

FABRICIO LUIZ ASSINI

**INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS ADENOSINÉRGICO E
ENDOCANABINÓIDE, ATRAVÉS DOS RECEPTORES A₁ E CB₁,
NO CONTROLE DA MEMÓRIA ESPACIAL**

**FLORIANÓPOLIS – SC
2011**

FABRICIO LUIZ ASSINI

**INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS ADENOSINÉRGICO E
ENDOCANABINÓIDE, ATRAVÉS DOS RECEPTORES A₁ E CB₁,
NO CONTROLE DA MEMÓRIA ESPACIAL**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia como
requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Farmacologia**

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

**FLORIANÓPOLIS – SC
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

A848i Assini, Fabricio Luiz
Interação entre os sistemas adenosinérgico e
endocanabinóide, através dos receptores A1 e CB1, no controle
da memória espacial [tese] / Fabricio Luiz Assini ;
orientador, Reinaldo Naoto Takahashi. - Florianópolis, SC,
2011.
166 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Neuroreguladores. 3. Endocanabinóides.
4. Receptores de Canabinóides. 5. Agregação Celular. I.
Takahashi, Reinaldo Naoto. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.
Titulo.

CDU 615

Aquele que vence a si mesmo é invencível.
Sun Tzu

**A todos que, genética ou
espiritualmente, formam a
minha família.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que se revela nos detalhes impressionantes da natureza;

Aos meus pais, Emílio e Nida, pela sólida base moral e apoio incondicional;

A minha esposa Cristina, por me dar a sorte de um amor tranquilo. A minha filha Mariah, fonte de toda a perseverança deste pai obstinado. Ao Pedro, filho que está por vir, seja bem vindo!

Aos membros da família Santana e seus agregados, pelo acolhimento.

Ao professor Reinaldo, meu agradecimento e o reconhecimento por sua participação fundamental na minha formação profissional;

A profesora Carla Tasca, qua abriu as portas do seu laboratório para a realização dos ensaios bioquímicos;

Aos colegas da UnC-Concórdia: Maria Lionzo, André Villar e Rodrigo Flores, companheiros de “oeste selvagem” e de constante troca de idéias.

Aos colegas da Faculdade Estácio de Sá: Glória, Silvia, Rose, Koga, Márcio, Murilo, Patrícia Acioly, Patrícia Barreto, Roberta, Rafael, Ramiro e Micheline. Muito obrigado pelo clima alegre que conseguimos manter em nosso ambiente de trabalho.

Aos colegas de laboratório, Cristiane, Rafael, Thiago, Pamplona, Pablo, Lívia, Marília e Jéssica. Pelas conversas sempre produtivas e prazerosas.

Aos companheiros de experimentos: Carina Akemi, sempre sorrindo, obrigado por todos os DVDs assistidos. Marcelo Duzzioni, grande parceiro e melhor “mão” que eu já vi operando. Tetsade Camboim, bom humor em forma de pessoa e parceira nos ensaios bioquímicos. Fabrício Pamplona, parceiro do último experimento, é sempre bom passar à tarde com alguém que topa qualquer tipo de assunto!

Aos professores do Departamento de Farmacologia, os quais – cada um a sua maneira – serviram de referência para uma série de condutas que hoje tomo em minha vida profissional.

Aos membros da banca, que disponibilizaram parte do seu tempo para contribuir com este trabalho.

Aos funcionários do Departamento, Diana, Rita, Zu, Pedro e Murilo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Memória espacial.....	19
1.1.1. A participação do hipocampo na memória espacial	20
1.1.2. O hipocampo além da memória espacial.....	22
1.2. O sistema adenosinérgico	23
1.2.1. As origens e o metabolismo da adenosina.....	24
1.2.2. Os receptores adenosinérgicos	25
1.2.3 O receptor adenosinérgico A ₁	25
1.2.3.1. Receptor A ₁ : distribuição tecidual e localização celular	25
1.2.3.2. Receptor A ₁ : Vias de transdução do sinal	27
1.2.3.3. Receptor A ₁ : Interações funcionais.....	27
1.2.3.4. Receptor A ₁ : Efeitos de agonistas e antagonistas sobre a memória espacial	29
1.3. O sistema endocanabinóide.....	29
1.3.1 Síntese e degradação dos endocanabinóides	30
1.3.2. Os receptores canabinóides	31
1.3.3. O receptor canabinóide do tipo 1	32

1.3.3.1. Receptor CB ₁ : Distribuição tecidual e localização celular	32
1.3.3.2. Receptor CB ₁ : Mecanismos de transdução do sinal	33
1.3.3.3. Receptor CB ₁ – Interações funcionais	34
1.3.3.4. Receptor CB ₁ – Efeitos de agonistas e antagonistas sobre a memória espacial	35
1.4. Interações adenosina X canabinóides	37
1.4.1 Comparações gerais.....	37
1.4.2. Evidências de interação entre os receptores A ₁ e CB ₁	39
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Animais	41
4.2. Drogas e Soluções	42
4.3. Cirurgias estereotáxicas.....	44
4.4. Administração local de drogas	45
4.5. Histologia	45

4.6. Testes comportamentais.....	45
4.6.1. Tarefa da Localização de Objetos	45
4.6.2. Teste do Labirinto Aquático.....	47
4.7. Testes bioquímicos	48
4.7.1 Preparação e incubação das fatias de hipocampo e córtex pré-frontal	48
4.7.2. Ensaio da liberação de L-[³ H] glutamato	49
4.7.3. Avaliação de viabilidade celular	49
4.7.4. Preparação das frações hipocampais para o ensaio de ligação	50
4.7.5. Ensaio de ligação em receptores adenosinérgicos A ₁ e canabinóides CB ₁	50
4.8. Desenho experimental.....	51
2.8.1. Validação do teste da localização de objetos em camundongos <i>Swiss</i> machos.....	51
4.8.2. Co-administração dos antagonistas A ₁ e CB ₁ : participação do sistema glutamatérgico via receptor NMDA.....	52

4.8.3. Interação funcional entre os receptores A ₁ e CB ₁ localizados no hipocampo no controle da amnésia induzida por agonistas de ambos os receptores.....	53
4.9. Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1. Validação do teste da localização de objetos em camundongos <i>Swiss machos</i>.....	55
5.2. Co-administração dos antagonistas A ₁ e CB ₁ melhora a memória espacial de camundongos. Participação do sistema glutamatérgico via receptor NMDA.....	61
5.3. Interação funcional entre os receptores A ₁ e CB ₁ localizados no hipocampo no controle da amnésia induzida por agonistas de ambos os receptores.....	76
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÕES.....	109
7. REFERÊNCIAS.....	110

LISTA DE ABREVIACOES

- 2-AG – 2 araquidonil glicerol
A₁ - Receptor A₁ da adenosina
ANOVA - Análise de variância
BSA - Albumina sérica bovina
CB₁ - Receptor canabinide₁
CCK – colecistocinina
CEUA - Comitê de tica para o uso de animais
DAG – diacil glicerol
DMSO - Dimetilsulfóxido
E.P.M. - Erro padrão da média
FAAH – amido hidrolase de ácidos graxos
i.p. - Via intraperitoneal
LTP – potenciao de longo prazo
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
MAGL – mono acil glicerol lipase
NADA – n-araquidonil dopamina
NAPE – n-araquidonil fosfatidil etanolamina
PBS – soluço salina tamponada com fosfato
s.c. - Via subcutânea
SNC - Sistema nervoso central
THC - Δ^9 - tetrahydrocannabinol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As três principais vias hipocampais.	21
Figura 2. Representação esquemática do modelo da localização de objetos.	46
Figura 3. Representação esquemática do modelo do labirinto aquático.	48
Figura 4: Curva de tempo para a memória de localização de objetos em camundongos.....	55
Figura 5: Efeitos de drogas glutamatérgicas sobre a memória de localização de objetos em camundongos.....	57
Figure 6: Efeitos de drogas colinérgicas sobre a memória de localização de objetos em camundongos.	58
Figura 8: Efeitos do tratamento com os antagonistas dos receptores adenosinérgicos A ₁ e canabinóides CB ₁ sobre a memória de localização de objetos em camundongos.....	62
Figura 9: Efeitos da co-administração pré-treino de doses sub-efetivas dos antagonistas dos receptores adenosinérgicos A ₁ e canabinóides CB ₁ sobre a memória de localização de objetos em camundongos.	63

- Figura 10: Efeitos do tratamento com os antagonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 e canabinóides CB_1 sobre a memória avaliada no labirinto aquático em camudongos..... 65
- Figura 11: Efeitos da co-administração pré-treino de doses sub-efetivas dos antagonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 , DPCPX, e canabinóides CB_1 , AM 251, sobre a memória avaliada o labirinto aquático..... 66
- Figura 12: Participação dos receptores NMDA na melhora de aprendizado induzida pela interação de doses sub-efetivas dos antagonistas A_1 e CB_1 69
- Figura 13: Participação dos receptores NMDA cortico-hipocampais na melhora de aprendizado induzida pela interação de doses sub-efetivas dos antagonistas A_1 e CB_1 72
- Figura 14: Liberação “ex-vivo” de L-[3H]-glutamato em fatias de hipocampo e córtex pré-frontal em camundongos tratados com AM 251 0,25 mg/kg e/ou DPCPX 0,3 mg/kg. 75
- Figura 15: Efeitos do tratamento com os agonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 e canabinóides CB_1 sobre a memória de localização de objetos em camudongos..... 77

Figure 16: Avaliação da interação funcional entre receptores A_1 e CB_1 no prejuízo de memórias dependentes de hipocampo. 80

Figura 17: Avaliação da interação funcional entre receptores A_1 e CB_1 no prejuízo de memórias dependentes de hipocampo 82

Figura 18: Efeitos da infusão na região CA1 do hipocampo do agonista dos receptores adenosinérgicos A_1 , CCPA, sobre a memória de localização de objetos em camudongos Swiss..... 84

Figura 19: Participação da região CA1 do hipocampo na interação funcional entre receptores A_1 e CB_1 no prejuízo da memória de localização de objetos..... 86

Figura 20: Participação da região CA1 do hipocampo na interação funcional entre receptores A_1 e CB_1 no prejuízo da memória de localização de objetos..... 89

Figura 21: Ensaio para a avaliação da interação de ligantes do receptor CB_1 e a ligação do antagonista radioativo do receptor A_1 , 3H -DPCPX. 92

Figura 22: Ensaio para a avaliação da interação de ligantes do receptor A_1 e a ligação do antagonista radioativo do receptor CB_1 , 3H -SR141716a..... 93

RESUMO

Os sistemas endocanabinóide e adenosinérgico, através dos receptores A_1 e CB_1 , compartilham uma série de características. Ou seja, ambos os receptores ativam proteínas $G_{i/o}$ para mediar suas principais ações, inibem a liberação de diferentes neurotransmissores e são expressos em grandes concentrações no córtex, hipocampo e cerebelo. Além disso, agonistas dos dois receptores prejudicam processos relacionados à memória espacial enquanto que antagonistas induzem melhora cognitiva. Apesar das semelhanças entre os dois sistemas e da importância da memória espacial na fisiopatologia de diferentes doenças, poucos estudos avaliaram a possível interação entre ambos os sistemas no controle da memória espacial. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 , na modulação da memória espacial. Para isso validou-se o modelo da localização de objetos em camundongos, o qual pareceu sensível a drogas amnésicas ou pró-mnemônicas. Além disso, demonstrou-se que a região CA1 do hipocampo participa da aquisição da memória de localização de objetos em camundongos. Posteriormente, utilizou-se o modelo recém validado e o labirinto aquático para avaliar o efeito pró-mnemônico da co-administração de antagonistas dos receptores A_1 e CB_1 . Esta interação melhora o aprendizado de camundongos em doses até 20 vezes menores do que aquelas utilizadas para produzir o mesmo efeito quando administradas isoladamente. Na sequência demonstrou-se que as ações da co-administração são mediadas, pelo menos em parte, pela liberação de glutamato e a interação deste com os receptores NMDA no hipocampo e no córtex pré-frontal. No último grupo de experimentos, demonstrou-se que os receptores A_1 e CB_1 do hipocampo interagem para modular a amnésia induzida por agonistas de ambos. Ou seja, o efeito amnésico do agonista A_1 é bloqueado pelo antagonista CB_1 , enquanto que o prejuízo de aprendizado induzido pelo agonista CB_1 é atenuado pelo agonista A_1 . Sugerindo que tanto o tônus adenosinérgico quanto o endocanabinóide interagem para a modulação da amnésia induzida por agonistas dos receptores CB_1 e A_1 , respectivamente. Por fim, conclui-se que os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através de seus receptores A_1 e CB_1 , interagem para o controle de processos associados à memória espacial de camundongos.

Palavras chaves: Sistema adenosinérgico. Sistema endocanabinóide. Receptor A_1 . Receptor CB_1 . Interação.

ABSTRACT

The adenosinergic and endocannabinoid systems share different characteristics through the A₁ and CB₁ receptors. For example, both are densely expressed in areas such as the cerebellum, prefrontal cortex, and hippocampus. The binding of agonists to them activates Gi/o proteins and similar mechanisms of signal transduction. Functionally, A₁ and CB₁ receptor activation inhibits the release of different neurotransmitters. In animal models of spatial learning, A₁ and CB₁ receptor agonists and antagonists have been reported to impair and to facilitate learning and memory, respectively. Despite these evidences, there are no studies evaluating the interaction between both systems in spatial memory processes. Initially, we have done a pharmacological validation of the object-location task in mice. This task is sensitive to amnesic and pro-mnemonic drugs, and the expression of memory seems to be dependent on the CA1 hippocampus. In a second set of results, we have shown that coadministration of subeffective doses of A₁ and CB₁ antagonists improves acquisition of spatial learning evaluated either in the water maze or in the object-location task. This effect was dependent on glutamate release into the hippocampus and prefrontal cortex. The blockade of NMDA receptors in the CA1 hippocampus and prefrontal cortex counteracts the effects of the coadministration evaluated in the object-location task. This suggests that the simultaneous blockade of the adenosinergic and endocannabinoid tonuses might enhance memory, and that the mechanism of this effect is dependent on glutamate release into the hippocampus and prefrontal cortex. The last group of experiments evaluated the interaction between A₁ and CB₁ receptors in the amnesia induced by the agonists of both. The result suggests that the amnesia induced by an A₁ agonist is blocked by a CB₁ receptor antagonist. On the other hand, the learning deficits induced by the CB₁ receptor agonist are attenuated by the A₁ receptor activation. This suggests that the adenosinergic and endocannabinoid systems might modulate amnesia induced either by A₁ or CB₁ agonists. Finally, these results also suggest that the adenosinergic and endocannabinoid systems interact to modulate behavioral processes associated with spatial memory.

Key Words: Adenosinergic system. Endocannabinoid system. A₁ receptor. CB₁ receptor. Interaction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Memória espacial

Antes de discorrer a respeito da memória espacial é importante contextualizá-la dentro das diferentes classificações de memória, bem como deixar claro a diferença entre aprendizado e memória. De acordo com Kandel e colaboradores (2000), aprendizado é o processo no qual adquirimos conhecimentos e memória é a sua codificação, armazenamento e posterior evocação. Desta forma, percebe-se que memória não é algo estático, isolado ou uma simples função cerebral, sendo melhor caracterizada como uma rede complexa de funções inter-relacionadas trabalhando para manejar informações.

