

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

PAPEL DOS RECEPTORES VR1 HIPOCAMPAIS SOBRE A
CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

BRUNA PASQUALINI GENRO

Orientador: prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

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

Porto Alegre, fevereiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Jorge:

“Sonhar
Mais um sonho impossível
Lutar
Quando é fácil ceder
Vencer o inimigo invencível
Negar quando a regra é vender”

*Sonho impossível/ J. Darion - M. Leigh
Versão Chico Buarque e Ruy Guerra*

“Traduzir uma parte
na outra parte
- que é uma questão
de vida ou morte -
será arte?”

Traduzir-se/ Ferreira Gullar

Aos colegas de LPBNC e à querida D. Zelma:

“Saltar, sair
Partir pé ante pé
Antes do povo despertar
Pular, zunir
Como um furtivo amante
Antes do dia clarear
Apagar as pistas de que um dia
Ali já foi feliz
Criar raiz
E se arrancar”

Na carreira/ Chico Buarque

Ao Lucas:

“Amor é o que se aprende no limite,
depois de se arquivar toda a ciência
herdada, ouvida. Amor começa tarde.”

*Amor e seu tempo/ Carlos Drummond de
Andrade*

A minha irmã Júlia e minha mãe, Letícia:

“As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.

Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
essas ficarão.”

Memória/ Carlos Drummond de Andrade

Ao meu pai (*in memmorian*):

“E de tudo fica um pouco.
Oh abre os vidros de loção
e abafa
o insuportável mau cheiro da memória.”

Resíduo/ Carlos Drummond de Andrade

“O passado não reconhece o seu lugar:
está sempre presente.”

Mário Quintana

Aos ratinhos (in)voluntários:

“Saqueador da metrópole
Tenaz roedor
De toda esperança
Estuprador da ilusão
Ó meu semelhante
Filho de Deus, meu irmão”

Ode aos ratos/ Chico Buarque

“E se a sentença se anuncia bruta
Mais que depressa a mão cega executa
Pois que senão o coração perdoa...”

Fado Tropical/ Chico Buarque - Ruy Guerra

A Pagu, minha gata:

“Nós, gatos, já nascemos pobres
Porém, já nascemos livres
Senhor, senhora ou senhorio
Felino, não reconhecerás”

*História de uma gata/ Enriquez - Bardotti - Chico
Buarque*

Neste trabalho, optamos por designar os ligantes utilizados (capsaicina e capsazepina) e seus receptores VR/TRPV-1 como Sistema “Vanilóide”, e não “Baunilhóide”, como é empregado em nosso laboratório. No apêndice, há uma nota terminológica redigida por meu orientador.

RESUMO

Os receptores vanilóides VR1 estão presentes em grandes quantidades no sistema nervoso periférico (SNP) e têm sido amplamente estudados como integradores de estímulos nocivos. A detecção desse sistema vanilóide também no sistema nervoso central (SNC), leva ao questionamento de qual seria o papel fisiológico dos receptores VR1 localizados no encéfalo. No presente estudo, abordamos a função desses receptores no hipocampo, estrutura essencial para a formação de memórias aversivas. Foram estudados os efeitos da administração bilateral intrahipocampal de capsaicina, um agonista vanilóide endógeno e de capsazepina, um antagonista dos receptores vanilóides VR1 sobre a etapa de consolidação da memória avaliando 3 parâmetros comportamentais (a) a tarefa de Esquiva Inibitória (b) a tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto, e (c) o Labirinto em Cruz Elevado. Nossos resultados mostram que o antagonista VR1, a capsazepina, na concentração de 10 μ M prejudicou a consolidação da memória somente na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto. Não foram observados efeitos na tarefa da Esquiva Inibitória e tampouco no Labirinto em Cruz Elevado, sugerindo que o sistema vanilóide participa nos processos de memória envolvendo componentes mais aversivos e que os fármacos utilizados não produziram efeito sobre a ansiedade ou atividade locomotora dos animais. As evidências sugerem um envolvimento do sistema vanilóide endógeno na modulação da consolidação de memórias com um maior grau de aversividade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Memória	8
1.1.1 Memórias declarativas e não-declarativas.....	10
1.1.2 Memórias de curta duração e de longa duração.....	11
1.2 Sistema Vanilóide	13
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos gerais.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Animais e condicionamento	25
3.2 Procedimentos cirúrgicos	25
3.2.1 Anestesia.....	25
3.2.2 Coordenadas das estruturas.....	26
3.2.3 Craniotomia e colocação das cânulas.....	27
3.2.4 Pós-operatório.....	28
3.3 Tarefas Comportamentais	29
3.3.1 Esquiva Inibitória.....	29
3.3.2 Condicionamento Aversivo ao Contexto.....	31
3.3.3 Labirinto em Cruz Elevado.....	33
3.4 Preparação e injeção dos fármacos	35
3.5 Controle do posicionamento das cânulas	36
3.6 Análise estatística	36
3.7 Desenho experimental e conforto dos animais	37
4. RESULTADOS	39
4.1 Capsaicina na tarefa de Esquiva Inibitória.....	39
4.2 Capsazepina na tarefa de Esquiva Inibitória.....	41
4.3 Capsaicina na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.....	43

4.4 Capsazepina tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.....	45
4.5 Capsaicina no Labirinto em Cruz Elevado	47
4.6 Capsazepina no Labirinto em Cruz Elevado.....	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. APÊNDICE	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Fases da Memória.....	9
Figura 1.2 Receptor VR1. Adaptado de Caterina <i>et al.</i> 1997.....	13
Figura 1.3 <i>Capsicum</i>	15
Figura 1.4 <i>Euphorbia</i> . Adaptado de Szallasi & Blumberg, 1999.....	15
Figura 1.5 Ativação e modulação do receptor VR1. Adaptado de Benham <i>et al.</i> 2002.....	15
Figura 1.6 Endovanilóides. Adaptado de Starowicz <i>et al.</i> 2007.....	19
Figura 3.1 Hipocampo. Adaptado de Paxinos & Watson, 1998.....	26
Figura 3.2 Cirurgia estereotáxica.....	28
Figura 3.3 Esquiva Inibitória.....	30
Figura 3.4 Condicionamento Aversivo ao Contexto.....	32
Figura 3.5 Protocolo experimental esquemático do Condicionamento Aversivo ao Contexto.....	32
Figura 3.6 Aparatao utilizado no Labirinto em Cruz Elevado.....	34
Figura 3.7 Protocolo experimental esquemático do Labirinto em Cruz Elevado.....	34
Figura 4.1 Capsaicina na tarefa de Esquiva Inibitória.....	40
Figura 4.2 Capsazepina na tarefa de Esquiva Inibitória.....	42
Figura 4.3 Capsaicina na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.....	44
Figura 4.4 Capsazepina na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto.....	46
Figura 4.5a Capsaicina no Labirinto em Cruz Elevado - Tempo de permanência nos braços abertos.....	48
Figura 4.5b Capsaicina no Labirinto em Cruz Elevado - Número de entradas nos braços abertos.....	49
Figura 4.5c Capsaicina no Labirinto em Cruz Elevado - Número de entradas nos braços fechados.....	50
Figura 4.6a Capsazepina no Labirinto em Cruz Elevado - Tempo de permanência nos braços abertos.....	52
Figura 4.6b Capsazepina no Labirinto em Cruz Elevado - Número de entradas nos braços abertos.....	53
Figura 4.6c Capsazepina no Labirinto em Cruz Elevado - Número de entradas nos braços fechados.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Memória

A essência de um indivíduo baseia-se em uma parte nada desprezível do que ele é capaz de se lembrar, fazendo com que a combinação de suas experiências com sua carga genética torne cada indivíduo ímpar. Sob esta ótica, a memória é um dos diversos modos pelo qual se pode abordar o segredo da base física da individualidade.

Memória é o traço duradouro, ou engrama, deixado por uma experiência comportamental no cérebro de um animal. Para que ocorra tal fenômeno, um aprendizado prévio é necessário, é o que chamamos de aquisição, período que se dá durante a exposição à experiência. A consolidação das informações adquiridas é o passo seguinte na formação da memória, é uma fase instável e sujeita a modulações. O armazenamento constitui a fase final da formação da memória, é o registro no sistema nervoso central das experiências vividas, quando realmente ocorre a internalização do traço. E, por fim, a evocação da memória, ou o momento em que lembramos, é a prova de que o aprendizado realmente ocorreu, e as informações foram estocadas. Nos animais a evocação é observada de duas maneiras: pela supressão de um comportamento inato (como deixar de explorar um ambiente devido a um estímulo aversivo encontrado nesse ambiente) ou aquisição de um comportamento não natural (como acionar uma alavanca diversas vezes mediante estímulos apetitivos); no homem pode se estender ao reconhecimento de pessoas, palavras, lugares, etc.

Durante a evocação, dois processos antagônicos podem ocorrer (dependendo do valor atribuído à informação), se a informação é importante, essa memória vai ser

reconsolidada, caso contrário ela tenderá a ser extinta. O sentido biológico da reconsolidação da memória é manter e acrescentar novas informações à memória antiga, enquanto a extinção é de formar uma nova memória com significado distinto à memória original.

Devemos ter em mente que a formação de memórias não é um evento instantâneo, mas sim um processo dependente do tempo, que obedece a seqüência da **Figura 1.1**. Podemos interferir com todos esses processos (com a administração de fármacos, por exemplo) sobre as distintas fases da memória.

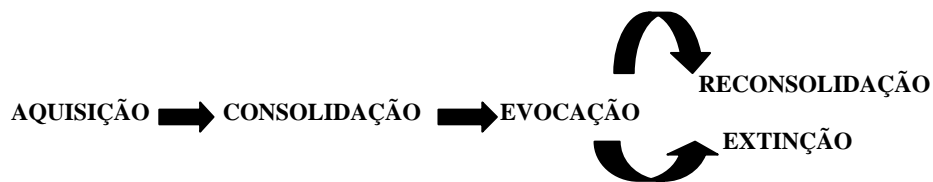


Figura 1.1: Fases da memória.

A experiência é um fator-chave na moldagem dos microcircuitos do cérebro. Comer algo que se associa a um evento desagradável pode muito bem fazer com que nunca mais se volte a gostar daquele tipo de comida. De modo ainda mais simples, apenas aqueles expostos à música de Mozart, por exemplo, terão a chance de dizer que têm uma preferência por Mozart. Experiências que nunca tivemos não desempenham qualquer papel na estruturação de nossa personalidade: se alguém herda um potencial para aprender muitas línguas, essa habilidade lingüística não será concretizada se a pessoa nunca foi exposta a línguas diferentes.

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

1.1.2 - Memórias declarativas e não-declarativas

As memórias declarativas, também conhecidas como explícitas, são assim chamadas pelo fato de podermos declará-las verbalmente, diferente das não-declarativas como veremos adiante. Elas podem ainda ser subdivididas em duas classes: memórias episódicas (eventos ocorridos em determinado tempo e local, com conteúdos autobiográficos) e semânticas (conhecimento de fatos e conceitos).

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

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

Memórias não-declarativas, também chamadas de implícitas ou procedurais, correspondem a hábitos e habilidades motoras. Esse tipo de memória, ao contrário das declarativas, é de mais difícil aquisição, porém depois de aprendida tornam-se praticamente eternas. Evocamos memórias implícitas de forma inconsciente e automática. O exemplo clássico é andar de bicicleta, não precisamos ficar prestando atenção em cada movimento que precisaremos fazer a cada instante.

1.1.3 - Memórias de curta e de longa duração

As memórias de longa duração podem durar de horas até o resto da vida, se essas informações irão ou não serem armazenadas por tanto tempo, vai depender da importância atribuída às informações, da concentração, estado de alerta, ansiedade, influência de fármacos, hormônios, etc. Logo após a aquisição, ou seja, durante a consolidação, é um momento onde as informações recém adquiridas são extremamente vulneráveis a modificações, tanto reforçadoras positivas como negativas, por muitos agentes como eletrochoque, drogas e estresse.

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

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

Alguns conceitos de memória variam conforme o autor, além disso, elas são classificadas de forma didática, algumas memórias declarativas possuem traços de memória não-declarativas. Para complicar a definição, somente os seres humanos podem literalmente declarar algo, mesmo que outros animais, como roedores, por exemplo, também possuam memória declarativa. Mas como a simples observação de aspectos anatômicos, bioquímicos ou eletrofisiológicos não permite detectar sua presença nos animais e, em particular, nos humanos, somente a medição da expressão de um comportamento alterado (evocação), acusa a existência da memória.

Neste trabalho, medimos em ratos a retenção de memórias declarativas de longa duração.

1.2. Sistema Vanilóide

O receptor vanilóide TRPV1 - *Transient receptor potential vanilloid type-1* - ou VR1, primeiramente clonado por Caterina e colaboradores, em 1997 (**Figura 1.2**), são canais catiônicos permeáveis a Na^+ e principalmente a Ca^{2+} pertencentes à família de proteínas denominadas TRP (*transient receptor potencial*), que abrange pelo menos três classes de canais iônicos que medeiam através de um receptor a resposta da célula a estímulos externos “transientes”, como luz, temperatura, estímulo mecânico e osmótico, carga elétrica e substâncias xenobióticas, aumentando ou diminuindo a permeabilidade seletiva a íons específicos e conseqüentemente modificando o potencial de membrana da célula (Starowicz *et al.*, 2007a).

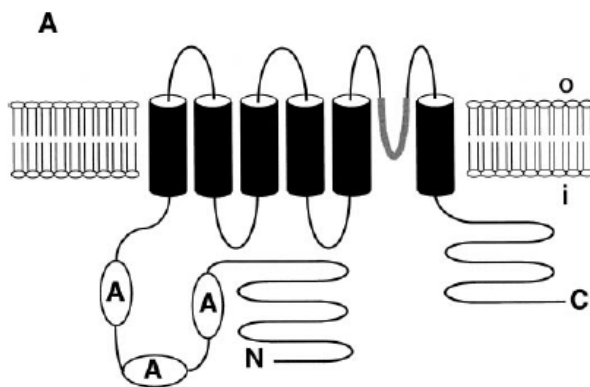


Figura 1.2: Receptor VR1. Estrutura do primeiro receptor vanilóide clonado, apresentando 6 segmentos transmembrana e mais um parcialmente na membrana, que se acredita estar associado com o poro do canal (Caterina *et al.*, 1997).

