

**Modulação do sistema colinérgico pelo sistema  
endocanabinoide em tarefas aprendidas e  
reaprendidas: efeito do agonista canabinoide  
WIN-2**

**Tamara Andrea Alarcón Ferreira**

**Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Farmacologia**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória**

**2016**

TAMARA ANDREA ALARCÓN FERREIRA

MODULAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO PELO  
SISTEMA ENDOCANABINOIDE EM TAREFAS  
APRENDIDAS E REAPRENDIDAS: EFEITO DO  
AGONISTA CANABINOIDE WIN-2

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal  
do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Rita Gomes Wanderley Pires

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Cristina Martins e Silva

Vitória

2016

TAMARA ANDREA ALARCÓN FERREIRA

MODULAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO PELO SISTEMA  
ENDOCANABINOIDE EM TAREFAS APRENDIDAS E  
REAPRENDIDAS: EFEITO DO AGONISTA CANABINOIDE WIN-2

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Área de concentração: Bioquímica

Aprovada em 11 de maio de 2016.

Comissão examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita Gomes Wanderley Pires  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Martins e Silva  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Maria Ribeiro  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Beijamini Harres  
Universidade Federal do Espírito Santo

Espaço reservado aos dados internacionais de catalogação, elaborados pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo.

**Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental do Departamento de Fisiologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com auxílio das seguintes instituições:**

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)**
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo amparo nos momentos difíceis e pela força para superá-los e conseguir vencer esta batalha.

À minha família por compreender que, às vezes, tive de me fazer ausente; por me apoiarem em todo momento e estarem sempre ai por mim. Não tenho palavras suficientes pra expressar o meu agradecimento e meu amor por vocês.

Obrigada também a professora Rita pela orientação e pela confiança que me prestou durante estes quase seis anos, e à professora Cristina pela coorientação ativa e por toda a ajuda que ofereceu. Novamente não tenho palavras suficientes para agradecê-las pela oportunidade.

Agradeço a todos os colegas do laboratório que me acompanharam ao longo dos anos pelo companheirismo, parceria, companhia, assim como pela ajuda prestada. Assim, agradeço principalmente à Luana e ao Matheus pelo trabalho direto com o projeto e por estarem sempre presentes e disponíveis, e por fazerem o trabalho não parecer sempre “trabalho”. Foi um grande prazer trabalhar ao seu lado.

Aos amigos que sempre tiveram palavras de apoio e confiança, e a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

FAPES e CAPES pelas bolsas fornecidas ao longo destes anos;

Equipe do LABIOM pelo suporte necessário no projeto;

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	24
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	27
<b>RESUMO</b> .....	XIII
<b>ABSTRACT</b> .....	29
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Aprendizagem e Memória .....	15
1.2 Hipocampo e Córtex pré-frontal .....	17
1.3 Memória espacial.....	20
1.4 Sistema colinérgico: Constituição .....	21
1.5 Sistema colinérgico e memória .....	24
1.6 O sistema endocanabinoide .....	25
1.7 Canabinoides e a liberação de neurotransmissores.....	30
1.8 Canabinoides: aprendizagem e memória .....	30
1.9 Sistema colinérgico x sistema endocanabinoide .....	32
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3. OBJETIVO EXPERIMENTO 1:</b> .....	36
3.1. Geral.....	36
3. 2. Específicos .....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS DO EXPERIMENTO 1</b> .....	37
4.1. Animais e droga .....	37
4.1.1 Animais: .....	37
4.1.2 Administração da droga: .....	37
4.2 Testes cognitivos .....	37
4.2.1 Equipamento.....	37
4.2.2 Teste de aprendizagem e memória.....	38
4.3 Estudos bioquímicos .....	39

4.3.1 Dissecção .....	39
4.3.2. Avaliação da expressão gênica de componentes do sistema colinérgico e endocanabinoide .....	39
4.3.3 Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase .....	41
4.4 Análise Estatística .....	42
<b>5. RESULTADOS EXPERIMENTO 1 .....</b>	<b>43</b>
5.1 Parâmetros Comportamentais .....	43
5.1.1 Aprendizagem .....	43
5.1.2 Reaprendizagem .....	44
5.2 Parâmetros Bioquímicos .....	46
5.2.1 Avaliação da expressão gênica .....	46
5.2.1.1 Avaliação da expressão gênica no hipocampo .....	46
5.2.1.2 Avaliação da expressão gênica no córtex pré-frontal .....	48
5.2.2 Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase .....	50
<b>6. OBJETIVO EXPERIMENTO 2 .....</b>	<b>52</b>
6.1. Geral .....	52
6.2. Específicos .....	52
<b>7. MATERIAL E MÉTODOS EXPERIMENTO 2 .....</b>	<b>53</b>
7.1 Animais e droga .....	53
7.1.1 Animais .....	53
7.1.2 Administração da droga .....	53
7.2 Testes cognitivos .....	53
7.2.1 Equipamento .....	53
7.3 Estudos bioquímicos .....	54
7.3.1 Dissecção .....	54
7.3.2 Avaliação da expressão gênica de componentes do sistema colinérgico e endocanabinoide .....	54
7.3.3 determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase: .....	54



7.3.2 Dosagem do conteúdo de acetilcolina .....	54
7.3.3 Dosagem da liberação de acetilcolina .....	55
7.4 Análise Estatística .....	57
<b>8. RESULTADOS EXPERIMENTO 2 .....</b>	<b>58</b>
8.1 Parâmetros Comportamentais .....	58
8.1.1 Aprendizagem .....	58
8.1.2 Reaprendizagem .....	59
8.2 Parâmetros Bioquímicos .....	60
8.2.1 Avaliação da expressão gênica .....	60
8.2.1.1 Avaliação da expressão gênica no hipocampo .....	61
8.2.1.1 Avaliação da expressão gênica no córtex pré-frontal .....	64
8.2.2 Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase .....	68
8.2.3 Dosagem do conteúdo de acetilcolina .....	69
8.2.4 Dosagem da liberação de acetilcolina .....	69
<b>9. DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>10. CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>11. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b>	Classificação dos tipos de memória de longa e curta duração.....	17
<b>Figura 2:</b>	Vias de informações entre o hipocampo e córtex pré-frontal.....	19
<b>Figura 3:</b>	A Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica.....	23
<b>Figura 4:</b>	Projeções Colinérgicas dos neurônios do prosencefalo basal.....	23
<b>Figura 5:</b>	O Sistema endocanabinóide .....	27
<b>Figura 6:</b>	Via de ativação do receptor canabinoide.....	28
<b>Figura 7:</b>	O Labirinto aquático de Morris.....	37
<b>Figura 8:</b>	Delineamento experimental da aquisição.....	38
<b>Figura 9:</b>	Reações envolvidas na dosagem da Acetilcolinesterase.....	41
<b>Figura 10:</b>	Resultado do desempenho dos animais durante a aprendizagem do experimento 1.....	42
<b>Figura 11:</b>	Resultado do teste comprobatório na aprendizagem do experimento 1.....	43
<b>Figura 12:</b>	Resultados da distância cumulativa percorrida na tentativa 4 durante a aprendizagem do experimento 1.....	43
<b>Figura 13:</b>	Resultado do desempenho dos animais na tarefa de Reaprendizagem do experimento 1.....	44
<b>Figura 14:</b>	Resultados da distância cumulativa percorrida na tentativa 4 durante a reaprendizagem do experimento 1.....	45
<b>Figura 15:</b>	Resultado do teste comprobatório na reaprendizagem do experimento 1.....	45
<b>Figura 16:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema colinérgico, no hipocampo do experimento 2.....	46
<b>Figura 17:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema endocanabinóide, no hipocampo do experimento 1.....	47

<b>Figura 18:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema colinérgico, no córtex pré-frontal no experimento 1.....	48
<b>Figura 19:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema endocanabinoide, no córtex pré-frontal do experimento 1.....	49
<b>Figura 20:</b>	Atividade enzimática da acetilcolinesterase no hipocampo e córtex pré-frontal do experimento 1.....	49
<b>Figura 21:</b>	Delineamento experimental da consolidação.....	53
<b>Figura 22:</b>	Reações enzimáticas envolvidas na dosagem de acetilcolina.....	54
<b>Figura 23:</b>	Sistema de rede.....	55
<b>Figura 24:</b>	Resultado do desempenho dos animais durante a aprendizagem do experimento 2.....	56
<b>Figura 25:</b>	Resultado do teste comprobatório na aprendizagem do experimento 2.....	57
<b>Figura 26:</b>	Resultado do desempenho dos animais na tarefa de Reaprendizagem do experimento 2.....	58
<b>Figura 27:</b>	Resultado do teste comprobatório na reaprendizagem do experimento 2.....	58
<b>Figura 28:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema colinérgico, no hipocampo de animais treinados no MWM do experimento 2.....	59
<b>Figura 29:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema endocanabinóide, no hipocampo de animais treinados no MWM do experimento 2.....	60
<b>Figura 30:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema colinérgico, hipocampo de animais não treinados no MWM do experimento 2.....	61
<b>Figura 31:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema endocanabinoide, no hipocampo de animais não treinados no MWM. do experimento 2.....	62
<b>Figura 32:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema colinérgico, no córtex pré-frontal de animais treinados no MWM do experimento 2.....	63
<b>Figura 33:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema endocanabinóide, no córtex pré-frontal de animais treinados no MWM do experimento 2.....	64
<b>Figura 34:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema colinérgico, no córtex	

	pré-frontal de animais não treinados no MWM do experimento 2.....	65
<b>Figura 35:</b>	Expressão relativa de mRNA de genes do sistema endocanabinóide no córtex pré-frontal de animais não treinados no MWM do experimento 2.....	65
<b>Figura 36:</b>	Atividade enzimática da acetilcolinesterase no hipocampo do experimento 2.....	66
<b>Figura 37:</b>	Atividade enzimática da acetilcolinesterase no córtex pré-frontal do experimento 2.....	66
<b>Figura 38:</b>	Dosagem do conteúdo de ACh no córtex pré-frontal.....	67
<b>Figura 39:</b>	Dosagem da liberação de ACh no hipocampo.....	67
<b>Tabela 1:</b>	Sequência de <i>primers</i> .....	39
<b>Tabela 2:</b>	Resumo das alterações na expressão gênica no hipocampo.....	73
<b>Tabela 3:</b>	Resumo das alterações na expressão gênica no córtex pré-frontal.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2- aradonil-glicerol
$\Delta^9$ - THC	$\Delta^9$ -Tetrahidrocanabinol
AC	Adenilato ciclase
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AEA	Anandamida
AMPC	Adenosina monofostafo cíclico
BuChE	Enzima butirilcolinesterase
CBs	Canabinoides
ChEIs	Inibidores de colinesterase
ChAT	Enzima colina acetil transferase
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
CBR	Receptor canabinoide
DAGL	Enzima diacilglicelol lipase
eCB	Endocanabinoide
EMT	Transportador de membrana endocanabinoide.
FAAH	Enzima ácido graxo amida hidrolase
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
MAGL	Enzima monoacilglicerol lipase
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
NAT	Enzimas N-acetil trasferase
NAPE-PLD	Enzima N-acilfosfatidiletanolamida específica- fosfolipase D
MWM	Labirinto acuático de Morris
PKA	Proteína cinase A
PLC	Enzima fosfolipase C
RNA	Ácido Ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Tricoloacético
VACHT	Transportado vesicular de Acetilcolina
WIN-2	WIN 55 (212-2)

## RESUMO

A planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, contém compostos denominados canabinoides, sendo o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) o componente mais ativo. Após clonagem e caracterização dos receptores canabinoides, descobriu-se que os mesmos se ligam a  $\Delta^9$ -THC e também a ligantes endógenos, denominados endocanabinoides (ECs), capazes de modular vários sistemas neurotransmissores, emergindo como importantes reguladores de várias funções fisiológicas cerebrais. O efeito dos canabinoides endógenos e exógenos nos processos de aquisição, consolidação e recuperação da informação, tanto na aprendizagem como na memória, ainda é controverso. Além disso, existem evidências de que os processos de aquisição e consolidação possuem bases biológicas distintas com provável participação do sistema colinérgico hipocampal e cortical nessas diferenças. Com o objetivo de compreender as bases moleculares de processos cognitivos que envolvem a participação do sistema colinérgico central, pela ativação dos receptores canabinoides, propusemos a utilização de um agonista canabinoide, o WIN 55, 212-2 (WIN-2). Para isso, camundongos da linhagem Swiss foram tratados com WIN-2 na dose de 2mg/kg e submetidos a teste no labirinto aquático de Morris (MWM) para avaliar aspectos de aquisição e consolidação da tarefa. Observamos que o déficit cognitivo provocado pelo tratamento crônico com WIN-2 está relacionado, principalmente, à memória de curta duração no processo de aquisição da tarefa espacial, enquanto a consolidação permaneceu inalterada. Este prejuízo cognitivo na aquisição pode estar relacionado a um possível aumento da concentração de 2-AG (2-araquidonilglicerol) e diminuição de AEA (anandamida) no córtex pré-frontal, os quais estariam relacionados aos níveis de RNAm das enzimas de síntese e degradação dos endocanabinóides. Apesar das alterações comportamentais observadas neste trabalho serem sutis, verificamos modulação do sistema colinérgico pelo sistema endocanabinoide, uma vez que o tratamento com WIN-2 no período de consolidação da memória provocou uma diminuição na liberação basal de acetilcolina (ACh) no hipocampo. Entretanto, esta diminuição não foi associada com os déficits cognitivos observados. Portanto, o presente trabalho corrobora o envolvimento de ambos os sistemas estudados na modulação de processos cognitivos e assim esperamos, futuramente, auxiliar no desenvolvimento de tratamentos com abordagens farmacológicas e não-farmacológicas, que busquem atenuar os déficits cognitivos provocados pelo abuso de drogas, assim como por doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Memória espacial, Sistema endocanabinoide, Sistema colinérgico.

## ABSTRACT

The *Cannabis sativa* plant, commonly known as marijuana, contains compounds named cannabinoids, and the  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) is the most active component. After cloning and characterization of cannabinoid receptors, it was found that they bind to  $\Delta^9$ -THC and to endogenous ligands, named endocannabinoids (ECs), capable of modulating multiple neurotransmitter systems, and emerging as important regulators of various physiological brain functions. The effect of endogenous and exogenous cannabinoids in the processes of acquisition, consolidation and recovery of information, both in learning and memory is still controversial. Moreover, there is evidence that the processes of acquisition and consolidation have distinct biological basis with probable involvement of hippocampal and cortical cholinergic system in these differences. In order to understand the molecular basis of cognitive processes that involve the participation of the central cholinergic system by the activation of cannabinoid receptors, we proposed the use of a cannabinoid agonist, WIN 55.212-2 (WIN-2). For this, Swiss mice were treated with WIN-2 at a dose of 2 mg/kg and submitted to testing in the aquatic Morris maze to evaluate aspects of acquisition and consolidation of the task. We observed that the cognitive impairment caused by chronic treatment with WIN-2 is mainly related to short term memory in acquisition of spatial task process, while consolidating remained unchanged. This cognitive impairment in the acquisition may be related to a possible increase in the concentration of 2-AG (2-arachidonylglycerol) and decreased of AEA (anandamide) in the prefrontal cortex. Although the behavioral changes observed in this study are subtle, we verified modulation of cholinergic by endocannabinoid system, since treatment with WIN-2 in the memory consolidation period resulted in a decreased basal release of acetylcholine (ACh) in hippocampus. However, this decrease was not associated with cognitive deficits observed. Therefore, this study confirms the importance of both systems studied in the modulation of cognitive processes and hopefully, in the future, help in developing treatments with pharmacological and non-pharmacological approaches, to seek reduce the cognitive deficits caused by drug abuse, as well as neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.

Keywords: Spatial memory, Endocannabinoid System, Cholinergic System.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aprendizagem e Memória

De acordo com Eric Kandel (2000, p.1228) "Aprendizagem é o processo pelo qual adquirimos conhecimentos sobre o mundo, e a memória é o processo pelo qual o conhecimento do mundo é codificado, armazenado e, posteriormente recuperado", Portanto, a aprendizagem depende de processos contínuos. Assim, a memória é um processo complexo que envolve várias estruturas do cérebro, atuando em conjunto, cuja finalidade é o armazenamento de informações para que estas possam ser recuperadas (KANDEL, 1991).

Os processos envolvidos na memória são: aquisição, consolidação e evocação (LENT,2010). A aquisição é a captação de informações memorizáveis (objeto, som, acontecimento, emoção, etc) nos sistemas neurais, começando com a percepção de estímulos sensoriais, os quais serão transformados em memória, em um processo conhecido como codificação (LENT, 2010). A consolidação é o processo de estabilização do conhecimento adquirido, resultando em uma memória estável. No início deste processo, as memórias podem ser interrompidas por vários fatores, como: trauma cerebral (RUSSEL, 1946), eletrochoque (DUNCAN, 1949), inibidores de síntese protéica (AGRANOFF, 1966; DEZAZZO; TULLY,1995; FREEMAN et al. 1995) e medicamentos como clorpromazina e anisomicina ( DOTY, 1964; GHIRARDI et al., 1995, GRECKSCH; MATTHIES 1980, WINDER et al., 1998). Porém, após a conclusão deste processo, que pode levar horas, estes fatores acima mencionados somente serão eficazes quando ocorrer a reativação da memória (ALBERINI, 2005). A consolidação também envolve a estabilização de novas conexões sinápticas e a reestruturação das já existentes (DUDAI,2004; LEDOUX, 2001). O processo pelo qual uma memória de longo prazo retorna a um estado transitoriamente lábil (e então se estabiliza gradualmente) chama-se reconsolidação (NADER, 2000). Por fim, a evocação ou recuperação é a capacidade de recuperar a informação armazenada, para sua utilização (DUDAI; MORRIS, 2013). O ato de lembrar consiste na reativação coordenada de regiões corticais envolvidas no momento da codificação (DAMASIO, 1989; DE RENZI, 1982). Quando uma memória é formada, ela depende das estruturas do lobo temporal medial (hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, córtex perirrinal, córtex para-hipocampal), porém, uma vez consolidada,



pode ocorrer sua reativação de forma independente do hipocampo (MCCLELLAND et al., 1995).

Em relação à classificação das memórias, a maioria dos autores concorda que existem dois principais tipos de memória que são classificadas de acordo com o fator temporal: as memórias de longa duração e as de curta duração (KANDEL, 2000; SQUIRE, et al., 2004; WINOGRAD, 1974) (Figura 1).

Em relação à memória de curta duração, pode-se citar a *working memory* ou memória de trabalho, que representa a capacidade de manter temporariamente uma quantidade limitada de informações na mente, que pode então ser usada para habilidades, incluindo aprendizagem, raciocínio e preparação da ação (BADDELEY; HITCH, 1974). A memória de trabalho é, portanto, fundamental para a organização e uso da memória. Lesões no lobo frontal não provocam amnésia, mas causam dificuldades na utilização da memória, apresentando déficit no teste de Wisconsin (DREWE, 1974), teste que avalia a capacidade do indivíduo raciocinar abstratamente e modificar estratégias cognitivas, como resposta a alterações nas contingências ambientais (DIAS et al., 1996).

As memórias de longa duração podem ser divididas em subcategorias: a memória declarativa e a não declarativa. A memória não declarativa (implícita) pode ser classificada em quatro categorias. A memória de procedimento, que envolve a capacidade de aprender habilidades e hábitos comportamentais. O condicionamento clássico, no qual dois estímulos são pareados a fim de provocar uma associação entre ambos. A memória não associativa, em que se observa uma resposta a um único estímulo ao longo do tempo. E, por último, o *priming*, que é uma forma de memória que requer “dicas”: pequenos fragmentos de uma imagem, palavras, gestos, sons, odores, para evocar uma memória, melhorando a velocidade e eficiência com que os organismos interagem com um ambiente familiar. Estas memórias são recuperadas inconscientemente (BECHARA et al., 1995; SALMON; BUTTERS, 1995). Por outro lado, a memória declarativa (explícita) responsável pela coleção de fatos e eventos que podem ser recuperados de modo consciente. Esta memória é dividida em memória semântica (capacidade de acumular informações sobre elementos ou fatos gerais) e episódica, que caracteriza-se por uma lembrança consciente de eventos passados da vida do indivíduo, remetendo a uma memória

autobiográfica, rica em elementos de diferentes aspectos, incluindo pessoas, objetos, datas, localização espacial e ocasiões associadas aos contextos (NADEL; HARDT, 2011; TULVING; MARKOWITSCH, 1998; TULVING, 2001).

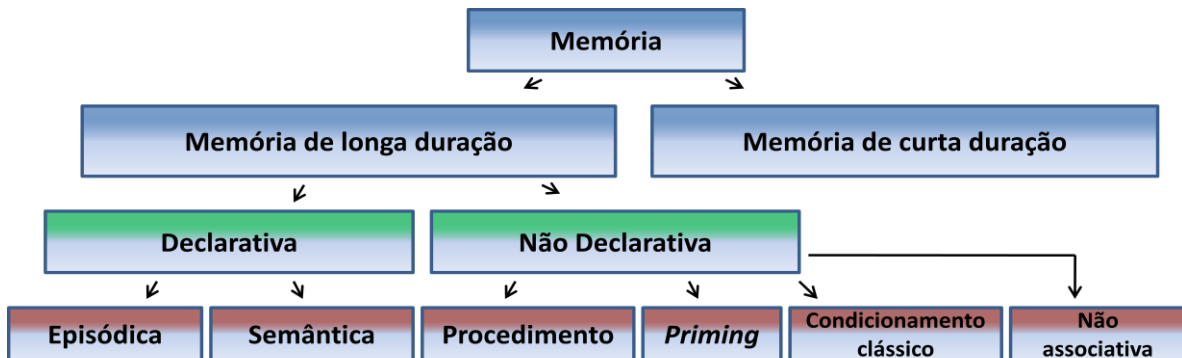


Figura 1: Classificação dos tipos de memória de longa e curta duração (adaptado de BARTSCH, T. & BUTLER, 2013).

Em relação às áreas do cérebro envolvidas em processos de aprendizagem e memória, destacam-se o hipocampo e o córtex pré-frontal (Moser et al. 1993), sendo que a participação relativa destas áreas, varia de acordo com o tipo de memória processada, como discutido a seguir.

## 1.2 Hipocampo e Córtex pré-frontal

A era moderna do estudo da memória, começou, em 1957, com o estudo do paciente conhecido como H.M. O paciente sofria de incontroláveis convulsões, não podendo ser tratado por métodos convencionais, por isto, foi submetido a uma excisão bilateral do lobo temporal médio do hipocampo e suas regiões adjacentes. O paciente H.M, após a cirurgia, apresentou uma incapacidade de formar novas memórias, porém as suas funções intelectuais e perceptivas se mantiveram intactas, tal qual as memórias anteriores à cirurgia (SCOVILLE; MILNER, 1957).

A partir do estudo do paciente H.M, Squire (2009) sugere que a memória é uma função cerebral distinta, separável das outras habilidades perceptivas e cognitivas. O autor também identifica o lobo temporal medial como importante para a formação de memórias, porém não sendo necessário para as memórias imediatas, pois H.M conseguia lembrar pequenas informações, como por exemplo, um número telefônico

durante um intervalo de tempo limitado. Por último, as estruturas danificadas não são o repositório final da memória, já que ele manteve suas memórias remotas.

Este estudo permitiu considerar o hipocampo como uma estrutura essencial no processamento da memória, porém não foi conclusivo, pois outras regiões também foram afetadas. Esta elucidação foi possível posteriormente com o estudo de outro paciente, conhecido como R.B, o qual a partir de uma isquemia global apresentou um quadro de perda de memória menos severa que a do paciente H.M. Após seu falecimento, foi realizada uma análise histológica do cérebro, onde foi observado que a lesão provocada pela isquemia localizava-se bilateralmente, envolvendo toda a extensão rostocaudal da região CA1 do hipocampo (ZOLA-MORGAN, 1986). A partir deste momento, vários trabalhos têm constatado déficits de memória ocasionados por lesões hipocámpais e áreas adjacentes (ABRAHAMS et al., 1997; ASTUR et al., 2002; FEIGENBAUM et al., 1996; GOLDSTEIN et al., 1989; MAGUIRE et al., 1996; ROSENBAUM et al., 2000; TENG; SQUIRE, 1999), confirmando que o hipocampo é uma estrutura essencial nos processos de aprendizagem e memória (IZQUIERDO; MEDINA, 1995; SQUIRE, 1992). Essa região é, hoje, reconhecida por exercer importante papel no processamento e armazenamento de informações, incluindo aprendizagem e recuperação de informação espacial (BUZASKI, 2005; VAYNMAN et al., 2004), medo condicionado (CAMMAROTA et al., 2005), esquiva passiva (VIANNA et al., 2004) e memória de trabalho ou de curta duração (HAMPSON; DEADWYLER, 1999 e 2000; NAVA et al., 2001).

Simultaneamente, existem estudos de monitoramento da atividade neural ou de mudanças estruturais do lobo temporal medial e outras regiões, após a aprendizagem de uma tarefa. Por exemplo, no trabalho de Frankland et al.(2004) foi verificada uma diminuição da expressão do proto-oncogene c-Fos (marcador da plasticidade sináptica) no hipocampo, após a aprendizagem, seguido de um aumento paralelo do mesmo em diversas áreas corticais. Outros estudos com neuroimagem corroboram a importância de regiões corticais na expressão da memória (RESTIVO et al., 2009; SMITH; SQUIRE, 2009). Concluiu-se que mudanças graduais de plasticidade sináptica no neocórtex contribuem para o estabelecimento de memórias estáveis de longo prazo, aumentando a conectividade entre as regiões corticais e diminuindo gradualmente o papel do hipocampo, que

inicialmente trabalha em conjunto com o neocórtex no armazenamento da memória de longo prazo (ALVAREZ; SQUIRE, 1994).

O envolvimento do córtex pré-frontal e hipocampo estão relacionados a vários aspectos de aprendizagem e memória, e a comunicação hipocampo-córtex pré-frontal tem sido destacada como fundamental nesses processos cognitivos (DICKERSON et al., 2007). Depois da aprendizagem, o córtex pré-frontal medial (CPFm) modula as memórias que inicialmente dependiam do hipocampo (TAKEHARA-NISHIUCHI; MCNAUGHTON, 2008). Isto é possível porque o CPFm recebe projeções diretas da região ventral de CA1 e subiculum, como também recebe e envia projeções indiretas vindas do córtex entorrinal (HOOVER; VERTES, 2007) (Figura 2). Além disso, foi observado que uma interrupção na via hipocampo e córtex pré-frontal prejudica o desempenho em tarefas de aprendizagem espaciais (BRUN et al., 2008; FLORESCO et al., 1997), mostrando a importância da comunicação entre estas regiões.

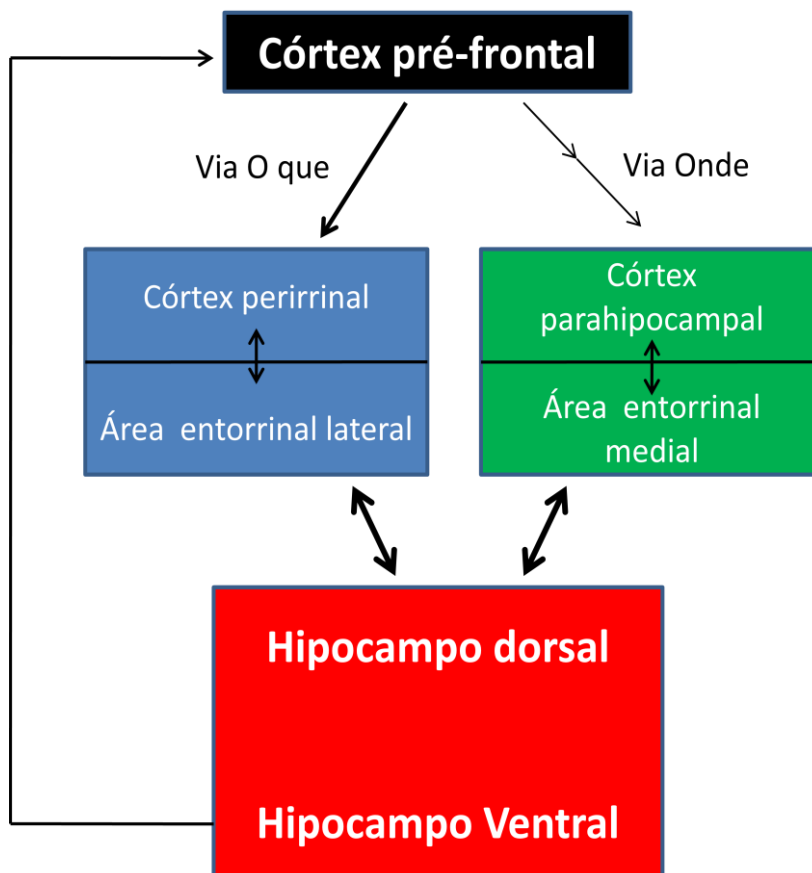


Figura 2. Vias de informações entre o hipocampo e córtex pré-frontal. (Adaptado de PESTON; EICHENBAUM, 2013).

### 1.3 Memória espacial

A memória espacial é um tipo de memória de longa duração evocada de forma consciente (memória explícita), a qual requer um alto processo cognitivo, pois envolve a capacidade de recordar uma informação a respeito de um determinado ambiente e guiar-se mediante a orientação espacial. Esse tipo de memória requer um comportamento exploratório, sendo este instintivo e amplamente preservado em todas as espécies animais, incluindo o homem (BERLYNE, 1950). Assim, a memória espacial pode ser definida como uma função do cérebro responsável pelo reconhecimento, codificação, armazenamento e recuperação de informações espaciais sobre a localização de objetos e trajetos específicos (KESSELS et al., 2001). Requer, de forma geral, a associação de ferramentas espaciais presentes no ambiente, as quais permitem a recuperação da informação, mesmo após a remoção das pistas espaciais (MORRIS, 1981).

Várias teorias sobre o papel do hipocampo na memória espacial têm sido propostas ao longo dos anos. O interesse no processamento espacial pelo hipocampo foi impulsionado pela descoberta de “células de lugar” (*place cells*) em ratos (O'KEEFE; DOSTROVSKY, 1971), macacos (ONO et al., 1991) e humanos (EKSTROM et al., 2003), e as células de rede, descobertas por Moser e Moser (2008). Uma característica marcante das “células de lugar” na memória espacial é sua atividade seletiva em locais específicos durante o teste comportamental, independentemente da sua orientação (O'KEEFE; DOSTROVSKY, 1971). As células de lugar são importantes para a formação do mapa cognitivo que consiste na representação espacial do ambiente externo (O'KEEFE; NADEL, 1978).

Fyhn et al.(2004) observaram que as células de “lugar” permanecem estáveis durante várias semanas, o que sugere que estas codificam uma memória de longo prazo. No entanto, registros eletrofisiológicos só demonstram uma correlação entre a posição espacial e o disparo neuronal. Estudos que utilizam lesões temporárias ou permanentes no hipocampo (KUBIE et al., 1999,SUTHERLAND et al.,1990) permitem confirmar a importância deste na memória espacial.

Para avaliar este tipo de memória são utilizados testes comportamentais, como, por exemplo, o labirinto radial de 8 braços (OLTON et al., 1978), o labirinto em T

(DEACON; RAWLINS, 2006) e o MWM (MORRIS, 1984). Este último é considerado padrão ouro para análise da aprendizagem espacial, uma vez que ele permite o estudo preciso e reprodutível da memória espacial de referência (D'HOOGE, DEYN, 2001).

Segundo Cammarota et al. (2004), oportunidades adicionais de aprendizado permitem a reconsolidação de uma tarefa e melhoram o desempenho de ratos nos testes de recuperação da memória. Na mesma linha, dados publicados por Pires et al. (2005) mostraram que ratos que aprenderam uma tarefa pela segunda vez apresentam um melhor desempenho na curva de aprendizagem para encontrar a plataforma de escape, e em tarefas de extinção, adquiridos no MWM. Nesse estudo, as melhoras nos parâmetros comportamentais são acompanhadas de maior atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo e no neocórtex e de maior liberação estimulada de acetilcolina (ACh) no neocórtex. No entanto, Suzuki et al. (2004) ressaltam que reconsolidação e extinção apresentam características bioquímicas distintas.

