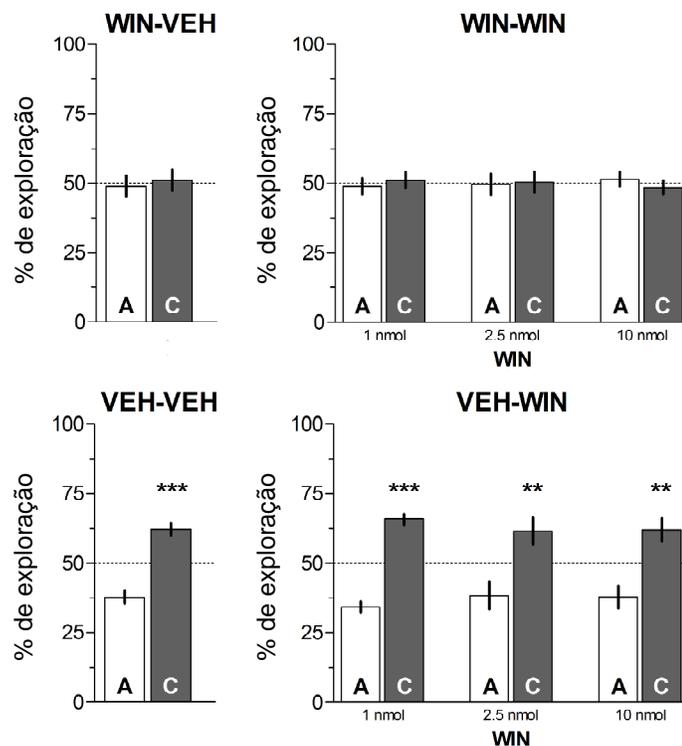
cruzamentos e de elevações em uma sessão de exploração livre com duração de 5 min no Campo Aberto (Tabela 3).

	VEH	WIN	ACEA	VDM
<b>Número Total Entradas</b>	7.36 ± 0.50	7.50 ± 0.83	7.15 ± 0.74	7.4 ± 0.81
<b>Entradas Braços Abertos</b>	7.93 ± 0.89	9.00 ± 1.42	8.00 ± 1.11	7.90 ± 1.33
<b>% Tempo nos Braços Abertos</b>	46,63 ± 2.72	50.32 ± 6.56	45.82 ± 6.29	48.04 ± 6.30
<b>Cruzamentos</b>	33.95 ± 5.20	25.00 ± 5.61	21.11 ± 7.08	37.1 ± 8.37
<b>Elevações</b>	11.05 ± 1.84	9.1 ± 2.37	9.22 ± 2.26	10.9 ± 2.74

**Tabela 3. Infusão de WIN-55,212-2, ACEA ou VDM-11 na região CA1 do hipocampo dorsal não exercem efeito sobre as atividades locomotora e exploratória ou o estado de ansiedade.** WIN-55,212-2 (WIN; 10 nmol/lado), ACEA (ACEA; 0,01 fmol/lado) ou VDM-11 (VDM; 100 pmol/lado) foram infundidos na região CA1 do hipocampo dorsal 24 h antes de uma sessão de Campo Aberto ou Labirinto em Cruz Elevado. Dados são expressos como média (± erro padrão) do número total de entradas, número de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos (Labirinto em Cruz; n=10 por grupo) e número de total de cruzamentos e elevações (Campo Aberto; n=10 por grupo). VEH= veículo. Um grupo distinto de animais foi utilizado para cada paradigma comportamental.

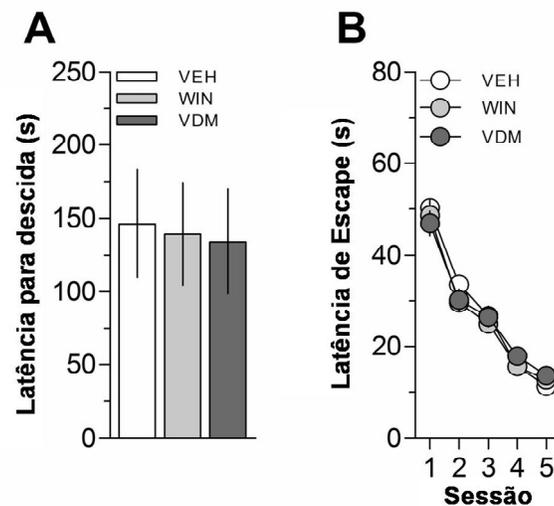
O termo dependência de estado refere-se a um fenômeno em que a evocação de uma memória previamente adquirida é mais fácil se o indivíduo encontra-se no mesmo estado neuro-humoral em que se encontrava no momento da aquisição. Neste sentido, o estado neuro-humoral participaria da aquisição da memória como mais um fator contextual do aprendizado, agindo como um estímulo condicionado. Tal acontecimento pode ser observado para diversas substâncias endógenas, como, por exemplo, os hormônios do estresse, e algumas exógenas, como morfina e álcool. Diversos autores demonstraram a ocorrência deste fenômeno em usuários de maconha (Rickles *et al.*, 1973; Hill *et al.*, 1973; Stillman *et al.*, 1974; Zarrindast *et al.*, 2006) e por esta razão é interessante estudar se os efeitos das drogas canabinomiméticas utilizadas neste estudo poderiam dever-se à indução de um fenômeno deste tipo. Para estudar esta hipótese, administramos WIN-55,212-2 15 min antes da sessão de teste a um

grupo de animais que havia recebido esta mesma droga imediatamente após a sessão de treino. Como pode ser observada na Figura 12 (gráficos superiores), a administração de WIN antes da sessão de teste aos animais que estavam sob efeito de WIN durante o processo de consolidação (grupo WIN-WIN) não facilitou a evocação da memória de longa duração para o reconhecimento de objetos, ou seja, não foi capaz de reverter os efeitos prejudiciais de WIN sobre a consolidação da mesma (ver grupo WIN-VEH). Quando administrado unicamente antes da sessão de teste, ainda, WIN não exerceu efeito sobre a evocação da memória formada (VEH-WIN).