A família de canais TRP foi assim chamada após a descoberta do papel dessas proteínas na fototransdução de *Drosophilas* mutantes, que mostraram uma resposta transiente ao invés de uma sustentada quando expostas a uma luz brilhante (Montell,

2005). TRP são divididos em três subfamílias: TRPC (*canonical*), TRPV (vanilóide) e TRPM (*melastatin*). O TRPV1 (ou VR1) foi o primeiro a ser clonado entre um grupo de seis canais iônicos TRP ativados por temperatura, sendo quatro deles ativados por calor (TRPV1-4) e dois ativados pelo frio (TRPM8 e TRPA1) (Caterina & Julius, 2001; Patapoutian *et al.*, 2003). Estimulação térmica repetida pode ainda gerar sensibilização (TRPV2 e TRPV3) ou dessensibilização (TRPV4 e TRPA1) desses receptores, bem como distintos mecanismos de sinalização intracelular nesta família de canais TRP (Starowicz *et al.*, 2007a).

Esta família de proteínas-canais caracteriza-se por seis domínios transmembrana de proteínas de membrana integrais e pelos terminais intracelulares N- e C- (Benham *et al.*, 2002), a subfamília TRPV pode ser ativada por toxinas produzidas por algumas plantas como a capsaicina, substância que confere a ardência característica das pimentas (do gênero *Capsicum*) (Figura 1.3), e resiniferatoxina (RTX), toxina produzida pela *Euphorbia resinifera* (Figura 1.4), é essencial para a ação nociceptiva dos compostos vanilóides (Caterina *et al.*, 1997), atuando também como um integrador de estímulos nocivos como baixo pH, altas temperaturas (>43°C), e hiperalgesia térmica resultante de inflamações cutâneas (Figura 1.5) (Szallasi & Blumberg, 1999; Davis *et al.*, 2000).



Figura 1.3: *Capsicum*. A capsaicina, que é um agonista dos receptores VR1, é o componente que confere a ardência clássica das pimentas.



Figura 1.4: *Euphorbia*. Na antiguidade a planta era usada para irritações de pele e nariz, e também como remédio para picadas de cobra e venenos diversos (Freer Gallery of Art, Smithsonian Institution, Washington, DC). Adaptado de Szallasi & Blumberg, 1999.

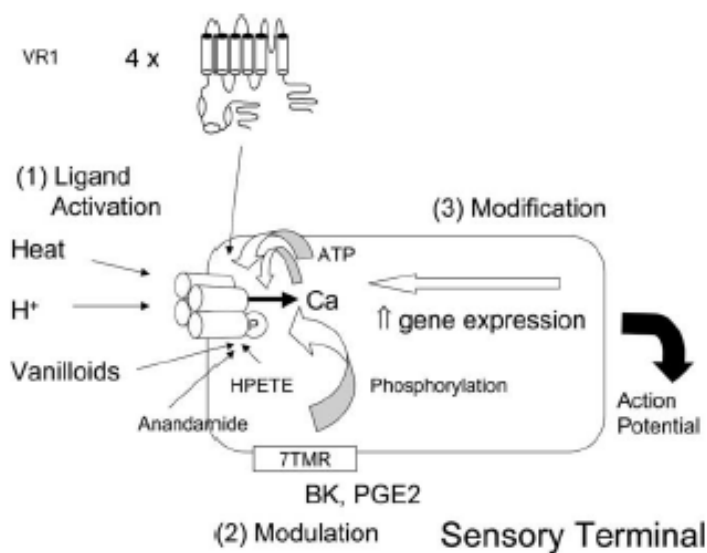


Figura 1.5: Ativação e modulação do receptor VR1. A figura resume o controle de abertura do canal catiônico pertencente à família TRP que constitui o receptor VR1. O poro que forma a estrutura é composto por 4 subunidades e ligantes extracelulares e intracelulares agem individualmente ou sinergicamente para ativar o receptor. Adaptado de Benham *et al.*, 2002.

Mesmo sendo um canal não seletivo, este receptor do tipo 1 da família TRP e subfamília vanilóide, está sujeito a múltiplos níveis de controle através de interações com outras moléculas: (1) O primeiro dentre esses níveis, é por fosforilação reversível catalizada por cinases intrínsecas (por exemplo, proteína cinase A e C) e fosfatases (por exemplo, calcineurina), que desenvolvem um papel importante na sensibilização do receptor; (2) Outro nível de regulação é pela compartimentalização subcelular, no retículo endoplasmático VR1 está presente em duas diferentes formas reguladas, uma dependente de inositol-trifosfato – IP3 – e outra não; (3) E, por último, há uma regulação da atividade de VR1 pelo controle da expressão gênica, embora este processo não seja ainda bem compreendido. Fatores que diminuem a expressão de VR1 (*downregulation*) incluem tratamento com agentes vanilóides e deprivação de fator de crescimento (especialmente de tecido nervoso - NGF), em contraste, o receptor aparece superexpresso (*upregulation*) durante condições inflamatórias, e até presente em neurônios que normalmente não expressam VR1 em modelos experimentais de injúria ao nervo e diabetes neuropática (Cortright & Szallasi, 2004).

Embora a maioria da atenção tenha sido, ao longo dos anos, direcionada para os neurônios sensoriais das vias da dor como os principais sítios de ação da capsaicina, há um número crescente de evidências que apontam que essa substância atua diretamente também em diversas regiões encefálicas.

Antes de o papel do sistema vanilóide central começar a ser investigado no comportamento, já havia alguns estudos anteriores mostrando que a ativação direta do receptor VR1 em diferentes áreas encefálicas resulta em efeitos diversificados, incluindo mudanças na temperatura corporal, respiração, taxa cardíaca, pressão sanguínea e locomoção.

A evidência tanto primária quanto essencial é a presença dos receptores VR1 no encéfalo de mamíferos. Esta localização vem sendo demonstrada através de diversos estudos: a detecção molecular dos VR1 pela hibridização *in situ* (Mezey *et al.*, 2000) e das proteínas componentes do receptor por métodos imunoquímicos (Sanchez *et al.*, 2001; Cortright *et al.*, 2001); corroborando com autoradiografia [³H]RTX no SNC de camundongos expressando ou não os receptores VR1 (Roberts *et al.*, 2004).

A expressão de VR1 detectada no encéfalo é relativamente pequena quando comparada com núcleos infra-espinhais, como por exemplo, a raiz do gânglio dorsal, mas potencialmente funcional. As estruturas encefálicas nas quais foi detectada a expressão, de receptores VR1 incluem: núcleos talâmico e hipotalâmico, o *locus coeruleus*, matéria cinzenta periaquedutal e cerebelo, estruturas corticais e límbicas (notadamente o hipocampo), o caudado putamen e substância nigra *pars compacta* (De Petrocellis & Di Marzo, 2005).

A significância funcional da expressão do VR1 nessas estruturas encefálicas não é clara. No hipotálamo (neurônios pré-ópticos em *slices*), a capsaicina aumentou a taxa de disparo e a liberação de glutamato (Sasamura *et al.*, 1998), além de interferir na termoregulação diminuindo a temperatura corporal (Marinelli *et al.*, 2003). No gânglio basal o VR1 pode estar envolvido no controle extra-piramidal da atividade espontânea. No *locus coeruleus*, a capsaicina ativou os disparos e aumentou a frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias em miniatura *in vitro* (Marinelli *et al.*, 2002). Nos neurônios dopaminérgicos da substância nigra a capsaicina aumentou a frequência de correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas (Marinelli *et al.*, 2003). Finalmente, no tronco encefálico, a estimulação dos receptores VR1 com capsaicina leva a efeitos antinociceptivos através de ao menos dois mecanismos diferentes já descritos (Palazzo *et al.*, 2002; McGaraughty *et al.*, 2003).

Estudos eletrofisiológicos indicam que a ação do VR1 em estruturas supra-espinhais é amplamente pré-sinápticas, embora também haja estudos reportando a localização em espinhas dendríticas neuronais pós-sinápticas no encéfalo (Steenland *et al.*, 2006).

Análises imunohistoquímicas mostraram que, no hipocampo, esses receptores estão localizados no soma e nos dendritos dos neurônios, e nos pés terminais de astrócitos (Tóth *et al.*, 2005). Na região CA1 do hipocampo dorsal, a perfusão de capsaicina e anandamida aumenta a depressão de pulsos pareados de *population spikes* GABA-dependentes, e esse efeito não é revertido pelo antagonista canabinóide AM281, e sim pelo antagonista vanilóide capsazepina, indicando uma localização pré-sináptica de VR1 em terminais GABAérgicos, aumentando a liberação de GABA e inibindo os neurônio desta região hipocampal (Al-Hayani *et al.*, 2001). Hajos e Freund (2002) também demonstraram em neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo que a capsaicina inibe a corrente excitatória pós-sináptica (EPSC), e esse efeito é revertido com o antagonista capsazepina. Porém, a corrente inibitória pós-sináptica (IPSC) não é alterada pelos tratamentos farmacológicos. Por outro lado, foi encontrado por outro grupo que a ativação de VR1 inibe o influxo de cálcio e reduz a liberação de GABA em preparações de sinaptossomas hipocampais (Köfalvi *et al.*, 2006). Essa discrepância entre estudos *in vitro* e *ex vivo* pode ser consequência de duas situações *ex vivo*: a ruptura de moléculas intra e/ou extracelulares que modulariam a função do canal e a possibilidade de uma rápida dessensibilização do receptor VR1.

Um grupo particular de endolipídios, chamados de ligantes endocanabinóides/endovanilóides (Figura1.6) podem ativar tanto os receptores canabinóides CB1, como os receptores vanilóides VR1(Köfalvi *et al.*,2006). A anandamida (AEA) foi o primeiro endovanilóide identificado, primeiramente foi classificado como

agonista endógeno dos receptores canabinóides CB1, e realmente há diversas similaridades entre a ação deste ligante nos dois sistemas em receptores CB1 e VR1: possuem ações opostas sobre os mesmos sinais intracelulares, desempenham um papel nas mesmas condições patológicas, e compartilham ligantes e a mesma distribuição tecidual (Starowicz *et al.* 2007b). Desde a descrição do receptor vanilóide e seu ligante fisiológico AEA, um dos objetivos tem sido identificar outros endovanilóides, como a N-araquidonil dopamina (NADA) e N-oleoil dopamina (cadeias longas saturadas de N-acildopamina) e produtos da lipoxigenase (LOX) metabolizados a partir do ácido araquidônico (AA), que já foram descritos (van Der Stelt & Di Marzo, 2004).

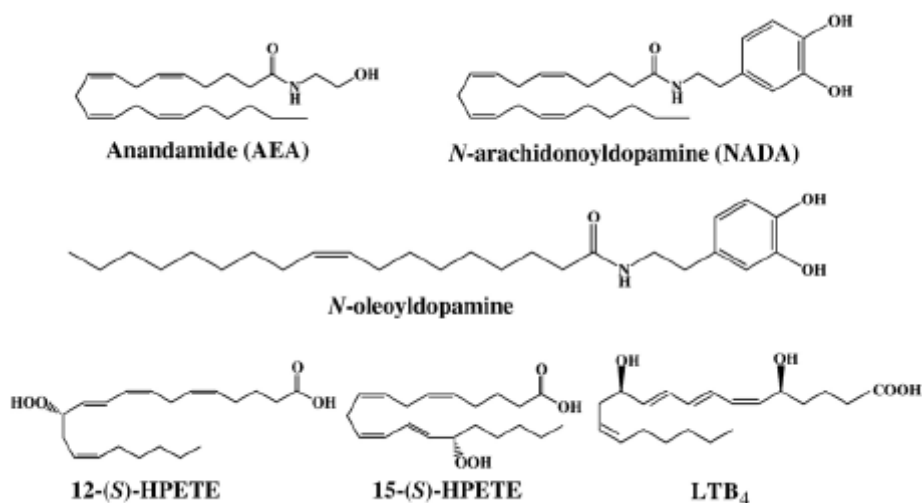


Figura 1.6: Endovanilóides. Estrutura química de algumas moléculas propostas como endovanilóides. Adaptado de Starowicz *et al.*, 2007a.

Entre os endovanilóides já descritos, a AEA é o que foi mais bem caracterizado, sabendo-se que é um ativador dos receptores canabinóides, agindo em CB1 com uma potência similar àquela descrita para seus efeitos em VR1 (Di Marzo *et al.*, 2001). Essa semelhança de ação sugere que VR1 podem ser os receptores funcionais de anandamida no SNC (Al-Hayani *et al.*, 2001). A localização destes receptores descrita por Tóth e

colaboradores (2005) também sustentam esta idéia, já que ambos receptores (CB1 e VR1) são expressos nas mesmas regiões encefálicas, como o hipocampo. Outros dados obtidos com técnicas de imunohistoquímica e confirmados com camundongos nocaute para os receptores CB1 e VR1 também confirmam esta hipótese, particularmente no hipocampo esta coexpressão foi detectada no corpo celular de um grande número de células piramidais entre CA1-CA3 e na camada molecular do giro denteado (Cristino *et al.*, 2006), embora especialmente nestas células neuronais a atividade funcional da AEA no receptor vanilóide possa ser mascarada ou diminuída pela sua ligação e atividade também nos receptores CB1 (Hermann *et al.*, 2003). Ainda no início deste ano de 2008, este mesmo grupo de Cristino e colaboradores, verificou a co-localização de endovanilóides e enzimas relacionadas com sua síntese e degradação, especialmente em células piramidais da região CA3 do hipocampo e em células de Purkinje, indicando que agem como ligantes endógenos do VR1 em sítios de ligação intracelulares (Cristino *et al.*, 2008). Além disso, a coativação pela anandamida da proteína G acoplada aos receptores CB1 com a permeabilidade ao Ca^{2+} dos receptores VR1 pode se somar para explicar a complexidade do funcionamento do sistema endocanabinóide no SNC. Porém é preciso levar em consideração que a eficácia e potência da AEA em VR1 dependem também de diversos eventos regulatórios que podem levar ou não a molécula a se portar como um verdadeiro endovanilóide. Em condições inflamatórias, por exemplo, tem sido demonstrado que a ativação da cascata de sinalização do AMPc transforma a AEA em um potente e eficaz endovanilóide em neurônios da raiz do gânglio dorsal (Starowicz *et al.*, 2007a).

Em ratos, a AEA produziu hipocinesia em paralelo com um decréscimo na atividade de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. E, já que a AEA reduziu a ambulação, estereotipia, e exploração (medidos na tarefa do Campo Aberto), sendo que todos esses efeitos foram revertidos pela capsazepina (antagonista VR1), que não

apresentou efeito próprio, esses efeitos são sugeridos como consequência da atividade em VR1 e não em receptores canabinóides CB1 (de Lago *et al.*, 2004). Di Marzo e colaboradores (2001b) igualmente encontraram esses efeitos dose-dependente de capsaicina e AEA administrados intra-peritônio, sendo que a capsazepina administrada previamente bloqueou os efeitos da capsaicina, mas não da AEA. Além disso, nos experimentos *in vitro*, células expressando o receptor VR1 de rato, estimuladas por capsaicina levaram a formação de AEA. Os autores acreditam que o comportamento motor pode ser suprimido pela ativação de receptores vanilóides, possivelmente através do intermediário da anandamida.