#### **1.4 Sistema colinérgico: Constituição**

O sistema colinérgico é constituído por áreas com uma alta densidade de neurônios colinérgicos e receptores de acetilcolina, que podem ser muscarínicos ou nicotínicos. A acetilcolina é sintetizada no citosol dos neurônios colinérgicos, onde a enzima colina acetiltransferase (ChAT), por meio da acetil-coenzima A (acetil-CoA), acetila a colina gerando acetilcolina. Esta é armazenada em vesículas mediante um gradiente de prótons transvesicular gerado por uma ATPase vacuolar, através do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (Figura 3) (PARSONS, 2000). O influxo de  $Ca^{+2}$  para o citoplasma leva a uma despolarização celular, provocando a liberação da acetilcolina para a fenda sináptica. A acetilcolina atua tanto no neurônio pré-sináptico como pós-sináptico (WEVER, 2010). A hidrólise da acetilcolina ocorre rapidamente pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). A colina formada é recaptada pelo neurônio através do transportador de colina de alta eficiência (ChT1) (revisado por Martins-Silva, 2008).

A acetilcolina se liga tanto a receptores muscarínicos (metabotrópicos), quanto nicotínicos (ionotrópicos). Os receptores muscarínicos são cinco, e interagem com a proteína G que pode estar acoplada à fosfolipase (M1, M3 e M5), ou à

adenilatociclase (M2 e M4) (FELDER, 1995). Embora encontrados em abundância ao longo do sistema nervoso central e periférico os diferentes subtipos não apresentam uma distribuição homogênea no sistema nervoso (LEVEY et al., 1991). Assim, M2 é expresso proeminentemente no neocórtex e núcleo basal, M4 é expresso principalmente no estriado e hipocampo, enquanto M1 é expresso especialmente no hipocampo. (BUBSER et al. 2012, LEVEY et al., 1991). Os receptores muscarínicos influenciam em vários processos cognitivos, como atenção (PARIKH et al. 2007), orientação espacial (ROBERTS et al. 2005; SATO et al. 1987) e controle da sincronia neural (CHALK et al. 2010, FRIES et al. 2001).

Por outro lado, os receptores nicotínicos se subdividem em  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ),  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ),  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ , podendo estar estes ligados a canal de  $\text{Ca}^{+2}$  ou de  $\text{Na}^{+}$  (ZIA et al., 2000). Localizados tanto pré como pós sináptico, os quais modulam a liberação de diversos neurotransmissores como acetilcolina (WILKIE et al., 1996), GABA (YANG et al., 1996) e glutamato (MCGEHEE et al., 1995), assim estes receptores tem sido implicados em diversas disfunções cognitivas como demência (PICCIOTTO; ZOLI, 2002), epilepsia (RAGGENBASS; BERTRAND, 2002), doença de Alzheimer (PERRY et al., 2000), déficit de atenção (POTTER; NEWHOUSE, 2004.), entre outras.

Mesulam et al. (1983) classificaram os neurônios colinérgicos do sistema nervoso central em seis grupos (Figura 4). CH1 a CH4 localizadas no prosencéfalo basal, o CH1 é composto de neurônios colinérgicos da região do septo medial, enquanto CH2 estão situados na extremidade vertical da área de Broca. Ambos têm projeções densas para o hipocampo (PARÉ et al., 1988). Os neurônios pertencentes a CH3 estão localizados na região horizontal da área da broca e inervam o bulbo olfatório (DEOIMOS et al., 1978) e núcleos talâmicos (STERIADE et al., 1988). Enquanto os neurônios CH4 localizam-se no núcleo basal e projetam-se para tálamo, neocórtex e amígdala (MESULAM et al., 1983b). Por ultimo, a formação reticular pontomesencefálica contém dois grupos de neurônios colinérgicos Ch5 e Ch6. Eles constituem o núcleo pedunculopontino e núcleo tegmental laterodorsal, respectivamente e fazem projeção para o mesencéfalo, diencéfalo e bulbo. São importantes para processos como vigília e iniciação do sono (MESULAM et al., 1983; MESULAN et al., 1989). Esta transmissão colinérgica utiliza receptores de acetilcolina pré e pós-sinápticos, muscarínicos e nicotínicos, os quais estão

relacionados com atenção, aprendizagem e memória (ARTHUR;LEVIN, 2002; BROWN et al., 2002; COZZOLINO et al., 1994; ELVANDER et al., 2004; FELIX, LEVIN, 1997; ). O papel do sistema colinérgico na cognição, em particular das projeções colinérgicas do córtex pré-frontal, tem sido extensamente investigado em primatas e roedores (revisado por Logue e Gould, 2013).

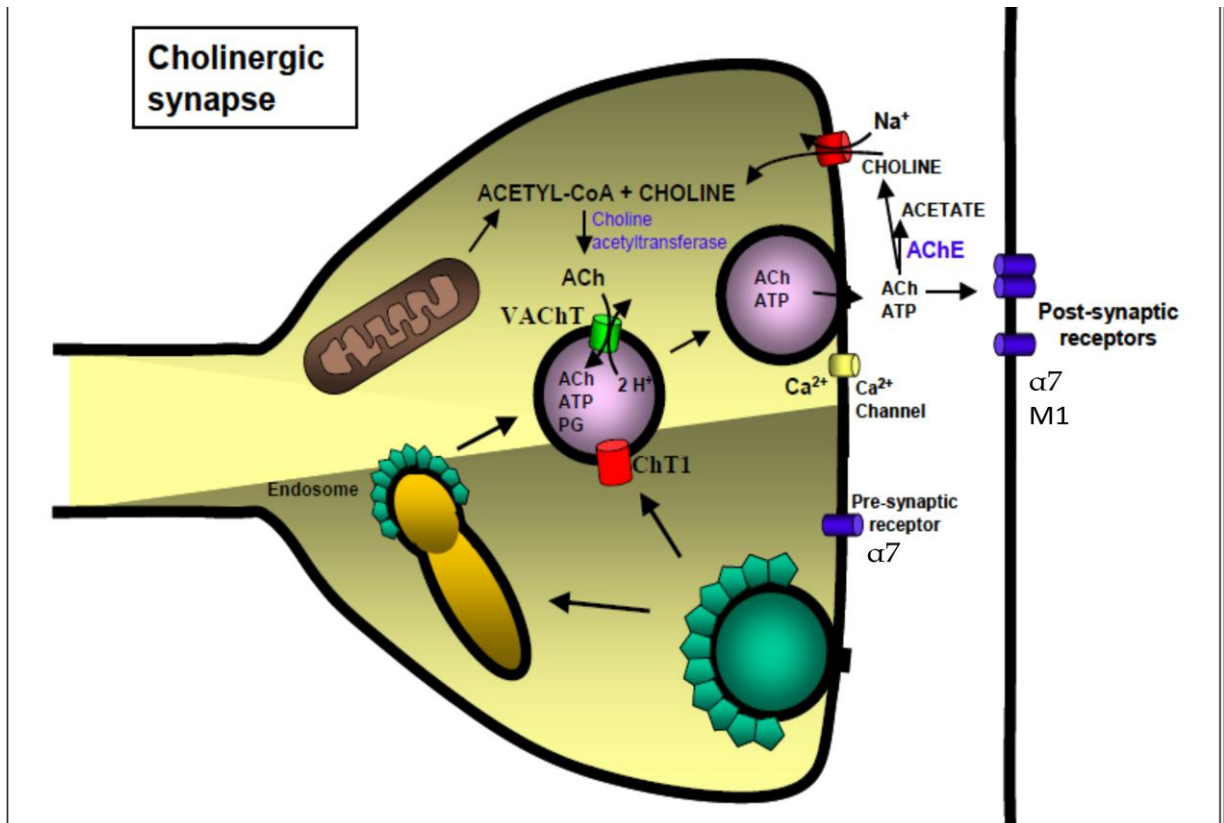


Figura 3 : Desenho esquemático de um terminal colinérgico: A acetilcolina (ACh) é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) e armazenada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Com a exocitose, o neurotransmissor pode se ligar a receptores pré e pós-sinápticos. Após a ACh ser rapidamente degradada pela acetilcolinesterase (AChE), a colina é novamente recaptada para o terminal pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (ChT1).Fonte: Martins-Silva, 2008.



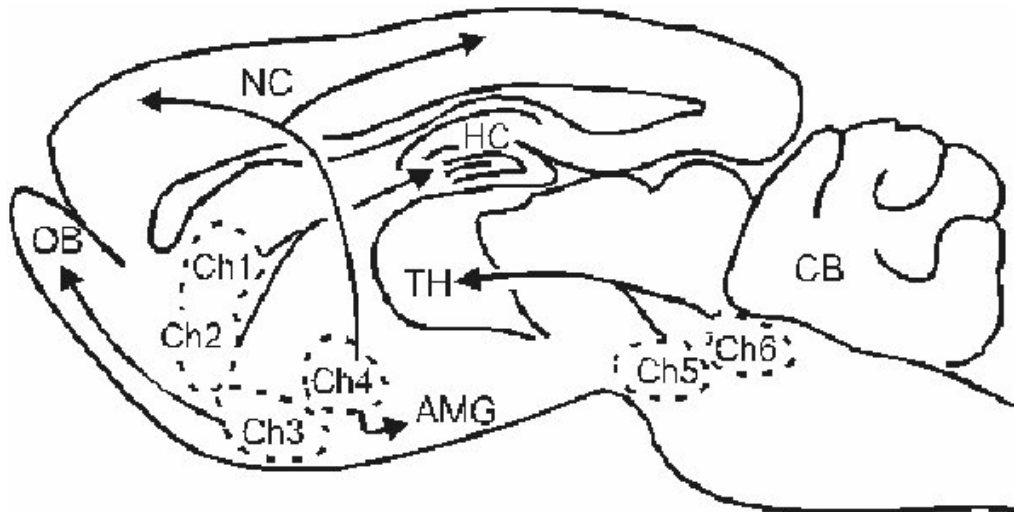


Figura 4: Figura representativa da distribuição dos neurônios colinérgicos no sistema nervoso central de ratos. Abreviações: (AMG) amígdala; (CB) cerebelo; (HC) hipocampo; (NC) neocórtex; (OB) bulbo olfatório; (TH) tálamo. (Modificado de Mesulan et al., 1983)

## 1.5 Sistema colinérgico e memória

Vários estudos têm demonstrado a participação do sistema colinérgico em processos cognitivos, especialmente de aprendizagem e memória (PIRES et al., 2001; PIRES et al., 2005; PIRES et al., 2007; PRADO et al., 2006), bem como uma correlação entre a liberação de acetilcolina e os diferentes processos de aprendizagem (PIRES et al., 2005). A disfunção colinérgica está associada a déficits cognitivos e neuropsiquiátricos, tendo um papel central nos processos cognitivos. A aquisição de memória espacial ativa projeções neuronais colinérgicas no hipocampo (STANCAMPIANO et al., 1999) aumentando a liberação de acetilcolina (MCLNTYRE et al., 2003). Porém, esta liberação de acetilcolina não está restrita ao hipocampo, havendo várias evidências da liberação de acetilcolina no neocórtex, durante os testes comportamentais (GIOVANNINI et al., 1998). Os processos de aprendizagem e consolidação apresentam bases moleculares diferentes. Baixos níveis de acetilcolina podem não ser suficientes para a codificação de novas informações, porém podem facilitar os processos de recuperação e consolidação (HASSELMO, MCGAUGHY, 2004; PIRES et al., 2005).

Já é sabido de longa data que, em doenças neurodegenerativas que causam déficits cognitivos graves, como o mal de Alzheimer, o sistema colinérgico é o sistema primariamente afetado (revisado por ANAND; SIGH, 2013). Por isso, o tratamento de

doenças neurodegenerativas, como esta, baseia-se essencialmente na inibição da enzima AChE, pelos inibidores de colinesterase (ChEIs), como a galantamina (SCHNEIDER, 2004). Diversos estudos mostrando intervenções farmacológicas no sistema colinérgico foram revisadas por Deiana et al. (2011). Por outro lado, a ativação de receptores muscarínicos e nicotínicos por agonistas específicos induz a liberação de acetilcolina (BLAND; ODDIE, 1998). De fato, já foi demonstrado que a administração de agonistas específicos leva à reversão de prejuízos cognitivos induzidos pelo bloqueio de receptores muscarínicos M1 e nicotínicos  $\alpha 7$  (MARKOWSKA, 1995).

O papel relativo dos receptores muscarínicos e nicotínicos na mediação das funções cognitivas não estão totalmente esclarecidos. Porém, já foi observado o prejuízo cognitivo provocado pela interrupção da sinalização, através de antagonistas muscarínico e/ou nicotínicos (COZZOLINO et al., 1994; HAGAN et al., 1986; RIEKKINEN et al., 1990). A maioria dos receptores nicotínicos estão localizados pré-sinápticamente (FABIAN-FINE, 2001) e estão envolvidos na regulação da liberação de outros neurotransmissores, tais como dopamina, norepinefrina e serotonina (LIVINGSTONE, WONNACOTT, 2009; KLINK et al. 2001; VIZI, LENDVAI, 1999)

Dessa forma, o sistema colinérgico é um dos principais focos na busca pela elucidação dos mecanismos responsáveis por alterações cognitivas, causadas tanto por doenças neurodegenerativas, quanto pelo abuso de drogas e envelhecimento cerebral.

Desde a década de 1990 é conhecido o papel modulador do sistema endocanabinoide em outros sistemas de neurotransmissão (KATON et al., 2000). Assim a interação deste sistema com o sistema colinérgico em processos relacionados à memória vem sendo descrita (CARTA et al., 1998). A modulação do sistema colinérgico, pelo sistema endocanabinoide no hipocampo e no neocórtex, se apresenta como um importante foco para o estudo de alterações cognitivas, como déficits em processos de aprendizagem e memória.

## **1.6 O sistema endocanabinoide**

A planta *Cannabis sativa* tem sido usada nos últimos 4000 anos como droga recreacional devido a suas propriedades psicoativas. A maconha, como é

conhecida, é a droga ilegal mais consumida no mundo atualmente (LENAD, 2012). A *Cannabis sativa* contém mais de 60 compostos aromáticos hidrocarbonados, contendo oxigênio, conhecidos como canabinoides (CBs), sendo o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) o componente mais ativo (MECHOULAM et al., 1970). Os efeitos do  $\Delta^9$ -THC são mediados por receptores canabinóides (CBRs), os quais já foram isolados e clonados: CB1 (MATSUDA et al., 1990) e CB2 (MUNRO et al., 1993), os quais localizam-se principalmente nos neurônios pré-sinápticos (KATONA et al., 1999). Os receptores do tipo CB1 estão amplamente distribuídos no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo bastante expressos principalmente no cerebelo, hipocampo, núcleos basais e neocórtex cerebral, entre outros (HERKENHAM et al., 1990, 1991; MATSUDA et al., 1990; TSOU et al., 1998); enquanto os receptores do tipo CB2 se encontram praticamente restritos às células do sistema imunológico (MORERA-HERRERAS et al., 2009); porém, também estão expressos no SNC, em neurônios e células gliais, em condições inflamatórias (GALIEGUE et al., 1995; SCHAT et al., 1997). Recentemente, foi observada a capacidade de alguns canabinoides ativarem receptores GPR55 (PERTWEE, 2007), sugerindo que este pode ser um novo receptor canabinoide "CB3R" (MORICONI et al., 2010).

Após a clonagem e caracterização dos CBRs, especialmente do receptor CB1, veio do fato da existência de ligantes endógenos, atualmente denominados endocanabinoides (eCBs) (DEVANE et al., 1992; STELLA et al., 1997). Os dois mais estudados são a anandamida (AEA) e o 2-aracdonil-glicerol (2-AG) (BISOGNO et al., 2005). Os eCBs são liberados sob demanda a partir de precursores fosfolipídicos de membrana e, embora a síntese dos eCBs aconteça por várias vias metabólicas (MUCCIOLI, 2010), as enzimas N-acetiltransferase (NAT) e N-acilfosfatidiletanolamida específica- fosfolipase D (NAPE-PLD) são, atualmente, consideradas as principais enzimas responsáveis pela produção de AEA (OKAMOTO et al., 2009). Por outro lado, a síntese de 2-AG ocorre pela ação de uma fosfolipase C específica (PLC) seguida pela ativação da enzima diacilglicerol lipase (DAGL) (UEDA et al., 2011). A recaptação intracelular pode ocorrer através do transportador de membrana endocanabinóide (EMT) (RONSES et al., 2004; LIGRESTI et al., 2004), que ainda não está bem caracterizado (FU et al. 2011). Após sua recaptação, a AEA é degradada pela enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH) (MCKINNEY; CRAVATT, 2005) localizada no neurônio pós-sináptico

(GUYLASET al., 2004), enquanto o 2-AG é degradado principalmente pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) (DINH et al., 2002), localizada no neurônio pré-sináptico (YOSHIDA et al., 2006; KATONA et al., 2006). (Figura 5).

Os receptores canabinoides são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína-G (GPCR), mais especificamente do tipo  $\alpha_{i/o}$  (HEIFETS; CASTILLO, 2009). Nesses receptores, a proteína-G inibe a atividade da adenilato ciclase e, conseqüentemente, a formação de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (CHEVALEYRE et al., 2006; FREUD et al., 2003; KANO et al., 2009; LOVINGER, 2008). A ativação dos receptores CB1 abre canais de potássio tipo A, o que reduz a duração dos potenciais de ação pré-sinápticos, diminuindo, assim, a liberação de vesículas contendo neurotransmissores (HAMPSON; DEADWLER, 1999). Outro mecanismo pelo qual CB1 impede a exocitose de vesículas pré-sinápticas é através da inibição de correntes de cálcio do tipo N e P/Q, por ação direta das subunidades da proteína- $G_{\beta\gamma}$  sobre esses canais (DAVIES et al., 2002; IVERSEN, 2003). (Figura 6).

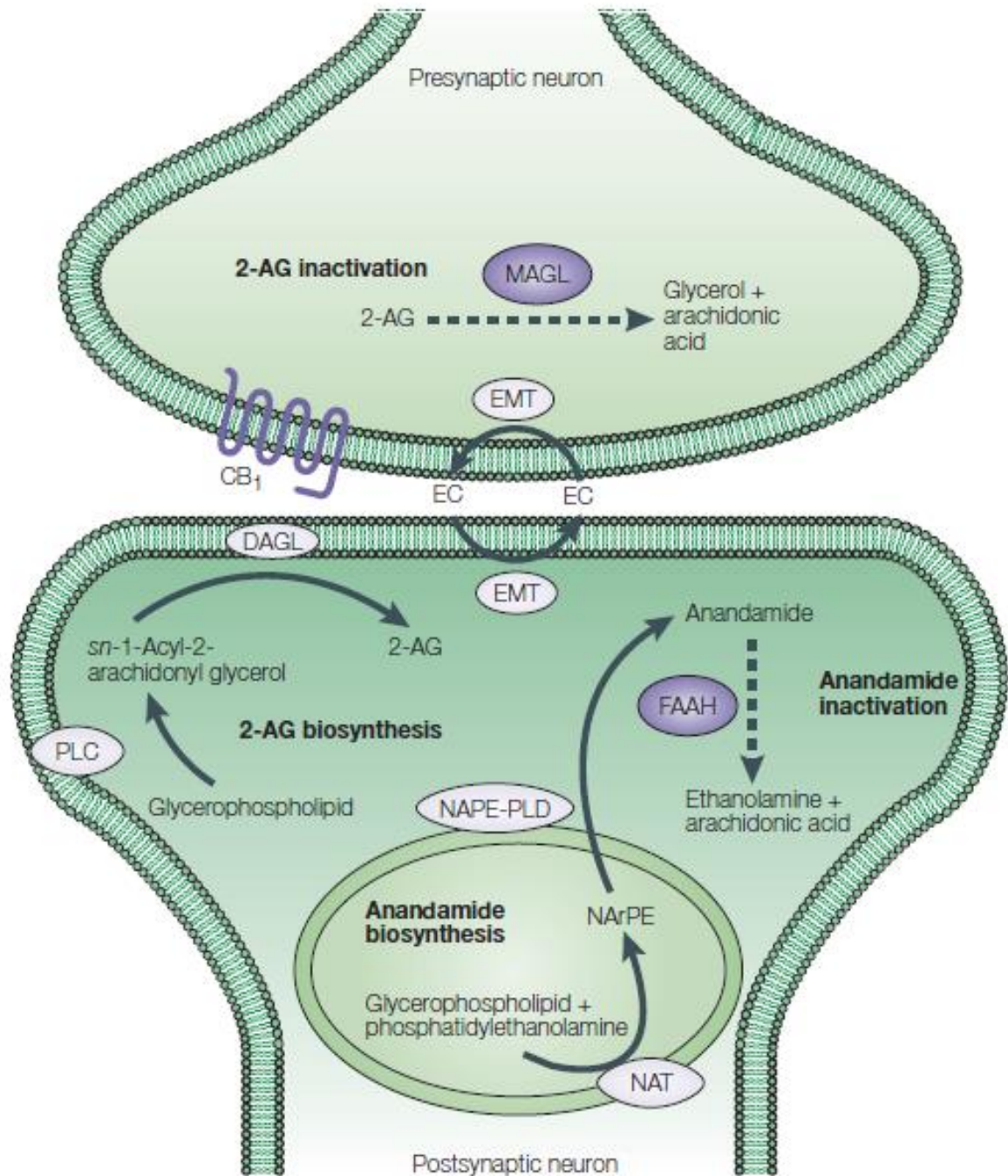


Figura 5: Esquema do Sistema endocanabinoide. Os eCBs são sintetizados e degradados por enzimas hidrolíticas. A síntese do 2-AG acontece pela ativação da enzima fosfolipase C (PLC) com posterior atuação da enzima diacilglicerol lipase (DAGL), estas enzimas encontram-se localizadas na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico, enquanto que a monoacilglicerol lipase (MAGL) que inativa 2-AG localiza-se principalmente no neurônio pré-sináptico. As enzimas biossintéticas N-acetiltransferase (NAT) e N-acilfosfatidil-etanolamina-específica fosfolipase D (NAPE-PLD) e de inativação ácido graxo amida hidrolase (FAAH) da anandamida, localizam-se nas membranas intracelulares. Finalmente, transportadores de membrana (EMT), ainda não caracterizados, permitem tanto a liberação dos endocanabinoides como a sua recaptação ( Di Marzo et al., 2004).

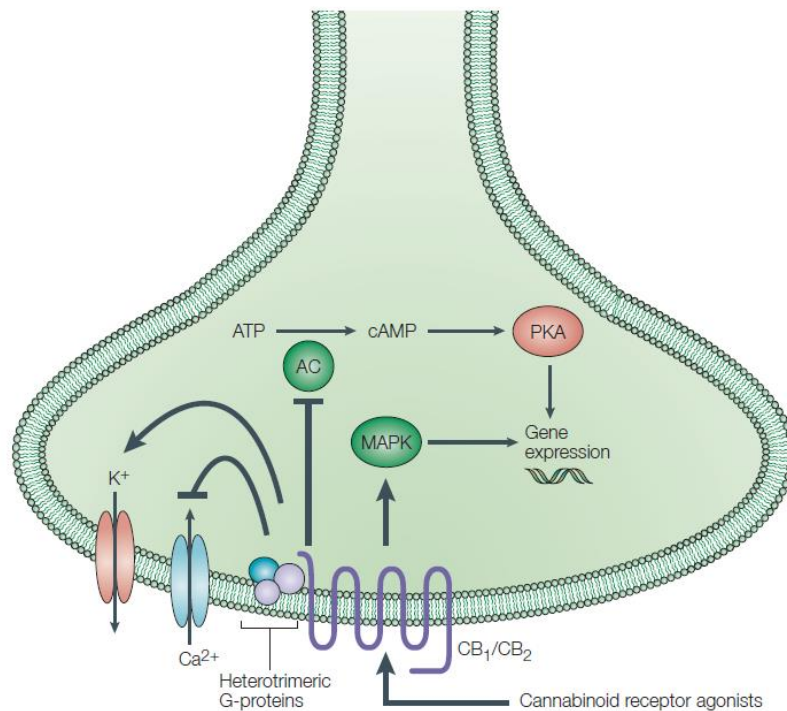


Figura 6: Esquema da via de tradução do sinal do receptor canabinoide. A ativação do receptor canabinoide acoplado a proteína G inibitória leva a uma inibição da enzima adenilato ciclase (AC) com a inativação da proteína cinase A (PKA), ou ativação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Estas mudanças levam a regulação da expressão gênica. A estimulação de receptores acoplados a proteína G inibitória também desencadeia a inibição de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e abertura de canais de potássio  $\text{K}^+$ , com conseqüente inibição da liberação de neurotransmissores (Di Marzo et al., 2004).

Os eCBs são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem predominantemente nos receptores pré-sinápticos (WILSON; NICOLL, 2001). Essa sinalização retrógrada emergiu nos últimos anos como um importante tema no estudo da plasticidade sináptica. Neurobiologistas têm voltado atenção ao sistema endocanabinoide como um importante modulador das funções fisiológicas cerebrais, incluindo dor, controle do apetite, funções motoras e aprendizagem e memória (AMERI, 1999; ALVAREZ et al., 2008; IVERSEN, 2003).

## 1.7 Canabinoides e a liberação de neurotransmissores

Desde que Gill et al. (1970) demonstraram que a liberação de acetilcolina é inibida por  $\Delta^9$ -THC em cérebros de porcos eletricamente estimulados, vários estudos focam no papel dos canabinoides na modulação da liberação de neurotransmissores clássicos principalmente nas regiões do neocórtex e hipocampo. Diversos agonistas canabinoides apresentaram efeitos inibitórios similares para: ácido gama-aminobutírico (GABA) (KATON et al., 2000; EGERTOVÁ; ELPHICK, 2000; TSOU et al., 1999), glutamato (GERDERMAN; LOVINGER, 2001; KATONA et al., 2006; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006), noradrenalina (SCHLICKER et al., 1997; SCHLICKER; KATHMANN, 2001), dopamina (SZABO et al., 1999), serotonina (NAKAZI et al., 2000) e acetilcolina (CARTA et al., 1998; GIFFORD et al., 2000; KATHMANN et al., 2001a e 2001b; NAVA, 2001).

Vários autores mostraram que os canabinoides, endógenos e/ou exógenos, inibem a liberação de acetilcolina no hipocampo *in vivo* (CARTA et al., 1998; GESSA et al., 1997, 1998, GOONAWADERNA et al., 2011) e *in vitro* (GIFFORD; ASHBY, 1996; GIFFORD et al., 1997, 2000). Além disso, Kathmann et al. (2001a) relatam que, em linhagens de camundongos geneticamente deficientes do receptor CB1, a liberação de acetilcolina evocada por estimulação elétrica de neurônios hipocámpais em cultura é o dobro daquela encontrada em preparações obtidas de camundongos do tipo selvagem. Reforçando esses dados, os estudos de Steffens et al. (2003) demonstram a modulação da liberação de acetilcolina pelos receptores CB1 no neocórtex de camundongos e de humanos e, sugerem, assim como Kathmann et al. (2001a), a existência de uma inibição tônica da liberação de acetilcolina mediada pelo receptor CB1. Devido ao efeito modulatório do sistema endocanabinoide sobre o colinérgico, torna-se interessante ressaltar que, variações nos níveis extracelulares de acetilcolina são correlacionadas a mudanças na atividade neuronal, sendo que a redução desses níveis pode ser acompanhada de alterações comportamentais específicas (PEPEU; GIOVANNINI, 2004; POWER et al., 2003).

## 1.8 Canabinoides: aprendizagem e memória

Déficits cognitivos e de aprendizagem após o uso agudo e crônico de maconha já foram observados em humanos há algum tempo (DARLEY et al., 1973 a,b; HOLLISTER, 1986), e trabalhos seguintes confirmaram alterações na recuperação

imediate de informações (DARLEY et al., 1973 a,b), na memória de curta duração (FLETCHER et al., 1996; MILLER; BRANCONNIER, 1983), na recuperação da memória e atenção (BLOCK; GHOSHNEIM, 1993). Prejuízos causados por  $\Delta^9$ -THC em processo de aprendizagem e memória em animais de laboratório também foram relatados (NAKAMURA et al., 1991; WINSAUER et al., 1999). Ratos submetidos a tratamento crônico com canabinoides apresentaram prejuízos de aprendizagem em tarefas no labirinto radial de 8 braços (FEHR; KALANT, 1983 b; STIGLICK; KALANT, 1982a) e no MWM (FERRARI et al., 1999). Da mesma forma, Nakamura-Palacios et al. (2000) também demonstraram que a administração aguda de  $\Delta^9$ -THC produziu prejuízos, de forma dose-dependente, de aprendizagem em primatas não-humanos numa tarefa de aquisição repetida. Essas alterações comportamentais são causadas por danos ao córtex pré-frontal, em macacos e humanos (GOLDMAN-RAKIC, 1991), sugerindo que disfunções nessa região cerebral podem ser uma das causas das disfunções cognitivas induzidas pelo consumo de canabinoides. Além disso, Davies et al. (2002) sugerem que essas disfunções cognitivas são comparáveis àquelas observadas em várias formas de demência, caracterizadas por degeneração do hipocampo (*i.e.* Mal de Alzheimer) e, assim, os déficits induzidos pelo uso da maconha também podem ser atribuídos a um mal funcionamento hipocampal. As hipóteses acima descritas foram testadas em vários modelos experimentais utilizando canabinoides naturais e sintéticos, como descrito a seguir.

Diversos autores descrevem pioras após administração de agonistas canabinoides, no desempenho dos animais em tarefas que avaliam memória de referência espacial no MWM (por exemplo, VARVEL; LITCHMAN, 2002) e memória de trabalho, avaliada em testes de apresentação de estímulos condicionados com atrasos variáveis (HAMPSON; DEADWYLER, 1999 e 2000; NAVA et al., 2001). Hampson e Deadwyler (1999 e 2000) demonstraram que a estimulação de receptores CB1 no hipocampo, de forma reversível, prejudica a memória de trabalho, avaliada em testes de condicionamento clássico com atraso, de maneira similar à remoção total do hipocampo e à remoção hipocampal acompanhada de estruturas límbicas circundantes.

Da mesma forma, a administração apenas do antagonista rimonabant (SR141716A), bloqueando a ação dos receptores CB1 durante o aprendizado da tarefa, melhora o desempenho dos ratos nos testes de tarefas espaciais no labirinto radial



(LITCHMAN, 2000). Reibaud et al. (1999) demonstraram que linhagens de camundongos deficientes de receptores canabinoides permanecem capazes de recuperar a informação aprendida por períodos de tempo maiores do que camundongos normais em testes de reconhecimento de objetos. Varvel e Lichtman (2002) mostraram que os animais desprovidos desses receptores apresentam dificuldade no processo de extinção de memórias consolidadas. Nesses experimentos, quando a plataforma do labirinto aquático era colocada em um novo local, os camundongos insistiam em procurar no local previamente conhecido. Da mesma maneira, Varvel et al. (2005) demonstraram que a falta da sinalização através dos receptores CB1, por bloqueio ou deleção genética do receptor, piora a extinção de tarefas aprendidas no MWM, sem, no entanto, interferir no processo de aprendizagem. Contrariamente, camundongos knockout para FAAH apresentaram um melhor desempenho no labirinto aquático de Morris quando comparados a animais selvagens (VARVEL et al., 2006, 2007).

Desta forma é razoável assumir que, os efeitos nas respostas eletrofisiológicas e celulares mediados pelo receptor CB1, no hipocampo e no córtex pré-frontal, traduzem-se em eventos comportamentais relevantes. Assim, os receptores CB1, nestas regiões, podem ser importantes em mecanismos de aquisição, consolidação, recuperação e extinção de informações, em animais e humanos (DAVIES et al., 2002; RIEDEL et al., 1999).

## **1.9 Sistema colinérgico x sistema endocanabinoide**

Após o isolamento e determinação da estrutura química do  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ - THC) por Mechoulam em 1964, foi possível o desenvolvimento de canabinoides sintéticos como o WIN 55 212-2 (WIN-2). Esta droga pode ser utilizada como uma ferramenta para compreender as bases moleculares da aprendizagem e memória. Existem relatos dos efeitos cognitivos provocados por WIN-2, quando administrado diretamente no hipocampo (ABUSH; AKIRAV, 2010; YIM et al., 2008; WEGENER et al., 2008) ou administrado intraperitonealmente (ROBINSON et al., 2010). Estes prejuízos podem ser revertidos utilizando um inibidor da AChE, a rivostigmina, sugerindo que o efeito está relacionado com uma hipofunção do sistema colinérgico. Isto foi observado tanto em testes de memória de curta duração (GOONAWADERNA et al., 2010) como na avaliação da memória de referência (ROBINSON et al., 2010).

Além disso, Tzavara et al. (2003) sugeriram que o mecanismo pelo qual o WIN-2 provoca prejuízo cognitivo é mediante uma diminuição da liberação de acetilcolina no hipocampo.