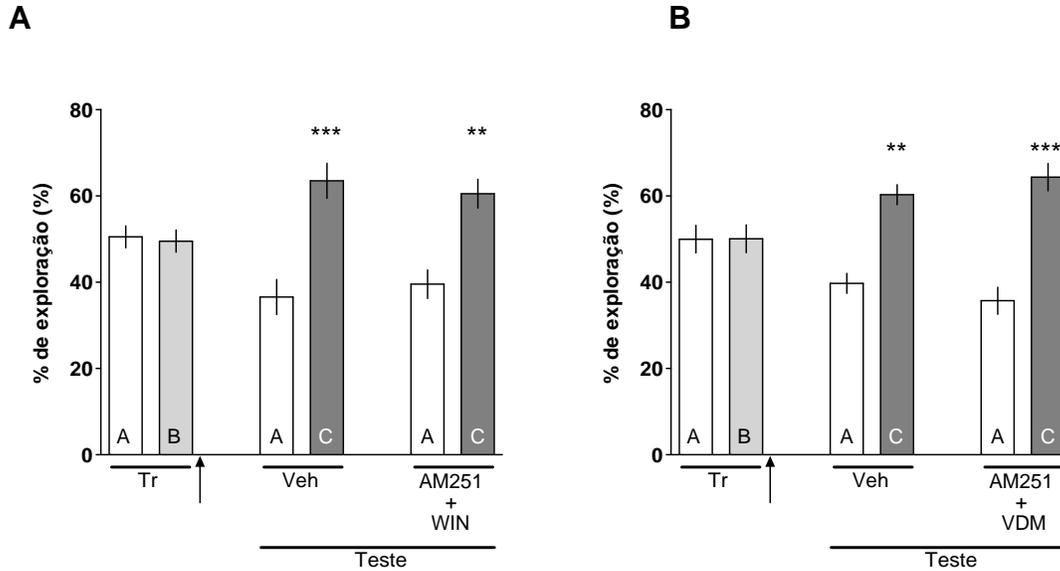
**Figura 12: O efeito amnésico causado pela ativação dos receptores canabinóides imediatamente após a sessão de treino não se deve ao estabelecimento de dependência de estado.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (0,1% DMSO em salina) ou WIN-55,212-2 (10 pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Vinte e quatro depois do treino, os mesmos animais receberam outra infusão de veículo (formando os grupos WIN-VEH e VEH-VEH) ou WIN-55,212-2 (formando os grupos WIN-WIN e VEH-WIN) e, 15 min depois, foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da formação da memória de longa duração. Dados (média ± erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,05$  em teste  $t$  de Student. (n=9 por grupo).

Para assegurar que o efeito amnésico causado pelas drogas em questão não se devia a um possível efeito permanente de perda da funcionalidade do hipocampo, a manutenção ou não da integridade funcional desta estrutura após o tratamento farmacológico foi testada. Um grupo de ratos foi treinado em dois paradigmas comportamentais distintos que exigem a integridade do hipocampo para a formação das respectivas memórias. WIN-55,212-2 e VDM-11 foram infundidos na região CA1 24 h antes do treino nas tarefas. Nenhum efeito foi observado sobre a aquisição da memória para as tarefas de EI (Figura 13 A – latências de teste. Tampouco houve diferença entre os grupos nas latências de treino – dados não mostrados.) ou LAM (Figura 13 B) (Izquierdo *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2007).

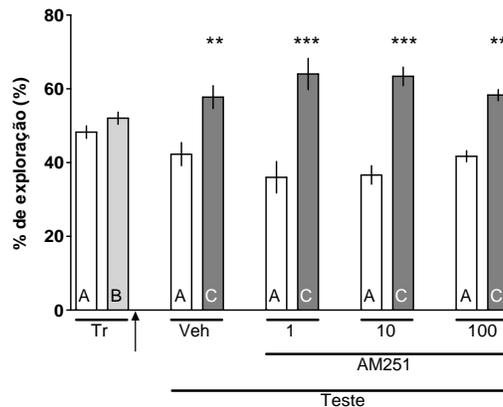


**Figura 13. A ativação de receptores canabinóides e a inibição da recaptação celular de endocanabinóides na região CA1 do hipocampo dorsal 24 h antes do treino não afetam a formação das memórias para Esquiva Inibitória e Labirinto Aquático de Morris.** Ratos foram treinados na tarefa da Esquiva Inibitória 24 h após receber infusão bilateral intra-CA1 (0.8 µl/lado) de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina), WIN-55,212-2 (WIN; 10 pmol/lado) ou VDM-11 (VDM; 100 pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Vinte e quatro horas depois, os animais foram testados para avaliar a retenção da memória de longa-duração. Dados (média ± erro padrão) são representados como latência para descida da plataforma. (A) Outro grupo de animais foi treinado na tarefa do Labirinto Aquático de Morris 24 h após receber infusão bilateral intra-CA1 de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina), WIN-55,212-2 (WIN; 10pmol/lado) ou VDM-11 (VDM; 100 pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Dados (média ± erro padrão) são representados como latência para encontrar a plataforma submersa. (B) (n=10 por grupo)

Com o objetivo de investigar se os efeitos observados após a administração dos agentes farmacológicos utilizados neste estudo se devem à ativação de receptores CB1, imediatamente após o treino na tarefa de RO os animais receberam uma infusão bilateral de WIN-55,212-2 (10 pmol/lado) ou VDM-11 (100 pmol/lado) juntamente com um antagonista CB1, o AM-251 (100 pmol/lado; Gatley *et al.*, 1996; Pertwee, 2005b; Degroot *et al.*, 2006) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória de longa duração foi avaliada numa sessão de teste realizada 24 h pós-treino. A co-infusão de AM-251 reverteu totalmente o efeito amnésico de WIN-55,212-2 (Figura 14 A) e VDM-11 (Figura 14 B). Quando administrado sozinho na região CA1, o AM-251 (1-100 pmol/lado) não afetou o comportamento dos animais na sessão de teste (Figura 15) e a curva %C-%A teve inclinação de  $-1,85 \pm 2,15$  (não significativo) por unidade logarítmica de dose, mostrando que, o AM-251 não tem efeito *per se* sobre a retenção da memória de longa duração para a tarefa de RO.

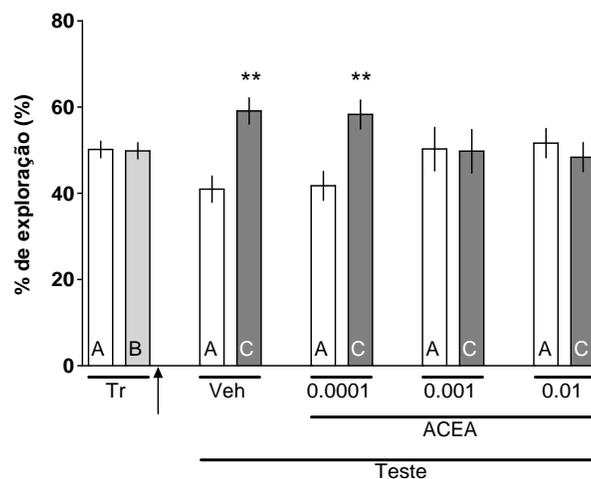


**Figura 14. A co-infusão de um antagonista dos receptores CB1 reverte o efeito amnésico da administração intra-hipocampal de WIN-55,212-2 e VDM-11.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina), ou AM-251 (100 pmol/lado) juntamente com WIN-55,212-2 (A < 251+WIN; 10 pmol/lado) ou VDM-11 (AM251+VDM; 100 pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 minutos, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Dados (média ± erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\*\*p<0,01 e \*\*p<0,05 em teste t de Student. (n=9 por grupo).