Mesmo assumindo a presença de receptores VR1 no encéfalo, a maior parte são estudos episódicos *ex vivo* que têm demonstrado o seu envolvimento em mecanismos fisiológicos no hipocampo. Köfalvi e colaboradores (2006) reportaram a ausência de evidências de receptores VR1 funcionais em neurônios do hipocampo de ratos. Foi observado um antagonismo competitivo entre I-RTX (antagonista VR1) e AM251 (antagonista rCB1), indicando que as duas moléculas podem estar agindo no mesmo sítio, e mostrando que ainda há discrepâncias entre estudos *ex vivo* e *in vitro* que precisam ser analisadas para entendermos as funções neuroquímicas e fisiológicas do receptor VR1 no encéfalo.

Porém, no último ano, dois estudos começaram a elucidar um pouco melhor o papel destes receptores no encéfalo *in vivo*. O primeiro deles mostrou que camundongos que não expressam o receptor VR1 demonstram uma ansiedade reduzida nas tarefas comportamentais utilizadas (Teste do Claro-Escuro e Labirinto em Cruz Elevado) e também um déficit no aprendizado tanto na tarefa de Medo Condicionado (somente no protocolo de condicionamento mais intenso) como na de Medo Inato. Como são tarefas dependentes do hipocampo, corroboram também com os achados eletrofisiológicos, onde

houve uma diminuição significativa da indução da potenciação de longa duração, a LTP (*long-term potentiation*) (Marsch *et al.*, 2007). O segundo abordou o papel do sistema endocanabinóide na modulação da ansiedade no córtex pré-frontal (CPF). A injeção de doses baixas de AEA no CPF de ratos produziu efeito ansiolítico, enquanto doses altas induziram um efeito ansiogênico. Pré-tratamento com antagonista canabinóide e vanilóide sugeriu que o efeito ansiolítico encontrado seria devido à interação com o receptor CB1 e o efeito ansiogênico seria atribuído à ação da AEA em receptores vanilóides (Rubino *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é investigar a participação do sistema vanilóide/endovanilóide hipocampal sobre a consolidação de memórias aversivas em ratos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Verificar os efeitos do agonista VR1 *capsaicina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, imediatamente após o treino, na tarefa de *Esquiva Inibitória*;

2.2.2 Verificar os efeitos do antagonista VR1 *capsazepina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, imediatamente após o treino, na tarefa de *Esquiva Inibitória*;

2.2.3 Verificar os efeitos do agonista VR1 *capsaicina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, imediatamente após o treino, na tarefa de *Condicionamento Aversivo ao Contexto*;

2.2.4 Verificar os efeitos do antagonista VR1 *capsazepina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, imediatamente após o treino, na tarefa de *Condicionamento Aversivo ao Contexto*;

- 2.2.5 Verificar os efeitos do agonista VR1 *capsaicina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, 15 minutos antes do teste, sobre o desempenho no *Labirinto em Cruz Elevado*;
- 2.2.6 Verificar os efeitos do antagonista VR1 *capsazepina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, 15 minutos antes do teste, sobre o desempenho no *Labirinto em Cruz Elevado*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e acondicionamento

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade de 3 a 4 meses, pesando entre 280 e 350 gramas, fornecidas pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do sul. Os animais foram mantidos no ratário de nosso laboratório (Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação - LPBNC), no Departamento de Biofísica e acondicionados em caixas plásticas cobertas com grades metálicas, no assoalho há maravalha seca e autoclavada, trocada a cada 3 dias. Cada caixa contém 5 ratos. O ciclo de iluminação do ratário do LPBNC é de 12h com luzes acesas (7-19 hs) e 12h com luzes apagadas. A ração padronizada e a água fresca são *ad libitum*.

3.2. Procedimentos cirúrgicos

3.2.1 - Anestesia

Para a cirurgia os animais foram anestesiados usando-se um anestésico geral, Ketamina juntamente com Xilazina, que é um sedativo, miorelaxante e analgésico, administrados intra-peritonealmente (i.p.), nas doses de 75mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

3.2.2 - Coordenadas da estrutura

As coordenadas estereotáxicas, foram adaptadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1998) (**Figura 3.1**) e confirmadas em cirurgias-piloto prévias para nossos

animais. As coordenadas finais para a ponta das cânulas (1 mm acima da região alvo), tendo como ponto de referência o bregma, foram as seguintes (todas em mm):

- Coordenadas Hipocampo:

Plano de fixação = - 0,33

Coordenadas: Ântero-Posterior = - 4,2

Látero-Lateral = +/- 3,0

Dorso-Ventral = - 1,8

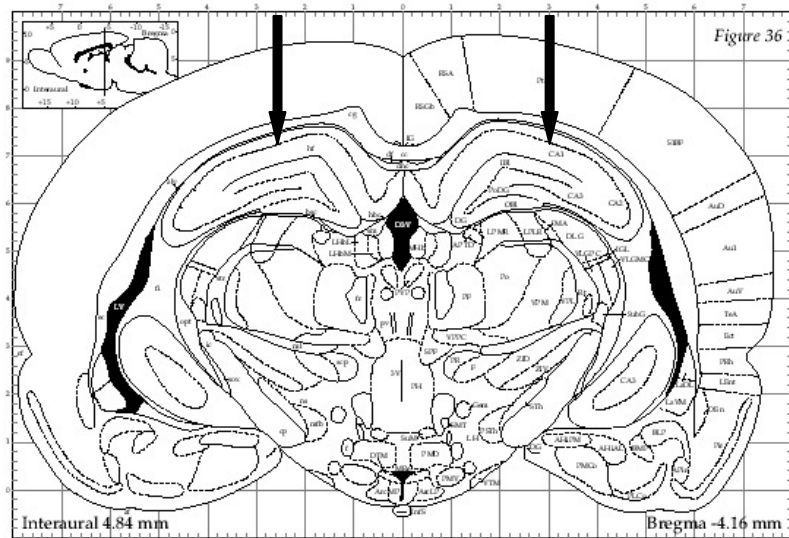


Figura 3.1: Hipocampo. Desenho representando o plano AP-4,3 MM, adaptado do Atlas Paxinos e Watson (1998), mostrando a região CA1 do hipocampo dorsal de rato(indicada pelas setas).

3.2.3 - Craniotomia e colocação das cânulas

Depois de anestesiado o animal é colocado num aparelho estereotáxico (**Figura 3.2**). O topo do crânio era exposto através de incisão com bisturi, seguida de uma craniotomia bilateral usando uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas ântero-posteriores (AP) e látero-laterais (LL) do hipocampo dorsal. Uma cânula de aço inoxidável é posicionada sobre cada orifício feito na calota craniana com o emprego da torre móvel do estereotáxico, então abaixada lentamente até encostar-se à dura-máter, quando a cânula é posicionada na coordenada dorso-ventral (DV).

Cada cânula é fixada com acrílico dentário que, quando seco, forma um capacete sobre o crânio. Sobre a calota craniana, imediatamente acima do cerebelo, é posicionado um parafuso para aumentar a fixação do capacete sobre o crânio.

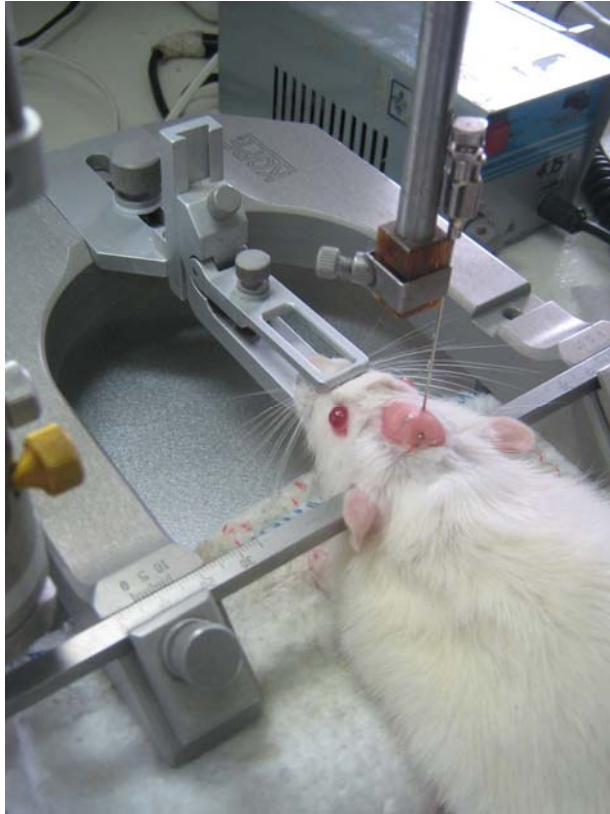


Figura 3.2: Cirurgia estereotáxica. Procedimento cirúrgico para implantação bilateral de cânulas.

3.2.4 - Pós-operatório

Imediatamente após a cirurgia, os animais eram mantidos levemente aquecidos sob uma lâmpada vermelha de 40W, durante 2h, colocada acima da gaiola. Os animais não enxergam no comprimento de onda da luz vermelha evitando, com isso, interferir no ciclo claro/escuro. Após 48-72 horas de recuperação da cirurgia, os animais iniciavam as tarefas comportamentais.

3.3. Tarefas Comportamentais

3.3.1 - Esquiva Inibitória (EI)

O aparelho de Esquiva Inibitória consiste de uma caixa de condicionamento de madeira automatizada (**Figura 3.3**), com medidas 50 x 25 x 25 cm (comprimento x largura x altura). A parede frontal era de vidro transparente, para observação do animal, e o assoalho era uma grade de barras de bronze. No lado esquerdo da caixa, olhando-a de frente, há uma plataforma de madeira revestida de acrílico com medidas 8 x 25 x 5 cm (comprimento x largura x altura). Tanto na sessão de treino (TR), quanto na sessão de teste (TT), o animal foi colocado gentilmente no canto posterior esquerdo do aparelho, sobre a plataforma, sendo, a tampa de acrílico translúcido imediatamente fechada. Na sessão de treino o animal ao descer da plataforma com as 4 patas, recebia durante 3s, um choque intermitente de 0,5 mA nas patas através das barras de bronze do assoalho. Era medido o tempo de espera para a descida da plataforma (latência). Na sessão de teste, 24h após a sessão de treino, o animal era recolocado na plataforma do aparelho de EI, novamente, medindo-se a latência de descida. Na sessão de teste não foi aplicado choque. O teto máximo de latência era de 180s. A diferença das latências TT- TR foi tomada como uma medida de “memória” e referida nas tabelas como escore de retenção.

O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado:

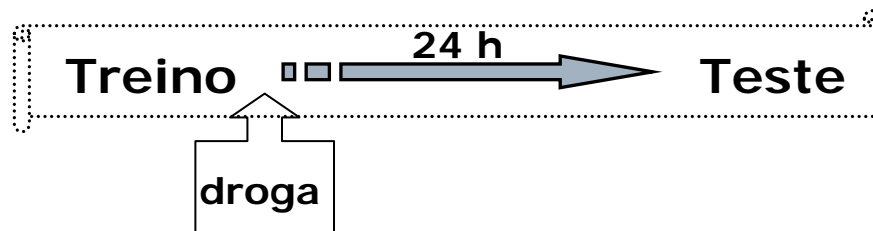


Figura 3.3: Esquiva Inibitória (EI).Caixa de condicionamento automatizada utilizada na tarefa da EI.

3.3.2 - Condicionamento Aversivo Contextual (CAC)

De acordo com o condicionamento Pavloviano, quando um animal associa um estímulo condicionado (EC), o qual inicialmente não produz uma resposta comportamental significativa, com um estímulo incondicionado (EI), o mesmo passa a produzir uma resposta condicionada na presença do EC.

Esta tarefa comportamental foi realizada em uma caixa de condicionamento automatizada, com dimensões 25 X 25 X 25 cm. A parede frontal é feita de vidro transparente, através do qual se observa o animal. O assoalho é uma grade de barras de bronze de 1 mm de diâmetro cada, espaçadas 1 cm uma das outras (**Figura 3.4**). Nesta grade aplica-se uma diferença de potencial elétrico, obtendo-se, conseqüentemente, uma corrente elétrica de 0,2-1,0 mA, conforme o desejado. Delineamento do protocolo experimental (esquematizado na **Figura 3.5**):

- *Sessão de treino*: os animais são colocados na caixa de condicionamento (EC), após 3 min recebem 2 choques de 0,7mA (intervalo de 30 segundos entre eles) (EI). Os animais permanecem por mais 1 minuto antes de voltarem para suas caixas de habitação;
- *Sessão de teste*: passadas 48h da sessão de condicionamento, os animais são reexpostos por 5 minutos na mesma caixa (EC, sem o EI).

Todos os fármacos foram injetados intrahipocampalmente imediatamente após a sessão de treino, na qual se realiza o condicionamento. Depois de condicionados os animais expressam respostas autonômicas e comportamentos defensivos bastante claros, como congelamento, piloereção, aumento da frequência cardíaca e liberação de corticotrofina, quando reexpostos ao EC ([Blanchard e Blanchard,1969](#)). No presente estudo, o congelamento, definido como imobilidade em uma posição estereotipada de

agachamento, com exceção dos movimentos necessários para respiração (Blanchard e Blanchard,1969), será utilizado como índice de memória.



Figura 3.4: Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC). Caixa de condicionamento automatizada utilizada na tarefa de CAC.

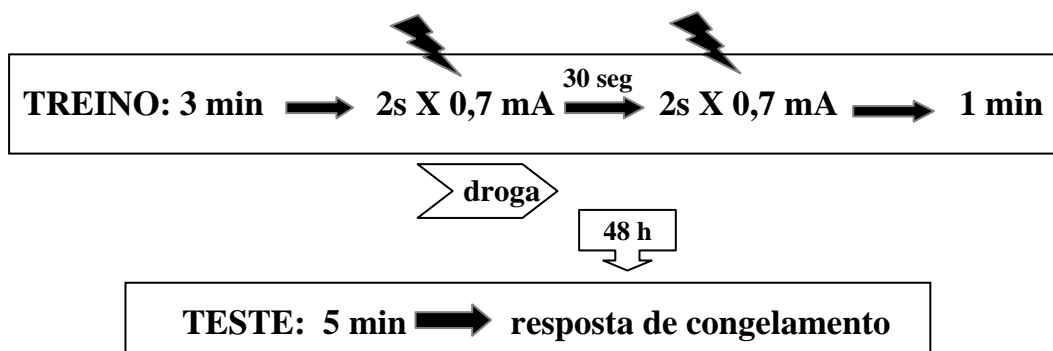


Figura 3.5: Protocolo experimental esquemático do Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC).