Apesar das diversas evidências da participação do sistema endocanabinoide na consolidação, recuperação e extinção de informações, e de sua influência tônica sobre o sistema colinérgico, muito continua incerto e ainda existem controvérsias na literatura, tornando-se clara a necessidade de mais estudos acerca da atuação desse sistema em diferentes aspectos das tarefas cognitivas, como aprendizagem, memória, extinção e reaprendizagem.

## 2. JUSTIFICATIVA

No presente projeto, propomos testar a hipótese de que a atuação não fisiológica no hipocampo e no córtex pré-frontal do sistema endógeno de canabinoides, modulando o sistema colinérgico, se correlaciona com o desempenho cognitivo de indivíduos submetidos à aprendizagem e reaprendizagem de uma mesma tarefa. Essa questão se baseia na hipótese de que a atividade modulatória do sistema endocanabinoide, sobre o sistema colinérgico hipocampal e cortical, seria importante na regulação de aspectos dos processos cognitivos, como aprendizagem, memória e extinção. O esclarecimento desses mecanismos irá contribuir para um maior conhecimento dos sistemas envolvidos o que pode, futuramente, auxiliar no desenvolvimento de tratamentos que podem atenuar os déficits cognitivos e fisiológicos provocados pela exposição aos canabinoides. Além disso, um melhor conhecimento dos mecanismos modulatórios do sistema endocanabinoide irá, certamente, contribuir para a elucidação de mecanismos cognitivos, especialmente de aprendizagem e memória.

Dessa forma, o presente trabalho foi dividido em dois experimentos. No experimento 1, propostos testar o efeito do agonista canabinóide WIN-2 na aquisição de uma tarefa aprendida e depois, reaprendida. No segundo experimento, propomos testar a mesma hipótese, porém, avaliaremos a consolidação da memória.

**EXPERIMENTO 1: EFEITO DO WIN-2 NA  
AQUISIÇÃO DE TAREFAS APRENDIDAS E  
REAPRENDIDAS**

### **3. OBJETIVO EXPERIMENTO 1:**

#### **3.1. Geral**

Verificar o envolvimento do sistema endocanabinoide na modulação do sistema colinérgico, na aquisição de processos de aprendizagem e reaprendizagem, utilizando o agonista canabinoide WIN-2.

#### **3. 2. Específicos**

Em animais tratados cronicamente com o agonista canabinoide WIN-2:

- Estudar o efeito da reaprendizagem na memória, através da avaliação do desempenho em tarefas espaciais, aprendidas e reaprendidas;
- Investigar alterações na expressão dos receptores CB1 e colinérgicos (M1 e  $\alpha 7$ ) no hipocampo e no córtex pré-frontal, para avaliar o processo de plasticidade neuronal;
- Investigar alterações na expressão gênica das enzimas de síntese e degradação, do sistema colinérgico e endocanabinoide, no hipocampo e córtex pré-frontal: ChAT, AChE, FAAH, MAGL, DAGL e NAPE-PLD;
- Investigar a atividade enzimática da AChE no hipocampo e no córtex pré-frontal.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS DO EXPERIMENTO 1**

### **4.1. Animais e droga**

#### **4.1.1 Animais:**

Foram usados camundongos machos da linhagem SWISS (n=27) de dois meses de idade (38-50g), provenientes do biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo, mantidos em gaiolas com 4-5 animais sobre um ciclo claro-escuro de 12:12h. Todos os sujeitos experimentais receberam água e ração comercial *ad libitum*. Os experimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES) pelo protocolo de número (010/2010).

#### **4.1.2 Administração da droga:**

O WIN55, 212-2 (WIN-2) (Cayman Michingan, USA), foi diluído em DMSO/salina 70%, aliquotado, e armazenado a -20°C. Os animais foram divididos em dois grupos: WIN-2 e *veículo*. Para avaliação do efeito crônico do WIN-2 sobre parâmetros cognitivos, o agonista foi administrado diariamente, pela via intraperitoneal (i.p.), na dose de 2 mg/kg. As administrações foram iniciadas uma semana antes do início dos testes cognitivos, respeitando um intervalo mínimo de 8 horas antes das sessões diárias, no MWM (vide abaixo), e mantidas até o fim dos experimentos. A dose utilizada foi baseada nos artigos de Yim et al (2008) e Goodman (2014) os quais utilizaram as doses de 1 e 3 mg/kg; desta forma, optamos pela utilização de uma dose intermediária de 2 mg/kg.

### **4.2 Testes cognitivos**

#### **4.2.1 Equipamento**

O MWM (figura 7) consiste em uma piscina circular de 90 cm de diâmetro por 50 cm de altura de cor azul, dividida em quatro quadrantes imaginários, preenchida com água e leite (para tornar a água turva e assim impedir a visualização da plataforma). Pistas espaciais foram colocadas na parede da sala para auxiliar na orientação espacial do animal. Em um dos quadrantes, foi colocada uma plataforma submersa, a 1 cm da superfície da água. A piscina foi marcada com os quatro pontos cardeais

equidistantes, sendo que a plataforma foi posicionada no quadrante norte (MORRIS, 1984).

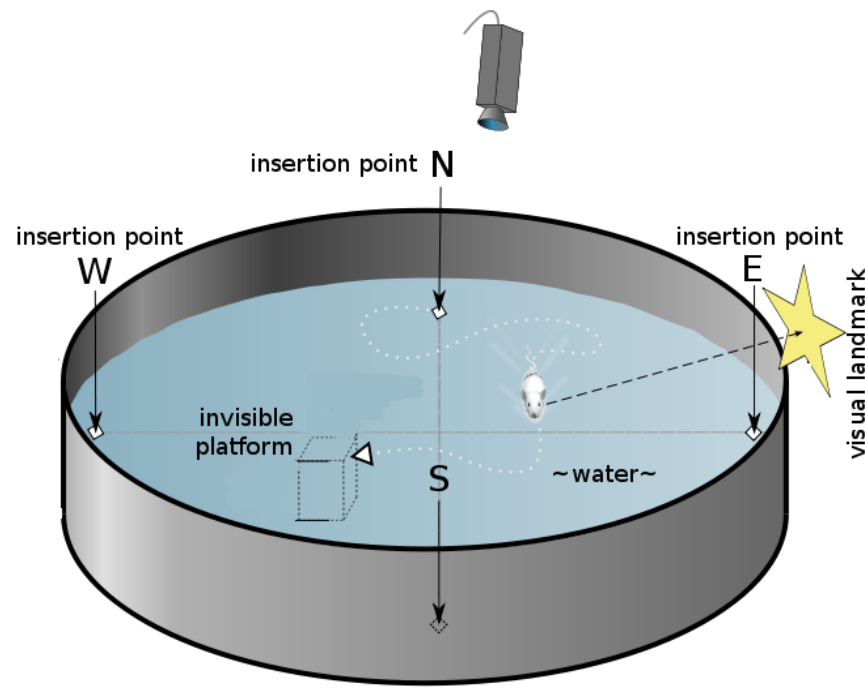


Figura7:O MWM

#### 4.2.2 Teste de aprendizagem e memória

O experimento consistiu em oito sessões, cada sessão diária foi constituída por quatro tentativas (saindo dos quatro pontos cardeais). Cada tentativa consistiu em colocar o animal na água, voltado para a parede da piscina, e ao animal foi permitido nadar livremente por 60 segundos, ou até que o mesmo encontrasse a plataforma de escape. Se a plataforma não fosse encontrada em 60 segundos, o animal era gentilmente guiado pelo experimentador até a mesma, e nela permanece durante 10 segundos. A avaliação do desempenho dos animais foi feita através da medida da latência (intervalo de tempo desde a liberação do animal até o momento em que o mesmo encontra a plataforma), distância percorrida até achar a plataforma e a distância cumulativa (consiste no somatório das distâncias totais percorridas tanto na primeira quanto na quarta tentativa, durante as oito sessões de aprendizagem ou reaprendizagem). No nono dia de experimento foi realizado o teste comprobatório. Nesse teste, a plataforma foi retirada e o tempo despendido pelo animal em cada quadrante foi medido. Após esses cinco dias de intervalo, durante os quais os animais foram treinados da mesma forma do teste comprobatório, foi realizado o

teste de reaprendizagem. A reaprendizagem consistiu em oito sessões, como descrito na aprendizagem, e no nono dia foi realizado o teste comprobatório. Além disso, avaliamos também a distância cumulativa percorrida nas tentativas 1 e 4 em todas as sessões (Figura 8). De acordo com Robinson et. al, 2010, o somatório das distâncias de todas as tentativas 1 e 4 podem ser consideradas como medidas de memória de longa e de curta duração, respectivamente. Todas as sessões foram filmadas para posterior análise dos dados pelo software Any Maze®.

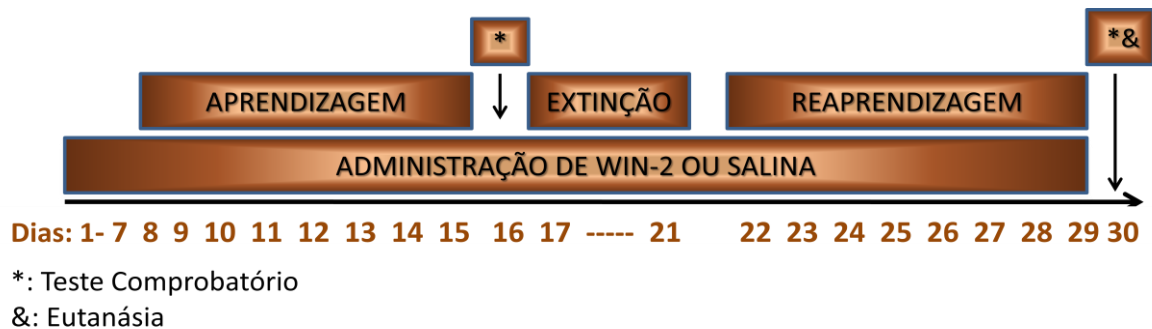


Figura 8: Delineamento experimental da aquisição: Efeito do WIN-2 na aquisição de tarefas aprendidas e reaprendidas

## 4.3 Estudos bioquímicos

### 4.3.1 Dissecção

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação, seus cérebros foram rapidamente retirados e mantidos em gelo. O córtex pré-frontal e o hipocampo de ambos os hemisférios foram imediatamente dissecados e os tecidos foram utilizados para determinação dos parâmetros bioquímicos.

### 4.3.2. Avaliação da expressão gênica de componentes do sistema colinérgico e endocanabinoide

Para purificação do RNA, o hipocampo e córtex pré-frontal foram dissecados e o tecido macerado com nitrogênio líquido utilizando um “graal” e um pistilo. O RNA total foi extraído utilizando-se o método do Trizol (Sigma aldrich). Após a extração, o RNA foi tratado com DNase I (Sigma-Aldrich) para eliminação do DNA genômico. Para realização do PCR quantitativo (qPCR), a primeira cadeia de cDNA foi sintetizada utilizando-se iScript cDNA synthesis kit (Biorad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a transcrição reversa, o cDNA foi submetido ao



qPCR em um equipamento CFX96 qPCR (Biorad, CA, USA) utilizando o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA). Resumidamente, a amplificação foi feita em um volume total de 10µl contendo 0,5 µL de cada *primer* (concentração inicial 10 µM), 5µL de SYBR Green Supermix 2X e 0,5µL de cDNA não diluído. Após o passo de desnaturação inicial (95°C, 2 minutos), foram realizados 40 ciclos de amplificação de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C, 15s; anelamento, 60°C, 30s; amplificação. Para cada experimento, uma reação sem cDNA molde foi incluída como controle negativo. A análise da curva de “melting” dos produtos amplificados foi feita pelo esfriamento das amostras a 60°C e, em seguida, aumentando-se a temperatura para 95°C a uma taxa de incremento de 0,1°C/s. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizando a expressão do gene beta actina para normalização dos dados. Os *primers* utilizados para a avaliação da expressão dos genes mencionados foram desenhados utilizando o site da *Integrated DNA Technologies* (IDT, <http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) e posteriormente foi realizado *BLAST* para confirmação da homologia e especificidade dos mesmos. Os *primers* utilizados apresentam-se listados na Tabela 1.

TABELA 1: Sequência de *primers*

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento(pb)	TM (°C)
CB1	F: ACC TAT ACC CAC ACC CCT AC	143	57
	R: TCA TTC CAA ACA GAG CCA GG		57
FAAH	F: GTC TGG GCT CTG TAA GGT TTA TC	145	58
	R: GCA TAG AAG TAA TCG GGA GG		55
MAGL	F: ACC ATC TCA ACC ACT AAG CCC	124	59
	R: GAG AAA GGG AAG TGT GAG GTG		58
n-PLD	F: TTG GTT TGC TCC TTA GTC TCG	173	58
	R: CGC TTT CTC CGT GTT TCT TTT GG		61

<b>DAGL</b>	F: CGT AGC TGT GGA CCA TGA CA	157	59
	R: TGA GAG TAC CAT GCC CTT GTG		
<b>ChAT</b>	F:CAAATAAGTCATAAAGGCAGAGGC	140	59
	R:CTCAAGGAAGACTGTGCTATGG		
<b>AChE</b>	F: GCGCCACCGATACTCTGGACG	146	69
	R:GGGTCCCCCAAGGGGTCACA		
<b>M1</b>	F:TGG TTT CCT TCG TTC TCT GG	98	69
	R: GAGGAACTGGATGTAGCACTG		
<b>Alfa-7</b>	F:AAA GAG CCAT ACC CAG ATG TC	77	58
	R: ATG AGC AGA TTG AGG CCA TAG		
<b>Actina</b>	F: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG A	122	61
	R: AAT GCC TGG GTA CAT GGT GGT A		

Tabela1: *Primers* de componentes dos Sistemas colinérgico e endocannabinoide.

#### 4.3.3 Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi medida no hipocampo, conforme descrito por Ellman, 1961, modificado por Pires e cols., 2001. Alíquotas de 20 mg do tecido foram transferidas para microtubos e armazenadas à temperatura de -80°C. Posteriormente, os tecidos foram lentamente descongelados à 4°C, homogeneizados com tampão fosfato 0,1M (pH=8,2) e congeladas a -20 °C até o dia do ensaio. O homogenato foi utilizado para análise da hidrólise do substrato acetiltiocolina, o qual é degradado em acetato e tiocolina, que reage com o íon ditiobinistrobenzoato, produzindo uma cor amarela, a qual é detectada por espectrofotometria (Figura 9). As absorbâncias foram registradas durante 120 segundos em intervalos de 10 segundos. Os resultados foram expressos em  $\mu$ moles de acetiltiocolina hidrolizados por hora por miligrama de proteína. A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976).

Acetilcolina  $\xrightarrow{\text{AChE}}$  Acetil + Tiocolina

Tiocolina + DTNB\*  $\longrightarrow$  Cor amarela

\*ácido ditiobinistrobenzóico

Figura 9: Reações envolvidas na dosagem da atividade da Acetilcolinesterase

#### 4.4 Análise Estatística

Todas as análises bioquímicas e avaliações comportamentais foram expressas como média  $\pm$  erro padrão da média dos dados analisados. Para a análise dos dados comportamentais foi empregado análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguidas do teste de Bonferroni, ou teste t-student pareado. Para as análises bioquímicas e moleculares, foi utilizado o teste t-student não pareado. Para todas as análises foi aplicado um nível de significância para  $p < 0,05$ . Foi utilizado o “software” GraphPad Prism® versão 5.0 para as análises estatísticas e confecção dos gráficos.

## 5. RESULTADOS EXPERIMENTO 1

### 5.1 Parâmetros Comportamentais

#### 5.1.1 Aprendizagem

As injeções de WIN-2 (2mg/kg) foram iniciadas uma semana antes do início dos testes comportamentais de aprendizagem e memória. Observamos que tanto o grupo veículo, quanto o grupo WIN-2 apresentaram uma diminuição no tempo de latência [ $F(7,168)=26,76;p<0,0001$ ] e na distância percorrida [ $F(7,168)=34,43;p<0,0001$ ] para encontrar a plataforma de escape ao longo das sessões (Figura 10), sugerindo que aprenderam a tarefa ao longo das sessões. A aprendizagem foi confirmada através do teste comprobatório, no qual os animais de ambos os grupos permaneceram tempo significativamente maior no quadrante alvo quando comparado ao quadrante oposto (Veículo  $p<0,0001$  e WIN-2  $p=0,0005$ ) (Figura 11). Porém, encontramos um aumento discreto na distância cumulativa percorrida na tentativa 4 do grupo WIN-2 ( $p=0,0263$ ) (Figura 12). Não observamos diferença significativa entre os grupos em nenhum outro dos parâmetros avaliados: latência, distância percorrida e distância cumulativa percorrida da tentativa 1 ( $p>0,05$ ; dados não mostrados).

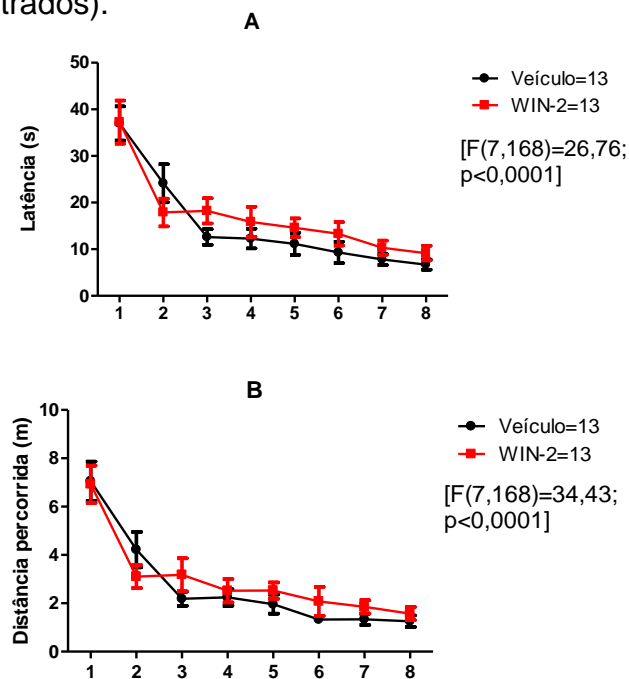


Figura 10: Resultado do desempenho dos animais durante a aprendizagem no experimento 1: Média  $\pm$  SEM da latência (painel A) e distância percorrida (painel B) para encontrar a plataforma de escape. Veículo, N=13; WIN-2, N=13.

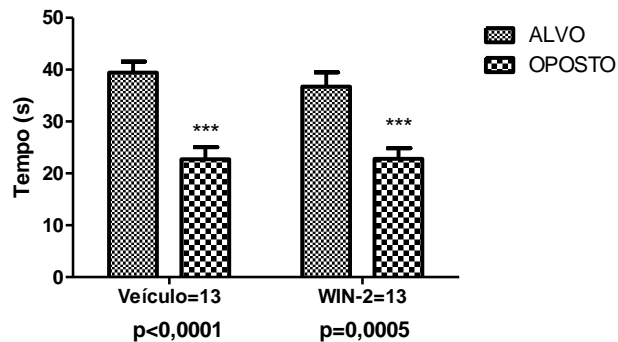


Figura 11: Resultado do teste comprobatório na aprendizagem no experimento 1: Média  $\pm$  SEM do tempo despendido nos quadrantes alvo e oposto. Teste t pareado Veículo, N=13; WIN-2, N=13

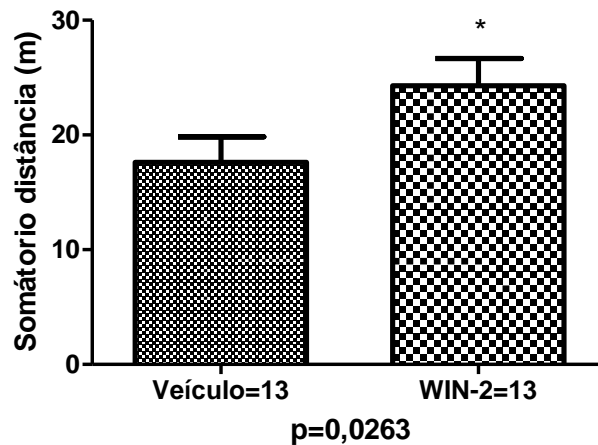


Figura 12: Resultados da distância cumulativa percorrida na tentativa 4 durante a aprendizagem no experimento 1: Média  $\pm$  SEM distância cumulativa. Teste t não pareado. Veículo, N=13; WIN-2, N=13.

### 5.1.2 Reaprendizagem

Após um intervalo de cinco dias, durante os quais os animais foram treinados de maneira semelhante ao teste comprobatório, os animais foram submetidos à reaprendizagem, a qual foi realizada de maneira idêntica à aprendizagem. Nesta fase observamos que animais tanto do grupo veículo [ $F(1,168)=69,23$ ;  $p < 0,0001$ ] quanto do grupo WIN-2 [ $F(1,168)=8,060$ ;  $p=0,0091$ ], apresentaram um desempenho significativamente superior quando comparado ao desempenho obtido na aprendizagem (Figura13, painel A e painel B, respectivamente). Assim, quando comparamos os desempenhos dos animais veículo e WIN-2, observamos que o desempenho do grupo WIN-2 é significativamente pior que o grupo veículo [ $F(1,168)=4,518$ ;  $p=0,044$ ] (figura13, painel C). Este prejuízo cognitivo provocado pelo tratamento com WIN-2 também foi verificado na distância cumulativa percorrida na tentativa 4 ( $p=0,046$ ) (Figura14), mas não na distância cumulativa percorrida na

tentativa 1 ( $p > 0,05$ ) (dado não mostrado). Dessa forma, esses dados indicam déficits no componente da memória de curta duração. Vale ressaltar que os animais do grupo WIN-2 não desaprenderam a tarefa, pois continuaram a permanecer mais tempo no quadrante alvo comparado ao quadrante oposto (veículo  $p < 0,0001$  e WIN-2  $p < 0,0001$ ) (Figura 15). Para avaliarmos se o pior desempenho na reaprendizagem, pelo grupo WIN-2, foi provocado por um prejuízo cognitivo e não motor foi avaliada a velocidade de nado, onde não foi encontrada diferença estatística entre os grupos (dados não mostrados).

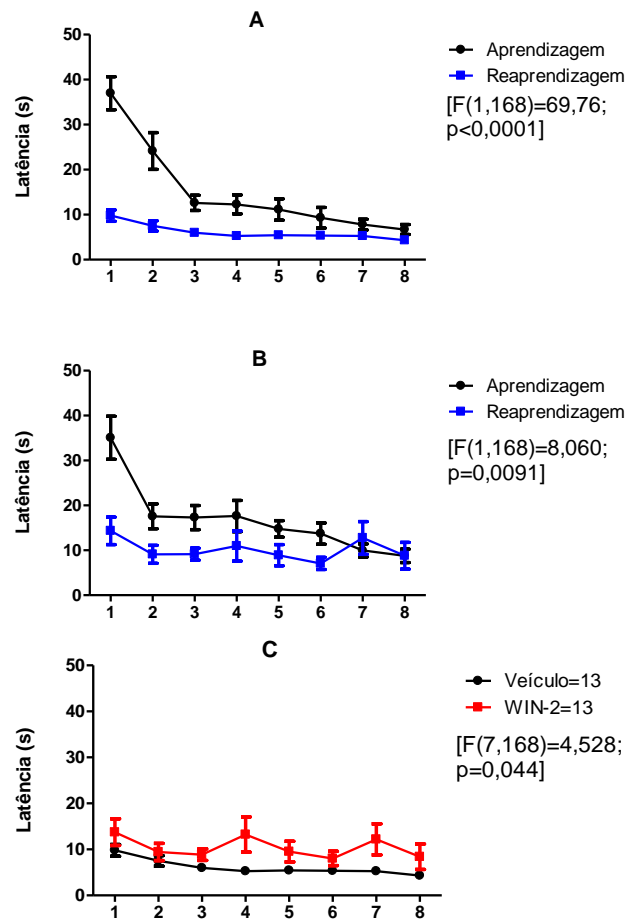


Figura 13: Resultado do desempenho dos animais da Reaprendizagem no experimento 1: Média  $\pm$  SEM da latência para encontrar a plataforma de escape. Painel A: Comparação do grupo veículo na aprendizagem e na reaprendizagem. Painel B: Comparação do grupo WIN-2 na aprendizagem e na reaprendizagem. Painel C: Comparação do grupo veículo e WIN-2 na reaprendizagem. Veículo, N=13 WIN-2, N=13.

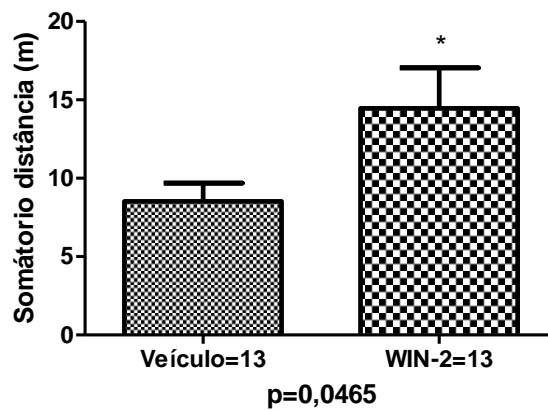


Figura 14: Resultados da distância cumulativa percorrida na tentativa 4 durante a reaprendizagem no experimento 1: Média  $\pm$  SEM distância cumulativa. Teste t não pareado. Veículo, N=13; WIN-2, N=13.

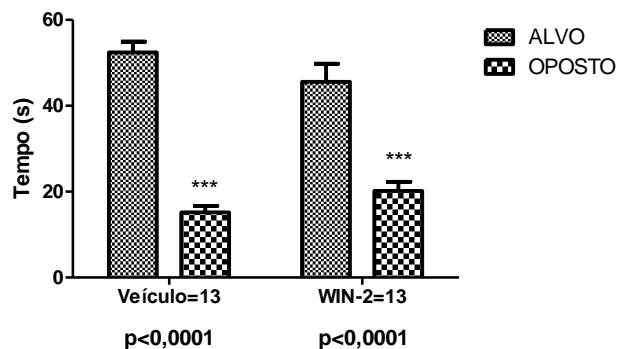


Figura 15: Resultado do teste comprobatório na reaprendizagem do experimento 1: Média  $\pm$  SEM do tempo despendido nos quadrantes alvo e oposto. Teste t pareado. Veículo, N=13; WIN-2, N=13

## 5.2 Parâmetros Bioquímicos

### 5.2.1 Avaliação da expressão gênica

Em busca de entendermos melhor a modulação do sistema colinérgico pelo sistema endocanabinoide, provocado pelo tratamento crônico com WIN-2, decidimos avaliar a expressão gênica de alguns componentes tanto do sistema colinérgico como do sistema endocanabinoide no hipocampo e córtex pré-frontal, por qPCR.

#### 5.2.1.1 Avaliação da expressão gênica no hipocampo

Em relação ao sistema colinérgico, avaliamos os receptores M1 e alfa 7. Além disso, avaliamos as enzimas de síntese e degradação da acetilcolina respectivamente: ChAT e AChE. Observamos uma discreta alteração na expressão gênica da enzima AChE, a qual se encontrou aproximadamente 15% diminuída nos animais tratados com WIN-2 ( $p=0,0112$ ) (Figura 16). Em relação ao sistema endocanabinoide, foi

avaliada a expressão gênica das enzimas de degradação de 2-AG e AEA (MGL e FAAH respectivamente) e do receptor CB1. A figura 17 mostra os resultados obtidos para todos os genes estudados em relação ao sistema endocanabinoide. Somente observamos um aumento na expressão gênica da enzima de síntese DAGL ( $p=0,0017$ ). Para os demais genes avaliados, não houve diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ).

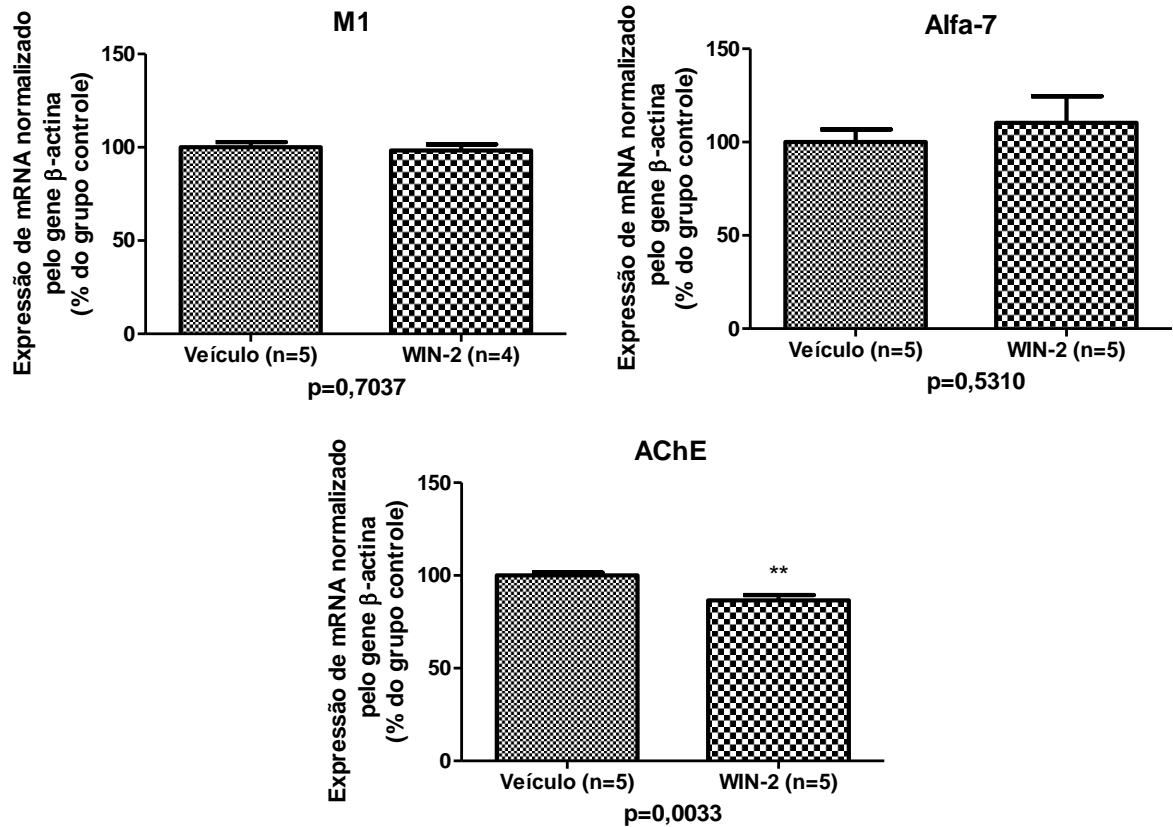
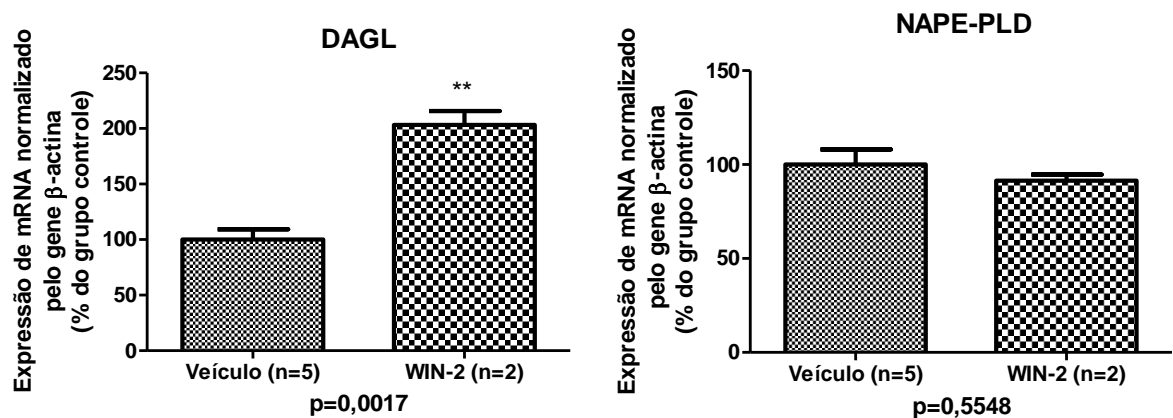


Figura 16: Resultado da expressão gênica do sistema colinérgico no hipocampo referente ao experimento 1. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=5; WIN-2, N=5.