As classificações da memória são baseadas em observações clínicas e/ou evidências neuropsicológicas. Em geral, memória pode ser dividida em memória de curta ou longa duração. A memória de curta duração possui capacidade limitada e dura somente alguns segundos a minutos. Enquanto que a memória de longa duração armazena quantidades maiores de informações por horas ou até anos (Kandel *et al.*, 2000). Outros autores propõem que a memória de longa duração pode ser dividida em declarativa (explícita) e a não-declarativa (implícita) (Anderson, 1976). A memória declarativa refere-se à informação que é transmitida, podendo ser subdividida em episódica e semântica. A memória não declarativa está relacionada a habilidades motoras (Squire, 1986; Tulving e Schacter, 1990).

Com relação à memória espacial, O'Keefe e Nadal (1978) classificaram-na como um subtipo de memória episódica porque armazena informações dentro da organização espaço-tempo. Todavia, outros autores sugerem que a memória espacial faz parte de várias categorias, uma vez que envolve aspectos da memória não-declarativa, declarativa, bem como das memórias de curta e longa duração (Moscovitch *et al.*, 2006). Usualmente este tipo de memória está relacionado com a resposta da pergunta “onde?”, a qual pode ser obtida através de comportamentos exploratórios comuns a todas as espécies de animais. Estes comportamentos são considerados a expressão da

curiosidade natural ou a necessidade de adquirir informações quando os sujeitos são expostos a novos ambientes ou estímulos (Thinus-Blanc, 1996). Assim, a memória espacial poderia ser considerada como a função cerebral responsável por reconhecer, codificar, armazenar e evocar as informações espaciais sobre a organização de objetos ou rotas específicas (Kessels *et al.*, 2001).

A organização desta informação espacial envolve pelo menos duas dimensões, uma relativa ao espaço corporal e outra relacionada ao espaço externo. A informação obtida por estas duas fontes é organizada e utilizada por dois processos: conhecidos como estratégias egocêntricas e aloecêntricas (Burgess, 2006). A estratégia egocêntrica é baseada nas informações proporcionadas por pistas corporais, ou seja, nesta estratégia o sujeito funciona como seu próprio ponto de referência e desta forma as posições dos objetos são definidas em relação à posição do indivíduo no espaço (Klatzky, 1998). Por outro lado, a estratégia aloecêntrica depende de pistas espaciais, assim o sujeito memoriza a localização alvo utilizando-se de pontos de referência ambientais (Benhamou e Poucet, 1996). Desta forma, a localização de um alvo em particular é estabelecida através de pontos de referência próximos e distantes que são independentes do observador (Klatzky, 1998). Apesar de distintas, as estratégias egocêntricas e aloecêntricas trabalham em paralelo, sendo que a prevalência de uma sobre a outra dependerá de fatores específicos de cada tarefa realizada (Burgess, 2006).

1.1.1. A participação do hipocampo na memória espacial

A primeira evidência da participação do hipocampo no controle da memória surgiu com a descrição do caso do paciente H.M. na década de 1950, o qual apresentou amnésia severa após a remoção cirúrgica do lobo temporal medial (Scoville e Milner, 1957). Nos anos seguintes, diversos trabalhos com pacientes portadores de lesão hipocampal confirmaram o papel do hipocampo no controle da memória espacial (Maguire *et al.*, 1996; Abrahams *et al.*, 1997; Teng and Squire 1999; Rosenbaum *et al.*, 2000; Astur *et al.*, 2002). De maneira interessante, Maguire e colaboradores (2006) mostraram que motoristas de taxi da cidade de Londres, os quais demandam sobremaneira da memória espacial, possuem o volume hipocampal maior do que indivíduos controle. Além disso, trabalhos avaliando lesões ou o efeito do

envelhecimento sobre o hipocampo de roedores e primatas não-humanos, confirmam o papel fundamental desta área em tarefas relacionadas à memória espacial (de Bruin *et al.*, 2001; Pouzet *et al.*, 2002). De fato o hipocampo representa a estrutura chave para aprendizado espacial em diferentes seres vivos. Anatomicamente, o hipocampo possui três vias que ligam suas diferentes regiões: a via perforante, que se projeta a partir do córtex entorrinal até as células granulosas do giro denteado; a via das fibras musgosas, composta pelos axônios das células granulosas que se projetam para as células piramidais da região CA3 do hipocampo; e a via colateral de Shaffer, que consiste nas ramificações excitatórias das células piramidais da região CA3 e termina nas células piramidais da região CA1 (Kandel *et al.*, 2000).

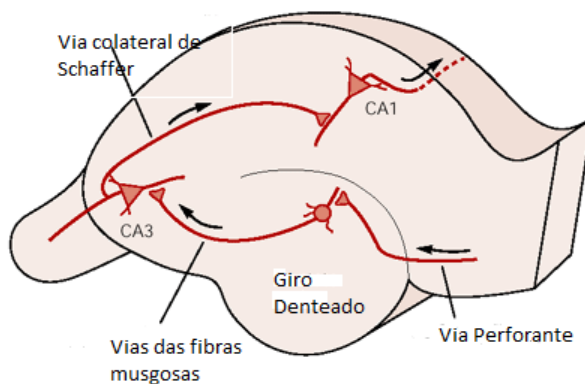


Figura 1. As três principais vias hipocâmpais. A via das fibras perforantes proveniente do córtex entorrinal forma sinapses com as células granulosas do giro denteado. As células granulosas projetam axônios que formam a via das fibras musgosas que se comunicam com as células piramidais da região CA3. Estas se projetam para a região CA1 através da via colateral de Schaffer. Adaptado de Kandel et al., (2000).

Esta organização anatômica facilitou a execução de estudos *in vivo* e *in vitro* que resultaram tanto na caracterização das células de lugar (O'Keefe e Dostrovsky, 1971), quanto do fenômeno da potencialização de longo prazo (LTP) (Bliss e Collingridge 1993), os quais podem ser considerados fundamentais para o processamento de memórias espaciais. No ano de 1948, Edward Tolman propôs que o aprendizado de animais em labirintos não seria proporcionado pela simples associação entre estímulos externos e respostas

comportamentais, uma vez que seus desempenhos melhoravam com os treinos. Desta maneira, Tolman concluiu que os animais criavam representações do ambiente externo para localizar um alvo dentro de um labirinto, chamando tal estratégia de mapa cognitivo. Esta teoria encontrou suporte com a caracterização das “células de lugar” no hipocampo (O’Keefe e Dostrovsky, 1971), as quais podem ser identificadas por registro *in vivo* de neurônios das regiões CA1 e CA3. Estas células possuem padrões de despolarização que variam de acordo com a conformação espacial de objetos no ambiente ou com as dimensões dos campos exploratórios (para revisão ver Kentros, 2006) e auxiliam na formação do mapa cognitivo.

Por outro lado, a LTP é considerada por muitos o substrato eletrofisiológico da memória. No hipocampo a LTP acontece em qualquer uma das três vias citadas anteriormente, porém a via colateral de Shaffer é a mais estudada delas. Nestas vias uma breve sequência de despolarizações produzirá alterações sinápticas duradouras de maneira a aumentar a força sináptica (Bliss e Collingridge 1993). Uma série de evidências aponta para o receptor N-metil D-aspartato (NMDA) como a estrutura chave para o início da LTP (Collingridge *et al.*, 1983; Shankar *et al.*, 1998). Descrevendo-a brevemente, pode-se dizer que a ativação do receptor NMDA leva ao influxo de cálcio na célula. Quando o cálcio entra na célula ativa proteínas quinases (por exemplo, a cálcio calmodulina quinase II) (Malenka *et al.*, 1989). Esta enzima ativa o receptor AMPA, o qual aumenta a condutância para o sódio e o potássio e por consequência a resposta celular ao glutamato (Lynch, 2004). O influxo de cálcio também leva a ativação da enzima adenilato ciclase a qual produz o segundo mensageiro AMPc. Este ativa a enzima proteína quinase C levando a fosforilação do fator de transcrição responsivo ao AMPc (CREB), a síntese proteica e a mudanças na estrutura sináptica (Eichenbaum e Cohen 2001).

1.1.2. O hipocampo além da memória espacial

Além da presença das células de lugar e da ocorrência da LTP, o hipocampo é um dos primeiros alvos para as mudanças fisiológicas e estruturais relacionadas ao envelhecimento (Hasan e Glees, 1973). Trabalhos recentes mostram que pacientes com esquizofrenia,

depressão, transtorno bipolar, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade ou dependência a drogas (Bolla *et al.*, 1998; Barch, 2005; Doyle, 2006; Clark *et al.*, 2009) apresentam prejuízos cognitivos associados ao mau funcionamento hipocampal. Desta forma, o entendimento dos diferentes processos relacionados à memória espacial é fundamental para a busca por tratamentos que exerçam efeito pró-cognitivo nestes pacientes.

Embora drogas que aumentam a atividade colinérgica (Salinas *et al.*, 1997), dopaminérgica (Hitchcott *et al.*, 1997) ou glutamatérgica (Lee *et al.*, 2007) nas sinapses, sejam utilizadas clinicamente para minimizar a disfunção cognitiva de pacientes com doenças de Alzheimer, Parkinson ou esquizofrenia, estas drogas não são livres de efeitos indesejados (Winslow *et al.*, 2011). Desta forma, a utilização de moduladores destes neurotransmissores possivelmente possibilitaria o efeito pró-cognitivo desejado com menos efeitos adversos.

Dentre os moduladores sinápticos, destacam-se a adenosina e os endocanabinóides (eCB). Ambos possuem ampla distribuição pelo sistema nervoso central (SNC) e diferentes evidências sugerem que estejam envolvidos com processos cognitivos (ver itens 1.2.3.4 e 1.3.3.4). Embora agonistas e/ou antagonistas destes sistemas já tenham sido utilizados clinicamente (Hayes, 2003; Roser *et al.*, 2008), foram descritos efeitos adversos significativos (Lee *et al.*, 2009). Sendo assim, a interação de drogas que modulem os dois sistemas poderia os efeitos cognitivos desejados e minimizar os efeitos adversos. Além disso, o entendimento da forma como os dois sistemas interagem para controlar os processos de memória espacial aumentaria as possibilidades de tratamento para patologias relacionadas ao mau funcionamento hipocampal.

1.2. O sistema adenosinérgico

A adenosina não é armazenada em vesículas nem sofre exocitose como um neurotransmissor clássico, ou seja, é liberada do citoplasma para o líquido extracelular (LEC) através de transportadores, ou origina-se após a quebra do ATP por uma série de enzimas. No LEC, a adenosina irá interagir com seus receptores e exercer sua importante função neuromodulatória.

1.2.1. As origens e o metabolismo da adenosina

A primeira forma de geração de adenosina no LEC é através da quebra enzimática do ATP. Este é co-liberado em associação a uma série de neurotransmissores, entre eles a acetilcolina, a dopamina, a serotonina (5-HT) e a noradrenalina (Fredholm *et al* 1982). Na sinapse, o ATP sofre hidrólise por enzimas ecto-nucleotidasas, ecto-fosfodiesterases e apirases, as quais podem desfosforilar qualquer nucleotídeo de adenina até 5'-AMP. Este sofrerá a ação da enzima 5'-nucleotidase a qual o transformará em adenosina (Robson *et al.*, 2006). Esta é uma importante via para a manutenção de tônus basal de adenosina no cérebro e pode ser incrementada com a liberação de ATP a partir dos astrócitos (Pascual *et al.*, 2005).

Outro mecanismo regulador dos níveis de adenosina no LEC é a difusão facilitada por transportadores de nucleotídeos. Existem dois tipos de transportadores conhecidos: 1) aqueles que transportam à adenosina através da membrana de acordo com a gradiente de concentração; 2) ou ainda os transportadores que levam a adenosina para dentro da célula, mesmo contra a gradiente de concentração (Geiger e Fida, 1991). As concentrações intracelulares de adenosina livre são mantidas baixas, devido à atividade da enzima adenosina quinase, desta forma o fluxo normal de adenosina é em direção ao interior celular (Dunwiddie e Masino, 2001). Todavia, qualquer estímulo (por exemplo, isquemia) que aumente as concentrações intracelulares de adenosina (para revisão ver Cunha, 2005) fará com que a adenosina saia para o espaço extracelular. Outra via para a formação de adenosina intracelular, é a quebra da S-adenosilhomocisteína (SAH) pela enzima SAH-hidrolase formando adenosina e homocisteína (Dunwiddie e Masino, 2001).

A inativação da adenosina acontece tanto pela transformação da mesma à AMP através da ação da enzima adenosina quinase. Ou por sua transformação a inosina pela enzima adenosina deaminase. As duas reações acontecem no meio intracelular, sendo a via da adenosina quinase mais efetiva quando as concentrações de adenosina são menores. Por outro lado, a via da adenosina deaminase ganha importância quando crescem as concentrações de adenosina (Meghji, 1991).

1.2.2. Os receptores adenosinérgicos

Existem quatro receptores para a adenosina, são eles: os receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Todos são receptores acoplados a proteína G (GPCR) e tradicionalmente podem ser divididos em dois grupos: aqueles que inibem a enzima adenilato ciclase, os receptores A_1 e A_3 ; e o grupo dos receptores que estimulam a adenilato ciclase, composto pelos receptores A_{2A} e A_{2B} (Fredholm *et al.*, 2001). Entretanto esta classificação pode ser revista, uma vez que os receptores adenosinérgicos parecem mediar suas ações por diferentes vias de transdução do sinal, dependendo do grau de ativação e de sua localização tecidual e celular (Cunha, 2005).

Os receptores A_1 terão suas características detalhadas no item 1.2.3. Os receptores A_{2A} são expressos no cérebro em menores quantidades que os receptores A_1 , porém apresentam funções relevantes no estriado, bulbo olfatório e hipocampo (para revisão ver Cunha *et al.*, 2008). O papel dos receptores A_{2A} parece estar relacionado com sua habilidade de interagir com outros receptores para neurotransmissores e neuromoduladores (para revisão ver Ribeiro e Sebastião, 2011), ou seja, realizar uma espécie de “sintonia fina” da atividade nervosa. Com relação aos receptores A_{2B} , sua presença foi identificada em células não neuronais como: macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células endoteliais (Aherne *et al.*, 2011). Além disso, embora tenham baixa afinidade pela adenosina em situações fisiológicas, trabalhos recentes indicam um papel protetor importante em situações de hipoxia (Aherne *et al.*, 2011). Por fim, a presença dos receptores A_3 também foi demonstrada em neurônios, tanto em ensaios de ligação quanto em estudos funcionais. Entretanto, diferentemente dos receptores A_1 e A_{2A} as funções dos receptores A_3 parecem ser mais evidentes em astrócitos e na microglia (Borea *et al.*, 2009).

1.2.3 O receptor adenosinérgico A_1

1.2.3.1. Receptor A_1 : distribuição tecidual e localização celular

Embora existam maiores quantidades do receptor A_1 no neocórtex e em outras áreas límbicas, estes receptores também são abundantes no estriado, gânglios da base e cerebelo (Fastbom *et al.*, 1987). Dentre as diferentes células cerebrais, sua expressão é maior em neurônios, todavia também estão presentes nos astrócitos (Biber *et al.*, 1997), micróglia (Gebicke-Haerter *et al.*, 1996) e olidodendrócitos (Othman *et al.*, 2003).