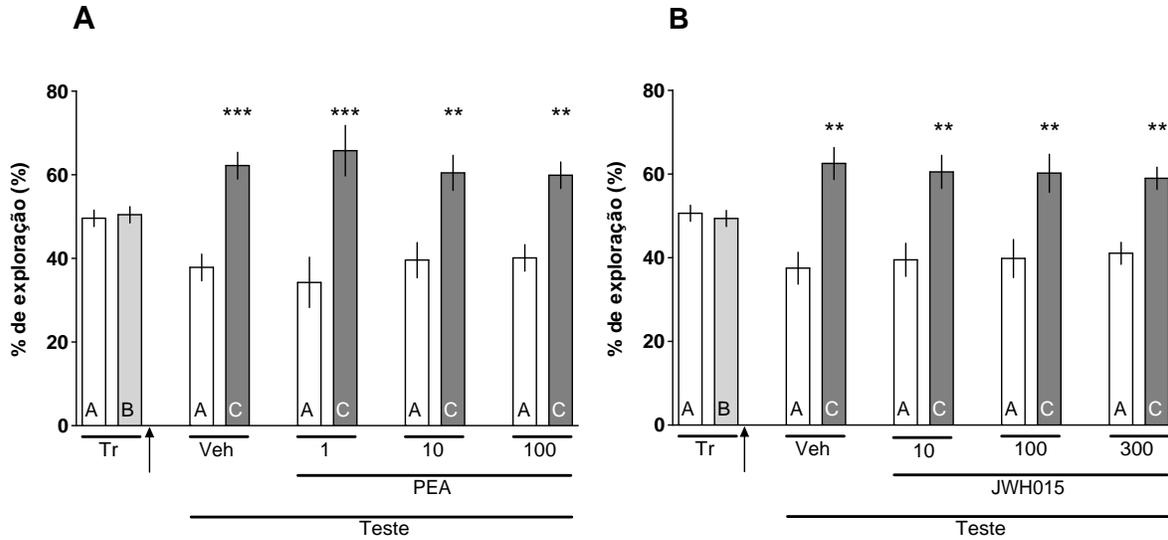


**Figura 15. O bloqueio de receptores CB1 imediatamente após o treino não afeta a retenção da memória de longa-duração.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina), ou AM-251 (AM251, 1-100 pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Dados (média ± erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\*\*p<0,01 e \*\*p<0,05 em teste t de Student. (n=9 por grupo).

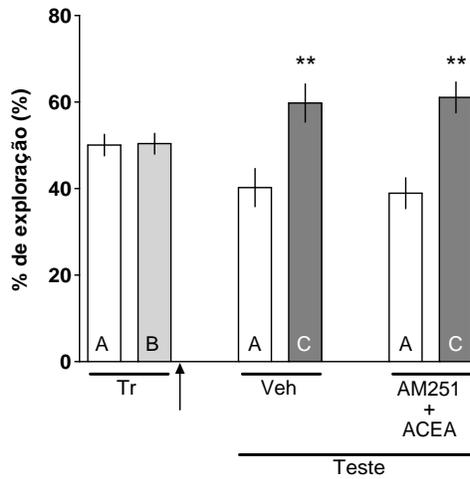
O agonista específico de receptores CB1, ACEA (0.0001-0,01 fmol/lado; Figura 16; Hillard *et al.*, 1999), foi administrado na região CA1 hipocampal imediatamente após o treino na tarefa de RO e impediu a retenção da memória de longa duração. A curva %C-%A, para ACEA, teve inclinação de  $-5,01 \pm 2,05$  ( $p < 0,05$ ) por unidade de dosagem, mostrando um efeito dose-dependente de ACEA sobre a retenção da memória. Tal efeito não foi observado após administração dos agonistas específicos de receptores CB2, JWH-015 (1-100 pmol/lado; Figura 17 A; Huffman, 2000; Onaivi *et al.*, 2006) e palmitoiletanolamida (1-100 pmol/lado; Figura 17 B; Jaggar *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1999). Quando co-infundido com AM-251, o efeito amnésico de ACEA foi abolido (Fig. 18).



**Figura 16. A ativação de receptores CB1 imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8  $\mu$ l/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina), ou ACEA (ACEA, 0,0001-0,01 fmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Dados (média  $\pm$  erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\* $p < 0,05$  em teste *t* de Student. (n=9 por grupo).



**Figura 17. A ativação de receptores CB2 imediatamente após o treino não afeta a retenção da memória de longa duração.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina), palmitoiletanolamida (PEA; 1-100 pmol/lado) ou JWH-015 (JWH015; 10-300 fmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Dados (média ± erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,05$  em teste  $t$  de Student. (n=9 por grupo).



**Figura 18. A co-infusão de AM-251 reverte o efeito amnésico da administração intra-hipocampal de ACEA.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou AM 251 (100pmol/lado) juntamente com ACEA (AM251+ACEA; 0,01 fmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Dados (média ± erro padrão) são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\* $p < 0,05$  em teste  $t$  de Student. (n=9 por grupo).

## V. Discussão

Os resultados apresentados mostram que a ativação farmacológica de receptores CB1 no hipocampo dorsal logo após o treino inibiu a formação da memória de longa duração para o RO. Quando infundidos no hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, tanto o agonista canabinóide não-seletivo WIN-55,212-2 como o inibidor da recaptção celular de endocanabinóides VDM-11, prejudicaram a retenção da memória 24 h pós-treino. WIN-55,212-2 e VDM-11 não tiveram efeito sobre a retenção da memória de reconhecimento de curta duração, quando esta foi avaliada em um teste realizado 180 min pós-treino. Ainda, quando administrados 24 h antes da respectiva sessão comportamental, estas drogas não afetaram o desempenho de animais nas tarefas de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, ou seja, o efeito amnésico causado por WIN-55,212-2 e VDM-11 no RO provavelmente se deve a uma ação específica sobre o processo de consolidação da memória, já que não se observa modificação na atividade locomotora, exploratória ou estado de ansiedade. Ainda, ratos que receberam WIN-55,212-2 ou VDM-11 intra-CA1 24 h antes de serem treinados no paradigma da EI ou no LAM foram capazes de formar e conservar as memórias pertinentes a estas tarefas. Já que a formação das memórias de EI e LAM dependem da participação funcional do hipocampo, estes resultados demonstram que o efeito amnésico que estas drogas têm sobre a memória de reconhecimento não é devido à indução de danos permanentes ao hipocampo, mas a um efeito inibitória real sobre o processo de consolidação.