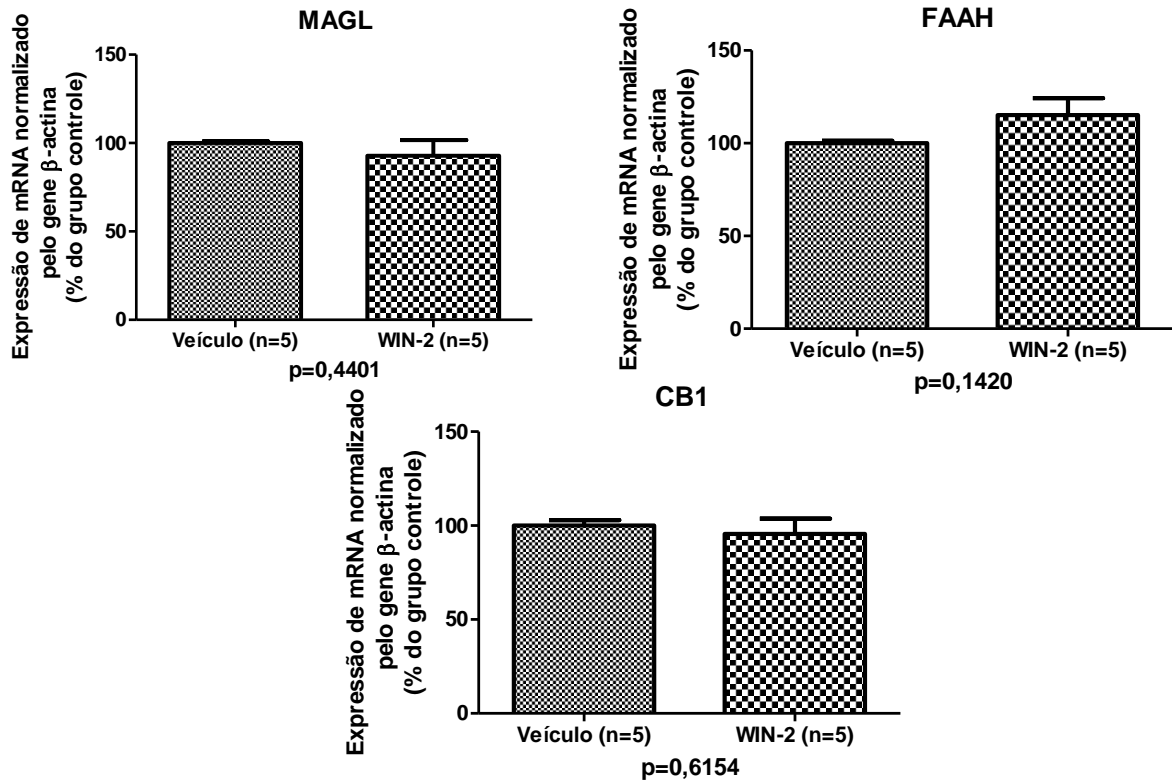


Figura 17: Resultado da expressão gênica do sistema endocanabinoide no hipocampo referente ao experimento 1. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=5; WIN-2, N=5.

### 5.2.1.2 Avaliação da expressão gênica no córtex pré-frontal

Da mesma maneira como realizado no hipocampo, avaliamos a expressão gênica dos mesmos componentes tanto do sistema colinérgico quanto do sistema endocanabinoide, no córtex pré-frontal, por qPCR. Observamos um aumento de aproximadamente 25% na expressão gênica do receptor muscarínico M1 em animais tratados com WIN-2 ( $p=0,0211$ ) (Figura 18). Em relação ao sistema endocanabinoide, conforme mostrado na Figura 19, verificou-se uma diminuição significativa na expressão gênica das enzimas de degradação MAGL ( $p=0,0370$ ), e FAAH ( $p=0,0414$ ). Em relação às enzimas de síntese, somente foi observado um aumento da DAGL ( $p=0,0009$ ). Por último, foi constatado um aumento na expressão gênica do receptor canabinoide CB1 ( $p=0,0256$ ).

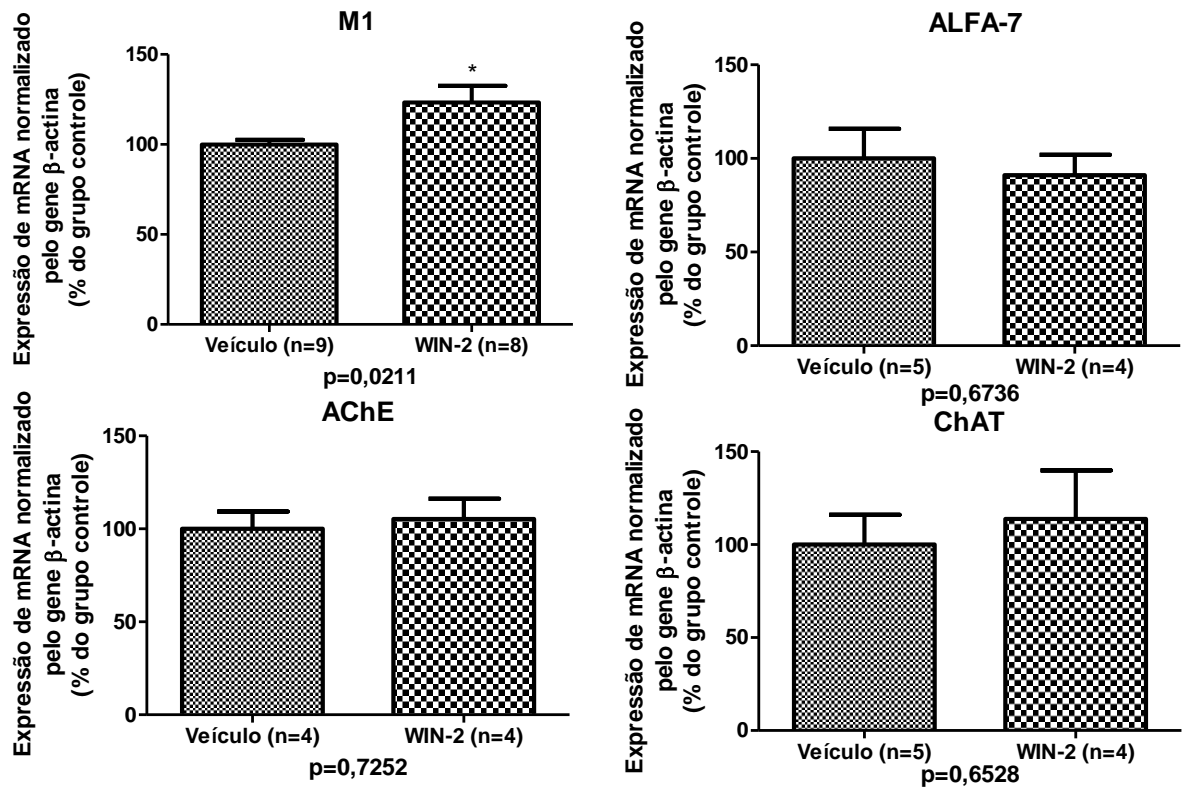
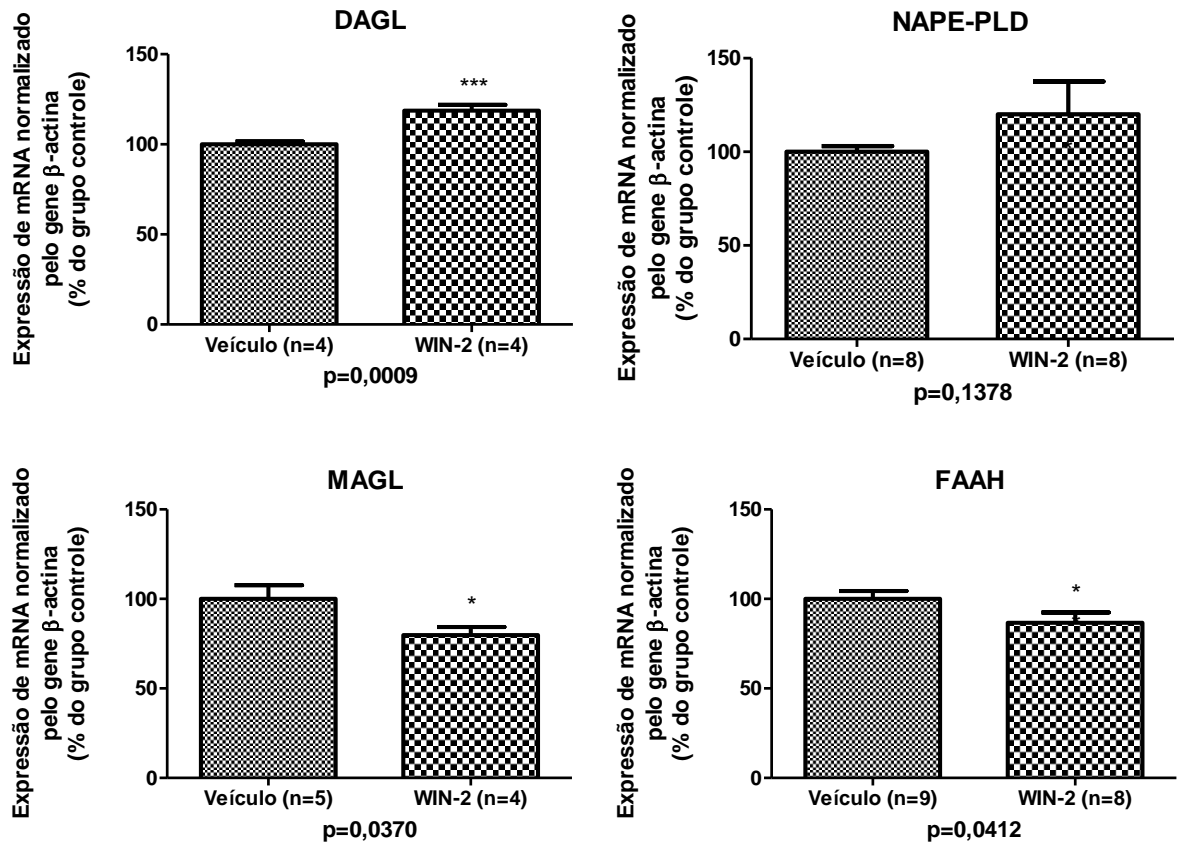


Figura 18: Resultado da expressão gênica do sistema colinérgico no córtex pré-frontal referente ao experimento 1. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(4-9); WIN-2, N=(4-8)



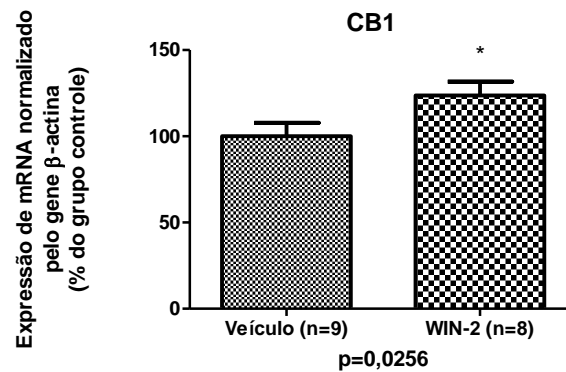


Figura 19 Resultado da expressão gênica do sistema endocanabinoide no córtex pré-frontal referente ao experimento 1. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste T não pareado. Veículo, N=(4-9); WIN-2, N=(4-8).

### 5.2.2 Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase

Como observamos discreta diminuição dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) da enzima AChE no hipocampo, decidimos avaliar se essa alteração na expressão gênica da enzima refletia na sua atividade nessa região e no córtex pré-frontal. Para isso, realizamos o ensaio de cinética enzimática descrito acima (item 4.3.2). Não observamos alteração significativa da atividade enzimática entre os grupos em nenhuma das duas regiões estudadas ( $p > 0,05$ ) (Figura 20). Esses dados mostram que, mesmo com o nível de RNAm diminuído no hipocampo, a atividade da enzima permanece inalterada.

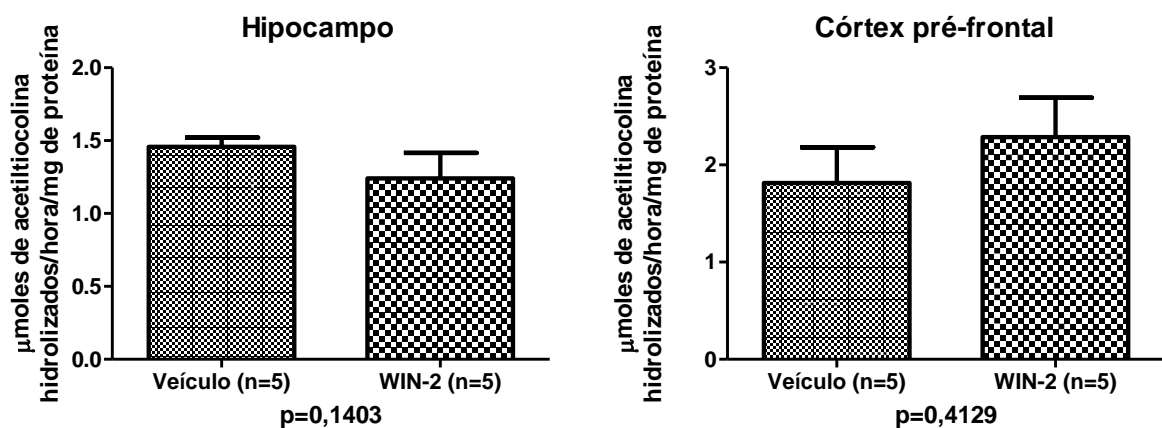


Figura 20: Resultado da atividade enzimática da acetilcolinesterase no hipocampo e córtex pré-frontal referente ao experimento 1: Média  $\pm$  SEM da atividade da acetilcolinesterase em  $\mu$ moles de acetiltiocolina hidrolizados /hora/mg de proteína. Teste t não pareado. Painel A: Hipocampo. Painel B: Córtex pré-frontal. Veículo, N=5; WIN-2, N=5

**EXPERIMENTO 2: EFEITO DO WIN-2 NA  
CONSOLIDAÇÃO DE TAREFAS  
APRENDIDAS E REAPRENDIDAS**

## **6. OBJETIVO EXPERIMENTO 2**

### **6.1. Geral**

Verificar o envolvimento do sistema endocanabinoide na modulação do sistema colinérgico na consolidação de tarefas aprendidas e reaprendidas, utilizando o agonista canabinoide WIN-2.

### **6.2. Específicos**

Em animais tratados cronicamente com o agonista canabinoide WIN-2:

- Estudar o efeito da reaprendizagem na memória, através da avaliação do desempenho em tarefas espaciais, aprendidas e reaprendidas;
- Investigar alterações na expressão dos receptores canabinoide CB1 e colinérgicos M1 e  $\alpha 7$  no córtex pré-frontal e hipocampo, para avaliar o processo de plasticidade neuronal;
- Investigar alterações na expressão gênica das enzimas de síntese e degradação, dos sistemas colinérgico e endocanabinoide, no córtex pré-frontal e hipocampo: ChAT, AChE, FAAH, MAGL, DAGL e NAPE-PLD;
- Investigar a liberação da acetilcolina no hipocampo;
- Investigar a quantidade de acetilcolina no córtex pré-frontal;
- Investigar a atividade enzimática da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal.

## **7. MATERIAL E MÉTODOS EXPERIMENTO 2**

### **7.1 Animais e droga**

#### **7.1.1 Animais**

Foram usados camundongos machos da linhagem SWISS (n=70) de dois meses de idade (38-50g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os procedimentos aplicados e condições de manutenção dos animais foram aprovados pelo CEUA/UFES (protocolo 010/2010) e ocorreram conforme descrito no item 4.1.2.

#### **7.1.2 Administração da droga**

As condições de preparo e armazenamento do WIN-2, bem como a dose e via de administração utilizada foi conforme o descrito no item 4.1.2. Entretanto, as administrações ocorreram diariamente, logo após o teste cognitivo em MWM. Os animais foram divididos em dois grupos veículo e WIN-2. Adicionalmente, como controle, animais não treinados foram divididos em grupo veículo e WIN-2 apenas para que os parâmetros moleculares fossem realizados. A realização dos ensaios moleculares em animais não treinados teve a finalidade de verificar se as alterações eventualmente observadas poderiam estar relacionadas ao treinamento no MWM, uma vez que, mesmo sendo uma tarefa aversiva, esse teste envolve exercício físico e atividades cognitivas e pode levar a alterações nos parâmetros avaliados. Esses animais foram administrados com veículo ou WIN-2 (2mg/kg), uma vez ao dia, durante 22 dias, entretanto este grupo foi realizado posteriormente aos animais treinados e de forma independente aos animais treinados.

### **7.2 Testes cognitivos**

#### **7.2.1 Equipamento**

O aparato utilizado para o teste cognitivo, o MWM, corresponde àquele descrito no item 4.2.1.

## 7.2.2 Teste de aprendizagem e memória

O teste de aprendizado e memória foi realizado conforme descrito no item 4.2.2, contudo a administração do WIN-2 ocorreu desde o primeiro dia de teste e continuou até o dia 22. O delineamento experimental está esquematizado na Figura 21.



Figura 21: Delineamento experimental da consolidação

## 7.3 Estudos bioquímicos

### 7.3.1 Dissecção

A dissecção foi realizada conforme o descrito no item 4.3.1.

### 7.3.2 Avaliação da expressão gênica de componentes do sistema colinérgico e endocanabinoide

A avaliação da expressão gênica do sistema colinérgico e endocanabinoide ocorreram como descritas no item 4.3.2.

### 7.3.3 determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase:

A determinação da atividade da enzima AChE foi executada conforme o descrito no item 4.3.3.

### 7.3.2 Dosagem do conteúdo de acetilcolina

A dosagem de acetilcolina, no córtex pré-frontal, foi realizada de acordo com o método descrito por Israel e Lesbats (1980). Primeiramente, o córtex pré-frontal foi dissecado e a acetilcolina contida no tecido foi extraída com ácido tricloroacético (TCA) 5%. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000xg por 10 minutos a 4°C, e

os sobrenadantes congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. A determinação da acetilcolina foi realizada essencialmente como descrito por Prado et al.(1990). Em resumo, o TCA da amostra foi removido com 5 volumes de uma solução de éter saturada com água destilada. As amostras foram agitadas no vórtex durante 1 minuto e, após a separação das fases, a fase etérea foi descartada; este processo foi repetido cinco vezes. O éter residual foi evaporado em Speedvac (Eppendorf). Posteriormente, adicionou-se  $10\mu\text{L}$  de metaperiodato 0,5% para cada  $100\mu\text{L}$  de amostra. A quantificação da acetilcolina foi realizada por quimioluminescência, utilizando luminômetro GloMax® 20/20 (Promega). Utilizaram-se  $30\mu\text{L}$  da amostra, os quais foram incubados em uma solução contendo  $7,5\mu\text{L}$  de colina oxidase ( $200\text{u/mL}$ ),  $11\mu\text{L}$  de microperoxidase ( $1\text{mg/mL}$ ),  $20\mu\text{L}$  luminol  $1\text{mM}$  e  $0,94\text{mL}$  tampão glicina ( $67\text{mM}$ ,  $\text{pH } 8,6$ ). Após estabilização do aparelho, adicionou-se  $20\mu\text{L}$  da enzima AChE ( $80\text{u/mL}$ ), o pico de luz obtido foi medido e corresponde à quantidade de acetilcolina presente na amostra (Figura 22). Após o retorno da linha de base, adicionaram-se quantidades conhecidas do padrão de acetilcolina, com a finalidade de fornecer uma curva padrão e, assim, determinar a quantidade de acetilcolina presente na amostra. As dosagens foram feitas em duplicata e os valores foram corrigidos pelo conteúdo protéico. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976).

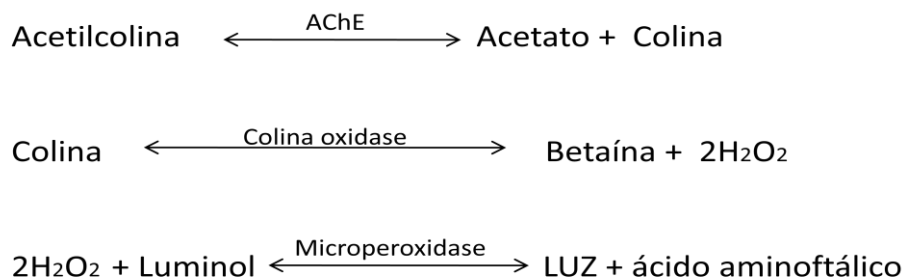


Figura 22: Reações enzimáticas envolvidas na dosagem de acetilcolina.

### 7.3.3 Dosagem da liberação de acetilcolina

A dosagem da liberação de acetilcolina no hipocampo foi realizada de acordo com o método descrito por Israel e Lesbats (1980). Os hipocampos foram fatiados (TissueChopper/McIlwain™) a  $400\mu\text{m}$  de espessura e pesados. Tecido hipocampal ( $30\text{ mg}$ ) foi transferido para um sistema de redes (Figura 23), que foi imediatamente introduzido em tubo de incubação, contendo  $1\text{mL}$  de meio normal ( $136,0\text{ mM}$  de  $\text{NaCl}$ ,  $2,7\text{ mM}$  de  $\text{KCl}$ ,  $1,35\text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ ,  $12,0\text{ mM}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $0,36\text{ mM}$  de



NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,49 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,5 mM de glicose e 0,01 mM de eserina) e pré-incubado por 5 minutos a 37°C, sob agitação. Após a pré-incubação, o sistema de rede, contendo as amostras, foi transferido para tubos de incubação, contendo 1 mL de meio normal ou despolarizante (33mM de KCl), durante 30 minutos a 37°C, sob agitação. Para cada amostra, foram necessários aproximadamente 60 mg de tecido, por isso se fez inevitável a utilização de *pool* de tecidos provenientes de dois animais, cada. Após 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida com 100 µL de TCA 50% p/v. As amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram congelados a -80°C até a dosagem da quantidade do neurotransmissor liberado. Os ensaios foram realizados até, no máximo, um mês após a eutanásia dos animais.

O ensaio quimiluminescente para dosagem da liberação de acetilcolina foi processada de acordo com o método descrito por Prado et al.(1990), de forma semelhante ao descrito para a dosagem de acetilcolina, porém após o passo de remoção de TCA com éter, foi realizada uma etapa de remoção de eserina com benzeno, que foi, juntamente com o éter, subsequentemente evaporado no Speedvac (Eppendorf). Posteriormente, adicionou-se 10µL de metaperiodato 0,5% para cada 100µL de amostra. Para a quantificação da liberação da acetilcolina foram utilizados 50µL da amostra, sendo executada por quimioluminescência, utilizando luminômetroGloMax® 20/20 (promega), de modo idêntico à quantificação do conteúdo da acetilcolina (vide acima).



Figura 23: Sistema de rede

## **7.4 Análise Estatística**

A análise estatística foi executada conforme o descrito no item 4.4.

## 8. RESULTADOS EXPERIMENTO 2

### 8.1 Parâmetros Comportamentais

#### 8.1.1 Aprendizagem

As injeções de WIN-2 (2mg/kg) foram aplicadas diariamente, logo após o término do teste comportamental no MWM. Observamos que tanto o grupo veículo, quanto o grupo WIN-2 apresentaram uma diminuição no tempo de latência [ $F(7,301)=33,04$ ;  $p<0,0001$ ] e na distância percorridas [ $F(7,301)=46,41$ ;  $p<0,0001$ ] para encontrar a plataforma de escape ao longo das sessões (Figura 24), sugerindo que aprenderam a tarefa ao longo das sessões. A aprendizagem foi confirmada através do teste comprobatório, no qual os animais de ambos os grupos permaneceram por um período significativamente maior no quadrante alvo quando comparado ao quadrante oposto (Veículo  $p <0,0001$  e WIN-2  $p=0,0138$ ) (Figura25). Não observamos diferença significativa entre os grupos em nenhum outro dos parâmetros avaliados: latência, distância percorrida e distâncias cumulativas ( $p>0,05$ ; dados não mostrados).

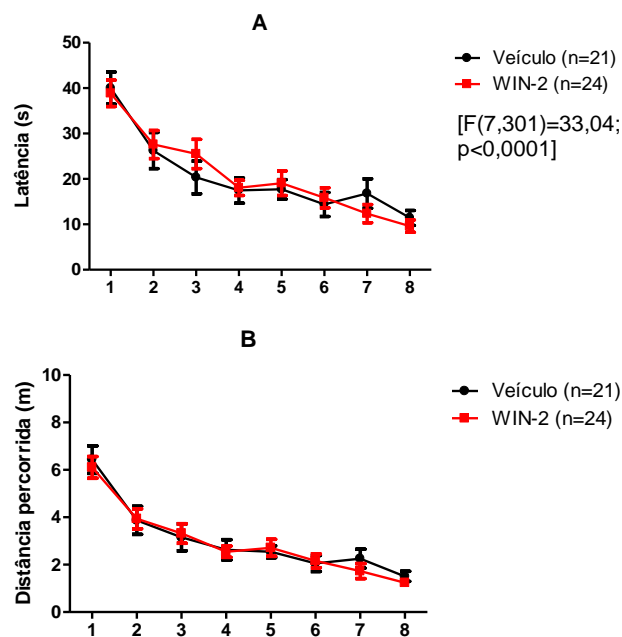


Figura 24: Resultado do desempenho dos animais durante a aprendizagem no experimento 2: Média  $\pm$  SEM da latência (painel A) e a distância percorrida (painel B) para encontrar a plataforma de escape pelos dois grupos. Veículo, N=21; WIN-2, N=24.

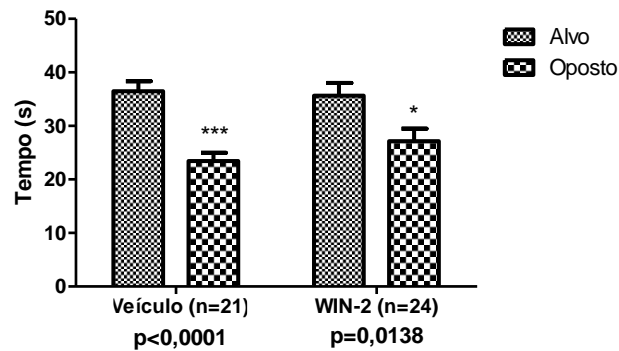
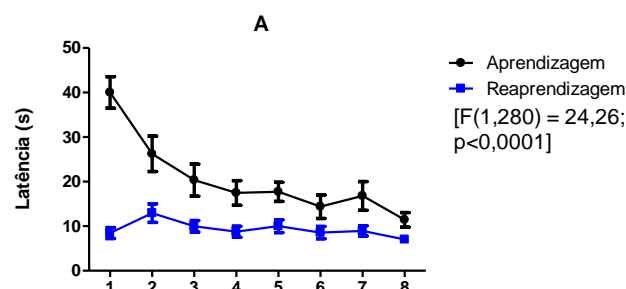


Figura 25: Resultado do teste comprobatório da aprendizagem no experimento 2: Média  $\pm$  SEM do tempo despendido nos quadrantes alvo e oposto. Teste t pareado. Veículo, N=21; WIN-2, N=24

### 8.1.2 Reaprendizagem

Após um intervalo de cinco dias, durante os quais os animais foram treinados de maneira semelhante ao teste comprobatório, os animais foram submetidos à reaprendizagem, a qual foi realizada de maneira idêntica à aprendizagem. Nesta fase observamos que animais tanto do grupo veículo [F(1,280)=24,26; p<0,0001] quanto do grupo WIN-2 [F(1,322)=56,57; p<0,0001], apresentaram um desempenho significativamente superior quando comparado ao desempenho obtido na aprendizagem (Figura 26, painel A e painel B respectivamente). Indicando que, uma nova oportunidade de aprendizagem melhora o desempenho cognitivo. Assim, quando comparamos os desempenhos dos animais veículo e WIN-2, não observamos diferenças entre os grupos [F(1,301)=0,1222; p=0,7184] (figura 26, painel C), indicando que o tratamento crônico com WIN-2 na dose de 2 mg/kg não afeta a consolidação da memória de referência, no MWM. Isto foi verificado no teste comprobatório, no qual ambos os grupos permaneceram mais tempo no quadrante alvo quando comparado ao quadrante oposto (veículo p<0,0001 e WIN-2 p<0,0001) (figura 27). Não foi verificada nenhuma diferença estatísticas entre os grupos, para os outros parâmetros avaliados: distância percorrida, somatório das distâncias cumulativas, velocidade de nado (p>0,05; dados não mostrados).



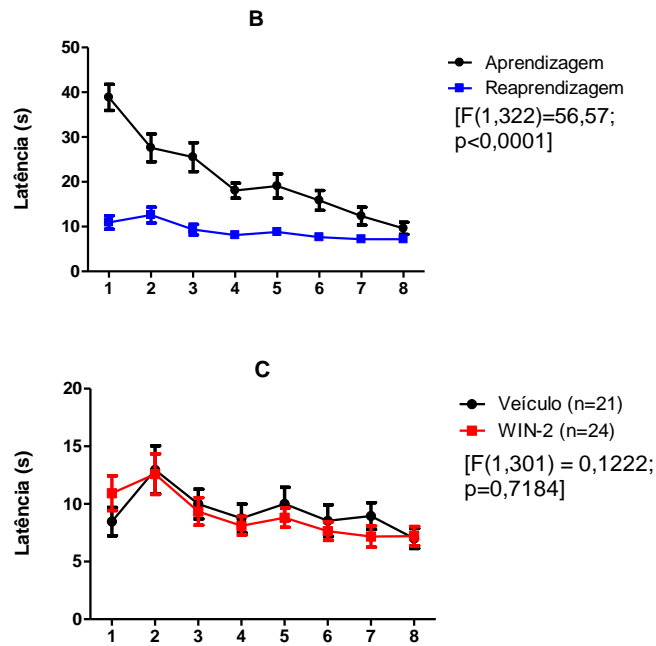


Figura 26: Resultado do desempenho dos animais na tarefa de Reaprendizagem no experimento 2: Média  $\pm$  SEM da latência para encontrar a plataforma de escape. Painel A: Comparação do grupo veículo na aprendizagem e na reaprendizagem. Painel B: Comparação do grupo WIN-2 na aprendizagem e na reaprendizagem. Painel C: Comparação do grupo veículo e grupo WIN-2 na reaprendizagem. Veículo, N=21 WIN-2, N=24.

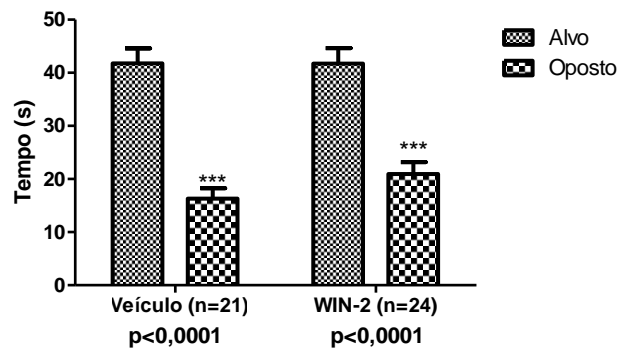


Figura 27: Resultado do teste comprobatório na reaprendizagem do experimento 2: Média  $\pm$  SEM do tempo despendido nos quadrantes alvo e oposto. Teste t pareado. Veículo, N=21; WIN-2, N=24.

## 8.2 Parâmetros Bioquímicos

### 8.2.1 Avaliação da expressão gênica

Em busca de compreender a modulação do sistema colinérgico pelo sistema endocanabinoide, na consolidação de uma tarefa espacial, avaliamos a expressão gênica tanto em animais treinados no MWM, quanto de animais não treinados

(Controle veículo e controle WIN-2), os quais foram tratados cronicamente com WIN-2 ou veículo (durante 22 dias). Para isso, como mencionado anteriormente analisamos a expressão gênica de alguns componentes tanto do sistema colinérgico como do sistema endocanabinoide no hipocampo e no córtex pré-frontal, por q PCR.

### 8.2.1.1 Avaliação da expressão gênica no hipocampo

No hipocampo de animais treinados no MWM, foi constatado, em relação ao sistema colinérgico (Figura 28), uma diminuição de 40% na expressão gênica da AChE ( $p=0,0179$ ), enquanto os outros genes testados permaneceram inalterados ( $p>0,05$ ). Em relação ao sistema endocanabinoide (Figura 29), tanto as enzimas de síntese, NAPE-PLD e DAGL, apresentaram uma diminuição na expressão gênica ( $p=0,0293$ ;  $p=0,0136$ , respectivamente), como o receptor CB1 ( $p=0,0367$ ). Em relação às enzimas de degradação, houve uma diminuição estatística na expressão gênica de MAGL ( $p=0,0409$ ).