Em neurônios hipocampais, os receptores A_1 exibem localização tanto pré- quanto pós- sináptica destes receptores (Tetzlaff *et al.*, 1987; Rebola *et al.*, 2003). Estes dados, associados a trabalhos que mostram o efeito inibitório de agonistas do receptor A_1 sobre a liberação de glutamato (Ambrosio *et al.*, 1997), acetilcolina (Cunha *et al.*, 1994) ou serotonina (Okada *et al.*, 2001), conclui-se que parte dos receptores A_1 hipocampais localizam-se em terminais pré-sinápticos de neurônios glutamatérgicos, colinérgicos ou serotoninérgicos. Com relação aos receptores A_1 pós-sinápticos, Rebola e colaboradores (2003) mostraram que estes se localizam em terminais marcados para as subunidades 1, 2a e 2b do receptor NMDA, sugerindo que estes receptores A_1 auxiliam no controle das funções do receptor NMDA nos fenômenos de plasticidade sináptica hipocampal. Além disso, existem diferenças na distribuição dos receptores A_1 dentro das diferentes áreas hipocampais. Ou seja, a expressão de RNAm para estes receptores sugere que exista uma maior concentração de receptores na região CA3 do que na CA1 (Ochiishi *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1997). Entretanto, a ligação do agonista radioativo para o receptor A_1 (^3H -CHA) é muito parecida nas duas áreas (Johansson *et al.*, 1997).

É importante salientar que os receptores A_1 também possuem papel fundamental em outros tecidos além dos neuronais. Ou seja, é através do receptor A_1 que a adenosina reduz a frequência cardíaca (Froldi e Belardinelli, 1990), a taxa de filtração glomerular e a liberação renal de renina (Spielman e Arend, 1991), induz broncoconstrição (El Hashim *et al.*, 1996) e inibe a lipólise. Desta forma, agonistas deste receptor são candidatos ao tratamento de arritmias, angina ou diabetes do tipo II (para revisão ver Kiesman *et al.*, 2009).

1.2.3.2. Receptor A₁: Vias de transdução do sinal

O receptor A₁ tem suas ações mediadas pela ligação proteínas Gi/o e a consequente inibição da enzima adenilato ciclase, ativação de fosfolipases, inibição de canais de cálcio ou ainda ativação de canais de potássio (Hass e Selbach, 2000). Com relação às diferentes isoformas da subunidade α da proteína G, em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos os receptores A₁ interagem com as subunidades G_{ai1}, G_{ai2}, G_{ai3} e G_{o1} (Straiker *et al.*, 2002).

Em tecidos neuronais as ações dos receptores A₁ parecem ser mediadas basicamente pela interação de proteínas Gi com canais de cálcio ou potássio. Por exemplo, em cultura de células piramidais da região CA3 do hipocampo a ativação de receptores A₁ inibe a corrente de cálcio por canais do tipo N (Mogul *et al.*, 1993), sugerindo que o efeito inibitório pré-sináptico destes receptores seja mediado pela redução do influxo de cálcio (Wu e Saggau 1994). Ainda no hipocampo, a hiperpolarização causada por agonistas A₁ foi acompanhada por aumento da condutância para o potássio em neurônios piramidais (Gerber *et al.*, 1989).

Em células CHO transfectadas com o receptor A₁, a transdução do sinal é mediada pela interação da subunidade G α i e a via do trifosfato de inositol/diacilglicerol ou ainda, o dímero $\beta\gamma$ parece ativar a via da fosfolipase A2 (Freund *et al.*, 1994). Em células de músculo liso, a ativação do receptor A₁ aumenta a concentração de cálcio intracelular através da formação de trifosfato de inositol (Gerwins e Fredholm, 1995). Por fim, em células atriais a ativação do receptor A₁ aumenta a condutância para o potássio através de canais retificadores de corrente (Belardinelli e Isenberg, 1983)

1.2.3.3. Receptor A₁: Interações funcionais

A adenosina, através da interação com receptores A₁ pré- e pós-sinápticos, é responsável pela modulação das funções de uma série de neurotransmissores e neuromoduladores. Esta ação neuromodulatória acontece tanto por interação com os mecanismos de transdução do sinal, quanto através da formação de dímero com outros receptores (para revisão ver Ferre *et al.*, 2007). Nesta sessão serão descritas as interações

funcionais entre as ações da adenosina mediadas pelo receptor A_1 e outros GPCR, com exceção do receptor CB_1 , a qual será descrita no tópico 1.4.2.

Uma das primeiras interações descritas foram aquelas dos receptores A_1 com os receptores dopaminérgicos. O receptor A_1 interage com os receptores D_1 nos gânglios da base para controlar a liberação de GABA na substância negra (Floran *et al.*, 2002) e no núcleo accumbens (Mayfield *et al.*, 1999), bem como a liberação da própria dopamina no estriado (O'Neill *et al.*, 2007). Além disso, Le Crom e colaboradores (2002) demonstraram que a ativação do receptor A_1 parece facilitar a dessensibilização do receptor D_1 .

Além da dopamina, a adenosina através do receptor A_1 também controla as ações de diferentes neuropeptídeos. Por exemplo, o efeito analgésico da adenosina parece estar relacionado com a inibição tanto da liberação quanto da ação do peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, a qual é mediada pela interação da adenosina com o receptor A_1 (Carruther *et al.*, 2001). Ainda, Cunha-Reis e colaboradores (2008) demonstraram que a liberação hipocampal de GABA controlada pelo peptídeo intestinal vasoativo é regulada pela interação da adenosina com o receptor A_1 , proporcionando evidências da interação dos receptores A_1 com sinapses GABAérgicas hipocâmpais. Outro peptídeo que parece ter suas ações controladas pelos receptores A_1 é o neuropeptídeo Y (NPY), uma vez que agonistas do receptor A_1 bloqueiam o efeito inibitório do NPY sobre a exocitose de glutamato (Qian *et al.*, 1997).

Com relação aos receptores metabotrópicos do glutamato (mGLU), as evidências sugerem que são os diferentes mGLU que parecem regular a atividade do receptor A_1 . Por exemplo, o efeito inibitório sobre a exocitose glutamato de agonistas dos receptores A_1 é inibido por agonistas dos receptores mGLU (Budd e Nichols, 1995). Por outro lado, em astrócitos agonistas dos receptores A_1 e mGLU parecem somar seus efeitos, uma vez que aumentam o influxo de cálcio de maneira significativa quando perfundidos conjuntamente (Ogata *et al.*, 1994).

Por fim, é preciso destacar as interações entre os receptores A_1 e A_{2A} . Inicialmente mostrou-se que a ativação do receptor A_{2A} diminua o papel inibitório de agonistas A_1 sobre sinapses excitatórias (Cunha *et al.*, 1994). Recentemente, Ferré e colaboradores (2007) demonstram que ambos os receptores formam dímeros. Este dímero A_1/A_{2A} parece controlar a liberação de glutamato de maneira dependente das concentrações de adenosina. Ou seja, aumentos ou diminuições nas

concentrações de adenosina extracelular teriam efeitos opostos sobre a liberação de glutamato (para revisão ver: Sebastião e Ribeiro, 2009).

1.2.3.4. Receptor A₁: Efeitos de agonistas e antagonistas sobre a memória espacial

A própria adenosina como um neuromodulador tem um importante papel em mecanismos de aprendizado e memória por interagir com o receptor A₁. Ou seja, diversos trabalhos demonstram que agonistas deste receptor prejudicam tanto a LTP hipocampal (Arai *et al.*, 1990) quanto o desempenho de animais em tarefas de aprendizado dependentes de hipocampo (Normile e Barraco, 1991; Suzuki *et al.*, 1993).

Por outro lado, os antagonistas dos receptores A₁ parecem ser úteis no tratamento de distúrbios de memória (Stone *et al.*, 1995), uma vez que há trabalhos sugerindo que estas drogas facilitam a memória de animais testados na esQUIVA inibitória (Pereira *et al.*, 2002) e na tarefa de alternância espontânea (Schingnitz *et al.*, 1991). Além disso, antagonistas do receptor A₁ revertem os prejuízos de memória induzidos pela disfunção colinérgica (Pitsikas e Borsini, 1997), pela administração do antagonista NMDA, MK-801 (Fraser *et al.*, 1997) ou ainda pelo tratamento crônico com metilfenidato (Mioranzza *et al.*, 2011). Por fim, é importante ressaltar que a depleção dos receptores A₁ em camundongos parece não afetar o comportamento destes animais em tarefas de aprendizado e memória (Giménez-Llort *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2003; Giménez-Llort *et al.*, 2005).

1.3. O sistema endocanabinóide

O sistema endocanabinóide é composto pelos canabinóides endógenos (eCB), seus receptores e enzimas de síntese e degradação. Embora o termo endocanabinóide tenha sido proposto por Di Marzo e colaboradores no ano de 1994, pode-se dizer que a identificação do composto psicoativo da planta *Cannabis sativa*, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (Gaoni e Mechoulan, 1964), a caracterização dos receptores canabinóide do tipo 1 (CB₁) (Matsuda *et al.*, 1990) e canabinóide do tipo 2 (CB₂) (Munro *et al.*, 1993), bem como a identificação do primeiro

ligante endógeno anandamida (Devane *et al.*, 1992), foram fundamentais para todo o conhecimento acerca do tema produzido nos últimos anos.

1.3.1 Síntese e degradação dos endocanabinóides

Os eCB são lipídios originados a partir de ésteres, éteres e amidas de ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturada (Di Marzo *et al.*, 1998). Atualmente são conhecidos cinco eCB: desde os mais estudados N-aracdoniletanolamina (anandamida) e 2-aracdonilglicerol (2-AG) até os ainda menos conhecidos noladin, virodamina e N-aracdonildopamina (Pertwee, 2005). De maneira semelhante à adenosina, os eCBs não são armazenados em vesículas, sendo sintetizados e liberados a partir de estímulos fisiológicos como a despolarização neuronal (Di Marzo *et al.*, 1994) ou ainda patológicos como na resposta ao estresse (O'Sullivan *et al.*, 2011).

Existem várias vias para a síntese e degradação da anandamida e do 2-AG. A anandamida origina-se a partir de um precursor fosfolipídico, o N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina (NArPE). O NArPE é transformado em anandamida por quatro vias distintas, sendo que a mais estudada e direta (aquela que não produz intermediários) é a via catalisada pela enzima N-acil-fosfatidiletanolamina-fosfodiesterase (NAPA-PLD). As outras três vias são catalisadas pelas seguintes enzimas: 1) fosfolipase C e tirosina fosfatase; 2) fosfolipase A1/2 e fosfolipase D; 3) $\alpha\beta$ -hidrolase e glicerolfosfodiester-fosfodiesterase; (Liu *et al.*, 2008). Os intermediários produzidos nas três vias não possuem grande afinidade pelos receptores canabinóides e podem interagir com outros receptores. Por exemplo, o intermediário palmitoiletanolamina tem ação antiinflamatória enquanto que o oleoiletanolamina tem ação anoréxica (Alexander e Kendall, 2007). Ao contrário da anandamida, o 2-AG é sintetizado predominantemente a partir do diacilglicerol (DAG) através da ação da enzima DAG-lipase. Duas isoformas da DAG-lipase já foram clonadas (Sugiura *et al.*, 2006), sendo que a DAG-lipase α parece ser mais abundante no cérebro (Gao *et al.*, 2010).

A inativação dos eCB é dependente da recaptação destes para o interior celular. Embora tenham características lipídicas, as evidências sugerem que a recaptação ocorra através da difusão facilitada por

transportador (Di Marzo, 2008). Depois de re-captados, a anandamida é metabolizada pela enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), enquanto que o 2-AG é metabolizado pela monoacilglicerol lipase (MAGL) (Di Marzo e Petrosino, 2007), pelas enzimas $\alpha\beta$ -hidrolase 6 e 12, além da FAAH (Blankman *et al.*, 2007). É importante salientar que tanto a anandamina quanto o 2-AG podem tornar-se substratos para a enzima ciclooxigenase 2 (COX2) em situações onde ocorra a diminuição da atividade da FAAH ou da MAGL (Rouzer e Marnett, 2008). Por fim, existem evidências que os eCB possam ser metabolizados pela enzima lipooxigenase (Ueda *et al.*, 1995) ou ainda pelas enzimas do citocromo p450 (Bornheim *et al.*, 1995).

1.3.2. Os receptores canabinóides

A caracterização dos receptores canabinóides aconteceu na década de 90, cerca de 30 anos após a identificação do THC. O primeiro receptor identificado, o receptor CB₁, foi clonado inicialmente em ratos (Matsuda *et al.*, 1990) e, posteriormente, em seres humanos (Gerard *et al.*, 1991) e em camundongos (Chakrabarti *et al.*, 1995). A caracterização e clonagem do receptor CB₂ aconteceram na seguinte sequência: seres humanos (Munro *et al.*, 1993), camundongos (Shire *et al.*, 1996) e ratos (Griffin *et al.*, 2000). Entretanto, dados recentes sugerem que existem duas isoformas para os receptores CB₂ em humanos e camundongos (Liu *et al.*, 2009).

Em humanos, o receptor CB₁ é amplamente distribuído pelo cérebro e medula espinhal (Howllet, 2002). Por outro lado, o receptor CB₂ é expresso em grandes níveis nos leucócitos e baço e, em menores concentrações, no tecido muscular, fígado, intestino, testículos e tecido adiposo (Roche *et al.*, 2006). Além disso, uma segunda isoforma do receptor CB₂ parece existir no cérebro (Liu *et al.*, 2009).

Embora os receptores CB₁ e CB₂ sejam bem conhecidos e caracterizados, muito se discute sobre a existência de um receptor "CB₃". Caso sejam considerados como receptores canabinóide todos aqueles com afinidade para os eCB, teríamos uma grande variedade de receptores candidatos. Uma vez que a anandamida exhibe afinidade por diferentes receptores, por exemplo: receptor TRP do tipo vanilóide (TRPV) (Huang *et al.*, 2002), o receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) (Drumota *et al.*, 2004), o receptor acoplado a proteína G 119

(GPR119) (Overton *et al.*, 2005), os receptores PPAR α (Sun *et al.*, 2007) e PPAR γ (Bouaboula *et al.*, 2005). Em meio a tal miscelânea, o subcomitê do receptor canabinoide, o qual é vinculado ao comitê de nomenclatura de receptores e classificação de drogas da União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica, propuseram critérios para que um receptor seja considerado o “CB₃”. Dentre estes critérios, temos: 1) o receptor deve ser ativado em seu sítio ortostérico, com potência significativa, por um ligante CB₁/CB₂; 2) o receptor deve ser ativado por um agonista CB₁/CB₂ endógeno em concentrações “fisiologicamente” relevantes; 3) caso seja um GPCR, deve possuir sequência e aminoácidos semelhantes aos receptores CB₁/CB₂; 4) Não deve ser um receptor que já possua um ligante endógeno bem estabelecido; 5) Deve ser expresso em células de mamíferos que sabidamente liberem eCB em concentrações relevantes (Pertwee *et al.*, 2010). Desta maneira pode-se dizer resumidamente que nenhum dos receptores descritos acima se encaixa em todos os critérios estabelecidos.