3.3.3 - Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O Labirinto em Cruz Elevado compreende 2 braços abertos (50 X 10 cm) e dois braços parcialmente fechados (50 X 10 X 40 cm) formando uma cruz com uma plataforma central em comum (10 X 10 cm), com todo aparato elevado a 70 cm do solo (**Figura 3.6**). Todos os grupos foram testados 15 minutos após a injeção dos fármacos, para avaliar possíveis alterações no nível de ansiedade e na motricidade dos animais sob efeito dos fármacos utilizados nos demais experimentos. O teste consiste em colocar o animal na plataforma central, sob uma luz fraca, virado para um dos braços abertos e então ele é deixado livre para explorar o labirinto por 5 minutos (**Figura 3.7**). Após a retirada de cada animal, o labirinto era cuidadosamente limpo para colocação do próximo rato.

A tarefa se baseia no conflito entre a exploração de um novo ambiente e a evitação de uma potencial situação de risco desconhecida. Os parâmetros são baseados no fato de que animais mais ansiosos permanecem mais tempo nos braços fechados, onde se sentem mais protegidos, explorando menos os braços abertos. Os parâmetros comportamentais avaliados neste experimento foram:

(a) Permanência no braço aberto: foi avaliado o tempo gasto na permanência do animal no braço aberto, representando seu nível de ansiedade;

(b) Número de entradas nos braços abertos: cada entrada era considerada quando o animal cruzava um dos braços com as 4 patas. Medida também para avaliar o estado de ansiedade ([Silveira et al., 2005](#));

(c) Número de entradas nos braços fechados: foi avaliado como uma medida de locomoção para verificar um possível efeito motor ([Carobrez & Bertoglio, 2005](#)).



Figura 3.6: Aparato utilizado no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

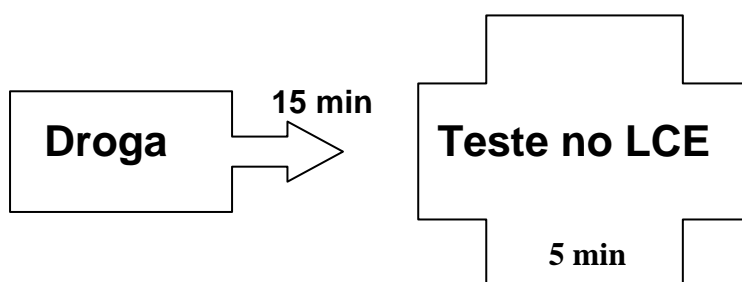


Figura 3.7: Protocolo experimental esquemático do Labirinto em Cruz Elevado.

3.4. Preparação e administração dos fármacos

Experimentos com o antagonista vanilóide capsazepina: Os animais foram divididos em dois grupos que recebiam a infusão bilateral de 0,5µl/lado de capsazepina no hipocampo nas concentrações de 2, 10 ou 20µM, ou seu veículo: dimetil-sulfóxido (DMSO) diluído a 8% em tampão fosfato salino (TFS), isto é, 0,9g% de NaCl em tampão fosfato sódico 0,1M, com pH ajustado para 7,4 (Brioni *et al.*, 1990; da Cunha *et al.*, 1991).

Experimentos com o agonista vanilóide capsaicina: Os animais foram divididos em dois grupos que recebiam a infusão bilateral de 0,5µl/lado de capsaicina no hipocampo nas concentrações de 0,1, 1 ou 10µM, ou seu veículo. O veículo utilizado foi o DMSO 8% em TFS.

A forma de injeção era igual para o grupo droga e o seu correspondente grupo controle. A injeção foi feita com uso de um sistema propulsor automático de microseringas Hamilton, com fluxo de 20 µl/hora (0,5 µl/90 segundos). Completada a infusão de 0,5 µl, aguardava-se mais 30 segundos antes de se remover a “mizzy” (agulha odontológica de calibre 30), para se garantir a absorção/difusão dos fármacos no tecido, evitando o refluxo. Cada operação de injeção foi realizada simultaneamente em ambos os lados, já que duas microseringas estavam acopladas ao propulsor e foram acionadas conjuntamente.

Para avaliar a consolidação da memória, tanto na tarefa de Esquiva Inibitória quanto na do Condicionamento Aversivo ao Contexto, todos os fármacos foram administrados imediatamente após o treino. E para avaliar o efeito das drogas utilizadas

sobre o nível de ansiedade e sobre a locomoção dos animais, os fármacos foram injetados 15 minutos antes do teste na tarefa do Labirinto em Cruz Elevado.

3.5. Controle do posicionamento das cânulas

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

3.6. Análise estatística

Para a análise dos dados da Esquiva Inibitória foram utilizados testes estatísticos não-paramétricos, uma vez que a distribuição dos dados não foi normal em nenhum dos grupos, mesmo naqueles que não atingiram o “teto” de 180s nas latências de teste (teste de Kolmogorov-Smirnov). Para a comparação entre o desempenho no treino e no teste dos animais, utilizou-se o teste de Wilcoxon, enquanto para verificar se houve diferença entre os grupos, tanto no treino quanto no teste utilizou-se o teste de ANOVA de Kruskal-Wallis.

Para a análise dos dados do Condicionamento Aversivo ao Contexto, os tempos de respostas de congelamento dos diferentes grupos no teste foram comparados utilizando o teste ANOVA de 1-via, e quando necessário ($P < 0,05$), o teste *post-hoc* de Tukey HSD.

Para a análise dos dados do Labirinto em Cruz Elevado, o desempenho dos animais foram comparados entre os grupos dentro de cada comportamento estudado, em cada um dos 3 paradigmas utilizados, utilizando o teste ANOVA de 1-via.

3.7. Desenho experimental e conforto dos animais

Este trabalho é um desdobramento do Projeto "Papel dos Receptores CB1 na consolidação e evocação da Memória em Ratos" registrado na UFRGS com o N° 8704, e, de acordo com novas diretrizes emanadas apenas em 2007II, está aguardando aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFRGS).

A partir de trabalhos anteriores de nosso e de outros laboratórios, calculamos amostras de 12-15 animais por grupo para um $\alpha=0,05$ e um poder estatístico igual a 0,90 (veja, por exemplo, [Ferreira *et al.*, 2003](#)).

Como descrito acima no item 3.2, todos os procedimentos cirúrgicos são realizados sob anestesia (após pesagem) com ketamina e xilazina, ficando, depois, em pós-operatório por 4-5 dias, antes de serem utilizados em tarefas comportamentais, quando devem estar plenamente saudáveis e bem dispostos.

Findos os experimentos, todos os animais são sacrificados por decapitação rápida (guilhotinamento) para verificação da posição das cânulas. Este procedimento segue normas consensuadas internacionalmente e é realizado em uma sala diferente daquela em que se fazem os experimentos (e também longe do ratário), e sempre por estudantes ou técnicos treinados e experientes.

O conjunto de procedimentos empregados está (a) em conformidade com a Lei Brasileira N° 6.638/1979, que, por sua vez, está em harmonia com as diretrizes do *U.S. National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals - publication n°. 85-23, revised in 1985*, e do *European Communities Council Directive of 24 November 1986 - 86/609/EEC*), e também (b) de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC-<http://www.sbnec.org.br/>), do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-<http://www.cobea.org.br/>) e da *International Brain Research Organization (IBRO)*.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do agonista VR1 *capsaicina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, imediatamente após o treino, na tarefa de *Esquiva Inibitória*

Para verificar o efeito do agonista vanilóide capsaicina sobre a consolidação da memória na Esquiva Inibitória (EI) utilizamos um total de 44 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal. Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de capsaicina nas concentrações 0.1 μ M (N=10), 1 μ M (N=12), e 10 μ M (N=11), ou de seu veículo (N=9), DMSO8% em TFS, sempre administrados imediatamente após a sessão de treino.

Os resultados estão mostrados na **Figura 4.1**.

Como os dados (i) não se distribuíam normalmente (teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e também (ii) houve latências que atingiram o valor imposto como “teto” de 180s, utilizamos estatística não-paramétrica.

Os treinos dos grupos não diferiram significativamente entre si, permitindo analisar os dados comparando os diferentes grupos (teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,791$).

Todos os grupos mostraram diferença significativa entre as latências na sessão de treino e de teste (“a”, no gráfico - teste de Wilcoxon, $P < 0,05$), demonstrando terem aprendido a tarefa.

Não houve diferença significativa entre os grupos nas latências das sessões de teste (teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,392$).

CPS na tarefa de EI

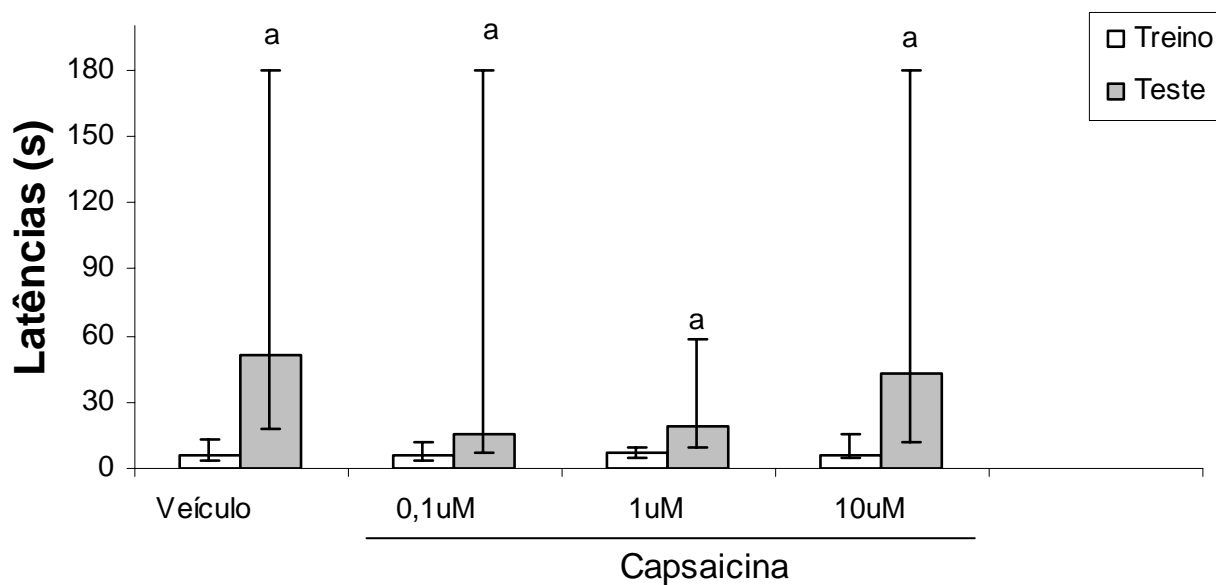


Figura 4.1

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsaicina nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM ($N= 11, 10, 12$ e 11 , respectivamente) no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória (EI). Dados expressos como mediana (intervalos interquartis) das latências de descida da plataforma.

(a) Diferença significativa entre as latências do treino e do teste no grupo (teste de Wilcoxon, $P<0,05$). Não há diferença significativa entre os grupos nas latências dos treinos ou dos testes (teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P=0,791$ e $0,392$, respectivamente).

4.2. Efeitos do antagonista VR1 *capsazepina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, imediatamente após o treino, na tarefa de *Esquiva Inibitória*

Para verificar o efeito do antagonista vanilóide capsazepina sobre a consolidação da memória na Esquiva Inibitória (EI) utilizamos um total de 44 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal. Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de capsazepina nas concentrações 2 μ M (N=10), 10 μ M (N=11), e 20 μ M (N=11), ou de seu veículo (N=12), DMSO8% em TFS, sempre administrados imediatamente após a sessão de treino.

Os resultados estão mostrados na **Figura 4.2**.

Como os dados (i) não se distribuíam normalmente (teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e também (ii) houve latências que atingiram o valor imposto como “teto” de 180s, utilizamos estatística não-paramétrica.

Os treinos dos grupos não diferiram significativamente entre si, permitindo analisar os dados comparando os diferentes grupos (teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,586$).

Todos os grupos mostraram diferença significativa entre as latências na sessão de treino e de teste (“a”, no gráfico - teste de Wilcoxon, $P < 0,05$), demonstrando terem aprendido a tarefa.

Não houve diferença significativa entre os grupos nas latências das sessões de teste (teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,277$).

CPZ na tarefa de EI

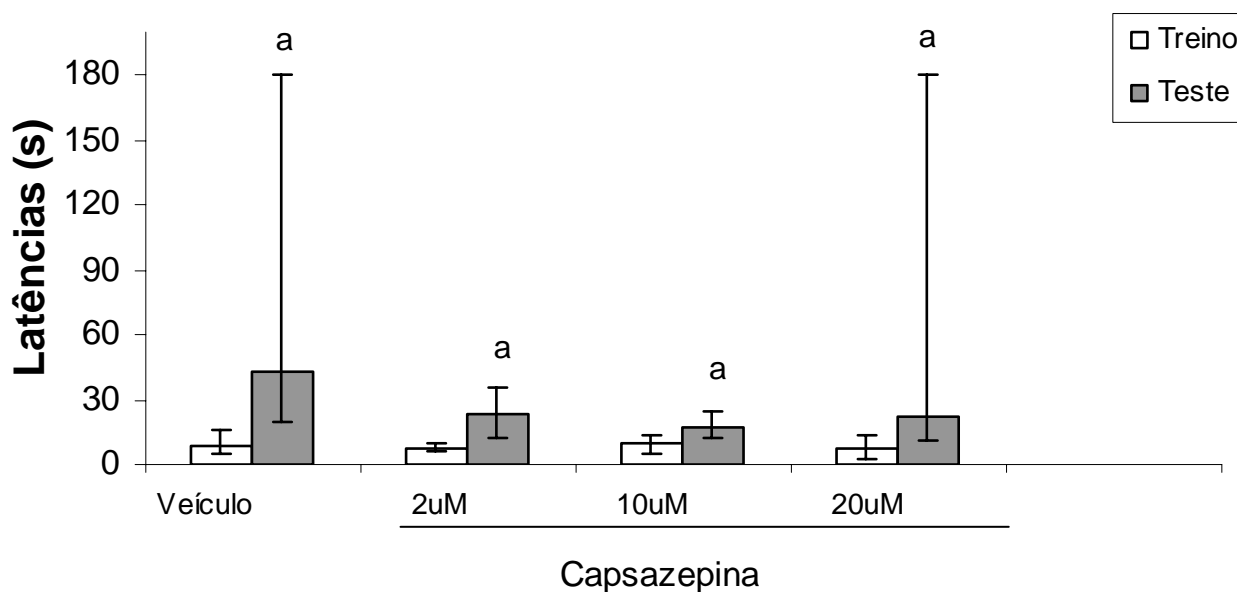


Figura 4.2

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsazepina nas concentrações de 2, 10 e 20 μM ($N= 12, 10, 11$ e 11 , respectivamente) no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória (EI). Dados expressos como mediana (intervalos interquartis) das latências de descida da plataforma.