Quando infundido imediatamente após o treino, o agonista canabinóide CB1-seletivo, ACEA, mimetizou o efeito amnésico de WIN-55,212-2 e VDM-11, ao passo que a co-infusão de um antagonista específico dos receptores CB1 (AM-251) foi capaz de reverter o efeito amnésico de WIN-55,212-2, VDM-11 e ACEA. Estes dados endossam

a hipótese de que a amnésia causada por estas drogas se deve à ativação de receptores CB1 hipocámpais. O fato de que os agonistas CB2-seletivos testados, quando infundidos imediatamente após o treino na região CA1 do hipocampo dorsal não exerceram efeito sobre a retenção da memória de longa duração confirma esta hipótese.

Os resultados acima estão parcialmente de acordo com relatos anteriores (Hampson e Deadwyler 1999; Varvel *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2004). Muitos desses trabalhos indicam que agonistas de receptores canabinóides, especialmente aqueles com certa especificidade para o receptor CB1, afetam os processos de aquisição e/ou consolidação (Da e Takahashi, 2002; Robinson *et al.*, 2007; Kobilko *et al.*, 2007), possivelmente devido à elevada concentração destes receptores na formação hipocámpal (Herkenham *et al.*, 1990; Pettit *et al.*, 1998). No entanto, grande parte das pesquisas anteriores caracterizou-se por utilizar animais *knock out* para receptores CB1 (Reibaud *et al.*, 1999; Varvel e Lichtman, 2002; Martin *et al.*, 2002; Bilkei-Gorzo *et al.*, 2005) ou a administração periférica de  $\Delta(9)$ -THC e canabinomiméticos (Ferrari *et al.*, 1999; Varvel *et al.*, 2001; Barna *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2007), tornando difícil definir com segurança o papel dos receptores CB1 de uma determinada região cerebral nos processos mnemônicos.

Poucos estudos buscaram esclarecer o papel dos receptores canabinóides sobre a formação das memórias de reconhecimento. Nos principais e mais recentes trabalhos, agonistas canabinóides impediram a formação da memória para a tarefa de Reconhecimento de Objetos (Ciccocioppo *et al.*, 2002; Kosiorek *et al.*, 2003). Nestes estudos, os efeitos mnemônicos de  $\Delta(9)$ -THC e CP-55,940 foram revertidos por antagonistas CB1. Em ambos os casos, porém, a administração das drogas se deu por via sistêmica, o que dificulta a distinção entre uma ação central específica sobre estruturas responsáveis pela formação de memórias de uma possível ação sistêmica.

Além disso, não foi avaliado o efeito dos antagonistas testados isoladamente, o que limita a confiabilidade destes resultados visto que, em se tratando de antagonistas canabinóides, os resultados encontrados previamente são controversos. Há relatos de que os antagonistas CB1 podem bloquear o aprendizado (de Oliveira Alvares *et al.*, 2005; de Oliveira Alvares *et al.*, 2006), não exercer efeito (Hampson e Deadwyler, 2000; Arenos *et al.*, 2006) ou melhorar a memória e plasticidade sináptica (Terranova *et al.*, 1996; Lichtman, 2000; Wolff e Leander, 2003; Hoffman *et al.*, 2007).

Em estudos realizados com animais com deleção gênica dos receptores CB1 treinados no RO, observou-se que os animais *knock out* possuem índice de aprendizagem maior que o observado para os animais com genótipo selvagem (Maccarone *et al.*, 2002; Reibaud *et al.*, 1999). Não houve alteração do comportamento exploratório dos animais na sessão de treino, o que torna este modelo bastante útil na tentativa de esclarecer o papel dos receptores CB1 no processo de formação de memórias, a despeito dos relatos de um aumento nos níveis de ansiedade dos animais *knockout*.

A identificação de um animal da mesma espécie como sendo familiar ou conhecido também envolve a formação de uma memória de reconhecimento e é a base de diversos processos de interação social, incluindo as relações de hierarquia entre o grupo e a escolha do parceiro sexual (Winslow e Insel, 2004). A partir da observação de que os animais passam mais tempo explorando um animal intruso em relação a um animal conhecido, foi descrito o paradigma de Reconhecimento Social. No caso do reconhecimento entre animais, acredita-se que a memória formada seja do tipo olfativa e o reconhecimento do animal intruso pelo animal experimental pode ser observado em diversos momentos após o primeiro contato entre estes dois animais, pela diminuição no tempo de interação entre eles. Em um estudo utilizando este paradigma, o agonista

canabinóide WIN-55,212-2 impediu, de forma dose dependente, a formação da memória de curta duração (Schneider e Koch, 2002).

Estudos sobre o efeito dos canabinóides utilizando modelos *in vitro* de plasticidade sináptica hipocampal, particularmente de LTP, tem sido muito úteis na tentativa de esclarecer o seu papel sobre os processos mnemônicos (Davies *et al.*, 2002). A indução de LTP hipocampal é bloqueada pela aplicação aguda de  $\Delta^9$ -THC (Nowicky *et al.*, 1987) bem como pelo ligante endógeno 2-araquidonil glicerol (2-AG; Stella *et al.*, 1997) e pelos agonistas sintéticos HU-210 (Collins *et al.*, 1995) e WIN-55,212-2 (Terranova *et al.*, 1995; Mereu *et al.*, 2003). Além disso, sabe-se que camundongos mutantes com deleção gênica dos receptores CB1 apresentam um aumento na potenciação de longa duração *in vivo* (Bohme *et al.*, 2000).

Alguns dos agonistas canabinóides conhecidos, além de interferir no processamento de informação, podem também inibir a formação de novas sinapses, segundo Kim e Thayer (2001). Já foram relatadas, também, mudanças na morfologia hipocampal, semelhantes àsquelas observadas após lesões isquêmicas ou tóxicas, de ratos tratados com doses altas de WIN-55,212-2 (Lawston *et al.*, 2000). Tais modificações no desenvolvimento e morfologia de estruturas encefálicas podem contribuir para os efeitos prejudiciais destes agonistas sobre os processos mnemônicos e sobre a plasticidade.