1.3.3. O receptor canabinoide do tipo 1

1.3.3.1. Receptor CB₁: Distribuição tecidual e localização celular

Herkenhan e colaboradores (1991), utilizando o agonista radioativo CB₁ ³[H] CP-55,940, publicaram o trabalho pioneiro o qual concluía que a localização dos receptores CB₁ coincidia com os substratos neurais sugeridos para os efeitos comportamentais de agonistas deste receptor. Nos anos seguintes diferentes técnicas demonstraram não só a ampla distribuição destes receptores pelo SNC, mas também que o receptor CB₁ é o GPCR com maior expressão no cérebro (Henkerhan *et al.*, 1991; Howlett *et al.*, 2002). Grandes concentrações dos receptores CB₁ foram detectadas no bulbo olfatório, gânglios da base, cerebelo, hipocampo e áreas límbicas do córtex cerebral, especialmente o córtex cingulado e frontal (Henkerhan *et al.*, 1991).

Com relação ao hipocampo, os receptores CB₁ foram detectados em maiores concentrações em interneurônios GABAérgicos positivos para a presença da colecistocinina (CCK) (Marsicano e Lutz, 1999; Freund *et al.*, 2003). Por outro lado, a presença de receptores CB₁ em terminais glutamatérgicos foi sugerida através da presença de RNAm em neurônios piramidais da região CA1 e CA3 (Matsuda *et al.*, 1993; Marsicano e Lutz, 1999). Posteriormente, foi confirmada a presença do receptor tanto nas células piramidais (Marsicano *et al.*, 2003) quanto nas células musgosas (Johnston e Amaral, 2004), as quais parecem conter as maiores quantidades de receptor CB₁ dentre os neurônios glutamatérgicos hipocâmpais (Monory *et al.*, 2006). Por fim, é importante mencionar que além da localização neuronal, os receptores CB₁ foram caracterizados em cultura de microglia (Walter *et al.*, 2003) e astrócitos de ratos (Sánchez *et al.*, 1998).

Em neurônios, os receptores CB₁ localizam-se essencialmente nos terminais pré-sinápticos, onde exercem sua função neuromodulatória. Por outro lado, pequenos níveis de receptores CB₁ foram encontrados em partes proximais do axônio, dendritos ou no corpo celular (Nyiri *et al.*, 2005; Leterrier *et al.*, 2006). Além da presença na membrana citoplasmática, McIntosh e colaboradores (1998) demonstraram a presença de receptores CB₁ na membrana nuclear de neuroblastomas e trabalhos recentes sugerem que a maioria dos receptores não chega à membrana citoplasmática, ou seja, permanecem associados ao lisossomo (Rozenfel e Devi, 2008) onde podem interagir com a subunidade G_{ai} da proteína G, sugerindo que os receptores CB₁ intracelulares possam ter funções ainda não conhecidas.

1.3.3.2. Receptor CB₁: Mecanismos de transdução do sinal

A ativação de proteínas Gi/o e a consequente inibição da atividade da enzima adenilato ciclase foi a primeira via de transdução do sinal caracterizada agonistas do receptor CB₁ (Howlett e Fleming 1984, Howlett 1985, Howlett *et al.*, 1986). Há evidências que as isoformas 1,3,5,6 ou 8 da adenilato ciclase estão envolvidas em tal efeito, uma vez que sua co-expressão resulta em diminuição das concentrações de AMPc mediada pela ativação do receptor CB₁ (Rhee *et al.*, 1998).

Além disso, às diferentes isoformas da proteína Gi parecem ser ativadas de maneira distinta por diferentes agonistas do receptor CB₁

(Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Isto é, em células N18TG2 a ligação do agonista CB₁, WIN 55,212-2, leva ativação das isoformas G₁₁, G₁₂ e G₁₃ enquanto que a metanandamida atua como agonista para a isoforma G₁₃ e como agonista inverso para a isoforma G₁₁ e G₁₂ (Mukhopadhyay e Howlett 2005). Outro trabalho, demonstrou-se que o WIN 55,212-2 ativa isoformas da proteína Gi/o com eficácia diferente para cada uma delas, sugerindo que mesmo um único ligante pode ativar diferentes vias (Prather *et al.*, 2000).

Além da inibição da adenilato ciclase, as proteínas G_{i/o} ativadas pelo receptor CB₁ também ativam canais de potássio retificadores de corrente (GIRKs) (Henry e Chavkin 1995, Mackie *et al.*, 1995). Diferentes trabalhos mostram a ativação do GIRK2 e do GIRK4 tanto em oócitos quanto em neurônios (Henry e Chavkin 1995, McAllister *et al.*, 1999, Guo e Ikeda 2004, Azad *et al.*, 2008). Os receptores CB₁ também modulam a função de canais de cálcio voltagem dependentes. A inibição de canais de cálcio do tipo L foi demonstrada em vasos sanguíneos cerebrais (Gebremedhin *et al.*, 1999), em células da retina (Straiker *et al.*, 1999) e no trato solitário de ratos (Endoh 2006). Além disso, o efeito inibitório pré-sináptico dos eCB parece ser mediado pela ativação do receptor CB₁ e a subsequente inibição do canal de cálcio do tipo N (Freund *et al.*, 2003, Howlett 2005). Por fim, os canais de cálcio do tipo P/Q também são modulados negativamente pelos receptores CB₁ (Mackie *et al.*, 1995, Fisyunov *et al.*, 2006).

Por outro lado, em células pré-tratadas com a toxina pertussis a ativação do receptor CB₁ leva a ativação da adenilato ciclase, sugerindo que o receptor CB₁ possa interagir com proteínas G_s (Kearn *et al.*, 2005). Além disso, a co-expressão das isoformas 2,4 ou 7 da adenilato ciclase também resultou na produção de AMPc mediada pela ativação do receptor CB₁, entretanto este efeito provavelmente é mediado pelo dímero G_{βγ} (Rhee *et al.*, 1998). Por fim, a via da MAPK é ativada após a ligação de agonistas a GPCR e está associada à proliferação, diferenciação ou morte celular. A cascata da MAPK inclui a ativação de proteínas como ERK 1/2, proteína quinase c-Jun NH₂-terminal (JNK), p38 MAPK ou ERK5, as quais são ativadas após a ligação de agonistas ao receptor CB₁ *in vivo* ou *in vitro* (Howlett, 2005; Paradisi *et al.*, 2008).

1.3.3.3. Receptor CB₁ – Interações funcionais

A localização pré-sináptica e o papel inibitório do receptor CB₁ fazem as ações mediadas por este receptor passíveis de interação funcional com diversos neurotransmissores. Neste contexto, há trabalhos mostrando que o receptor CB₁ possui amplo papel inibitório nas sinapses do SNC, exercendo influência sobre a liberação de acetilcolina (Gessa *et al.*, 1998), GABA (Tersigni e Rosemberg, 1996), noradrenalina (Gobel *et al.*, 2000), dopamina (Cadogan *et al.*, 1997), serotonina (Nakazi *et al.*, 2000), glutamato (Sulivam *et al.*, 1999), glicina (Jennings *et al.*, 2001), d-aspartato (Breivogel *et al.*, 1999) e colecistocinina (Beinfeld e Conally, 2001).

Dentre os exemplos de interação funcional pode-se citar aquela que ocorre entre o sistema eCB e os opióides endógenos, evidenciada por diferentes estudos que mostram tanto sensibilização (Pontieri *et al.*, 2001; Vigano *et al.*, 2004) quanto tolerância cruzada (Robledo *et al.*, 2008) entre drogas opióides e canabinóides. Outros trabalhos sugerem interação entre o receptor CB₁ e o receptor dopaminérgico D₃, uma vez que o bloqueio do receptor CB₁ potencializa o efeito de busca por alimento induzido pelo agonista D₃, quinerolana (Duarte *et al.*, 2004). Além disso, a interação funcional entre receptores CB₁ e quimiocinas (uma família de pequenas proteínas associadas a migração celular) foi sugerida na substância cinzenta periaquedutal de ratos, onde a ativação dos receptores para as quimiocinas potencializou o efeito analgésico do agonista canabinóide WIN 55,212-2 (Benamar *et al.*, 2008). Recentemente, Hudson e colaboradores (2010) sugeriram a interação funcional e física entre receptores CB₁ e β_2 -adrenérgicos em células HEK 293H.

É importante ressaltar que neste tópico foram citadas apenas algumas das interações funcionais dos receptores CB₁, com o objetivo de mostrar que os receptores canabinóides interagem com uma série de outros receptores além dos adenosinérgicos. A propósito, as interações CB₁ x adenosina serão descritas no item 1.4.

1.3.3.4. Receptor CB₁ – Efeitos de agonistas e antagonistas sobre a memória espacial

As grandes concentrações do receptor CB₁ (Herkenham *et al.*, 1991) e a presença da anandamida e do 2-AG no hipocampo e em outras regiões associadas a memória (Felder *et al.*, 1996; Di Marzo *et al.*,

2000) são consistentes com a noção de que o sistema eCB participa da modulação de processos cognitivos.

O prejuízo do aprendizado e da memória está entre os efeitos comportamentais mais comuns dos canabinóides (Lichtman *et al.*, 1995). Embora o efeito amnésico do THC já tenha sido descrito em humanos (Ranganathan e D'Souza, 2008), a maioria dos trabalhos envolve animais. Estes estudos mostram que agonistas do receptor CB₁ prejudicam a memória dependente do hipocampo em modelos de condicionamento operante (Suenaga *et al.*, 2008; Hampson e Deadwyler, 2000), memória espacial de trabalho (Lichtman *et al.*, 1996; Mishima *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 1991; Wegener *et al.*, 2008) e memória espacial de referência (Varvel *et al.*, 2001; Varvel *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2007; Da Silva e Takahashi, 2002). Além disso, a infusão de agonistas canabinóides no hipocampo, principalmente o dorsal (Wise *et al.*, 2009), afeta o desempenho dos animais avaliados tanto no labirinto radial quanto no labirinto em T elevado (Lichtman *et al.*, 1995; Egashira *et al.*, 2002; Suenaga e Ichitani, 2008).

Por outro lado, alguns autores relatam que a administração do antagonista do receptor CB₁ - rimonabanto (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1995) - melhora a memória de animais testados no labirinto radial (Lichtman, 2000; Wolff e Leander, 2003), na tarefa da memória de reconhecimento social (Terranova *et al.*, 1996) e no labirinto em T elevado (Takahashi *et al.*, 2005). Com relação aos outros antagonistas/agonistas inversos do receptor CB₁, o AM 251 parece reverter o prejuízo da memória de reconhecimento de objetos induzido pelo MDMA (Nawata *et al.*, 2010), o antagonista CB₁, SLV330, induziu melhora cognitiva em ratos testados na tarefa do reconhecimento social (De Bruin *et al.*, 2010) e o antagonista CB₁, CE, quando administrado antes ou imediatamente após o treino, reduziu o número de erros dos animais testados no labirinto radial (Wise *et al.*, 2008).

Corroborando os estudos farmacológicos, trabalhos com camundongos que tiveram os receptores CB₁ deletados (*Knockout*) mostram que estes animais possuem plasticidade sináptica aumentada (Bohme *et al.*, 2000) e melhor desempenho na tarefa de reconhecimento de objeto quando comparado ao animal controle (Reibaud *et al.*, 1999; Maccarrone *et al.*, 2002). Em resumo, o conjunto destes dados sugere que o sistema eCB, através dos receptores CB₁, está envolvido na modulação da memória espacial e que antagonistas destes receptores parecem possuir atividade pró-cognitiva. Todavia, esta generalização é válida somente para este tipo de memória, uma vez que o perfil de ação

de drogas canabinóides sobre outros tipos de memória é bastante diverso. Por exemplo, diferentes autores mostram que o bloqueio dos receptores CB₁ prejudica o processo de extinção de memórias aversivas enquanto que a ativação deste receptor parece facilitar (Pamplona *et al.*, 2006; de Oliveira Alvares *et al.*, 2008).

1.4. Interações adenosina X canabinóides

1.4.1 Comparações gerais

Reverendo as características de ambos os receptores descritas anteriormente, pode-se perceber que os receptores A₁ e CB₁ são dois GPCR amplamente distribuídos pelo SNC de mamíferos, com grandes concentrações em áreas como cerebelo, córtex pré-frontal e hipocampo (Fredholm *et al.*, 2005; Mackie, 2006). A ligação de agonistas endógenos ou exógenos em ambos os receptores leva à ativação de proteínas Gi/o e desencadeia mecanismos de sinalização intracelular semelhantes, como por exemplo: inibição da atividade da enzima adenilato ciclase (Van Calker *et al.*, 1979; Howlett *et al.*, 1986), bloqueio de canais de cálcio do tipo N e P/Q (Ambrósio *et al.*, 1997; Twitchell *et al.*, 1997), ou ainda a ativação de canais de potássio retificadores de corrente (Takigawa e Alzheimer, 2002; Guo e Ikeda, 2004). Comportamentalmente, a ativação tanto de receptores A₁, quanto CB₁, induz prejuízos de aprendizado em animais (Suzuki *et al.*, 1993; Von Lubitz *et al.*, 1993; Varvel *et al.*, 2001; Da Silva e Takahashi, 2002) e, por outro lado, o bloqueio de ambos reverte prejuízos induzidos por drogas amnésicas (Mioranza *et al.*, 2011; Guidali *et al.*, 2011;) ou lesões (Harkany *et al.*, 1999; Mazzola *et al.*, 2003). No quadro 1 são descritas mais características de ambos os receptores com o objetivo de possibilitar maiores comparações.

Quadro 1: Comparações entre diferentes aspectos relativos aos receptores adenosinérgicos-A₁ e canabinóides-CB₁

	RECEPTOR A₁	RECEPTOR CB₁	REFERÊNCIA
Mecanismo de transdução primário	G _i /G _o Inibição da adenilato ciclase; Inibição de canais de Ca ²⁺ tipos N, P/Q; Ativação de canais de K ⁺ retificadores de corrente;	G _i /G _o Inibição da adenilato ciclase; Inibição de canais de Ca ²⁺ tipos N, P/Q; Ativação de canais de K ⁺ retificadores de corrente;	Cordeaux <i>et al.</i> , 2004; Howlett <i>et al.</i> , 1986; Mackie e Hille, 1992; Henry e Chavkin, 1995;
Mecanismo de transdução secundário	G _s Estimulação da adenilato ciclase; G _q /G ₁₁ Estimulação da fosfolipase C	G _s Estimulação da adenilato ciclase;	Cordeaux <i>et al.</i> , 2004; Glass e Felder, 1998;
Distribuição tecidual no Sistema Nervoso Central	Córtex, cerebelo, hipocampo, bulbo olfatório, estriado.	Córtex, cerebelo, hipocampo, gânglios da base.	Mahan <i>et al.</i> , 1991; Lopes <i>et al.</i> , 2004; Herkenham <i>et al.</i> , 1990;
Distribuição tecidual em outras áreas	Rins, coração, testículos, pulmões;	Neurônios dos sistemas sensorial somático e autônomo; Testículos;	Mahan <i>et al.</i> , 1991; Pertwee <i>et al.</i> , 1992;
Localização sináptica	Pré- e Pós-sinapse;	Pré-sinapse;	Howlett <i>et al.</i> , 2002; Oshiichi <i>et al.</i> , 1999 ;

Efeitos de agonistas	Analgésia, inibição da liberação de glutamato, amnésia, inibição da liberação de renina.	Analgésia, inibição da liberação de neurotransmissores, amnésia, hipolocomoção.	Fredholm <i>et al.</i> , 2010; Abood <i>et al.</i> , 2010;
-----------------------------	--	---	--

1.4.2. Evidências de interação entre os receptores A₁ e CB₁

Além das semelhanças neuroanômicas e neuroquímicas já apresentadas, há evidências que os receptores A₁ e CB₁ interagem em diferentes áreas cerebrais. Os primeiros indícios mostraram que a incoordenação motora induzida por agonistas canabinóides poderia ser atenuada pela infusão intracerebelar de antagonistas do receptor A₁ (Dar, 2000). Posteriormente, De Santy e Dar (2001) sugeriram que o sistema adenosinérgico, via receptor A₁, poderia facilitar a incoordenação motora induzida pelo THC. Na sequência, outros autores demonstraram a dessensibilização heteróloga entre ambos os receptores. Ou seja, Kouznetsova e colaboradores (2002) mostraram a diminuição da potência do agonista canabinóide (WIN 55,212-2) em neurônios hipocâmpais depois da incubação do agonista A₁. Além disso, outros pesquisadores evidenciaram a atenuação da inibição da enzima adenilato ciclase induzida por agonistas A₁ após o tratamento crônico com THC (Selley *et al.*, 2004). Outra evidência da interação de ambos os receptores é sugerida pelo fato do antagonista dos receptores CB₁, AM 251 10 µM, ser capaz de deslocar para a direita a ligação de agonistas do receptor A₁ (Savinainen *et al.*, 2003), fato que figura entre as hipóteses para explicar a ação do AM 251 como agonista inverso dos receptores CB₁ (Pertwee, 2005).