(a) Diferença significativa entre as latências do treino e do teste no grupo (teste de Wilcoxon, $P<0,05$). Não há diferença significativa entre os grupos nas latências dos treinos ou dos testes (teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P=0,586$ e $0,277$, respectivamente).

4.3. Efeitos do agonista VR1 *capsaicina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, imediatamente após o treino, na tarefa de *Condicionamento Aversivo ao Contexto*

Para verificar o efeito do agonista capsaicina sobre a consolidação da memória no Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) utilizamos um total de 42 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal. Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de capsaicina nas concentrações 0.1 μ M (N=11), 1 μ M (N=13), e 10 μ M (N=9), ou de seu veículo (N=9), DMSO8% em TFS, sempre administrados imediatamente após a sessão de treino.

Os resultados estão mostrados na **Figura 4.3**.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de resposta de congelamento da sessão de teste dos diferentes grupos ($F_{(3,38)}=0,460$, $P=0,712$, teste de ANOVA de 1 via,

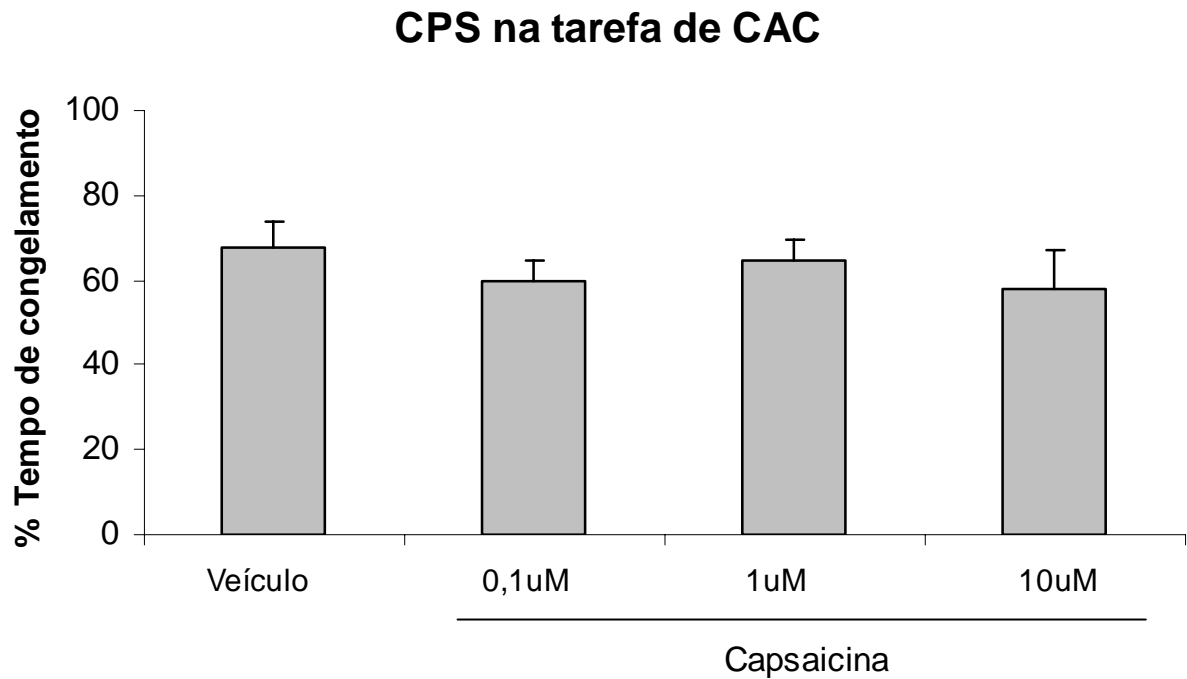


Figura 4.3

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsaicina nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M (N= 9, 11, 13 e 9, respectivamente) no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após o treino na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC). Dados expressos como porcentagem de tempo de respostas de congelamento em relação ao tempo total do teste.

Não há diferença significativa entre os grupos no tempo de respostas de congelamento no teste ($F_{(3,38)}=0,460$, $P=0,712$, teste de ANOVA de 1 via).

4.4. Efeitos do antagonista VR1 *capsazepina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, imediatamente após o treino, na tarefa de *Condicionamento Aversivo ao Contexto*

Para verificar o efeito do antagonista vanilóide capsazepina sobre a consolidação da memória no Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) utilizamos um total de 39 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal. Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de capsazepina nas concentrações 2 μ M (N=9), 10 μ M (N=9), e 20 μ M (N=10), ou de seu veículo (N=11), DMSO8% em TFS, sempre administrados imediatamente após a sessão de treino.

Os resultados estão mostrados na **Figura 4.4**.

Houve diferença significativa entre os tempos de resposta de congelamento da sessão de teste dos diferentes grupos ($F_{(3,35)}=3,233, P=0,034$, Teste de ANOVA de 1-via.), que, posteriormente ordenado pelo teste *post-hoc* de Tukey de comparações múltiplas, mostrou que o grupo em que foi administrada a concentração de 10 μ M era significativamente diferente do grupo controle ($P<0,05$). Diferença estatisticamente significativa representada por “a” no gráfico.

CPZ na tarefa de CAC

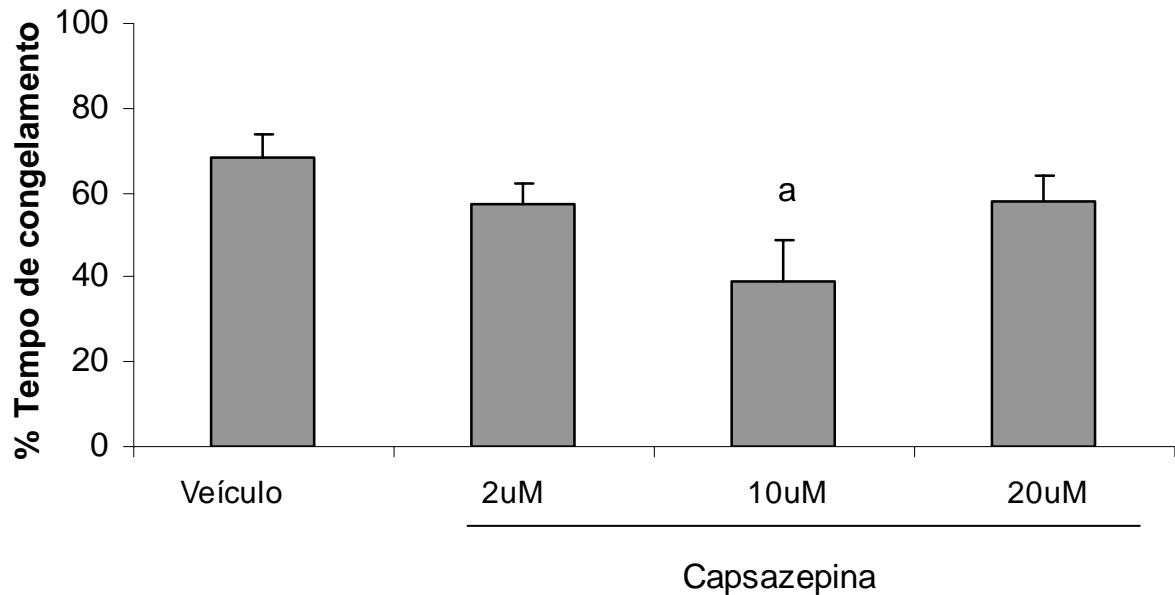


Figura 4.4

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsazepina nas concentrações de 2, 10 e 20 μM ($N= 11, 9, 9$ e 10 , respectivamente) no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após o treino na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC). Dados expressos como porcentagem de tempo de respostas de congelamento em relação ao tempo total do teste.

(a) Representando diferença significativa ($p<0,05$) no tempo de respostas de congelamento no teste entre o grupo que recebeu a capsazepina na concentração de $10\mu\text{M}$ e o grupo controle.

4.5. Efeitos do agonista VR1 *capsaicina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, 15 minutos antes do teste, sobre o desempenho no *Labirinto em Cruz Elevado*

Para verificar o efeito do agonista capsaicina sobre o desempenho dos animais no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) utilizamos um total de 28 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal. Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de capsaicina nas concentrações 0.1 μ M (N=7), 1 μ M (N=7), e 10 μ M (N=7), ou de seu veículo (N=7), DMSO8% em TFS, neste modelo sempre administrados 15 minutos anteriormente ao teste.

Foram analisados 3 diferentes parâmetros durante o teste:

- (a) O tempo total que os animais permaneciam no braço aberto, usado como medida de ansiedade (TBA);
- (b) O número de entradas realizadas nos braços abertos, analisado como uma segunda medida de ansiedade (EBA);
- (c) O número de entradas nos braços fechados, estudado para avaliar possíveis efeitos motores (EBF).

Os resultados estão mostrados, respectivamente, nas **Figura 4.5a** , **Figura 4.5b** e **Figura 4.5c**.

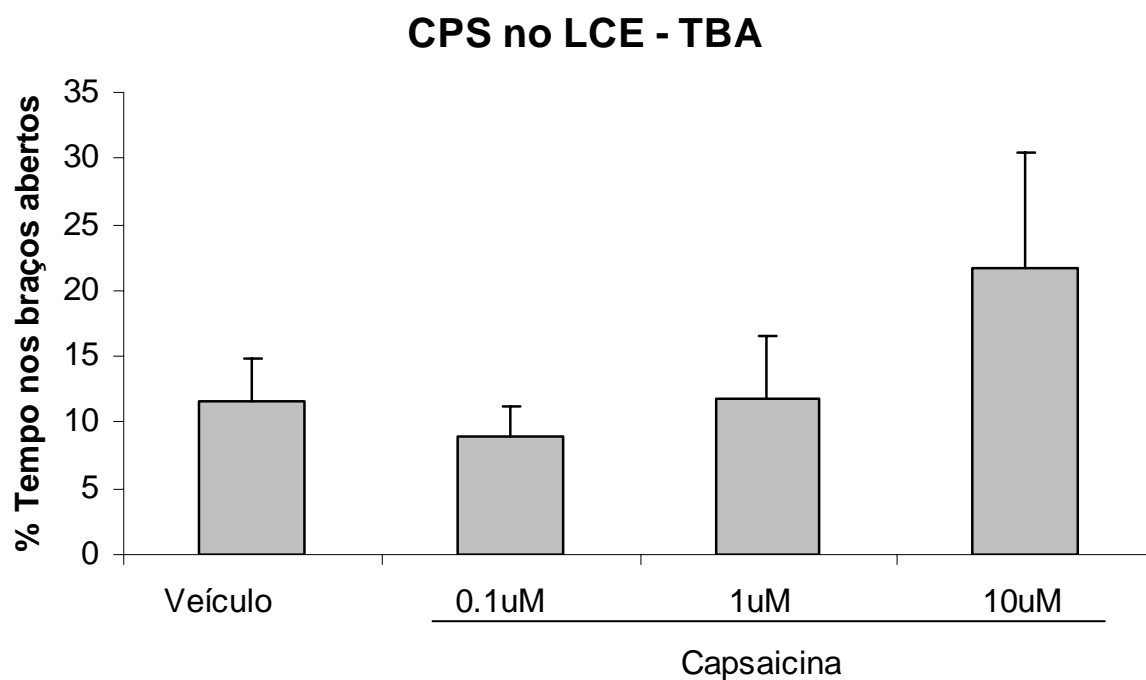


Figura 4.5a

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsaicina nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM ($N=7$, para todos os grupos) no hipocampo dorsal de ratos, 15 minutos antes do teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) . Dados expressos como porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total do teste.

Não há diferença significativa entre os grupos no tempo de permanência nos braços abertos (teste de ANOVA de 1-via, $F_{(3,24)}=1,620$, $P=0,211$).

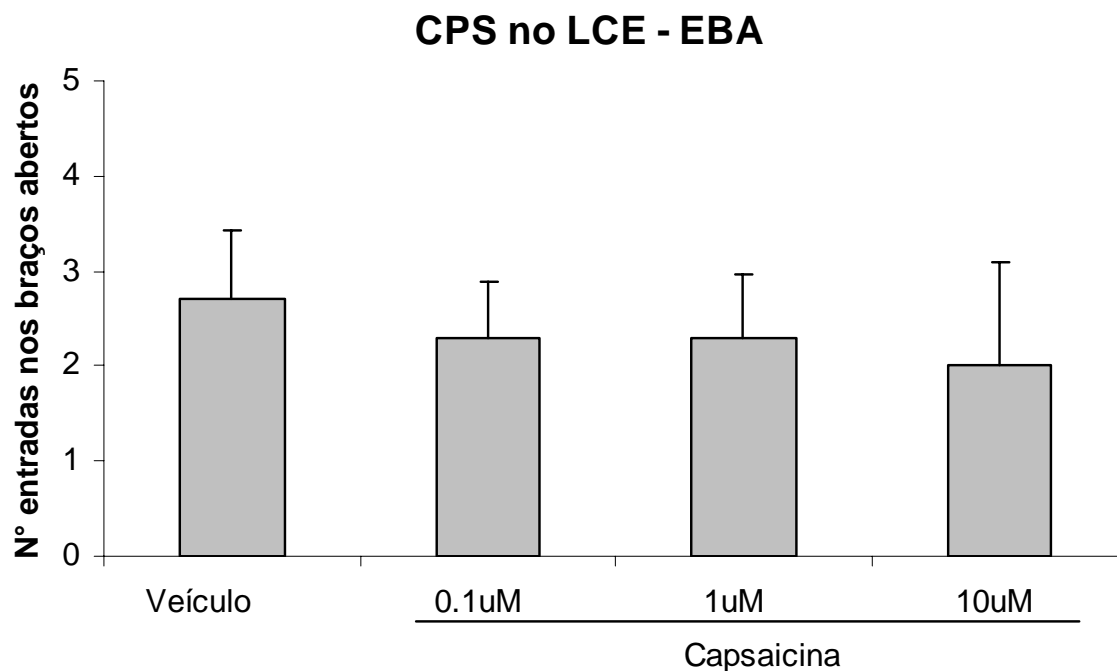


Figura 4.5b

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsaicina nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM ($N=7$, para todos os grupos) no hipocampo dorsal de ratos, 15 minutos antes do teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) . Dados mostrando o número de entradas realizadas nos braços abertos durante o teste.

Não há diferença significativa entre os grupos no número de entradas realizadas nos braços abertos (teste de ANOVA de 1-via, $F_{(3,24)}=0,137$, $P=0,937$).