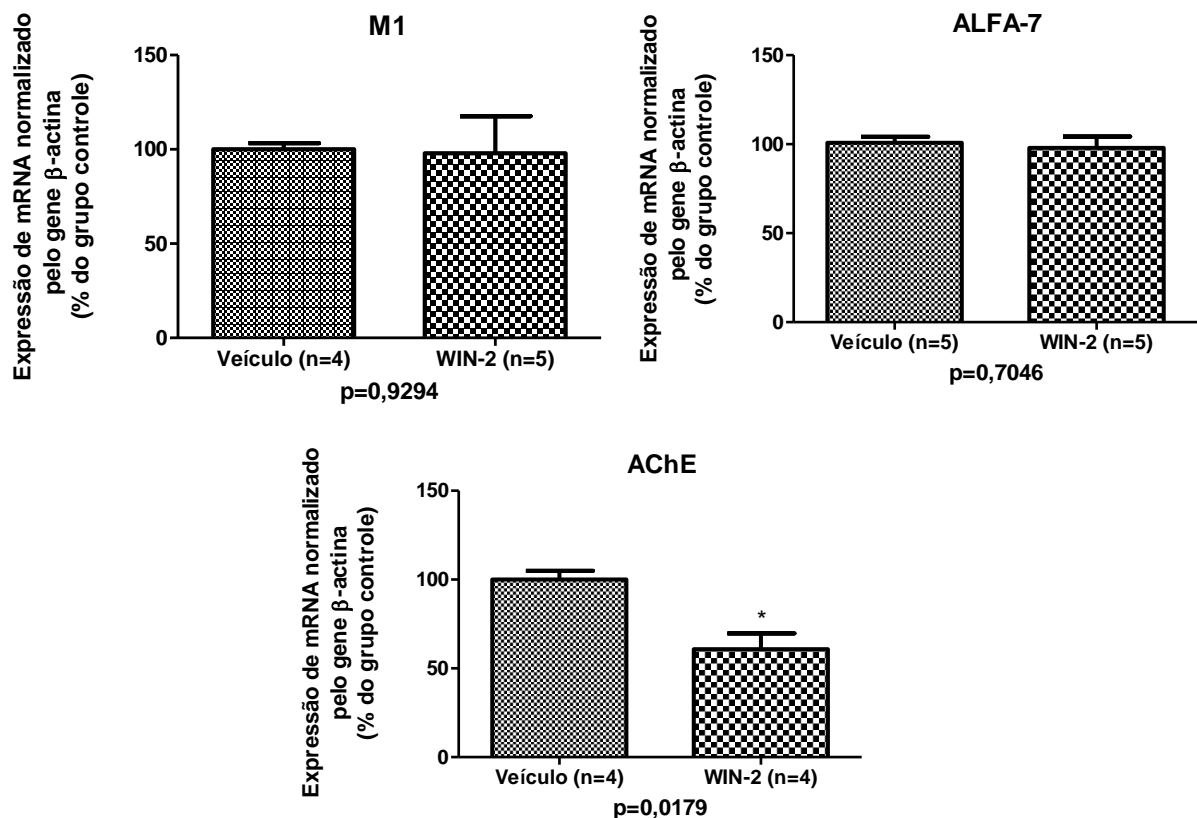


Figura 28: Resultado da expressão gênica do sistema colinérgico no hipocampo de animais treinados no MWM referente ao experimento 2. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(4-5); WIN-2, N=(4-5).

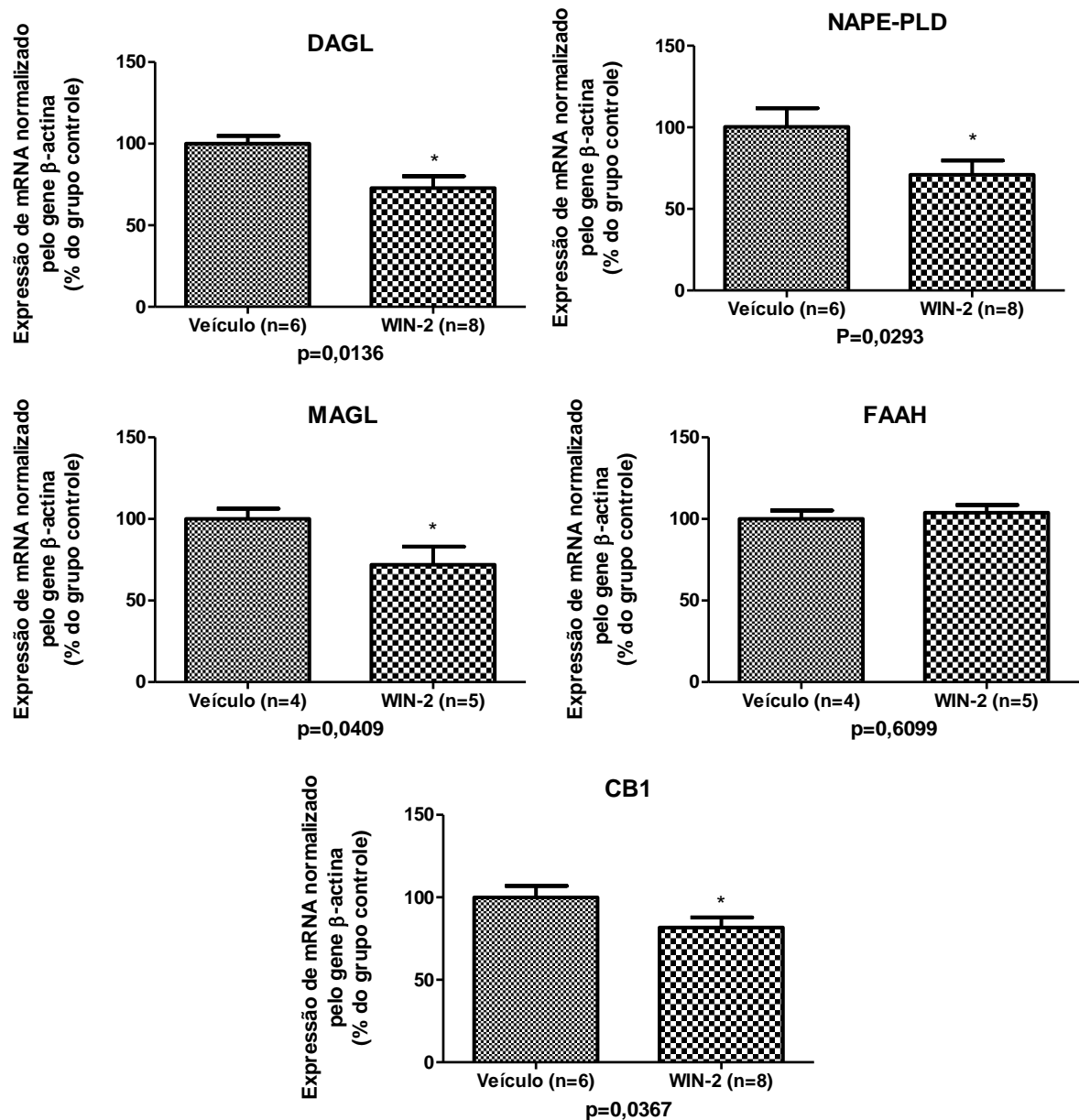


Figura 29: Resultado da expressão gênica do sistema endocanabinoide no hipocampo de animais treinados no MWM referente ao experimento 2. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(4-6); WIN-2, N=(5-8).

Por outro lado, ao avaliar a expressão gênica de componentes do sistema colinérgico de animais não treinados no MWM, foi verificada uma diminuição na expressão gênica do receptor nicotínico alfa-7 ( $p=0,0085$ ) (Figura 30). Em relação aos componentes do sistema endocanabinoide, cujos resultados são apresentados na Figura 31, foi observado, igualmente aos animais treinados, uma diminuição da expressão gênica das enzimas de síntese NAPE-PLD e DAGL ( $p=0,0480$ ;  $p=0,0085$ , respectivamente), porém não foi verificada uma diminuição estatisticamente significativa na expressão do receptor canabinoide CB1 ( $p=0,1377$ ). Com relação às

enzimas de degradação, ao contrário do observado nos animais treinado, houve uma diminuição da expressão gênica para FAAH ( $p=0,0065$ ).

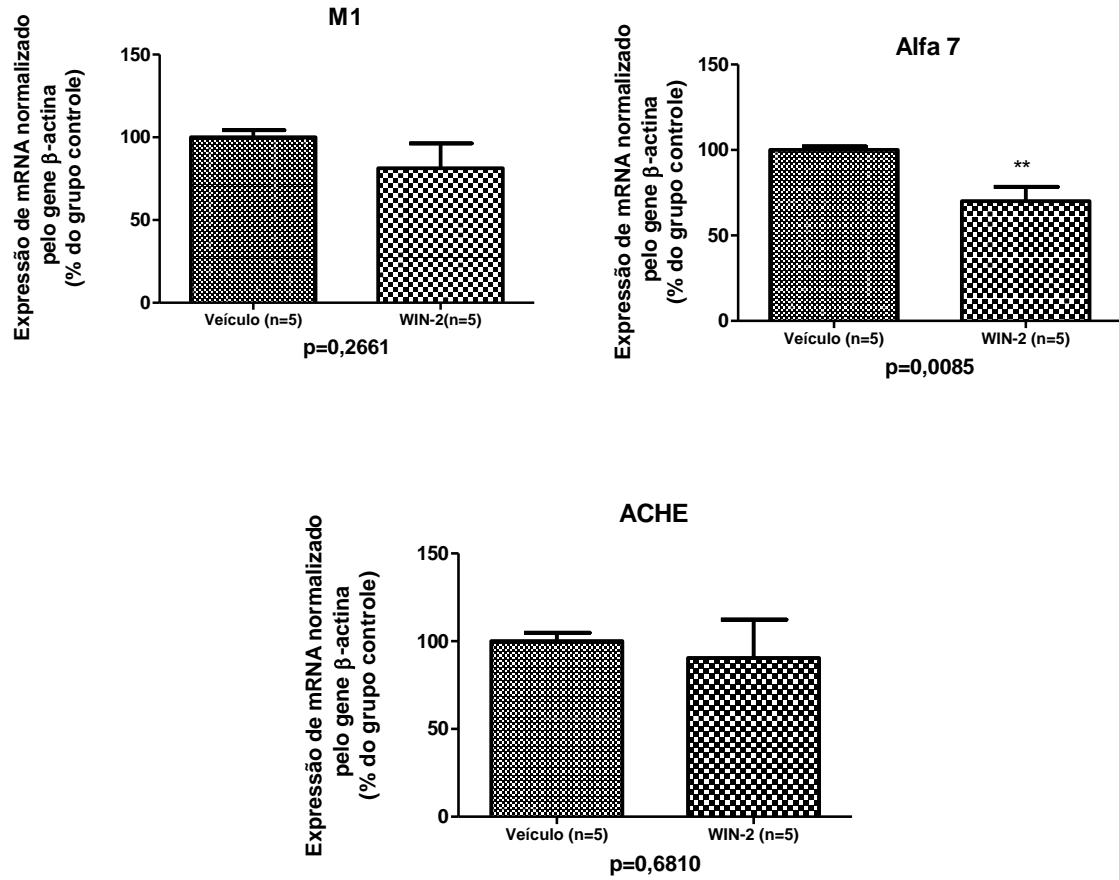
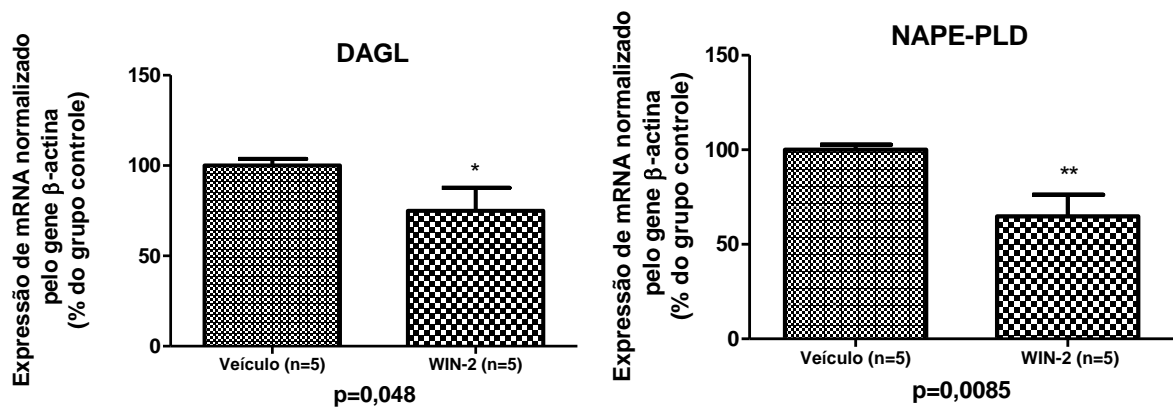


Figura 30 Resultado da expressão gênica do sistema colinérgico no hipocampo de animais não treinados no MWM referente ao experimento 2. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(5); WIN-2, N=(5).





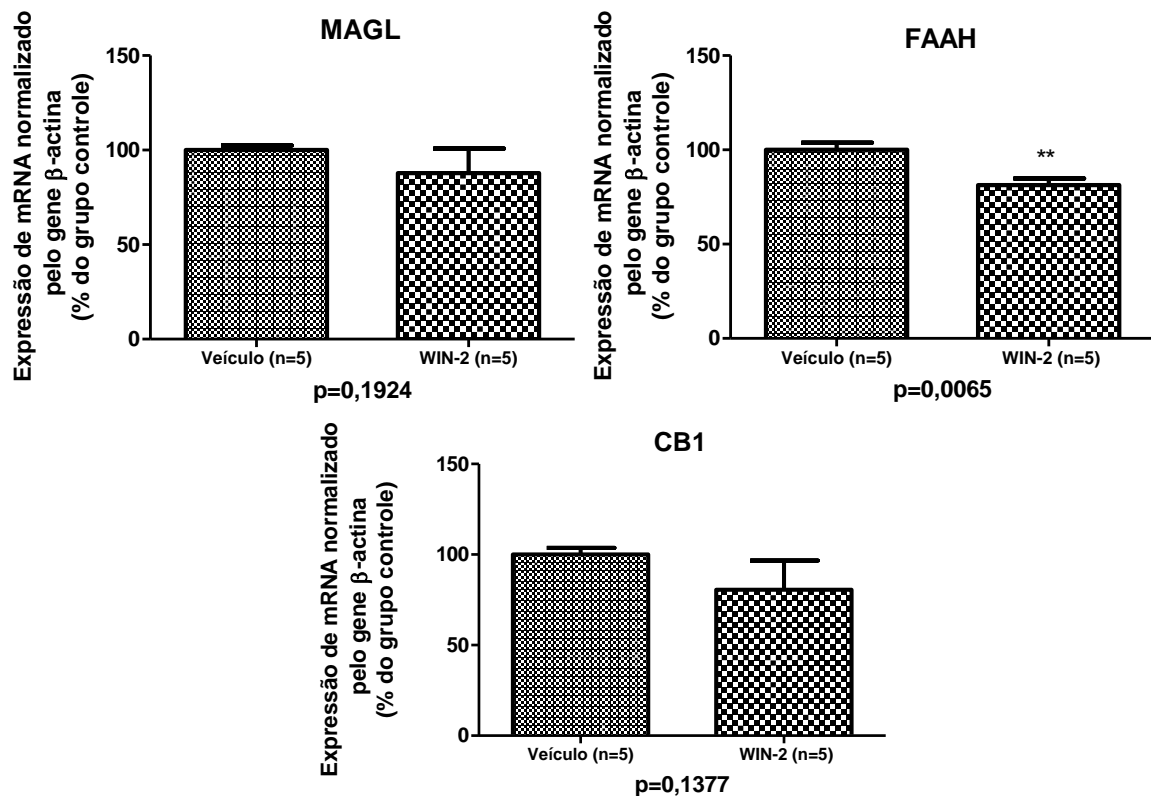


Figura 31: Resultado da expressão gênica do sistema endocanabinoide no hipocampo de animais não treinados no MWM referente ao experimento 2. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(5); WIN-2, N=(5).

### 8.2.1.1 Avaliação da expressão gênica no córtex pré-frontal

Da mesma maneira, avaliamos a expressão gênica dos mesmos componentes tanto do sistema colinérgico como do sistema endocanabinoide no córtex pré-frontal, por qPCR. No sistema colinérgico, conforme mostrado na Figura 32, foi verificado um aumento significativo na expressão da enzima de síntese ChAT ( $p=0,0476$ ), enquanto os demais componentes do sistema colinérgico avaliada permaneceram inalterados ( $p>0,05$ ). Em relação com o sistema endocanabinoide (Figura 33), foi constatado um aumento da expressão gênica da enzima de síntese NAPE-PLD ( $p=0,0326$ ), da enzima de degradação MAGL ( $p=0,0222$ ) e do receptor CB1 ( $p=0,0367$ ). Por outro lado, tanto a enzima de síntese DAGL e degradação FAAH, não apresentaram nenhuma variação na expressão quando comparado com o grupo veículo ( $p>0,05$ ).

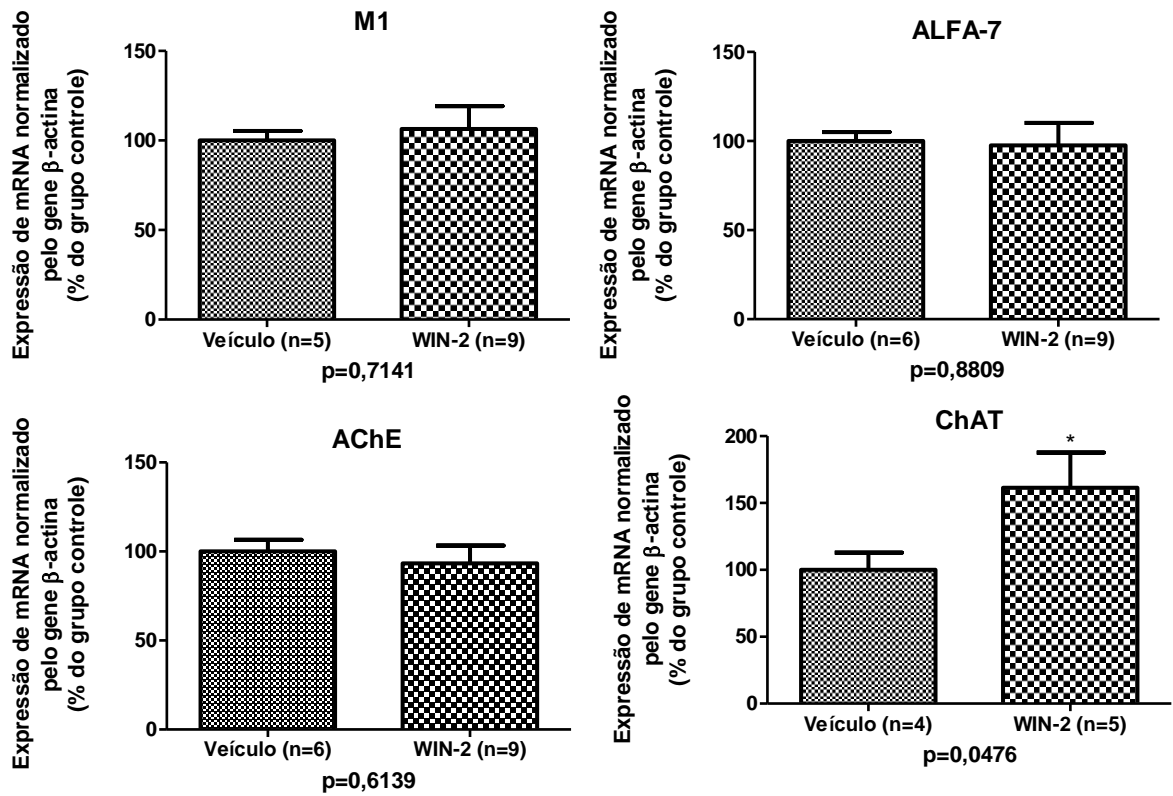
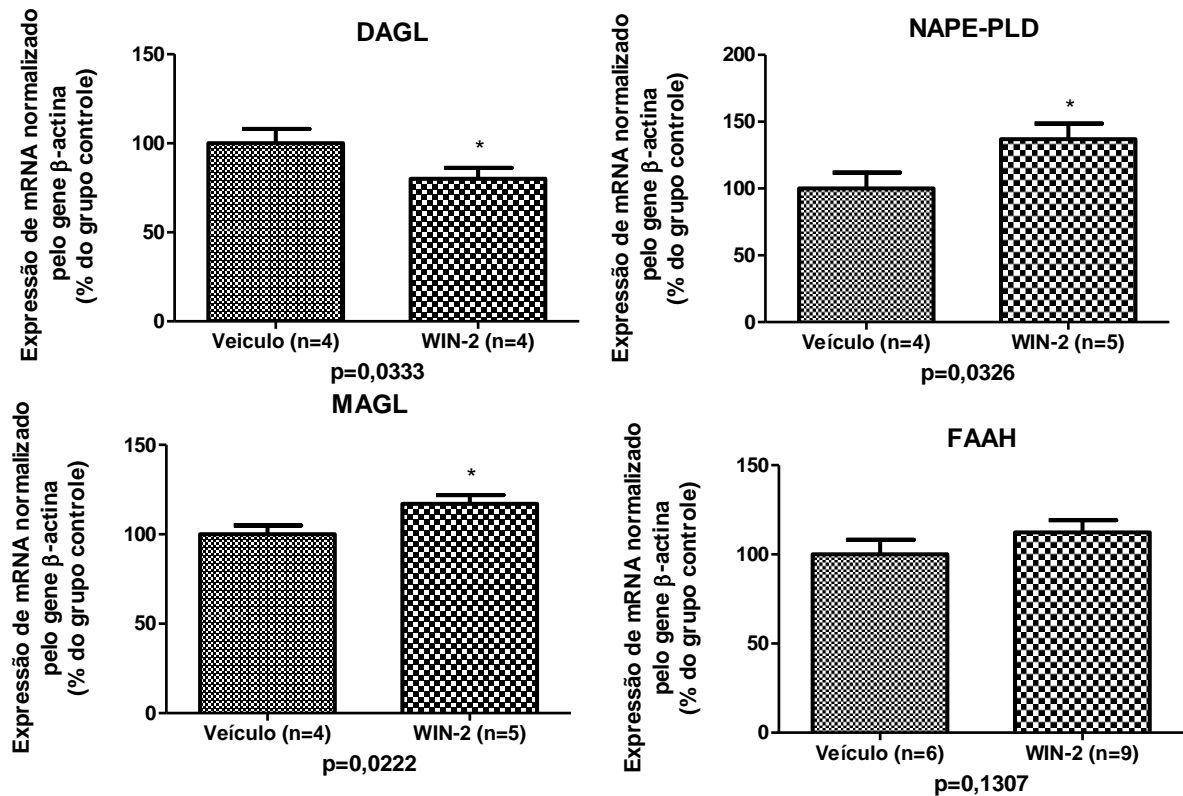


Figura 32: Resultado da expressão gênica do sistema colinérgico no córtex pré-frontal de animais treinados no MWM referente ao experimento 2. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(5-6); WIN-2, N=(5-9).



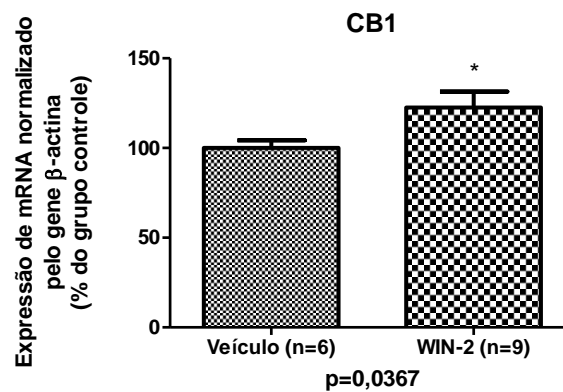
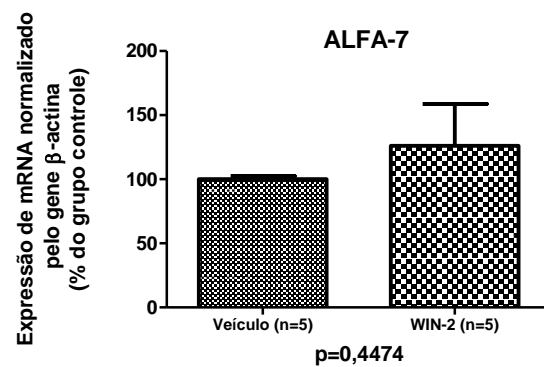
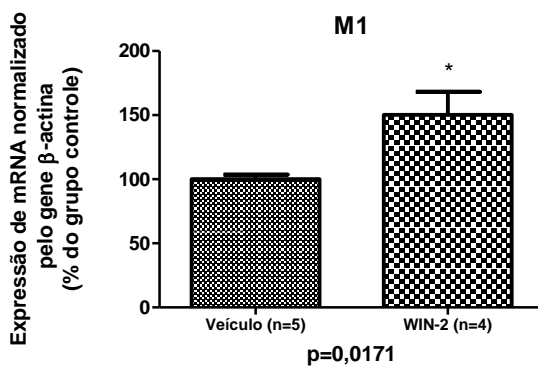


Figura 33: Resultado da expressão gênica do sistema endocanabinoide no córtex pré frontal de animais treinados no MWM referente ao experimento 2. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(4-6); WIN-2, N=(4-9).

Ainda, quando avaliamos a expressão gênica dos animais não treinados, foi possível constatar que, no sistema colinérgico, ao passo que houve um incremento da expressão gênica do receptor M1 ( $p=0,0171$ ), não observou-se um aumento significativo da expressão gênica da enzima de síntese ChAT ( $p=0,0810$ ), os outros parâmetros permaneceram inalterados ( $p>0,05$ ), do mesmo modo que nos animais treinados (Figura 34). No entanto, no sistema endocanabinoide, foi constatado um aumento da expressão gênica tanto das enzimas de síntese DAGL e NAPE-PLD ( $p=0,048$ ;  $p=0,0069$ , respectivamente), quanto do receptor CB1 ( $p=0,0046$ ). Porém as enzimas de degradação permaneceram inalteradas quando comparadas ao controle veículo,  $p>0,05$  (Figura 35).



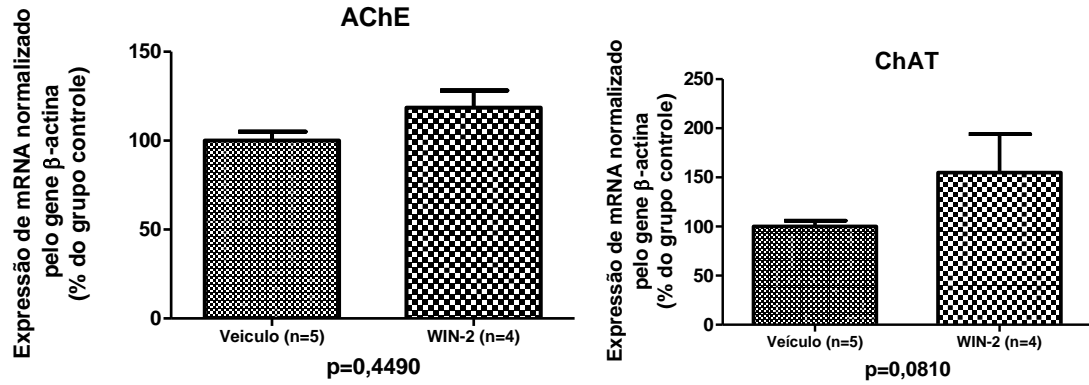


Figura 34: Resultado da expressão gênica do sistema colinérgico no córtex pré-frontal de animais não treinados no MWM referente ao experimento 2. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao grupo veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(5); WIN-2, N=(4-5).

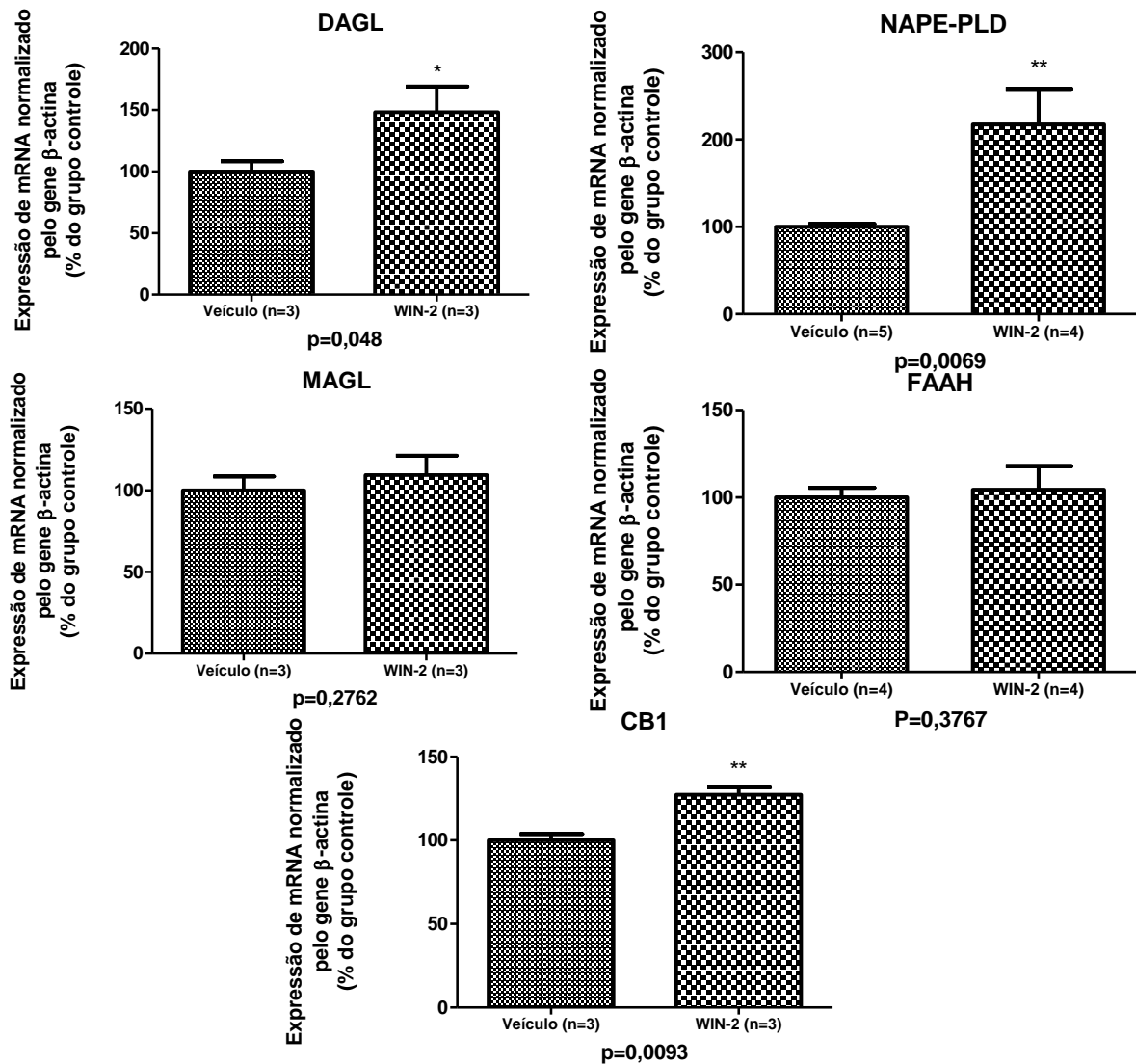


Figura 35: Expressão relativa de mRNA de genes do sistema endocanabinoide no córtex pré-frontal de animais não treinados no MWM do experimento 2. Média  $\pm$  SEM da porcentagem de expressão do grupo WIN-2 em relação ao veículo. Teste t não pareado. Veículo, N=(3-5); WIN-2, N=(3-5).