CB1 é um receptor acoplado à proteína G, e parece atuar por meio da inibição da enzima adenilato ciclase celular (Bayewitch *et al.*, 1996; Rhee *et al.*, 1997; Steffens *et al.*, 2004). A inibição desta enzima pode alterar de diversas formas o metabolismo celular, afetando inclusive a ativação de proteínas crucias para a formação de memórias, como, por exemplo, a proteína cinase A (PKA). As cascatas de sinalização reguladas pelo receptor CB1 também levam à ativação das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs; Bouaboula *et al.*, 1995), p38MAPK e cinase do extremo N-

terminal de *c-Jun* (JNK; Liu *et al.*, 2000). A ausência de ativação destas proteínas em diferentes momentos após a aquisição de uma memória pode levar a uma falha na consolidação da mesma (Izquierdo, 2002). Qualquer destes efeitos poderia justificar os efeitos mnemônicos observados após a administração de agonistas canabinóides.

É amplamente aceito que os endocanabinóides são liberados pelos terminais pós-sinápticos exercendo sua ação sobre receptores localizados nos terminais pré-sinápticos de forma a inibir a liberação de outros neurotransmissores na fenda (Sullivan, 1999). Alguns autores sugeriram que o déficit na LTP causado pelos agonistas CB1 se deve a um decréscimo na liberação de glutamato a níveis inferiores àqueles necessários para a saída das moléculas de Mg<sup>2+</sup> que bloqueiam os receptores NMDA (Misner e Sullivan, 1999).

No entanto, os receptores CB1 são expressos principalmente no axônio terminal de interneurônios GABAérgicos no hipocampo (Tsou *et al.*, 1999; Katona *et al.*, 1999), e sabe-se que os endocanabinóides medeiam a supressão temporária de Potencial Inibitório Pós-Sináptico (PIPS) mediadas por GABA<sub>A</sub> que ocorre nos neurônios piramidais do hipocampo após intensa despolarização (Wilson e Nicoll, 2001). Essas observações, e o relato de que os endocanabinóides facilitam a LTP induzida em neurônios individuais durante a supressão de PIPS espontâneos (Carlson *et al.*, 2002), sugerem que o verdadeiro efeito destes mensageiros retrógrados sobre a plasticidade sináptica depende de uma interação finamente controlada entre os sistemas excitatório e inibitório de transmissão (Hashimoto *et al.*, 2007).

Independentemente do mecanismo molecular envolvido, os resultados obtidos provam que a ativação de receptores CB1, na região CA1 do hipocampo dorsal, impede a consolidação da memória para a tarefa de reconhecimento de objetos.

## VI. Conclusões

A partir da análise dos resultados obtidos nesta dissertação pode-se concluir que a ativação de receptores canabinóides CB1, mas não CB2, imediatamente após o treino na tarefa de RO bloqueia a retenção da memória de longa duração. Esta conclusão baseia-se nas seguintes observações:

1. O agonista canabinóide não-seletivo, WIN-55,212-2, infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração testada 24 horas pós-treino.
2. O agente inibidor da recaptação celular de canabinóides, VDM-11, infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração testada 24 horas pós-treino.
3. WIN-55,212-2 e VDM-11, infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, não impedem a formação da memória de curta duração testada 180 minutos pós-treino.
4. O efeito amnésico causado pela ativação de receptores canabinóides na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO não se deve ao estabelecimento de dependência de estado.
5. Os efeitos de WIN-55,212-2 e VDM-11 sobre a formação da memória de longa duração para a tarefa de RO se devem a uma ação específica sobre o subtipo de receptor canabinóide CB1, pois seus efeitos amnésicos foram revertidos com a co-infusão de um antagonista específico dos receptores CB1.
6. O agente antagonista de receptores CB1, AM-251, infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO,

- não possui efeito *per se* sobre a formação da memória de longa duração testada 24 horas pós-treino.
7. O agonista dos receptores CB1, ACEA, mas não os agonistas de receptores CB2, palmitoiletanolamida e JWH-015, infundidos bilateralmente em diferentes doses na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração testada 24 horas pós-treino.
  8. O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 do agonista de receptores CB1, ACEA, é revertido com a co-infusão do agente antagonista de receptores CB1, AM-251, imediatamente pós-treino, mostrando a especificidade deste agente agonista sobre este subtipo de receptor.
  9. O efeito amnésico das substâncias estudadas deve-se, especificamente, à sua ação sobre o processo de consolidação e não ao fato de provocarem uma lesão permanente no hipocampo ou de afetarem a atividades locomotora e exploratória nem o estado de ansiedade dos animais.

## VII. Perspectivas

A partir dos resultados encontrados nesta dissertação, ficam por ser esclarecidas em estudos futuros as seguintes proposições:

1. A ativação dos receptores canabinóides CB1 em outros momentos após a sessão de treino pode afetar o processo de consolidação da memória para o RO?
2. Qual é (são) o (os) mecanismo (s) molecular (es) que se segue (m) após a ligação de agonistas canabinóides aos receptores CB1 hipocampais e que são responsáveis por seu efeito amnésico?
3. Seria um mecanismo molecular provável a inibição da enzima adenilato ciclase? A co-infusão de cAMP juntamente com agonistas canabinóides intra-CA1, imediatamente pós-treino na tarefa de RO, é capaz de reverter os déficits cognitivos observados após a infusão de canabinomiméticos?
4. Agentes ativadores das MAPK, ou de mensageiros sucessores a esta proteína na cascata de sinalização, são capazes de reverter os déficits de memória causados por agentes canabinóides, quando co-infundidos com estes imediatamente após o treino na tarefa de RO?

## VIII. Referências

Abood, M.E. Molecular Biology of Cannabinoid Receptors. In: Cannabinoids. Berlin Heidelberg: Springer, 2005. 762 p.

Akirav, I.; Maroun, M. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cerebral cortex* 16, 1759-65, 2006.

Arenos, J.D.; Musty, R.E.; Bucci, D.J. Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *European Journal of Pharmacology* 539, 177-83, 2006.

Barna, I.; Soproni, K.; Arszovski, A.; Csabai, K.; Haller, J. WIN-55,212-2 chronically implanted into the CA3 region of the dorsal hippocampus impairs learning: a novel method for studying chronic, brain-area-specific effects of cannabinoids. *Behavioral Pharmacology* 18, 515-20, 2007.

Bayewitch, M.; Rhee, M.H.; Avidor-Reiss, T.; Breuer, A.; Mechoulam, R.; Vogel, Z. (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9902-5, 1996.