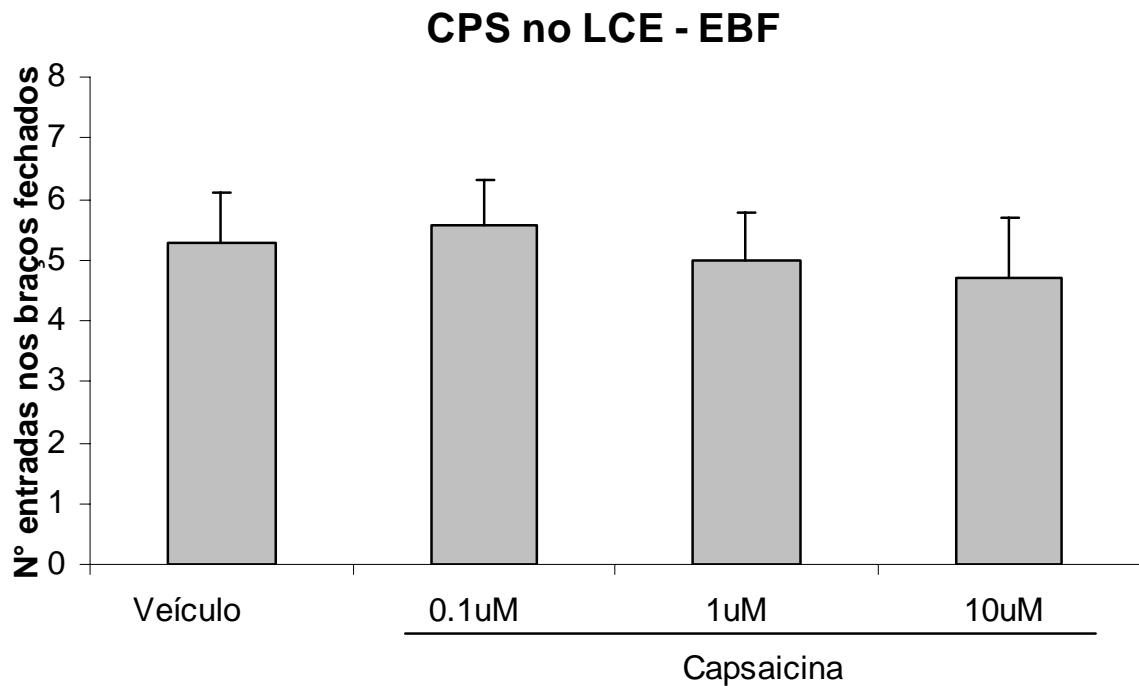


Figura 4.5c

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsaicina nas concentrações de 0.1, 1 e 10 μM ($N= 7$, para todos os grupos) no hipocampo dorsal de ratos, 15 minutos antes do teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) . Dados mostrando o número de entradas realizadas nos braços fechados durante o teste.

Não há diferença significativa entre os grupos no número de entradas realizadas nos braços fechados (teste de ANOVA de 1-via, $F_{(3,24)}=0,196$, $P=0,898$).

4.6. Efeitos do antagonista VR1 *capsazepina*, infundido bilateralmente e em diferentes concentrações no hipocampo dorsal (CA1) de ratos, 15 minutos antes do teste, sobre o desempenho no *Labirinto em Cruz Elevado*

Para verificar o efeito do agonista capsaicina sobre o desempenho dos animais no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) utilizamos um total de 29 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal. Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de capsaicina nas concentrações capsazepina nas concentrações 2 μ M (N=7), 10 μ M (N=7), e 20 μ M (N=7), ou de seu veículo (N=8), DMSO8% em TFS, neste modelo sempre administrados 15 minutos anteriormente ao teste.

Foram analisados 3 diferentes parâmetros durante o teste:

- (a) O tempo total que os animais permaneciam no braço aberto, usado como medida de ansiedade (TBA);
- (b) O número de entradas realizadas nos braços abertos, analisado como uma segunda medida de ansiedade (EBA);
- (c) O número de entradas nos braços fechados, estudado para avaliar possíveis efeitos motores (EBF).

Os resultados estão mostrados, respectivamente, nas **Figura 4.6a**, **Figura 4.6b** e **Figura 4.6c**.

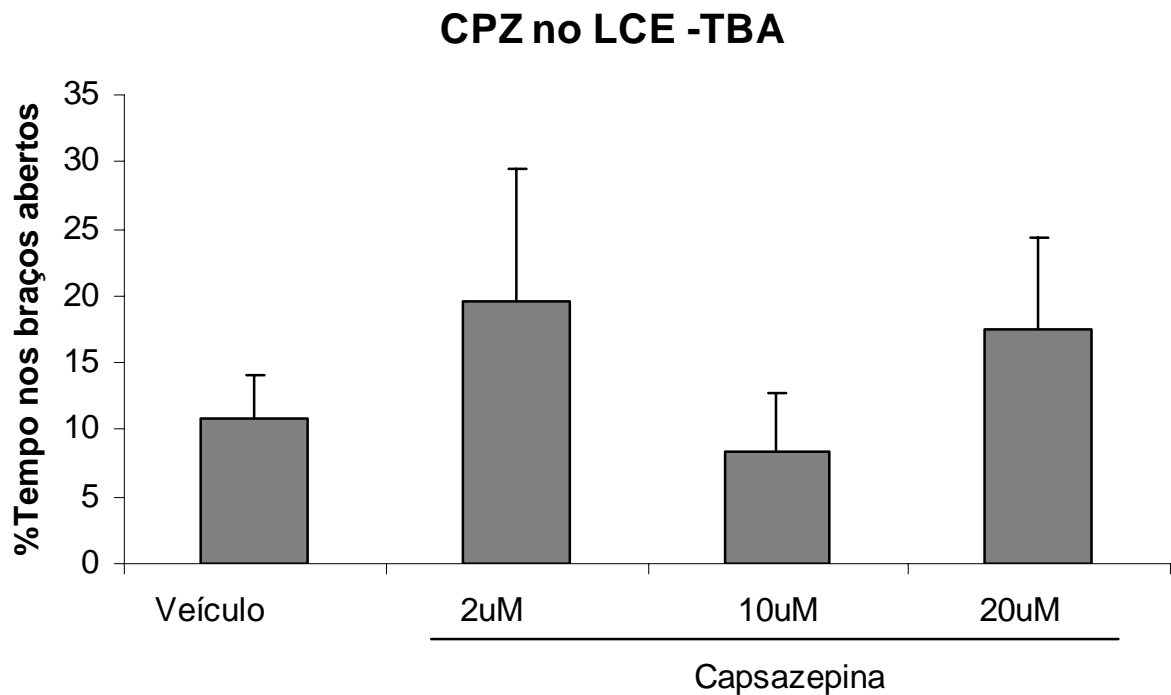


Figura 4.6a

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsazepina nas concentrações de 2, 10 e 20 μM (N=8 para o grupo veículo e N= 7, para todos os grupos infundidos com droga) no hipocampo dorsal de ratos, 15 minutos antes do teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Dados expressos como porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total do teste.

Não há diferença significativa entre os grupos no tempo de permanência nos braços abertos (teste de ANOVA de 1-via, $F_{(3,25)}=0,652$, $P=0,589$).

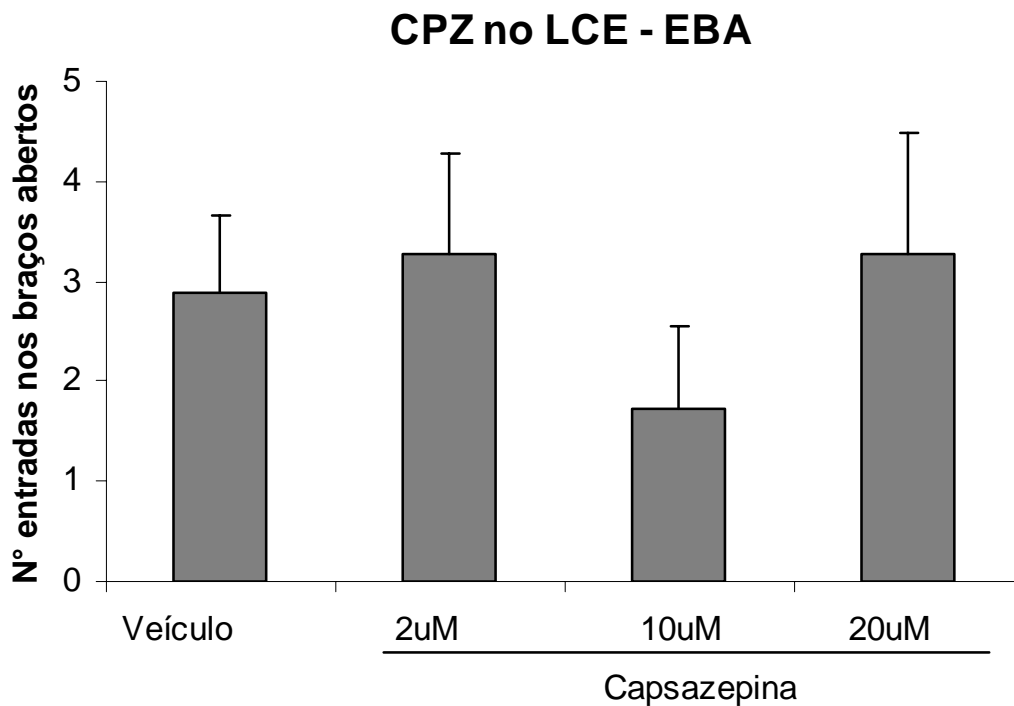


Figura 4.6b

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsazepina nas concentrações de 2, 10 e 20 μM (N=8 para o grupo veículo e N= 7, para todos os grupos infundidos com droga) no hipocampo dorsal de ratos, 15 minutos antes do teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Dados mostrando o número de entradas realizadas nos braços abertos durante o teste.

Não há diferença significativa entre os grupos no número de entradas realizadas nos braços abertos (teste de ANOVA de 1-via, $F_{(3,25)}=0,578$, $P=0,635$).

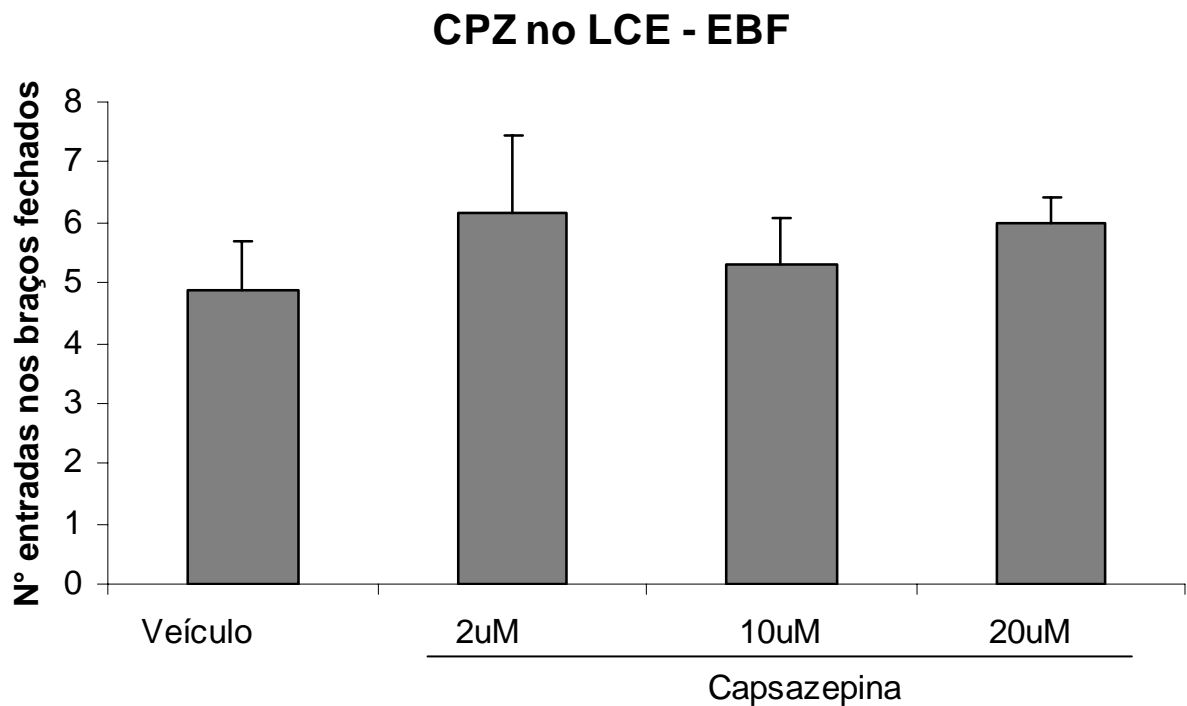


Figura 4.5c

Efeito da infusão bilateral de veículo ou capsazepina nas concentrações de 2, 10 e 20 μM (N=8 para o grupo veículo e N= 7, para todos os grupos infundidos com droga) no hipocampo dorsal de ratos, 15 minutos antes do teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Dados mostrando o número de entradas realizadas nos braços fechados durante o teste.

Não há diferença significativa entre os grupos no número de entradas realizadas nos braços fechados (teste de ANOVA de 1-via, $F_{(3,25)}=0,460$, $P=0,713$).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, o antagonista vanilóide capsazepina promoveu efeito amnésico na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC), na concentração de 10 μ M; ou seja, prejudicou a consolidação desta memória aversiva contextual testada 48h após o condicionamento / administração do fármaco (**Figura 4.4**). Não houve efeito, porém, na tarefa de Esquiva Inibitória (EI) com descida da plataforma, em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 4.2**), apesar de esta ser também (embora talvez menos) aversiva, existindo a possibilidade dessa ausência de resultados ter-se dado a variáveis experimentais que não temos controle, como por exemplo, diferenças inatas e individuais de comportamento dos animais.

O agonista vanilóide capsaicina não teve efeito em nenhuma das tarefas aversivas utilizadas, em qualquer das concentrações estudadas (**Figuras 4.1 e 4.3**).

Em relação aos parâmetros utilizados para medir ansiedade, verificados no Labirinto em Cruz Elevado, nenhum dos fármacos em nenhuma das concentrações testadas apresentou qualquer efeito sobre o nível de ansiedade dos animais, tanto na medida do tempo total gasto nos braços abertos (**Figuras 4.5a e 4.6a**), quanto no número de entradas nos mesmos (**Figuras 4.5b e 4.6b**). Nossos resultados também mostraram a ausência de efeitos motores empregando esta mesma tarefa (**Figuras 4.5c e 4.6c**), no caso, observando o número de entradas nos braços fechados ([Weiss et al., 1998](#)).

De acordo com a revisão bibliográfica que realizei para este trabalho, não há, até o presente momento, qualquer outro trabalho publicado na literatura com infusão de agentes vanilóides na formação hipocampal *in vivo*. Há, porém, um número muito reduzido de estudos comportamentais que sugerem a participação do sistema endovanilóide ([Marsch et](#)

al., 2007; Kascow *et al.*, 2004; Di Marzo *et al.*, 2001; Rubino *et al.*, 2007; de Lago *et al.*, 2004).