### 8.2.2 Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase

Como observamos discreta diminuição dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) da enzima AChE no hipocampo, decidimos avaliar se esta alteração na expressão gênica encontra-se refletida na sua atividade nesta região (Figura 36) e no córtex pré-frontal (Figura 37). Em relação ao hipocampo observamos uma diminuição na atividade enzimática da AChE tanto em animais treinados, quanto nos animais não treinados,  $p < 0,05$ . Por outro lado, no córtex pré-frontal não foram verificadas alterações na atividade enzimática, quando comparado o grupo WIN-2 com seu respectivo grupo veículo,  $p > 0,05$ . Esses dados mostram que existe uma correlação no nível de RNAm diminuído no hipocampo com a atividade da enzimática

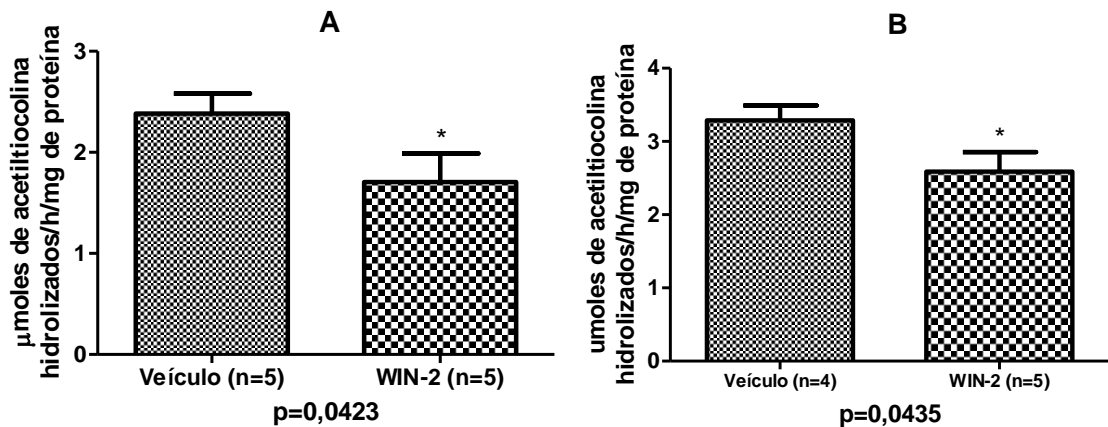


Figura 36: Resultado da atividade enzimática da acetilcolinesterase no hipocampo referente ao experimento 2: Média  $\pm$  SEM da atividade da acetilcolinesterase em  $\mu$ moles de acetiltiocolina hidrolizados /h/mg de proteína. Teste t não pareado. Painel A: Animais treinados da consolidação. Veículo, N=5; WIN-2, N=5. Painel B: Animais não treinados da consolidação: Veículo, N=4; WIN-2, N=5

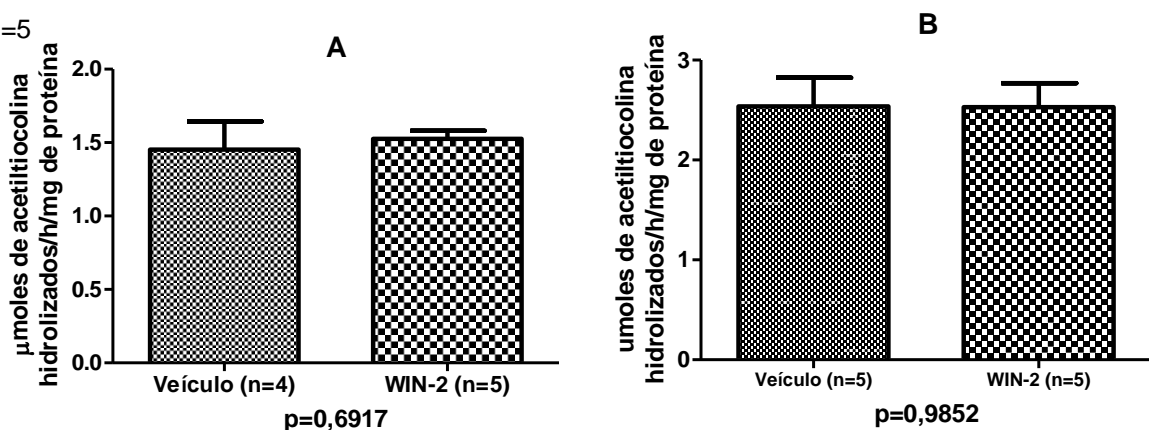


Figura 37: Resultado da atividade enzimática da acetilcolinesterase no córtex pré-frontal referente ao experimento 2: Média  $\pm$  SEM da atividade da acetilcolinesterase em  $\mu$ moles de acetiltiocolina hidrolizados /h/mg de proteína. Teste t não pareado. Painel A: Animais treinados da consolidação,

Veículo, N=4; WIN-2, N=5. Painel B: Animais não treinados da consolidação: Veículo, N=5; WIN-2, N=5

### 8.2.3 Dosagem do conteúdo de acetilcolina

Com a finalidade de verificar se o aumento da expressão gênica da ChAT, enzima de síntese da acetilcolina, está correlacionada com a quantidade de acetilcolina no tecido, avaliamos o conteúdo da acetilcolina no córtex pré-frontal (Figura 38). Não houve alteração no conteúdo de acetilcolina quando comparado o grupo veículo com o grupo WIN-2 ( $p > 0,05$ ), sugerindo que não existe uma correlação entre a expressão gênica da enzima e o conteúdo da acetilcolina.

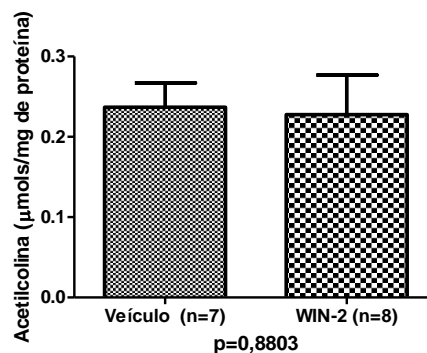


Figura 38: Resultado da dosagem do conteúdo de ACh no córtex pré-frontal referente ao experimento 2: Média  $\pm$  SEM do conteúdo tecidual de acetilcolina no córtex pré-frontal em  $\mu$ moles/mg de proteína. Teste t não pareado. Veículo, N=(7); WIN-2, N=(8).

### 8.2.4 Dosagem da liberação de acetilcolina

Com a intenção de averiguar se o uso de canabinoides afeta a liberação de acetilcolina no hipocampo, quantificamos a mesma por luminometria. Em condição normal (não estimulada), houve uma forte tendência à diminuição na liberação de acetilcolina em animais tratados cronicamente com WIN-2 ( $p = 0,0656$ ) (Figura 39, painel A). Porém, em condição estimulada, não houve diferença entre os grupos,  $p > 0,05$  (Figura 39, painel B).

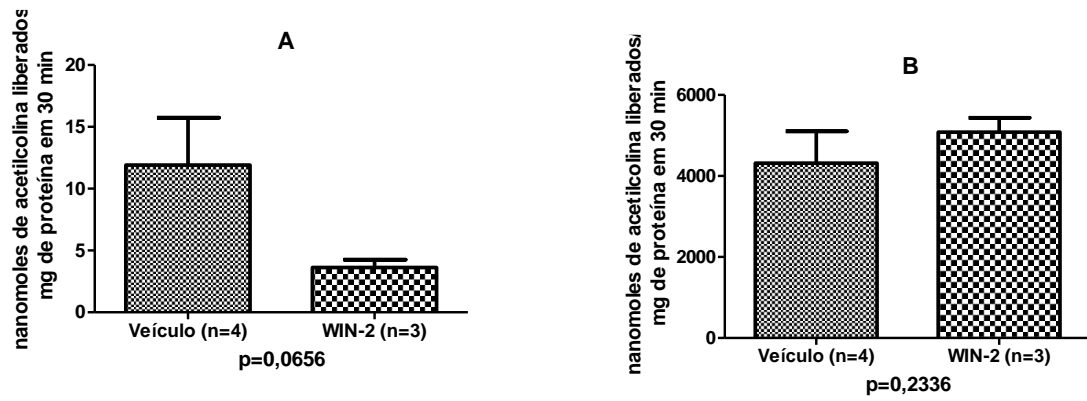


Figura 39: Dosagem da liberação de acetilcolina: Média  $\pm$  SEM da liberação de acetilcolina no hipocampo em nanomoles/ mg de proteína. Painel A: Acetilcolina em meio normal. Painel B: Acetilcolina em meio despolarizante. Teste t não pareado. Veículo, N=(4); WIN-2, N=(3).

## 9. DISCUSSÃO

O tratamento crônico com o agonista canabinoide WIN-2 provoca déficits cognitivos quando administrado antes do teste comportamental, este prejuízo observado pode estar relacionado as alterações nos níveis gênicos de alguns componentes do sistema endocanabinoide, os quais podem estar afetando os níveis de endocanabinoides que podem ser responsáveis pelos efeitos comportamentais observados.

Existem diversas evidências que mostram que o uso de canabinoides provoca alterações cognitivas em diferentes processos relacionados à memória, tais como: aprendizagem (LITCHMAN et al., 1996; MALLET, BENINGER, 1998; VARVEL et al., 2005b), consolidação (WOLFF, LEANDER, 2003; YIM et al., 2008), recuperação (MIKICS et al., 2006), extinção (MARCIANO et al., 2002; VARVEL et al., 2005, 2007). Entretanto, devido ao limitado número de publicações com WIN-2 a respeito de aprendizagem e memória no MWM e, dentre eles, a diversidade de protocolos existentes, torna-se difícil a comparação dos mesmos. Neste trabalho foi utilizada a dose de 2mg/kg, pois segundo Robinson et al. (2010) tanto a dose de 1mg/kg quanto a de 3mg/kg provocam prejuízo cognitivo na memória de referência no MWM. Porém, Acheson et al., (2012) não observaram esse prejuízo na dose de 1mg/kg. Dessa forma, decidimos utilizar a dose intermediária de 2mg/Kg, esperando observar prejuízos cognitivos nos animais tratados com a droga.

Na aprendizagem do experimento 1, no qual os animais receberam a droga ou veículo durante sete dias antes do teste cognitivo, não foi observado um prejuízo cognitivo, pois ambos os grupos apresentaram uma curva de aprendizagem semelhante e permaneceram mais tempo no quadrante alvo durante o teste comprobatório. Estes dados estão de acordo com os dados apresentados por Acheson et al. (2012), que também não observaram déficits na memória espacial de referência utilizando a dose de 1mg/kg de WIN-2 por 5 dias, 30 minutos antes do teste comportamental. Na reaprendizagem, foi possível identificar uma discreta diferença na curva de latência entre os grupos. Entretanto, no teste comprobatório esta diferença não foi observada, sendo que animais de ambos os grupos despenderam maior tempo no quadrante alvo que no oposto. Por outro lado, tanto na aprendizagem quanto na reaprendizagem os animais do grupo WIN-2



apresentaram maior distância cumulativa na quarta tentativa. Este aumento evidencia um prejuízo na memória de curta duração, uma vez que, na quarta tentativa o animal deve lembrar o executado dentro da sessão, enquanto na primeira tentativa, o animal precisa lembrar o que foi executado no dia anterior (ROBINSON, et al., 2010). Nossos dados vêm de encontro com a literatura, onde existem diversos relatos do uso de canabinoides afetando a memória de curta duração, *working memory*, no labirinto radial (EGASHIRA, et al., 2008; LITCHMAN, et al., 1995; WISE et al., 2009b), no labirinto em T (JENTSCH et al., 1998; NAVA, et al., 2001; VARVEL et al., 2005b), no teste de atraso não ligado à posição (DNMP) (DEADWYLER et al., 2007; HEYSER et al., 1993; PANLILLO et al., 2011) e no MWM (VARVEL; LICHTMAN, 2002; NIYUHIRE et al., 2007). Quando comparamos as curvas de aprendizagem e reaprendizagem dos grupos veículo e WIN-2, percebemos que ambos os grupos apresentaram um melhor desempenho na reaprendizagem, indicando que tentativas adicionais de aprendizagem são importantes para uma melhor consolidação da tarefa, como sugerido por Camarota et al. (2004) e Pires et al. (2005). No trabalho de Pires et al (2005) foi observado que animais pré-treinados apresentam melhor desempenho quando comparado a um grupo que não havia tido contato prévio com a tarefa de memória de referência no MWM, mostrando que tentativas adicionais favorecem a reconsolidação da tarefa. Os animais WIN-2 não desaprenderam a tarefa, pois, quando testados no teste comprobatório, logo após a reaprendizagem, continuaram permanecendo mais tempo no quadrante alvo comparado ao quadrante oposto. Assim, existem divergências acerca do tipo de memória afetado pelo uso de canabinoides em testes realizados no MWM. Alguns trabalhos relatam prejuízo quando somente é avaliada a curva de aprendizagem (ABUSH; AKIRAV, 2010; DA, TAKAHASHI, 2002; FERRARI et al., 1999; ROBINSON et al., 2007). Em outros trabalhos, esta alteração na curva de aprendizagem não foi observada (ACHESON et al., 2011; DIANA et al., 2003). Vale destacar que nenhum desses estudos observou diferença entre os grupos no teste comprobatório corroborando os dados observados nesse trabalho. Isso pode sugerir que, nos trabalhos em que houve prejuízo na curva de aprendizagem, a informação foi adquirida igualmente por ambos os grupos quando evocada no teste comprobatório.

No experimento 2, no qual o processo de consolidação foi avaliado, não observamos diferenças entre os grupos, em nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados.

Conseqüentemente, tanto animais veículos quanto WIN-2 aprendem e reaprendem a tarefa de memória espacial. Existem poucos relatos do uso de canabinoides afetando a consolidação de uma forma geral em processos cognitivos. Constanzi et al. (2004), utilizando o teste de esQUIVA inibitória, demonstraram que ratos tratados com AEA logo após o treino apresentaram um tempo de latência significativamente menor em relação aos animais veículo. Entretanto, a maioria dos trabalhos não identifica alterações comportamentais na consolidação em animais tratados com canabinoides (MISHIMA et al., 2001, YIM et al., 2008). Assim, DASilva e Takahashi (2002), utilizando o MWM, observaram prejuízo cognitivo na aquisição e recuperação da tarefa espacial, em animais tratados com THC, porém a consolidação se manteve inalterada. Por outro lado, YIM et al. (2008) utilizando WIN-2 nas doses de 1 e 3 mg/kg e intracranialmente (2,5-5µg) verificaram um discreto prejuízo cognitivo no MWM, somente ao realizar um teste comprobatório 28 dias após o término do treino, em todas as doses testadas. Os efeitos comportamentais sutis ou ausentes da droga podem estar relacionados a uma tolerância provocada pelo uso crônico da droga, como foi verificado por Hampson et al (2003).

Ao avaliarmos os resultados cognitivos desse trabalho, devemos levar em consideração algumas vantagens do MWM em relação a outros paradigmas que avaliam memória espacial: não há privação de comida; trata-se de um teste mais rápido; não há utilização de pistas olfativas para a sua localização espacial; além desse teste ser altamente sensível na avaliação de danos hipocampais (BANNERMAN et al., 1999). Adicionalmente, há estudos demonstrando que sua utilização permite resultados exatos e reprodutíveis na memória espacial de referência (D'HOOGHE; DEYN, 2001; DUDCHENKO, 2004). Dessa forma, algumas diferenças em relação ao desempenho em um teste de memória espacial podem estar relacionadas a alterações em outras regiões cerebrais que não foram avaliadas nesse trabalho. Como também os variáveis presentes no teste: o tamanho da piscina (75-150 cm de diâmetro), que pode ou não afetar o desempenho, dependendo da linhagem de animais utilizados (VAN DAM et al., 2006); a variação no uso das pistas espaciais (CHAMPAGNE et al., 2002); idade dos animais (GEINISMAN et al., 1995); e a linhagem de animais utilizados (WRIGHT, et al.,

2004). Por fim, o desempenho cognitivo pode ser afetado pela aversão provocada pela exposição ao MWM (QUERVAIN et al., 1998).

Além das variações próprias do modelo experimental, existem outros fatores a serem considerados como o efeito da droga nas diferentes faixas etárias. MAY et al. (2006) comparando o desempenho cognitivo de animais de 30 ou 60 dias, aproximadamente, no MWM, demonstrou que os animais jovens tratados com THC (5mg/kg) apresentaram prejuízo cognitivo, pois gastaram mais tempo para achar a plataforma de escape, enquanto que os animais adultos não apresentaram variação quando comparados ao veículo. Esse dado foi corroborado no teste de reconhecimento de objeto e social, onde foram comparados ratos de 40 e 80 dias, tratados cronicamente com WIN-2 (1,2 mg/kg) durante 20 dias. Os animais foram testados em três oportunidades diferentes: Após a primeira injeção, posteriormente ao término do tratamento crônico com WIN-2 e 15 dias após a última administração da droga. Os animais com 40 dias apresentaram prejuízo nos testes comportamentais nas três oportunidades, enquanto os animais com 80 dias, somente demonstraram falha na cognição no primeiro teste (SCHEIDER et al., 2008). Estes dados mostram que idade é um fator importante na avaliação da memória, sendo que animais jovens são mais suscetíveis a danos cognitivos provocados pelo uso de canabinoides.

Canabinoides são conhecidos por modular o estresse e a ansiedade, e possuem a capacidade de modular respostas a eventos estressores (GOBBI et al., 2005; HALLER et al, 2009). O hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala são áreas envolvidas em distúrbios de ansiedade e estresse pós-traumático (SHIN; LIBERZON, 2010). O estresse provoca a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) no hipocampo, o qual inicialmente tem um papel benéfico na memória e na aprendizagem e, posteriormente, deletério (Diamond, et al., 1992). Estudos do efeito do sistema endocanabinoide no estresse apresentam resultados controversos. Ao passo que o uso de canabinoides apresenta efeitos benéficos na consolidação avaliada através do teste de esQUIVA inibitória (MORENA et al., 2014), o aumento da ativação do receptor CB1 pode provocar respostas de estresse e ansiedade (Rodriguez et al, 1996). Desta forma, há um efeito bifásico na ativação de receptores CB1 em que o efeito ansiogênico ou ansiolítico depende da maior ou menor ativação

do receptor CB1 (SCHERMA et al., 1998). No trabalho de Patel e Hillard (2006), foi avaliada a ansiedade no labirinto em X elevado, utilizando de doses crescentes do agonista canabinoide WIN-2 (0,3-1-3-10 mg/kg). Neste trabalho, foi avaliado o tempo de permanência no braço aberto, observou-se a formação de uma curva em U invertida: na qual animais tratados na dose de 0,3 mg/kg não apresentaram efeito quando comparados ao grupo veículo, enquanto que animais tratados com as doses de 1 a 3 mg/kg permaneceram mais tempo no braço aberto, indicando que WIN-2 na dose (1 a 3 mg/kg) apresenta um efeito ansiolítico; por outro lado, animais que receberam 10 mg/kg não apresentaram diferenças comportamentais em relação ao veículo. Adicionalmente, Abush e Akirav (2010), verificaram que o uso do WIN-2 (1,2mg/kg) prejudicava a memória de curto prazo na tarefa de localização espacial (teste não-aversivo), mas não teve efeito sobre a memória espacial no MWM (teste aversivo), mais uma vez indicando que o uso de canabinoides modula as respostas à estímulos aversivos. Por último, para reforçar os efeitos benéficos dos canabinoides na ansiedade, o mesmo grupo, mostrou que o WIN-2 é capaz de melhorar o prejuízo cognitivo causado pelo estresse crônico (ABUSH; AKIRAV, 2013). Dessa maneira, podemos sugerir que os efeitos do WIN-2 sobre a memória, são dependentes do estado emocional do animal e, no presente trabalho, não avaliamos regiões cerebrais envolvidas em resposta a estímulos aversivos, como a amígdala. Dessa forma podemos sugerir que a ausência de déficits cognitivos observados nesse trabalho podem estar relacionados a um efeito ansiolítico provocado pela dose utilizada e, esse efeito pode ter facilitado as funções cognitivas dos animais.

Por fim, Mishima et al. (2001) constatou, utilizando injeções intraperitoniais de THC, que são necessárias doses menores para provocar prejuízos cognitivos na memória de trabalho, quando comparado à memória de referência. Além disso, foi verificado que a dose que provocou o déficit cognitivo no labirinto radial não teve o mesmo efeito no MWM. Em concordância, Varvel et al. (2001), utilizando o MWM, avaliaram tanto a memória de referência quanto a memória de trabalho e constataram prejuízos na memória de referência com doses muito altas de THC, as quais podem provocar outros efeitos como antinocicepção, hipotermia, catalepsia, ou hipomotilidade. Portanto, sugerimos que são necessárias altas doses de canabinoides para provocar alterações acentuadas na memória espacial de

referencia no MWM e, essas doses podem ativar receptores CB1 em várias outras regiões do SNC envolvidas, por exemplo, na coordenação do movimento, como a região do estriado (GIUFFRIDA et al., 1999; MANEUF et al., 1997).

No intuito de compreender melhor os mecanismos moleculares da ação do agonista canabinoide WIN-2 no SNC, avaliou-se a expressão gênica relativa dos genes de interesse. As tabelas a seguir resumizam os dados de expressão gênica, no hipocampo (Tabela 2) e no córtex pré-frontal (Tabela 3), observados neste trabalho para os grupos, assim denominados: aquisição (correspondente ao experimento 1: aquisição de tarefas aprendidas e reaprendidas), consolidação (correspondente ao experimento 2: consolidação de tarefas aprendidas e reaprendidas) e não treinados (correspondente ao experimento 2).

TABELA 2: RESUMO DAS ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA NO HIPOCAMPO

Gene	Experimento 1 Aquisição	Experimento 2 Consolidação	Não treinados
Alfa 7	=	=	↓
M1	=	=	=
AChE	↓	↓	=
CB1	=	↓	=
NAPE-PLD	=	↓	↓
FAAH	=	=	↓
DAGL	↑	↓	↓
MAGL	=	↓	=

Fonte: Tamara Alarcón

TABELA 3: RESUMO DAS ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

Gene	Experimento 1 Aquisição	Experimento 2 Consolidação	Não treinados
Alfa 7	=	=	=
M1	↑	=	↑
AChE	=	=	=
ChAT	=	↑	=
CB1	↑	↑	↑
NAPE-PLD	=	↑	↑
FAAH	↓	=	=
DAGL	↑	↓	↑
MAGL	↓	↑	=

Fonte: Tamara Alarcón

Em relação ao sistema endocanabinoide, existem pouquíssimos trabalhos que avaliam a expressão gênica dos componentes deste sistema, sendo que o mais estudado é o receptor canabinoide CB1. Em nosso estudo, o uso crônico do canabinoide WIN-2 apresentou um efeito região específica, no hipocampo onde observamos uma diminuição da expressão gênica do receptor CB1 no grupo de animais treinados no experimento 2, enquanto que no córtex pré-frontal observamos um aumento nos três grupos acima mencionados. Na maioria dos trabalhos constata-se que a exposição crônica a canabinoides (THC, WIN55,212-2 e CP55,940) provoca *downregulation* do receptor CB1 e perda do sítio de ligação do receptor, em várias regiões do cérebro (LAZENKA et al., 2014; Rodríguez et al., 1993; Romero et al., 1997, 1999; SIM-SELLEY; MARTIN, 2002). Esta diminuição também foi verificada *post mortem*, no hipocampo, núcleo caudado, núcleo *accumbens* e putamen, em usuários de maconha (VILLARES, 2007). Esta *downregulation* é região específica, afetando algumas áreas como hipocampo e

estriado, e permanecendo inalterada em outras como globo pálido (MCKINNEY et al., 2008) ou neocórtex (CASTELLI et al., 2007).

A *downregulation* pode acontecer devido a uma diminuição da síntese protéica (que pode ser afetada pela expressão gênica) (CASEY, 2002) ou pelo aumento da degradação do receptor (SMITH, 2005). Em relação a expressão gênica do CB1, a maioria dos autores concorda que o uso crônico de canabinoides leva a uma diminuição nos níveis de RNAm do receptor CB1, na maioria das áreas (RUBINO et al., 1998), porém os resultados dependem do tempo entre a última administração e a eutanásia dos animais e do tipo de análise do RNAm. No trabalho de Romero et al. (1997), um aumento do RNAm de CB1 no estriado foi observado em análise por *Northenblot* em animais eutanaziados 10 min após a última administração de THC. Enquanto que, em outro trabalho do mesmo grupo, foi demonstrado que animais sacrificados 20 min após a última administração de THC apresentavam redução dos níveis de RNAm de CB1 no estriado, conforme demonstrado por análises por hibridação *in situ* (ROMERO et al., 1999). Zhuang et al. (1998), avaliaram a expressão gênica (qPCR) do receptor CB1 no uso de THC (10mg/kg) (6h, 1d, 2d, 3d, 7d, 14d, 21d). Os animais foram sacrificados 24 horas após a última administração, e, nas três regiões avaliadas (hipocampo, cerebelo e estriado) foi observada uma diminuição dos níveis de RNAm quando o tecido foi recolhido seis horas após uma única injeção aguda de THC. Esta redução foi mantida até o dia 14 no estriado para, posteriormente, voltar aos níveis do veículo, no dia 21. No cerebelo e no hipocampo, o padrão observado foi bifásico, onde nos dias 1, 2, e 3 os níveis de RNAm se apresentaram diminuídos ou sem nenhuma alteração. Entretanto, nos dias 7 e 14 ocorreu um aumento da expressão, para finalmente no dia 21 voltar aos níveis do veículo. Além disso, no neocórtex não foi observada diferença em relação ao veículo em animais tratados cronicamente com THC (1mg/kg) durante 21 dias (GINOVAR et al., 2012). Em relação aos efeitos opostos do córtex pré-frontal e hipocampo observados no presente trabalho, já foi visto que o estresse crônico por 21 dias pode causar efeito região específico no ensaio de ligação do receptor CB1: no córtex pré-frontal, observou-se um aumento no ensaio de ligação do receptor CB1, enquanto no hipocampo foi verificada uma diminuição do mesmo (HILL et al., 2009; HILLARD et al., 2006).

O uso crônico de WIN-2 pode, de maneira semelhante, provocar mecanismos compensatórios em outros componentes do sistema endocanabinoide, uma vez que os mesmos são sintetizados sob demanda (MUCCIOLI, 2010). No presente trabalho, no hipocampo, foi observada uma diminuição das enzimas de sínteses (NAPE-PLD e DAGL) em ambos os grupos do experimento 2 (animais treinados e não treinados), entretanto isto não foi observado no experimento 1. Acreditamos que o baixo número de animais utilizados nos ensaios de expressão gênica destes genes (n=2), podem ter relação com o resultado observado, de forma que seriam necessários mais experimentos para confirmarmos os resultados obtidos. Em relação à enzima de degradação da AEA, a FAAH, não observamos efeito do WIN-2 no hipocampo de animais treinados no MWM (experimentos 1 e 2) mas observamos diminuição nos animais não treinados do experimento 2. Esses dados sugerem que o treinamento no MWM restaura uma diminuição provocada pelo WIN-2 nessa região. O MWM, embora aversivo, pode levar a alterações de expressão gênica de vários genes devido ao fato do paradigma envolver exercício físico e estimulação cognitiva. Dessa forma, sugerimos que a diminuição observada apenas nos animais não treinados possa ter sido revertida pelos estímulos supracitados. De fato, foi observado que a atividade física provoca uma diminuição da expressão de CB1 no hipocampo de ratos (da SILVA et al., 2010).

De um modo geral, as enzimas responsáveis pela síntese de endocanabinoides estão diminuídas no hipocampo, o que sugere que, nessa região, é possível que os níveis de endocanabinoides estejam diminuídos com consequente atenuação da ativação dos receptores CB1. De fato, no caso dos animais que receberam WIN-2 logo após o teste comportamental, observamos diminuição na expressão das enzimas de síntese, com consequente diminuição na expressão dos receptores CB1. Entretanto, essas alterações funcionais não refletiram nas alterações comportamentais. É possível que os níveis de endocanabinoides não estejam alterados, mesmo com a expressão gênica das enzimas de seus metabolismos se apresentarem alteradas. Alterações na expressão gênica que não refletem em alterações na expressão protéica são comuns (CHEN et al., 2016; LICHTINGHAGEN et al., 2002; MOUSAVI et al., 2003; SARRO et al., 2010;), assim como a possibilidade da expressão protéica não refletir na atividade da enzima em questão (LIEDHEGNET et al., 2014; SCHOBER et al., 1997). Em relação ao córtex



pré-frontal, os animais não treinados no experimento 2 apresentaram um aumento nos níveis de RNAm das enzimas de síntese (NAPE-PLD e DAGL) dos endocanabinoides AEA e 2-AG causados pelo tratamento com WIN-2, enquanto a expressão gênica das enzimas de degradação (FAAH e MAGL) permaneceram inalteradas em relação aos animais não tratados. Conseqüentemente, novamente, podemos apenas sugerir um aumento nos endocanabinoides nesta região, uma vez que seriam necessários ensaios para dosagem dos AEA e 2-AG para que possamos confirmar essa hipótese. Nos grupos treinados (experimentos 1 e 2), observamos um aumento da enzima de síntese da AEA, NAPE-PLD, em animais tratados com WIN-2. Entretanto, este aumento somente foi significativo no experimento em que avaliamos o efeito do WIN-2 na consolidação da tarefa (experimento 2). Já a enzima de degradação da AEA, FAAH, se apresentou diminuída no experimento 1 e não alterada no experimento 2 em animais tratados com WIN-2. Em relação à enzima de síntese e degradação do 2-AG (DAGL e MAGL), as mesmas apresentaram respostas opostas nos diferentes experimentos. Em resposta ao tratamento com WIN-2 no experimento 1, foi observado um aumento da expressão da enzima DAGL acompanhado de uma diminuição do nível de RNAm da enzima de degradação, MAGL, conseqüentemente pode-se sugerir que nestas condições de tratamento aconteça um aumento tanto de AEA como de 2-AG. Já no experimento 2, onde avaliamos o efeito do WIN-2 na consolidação da tarefa, ocorreu diminuição na expressão gênica da enzima de síntese acompanhado por um aumento da enzima de degradação de 2-AG. Assim, é possível que ocorram efeitos opostos em relação aos níveis de endocanabinoides: o uso do agonista canabinoide antes do teste comportamental levaria a um aumento dos níveis de 2-AG, enquanto a utilização posterior ao teste comportamental provocaria uma diminuição do mesmo. A correlação entre a expressão gênica das enzimas de síntese (NAPE-PLD e DAGL), degradação (FAAH e MAGL) e seus produtos AEA (KWANG-MOOK JUNG, et al., 2007) e 2-AG (VAN DER STELT et al., 2006) já foram observadas experimentalmente.

O prejuízo cognitivo observado na aquisição da tarefa pode ser explicado pelas diferenças na expressão gênica observadas no córtex pré-frontal. Nesse caso, o grupo tratado com WIN-2 apresentou um prejuízo na memória de curta duração (constatado nas distâncias cumulativas da quarta tentativa) como também na curva

da reaprendizagem. Já se sabe que o córtex pré-frontal está envolvido, principalmente, em prejuízos na memória de curta duração (revisado por KANE; ENGLE, 2002). Apesar de existirem poucos relatos diferenciando os efeitos dos endocanabinoides AEA e 2-AG, Van der Stelt. et al (2006) utilizaram o peptídeo  $\beta$ -amiloide intracranalmente, constataram além do dano neural no hipocampo um aumento de 2-AG mas não de AEA. Adicionalmente, foi utilizado um bloqueador da recaptção dos endocanabinoides, quando administrado antes da injeção do peptídeo  $\beta$ -amiloide provoca somente um aumento dos níveis de AEA, mas administrado após a injeção do peptídeo  $\beta$ -amiloide gera um aumento tanto dos níveis de AEA, quanto de 2-AG. Este aumento dos níveis de AEA e 2-AG são capazes de reverter tanto o dano neural, como o cognitivo provocado pelo peptídeo. Além disso, já é sabido que AEA ativa o receptor vaniloide tipo 1 (TRPVA1) (RALEVIC et al., 2001; ZYGMUNT et al., 1999) o qual tem sido relacionado com neuroproteção (PEGORINI et al., 2005; VELDHUIS, et al., 2003). O prejuízo cognitivo causado pelo uso de canabinoides é via receptor CB1, assim, o prejuízo cognitivo não é visualizado quando ocorre a utilização concomitante de agonistas e antagonistas do receptor CB1 (GALANPOULOS et al., 2014; DaSILVA; TAKAHASHI, 2002). Por fim, o uso de inibidores da FAAH também tem sido relacionado com uma melhora cognitiva no teste de reconhecimento de objeto (HASANEIN; FAR, 2015) e no MWM (VARVEL et al., 2007), sendo que a inibição da mesma não parece estar relacionada com um aumento na concentração de 2-AG (HAN et al., 2013).