Trabalhos recentes mostram que o efeito inibitório de agonistas CB₁ sobre a liberação de glutamato em sinapses hipocâmpais é modulado pelo tônus de adenosina endógena, através da ativação do receptor A₁ (Hoffman *et al.*, 2010). Nesta linha de raciocínio, Souza e

colaboradores (2011) mostraram que a ativação dos receptores A_1 também pode atenuar o efeito inibitório de agonistas CB_1 sobre a liberação de GABA. Por outro lado, é importante deixar claro que Serpa e colaboradores (2009) não evidenciaram “cross-talk” entre os receptores A_1 e CB_1 na modulação da LTP avaliada em fatias de hipocampo de ratos.

2. JUSTIFICATIVA

Desta forma, conforme descrito na Introdução desta tese, os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através da modulação de seus receptores A_1 e CB_1 , desempenham importante papel neuromodulatório inibitório sobre a exocitose de diferentes neurotransmissores. Este efeito parece ser mediado pela ativação de vias de transdução do sinal semelhantes. Além disso, ambos os receptores são amplamente distribuídos em áreas relacionadas à cognição, como o córtex pré-frontal e o hipocampo. Reforçando esta idéia, agonistas dos receptores A_1 e CB_1 prejudicam a LTP e induzem efeito amnésico em modelos de memória espacial, por outro lado, antagonistas parecem exercer efeito pró-cognitivo. Por fim, evidências da interação neuroquímica em sinapses hipocampais para o controle da exocitose de glutamato e GABA, sugere que trabalhos avaliando a interação funcional dos receptores A_1 e CB_1 sobre processos de memória espacial poderão ter consequências importantes. Principalmente quando se percebe que o hipocampo está relacionado a distúrbios cognitivos descritos nas doenças de Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia ou mesmo o abuso de drogas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Caracterizar a interação dos sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através da modulação dos receptores A_1 e CB_1 , no controle de processos relacionados à memória espacial em camundongos *Swiss*.

3.2. Objetivos específicos

- Validar o modelo da localização de objetos em camundongos *Swiss* machos;
- Verificar a participação do hipocampo na aquisição da memória de localização de objetos em camundongos *Swiss* machos;
- Caracterizar o efeito da co-administração de doses sub-efetivas dos antagonistas dos receptores A_1 e CB_1 no modelo da localização de objetos e o labirinto aquático;
- Investigar a participação da neurotransmissão glutamatérgica cortico-hipocampal na melhora cognitiva induzida pela co-administração de doses sub-efetivas dos antagonistas dos receptores A_1 e CB_1 ;
- Avaliar a interação entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 , no prejuízo de aprendizado induzido por agonistas de ambos os receptores.
- Investigar a interação dos receptores A_1 e CB_1 , localizados na região CA1 do hipocampo, na amnésia induzida por agonistas de ambos os receptores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Nos experimentos realizados nesta tese foram utilizados camundongos *Swiss* machos provenientes do Biotério Central da

Universidade Federal de Santa Catarina. Após o desmame, os animais foram encaminhados para o Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia. No mínimo uma semana antes dos experimentos os animais eram trazidos para o biotério do laboratório de Psicofarmacologia I. Durante este período os animais eram mantidos, em grupos de no máximo 15, em caixas plásticas (40 x 32 x 17 cm), tendo livre acesso à água e à comida. Os camundongos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara 07h00min-19h00min). Todos os procedimentos usados no presente estudo estão de acordo com as normas de conduta com animais experimentais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC, protocolo: PP0280)

4.2. Drogas e Soluções

As soluções utilizadas como controle correspondiam ao veículo no qual eram dissolvidas as drogas testadas. Desta forma, utilizou-se solução salina (NaCl 0,9%) nos experimentos que envolveram comparações com animais tratados com MK-801, d-cicloserina, escopolamina ou tacrina. A solução controle para os grupos comparados ao DPCPX ou CCPA foi dimetilsulfóxido (DMSO) 10% dissolvido em solução salina. Devido a característica lipofílica dos ligantes canabinóides, o WIN 55,212-2 e o AM 251 foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%) com 10% de DMSO mais 0,1% de Tween 80 e a solução controle consistiu do veículo utilizado para dissolver estas drogas. A solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,1M) foi utilizada como veículo das drogas infundidas em diferentes áreas cerebrais. No quadro 1 são descritas a nomenclatura química, mecanismo de ação, doses, vias e referências para a seleção das drogas utilizadas nos diferentes experimentos realizados nesta tese. Os tampões utilizados nos experimentos bioquímicos terão sua composição descrita no item 4.7. Por fim, todas as drogas administradas por via sistêmica foram diluídas em um volume de 1mL/100g de animal.

Tabela 1: Drogas utilizadas nos diferentes experimentos desta tese.

Drogas	Nomenclatura Química (Fabricante)	Mecanismo de ação	Doses / (Vias)	Referências
AM 251	N-(Piperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenol)-4-metil-1H-pirazola-3-carboxamida (Tocris, USA).	Antagonista do receptor canabinoide e CB1	0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 mg/kg (via i.p.) 1 nMOL (intra-CA1)	Biala e Kruk, 2008; Haller <i>et al.</i> , 2004; Nasehi <i>et al.</i> , 2009.
CCPA	2-Chloro-N-cyclopentyladenosine (Tocris, USA).	Agonista do receptor adenosinergico A ₁	0,01; 0,05 e 1,0 mg/kg (via i.p.) 0,5; 1,0 e 10,0 nM Intra-CA1	Prediger e Takahashi, 2005; Prediger <i>et al.</i> , 2006.
d-cicloserina	[(R)-4-amino-3-isoxazolidone] (RBI, USA),	Agonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA	0,2; 2,0 e 20,0 mg/kg (via i.p.)	Zlomuzica <i>et al.</i> , 2007.
DPCPX	8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (Tocris, USA)	Antagonista do receptor adenosinergico A ₁	0,3; 1,0; 6,0 mg/kg (via i.p.)	Batista <i>et al.</i> , 2006;
Escopolamina	[(<u> </u> ,S)- <u> </u> -(hydroxymetil)-benzeneacetic acid (1 <u> </u> ,2 <u> </u> ,4 <u> </u> ,5 <u> </u> ,7 <u> </u>)-9-methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.0 _{2,4}]non-7-ylester hydrobromide] (Sigma, USA)	Antagonista colinérgico muscarínico	0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg (via i.p.)	Murai <i>et al.</i> , 2007;
Lidocaina	[2-diethylamino-N-(2,6-dimethylphenyl)acetamide] (Sigma, USA)	Bloqueador de canais de sódio.	Solução 4% (Intra-CA1)	Mingaud <i>et al.</i> , 2007.
MK-801	MK-801 [(5R,10S)-(-)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate] (RBI, USA)	Antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo	0,01; 0,05 e 0,1 mg/kg (via i.p.) 0,5 mM Intra-CA1	Lukawski <i>et al.</i> , 2008. Resayof <i>et</i>

		NMDA	Intra-PFC	<i>al.</i> , 2008;
Tacrina	[1,2,3,4-tetrahydro-5-aminoacridine hydrochloride] (Tocris, USA).	Inibidor seletivo da enzima acetilcolin esterase	0,3; 1,5 e 3,0 mg/kg (via i.p.)	Zhao <i>et al.</i> , 2007.
WIN 55,212-2	[R-(+)-(2,3-dihidro-5-metil-3-[[4-morfolinil]metil]pirol [1,2,3-de-]-1,4-benzoxazina-6-il)(1-naftalenil)metanona mesilato] (Tocris, USA)	Agonistas dos receptores canabinóides CB ₁ e CB ₂	0,1; 0,5 e 1,0 mg/kg (via i.p.) 10 nM Intra-CA1	Manzanedo <i>et al.</i> , 2010; Suenaga e Ichitani <i>et al.</i> , 2008.

4.3. Cirurgias estereotáxicas

Cada animal foi anestesiado com hidrato de cloral 4% e, depois de verificada a perda total dos reflexos, imobilizado em um aparelho estereotáxico (David Kopf[®], USA). Em seguida, procedeu-se a tricotomia, a assepsia com álcool iodado e a injeção com lidocaína (com 2 % de vasoconstritor, por via subcutânea, para anestesia local e redução do extravasamento sanguíneo no momento da incisão) na parte posterior da cabeça de cada animal. Ao final, a calota craniana foi exposta, após a raspagem do periósteo, e perfurada com uma broca odontológica para a inserção de uma cânula-guia na região CA1 do hipocampo (-2,0 mm posterior, ± 2,0 mm lateral ao bregma e -1,5 mm dorso-ventral), ou no córtex pré-frontal (+1,6 mm posterior, ± 0,5 mm lateral ao bregma e -1,2 mm dorso-ventral), conforme as coordenadas de Paxinos e Franklin (2001). A área aberta, feita para a introdução da cânula-guia, foi preenchida com acrílico auto-polimerizável. Após o término da cirurgia, cada animal foi aquecido por uma lâmpada de 40 W, a fim de amenizar a hipotermia induzida pela anestesia geral. Após a recuperação total, os animais foram reconduzidos a sua caixa moradia, onde permaneciam recebendo água e ração à vontade por 5 dias até o teste experimental.

4.4. Administração local de drogas

Os tratamentos foram administrados com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight[®]) na qual era acoplada uma seringa de Hamilton. As drogas utilizadas foram infundidas num volume de 0,5 µL por um período de 60 s, sendo que a agulha injetora permaneceu por outros 60 s dentro da cânula-guia para que todo seu conteúdo se difundisse para os tecidos adjacentes.

4.5. Histologia

Para a confirmação da localização das cânulas, após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 40% e perfundidos intracardiacamente com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de solução de formaldeído 4%. Em seguida, os animais foram decapitados e receberam uma micro-injeção de solução de Azul de Evans 0,5% (0,5 µL). Os cérebros foram retirados e checados quanto à localização das cânulas. Animais que não apresentavam localização correta das cânulas foram descartados da análise estatística dos dados. A média de animais descartados por bloco experimental variou entre 15 e 20%.

4.6. Testes comportamentais

4.6.1. Tarefa da Localização de Objetos

O aparelho utilizado para o teste da localização de objetos era uma caixa quadrada de acrílico transparente (50,0 cm lados X 40,0 cm altura), dividida em nove quadrantes. Os objetos eram dois retângulos plásticos idênticos (3,0 cm lado X 4,5 cm lado X 4,5 cm altura) os quais eram colados ao chão de maneira equidistante 7 cm de dois lados da caixa.

O teste da localização de objetos foi proposto inicialmente para ratos (Ennaceur *et al.*, 1997) e posteriormente adaptado (Murai *et al.*, 2007) e padronizado para camundongos *Swiss* (Assini *et al.*, 2009). O procedimento consistia em uma sessão de treino com duração de 3 min, na qual o animal era colocado na caixa e explorava-a livremente. Neste

momento eram registrados o número de quadrantes cruzados pelo animal e o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa. Depois do treino os animais retornavam a sua caixa moradia e aguardavam até o momento do teste.

Os intervalos entre treino e teste variaram entre 30, 90, 180 ou 360 min para os diferentes grupos testados. Ou seja, dependendo do objetivo do experimento era utilizado um ou outro intervalo entre treino e teste. Isso porque depois de realizada a curva de tempo percebeu-se que, quando testados aos 30 ou 360 min os animais controle não expressavam a memória de localização de objetos, fato que acontecia apenas quando os animais eram testados com intervalos entre treino e teste de 90 ou 180 min. Desta forma, para avaliar drogas ou procedimentos que prejudicassem o aprendizado utilizou-se o intervalo de tempo de 180 min, enquanto que para a investigação de drogas ou procedimentos que melhoravam o aprendizado foi utilizado o tempo de 360 min.

No momento do teste os animais retornavam a caixa do treino, porém um dos objetos havia sido mudado de lugar. Neste momento registrava-se o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Estes tempos eram utilizados para o cálculo do índice de localização de objetos, o qual foi utilizado como parâmetro de memória.

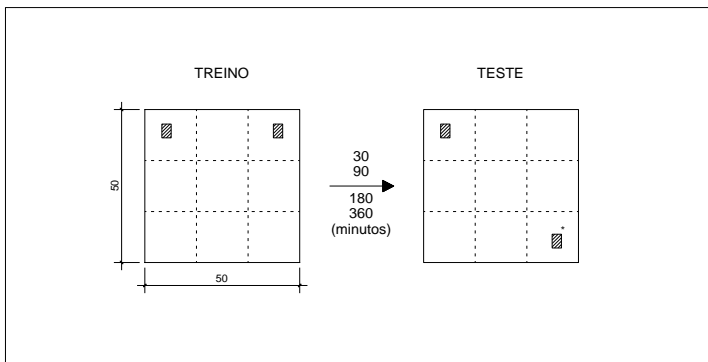


Figura 2. Representação esquemática do modelo da localização de objetos. *
Índice de localização do objeto = $[t(s)_{\text{obj_lugar_novo}} \times 100 / [t(s)_{\text{obj_lugar_novo}} + t(s)_{\text{obj_lugar_antigo}}]$

4.6.2. Teste do Labirinto Aquático

O aprendizado e a memória espacial de camundongos também foram avaliados através do teste do labirinto aquático (Morris *et al.*, 1984) seguindo uma adaptação da metodologia utilizada em trabalhos anteriores deste departamento (Medeiros *et al.*, 2007 e Prediger *et al.*, 2007).

O labirinto aquático consiste de um tanque circular de cor preta (97 cm de diâmetro e 60 cm de altura), localizado no interior de uma sala com pistas visuais nas paredes. O tanque era preenchido com água mantida a uma temperatura entre $25 \pm 2^\circ\text{C}$ através de um sistema de resistências elétricas. Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiam a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). No interior do tanque era colocada uma plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm), submersa 1 a 1,5 cm da superfície da água.

O protocolo experimental consistia em sessões de treino e teste. Durante o treinamento, os animais eram liberados para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era conduzido manualmente até ela, onde permanecia por 10 s. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma eram registrados. Após os 10 s, o animal era retirado do labirinto e colocado em uma caixa por 20 s, sendo então posicionado no ponto de partida seguinte. Este procedimento era realizado 5 vezes na sessão de treino, porém os animais partiam de pontos diferentes enquanto que a plataforma permanecia na mesma posição (quadrante Sudeste).