Devido ao fato de seus receptores terem sido clonados há relativamente pouco tempo, e a determinação de sua localização no SNC em estruturas encefálicas ser ainda mais recente, somente agora foi viabilizado um número crescente de investigações direcionadas para tal tema. Já estudos *ex vivo* há uma maior diversidade mostrando a participação dos receptores VR1 em fenômenos eletrofisiológicos, inclusive no hipocampo, utilizando agentes farmacológicos ou camundongos modificados geneticamente, que não expressam o receptor vanilóide VR1 (Marsch *et al.*, 2007).

Estudos prévios reportaram que o antagonismo dos receptores VR1, ou a ausência de expressão destes receptores poderia diminuir sua sensibilidade a estímulos aversivos, em especial ao calor (Caterina *et al.*, 1997), porém no presente estudo houve um controle de ansiedade e efeito locomotor para excluir que esta hipótese pudesse interferir nos resultados observados, além de terem sido realizados grupos controle para cada grupo experimental, que foram infundidos somente com o veículo dos fármacos.

Como dissemos, antes, a capsazepina na concentração de 10 μ M prejudicou a consolidação da memória da tarefa do Condicionamento Aversivo ao Contexto (**Figura 4.4**), ou seja, os animais que receberam o antagonista nesta dose intermediária demonstraram uma menor resposta de medo quando expostos novamente ao contexto no qual receberam o estímulo aversivo. A formação da memória do medo contextual requer uma formação hipocampal intacta, além do envolvimento da amígdala basolateral (Kim & Fanselow, 1992; Rudy *et al.*, 2004).

No Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC), que é um condicionamento Pavloviano, o animal é colocado em um contexto previamente neutro (estímulo

condicionado - EC) que é pareado com um estímulo aversivo, dois choques elétricos de 0,7mA e 2 segundos de duração cada (estímulo incondicionado – EI). Como resultado deste pareamento do contexto com o choque, o contexto, individualmente, adquire o potencial de evocar uma resposta de comportamento defensivo, como o *freezing* (a resposta condicionada – RC) durante a reexposição do animal a este mesmo contexto. Já no procedimento de Esquiva Inibitória (EI), o animal é colocado em uma plataforma, com o restante do solo da caixa experimental feito de uma grade metálica, sendo a latência para ele descer desta plataforma registrada. Quando desce efetivamente da plataforma com as quatro patas, ele recebe 3 choques elétricos inescapáveis de 0,5mA nas patas através da grade metálica, com duração de 1 segundo cada. No dia do teste, o animal é recolocado na plataforma e o tempo de latência para a descida da plataforma é novamente registrado.

É claro que estes dois protocolos aversivos têm muito em comum, em ambos os casos os animais experimentam o pareamento de estímulo previamente neutro (o contexto, seja da EI ou do CAC) com um choque elétrico. Mas também há diferenças relevantes entre estes dois procedimentos: no CAC a apresentação do choque é independente do comportamento do animal, o contingente entre o EC e o EI é determinado pelo experimentador; e já na EI o animal precisa exibir uma resposta comportamental, descendo ativamente da plataforma, antes de receber o choque (Quillfeldt, 2006). Como resultado o choque elétrico atua tanto para condicionar o compartimento neutro como um estímulo contextual aversivo (EC) no CAC e para punir o comportamento exploratório inato de descida da plataforma na EI (Tinsley *et al.*, 2004). O requerimento de uma resposta instrumental não se diferencia apenas na natureza psicológica dos dois processos descritos (CAC e EI), mas também podem apresentar efeitos divergentes nos substratos neurais envolvidos (Maren, 2003).

O grau de aversividade envolvido deve ser um fator relevante, pois na tarefa da Esquiva Inibitória, também aversiva - mas talvez não tanto assim já que não é uma resposta de *freezing* o que a EI promove e sim apenas a supressão de uma resposta (Quillfeldt, 2006): o antagonista capsazepina não produziu efeito significativo no desempenho dos animais em nenhuma das concentrações testadas (Figuras 4.1 e 4.2).

A magnitude do estímulo incondicionado reflete quantitativamente na magnitude da resposta ao estímulo condicionado, hipótese esta testada com dois protocolos experimentais aversivos mostrando que não só o tempo para o início da resposta de *freezing* como também o montante da resposta estavam relacionados com a intensidade do choque elétrico recebido pelos animais (Morris & Bouton, 2006). Cammarota e colaboradores, em 2005, demonstraram que na tarefa de Esquiva Inibitória com duas sessões de treino com choques de 0,5mA, os animais retêm a memória aversiva adquirida com uma intensidade similar àqueles treinados na mesma tarefa com apenas uma sessão de choque de 0,8mA.

Já o fato de o agonista capsaicina não ter causado qualquer efeito em nenhuma das tarefas aversivas pode se dever a outro aspecto mais de cunho fisiológico: o aumento do tônus vanilóide com a infusão de agentes exógenos necessariamente interfere com as ações endógenas dos (endo)vanilóides, o que pode se dar com a soma das concentrações presentes (se o agonista infundido fosse a anandamida), ou com algum tipo de sinergismo entre agonistas endovanilóides (seria o nosso caso). Esse tônus endovanilóide aumentado pode não ter causado qualquer efeito, pois sistemas, por exemplo, com respostas opostas, podem ter sido agonizados simultaneamente, compensando-se: claro que isso é hipotético, e precisaria ser testado. A esperança de algum efeito residiria possivelmente nas concentrações muito baixas, próximas às fisiológicas.

Camundongos nocaute para o receptor VR1 tiveram a aquisição e/ou expressão da memória do medo contextual prejudicada, mas este efeito da supressão do receptor só se tornou evidente após procedimentos mais fortes de condicionamento (um único choque de 0,7mA não surtiu efeito, houve diferença entre os nocautes e selvagens somente com 3 choques de 0,7mA ou um choque de 1,5mA) , e as respostas perduraram por pelo menos um mês. No mesmo trabalho, os resultados eletrofisiológicos da indução da LTP em CA1 apontam no mesmo sentido: foi possível induzir uma LTP estável nos camundongos nocaute, porém menos pronunciada em comparação com os animais selvagens, podendo esta redução ser análoga à inabilidade dos animais sem os receptores VR1 de formar uma memória de medo contextual mesmo após procedimentos de condicionamento mais aversivos (Marsch *et al.*, 2007). Com base nas informações obtidas através desse estudo realizado com camundongos geneticamente modificados podemos concluir que os animais nocaute diferem dos selvagens exclusivamente sob condições aversivas (por exemplo, teste do Claro-Escuro e Labirinto em Cruz Elevado, mas não no Campo Aberto). Portanto, em animais que expressam normalmente os receptores vanilóides, o VR1 seria responsável por promover medo inato e ansiedade, aquisição e/ou expressão da memória de medo contextual com um forte condicionamento e a LTP no hipocampo dorsal.

A ansiedade é uma resposta afetiva que pode complicar a interpretação de um resultado em termos puramente cognitivo, “mascarando” um resultado (McGaugh, 1966; Carobrez & Bertoglio, 2005). Em nosso estudo, empregamos a tarefa do Labirinto em Cruz Elevado para avaliar possíveis efeitos ansiogênicos/ansiolíticos: nenhum dos fármacos utilizados, porém, em nenhuma das concentrações estudadas, promoveu qualquer mudança no nível de ansiedade dos animais, tanto na medida do tempo total gasto nos braços abertos (Figuras 4.5a e 4.6a) quanto o número de entradas nos mesmos (Figuras 4.5b e 4.6b). Mesmo sabendo que o hipocampo dorsal não está envolvido no processamento da

ansiedade - ao contrário do hipocampo ventral, como recentemente demonstrado (Nascimento Häckl, L.P. & Carobrez, A.P., 2007), queríamos nos certificar de que nossos resultados não se deviam a nenhum efeito sobre a modulação da ansiedade, uma vez que outros autores têm descrito efeitos de vanilóides sobre a ansiedade (Rubino *et al.*, 2007; Kascow *et al.*, 2004).

Rubino e colaboradores (2007), por exemplo, acreditam que os receptores vanilóides estejam envolvidos em processos ansiogênicos. Em estudo publicado no último ano foi sugerido que o efeito bifásico da anandamida (AEA) se daria pelo menos através de dois mecanismos distintos, devido a sua habilidade em interagir com diferentes tipos de receptores. Doses baixas de AEA administradas no córtex pré-frontal estariam promovendo um efeito ansiolítico pela sua ação nos receptores CB1, já doses elevadas de AEA exerceriam seus efeitos ansiogênicos através da ativação (também) dos receptores VR1, já que a eficácia do fármaco é relativamente baixa quando comparada àquela observada sobre o receptor CB1 (Ross, 2003).

O envolvimento dos receptores vanilóides na modulação da ansiedade também foi sugerido por Kascow *et al.* (2004), que obteve algumas evidências preliminares do efeito ansiogênico de agonistas vanilóides e do efeito ansiolítico do antagonista capsazepina, sugerindo inclusive uma possível utilidade terapêutica para antagonistas vanilóides como tratamento para ansiedade.

Outras medidas comportamentais que nos tranquilizam na interpretação dos resultados são as de possíveis efeitos sobre a deambulação dos animais, também obtidas empregando-se o Labirinto em Cruz Elevado como uma forma de controle: nossos resultados mostraram uma ausência de efeitos motores (Figuras 4.5c e 4.6c) mediante o cômputo do número de entradas nos braços fechados (Weiss *et al.*, 1998). Ou seja, pelo

menos no hipocampo o sistema vanilóide não tem quaisquer efeitos sobre a locomoção dos animais. Isto também já era esperado, pois o hipocampo dorsal não participa diretamente e/ou isoladamente do controle motor, embora possa desempenhar processos fisiológicos complexos relacionados (Bast & Feldon, 2003; Wanderwolf & Leung, 1983).

Os efeitos da modulação do sistema vanilóide encontrados com a maioria dos experimentos comportamentais já realizados são em grande parte o oposto daqueles descritos em consequência da ativação do receptor canabinóide CB1, que pode reduzir o medo inato e ansiedade (Viveros *et al.*, 2005; Wotjak, 2005), diminuir as consequências comportamentais dos componentes da memória não-associativa na expressão do medo condicionado (Kamprath *et al.*, 2006), e causar redução na LTP (Bohme *et al.*, 2000; Slanina *et al.*, 2005). Esses resultados com agentes canabinóides também diferem dos encontrados no nosso laboratório, onde o antagonista seletivo dos receptores CB1 – AM251- prejudicou a consolidação de memórias aversivas, tanto na Esquiva Inibitória quanto no Condicionamento Aversivo ao Contexto, além de inibir a LTP em fatias de hipocampo (de Oliveira Alvares *et al.*, 2006 e 2008).

Porém é necessário observar que a maioria dos efeitos descritos na literatura atribuídos ao rCB1 é oriunda de experimentos com administração sistêmica, enquanto no nosso grupo os fármacos são microinjetados diretamente no hipocampo dorsal, excluindo a possibilidade de ação das drogas em outras estruturas, o que poderia talvez explicar a discrepância de resultados encontrados, já que existe uma grande quantidade de receptores canabinóides em diversas estruturas encefálicas que podem interferir em diferentes sistemas de neurotransmissão e modificar as respostas comportamentais.

Além disso, já foi verificado que enquanto a estimulação de VR1 promove e liberação e ação glutamatérgica, dependente do influxo de cálcio, sobre neurônios

dopaminérgicos, sem porém, afetar a neurotransmissão GABAérgica (Marinelli *et al.*, 2002, 2003), a ativação de CB1 leva a uma redução nos níveis de cálcio pré-sináptico, e assim, a uma redução na transmissão sináptica (Chevaleyre *et al.*, 2006). É bom notar que a regulação da síntese de anandamida (endocanabinóide/endovanilóide), que ocorre de acordo com a “demanda”, acontece através de uma via também cálcio-dependente (Di Marzo *et al.*, 1994), cuja maquinaria biossintética e metabólica sugere que essa e outras moléculas endógenas tenham sítios de ligação intracelulares (De Petrocellis *et al.*, 2001). Desta maneira, pode-se supor que a ativação dos receptores VR1 e CB1 por seus ligantes endógenos em comum parece promover princípios e funções antagônicas, que conjuntamente poderiam contribuir para um balanceamento nas respostas comportamentais/emocionais, e para a plasticidade sináptica.

Agora que é sabido que o receptor vanilóide VR1 não é apenas um integrador molecular de estímulos nocivos, mas também um importante modulador de estímulos químicos e físicos. É necessário voltar um pouco da atenção para sua ampla distribuição em estruturas supra-espinhais para que possamos compreender melhor seu papel fisiológico nas funções encefálicas e seu respectivo papel na modulação de comportamentos complexos, além de ser um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos.

6. CONCLUSÕES

6.1 A administração bilateral pós-treino de *capsaicina*, agonista dos receptores vanilóides VR1, na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, não causou efeito sobre a consolidação da memória na tarefa da *Esquiva Inibitória*;

6.2 A administração bilateral pós-treino de *capsazepina*, antagonista dos receptores vanilóides VR1, na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, não causou efeito sobre a consolidação da memória na tarefa da *Esquiva Inibitória*;

6.3 A administração bilateral pós-treino de *capsaicina*, agonista dos receptores vanilóides VR1, na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, não causou efeito sobre a consolidação da memória na tarefa de *Condicionamento Aversivo ao Contexto*;

6.4 A administração bilateral pós-treino de *capsazepina*, antagonista dos receptores vanilóides VR1, na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, teve **efeito amnésico** sobre a consolidação da memória na tarefa de *Condicionamento Aversivo ao Contexto*;

6.5 A administração bilateral de *capsaicina*, agonista dos receptores vanilóides VR1, na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 15 minutos antes do teste, não causou efeito sobre o desempenho no *Labirinto em Cruz Elevado*;

6.6 A administração bilateral de *capsazepina*, antagonista dos receptores vanilóides VR1, na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 15 minutos antes do teste, não causou efeito sobre o desempenho no *Labirinto em Cruz Elevado*;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Hayani, Wease, K.N., Ross, R.A., Perwtee, R.G., Davies, S.N., The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice, *Neuropharmacology* 41(2001) 1000-1005.
- Bast, T., Feldon J. Hippocampal modulation of sensorimotor processes, *Prog Neurobiol.* 70(2003) 4:319-345. Review.
- Benham, C.D., Davis, J.B., Randall, A.D., Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels, *Neuropharmacology* 42 (2002)7: 873-888.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli, *J Comp Physiol Psychol.* 68(1969)1:129-135.
- Bohme, G.A.; Laville, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Imperato, A., Enhanced Long-Term Potentiation In Mice Lacking Cannabinoid CB1 Receptors, *Neuroscience* 95(2000)1: 5-7.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Köhler, C., Medina, J.H., Izquierdo, I., Learning twice is different from learning once and from learning more, *Neuroscience* 132(2005) 2:273-279.
- Carobrez, A.P. & Bertoglio, L.J., Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on, *Neurosci Biobehav Rev* 29(2005) 8:1193-1205.
- Caterina, M.J. & Julius, D., The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24 (2001): 487-517.
- Caterina, M.J., Scumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 6653 (1997) 816-824.
- Cortright, D.N., Crandall, M., Sanchez, J.F., Zou, T., Krause, J.E., White, G., The tissue distribution and functional characterization of human VR1, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281 (2001)5: 1183-1189.
- Chevaleyre, V.; Castillo, P.E., Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability, *Neuron* 38(2003) 3:461-372.
- Cristino, L.; De Petrocellis, L.; Price, G.; Baker, D.; Guglielmotti, V.; Di Marzo, V., Immunohistochemical Localization Of Cannabinoid Type 1 And Vanilloid Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptors In The Mouse Brain. *Neuroscience* 139 (2006): 1405-1415.
- Cristino, L., Starowicz, K., De Petrocellis, L., Morishita, J., Ueda, N., Guglielmotti, V., Di Marzo, V., Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain, *Neuroscience* 151(2008) 4:955-68.
- Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., et al., Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405 (2000): 183-187.
- de Lago, E., de Miguel, R., Lastres-Becker, I., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J., Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: in vivo and in vitro evidence, *Brain Res.* 1007(2004) 1-2:152-159.
- 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 Res.* 1075(2006) 1:60-67.