Em relação à expressão gênica do sistema colinérgico no hipocampo, foi verificada uma diminuição na expressão da enzima de degradação AChE nos grupos de animais treinados e tratados com WIN-2, tanto no tanto no experimento 1 quanto no experimento 2. Dessa forma, decidimos testar se estas alterações nos níveis de RNAm da enzima seriam suficientes para alterar, também, a sua atividade. Quando analisamos a atividade AChE no experimento 1, verificamos apenas uma tendência à diminuição causada pelo tratamento. Desta forma, sugerimos que a redução nos níveis do transcrito de AChE observada durante a etapa de aquisição da memória não foi suficiente para gerar uma redução estatisticamente significativa na atividade da enzima. Por outro lado, quando avaliamos a atividade da AChE no hipocampo dos animais do experimento 2 (treinados e não treinados), constatamos que ambos

os grupos apresentaram redução da atividade enzimática em resposta ao tratamento com WIN-2. Até onde sabemos, o efeito de canabinoides naturais e sintéticos na atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal e hipocampo ainda não foi determinada. Porém, já foi visto que uma única dose de THC (20mg/kg) não provoca a inibição da enzima em questão no cérebro de ratos (MOSS et al., 1978), Da mesma forma, Romani et al. (2011) não observaram alteração na atividade da AChE no plasma, porém verificaram uma inibição da BChE no plasma. Entretanto, *in vitro*, foi constatado o oposto. O THC foi capaz de inibir a atividade da AChE (EUBANKS et al., 2006). Entretanto, sabe-se que para tarefas reaprendidas, existe uma correlação linear inversa entre o desempenho no MWM e a atividade da enzima AChE (PIRES et al., 2005).

Ao analisarmos a expressão do receptor nicotínico alfa-7 no hipocampo, verificamos que houve diminuição dos níveis de RNAm nos animais não treinados do experimento 2. O receptor alfa-7 encontra-se principalmente localizado em neurônios pré-sinápticos, modulando a liberação de neurotransmissores (WONNACOTT S et al., 1996). Estes receptores são estimulados por agonistas nicotínicos (ARAUJO et al, 1988), provocando a liberação de acetilcolina (BOWMAN et al., 1988). Visto que a dessensibilização dos receptores alfa-7 é rápida, estes só respondem a baixas concentrações de acetilcolina (TIAN et al., 1994). Receptores alfa-7 encontram-se distribuídos em diversas áreas do cérebro, como o hipocampo (FABIAN-FINE et al., 2001; FREEDMAN et al., 1993), onde sua presença foi detectada nos interneurônios gabaérgicos, nos quais possui um efeito excitatório, provocando o aumento da neurotransmissão gabaérgica (ALKONDON et al., 1998; BUHLER; DUNWIDDIE, 2002). A neurotransmissão gabaérgica também é regulada pelo receptor CB1, o qual é muito expresso nos interneurônios gabaérgicos (MATSUDA ET AL., 1993; TSOU ET AL., 1998), que expressam tanto receptores alfa-7, quanto CB1, conforme demonstrado por hibridização *in situ* (MORALES et al., 2008). Assim, interações funcionais entre os sistemas colinérgico nicotínico e canabinoides foram documentados (revisado por CASTAÑE et al, 2005; VIVEROS et al, 2006), porém ainda não está claro como esta interação ocorre. *In vitro*, existem evidências que sugerem ação direta dos endocannabinoides sobre o receptor alfa-7, resultando em uma inibição do mesmo (OZ et al, 2003, 2004).

Quando avaliamos a liberação de acetilcolina no hipocampo nos animais que receberam WIN-2 após o treino no MWM, observamos que apesar de haver uma forte tendência a diminuição na liberação basal de acetilcolina, não detectamos significância estatística. Em relação à resposta do tecido hipocampal ao estímulo despolarizante (KCl 33mM), não observamos diferença entre os grupos. A inibição na liberação de acetilcolina em resposta a canabinóides endógenos e exógenos tem sido bem descrita ao longo dos anos em diversas áreas do cérebro, e a mesma é revertida pelo uso de antagonistas canabinoides (CARTA et al., 1998; GESSA et al., 1997, 1998; GIFFORD et al., 1996). Além disso, a liberação de acetilcolina possui um perfil bifásico, no qual baixas doses de canabinoides aumentam a liberação de acetilcolina, enquanto altas doses diminuem (AQUAS et al., 2000, 2001; TZAVARA et al., 2003). Esta modulação na liberação de acetilcolina pode estar associada aos prejuízos cognitivos causado pelo uso de canabinoides, uma vez que, o prejuízo pode ser revertido com a utilização de inibidores da AChE como a fisostigmina (GOONAWARDENA et al., 2014; MISHIMA et al., 2002). Esses dados acima citados podem justificar a ausência de prejuízo cognitivo no presente trabalho, uma vez que, apesar de haver uma diminuição na liberação de acetilcolina basal causada pelo WIN-2, após a despolarização neuronal, os níveis de acetilcolina são iguais aos dos animais não tratados. Mais estudos seriam necessários para o esclarecimento das vias moleculares que levam a esta diminuição de acetilcolina no hipocampo, provocada pelo uso crônico de canabinoides.

Por outro lado, no córtex pré-frontal, foi observado um aumento na expressão da enzima de síntese ChAT em resposta ao tratamento com WIN-2 durante a etapa de consolidação da tarefa no MWM, mas essa alteração na expressão da ChAT não refletiu no conteúdo de acetilcolina nessa região. Já foi descrito que a diminuição da atividade de ChAT não está diretamente relacionada à quantidade de acetilcolina, já que diversos mecanismos participam da regulação da disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica que independem diretamente da atividade da ChAT (CARSON et al., 1976); sugerindo que outros mecanismos participem da regulação da disponibilidade de acetilcolina. Além disso, não observamos alteração na expressão da AChE, sugerindo que a AChE hipocampal parece ser mais sensível às drogas de abuso que a cortical (PIRES et al., 2005).

O receptor muscarínico M1, mais abundante receptor muscarínico nas regiões do neocórtex e hipocampo, tem seu papel em processos de aprendizagem e memória reconhecidos de longa data (Sheffler et al., 2009). Observamos alteração na expressão do receptor M1 no córtex pré-frontal de animais tratados com WIN-2 treinados no experimento 1 e em animais tratados com WIN-2 não treinados no experimento 2. No córtex pré-frontal, os receptores muscarínico M1 em conjunto com os receptores nicotínicos modulam a atenção (HASSELMO; SARTER, 2011; KLINKENBERG et al., 2011; BLOEM et al., 2014). Além disso, alterações farmacológicas e genéticas do receptor M1 estão relacionadas com déficits cognitivos em tarefas dependentes do córtex pré-frontal (ANAGNOSTARAS et al., 2003; CARBALLO-MÁRQUEZ et al., 2007; BARKER; WARBURTON, 2008).

Apesar de não haver relatos na literatura sobre a relação da expressão gênica do receptor CB1 associados ao uso de canabinoides, sabe-se da existência de sítios de ligação alostérica no receptor M1 e M4 para endocanabinoides, AEA, (CHRISTOPOULOS; WILSON, 2001). LANZAFAME et al. (2004) estudaram os efeitos da AEA nos ensaios de ligação e sinalização do receptor M1, constatando uma ligação alostérica que diminui a ligação tanto do antagonista como do agonista muscarínico. Porém foi necessária uma elevada concentração de AEA, para afetar o teste de ligação com agonista. Por outro lado, a ativação dos receptores muscarínicos provoca tanto um aumento da liberação de endocanabinoides (KIM et al., 2002), como aumento na sua sinalização retrógrada (OHNO-SHOSAKU et al., 2003). Ainda que existam evidências da relação de endocanabinoides com o receptor M1 se faz necessário mais estudos para desvendar melhor esta relação e sua importância na aprendizagem e memória.

Em termos finais, podemos verificar no presente trabalho, que as respostas dos sistemas colinérgico e endocanabinoide ao tratamento com um agonista canabinoide podem ser distintos, variando de acordo com o regime de tratamento, assim como parecem ser região específicos. Apesar de termos observado alterações em vários dos componentes dos dois sistemas, não houve correlação entre essas alterações funcionais e o desempenho cognitivo de animais expostos ao WIN-2. Além disso, a complexidade da modulação entre esses dois sistemas verificada através das alterações moleculares e bioquímicas deixam claro que ainda serão necessários muitos estudos utilizando outras abordagens comportamentais e moleculares para

que essa interação seja compreendida. Certamente, a elucidação desses mecanismos será de grande importância para que déficits cognitivos provocados por abuso de drogas, doenças neurodegenerativas, e outros fatores possam ser tratados de forma mais eficaz.

## 10. CONCLUSÕES

- A exposição crônica ao agonista canabinoide WIN-2 provoca prejuízo cognitivo na aquisição de tarefas espaciais aprendidas e reaprendidas no que diz respeito a memória de curta duração.
- Os déficits cognitivos apresentados pelo tratamento com WIN-2 na aquisição de uma tarefa podem estar relacionados a um aumento nos níveis de 2-AG e diminuição nos níveis de AEA no córtex pré-frontal.
- As alterações moleculares observadas no hipocampo em resposta ao tratamento com WIN-2 na aquisição de tarefas aprendidas e reaprendidas e na consolidação de tarefas aprendidas e reaprendidas, parecem não estar relacionadas à alterações comportamentais.
- A exposição crônica a WIN-2 não promove déficit na consolidação de tarefas espaciais aprendidas e reaprendidas
- O conteúdo de acetilcolina permaneceu inalterado no córtex pré-frontal, apesar do aumento na expressão gênica da ChAT em animais tratados cronicamente com WIN-2 posteriormente ao teste cognitivo.

## 11. REFERÊNCIAS

ABRAHAMS, S., PICKERING, A., POLKEY, C.E., MORRIS, R.G. Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. **Neuropsychologia**v. 35, n. 1, p. 11–24, 1997.

ABUSH, H., AND AKIRAV,I. Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. **Hippocampus** v. 20, p. 1126–1138, 2010.

ABUSH, H., & AKIRAV, I. Cannabinoids Ameliorate Impairments Induced by Chronic Stress to Synaptic Plasticity and Short-Term Memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 8, p.1521–1534, 2013.

ACHESON,S. K., MOORE, N. L. T., KUHN, C. M., WILSON, W. A., SWRTZWELDER,H. S. The synthetic cannabinoid WIN 55212-2 differentially modulates thigmotaxis but not spatial learning in adolescent and adult animals. **Neurosci. Lett**, v. 10, n. 487(3), p. 411–414, 2011

ALBERINI,C.M.Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends Neurosci** v. 28, p. 51–56, 2005

AGRANOFF, B.W., DAVID, R. E., BRINK, J. J.Chemical studies on memory fixation in goldfish. **Brain Res**.v. 1, p. 303–9, 1996

ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., ALBUQUERQUE, E.X. Alpha-bungarotoxin and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices.**Brain Res**. v. 810, p.257–263, 1998.

ALVAREZ, P., SQUIRE, L. R. Memory consolidation: the medial temporal-lobe – a simple network model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n.15, p. 7041–7045, 1994

ALVARES, L.O; GENRO, B.P.; DIEHL, F.; QUILFELDT, J.A. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. **Neurobiol Learn Mem**, v. 90, p. 1-9, 2008.

AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Prog Neurobiol**, v. 58, n. 4, p. 315-348, 1999



ANAGNOSTARAS, S. G., MURPHY, G. G., HAMILTON, S. E., MITCHELL, S. L., RAHNAMA, N. P., NATHANSON, N. M. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. **Nat. Neurosci.** v. 6, p. 51–58, 2003;

ANAND, P.; SINGH, B. (2013) A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Arch Pharm Res**, V. 36, n. 4, p. 375-99, 2013.

ARAUJO, D.M. **J. Neurochem.**v. 51, p. 292–299,1988

ACQUAS, E., PISANU, A., MARROCU, P., DI CHIARA, G. Cannabinoid CB(1) receptor agonists increase rat cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo. **European**, 2002.

ARTHUR, D., LEVIN, E.D., Chronic inhibition of alpha4beta2 nicotinic receptors in the ventral hippocampus of rats: impacts on memory and nicotine response. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 160, p. 140–5, 2002.

ASTUR RS, KLEIN RL, MUMBY DG, PROTZ DK, SUTHERLAND RJ, MARTIN GM. A role for olfaction in object recognition by normal and hippocampal-damaged rats. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 78, p. 186–91, 2002.

BADDELEY, A.P., HITCH, G.J., Working memory. In: Recent advances in learning and motivation (Bower GA, ed), **NewYork: Academic**.p 47–90, 1974.

BANNERMAN, D.M., YEE, B.K., GOOD, M.A., HEUPE ,M.J., IVERSEN, S.D., RAWLINS J.N., Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. **Behavioral Neuroscience**v. 113, n. 6, p. 1170–1188, 1999.

BARKER, G. R. I., WARBURTON, E. C. Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition **memory.Learn. Mem.** v. 16, p. 8–11,2008.

BARNES, C. A. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. **Trends in Neurosciences**,v. 11, n. 4, p. 163–169,1988.

BARTSCH, T., BUTLER, C. Transient amnesic syndromes. **Nature ReviewsNeurology**,v. 9, n. 2, p. 86–97,2013

BECHARA, A., TRANEL, D., DAMASIO, H., ADOLPHS, R., ROCKLAND, C., & DAMASIO, A.R. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. **Science**, v. 269, p. 1115–1118, 1995

BERLYNE, D.E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. *Br J Psychol*, v. 41, p. 68–80, 1950

BISOGNO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 2, p. 224-238, 2005.

BLAND BH, ODDIE SD, Anatomical. electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, p. 259–73, 1998.

BLOCK, R.I.; GHONEIM, M.M. Effects of chronic marijuana use on human cognition. **Psychopharmacology** v. 110, n. 1-2, p. 219-228, 1993.

BLOEM, B., POORTHUIS, R. B., MANSVELDER, H. D. Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. **Front. Neural Circuits** v. 8, p. 17, 2014.

BOWMAN, W.C. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 9, p. 16–20, 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. **binding Anal Biochem**, v. 7, n. 72, p. 248-54, 1976.

BROWN, R.W., BEALE, K.S., JAY FRYE, G.D. Mecamylamine blocks enhancement of referencememorybut not workingmemoryproduced by post-training injection of nicotine in rats tested on the radial arm maze. **Behav Brain Res** ,v. 134, p. 259–65, 2002

BRUN, V.H. Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex. **Neuron**, v. 57, p. 290–302, 2008.

BUHLER, A.V., DUNWIDDIE, T.V.. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on GABAergic interneurons evoke dendritic and somatic inhibition of hippocampal neurons. **J Neurophysiol.**v. 87, p. 548–557,2002

BUZSÁKI, G. Similar is different in hippocampal networks. **Science**, v. 309 n. 5734, p. 568-569, 2005

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H; IZQUIERDO, I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learn Mem**, v. 11, n. 5, p. 572-578, 2004.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; BARROS, D.M.; VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval and the extinction of memory. **Cell Mol Neurobiol**, v. 25, n. 3-4, p. 465-474, 2005.

CARSON, V.G., JENDEN, D.J., CHO, A.K., AND GREEN, R., Effects of choline acetyltransferase inhibitor 3-chloro-4-stilbazole on brain acetylcholine metabolism, **Biochem. Pharmacol.** v. 25, p. 195- 199, 1976.

CARTA, G.; NAVA, F.; GESSA, G. L. Inhibition of hippocampal acetylcholine release after acute and repeated THC in rats. **Brain Res**, v. 809 n. 1, p. 1-4, 1998.

CARBALLO-MÁRQUEZ, A., VALE-MARTÍNEZ, A., GUILLAZO-BLANCH, G., TORRAS-GARCIA, M., BOIX-TRELIS, N., AND MARTÍ-NICOLOVIUS, M. Differential effects of muscarinic receptor blockade in prelimbic cortex on acquisition and memory formation of an odor-reward task. **Learn. Mem.** v. 14, p. 616–624,2007.

CASEY T.M., PAKAY J.L., GUPPY M., ARTHUR P.G. Hypoxia causes downregulation of protein and RNA synthesis in noncontracting Mammalian cardiomyocytes. **Circ. Res.** v. 90, p. 777–783,2002

CASTAÑE, A., BERRENDERO, F., MALDONADO, R. The role of the cannabinoid system in nicotine addiction. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 81, p. 381–386,2005.

CASTELLI, M. P., PAOLA PIRAS, A., D'AGOSTINO, A., PIBIRI, F., PERRA, S., GESSA, G. L., PISTIS, M. Dysregulation of the endogenous cannabinoid system in adult rats prenatally treated with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2. **European Journal of Pharmacology**,v. 573, n. 1, p. 11–9, 2007.

CHAMPAGNE D., DUPUY J.B., ROCHFORD J., POIRIER J. Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: analysis of learning strategies in three versions of the task. **Neuroscience**, v. 114, n. 3, p. 641–654, 2002

CHEN M. J., RUSSO-NEUSTADT A. A. Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent. **Hippocampus** v. 19, p. 962–972, 2009.

CHEN, S. P., KAN, Y., ZHANG, J. L., WANG, J. Y., GAO, Y. H., QIAO, L. N., & FENG, X. M. Involvement of hippocampal acetylcholinergic receptors in electroacupuncture analgesia in neuropathic pain rats. **Behavioral and Brain Functions**, p. 1–10, 2016.

CHEVALEYRE, V.; TAKAHASHI, K. A.; CASTILLO, P.E. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 247-286, 2006.

CHRISTOPOULOS A., WILSON K. Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors. **Brain Resv.** 915, p. 70–78, 2001.

COSTANZI, M., BATTAGLIA, M., ROSSI- ARNAUD, C., CESTARI, V., CASTELLANO, C. Effects of anandamide and morphine combinations on memory consolidation in cd1 mice: involvement of dopaminergic mechanisms. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 81, p. 144–149, 2004.

COZZOLINO, R., GUARALDI, D., GIULIANI, A., GHIRARDI, O., RAMACCI, M.T., ANGELUCCI, L. Effects of concomitant nicotinic and muscarinic blockade on spatial memory disturbance in rats are purely additive: evidence from the Morris water task. **Physiol Behav**, v. 56, p. 111–4, 1994.

DAMASIO, A. R. Time-locked multiregional retroactivation: A systems-level proposal for the neural substrates of recall and recognition. **Neuro Bio Cogn.** v. 33, p. 25–62, 1989.

DASILVA, G. E. TAKAHASHI, R. N.SR141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol induced spatial learning deficit in aMorris-type water maze in mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** v. 26, p. 321–325, 2002.

DAVIES, S.N.; PERTWEE, R.G.; RIEDEL, G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 993-1007, 2002.

DARLEY, C.F.; TINKLENBERG, J.R.; HOLLISTER, T.E.; ATKINSON, R.C. Marijuana and retrieval from short-term memory. **Psychopharmacologia**, v. 29, n. 3, p. 231 – 238, 1973a.

DARLEY, C.F.; TINKLENBERG, J.R.; ROTH, W.T.; HOLLISTER, T.E.; ATKINSON, R.C. Influence of marijuana on storage and retrieval processes in memory. **Memory and Cognition**, v. 1, n. 2, p. 196 – 200, 1973b.

DEACON RM, RAWLINS JN. T-maze alternation in the rodent. **Nat Protocols**, v. 1, p. 7–12, 2006..

DEADWYLER, S. A., GOONAWARDENA, A. V., AND HAMPSON, R. E. Short-term memory is modulated by the spontaneous release of endocannabinoids: evidence from hippocampal population codes. **Behav. Pharmacol.** v. 18, p. 571–580, 2007.

DEIANA S, PLATT B, RIEDEL G. The cholinergic system and spatial learning. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2 p. 389-411, 2011.

DE RENZI E. Memory disorders following focal neocortical damage. **Philos R Soc London [Biol]**. v. 298, p. 73–83, 1982.

DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, JR. V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, 1961.

DEZAZZO J, TULLY T. Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. **Trends Neurosci.**v. 18, p. 212–18, 1995.

D’HOOGHE, R., DE DEYN, P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Res Rev.** v. 36, p. 60–90, 2001.

DIANA, G., MALLONI, M., PIERI, M. Effects of the synthetic cannabinoid nabilone on spatial learning and hippocampal neurotransmission. **Pharmacol. Biochem. Behav.**v. 75, p. 585–591, 2003.

DIAMOND, M.C. BENNETT, M. FLESHNER, G.M. Rose Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. **Hippocampus**, v. 2, p. 421–430, 1992.

DIAS, R., ROBBINS, T. W., ROBERTS, A. C. Primate analogue of the wisconsin card sorting test: effects of excitotoxic lesions of the prefrontal cortex in the marmoset. **Behav. Neurosci.** 110, 872–886, 1996

DICKERSON, B.C., MILLER, S.L., GREVE, D.N., DALE, A.M., ALBERT, M.S., SCHACTER, D.L., SPERLING, R.A. Prefrontal-hippocampal-fusiform activity during encoding predicts intraindividual differences in free recall ability: an event-related functional-anatomic MRI study. **Hippocampus**. v. 17, p.1060–1070, 2007.

DINH,T.P., FREUND, T.F., ANDPIOMELLI, D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. **Chem. Phys. Lipids**, v. 121, p. 149–158, 2002.

DOTY, B. A., DOTY, L. A. Effect of age and chlorpromazine on memory consolidation. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**,v. 57, n. 3, p. 331–334, 1964.

DREWE, E. A. The effect of type and area of brain lesion on Wisconsin card sorting test performance. **Cortex**. v. 10, p.159–70, 1974.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu. Rev. Psychol.** v. 55, p. 51–86, 2004.

DUDAI, Y; MORRIS, R.G. Memorable trends. **Neuron**, v. 80,p. 742–750, 2013

DUDCHENKO PA. An overview of the task used to test working memory in rodents. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 28, p. 699–709, 2004

DUNCAN,C.P. The effect of electroshock convulsions on the maze habit in the white rat. **J. Exp. Psychol.** v. 35, p. 267–278, 1985.

EGASHIRA, N., MISHIMA, K., IWASAKI, K., FUJIWARA, M. Intracerebral microinjections of D9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. **Brain Res.** v. 952, p. 239–245, 2002.

EGERTOVÁ, M.; ELPHICK, M. Localization of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. **J Comp Neurol**, v. 422, n. 2, p. 159-171, 2000.

EKSTROM, A.D. Cellular networks underlying human spatial navigation. **Nature.** v.425, p. 184–188, 2013

EUBANKS, L. M., ROGERS, C. J., IV, A. E. B., KOOB, G. F., ARTHUR, J., DICKERSON, T. J., & JANDA, K. D. **NIH Public Access**, v. 3, n. 6, p. 773–777, 2008.

FABIAN-FINE, R., SKEHEL, P., ERRINGTON, M. L., DAVIES, H. A., SHER, E., STEWART, M. G., FINE, A. Ultrastructural Distribution of the  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit in Rat **Hippocampus**, v. 21, n. 20, p. 7993–8003, 2001.

FARMER, J., ZHAO, X., VAN PRAAG, H., WODTKE, K., GAGE, F.H.,CHRISTIE, B.R. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague–Dawley rats *in vivo*. **Neuroscience.** v. 124, p. 71–79, 2004

FEHR, K.O.; KALANT, H. Long-term effects of cannabis on cerebral function: a review of the clinical and experimental literature. In: Cannabis and Health Hazards, ed. K.O. Fehr and H. Kalant, Toronto: **Addiction Research Foundation**, p 501 – 576, 1983b.

FEIGENBAUM, J.D., POLKEY, C.E., MORRIS, R.G. Deficits in spatial working memory after unilateral temporal lobectomy in man. **Neuropsychologia.** v. 34, n. 3, p. 163–176, 1996.

FELDER, C.C. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. **FASEB J.** v. 9, p. 619–25, 1995.

FERRARI, F.; OTTANI, A.; VIVOLI, R.; GIULIANI, D. Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 64, n. 3, p. 555 – 561,1999.

FLETCHER, J.M; PAGE, J.B.; FRANCIS, D.J.; COPELAND, K.; NAUS, M.J.; DAVIS, C.M.; MORRIS, R.; KRAUSKOPF, D.; SATZ, P. Cognitive correlates of long-term cannabis use in Costa rican men. **Arch Gen Psychiatry**, v. 53, n. 11, p. 1051-1057, 1996.

FLORESCO, S., SEAMANS, J., AND PHILIPS, A. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. **J. Neurosci.**v. 17, p. 1880–1890, 1997.

FOUQUET, C, TOBIN, C, RONDI-REIG, L. A new approach for modeling episodic memory from rodents to humans: the temporal order memory. **Behav Brain Res.**v. 215, p. 172–179, 2010.

FRANKLAND, P. W., BONTEMPI, B., TALTON, L. E., KACZMAREK, L. & SILVA, A. J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science**. v. 304, p. 881–883, 2004.

FREEDMAN R, WETMORE C, STROMBERG I, LEONARD S, OLSON L. Alpha-bungarotoxin binding to hippocampal interneurons: immunocytochemical characterization and effects on growth factor expression. **J Neurosci**. v.13, p. 1965–1975, 1993.

FREEMAN, F.M., ROSE, S.P.R., SCHOLEY, A.B. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 63, p. 291–95, 1995.

FREUND, T.F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signalling. **Physiol Rev**, v. 83, p. 1017-1066, 2003.

FU, J., BOTTEGONI, G., SASSO, O., BERTORELLI, R., ROCCHIA, W. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. **Nat. Neurosci**. v. 15, p. 64–69, 2011.



FYHN, M., MOLDEN, S., WITTER, M.P., MOSER, E.I, MOSER, M.B. Spatial representation in the entorhinal cortex. **Science**. v.305, p.1258–1264, 2004.

GALANOPOULOS, A., POLISSIDIS, A., GEORGIADOU, G., PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z., NOMIKOS, G.G., PITSIKAS. N. WIN55, 212-2 impairs non-associative recognition and spatial memory in rats via CB1 receptor stimulation. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 124, p. 58–66, 2014.

GALIEGUE, S., MARY, S., MARCHAND, J., DUSSOSSOY, D., CARRIÈRE, D., CARAYON, P., BOUABOULA, M., SHIRE, D., LE FUR, G., AND CASELLAS, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **Eur. J. Biochem**. v. 232, p 54–61, 1995.

GAONI, Y. & MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **J. Am. Chem. Soc**, v. 86, p. 1646–1647, 1964

GEINISMAN, Y., DETOLEDO-MORRELL, L., MORRELL, F., HELLER, R.E. Hippocampal markers of age- related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. **Progress in Neurobiology**. v. 45, n. 3, p. 223–252, 1995.

GERDEMAN, G.; LOVINGER, DM. CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. **J Neurophysiol**, v. 85, n. 1, p. 468-71, 2001

GESSA, G.L.; MASCIA, M.S.; CASU, M.A.; CARTA, G. Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. **Eur J Pharmacol**, v. 327, n. 1, p. 1-2, 1997.

GESSA, G.L; CASU, M.A; CARTA, G.; MASCIA, M.S. Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. **Eur J Pharmacol**, v. 355, n. 2-3, p. 119-124, 1998.

GHIRARDI, M., MONTAROLO, P. G., KANDEL, E. R. A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of *Aplysia* **Neuron**, v. 14, p. 413–20, 1995.

GIFFORD, A.N.; ASHBY, C.R.Jr. Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 277, n. 3, p. 1431-1436, 1996.

GIFFORD, A.N.; TANG, Y.; GATLEY, S.J; VOLKOW, N.D.; LAN, R.; MAKRIYANNIS, A. Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. **Neurosci Lett**, v. 238, n. 1-2, p. 84-86, 1997.

GIFFORD, A. N.; BRUNEUS, M.; GATLEY, J.; VOLKOW, N. D. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of acetylcholine release from hippocampal and cortical synaptosomes. **Br J Pharmacol**, v. 131, n. 3, p. 645-650, 2000.

GILL, E. W.; PATON, W. D. M.; PERTWEE, R. G. Preliminary experiments on the chemistry and pharmacology of cannabis. **Nature**, v. 228, n. 5267, p. 134-136, 1970.

GINOVRT, N., TOURNIER, B. B., MOULIN-SALLANON, M., STEIMER, T. Chronic D 9 -Tetrahydrocannabinol Exposure Induces a Sensitization of Dopamine D 2 / 3 Receptors in the Mesoaccumbens and Nigrostriatal Systems. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 11, p. 2355–2367, 2012.

GIOVANNINI MG, BARTOLINI L, KOPF SR, PEPEU G. Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. **Brain Res**, v. 784, p. 218-27, 1998.

GOBBI, G., BAMBICO, F. R., MANGIERI, R., BORTOLATO, M., CAMPOLONGO, P., SOLI- NAS, M., CASSANO, T., MORGESE, M. G., DEBONNEL, G., DURANTI, A., TON- TINI, A., TARZIA, G., MOR, M., TREZZA, V., GOLDBERG, S. R., CUOMO, V., PIOMELLI, D. . Antidepressant- like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. **Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.** v. 102, p. 18620–18625, 2005.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex of nonhuman primates. **Prog Brain Res**, v. 85, p. 325-335, 1991.

GOLDSTEIN LH, CANAVAN AG, POLKEY CE. Cognitive mapping after unilateral temporal lobectomy. **Neuropsychologia** v. 27, n. 2, p. 167–177, 1989.

GOONAWARDENA, A. V., ROBINSON, L., HAMPSON, R. E., RIEDEL, G. Cannabinoid and cholinergic systems interact during performance of a short term memory task in the rat. **Learn Mem**, v.28n.10,p.502-11,2010

GRECKSCH, G., MATTHIES, H. Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 12, p. 663–65, 1980.

GIUFFRIDA A, PARSONS LH, KERR TM, et al. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. **Nat Neurosci** v. 2, p. : 358±63, 1999.

GULYAS AI, CRAVATT BF, BRACEY MH, et al. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. **Eur J Neurosci**. 20, p. 441–458, 2004,

HAGAN JJ, JANSEN JH, BROEKKAMP CL. Blockade of spatial learning by the M1 muscarinic antagonist pirenzepine. **Psychopharmacology (Berl)** v. 93 , p. 470–6, 1987.

HALLER, J., BARNA, I., BARSVARI, B., GYIMESI PELCZER, K., YASAR, S., PANLILIO, L. V., AND GOLDBERG, S. Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. **Psychopharmacology (Berl.)** v. 204, p. 607–616, 2009.

HAN, B., WRIGHT, R., KIRCHHOFF, A. M., CHESTER, J. A., COOPER, B. R., DAVISSON, V. J., BARKER, E. Quantitative LC-MS/MS analysis of arachidonoyl amino acids in mouse brain with treatment of FAAH inhibitor. **Analytical Biochemistry**, v. 432, n. 2, p. 74–81, 2013.

HAMPSON, R. E.; DEADWYLER, S. A. Cannabinoids, Hippocampal Function and Memory. **Life Sci**, v. 65, n. 6-7, p. 715-723, 1999.

HAMPSON, R. E.; DEADWYLER, S. A. Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. **J Neurosci**, v. 20, n. 23, p. 8932-8942, 2000.

HASANEIN, P., FAR, M. T. Pharmacology , Biochemistry and Behavior Effects of URB597 as an inhibitor of fatty acid amide hydrolase on WIN55 , 212-2-induced

learning and memory deficits in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 131, p. 130–135, 2015.

HASSELMO, M. E., AND SARTER, M. Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology* v. 36, p. 52–73, 2011.

HASSELMO ME, MCGAUGHY J. High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Prog Brain Res*.v. 145, p. 207–31,2004

HEIFETS, B.D.; CASTILLO, P.E. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, v. 71, p. 283-306, 2009.

HERKENHAM, M.; LYNN, A.B.; DE COSTA, B.R.; RICHFIELD, E.K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*, v. 547, n. 2, p. 267-274, 1991.

HEYSER, C. J., HAMPSON, R. E., Dead-wyler, S. A. Effects of delta- 9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*v. 264, p. 294–307, 1993.

HILL, M. N., CARRIER, E. J., MCLAUGHLIN, R. J., MORRISH, A. C., MEIER, S. E., HILLARD, C. J., & GORZALKA, B. B. *NIH Public Access*, v. 106, n. 6, p. 2322–2336, 2009.

HILLARD, M.N. HILL, E.J., CARRIER, L. SHI,, W.E. CULLINAN, B.B. Regulation of cannabinoid receptor expression by chronic, unpredictable stress in rats and mice. *Soc. Neurosci. Abstr*,v. 746, p. 19, 2006.

HOLLISTER, L.E. Health Aspects of Cannabis. *Pharmacol Rev*, v. 38, p. 1 – 20, 1986.

HOOVER WB, VERTES RP: Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct*.v. 212, p. 149-1, 2007.

ISRAEL, M., B. LESBATS. [Continuous detection of the release of cetylcholine from the electric organ of Torpedo using a chemiluminescence reaction]. *C R Seances Acad Sci*, v.291, n.8,p. 713-6, 1980.

IVERSEN, L. Cannabis and the brain. **Brain**, v. 126, n. 6, p. 1252-1270, 2003.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 63, n. 1, p. 19-32, 1995.

JENTSCH, J.D., ANDRUSIAK, E., TRAN, A., BOWERS, M.B., ROTH, R.H.  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol increases prefrontal cortical catecholaminergic utilization and impairs spatial working memory in the rat: Blockade of dopaminergic effects by HA966. **Neuropsychopharmacology** v. 16, p. 426–432, 1997.