Beltramo, M.; Stella, N.; Calignano, A.; Lin, S.Y.; Makriyannis, A.; Piomelli, D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277, 1094-7, 1997.

Benito, C.; Núñez, E.; Tolón, R.M.; Carrier, E.J.; Rábano, A.; Hillard, C.J.; Romero, J. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *Journal of Neuroscience* 23, 11136-41, 2003.

Berlyne, D.E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *British Journal of Psychology* 41, 68-80, 1950.

Bevilaqua, L.R.; Rossato, J.I.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behavioral Pharmacology* 14, 649-52, 2003.

Bilkei-Gorzo, A.; Racz, I.; Valverde, O.; Otto, M.; Michel, K.; Sastre, M.; Zimmer, A. Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102, 15670-5, 2005.

Bisogno, T.; Maurelli, S.; Melck, D.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 3315-23, 1997.

Bohme, G.A.; Laville, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Imperato, A. Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience* 95, 5-7, 2000.

Bonini, J.S.; Bevilaqua, L.R.; Zinn, C.G.; Kerr, D.S.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Hormones and Behavior* 50, 308-13, 2006.

Borges, J.L. Ficções. 5ª ed., Globo, São Paulo, 1989.

Bouaboula, M.; Poinot-Chazel, C.; Bourrié, B.; Canat, X.; Calandra, B.; Rinaldi-Carmona, M.; Le Fur, G.; Casellas, P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochemical Journal* 312, 637-41, 1995.

Cammarota, M.; Bevilaqua, L.R.; Kerr, D.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *Journal of Neuroscience* 23, 737-41, 2003.

Carlson, G.; Wang, Y.; Alger, B.E. Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nature Neuroscience* 5: 723-4, 2002.

Ciccocioppo, R.; Antonelli, L.; Biondini, M.; Perfumi, M.; Pompei, P.; Massi, M. Memory impairment following combined exposure to delta(9)-tetrahydrocannabinol and ethanol in rats. *European Journal of Pharmacology* 449, 245-52, 2002.

Clark, R.E.; Zola, S.M.; Squire, L.R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 20, 8853-60, 2000.

Collins, D.R.; Pertwee, R.G.; Davies, S.N. Prevention by the cannabinoid antagonist, SR141716A, of cannabinoid-mediated blockade of long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *British Journal of Pharmacology* 115, 869-70, 1995.

Cravatt, B.F.; Giang, D.K.; Mayfield, S.P.; Boger, D.L.; Lerner, R.A.; Gilula, N.B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83-7, 1996.

Da, S.; Takahashi, R.N. SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 26, 321-5, 2002.

Da Silva, W.C.; Bonini, J.S.; Bevilaqua, L.R.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. *Neurobiology of Learning and Memory* 86, 100-6, 2006.

Da Silva, W.C.; Bonini, J.S.; Bevilaqua, L.R.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus* 18, 29-39, 2008.

D'Argenio, G.; Valenti, M.; Scaglione, G.; Consenza, V.; Sorrentini, I.; DiMarzo, V. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *FASEB Journal* 20, 568-70, 2006.

Davies, S.N.; Pertwee, R.G.; Riedel, G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. *Neuropharmacology* 42, 993-1007, 2002.

De Lago, E.; Ligresti, A.; Ortar, G.; Morera, E.; Cabranes, A.; Pryce, G.; Bifulco, M.; Baker, D.; Fernández-Ruiz, D.; Di Marzo, V. In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *European Journal of Pharmacology* 484, 249-57, 2004.

De Oliveira Alvares, L.; de Oliveira, L.F.; Cambiom, C.; Diehl, F.; Genro, B.P.; Lanziotti, V.B.; Quillfeldt, J.A. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 83, 119-24, 2005.

De Oliveira Alvares, L.; Genro, B.P.; Vaz Breda, R.; Pedroso, M.F.; Da Costa, J.C.; Quillfeldt, J.A. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Research* 1075, 60-7, 2006.

De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Davis, J.B.; Pertwee, R.G.; Di Marzo, V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Letters* 483, 52-6, 2000.

Degroot, A.; Köfalvi, A.; Wade, M.R.; Davis, R.J.; Rodrigues, R.J.; Rebola, N.; Cunha, R.A.; Nomikos, G.G. CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. *Molecular Pharmacology* 70, 1236-45, 2006.

Deutsch, D.G.; Glaser, S.T.; Howell, J.M.; Kunz, J.M.; Puffenbarger, R.A.; Hillard, C.J.; Abumrad, N. The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6967-73, 2001.

Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-9, 1992.

Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J.C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686-91, 1994.

Dudai, Y. Some basic notions and their ontogenesis. In: *The neurobiology of memory: concepts, findings, trends*. New York: Oxford UP, 1989.

Ennaceur, A.; Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research* 31, 47-59, 1988.

Ferrari, F.; Ottani, A.; Vivolvi, R.; Giuliani, D. Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 64, 555-61, 1999.

Gatley, S.J.; Gifford, A.N.; Volkow, N.D.; Lan, R.; Mikriyannis, A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *European Journal of Pharmacology* 307, 331-8, 1996.

Geinisman, Y. Structural synaptic modifications associated with LTP and behavioral learning. *Cerebral Cortex* 10, 52-62, 2000.

Gong, J.P.; Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Liu, Q.R.; Tagliaferro, P.A.; Brusco, A.; Uhl, G.R. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research* 1071, 10-23, 2006.

Hampson, R.E.; Deadwyler, S.A. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sciences* 65, 715-23, 1999.

Hampson, R.E.; Deadwyler, S.A. Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. *Journal of Neuroscience* 20, 8932-42, 2000.

Han, C.J.; Pierre-Louis, J.; Scheff, A.; Robinson, J.K. A performance-dependent adjustment of the retention interval in a delayed non-matching-to-position paradigm differentiates effects of amnesic drugs in rats. *European Journal of Pharmacology* 403, 87-93, 2000.

Hashimotodani, Y.; Ohno-Shosaku, T.; Kano, M. Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 27, 1211-9, 2007.

Herkenham, M.; Lynn, A.B.; Little, M.D.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; de Costa, B.R.; Rice, K.C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87, 1932-6, 1990.

Herkenham, M.; Lynn, A.B.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; de Costa, B.R.; Rice, K.C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience* 11, 563-83, 1991.

Hill, M.N.; Froc, D.J.; Fox, C.J.; Gorzalka, B.B.; Christie B.R. Prolonged cannabinoid treatment results in spatial working memory deficits and impaired long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus in vivo. *European Journal of Neuroscience* 20: 859-63, 2004.