- De Oliveira Alvares, L.; Genro, B.P.; Diehl, F.; Quillfeldt, J.A., Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms, *Neurobiol Learn Mem.* (2008) **In press**.
- De Petrocellis, L., Bisogno, T., Maccarrone, M., Davis, J.B., Finazzi-Agro, A., Di Marzo, V., The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J Biol Chem.* 276(2001) 16:12856-12863.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Anandamide: some like it hot, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 346– 349.
- 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(1994) 6507:686-691.
- Di Marzo, V., Lastres-Becker, I., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Milone, A., Davis, J.B., Fernandez-Ruiz, J.J., Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues, *Eur J Pharmacol.* 420(2001b) 2-3:123-131.
- Drysdale, A.J., Ruan, D., Pertwee, R.G., Platt, B., Cannabidiol-induced intracellular Ca²⁺ elevations in hippocampal cells, *Neuropharmacology* 50 (2006) 621-631.
- Ferreira, A.R., Fürstenau, L., Blanco, C., Kornisiuk, E., Sánchez, G., Daroit, D., Castro e Silva, M., Cerveñansky, C., Jerusalinsky, D., Quillfeldt, J.A., Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat, *Pharmacol Biochem Behav.* 74(2003)2:411-415.
- Hajos, N., Freund, T.F., Distinct cannabinoid sensitive receptor regulate hippocampal excitation and inhibition, *Chemistry and Physics of lipids* 121(2002)73-82.
- Hermann, H., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Schiano Moriello, A., Lutz, B., Di Marzo, V., Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid Vr1 receptor-mediated response, *Cellular and Molecular Life Sciences* 60 (2003)3: 607-616.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., De Sousa, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., Mechanisms for memory types differ, *Nature* 393(1998): 635-636.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A. Barros, D.M., Separate mechanisms for short- and long-term memory, *Behavioural Brain Research* 103(1999), 1-11.
- Kamprath, K.; Marsicano, G.; Tang, J.; Monory, K.; Bisogno, T.; Di Marzo, V.; Lutz, B.; Wotjak, C.T., Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes, *J Neurosci* 26(2006) 25:6677-6686.
- Kasckow, J.W.; Mulchahey, J.J.; Geraciotti, T.D. Jr., Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28 (2004)2: 291-295.
- Köfalvi, A., Catarina, R.O., Cunha, R.A., Lack of evidence for functional TRPV1 vanilloid receptors in rat hippocampal nerve terminal, *Neurosci. Letters* 4003 (2006)151-156.
- Maren, S., What the amygdala does and doesn't do in aversive learning. *Learn. Mem.* 10(2003): 306–308.
- Marinelli, S., Vaughan, C.W., Christie, M.J., Connor, M., Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro, *J. Physiol.* 543 (2002) 531– 540.
- Marinelli, S., Di Marzo, V., Berretta, N., Matias, I., Maccarrone, M., Bernardi, G., Mercuri, N.B., Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors, *J. Neurosci.* 23 (2003) 3136– 3144.
- Marsch, R.; Foeller, E.; Rammes, G.; Bunck, M.; Kössl, M.; Holsboer, F.; Zieglgänsberger, W.; Landgraf, R.; Lutz, B.; Wotjak, C.T., Reduced Anxiety, Conditioned Fear, And Hippocampal Long-Term Potenciation In Transient Receptor Potential Vanilloid Type1 Receptor-Deficient Mice, *J. Neurosci.* (2007) 27(4):832-839.

Mezey, E., Toth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., Szallasi, A., Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 3655– 3660.

McGaugh, J.L., Time-dependent processes in memory storage, *Science* 153(1966) 742:1351-1358.

McGaraughty, S., Chu, K.L., Bitner, R.S., Martino, B., El Kouhen, R., Han, P., Nikkel, A.L., Burgard, E.C., Faltynek, C.R., Jarvis, M.F., Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. *Journal of Neurophysiology* 90 (2003)4: 2702-2710.

Montell, C., The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 272 (2005), re3.

Morris, R.W., Bouton, M.E., Effect of unconditioned stimulus magnitude on the emergence of conditioned responding, *J Exp Psychol Anim Behav Process.*32(2006) 4:371-385.

Nascimento Häckl, L.P.; Carobrez, A.P., Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats, *Neurobiol Learn Mem.* 88(2007) 2: 177-185.

Palazzo, E., de Novellis, V., Marabese, I., Cuomo, D., Rossi, F., Berrino, L., Rossi, F., Maione, S., Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception, *European journal of Pharmacology* 439 (2002)1-3: 69-75.

Patapoutian, A., Peier, A.P., Story, G.M., Viswanath, V., Thermo TRP and beyond: mechanisms of temperature sensation, *Nat Rev Neurosci* 4 (2003): 529-539.

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

Quillfeldt, J. A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. IN: *Practical and Ethical Principles in the Use of Experimental Animals*, Andersen, M.L. et al. (edition), 2008 (no prelo).

Roberts, J.C., Davis, J.B., Benham, C.D., [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution, *Brain Research* 995(2004)2: 176-183.

Ross, R.A., Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors, *Br J Pharmacol.* 140(2003)5:790-801.

Rubino, T., Realini, N., Castiglioni, C., Guidali, C., Viganó, D., Marras, E., Petrosino, S., Perletti, G., Maccarrone, M., Di Marzo, V., Parolaro, D., Role in Anxiety Behavior of the Endocannabinoid System in the Prefrontal Cortex, *Cereb Cortex.* (2007) **In press.**

Sanchez, J.F., Krause, J.E., Cortright, D.N., The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR 5' splice variant RNA expression in rat, *Neuroscience* 107 (2001)3: 373-381.

Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, M., Kuraishi, Y., Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus, *NeuroReport* 9 (1998) 2045–2048.

Silveira, P.P., Portella, A.K., Clemente, Z., Gamaro, G.D., Dalmaz, C., The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci.* 23(2005)1:93-99.

Slanina, K.A.; Roberto, M.; Schweitzer, P., Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology.* 49(2005) 5: 660-668

Starowicz, K.; Nigam, S.; Di Marzo, V.; *Biochemistry And Pharmacology Of Endovanilloids.* *Pharmacology & Therapeutics* 114 (2007a) 1:13-33.

Starowicz, K., Maione, S., Cristino, L., Palazzo, E., Marabese, I., Rossi, F., de Novellis, V., Di Marzo, V., Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways, *J Neurosci.* 27(2007b) 50:13739-13749.

- Steenland, H.W.; Ko, S.W.; Wu, L.J.; Zhuo, M., Hot receptors in the brain, *Mol Pain* 2(2006):34.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., Resiniferatoxin And Its Analogs Provide Novel Insights Into The Pharmacology Of The Vanilloid (Capsaicin) Receptor, *Life Science* 47(1990) 1399-1408.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., Vanilloid (Capsaicin) Receptors And Mechanisms, *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 159-212.
- Tinsley, M.R., Quinn, J.J., Fanselow, M.S., The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance. *Learn Mem.* 11 (2004) 1:35-42.
- Tominaga, M.; Caterina, M.J.; Malmberg, A.B.; Rosen, T.A.; Gilbert, H.; Skinner, K.; Raumann, B.E.; Basbaum, A.I.; Julius, D., The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli, *Neuron* 21(1998)3: 531-543.
- Tóth, A., Boczan, J., Kedei, N. Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Édes, I., Csiba, L., Blumberg, P.M., Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain, *Molecular Brain Research* 135(2005) 162-168.
- Van Der Stelt, M., Di Marzo, V., Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels, *European Journal of Biochemistry* 271 (2004)10: 1827-1834.
- Viveros, M.P.; Marco, E.M.; File, S.E., Endocannabinoid system and stress and anxiety responses, *Pharmacol Biochem Behav* 81(2005) 2: 331-342. Review.
- Wanderwolf, C.H.; Leung, L.-W. S. Hippocampal Rythmical Slow Activity: A Brief History and the Effects of Entorhinal Lesions and Phencyclidine. Chp 16 IN: Seifert, W. (1983), *Neurobiology of the Hippocampus*, London: Academic Press, pp. 275-302.
- Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT., Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety, *Neurosci Biobehav Rev* 23(1998) 2: 265-271.
- Wotjak, C.T., Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality, *Mini Rev Med Chem* 5(2005) 7:659-670. Review.

8. APÊNDICE

Nota do Orientador:

Esta nota não tem qualquer relação com o conteúdo científico dos dados e interpretações apresentados neste trabalho, pelos quais dou plena fé. Trata-se apenas de uma discussão terminológica e cultural.

‘Baunilhóide’ ou ‘Vanilóide’ ?

Em nosso laboratório utilizamos a terminologia *abrasileirada* "baunilhóide", que é, por vezes, questionada por alguns, geralmente de modo informal. Neste trabalho, minha orientanda preferiu utilizar o neologismo “vanilóide” em vez de “baunilhóide”.

A expressão vernacular brasileira, utilizada etimologicamente desde 1719 (Houaiss, 2001), é "baunilha", designando diferentes plantas do gênero *vanilla* ou seus produtos. Este vocábulo deriva do espanhol que designa ‘bainha’, e é grafado "vainilla" (o "ll" tem som de "lh"), referindo-se às grandes vagens aromáticas da orquídea-trepadeira *Vanilla plantifolia*, de onde se extrai o melhor aromatizante homônimo amplamente utilizado em culinária.

Assim, se “baunilha” é o termo em português para estes produtos, não vejo porque inventar um novo termo para designar os demais compostos a eles relacionados: seriam os agentes (agonistas ou antagonistas) e receptores “baunilhóides”, consistente com o termo *vanilloid(s)* em inglês. É bem verdade que essa história já começou confusa etimologicamente, pois o nome do sistema deriva da analogia estrutural com um composto volátil da baunilha, a *vanilina* – daí *vanilloid* – que não é um ligante farmacologicamente muito eficiente desse sistema, que, em geral, é mais lembrado em termos de fármacos como a capsaicina, extraída de pimentas do gênero *Capsicum*, que, assim como outros compostos fenólicos frutais (eugenol, etc), possuem analogia estrutural com a vanilina, o volátil original. A rigor, portanto, seu nome mais correto talvez devesse ser “capsinóides” (ou até “pimentóides”, em português).

Com a descoberta dos receptores VR / TRPV-1, então, já podemos falar em “sistema baunilhóide”, englobando seus diversos ligantes e receptores.

A única palavra que possui o sufixo ‘vanila’ na literatura previamente existente em português é o termo químico que designa a “vanilina”; todo o resto era, até há pouco, apenas “baunilha”. Sendo assim, diante do surgimento de novas necessidades terminológicas – como a descoberta do sistema VR /TRPV-1 - porque não exercermos nosso direito de propor e efetivamente usar o bom e velho *baunilh-* para abrasileirar ‘vanilloid’ (inglês)? O termo ‘vanila’ entrou pela porta dos fundos da Flor do Lácio, e às vezes encontra empregos linguisticamente inacreditáveis, como “sorvete de vanila”: porque os sorveteiros têm que definir a língua que usamos se somos nós quem trabalha o tema em maior profundidade? Com o passar do tempo e a previsível multiplicação dos empregos de termos em “baunilh-“, quem sabe até aquele composto original venha a ser designado “baunilhina”? Não estaria errado.

Entendo que a introdução de nomenclaturas científicas na literatura em português deve ser sempre cuidadosa, posto que, no momento, não há uma cultura de preservação e enriquecimento da língua nacional no Brasil. A descoberta deste novo sistema de receptores (VR/ TRPV-1) é a oportunidade de introduzir essa terminologia nova em português. Trata-se, a meu ver, entre outras coisas, de resistirmos à anglicização forçada de nossa língua e cultura, e assim, preservar o que nossa língua já criou e usa. Por desconhecimento da língua-mãe, importam-se os termos mais comumente “encontrados”: foi assim que vimos aparecer no Brasil o termo ‘vanila’, empregado em sorvetes, cafés e doces, mas seu uso é tanto muito recente, como também desnecessário, haja visto a existência de termo equivalente de amplo uso prévio, ‘baunilha’.

Nossa experiência em traduções técnicas de livros como o Bear et al. (2^a e 3^a edições), Purves et al. (2^a edição) e Squire & Kandel, levou-nos a valorizar sempre mais nossa rica língua portuguesa (veja por exemplo, o prefácio que colocamos em Bear: http://www.ufrgs.br/ppgneuro/paginas/ppgn_1port.htm). A resistência ao uso deste termo é fruto da cultura de massas, que promove a tendência de “anglicizar” tudo, uma forma inconsciente de emprestar charme ‘as coisas mais banais, e reforçar seu apelo consumista. Uma posição, a meu ver, colonizada.

Em resumo, consideramos o neologismo 'vanila' e seus derivados – por exemplo, 'vanilóide' - como *anglicismos desnecessários*, muito recentemente introduzidos (basta sondar com o Google). Nós, cientistas e tradutores técnicos, temos esse minúsculo poder, mas uma imensa responsabilidade em defesa de nossa língua pátria. Neste primeiro trabalho de nosso grupo sobre o sistema baunilhóide, porém, a nomenclatura dos sorveteiros venceu a batalha.

Prof. Dr. Jorge A. Quillfeldt
Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação

Departamento de Biofísica, IB - UFRGS

15 de fevereiro de 2008