Na sessão de teste, realizada 6 h após a sessão de treino, os animais eram novamente liberados para nadar a partir da posição Norte, no entanto, a plataforma era removida do labirinto. O tempo de nado gasto pelos animais no quadrante onde se encontrava a plataforma na sessão de treino era registrado. Este valor foi utilizado para calcular a porcentagem de tempo no quadrante correto, o qual foi utilizado como índice de memória.

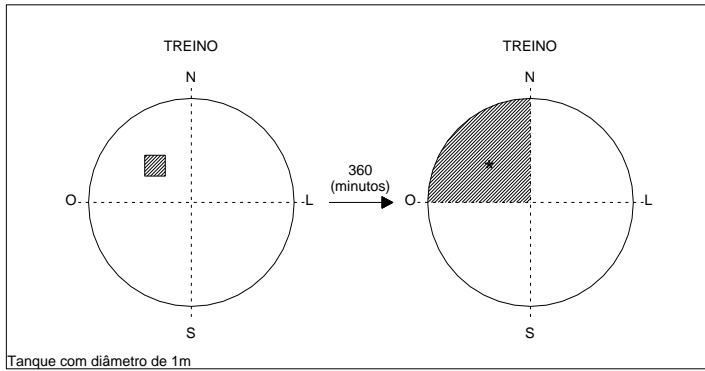


Figura 3. Representação esquemática do modelo do labirinto aquático. * % tempo no quadrante correto = $(t(s)_{\text{quadrante correto}} \times 100) / 60$

4.7. Testes bioquímicos

4.7.1 Preparação e incubação das fatias de hipocampo e córtex pré-frontal

Os animais foram mortos por decapitação e as áreas estudadas rapidamente removidas e mantidas em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain[®] e pré-incubadas em placas de 96 poços em tampão KRB por 1 hora a 37°C. Após este período de incubação, as fatias foram submetidas aos ensaios de liberação de glutamato e de viabilidade celular.

4.7.2. Ensaio da liberação de L-[³H] glutamato

A liberação de L-[³H] glutamato foi realizada segundo descrito por Molz *et al.*, 2005. Após a incubação, o meio contendo tampão KRB foi retirado e as fatias foram incubadas na solução salina balanceada de Hanks (HBSS, CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, Glicose 2 mM, Hepes 5 mM) por 15 min. O ensaio para a liberação de glutamato foi realizado através da incubação das fatias por 7 minutos com a adição de 0,33 µCi/ml L-[³H] glutamato e com 100 µM de glutamato não-marcado. Após esse período o meio foi descartado e as fatias lavadas por 3 vezes com 1 mL de HBSS. Na sequência as fatias foram novamente incubadas por 15 minutos com 300 µL de HBSS e o sobrenadante foi coletado para a mensuração da quantidade de L-[³H] glutamato liberada. As fatias foram rompidas através da incubação por 12 horas com 0.1% NaOH/0.01% SDS e as alíquotas dos lisados foram utilizadas para a determinação do conteúdo intra-celular de L-[³H] glutamato (Tavares *et al.*, 2002; Molz *et al.*, 2008). A determinação do conteúdo intracelular de L-[³H] glutamato foi avaliada em um contador de cintilação líquida. A quantidade de glutamato liberada foi determinada calculada em nmol de glutamato por miligrama de proteína por minuto e os valores expressos em porcentagem total de L-[³H] glutamato. A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Lowry e colaboradores, (1975).

4.7.3. Avaliação de viabilidade celular

O MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Thiazolyl blue) é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson & Fowler, 1999). Após o período de 1 h de pré-incubação as fatias de hipocampo e córtex pré-frontal foram incubadas por 20 min com MTT (0,5 mg/ml) à 37° C e o formazam reduzido foi solubilizado pela adição de DMSO. A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm).

4.7.4. Preparação das frações hipocámpais para o ensaio de ligação

Os extratos para os ensaios de ligação foram preparados a partir do hipocampo de camundongos. Os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram seu hipocampo removido. Na sequência, um conjunto de 4 hipocampos foi homogeneizado em 5 ml do tampão de preparação (320 mM de sacarose, 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 5 mM de MgCl₂, pH=7,4) em gelo. O homogenato foi centrifugado a 1.600 g por 10 min e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 16.000 x g por 1 hora. O pellet foi resuspenso em tampão (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 5 mM de MgCl₂, pH=7,4) e utilizado no ensaio de ligação. É importante salientar que no ensaio de ligação utilizando o ³H-DPCPX, este pellet resuspendido foi tratado com solução de adenosina deaminase 4 U/mL por 30 minutos. As concentrações de proteínas totais nas frações membranar e citosólica foram determinadas por comparação com solução padrão de albumina de soro bovino (BSA), seguindo o método de Bradford (1976).

4.7.5. Ensaio de ligação em receptores adenosinérgicos A₁ e canabinóides CB₁

O ensaio de ligação foi realizado utilizando fração de membrana de hipocampo de camundongo, conforme metodologia previamente descrita (Hirst *et al.*, 1996; Abood *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2011). As membranas foram homogeneizadas e diluídas em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 3 mM de MgCl₂, pH=7,4) resultando em uma concentração final de 1 mg/ml de proteínas totais. O ensaio de ligação constituiu na incubação de 50 µg de proteínas a um tubo contendo 0,5 nM do antagonista do receptor CB₁ radioativo [³H]-SR141716A (43 Ci/mmol), ou então, 0,5 nM do antagonista adenosinérgico A₁ radioativo [³H]-DPCPX, em quantidade suficiente de tampão de ensaio (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 3 mM de MgCl₂, 1 mg/ml de BSA, 100 µM de PMSF, pH=7,4), totalizando um volume final de 500 µl. A ligação inespecífica foi estimada pela adição de 10 µM do agonista canabinóide WIN 55212,2 ou 10 µM do agonista

dos receptores A₁ CCPA, ambos sem marcação radioativa. Após incubação por 1 h a 37 °C, o ensaio de ligação foi terminado pela adição de 1 ml do tampão de ensaio resfriado em gelo e filtração a vácuo por filtros de feltro previamente tratados com polietilenamina (0,1 %) por pelo menos 2 h, seguidos de 3 lavagens com 3 ml de tampão (Tris-HCl 50mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 3mM, 1 mg/ml BSA, pH=7.4) gelado. Os filtros foram mergulhados individualmente em 1 ml de líquido de cintilação e agitados por 1 h antes da determinação da radioatividade.

4.8. Desenho experimental

Os experimentos realizados foram divididos em 3 etapas descritos brevemente a seguir:

2.8.1. Validação do teste da localização de objetos em camundongos *Swiss machos*

Uma vez que se avaliaria a interação entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide sobre processos de memória espacial em camundongos, os experimentos desta tese iniciaram-se com a validação de um modelo animal para este tipo de memória.

Este grupo de experimentos iniciou-se com uma curva de tempo para a expressão da memória de localização de objetos. Deste experimento foram selecionados dois intervalos entre treino e teste: o intervalo de 180 min foi utilizado para testar drogas que tivessem potencial amnésico, uma vez que neste tempo o grupo controle expressava a memória de localização de objetos. O intervalo de 360 min foi empregado para avaliar drogas com potencial pró-mnemônico, porque neste tempo os grupos controle não expressavam mais a memória de localização de objetos. A validade preditiva do modelo foi confirmada após a verificação do efeito de drogas colinérgicas e glutamatérgicas com atividade amnésica e pró-mnemônica, respectivamente. A participação da região CA1 do hipocampo na aquisição desta memória foi confirmada após a inativação desta área, uma vez que animais testados 180 min depois do treino passavam a não mais exibir tal memória.

4.8.2. Co-administração dos antagonistas A₁ e CB₁: participação do sistema glutamatérgico via receptor NMDA

Uma vez que os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através de seus receptores A₁ e CB₁ apresentam semelhanças, especulou-se que a co-administração de antagonistas de ambos poderia produzir efeito pró-cognitivo, em doses menores do que aquelas necessárias para causar o mesmo efeito quando administradas isoladamente.

Os experimentos descritos a seguir foram realizados nos dois modelos com grupos diferentes de animais. Primeiramente, realizaram-se curvas dose-resposta para os antagonistas dos receptores A₁, DPCPX 0,3; 1,0 e 6,0 mg/kg, e do receptor CB₁, AM 251 0,25, 1,0 e 2,5 mg/kg. Com estas curvas pôde-se confirmar o efeito pró-mnemônico das maiores doses quando administradas 30 minutos antes do treino. Na sequência, foi realizada a administração conjunta das doses sem efeito em diferentes proporções, ou seja, DPCPX 0,3 + AM 0,25; DPCPX 1,0 + AM 0,25; DPCPX 0,3 + AM 1,0 e DPCPX 1,0 + AM 1,0 (mg/kg i.p. 30 minutos antes do treino).

Depois de observada a melhora do aprendizado para as diferentes proporções, selecionou-se a co-administração de DPCPX 0,3 mg/kg + AM 0,25 mg/kg, para avaliar seus efeitos sobre a consolidação e a evocação da memória. Entretanto, como não foram observados resultados positivos, nos experimentos seguintes avaliou-se os efeitos da co-administração apenas sobre os processos de aquisição do aprendizado.

Desta forma, optou-se por utilizar o antagonista dos receptores NMDA, MK-801, para avaliar se o aminoácido excitatório glutamato participava da melhora cognitiva observada. Uma vez que o efeito da co-administração foi bloqueado pelo MK-801 administrado sistemicamente, este também foi infundido no córtex pré-frontal e na região CA1 do hipocampo, permitindo sugerir ainda a participação dos receptores NMDA nas duas áreas estudadas.

Para relacionar com o efeito farmacológico, realizou-se um ensaio de liberação de glutamato em fatias de hipocampo e córtex de camundongo. Neste experimento os animais receberam a administração sistêmica dos seguintes tratamentos: Controle, DPCPX 0,3 mg/kg, AM

251 0,25 mg/kg ou DPCPX 0,3 mg/kg + AM 251 0,25 mg/kg, depois de 30 min os animais foram sacrificados e deu-se início ao ensaio de liberação de glutamato. Neste experimento observamos um aumento da liberação de glutamato nas fatias de córtex e hipocampo dos animais que haviam recebido a co-administração. Por fim, como o excesso deste neurotransmissor está associado à neurotoxicidade, foi realizado um ensaio para avaliar a viabilidade celular de fatias de córtex e hipocampo após o tratamento. Para isso, os animais receberam os tratamentos pela via intraperitoneal, 6 horas após o tratamento foram sacrificados, tiveram as duas áreas do cérebro retiradas e realizou-se o ensaio do MTT.

4.8.3. Interação funcional entre os receptores A₁ e CB₁ localizados no hipocampo no controle da amnésia induzida por agonistas de ambos os receptores.

Utilizando o modelo da localização de objetos foram realizadas curvas dose-resposta para o agonista dos receptores A₁, CCPA 0,01; 0,05 e 0,1 mg/kg, e para o agonista do receptor CB₁, WIN 55,212-2 0,1; 0,5 e 1 mg/kg, ambos administrados 30 min antes do treino. Nestes experimentos pode-se confirmar o efeito amnésico da maior dose de cada uma das drogas. Na sequência, foram realizados os seguintes protocolos: contra a dose amnésica do agonista CB₁ foram administradas duas doses do antagonista A₁, DPCPX 0,3 e 1,0 mg/kg, ou do agonista A₁, CCPA 0,01 e 0,05 mg/kg. Por outro lado, contra o prejuízo de aprendizado induzido pelo CCPA 0,1 mg/kg, foram administradas duas doses do antagonista CB₁, AM 251 0,25 e 0,5 mg/kg, ou do agonista CB₁, WIN 55,212-2 0,1 e 0,5 mg/kg.

4.9. Análise estatística

Todos os experimentos foram apresentados com média ± erro padrão da média (EPM) de cada um dos grupos. O número de animais para os diferentes tratamentos avaliados comportamentalmente variou entre 8 e 12 camundongos. Para os experimentos bioquímicos, as análises foram realizadas em duplicatas de no mínimo 4 e no máximo 6 amostras. Na curva de tempo para a expressão da memória de

localização de objetos, o teste t foi utilizado para a determinação da mudança de desempenho no teste da localização de objetos, ou seja, a avaliação se a % de tempo explorando o objeto trocado de lugar diferia significativamente de um valor teórico de 50%. A análise de variância, ANOVA, de uma-via foi utilizada para avaliar a diferença entre grupos tratados e o grupo controle. A ANOVA de duas vias foi utilizada quando se investigava interações entre diferentes tratamentos. Utilizou-se ANOVA de duas ou três vias com medidas repetidas em duas situações: 1) para avaliar as possíveis diferenças de latência para encontrar a plataforma em cada um dos treinos do labirinto aquático ou 2) para investigar se os animais exploraram de maneira desigual cada um dos objetos disponibilizados durante o treino da tarefa de localização de objetos. Os experimentos bioquímicos foram analisados com ANOVA de uma via (liberação de glutamato) ou o teste t (ensaio de ligação). Por fim, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls foi empregado para confirmar as diferenças entre os diferentes grupos. O nível de significância adotado em todos os experimentos foi $P < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Validação do teste da localização de objetos em camundongos *Swiss* machos.

O primeiro grupo de resultados envolve os experimentos realizados com o objetivo de validar o modelo da localização de objetos para camundongos *Swiss* machos. Para isso foi realizada uma curva de tempo para a expressão da memória de localização de objetos; avaliou-se a sensibilidade do modelo a drogas colinérgicas e glutamatérgicas com ação amnésica ou pró-mnemônica; e o papel da região CA1 do hipocampo na aquisição desta memória.

A figura 4 mostra a memória de localização de objetos em grupos de camundongos avaliados com diferentes intervalos de tempo entre treino e teste. A análise estatística sugere que os animais testados 30 ($t=0,59$; $p=0,57$) e 360 ($t=-0,8$; $p=0,53$) minutos após o treino não distinguem entre o objeto que permaneceu no lugar e o que foi trocado. Por outro lado, aqueles animais testados 90 ($t= - 3,96$; $p<0,05$) e 180 ($t=- 4,02$; $p<0,05$) minutos após o treino exploram o objeto trocado de lugar por mais tempo, dado que reflete um maior índice de localização de objetos.

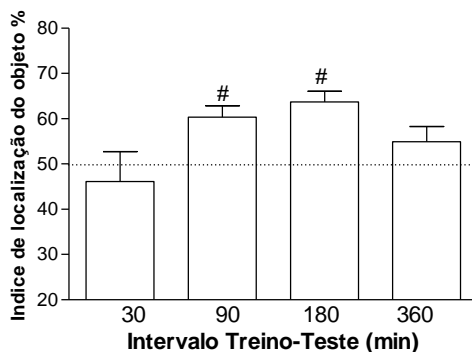


Figura 4: Curva de tempo para a memória de localização de objetos em camundongos *Swiss*. Seções de teste foram realizadas 30, 90, 180 e 360 min depois do treino. # $p<0,05$ versus 50% do tempo de exploração do objeto trocado mantido no durante o teste; N= 8-10 por grupo.