Hillard, C.J.; Mannard, S.; Greenberg, M.J.; Di Camelli, R.; Ross, R.A.; Stevenson, L.A.; Murphy, V.; Pertwee, R.G.; Campbell, W.B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 1427-33, 1999.

Hoffman, A.F.; Oz, M.; Yang, R.; Lichtman, A.H.; Lupica, C.R. Opposing actions of chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinoid antagonists on hippocampal long-term potentiation. *Learning and Memory* 14, 63-74, 2007.

Hohmann, A.G.; Tsou, K.; Walker, J.M. Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *Journal of Neurophysiology* 81, 575-83, 1999.

Howlett, A.C.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Milne, G.M. Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Molecular Pharmacology* 33, 297-302, 1988.

Huffman, J.W. The search for selective ligands for the CB2 receptor. *Current Pharmaceutical Design* 6, 1323-37, 2000.

Ishac, E.J.; Jiang, L.; Lake, K.D.; Varga, K.; Abood, M.E.; Kunos, G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *British Journal of Pharmacology* 118, 2023-8, 1996.

Izquierdo, I.; Barros, D.M.; Mello e Souza, T.; de Souza, M.M.; Izquierdo, L.A.; Medina, J.H. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, 635-6, 1998a.

Izquierdo, I.; Medina, J.H. On brain lesions, the milkman and Sigmunda. *Trends in Neuroscience* 21, 421-24, 1998b.

Izquierdo, I. Memória. Artmed, Porto Alegre, 2002. 92 p.

Izquierdo, L.A.; Barros, D.M.; da Costa, J.C.; Furini, C.; Zinn, C.; Cammarota, M.; Bevilaqua, L.R.; Izquierdo, I. A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 88, 160-6, 2007.

Jaggat, S.I.; Sellaturay, S.; Rice, A.S. The endogenous cannabinoid anandamide, but not the CB2 ligand palmitoylethanolamide, prevents the viscerovisceral hyper-reflexia associated with inflammation of the rat urinary bladder. *Neuroscience Letters* 253, 123-6, 1998.

Jansen, E.M.; Haycock, D.A.; Ward, S.J.; Seybold, V.S. Distribution of cannabinoid receptors in rat brain determined with aminoalkylindoles. *Brain Research* 575, 93-102, 1992.

Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M. Fundamentos da Neurociência e do Comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. 519 p. (Aprendizado e Memória).

Kathmann, M.; Bauer, U.; Schlicker, E.; Göthert, M. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacology* 359, 466-70, 1999.

Katona, I.; Sperlág, B.; Sík, A.; Käfalvi, A.; Vizi, E.S.; Mackie, K.; Freund, T.F. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience* 19, 4544-58, 1999.

Kelly, A.; Laroche, S.; Davis, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Journal of Neuroscience* 23, 5354-60, 2003.

Kerr, D.S.; Bevilaqua, L.R.; Bonini, J.S.; Rossato, J.I.; Köhler, C.A.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology* 179, 529-35, 2005.

Kim, D.; Thayer, S.A. Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience* 21, RC 146, 2001.

Kobilov, T.; Hazvi, S.; Dudai, Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience* 25, 3417-21, 2007.

Kosiorek, P.; Hryniewicz, A.; Bialuk, I.; Zawadzka, A.; Winnicka, A. Cannabinoids alter memory recognition in rats. *Polish Journal of Pharmacology* 55, 903-10, 2003.

Lambert, D.M.; DiPaolo, F.G.; Sonveaux, P.; Kanyonyo, M.; Govaerts, S.J.; Herman, E.; Bueb, J.; Delzenne, N.M.; Tschirhart, E.J. Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB(2) cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1440, 266-74, 1999.

Lawston, J.; Borella, A.; Robinson, J.K.; Whitaker-Azmitia, P.M. Changes in hippocampal morphology following chronic treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Brain Research* 877, 407-10, 2000.

Lichtman, A.H.; Dimen, K.R.; Martin, B.R. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 119, 282-90, 1995.

Lichtman, A.H.; Martin, B.R. Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology* 126, 125-31, 1996.

Lichtman, A.H. SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. *European Journal of Pharmacology* 404, 175-9, 2000.

Liu, G.; Gao, B.; Mirshahi, F.; Sanyal, A.J.; Khanolkar, A.D.; Makriyannis, A.; Kunos, G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochemical Journal* 346, 835-40, 2000.

Logothetis, N.K.; Sheinberg, D.L. Visual object recognition. *Annual Reviews in Neuroscience* 19, 577-621, 1996.

Maccarrone, M.; Bari, M.; Lorenzon, T.; Bisogno, T.; Di Marzo, V.; Finazzi-Agrò, A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 275, 13484-92, 2000.

Maccarrone, M.; Valverde, O.; Barbaccia, M.L.; Castañé, A.; Maldonado, R.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Finazzi-Agrò, A. Age-related changes of anandamide metabolism in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: correlation with behaviour. *European Journal of Neuroscience* 15, 1178-86, 2002.

McGaugh, J.L. Memory – A century of consolidation. *Science* 287, 248-251, 2000.

Mallet, P.E.; Beninger, R.J. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta9-tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacology* 140, 11-9, 1998.

Mandolesi, L.; Leggio, M.G.; Spirito, F.; Petrosini, L. Cerebellar contribution to spatial event processing: do spatial procedures contribute to formation of spatial declarative knowledge? *European Journal of Neuroscience* 18, 2618-26, 2003.

Martin, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Maldonado, R.; Valverde, O. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behavior. *Psychopharmacology* 159, 379-87, 2002.

Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-4, 1990.

Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N.E.; Schatz, A.R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, D.R. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* 50, 83-90, 1995.

Mereu, G.; Fà, M.; Ferraro, L.; Cagiano, R.; Antonelli, T.; Tattoli, M.; Ghiglieri, V.; Tanganelli, S.; Gessa, G.L.; Cuomo, V. Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. *The Proceedings of the National Academy of Science USA* 100, 4915-20, 2003.

Mishima, K.; Egashira, N.; Matsumoto, Y.; Ywasaki, K.; Fujiwara, M. Involvement of reduced acetylcholine release in Delta9-tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory in the 8-arm radial maze. *Life Sciences* 72, 397-404, 2002.

Misner, D.L.; Sullivan, J.M. Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *Journal of Neuroscience* 19, 6795-805, 1999.

Moses, S.N.; Cole, C.; Driscoll, I.; Ryan, J.D. Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. *Brain Research Bulletin* 67, 62-76, 2005.

Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-5, 1993.

Myskiw, J.C.; Rossato, J.I.; Bevilaqua, L.R.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2007 (*in press*).