KANDEL, E. SCHWARTZ, J. JESSEL, T.M. **The Principles of Neural Science**, 4 ed. McGraw-Hill Companies, New York (2000)

KANO, M.; OHNO-SHOSAKU, T.; HASHIMOTODANI, Y.; UCHIGASHIMA, M.; WATANABE, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiol Rev**, v. 89, n. 1, p. 309-380, 2009.

KATHMANN, M.; WEBER, B; ZIMMER, A.; SCHLICKER, E. Enhanced acetylcholine release in the hippocampus of cannabinoid CB1 receptor-deficient mice. **Br J Pharmacol**, v. 132, n. 6, p. 1169-1173, 2001a.

KATHMANN, M.; WEBER, B; SCHLICKER, E. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 e C57BL/6J mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 363, n. 1, p. 50-56, 2001b.

KATONA, I.; SPERLÁGH, B.; MAGLÓCZKY, Z.; SÁNTHA, E.; KÖFALVI, A.; CZIRJÁK, S.; MACHIE, K.; VIZI, E. S.; FREUND, T. F. Gabaergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. **Neuroscience**, v. 100, n. 4, p. 797-804, 2000.

KATONA, I.; URBÁN, G.M.; WALLACE, M.; LEDENT, C.; JUNG, K.M.; PIOMELLI, D.; MACKIE, K.; FREUND, T.F. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. **J Neurosci**, v. 26, n. 21, p. 5628-5637, 2006

KESSELS RPC, DE HAAN EHF, KAPPELLE LJ, POSTMA A. Varieties of human spatial memory: ameta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Res Rev**. v. 35, p. 295–303, 2005.

KLINK, R., DE KERCHOVE D'EXAERDE A., ZOLI, M., CHANGEUX, J.P. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. **J Neurosci.** v. 21, pg. 1452–1463, 2001.

KLINKENBERG, I., SAMBETH, A., BLOKLAND, A. Acetylcholine and attention. **Behav. Brain Res.** v. 221, p. 430–442, 2011.

KUBIE JL, SUHTERLAND RJ, MILLER RU. Hippocampal lesions produce a temporally graded retrograde amnesia on a dry version of the Morris swimming task. **Psychobiology.** v. 27, p. 313–30, 1999.

KWANG-MOOK, J., GIUSEPPE, A., SEVIL, Y., VITALY, V., DAVID, H., CRIBBSC, E., HEADC, C. W., COTMANC, D., PIOMELLI, A. An amyloid  $\beta$ 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging.** v. 33, n. 8, p. 1522–1532, 2012.

LANZAFAME, A., GUIDA, E., CHRISTOPOULOS, A. Effects of anandamide on the binding and signaling properties of M1 muscarinic acetylcholine receptors. **Biochem Pharmacol.** v. 68, p. 2207–2219, 2014.

LAZENKA, M. F., SELLEY, D. E., & SIM-SELLEY, L. J. D FosB induction correlates inversely with CB 1 receptor desensitization in a brain region-dependent manner following repeated D 9 -THC administration. **Neuropharmacology**, v.77, p. 224–233, 2014.

LEDOUX, J. E. *Synaptic Self* (Viking, New York, 2001).

LENAD levantamento Nacional de álcool e drogas.(2012).

LENT, R. **Cem bilhoes de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociências**, 2ed. Atheneu, Rio de Janiero (2010).

LEVER, C., WILLS, T., Cacucci, F., Burgess, N. & O'Keefe, J. Long-term plasticity in hippocampal place-cell representation of environmental geometry. **Nature** v. 416, p. 90–94,2002.

LIEDHEGNER, ES., SASMAN, A., HILLARD, C. J. Brain region-specific changes in N-acylethanolamine contents with time of day. **J Neurochem.** 2014;

- LIGRESTI, A. ET AL. Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. **Biochem. J.** v. 380, p. 265–272, 2004.
- LICHTMAN, A.H., DIMEN, K.R., MARTIN, B.R. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. **Psychopharmacology** v. 119, n. 3, p. 282–90, 1995.
- LICHTMAN, A.H. SR141716 A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 404, n. 1-2, p. 175-179, 2000.
- LIVINGSTONE PD, WONNACOTT S. Nicotinic acetylcholine receptors and the ascending dopamine pathways. **Biochem Pharmacol** v. 78, p. 744–55, 2009.
- LOGUE, S.F , GOULD, T.J The neural and genetic basis of executive function: attention, cognitive flexibility, and response inhibition, **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 123, p. 45–54. 2013.
- LOVINGER, D.M. Presynaptic modulation by endocannabinoids. **Handb Exp Pharmacol**, v. 86, p. 1646-1647, 2008.
- MAGUIRE, E.A., BURKE, T., PHILLIPS, J., STAUNTON, H. Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. **Neuropsychologia** v. 34, n. 10, p. 993–1001, 1996
- MALLET PE, BENINGER RJ. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta-9-tetrahydrocannabinol or anandamide. **Psychopharmacol.** v. 140, p. 11–19, 1998.
- MANEUF, A.R. CROSSMAN, J.M. Brotchie The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces D2, but not D1, dopamine receptor-mediated alleviation of akinesia in the reserpine-treated rat model of Parkinson's. **Exp Neurol**, v. 148, p. 265–270, 1997.
- MARSICANO, G., WOTJAK, C.T., AZAD, S.C., BISOGNO, T., RAMMES, G., CASCIO, M.G. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature** v. 418, p. 530–534, 2002.

MARKOWSKA AL, OLTON DS, GIVENS B. Cholinergic manipulations in the medial septal area: age-related effects on working memory and hippocampal electrophysiology. **J Neurosci**, v. 15, p.2063–73, 1995.

MARTINS-SILVA, C. *Avaliação neuroquímica do sistema colinérgico de camundongos com o gene do transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) modificado geneticamente*. 202f. Tese de Doutorado em ciências biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2008

MARZO, V. DI; BIFULCO, M.; PETROCELLIS, L. DE. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 9, p. 771–84, 2004.

MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.J.; BROWNSTEIN, M.J; YOUNG, A.C; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-564, 1990.

MAY, Y., WHITE, A. M., KUHN, C. M., WILSON, W. A., & SWARTZWELDER, H. S. Differential effects of delta 9 -THC on learning in adolescent and adult rats, v. 83, p. 448–455, 2006.

MCCLELLAND, J.L., MCNAUGHTON, B.L., O'REILLY, R.C. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: Insights from the successes and failures of connectionist models of learning and **memory**. **Psychol Rev** v. 102, p. 419–457, 1995.

MCINTYRE, C.K., MARRIOTT, L.K., GOLD, P.E. Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 79, p. 177–83, 2003.

MCKINNEY, M. K., AND CRAVATT, B. F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. **Annu. Rev. Biochem**, v. 74, p. 411–432, 2005.

MCKINNEY, D. L., CASSIDY, M. P., COLLIER, L. M., MARTIN, B. R., WILEY, J. L., SELLEY, D. E., & SIM-SELLEY, L. J. Dose-Related Differences in the Regional



Pattern of Cannabinoid Receptor Adaptation and in Vivo Tolerance Development to  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, v. 324, n. 2, p. 664–673, 2008.

MECHOULAM, R.; SHANI, A.; EDERY, H.; GRUNFELD, Y. Chemical Basis of hashish activity. **Science**, v. 169, n. 945, p. 611-612, 1970

MESULAM, M. M. ,MUFSON, E. J., WAINER, B. H., LEVEY, A. I. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). **Neuroscience** v. 10, p.1185–201, 1983b

MIKICS, E., DOMBI, T., BARSVÁRI, B., VARGA, B., LEDENT, C., FREUND, T. F., AND HALLER, J. The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. **Behav. Pharmacol.** v. 17, p. 223–230, 2006.

MILLER, L.L.; BRANCONNIER, R.J. Cannabis: effects on memory and the cholinergic limbic system. **Psychol Bull**, v. 93, n. 3, p. 441-456, 1983.

MISHIMA, K., EGASHIRA, N., HIROSAWA, N.,FUJII, M.,MATSUMOTO,Y., IWASAKI, K., AND FUJIWARA, M. Characteristics of learning and memory impairment induced by delta9- tetrahydrocannabinol in rats. **Jpn. J. Pharmacol.** v. 87, n. 297–308, 2001.

MORALES, M., HEIN, K., VOGEL, Z. Hippocampal interneurons co-express transcripts encoding the alpha7 nicotinic receptor subunit and the cannabinoid receptor 1.” **Neuroscience** v.152, n. 1, p. 70–81, 2008

MORENA, M., ROOZENDAAL, B., TREZZA, V., RATANO, P., PELOSO, A., HAUER, D., ATSAK, P.,TRABACE, L., CUOMO, V., MCGAUGH, J.L. Endogenous cannabinoid release within prefrontal-limbic pathway affects memory consolidation of emotional training. **Proc Natl Acad Sci** v. 111, p. 18333–18338, 2014.

MORERA-HERRERAS,T.; RUIZ ORTEGA, J. A. ; UGEDO, L. Two opposite effects of  $\Delta^9$ - tetrahydrocannabinol on subthalamic nucleus neuron activity :involvement of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. **Synapse**, v.64, p.20-29,2010.

MORICONI, A., CERBARA, I., MACCARRONE, M., AND TOPAI, A. GPR55: current knowledge and future perspectives of a purported “Type-3” cannabinoid receptor. **Curr. Med. Chem**, v. 17, p. 1411–1429, 2010.

MORRIS, R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learn Motiv** v. 12, p. 239–60, 1981.

MORRIS R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 11, n. 1, p.47-60, 1984.

MOSER, E., MOSER, M.B., ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **J. Neurosci.** v. 13, p. 3916–3925, 1993.

MOSER, E.I., KROPFF, E., MOSER, M.B. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. **Annu Rev Neurosci** v. 31, p. 69–89, 2008.

MOSS, D. E., PECK, P. L., & SALOME, R. (1978). Tetrahydrocannabinol and Acetylcholinesterase I, 8, 763–765.

MOUSAVI M, HELLSTROM-LINDAHL E, GUAN ZZ, SHAN KR, RAVID R, NORDBERG A. PROTEIN and mRNA levels of nicotinic receptors in brain of tobacco using controls and patients with Alzheimer's disease. **Neuroscience**. 2003;122:515–520

MUCCIOLI, G. G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. **Drug Discov. Today**, v. 15, p. 474–483, 2010.

MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

NADEL, L., HARDT, O., 2011. An update on memory systems. **Neuropsychopharmacology Reviews** 36, 251–273.

NADER K, SCHAFE GE, LEDOUX JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature** 406:722–26

NAKAMURA, E.M.: DA SILVA, E.A.; CONCÍLIO, G.V.: WILKINSON, D.A.; MASUR, J. Reversible effects of acute and long-term administration of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. **Drug Alcohol Depend**, v. 28, p. 167 – 175, 1991.

NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; WIINSAUER, P.J.; MOERSCHBAECHER, J.M. Effects of the cannabinoid ligand SR 141716A alone or in combination with  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol or scopolamine on learning in squirrel monkeys. **Behav Pharmacol**, v. 11, p. 377 – 386, 2000.

NAKAZI, M.; BAUER, U.; NICKEL, T.; KATHMAN, M.; SCHLICKER, E. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptor. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 361, n. 1, p. 19-24, 2000.

NAVA, F.; CARTA, G.; COLOMBO, G.; GESSA, G. L. Effects of Chronic THC Treatment on Hippocampal Extracellular Acetylcholine Concentration and Alternation Performance in the T-maze. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 3, p. 392-399, 2001

NIYUHIRE, F., VARVEL, S. A., THORPE, A. J., STOKES, R. J., WILEY, J. L., AND LICHT-MAN, A. H. The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in are task-specific. **Psychopharmacology** (Berl.) v. 191, p. 223–231, 2007.

OHNO-SHOSAKU, T., MATSUI, M., FUKUDOME, Y., SHOSAKU, J., TSUBOKAWA, H., TAKETO, M. M., ET AL. Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. **Eur. J. Neurosci**. v. 18, p. 109–116, 2003.

OKAMOTO, Y., TSUBOI, K., UEDA, N. Enzymatic formation of anandamide. **Vitam. Horm.**, v. 81, p. 1–24, 2009.

O'KEEFE, J. DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Res**. v. 34, p. 171–175, 1971.

O'KEEFE, J. NADEL, L. **The Hippocampus as a Cognitive Map** (Oxford Univ. Press), 1978.

OLTON DS, WALKER JA, GAGE FH. Hippocampal connections and spatial discrimination. **Brain Res**, v. 139, p. 295–308, 1978

ONO, T., NAKAMURA, K., FUKUDA, M. & Tamura, R. Place recognition responses of neurons in monkey hippocampus. **Neurosci. Lett**. 121, 194–198

OZ, M., RAVINDRAN, A., DIAZ-RUIZ, O., ZHANG, L., MORALES, M. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 306, p. 1003–1010, 2003

OZ, M., ZHANG, L., RAVINDRAN, A., MORALES, M., LUPICA, C.R. Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on alpha7-nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 310, p. 1152–1160, 2004.

PANLILIO, L. V., YASAR, S., THORNDIKE, E. B., GOLDBERG, S. R., AND SCHINDLER, C. W. Automatic recording of mediating behavior in delayed matching- and nonmatching- to-position procedures in rats. **Psychopharmacology (Berl.)** v. 214, p. 495–504, 2011.

PARSONS SM. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. **FASEB J**, v. 14, p. 2423–34, 2000..

PATEL, S., HILLARD, C. J. Pharmacological Evaluation of Cannabinoid Receptor Ligands in a Mouse Model of Anxiety : Further Evidence for an Anxiolytic Role for Endogenous Cannabinoid Signaling, v. 318, n. 1, p. 304–311, 2006.

PEPEU, G., GIOVANNINI, M. G. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. **Learn and Mem** , v. 11, n. 1, p. 21-27, 2004.

PERRY, E., WALKER, M., GRACE, J., PERRY, R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 6, p. 273–80, 1999.

POWER, A. E.; VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J. L. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 80, n. 3, p. 178-193, 2003.

PRADO, M. A., T. MORAES-SANTOS, R. N. FREITAS, M. A. SILVA E M. V.Gomez. Choline oxidase chemiluminescent assay, after removal of eserine from medium, of acetylcholine released in vitro from brain slices. **J Neurosci Methods**, v.31, n.3, Mar, p.193-6. 1990.

PRADO, V.F.; MARTINS-SILVA, C.; DE CASTRO, B.M.; LIMA, R.F.; BARROS, D.M.; AMARAL, E.; RAMSEY, A.Y.; SOTNIKOVA, T.D.; RAMIREZ, M.R.; KIM, H.G.; ROSSATO, J.I.; KOENEN, J.; QUAN, H.; COTA, V.R.; MORAES, M.F.; GOMEZ, M.V.; GUATIMOSIM, C.; WETSEL, W.C.; KUSHMERICK, C.; PEREIRA, G.S.; GAINETDINOV, R.R.; IZQUIERDO, I.; CARON, M.G.; PRADO, M.A. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. **Neuron**, v. 7, n. 51(5), p. 601-12, 2006.

PRESTON, A.R., EICHENBAUM, H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. **Curr Biol**. v. 23, n. 17, p. 764–73, 2013.

PARÉ, D., SMITH, Y., PARENT, A., STERIADEM. Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei. **Neuroscience** v. 25, p. 69–86, 1988.

PEGORINI, S., BRAIDA, D., VERZONI, C., GUERINI-ROCCO, C., CON- SALEZ, G. G., CROCI, L. AND SALA, M. Capsaicin exhibits neuroprotective effects in a model of transient global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. **Br. J. Pharmacol**. v. 144, p. 727–735, 2005.

PERTWEE, R. G. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? **Br. J. Pharmacol**, v. 152, p. 984–986, 2007.

PIRES, R.G., PEREIRA SR, PITTELLA JE, FRANCO GC, FERREIRA CL, FERNANDES PA, RIBEIRO AM. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 70, n. 2-3, p.227-35, 2001.

PIRES, R.G.; PEREIRA, S.R.; OLIVEIRA-SILVA, I.; FRANCO, G.C; RIBEIRO, A.M. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: A study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Behav Brain Res**, v. 162, n. 1, p. 11-21, 2005.

PIRES, R ; PEREIRA, S ; CARVALHO, F ; OLIVEIRASILVA, I ; FERRAZ, V ; RIBEIRO, A . Correlation between phosphorylation level of a hippocampal 86kDa

protein and extinction of a behaviour in a model of Wernicke Korsakoff syndrome. **Behavioural Brain Research**, v. 180, p. 102-106, 2007

QUERVAIN, D.J., ROOZENDAAL, B., MCGAUGH, J. L. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. **Nature** v. 394, p. 787–790, 1998

RALEVIC, V., KENDALL, D. A., RANDALL, M. D., & SMART, D. Cannabinoid modulation of sensory neurotransmission via cannabinoid and vanilloid receptors: roles in regulation of cardiovascular function. **Life Sci** v. 71, p. 2577–2594, 2002.

REIBAUD, M.; OBINU, M. C.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M; BÖHME, G. A.; IMPERATO, A. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. **Eur J Pharmacol**, v. 379, n. 1, p. R1-2, 1999.

RESTIVO, L., VETERE, G., BONTEMPI, B., AMMASSARI-TEULE, M. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. **J Neurosci** v. 29, p. 8206–8214, 2009.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J.; LAM, A.G.M.; ROLOFF, E.V.L.; MARTIN, S.; BRIDGE, H.; DE HOZ, L.; POESCHEK, B.; MCCULLOCH, J.; MORRIS, R.G.M. Reversal neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 898-905

RIEKKINEN JR P, SIRVIO J, AALTONENM,RIEKKINEN P. Effects of concurrent manipulations of nicotinic and muscarinic receptors on spatial and passive avoidance learning. **Pharmacol Biochem Behav** v. 37, n. 3, p.405–10, 1990.

ROBINSON, L., MCKILLOP-SMITH, S., ROSS, N. L., PERTWEE, R. G., HAMPSON, R. E., PLATT, B., & RIEDEL, G. Hippocampal endocannabinoids inhibit spatial learning and limit spatial memory in rats, p. 551–563, 2008.

ROBINSON, L.; GOONAWADERNA, A.V.; PERTWEE, R.; HAMPSON, R. E.; PLATT, B.; RIEDEL, G. WIN55,212-2 induced deficits in spatial learning are mediated by cholinergic hypofunction. **Behav. Brain Res**, v. 208, p. 584–592, 2010.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F., RUBIO, P., MENZAGHI, F., MERLO-PICH, E., RIVIER, J., KOOB, G. F., AND NAVARRO, M. Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [D-Phe<sup>12</sup>, Nle<sup>21</sup>, 38, C alpha MeLeu<sup>37</sup>] CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive-withdrawal behavior in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 276, p. 56–64, 1996.

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F., GORRITI, M.A., FERNANDEZ- RUIZ, J.J., PALOMO, T., RAMOS, J.A. Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol treatment. **Pharmacol Biochem Behav** v. 47, p. 33–40, 1993.

ROMANI, R., GALEAZZI, R., ROSI, G., FIORINI, R., PIRISINU, I., AMBROSINI, A., & ZOLESE, G. Biochimie Anandamide and its congeners inhibit human plasma butyrylcholinesterase . Possible new roles for these endocannabinoids ? **Biochimie**, v. 93, n. 9, p. 1584–1591, 2011.

ROMERO, J., BERRENDERO, F., GARCIA-GIL, L., DE LA CRUZ, P., RAMOS, J. A., & FERNÁNDEZ-RUIZ, J. J. Loss of cannabinoid receptor binding and messenger RNA levels and cannabinoid agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]guanylyl-5'-O-(thio)-triphosphate binding in the basal ganglia of aged rats. **Neuroscience**, v. 84, n. 4, p. 1075–1083, 1998.

ROMERO, J., BERRENDERO, F., GARCÍA-GIL, L., LIN, S. Y., MAKRIYANNIS, A., RAMOS, J. A., & FERNÁNDEZ-RUIZ, J. J. Cannabinoid receptor and WIN-55,212-2-stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding and cannabinoid receptor mRNA levels in several brain structures of adult male rats chronically exposed to R-methanandamide. **Neurochemistry International**, v. 34, n. 6, p. 473–482, 1999.

RONESI, J., GERDEMAN, G. L., LOVINGER, D. M. Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. **J. Neurosci.** v. 24, p. 1673–1679, 2004.

ROSENBAUM, R.S., PRISELAC, S., KOHLER, S., BLACK, S.E., GAO, F., NADEL, L., MOSCOVITCH, M. Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. **Nature Neuroscience** v. 3, n. 10, p. 1044–1048, 2000

RUBINO, T., MASSI, P., PATRINI, G., VENIER, I., GIAGNONI, G., PAROLARO D. Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptor mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study. **NeuroReport** v. 5, p. 2493–2496. 1994.

RUSSEL, W.R., NATHAN, P.W. Traumatic amnesia. **Brain** v. 69, p. 280–300, 1946.

SALMON, D.P., BUTTERS, N. Neurobiology of skill and habit learning. **Curr Opin Neurobiol** v. 5, p. 184–190, 1995.

SARRO, S.M., T.L. UNRUH, J. ZUCCOLO, R. SANYAL, J.M. LUIDER, I.A. AUERGRZESIAK, A. MANSOOR, AND J.P. Deans, Quantification of CD20 mRNA and protein levels in chronic lymphocytic leukemia suggests a post-transcriptional defect. **Leuk Res**, v. 34, n. 12, p. 1670-3., 2010.

SCHAT, A. R., LEE, M., CONDIE, R. B., PULASKI, J. T., AND KAMINSKI, N. E. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 142, p, 278–287, 1997.

SHEFFLER, D.J., WILLIAMS, R., BRIDGES, T.M., XIANG, Z., KANE, A.S., BYUN, N.E. A novel selective muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 antagonist reduces seizures without impairing hippocampus-dependent learning. **Mol Pharmacol** v. 76, p. 356–68, 2009.

SCHERMA, M., MEDALIE, J., FRATTA, W., VADIVEL, S. K., MAKRIYANNIS, A., PIOMELLI, D., MIKICS, E., HALLER, J., YASAR, S., TANDA, G., AND GOLDBERG, S. R. THE endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. **Neuropharmacology** v. 54, p. 129–140, 2008.

SCHNEIDER, M., KOCH, M. Chronic Pubertal , but not Adult Chronic Cannabinoid Treatment Impairs Sensorimotor Gating , Recognition Memory , and the Performance in a Progressive Ratio Task in Adult Rats, p. 1760–1769, 2003.

SCHNEIDER, M., SCHÖMIG, E., & LEWEKE, F. M. Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. **Addiction Biology**, v. 13, n. 3-4, p. 345–57, 2008..



SCHLICKER, E.; TIMM, J.; ZENTNER, J.; GOTHERT, M. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 356, n. 5, p. 583-589, 1997.

SCHLICKER, E.; KATHMAN, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 11, p. 565-572, 2001

SCHÖBER, A., MINICHIELLO, L., KELLER, M. Reduced acetylcholinesterase (AChE) activity in adrenal medulla and loss of sympathetic preganglionic neurons in TrkA-deficient, but not TrkB-deficient, mice. **J Neurosci**. v. 17, p. 891–903, 1997

SCOVILLE, W. B., & MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **The Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 20, n. 11, p. 11–21, 1957.

SENUT, M. C., MENETREY, D., LAMOUR Y. Cholinergic and peptidergic projections from the medial septum and the nucleus of the diagonal band of Broca to dorsal hippocampus, cingulate cortex and olfactory bulb: a combined wheatgerm agglutinin-apohorseradish peroxidase-gold immunohistochemical study. **Neuroscience**, 1989.

SHIN, L. M., LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology** v. 35, p. 169–191, 2010.

SIM-SELLEY LJ, MARTIN BR. Effect of chronic administration of WIN 55,212-2 or  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor adaptation in mice. **J Pharmacol Exp Ther** v. 303, p.36–44, 2002.

SMITH HJ, KHAL J, TISDALE MJ. Downregulation of ubiquitin-dependent protein degradation in murine myotubes during hyperthermia by eicosapentaenoic acid. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 332, p. 83–88, 2005.

SMITH, C.N., SQUIRE, L.R. Medial temporal lobe activity during retrieval of semantic memory is related to the age of the memory. **J Neurosci** v. 29, p. :930–938, 2009.

SQUIRE, L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkey and humans. **Psychol Rev**, v. 99, n. 2, p. 195-231, 1992.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain : A brief history and current perspective, v. 82, p. 171–177, 2004.

SQUIRE, L. R. The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. **Neuron**, v. 61, n. 1, p. 6–9, 2009.

STANCAMPIANO R, COCCO S, CUGUSI C, SARAIS L, FADDA F. Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. **Neuroscience**, v. 89, p.1135–43, 1999.

STEFFENS, M.; SZABO, B.; KLAR, M.; ROMINGER, A.; ZENTNER, J.; FEUERSTEIN, T. J. Modulation of electrically evoked acetylcholine release through cannabinoid CB1 receptor: evidence for an endocannabinoid tone in the human neocortex. **Neuroscience**, v. 120, n. 2, p. 455-465, 2003.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 773-778, 1997.

STERIADEM, PARE D., PARENT, A., SMITH, Y. Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. **Neuroscience** v. 25, p.47–67, 1988.

STIGLICK, A.; KALANT, H. Learning impairment in the radial-arm maze following prolonged cannabis treatment in rats. **Psychopharmacology**, v. 77, p. 117 – 123, 1982a

SUTHERLAND, R. W., MCDONALD, R. J., HILL, C. R., & RUDY, J. W . Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships. **Behavioral Brain Research**, v. 52, p. 321, 1989.

SUZUKI, A.; JOSSELYN, S.A.; FRANKLAND, P.W.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J.; KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J Neurosci**, v. 24, n. 20, p. 4787-4795, 2004

SZABO, B.; MÜLLER, T.; KOCH, H. Effect of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and nucleus accumbens in vitro. **J Neurochem**, v. 73, n. 3, p. 1084-1089, 1999.

TAKAHASHI, K.A.; CASTILLO, P.E. The Cb1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 795-802, 2006.

TAKEHARA-NISHIUCHI, K., MCNAUGHTON, B.L. Spontaneous changes of neocortical code for associative memory during consolidation. **Science**. v. 322, p. 960–963, 2008.

TENG, E., SQUIRE, L.R. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. **Nature** v. 400, p. 675–677, 1999

TIAN, L. **J. Physiol.** v. 476, p. 517–529, 1994.

TSOU, K.; BROWN, S.; SAÑUDO-PEÑA, M. C.; MACKIE, K.; WALKER, J. M.; Immunohistochemical Distribution of Cannabinoid CB1 Receptors in the Rat Central Nervous System. **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 393-411, 1998.

TULVING, E., MARKOWITSCH, H. J. Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. **Hippocampus**. v. 8, n. 3, p. 198-204, 1998.

TULVING, E. Episodic memory and common sense: how far apart? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B— Biological Sciences* v. 356, p. 1505–1515, 2001.

TZAVARA, E.T.; WADE, M.; NOMIKOS, G.G. Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. **J Neurosci**, v. 23, n. 28, p. 9374-84, 2003.

UEDA, N., TSUBOI, K., UYAMA, T., AND OHNISHI, T. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. **Biofactors**, v. 37, p. 1–7, 2011.

VAN DER STELT, M. MAZZOLA C, ESPOSITO G, MATIAS I, PETROSINO S, DE FILIPPIS D, MICALE V, STEARDO L, DRAGO F, IUVONE T, DI MARZO V. Endocannabinoids and  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 63, p. 1410–1424, 2006.

VAN DAM, D., LENDERS, G., DE DEYN, P.P. Effect of Morris water maze diameter on visual- spatial learning in different mouse strains. **Neurobiology of Learning and Memory** v. 85, n. 2, p. 164–172, 2006

VARVEL, S.A., HAMM, R.J., MARTIN, B.R., LICHTMAN, A.H. Differential effects of  $\Delta^9$  THC on spatial reference and working memory in mice. **Psychopharmacology** v. 157, p. 142–150, 2001.

VARVEL, S. A. & LICHTMAN, A. H. Evaluation of CB1 Receptor Knockout Mice in the Morris Water Maze. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 301, n. 3, p. 915-924, 2002.

VARVEL, S. A.; ANUM, E. A.; LICHTMAN, A. H. Disruption of CB1 receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. **Psychopharmacology**, v. 179, n. 4, p. 863-872, 2005.

VARVEL, S. A., WISE, L. E., NIYUHIRE, F., CRAVATT, B. F., & LICHTMAN, A. H. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. **Neuropsychopharmacology** v. 32, n. 5, p. 1032–41, 2007.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF Mediates the Efficacy of Exercise on Synaptic Plasticity and Cognition. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 10, p. 2580-2590, 2004.

VELDHUIS, W. B., VAN DER STELT, M., WADMAN, M. W., VAN ZADEL- HOFF, G., MACCARRONE, M., FEZZA, F., VELDINK, G. A., VLIAGENT- HART, J. F., BAR, P. R., NICOLAY, K. AND DI MARZO, V. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors, 2003.

VIANNA, M. R.; COITINHO, A. S.; IZQUIERDO, I. Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning. **Curr Neurovasc Res**, v. 1, n. 1, p. 55-60, 2004.

.VILLARES, J. Chronic use of marijuana decreases cannabinoid receptor binding and mRNA expression in the human brain. **Neuroscience** v. 145, p. 323-334, 2007.

VIVEROS, M.P., MARCO, E.M., FILE, S.E. Nicotine and cannabinoids: parallels, contrasts and interactions. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 30, p.1161–1181, 2006.

VIZI, E.S., LENDVAI, B. Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. **Brain Res Brain Res Rev** v. 30, p. 219–235, 1999.

WEGENER, N., KUHNERT, S., THUNS, A., ROESE, R., AND KOCH, M. Effects of acute systemic and intra- cerebral stimulation of cannabinoid receptors on sensorimotor gating, locomotion and spatial memory in rats. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 198, p. 375–385, 2008.

WEVERS A. Localization of pre- and post-synaptic cholinergic markers in the human brain. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 341-55, 2011.

WINSAUER, P.J.; LAMBERT, P.; MOERSCHBAECHER, J.M. Cannabinoids ligands and their effects on learning and performance in Rhesus monkeys. **Behav Pharmacol**, v. 10, p. 497 – 511, 1999.

WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 2-6, 2001.

WINDER, D.G., MANSUY, I.M., OSMAN, M., MOALLEM, T.M., KANDEL, E.R. Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. **Cell** v. 92, p. 25–37, 1998.

WINOGRAD, T. Frame representations and the declarative procedural controversy. In D. Bobrow & A. Collins (Eds.), **Representation and understanding: Studies in cognitive science** p. 185–210, 1975.

WISE, L. E., IREDALE, P. A., AND LICHT- MAN, A. H. The cannabi- noid CB1 receptor antagonist CE prolongs spatial memory duration in a rat delayed radial arm maze memory task. **Eur. J. Pharmacol.** v. 590, p. 246–249, 2008.

WRIGHT, J. W., ALT, J. A, TURNER, G. D., & KRUEGER, J. M. Differences in spatial learning comparing transgenic p75 knockout, New Zealand Black, C57BL/6, and Swiss Webster mice. **Behavioural Brain Research**, v. 153, n. 2, 453–8, 2004.

WOLFF, M.C., LEANDER, J.D. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. **Eur J Pharmacol** v. 477, p. 213–7, 2003.

WONNACOTT, S., SOLIAKOV, L., WILKIE, G., REDFERN, P., MARSHALL, D. Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the brain. **Drug Dev Res** v. 38, p.149–159, 1996.

YIM, T. T., HONG, N. S., EJAREDAR, M., MCKENNA, J. E., AND MCDONALD, R. J. Post-training CB1 cannabinoid receptor agonist activation disrupts long-term consolidation of spatial memories in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 151, p. 929–936, 2008

YOSHIDA, T., FUKAYA, M., UCHIGASHIMA, M. Localization of diacylglycerol lipase- $\alpha$  around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. **J Neurosci** v. 26, p. 4740– 4751, 2006

ZIA, S., NDOYE, A., LEE, T.X.,WEBBER, R.J., GRANDO, S.A. Receptor- mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. **J. Phar- macol. Exp. Ther.** v. 293, p. 973–981, 2000.

ZHUANG, S., KITTLER, J., GRIGORENKO, E. Effects of long-term exposure to delta<sup>9</sup>-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. **Mol Brain Res** v. 62, p.141–149, 1998.

ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L.R., AMARAL, D.G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. **J Neurosci**. v. 6, p. 2950–67, 1986.

ZYGMUNT, P. M., PETERSSON, J., ANDERSSON, D. A., CHUANG, H. -H., SORGARD, M., DI MARZO, V. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature** v. 400, p. 452–457, 1999.