Para os experimentos seguintes, selecionamos o intervalo de 180 minutos para a avaliação do efeito amnésico e o intervalo de 360 minutos para testar drogas que melhorem o aprendizado. Na figura 5 são mostrados os efeitos de drogas que interagem com o receptor NMDA sobre o índice de localização de objetos. A figura 5_A demonstra que a administração de MK-801 0,05 e 0,1 mg/kg prejudicou o aprendizado dos camundongos [$F(3,32)=9,40$; $p<0,05$], conforme o sugerido pela análise estatística por ANOVA de uma-via e confirmado pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. A figura 5_B mostra o efeito da d-cicloserina sobre a memória de localização de objetos em animais testados com intervalo entre treino e teste de 360 minutos. A análise estatística por ANOVA de uma-via sugere efeito significativo do tratamento [$F(3,32)=4,40$ $p<0,01$] e o *post-hoc* de Newman-Keuls indica que o tratamento com d-cicloserina 20 mg/kg melhorou a memória de localização de objetos dos animais.

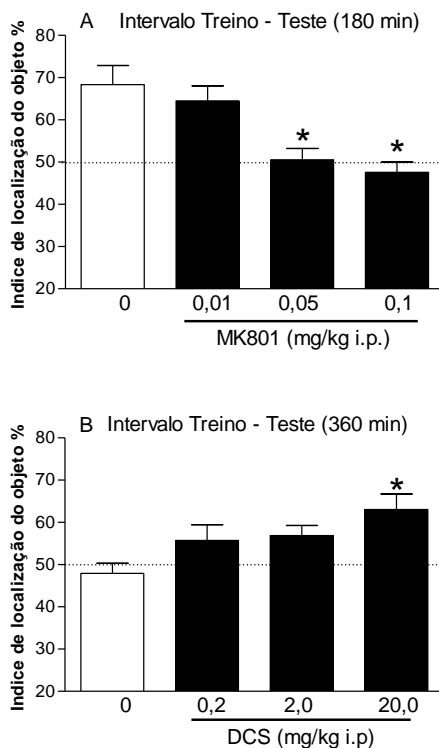


Figura 5: Efeitos de drogas glutamatérgicas sobre a memória de localização de objetos em camundongos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. $N = 8-9$ por grupo.

Seguindo a validação farmacológica do modelo, na figura 6 são mostrados os efeitos de drogas colinérgicas sobre o índice de localização de objetos. A figura 6_A indica que, quando comparados aos animais controle, os camundongos testados com escopolamina (0,25, 0,5 ou 1,0 mg/kg) não foram capazes de distinguir entre o objeto que permanece no lugar e o outro que foi alterado. Estes dados são confirmados pela análise estatística por ANOVA de uma-*via* [$F(3,29)=13,98$; $p < 0,01$] e pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Por outro lado, para a figura 6_B a análise estatística sugere efeito significativo do tratamento [$F(3,32)=3,32$; $p < 0,05$], o qual é confirmado pelo *post-hoc* de Newman-Keuls para o grupo tratado com tacrina 1,5 mg/kg.

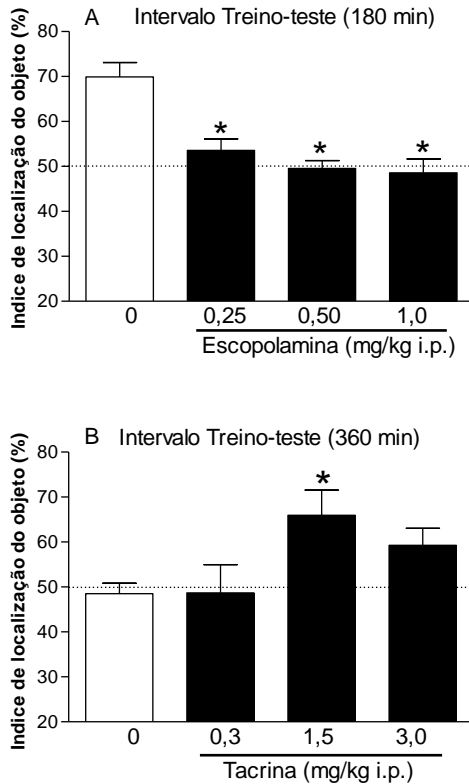


Figure 6: Efeitos de drogas colinérgicas sobre a memória de localização de objetos em camundongos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. $N = 8-9$ por grupo.

Na sequência foi avaliada a participação da região CA1 do hipocampo sobre a aquisição da memória de localização de objetos em camundongos. Quando se compara aos animais controle, a infusão de lidocaína 4% na região CA1 do hipocampo prejudicou de maneira significativa a aquisição da memória de localização de objetos ($t = 2,21$; $p < 0,05$), como apresentado na figura 7.

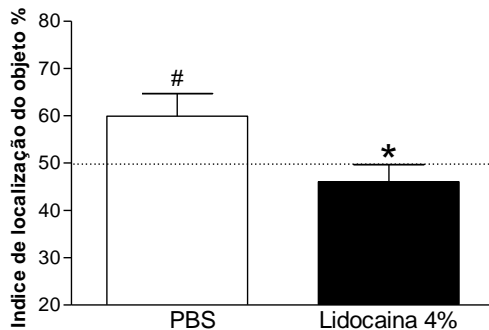


Figura 7: Efeitos da infusão pré-treino de lidocaína 4% na região CA1 do hipocampo sobre o índice de localização de objetos em camundongos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle; N= 10-12 por grupo.

A tabela 2 mostra o efeito dos diferentes tratamentos sobre a locomoção e o tempo de exploração dos dois objetos durante os 3 minutos de treino. Todas as drogas foram administradas 30 minutos antes do treino por via intraperitoneal, com exceção da lidocaína 4%, a qual foi infundida no hipocampo 10 minutos antes dos animais serem colocados no aparelho. A análise por ANOVA de uma via sugere que nenhum dos tratamentos alterou de maneira significativa a atividade locomotora dos animais: MK-801 [F(3,32)= 0,61; $p=0,60$]; d-cicloserina [F(3,32)= 3,03; $p=0,09$]; escopolamina [F(3,29)= 1,57; $p=0,21$]; tacrina [F(3,32)= 1,91; $p=0,14$] ou lidocaína [F(1,22)=0,13; $p=0,71$]. Além disso, a análise por ANOVA de uma via com medidas repetidas sugere que nenhum dos tratamentos alterou de maneira significativa a exploração dos objetos: MK-801 [F(3,32)= 2,72; $p=0,97$]; d-cicloserina [F(3,32)=1,81; $p=0,19$]; escopolamina [F(3,29)= 0,78; $p=0,51$]; tacrina [F(3,32)=0,26; $p=0,85$] ou lidocaína 4% [F(1,22)=0,06; $p=0,81$].

Tabela 2: Efeitos dos diferentes tratamentos sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos *Swiss* no teste da localização de objetos.

Tratamento mg/kg	Locomoção (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
Salina	48,1 ± 5,9	4,0 ± 0,9	3,3 ± 0,7
MK-801 0,01	52,7 ± 2,7	3,1 ± 0,5	3,4 ± 0,7
MK-801 0,05	57,9 ± 2,7	3,9 ± 0,6	2,6 ± 0,5
MK-801 0,10	52,7 ± 6,3	4,5 ± 1,0	2,2 ± 0,6
Salina	50,6 ± 8,4	3,1 ± 0,7	2,4 ± 0,9
d-cicloserina 0,2	40,3 ± 2,3	2,7 ± 1,0	2,5 ± 0,6
d-cicloserina 2,0	56,6 ± 5,7	3,4 ± 0,7	3,2 ± 1,5
d-cicloserina 20,0	64,3 ± 5,3	5,6 ± 1,1	3,3 ± 0,3
Salina	46,1 ± 3,9	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,5
Escopolamina 0,25	52,8 ± 1,8	4,5 ± 0,7	3,7 ± 0,5
Escopolamina 0,50	46,8 ± 6,1	5,0 ± 0,5	4,1 ± 0,8
Escopolamina 1,00	37,8 ± 5,9	4,4 ± 0,9	3,0 ± 1,0
Salina	47,3 ± 5,0	3,6 ± 0,5	3,4 ± 0,6
Tacrina 0,3	43,0 ± 2,8	4,1 ± 1,3	3,4 ± 0,5
Tacrina 1,5	34,4 ± 2,7	3,5 ± 0,5	3,3 ± 0,6
Tacrina 3,0	40,3 ± 4,1	5,2 ± 1,4	5,6 ± 2,0
PBS	44,1 ± 3,0	6,1 ± 0,8	5,8 ± 1,1
Lidocaina 4%	46,3 ± 2,3	5,8 ± 0,6	5,2 ± 0,8

5.2. Co-administração dos antagonistas A₁ e CB₁ melhora a memória espacial de camundongos. Participação do sistema glutamatérgico via receptor NMDA.

Depois de validado o modelo da localização de objetos, utilizou-se este em associação ao labirinto aquático para avaliar o efeito pró-mnemônico da interação de antagonistas dos receptores adenosinérgicos A₁ e canabinóides CB₁. Para isso foram realizadas curvas dose-resposta para ambos os antagonistas e, na sequência, doses sem efeito foram co-administradas com o objetivo de caracterizar o efeito aditivo.

A figura 8 mostra o efeito da administração pré-treino dos antagonistas dos receptores A₁ e CB₁ sobre o índice de localização de objetos. A figura 8_A evidencia que a administração do antagonista dos receptores A₁, DPCPX 6,0 mg/kg, melhorou o aprendizado dos animais. Esta constatação é confirmada tanto pela análise estatística por ANOVA de uma-via [$F(3,38) = 2,53; p < 0,05$] quando pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. A figura 8_B mostra os efeitos da administração do antagonista dos receptores CB₁, 30 minutos antes do treino, sobre o índice de localização de objetos. A análise estatística por ANOVA de uma-via sugere efeito significativo do tratamento [$F(3,33) = 2,85; p < 0,05$], e o *post-hoc* de Newman-Keuls confirma a diferença significativa entre o grupo controle e os animais tratados com a dose de AM 251 2,5 mg/kg.

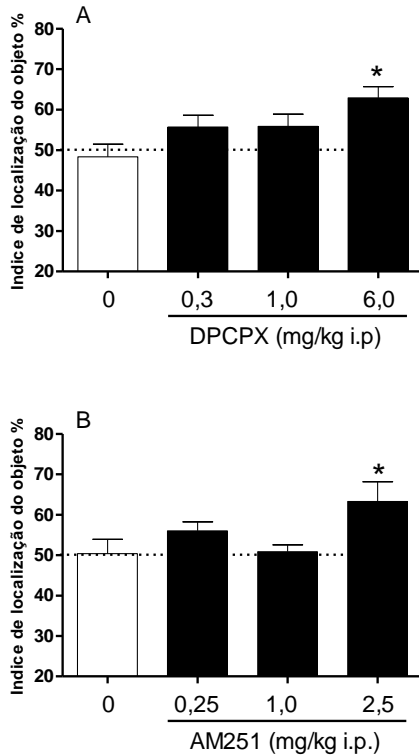


Figura 7: Efeitos do tratamento com os antagonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 e canabinóides CB_1 sobre a memória de localização de objetos em camundongos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. N= 10-12 por grupo.

Depois de caracterizadas as doses efetivas do antagonista dos receptores A_1 , DPCPX, e do antagonista dos receptores CB_1 , AM 251. Doses sem efeito (DPCPX 0,3 - 1,0 mg/kg e AM 251 0,25 - 1,0 mg/kg) foram co-administradas em diferentes proporções para caracterizar a interação entre os dois antagonistas. A figura 9 mostra o efeito destas co-administrações 30 minutos antes do treino sobre os índices relacionados à memória registrados no teste da localização de objetos. A análise estatística por ANOVA de uma-avia detectou efeito significativo do tratamento [$F(4,37)=3,83$; $p < 0,01$] e o *post-hoc* de Newman-Keuls

indicou diferença significativa em relação ao grupo controle para as seguintes co-administrações: AM 0,25 mg/kg + DPCPX 0,3 mg/kg; AM 1,0 mg/kg + DPCPX 0,3 mg/kg e AM 1,0 mg/kg + DPCPX 1,0 mg/kg.

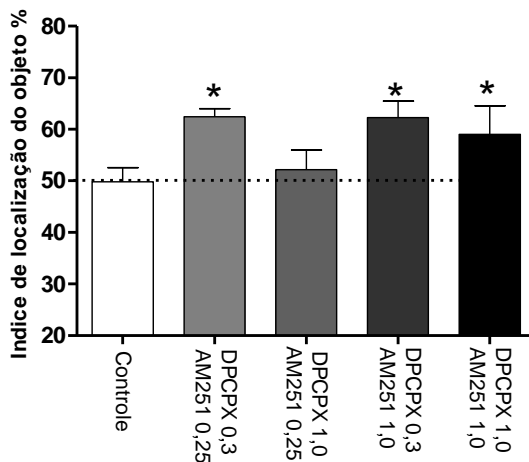


Figura 8: Efeitos da co-administração pré-treino de doses sub-efetivas dos antagonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 e canabinóides CB_1 sobre a memória de localização de objetos em camundongos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. N= 8-10 por grupo.

Os valores dos parâmetros comportamentais registrados durante o treino para os experimentos representados nas figuras 4-6 são mostrados na tabela 4. A atividade locomotora dos animais registrada durante os 3 minutos de treino não foi alterada pelo tratamento com DPCPX [F(3,38)=0,34; $p=0,85$], AM 251 [F(3,33)=1,25; $p=0,75$] ou pelas co-administrações [F(4,37)= 0,94; $p=0,45$]. Além disso, a análise por ANOVA de duas-vias com medidas repetidas realizada para certificar que os animais não possuíam preferência por algum dos objetos sugeriu que os animais tratados com DPCPX [F(3,38)=0,83; $p=0,74$], AM 251 [F(3,33)=2,25; $p=1,13$] ou com as co-administrações [F(4,37)= 0,49; $p=0,95$] não diferiram no tempo de exploração de cada um dos objetos apresentados durante o treino.

Tabela 3: Efeitos da administração do DPCPX, AM 251 e da co-administração, 30 minutos antes do treino, sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos no teste da localização de objetos.

Tratamento (mg/kg i.p.)		Locomoção (Média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
Controle		46,7 ± 5,6	2,5 ± 0,2	2,9 ± 0,3
DPCPX 0,3		45,5 ± 4,0	2,4 ± 0,2	3,0 ± 0,3
DPCPX 1,0		49,8 ± 3,3	2,9 ± 0,6	3,0 ± 0,4
DPCPX 6.0		43,4 ± 4,1	2,5 ± 0,4	2,8 ± 0,7
Controle		54,0 ± 8,3	2,7 ± 0,3	2,9 ± 0,6
AM 0,25		49,0 ± 4,9	2,3 ± 0,4	2,4 ± 0,5
AM 1,0		52,8 ± 4,1	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,6
AM 2,5		42,9 ± 2,8	2,6 ± 0,6	2,5 ± 0,3
Controle	Controle	38,7 ± 2,4	3,7 ± 0,5	4,1 ± 0,4
AM0,25	DPCPX0,3	47,6 ± 7,6	2,8 ± 0,7	3,1 ± 0,5
AM0,25	DPCPX1,0	42,1 ± 4,4	4,0 ± 0,6	3,5 ± 0,3
AM1,0	DPCPX0,3	35,4 ± 3,1	3,7 ± 0,3	3,5 ± 0,4
AM1,0	DPCPX1,0	33,4 ± 7,5	2,1 ± 0,5	2,8 ± 0,6

Após haver evidenciado a melhora do aprendizado induzida pela co-administração dos antagonistas dos receptores A_1 e CB_1 no modelo da localização de objetos, reforçamos os resultados realizando protocolos semelhantes no labirinto aquático. Nas figuras 10 e 11, os efeitos dos diferentes tratamentos são mostrados em porcentagem de tempo que os animais permaneceram no quadrante correto, ou seja, à porcentagem de tempo gasto durante o teste no quadrante onde estava a plataforma durante o treino. A análise estatística por ANOVA de uma-*via* dos dados apresentados na figura 10_A e 10_B sugere efeito significativo tanto do tratamento com DPCPX [$F(3,36)=3,51$; $p<0,05$] quanto com AM 251 [$F(3,39)=3,55$; $p<0,05$]. Além disso, a análise por *post-hoc* de Newman-Keuls confirma o aumento significativo da

porcentagem de tempo no quadrante correto para os animais tratados com DPCPX 6,0 mg/kg ou AM 251 2,5 mg/kg.