Nakamura, E.M.; da Silva, E.A.; Concilio, G.V.; Wilkinson, D.A., Masur, J. Reversible effects of acute and long-term administration of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. *Drug and Alcohol Dependence* 28, 167-75, 1991.

Nava, F.; Carta, G.; Battasi, A.M.; Gessa, G.L. D(2) dopamine receptors enable delta(9)-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *British Journal of Pharmacology* 130, 1201-10, 2000.

Nowicky, A.V.; Teyler, T.J.; Vardaris, R.M. The modulation of long-term potentiation by delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat hippocampus, in vitro. *Brain Research Bulletin* 19, 663-72, 1987.

Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Gong, J.P.; Patel, S.; Perchuk, A.; Meozzi, P.A.; Mora, Z.; Tagliaferro, P.; Gardner, E.; Brusco, A.; Akinshola, B.E.; Liu, Q.R.; Hope, B.; Iwasaki, S.; Arinami, T.; Teasenfitz, L.; Uhl, G.R. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Science* 1074, 514-36, 2006.

Pamplona, F.A.; Takahashi, R.N. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neuroscience Letters* 397, 88-92, 2006.

Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press: San Diego, 1986, 119 p.

Pertwee, R.G. Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9, 1553-71, 2000.

Pertwee, R.G. Pharmacological Actions of Cannabinoids. In: Cannabinoids. Berlin Heidelberg: Springer, 2005a. 762 p.

Pertwee, R.G. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology* 168, 1-51, 2005b.

Pettit, D.A.; Harrison, M.P.; Olson, J.M.; Spencer, R.F.; Cabral, G.A. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 51: 391-402, 1998.

Pop, E. Cannabinoids, endogenous ligands and synthetic analogs. *Current Opinion in Chemical Biology* 3, 418-25, 1999.

Reed, J.M.; Squire, L.R.; Patalano, A.L.; Smith, E.E.; Jonides, J. Learning about categories that are defined by object-like stimuli despite impaired declarative memory. *Behavioral Neuroscience* 113, 411-9, 1999.

Reibaud, M.; Obinu, M.C.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Böhme, G.A.; Imperato, A. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *European Journal of Pharmacology* 379: R1-2, 1999.

Rhee, M.H.; Vogel, Z.; Barg, J.; Bayewitch, M.; Levy, R.; Hanus, L.; Breuer, A.; Mechoulam, R. Cannabinol derivatives: binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylylcyclase. *Journal of Medicinal Chemistry* 40, 3228-33, 1997.

Riedel, G.; Davies, S.N. Cannabinoid Function in Learning, Memory and Plasticity. In: Cannabinoids. Berlin Heidelberg: Springer, 2005a. 762 p.

Riesenhuber, M.; Poggio, T. Neural mechanisms of object recognition. *Current Opinion in Neurobiology* 12, 162-8, 2002.

Robinson, L.; Goonawardena, A.V.; Pertwee, R.G.; Hampson, R.E.; Riedel, G. The synthetic cannabinoid HU210 induces spatial memory deficits and suppresses hippocampal firing rate in rats. *British Journal of Pharmacology* 151: 688-700, 2007.

Rossato, J.I.; Bevilaqua, L.R.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learning and Memory* 13, 431-40, 2006.

Rossato, J.I.; Bevilaqua, L.R.; Myskiw, J.C.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M.P. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning and Memory* 14, 36-46, 2007.

Rusakov, D.A.; Davies, H.A.; Harrison, E.; Diana, G.; Richter-Levin, G.; Bliss, T.V.P.; Stewart, M.G. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience* 80, 69-77, 1997.

Schneider, M.; Koch, M. The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 reduces sensorimotor gating and recognition memory in rats. *Behavioral Pharmacology* 13, 29-37, 2002.

Shen, M.; Piser, T.M.; Seybold, V.S.; Thayer, S.A. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *Journal of Neuroscience* 16, 4322-34, 1996.

Showalter, V.M.; Compton, D.R.; Martin, B.R.; Abood, M.E. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *Journal of Pharmaceutical and Experimental Therapeutics* 278, 989-99, 1996.

Steffens, M.; Engler, C.; Zentner, J.; Feuerstein, T.J. Cannabinoid CB1 receptor-mediated modulation of evoked dopamine release and of adenylyl cyclase activity in the human neocortex. *British Journal of Pharmacology* 141, 1193-203, 2004.

Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388, 773-8, 1997.

Sullivan, J.M. Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 82, 1286-94, 1999.

Szabo, B.; Dörner, L.; Pfreundtner, C.; Nörenberg, W.; Starke, K. Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85, 395-403, 1999.

Terranova, J.P.; Michaud, J.C.; Le Fur, G.; Soubrié, P. Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 352, 576-9, 1995.

Terranova, J.P.; Storme, J.J.; Lafon, N.; Pério, A.; Rinaldi-Carmona, M.; Le Fur, G.; Soubrié, P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology* 126, 165-72, 1996.

Tsou, K.; Mackie, K.; Sañudo-Peña, M.C.; Walker, J.M. Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 93, 969-75 1999.

Varvel, S.A.; Hamm, R.J.; Martin, B.R.; Lichtman, A.H. Differential effects of delta 9-THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacology* 157, 142-50, 2001.

Varvel, S.A.; Lichtman, A.H. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301, 915-24, 2002.

Wilson, R.I.; Nicoll, R.A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588-92, 2001.

Wilson, R.I.; Niccol, R.A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678-82, 2002.

Winsauer, P.J.; Lambert, P.; Moerschbaecher, J.M. Cannabinoid ligands and their effects on learning and performance in rhesus monkeys. *Behavioral Pharmacology* 10, 497-511, 1999.

Winslow, J.T.; Insel, T.R. Neuroendocrine basis of social recognition. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 248-53, 2004.

Wolff, M.C.; Leander, J.D. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. *European Journal of Pharmacology* 477, 213-7, 2003.

Woolf, N.J. A structural basis for memory storage in mammals. *Progress in Neurobiology* 55, 59-77, 1998.

Yim, T.T.; Hong, N.S.; Ejaredar, M.; McKenna, J.E.; McDonald, R.J. Post-training CB1 cannabinoid receptor agonist activation disrupts long-term consolidation of spatial memories in the hippocampus. *Neuroscience* 151, 929-36, 2008.

Zimmerberg, B.; Glick, S.D.; Jarvik, M.E. Impairment of recent memory by marihuana and THC in rhesus monkeys. *Nature* 233, 343-5, 1971.

## ***ANEXO***

Cópia do artigo científico intitulado “Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs long-term object recognition memory” submetido ao periódico *Neurobiology of Learning and Memory*.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.