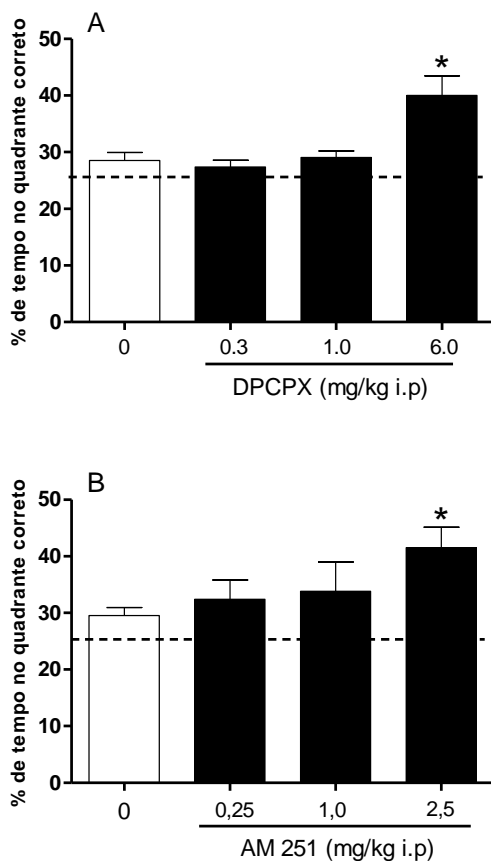


Figura 9: Efeitos do tratamento com os antagonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 e canabinóides CB_1 sobre a memória avaliada no labirinto aquático em camudongos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. $N = 10-12$ por grupo.

Depois de caracterizada a dose efetiva e as não efetivas dos antagonistas dos receptores A_1 e CB_1 no teste do labirinto aquático, as doses sem efeito foram co-administradas em diferentes proporções. Os valores da porcentagem de tempo no quadrante correto para os

diferentes grupos são apresentados na figura 11. A análise estatística por ANOVA de uma-avia sugere efeito significativo do tratamento [$F(4,37)=3,71$; $p<0,01$] e o *post-hoc* de Newman-Keuls confirma uma melhora no aprendizado dos animais tratados com as seguintes co-administrações: DPCPX 0,3 mg/kg + AM 0,25 mg/kg; DPCPX 1,0 mg/kg + AM 0,25 mg/kg e DPCPX 1,0 mg/kg + AM 0,25 mg/kg.

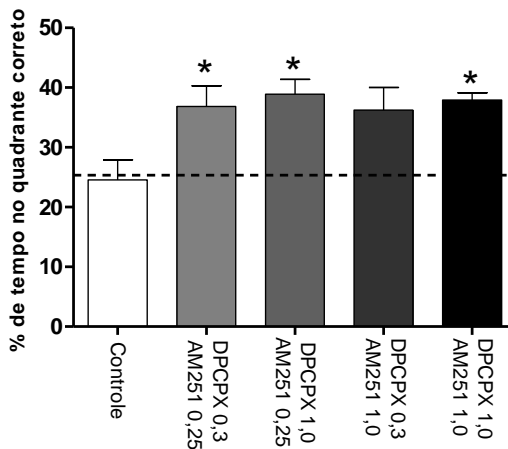


Figura 10: Efeitos da co-administração pré-treino de doses sub-efetivas dos antagonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 , DPCPX, e canabinóides CB_1 , AM 251, sobre a memória avaliada o labirinto aquático. * $p<0,05$ contra o grupo controle. N= 10-11 por grupo.

Os dados referentes à latência para encontrar a plataforma durante o treino dos experimentos apresentados nas figuras 10 e 11 são mostrados na tabela 5. Os dados foram analisados com ANOVA de duas-vias com medidas repetidas e não foi encontrada diferença significativa para a interação entre o tratamento e as latências durante o treino: DPCPX [$F(12,148)=0,78$; $p=0,66$]; AM 251 [$F(12,152)= 1,28$; $p=0,23$] e co-administrações [$F(16,148)= 0,92$; $p=0,53$].

Tabela 4: Efeitos dos diferentes tratamentos sobre a latência (s) para encontrar a plataforma durante o treino de camundongos no teste do labirinto aquático.

	Tratamento (mg/kg i.p.)		Latência (s) ± EPM Treino 1 – Treino 5				
	Administração Pré-treino	Controle		51±5	42±7	57±1	45±5
DPCPX 0,3			52±5	31±9	44±9	47±8	48±8
DPCPX 1,0			47±8	50±6	48±6	44±8	39±8
DPCPX 6.0			59±0	44±7	42±7	42±6	47±5
Administração Pré-treino	Controle		50±5	45±5	58±1	44±5	44±6
	AM 0,25		56±3	54±5	49±4	47±7	31±9
	AM 1,0		47±6	33±8	47±6	51±6	42±6
	AM 2,5		59±0	44±6	58±1	45±6	51±3
Administração Pré-treino	Control e	Control e	50±5	46±7	53±6	56±2	47±8
	AM0,25	DPCP X0,3	49±5	54±6	43±5	41±7	60±0
	AM0,25	DPCP X1,0	53±4	45±7	45±7	40±8	48±6
	AM1,0	DPCP X0,3	55±4	60±0	37±7	40±7	45±6
	AM1,0	DPCP X1,0	49±6	45±9	48±7	33±9	51±6

Uma vez demonstrada a interação entre os antagonistas dos receptores A_1 e CB_1 na aquisição de memórias dependentes de hipocampo, selecionamos a co-administração com DPCPX 0,3 mg/kg e AM 251 0,25 mg/kg para os experimentos seguintes. Na tabela 6 são mostrados os efeitos da administração pós-treino e pré-teste dos antagonistas A_1 e CB_1 isoladamente ou em associação (DPCPX 0,3 mg/kg + AM 251 0,25 mg/kg) sobre as medidas de memória avaliadas no teste da localização de objetos e no labirinto aquático. A análise estatística por ANOVA de uma-via dos dados apresentados na tabela 6 sugere que a co-administração após o treino dos antagonistas dos receptores A_1 e CB_1 não foi capaz de alterar os parâmetros relacionados à memória no modelo da localização de objetos [$F(3,35)=1,55$; $p=0,21$] e no labirinto aquático [$F(3,23)=0,09$; $p=0,99$]. Da mesma maneira, a co-administração 30 minutos antes do teste não afetou o índice de localização de objetos [$F(3,34)=0,44$; $p=0,72$] ou a porcentagem de

tempo gasto no quadrante correto no labirinto aquático [F(3,24)=1,68; p=0,19].

Tabela 5: Efeitos da administração pós-treino e pré-teste do antagonista dos receptores A₁ DPCPX 0,3 mg/kg e do antagonista dos receptores CB₁ AM 251 0,25 mg/kg, isoladamente ou em combinação, sobre os parâmetros comportamentais avaliados durante o teste nos modelos da Localização de Objetos e do Labirinto Aquático. N=7-10 por grupo.

	Tratamento (mg/kg i.p.)	Índice de localização de objetos (%) Média ± EPM	% de tempo no quadrante correto Média ± EPM
Administração Pós-treino	CONTROLE	52,02 ± 6,11	30,46 ± 3,34
	AM 0,25	45,19 ± 3,61	20,71 ± 3,50
	DPCPX 0,30	38,45 ± 4,51	16,42 ± 3,32
	AM 0,25 + DPCPX 0,30	49,81 ± 4,88	25,60 ± 3,53
Administração Pré-teste	CONTROLE	50,69 ± 8,33	23,09 ± 4,33
	AM 0,25	56,15 ± 4,14	23,33 ± 3,99
	DPCPX 0,30	53,62 ± 4,52	22,61 ± 2,23
	AM 0,25 + DPCPX 0,30	60,49 ± 7,26	23,57 ± 5,25

Uma vez que a co-administração não alterou a consolidação nem a evocação do aprendizado, nos experimentos seguintes investigouse os possíveis mecanismos pelos quais a co-administração pré-treino do DPCPX 0,3 mg/kg + AM 251 0,25 mg/kg melhorava memórias dependentes de hipocampo em camundongos. Na figura 12 é mostrada a participação do receptor NMDA na melhora cognitiva induzida pela co-administração dos antagonistas dos receptores A₁ e CB₁.

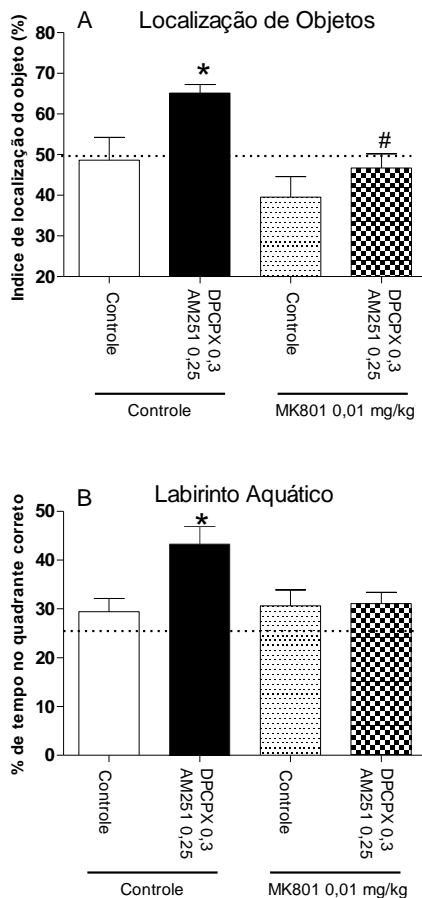


Figura 11: Participação dos receptores NMDA na melhora de aprendizado induzida pela interação de doses sub-efetivas dos antagonistas A1 e CB1. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. N= 7-9 por grupo.

A análise por ANOVA de duas-vias dos dados mostrados na figura 12 sugere que há efeito significativo da co-administração no modelo da localização de objetos [$F(1,34)=3,84$; $p < 0,05$] e no labirinto aquático [$F(1,30)=3,52$; $p < 0,05$]; significância do tratamento com o antagonista dos receptores NMDA, MK-801 0,01 mg/kg, no teste da localização de objetos [$F(1,34)=14,3$; $p < 0,01$] e no labirinto aquático

[F(1,30)=5,96; $p<0,05$]; e é significativa a interação entre os tratamentos sobre o índice de localização de objetos [F(1,34)=4,67; $p<0,05$] e sobre a porcentagem de tempo gasto no quadrante correto [F(1,30)= 5,18 $p<0,05$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls confirma a melhora de aprendizado induzida pela co-administração de DPCPX 0,3 mg/kg + AM 0,25 mg/kg, e ainda, o bloqueio deste efeito pela administração do antagonista dos receptores NMDA, MK-801 0,1 mg/kg, nos dois modelos animais utilizados.

Os dados para locomoção e tempo explorando cada um dos objetos durante o treino são mostrados na tabela 7. A análise por ANOVA de duas-vias indica que os tratamentos não alteraram de maneira significativa a locomoção dos animais durante o treino, co-administração: [F(1,34)=2,38; $p=0,13$]; tratamento com MK-801: [F(1,34)=0,15; $p=0,69$] e interação co-administração X MK-801: [F(1,34)=0,98; $p=0,32$]. Além disso, a análise por ANOVA de três-vias com medidas repetidas indica que não houve diferença entre o tempo de exploração dos dois objetos durante o treino [F(1,34)=0,58; $p=0,45$].

Tabela 6: Efeitos da administração de diferentes tratamentos, 30 minutos antes do treino, sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos Swiss no teste da localização de objetos.

Tratamento (mg/kg i.p.)		Locomoção Média ± EPM	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
CONTROLE	CONTROLE	58,5 ± 6,6	3,2 ± 0,6	3,7 ± 0,7
CONTROLE	CO-AD	44,1 ± 3,9	3,4 ± 0,8	4,0 ± 0,5
MK-801 0,01	CONTROLE	53,2 ± 3,7	3,9 ± 0,6	3,0 ± 0,5
MK-801 0,01	CO-AD	50,6 ± 4,1	3,5 ± 0,5	2,8 ± 0,7

Na tabela 8 são mostradas as latências para encontrar a plataforma durante o treino dos animais tratados com AM 0,25 mg/kg ou DPCPX 0,3 mg/kg, isoladamente ou em combinação, na presença ou não do MK-801. A análise por ANOVA de três-vias sugere que não houve diferença significativa entre os grupos [F(4,120)=0,59; $p=0,66$]

Tabela 7: Efeitos dos diferentes tratamentos sobre a latência para encontrar a plataforma no treino da tarefa do labirinto aquático.

Tratamento (mg/kg i.p.)		Latência (s) ± EPM Treino 1 – Treino 5				
CONTROL E	CONTROL E	55±4, 6	42±7, 5	42±8, 2	45±7, 2	37±6, 1
CONTROL E	CO-AD	60±0, 0	46±8, 4	52±6, 4	52±3, 5	47±6, 6
MK-801 0,01	CONTROL E	53±4, 3	45±7, 4	44±8, 3	52±2, 9	27±9, 7
MK-801 0,01	CO-AD	47±6, 2	42±8, 7	49±5, 0	35±6, 7	41±9, 2

CO-AD= AM 251 0,25 mg/kg + DPCPX 0,3 mg/kg i.p.

Depois de caracterizada a participação dos receptores NMDA na melhora do aprendizado induzida pela co-administração de DPCPX 0,3 mg/kg + AM 0,25 mg/kg, foi selecionado o modelo da localização de objetos para avaliar o papel dos receptores NMDA localizados no hipocampo e no córtex pré-frontal. Na figura 13 são mostrados dos dados referentes à infusão do MK-801 no hipocampo (Fig 13_A) ou no córtex pré-frontal (Fig 13_B) em animais que receberam a co-administração sistêmica de DPCPX 0,3 mg/kg + AM 0,25 mg/kg. A análise por ANOVA de duas-vias sugere efeito significativo da co-administração: Fig 13_A [F(1,30)= 2,35; p<0,05] e Fig 13_B [F(1,32)=2,05; p<0,05]; da infusão do MK-801 [F(1,30)= 1,25; p<0,05] e Fig 13_B [F(1,32)=10,59; p<0,05]; e por fim efeito significativo da interação entre a co-administração e a infusão do MK-801 no hipocampo [F(1,30)=4,96; p<0,05] e no córtex pré-frontal [F(1,32)=4,76; p<0,05]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls confirma a melhora do aprendizado induzida pela co-administração e também a reversão deste efeito após o bloqueio dos receptores NMDA no hipocampo e no córtex pré-frontal.

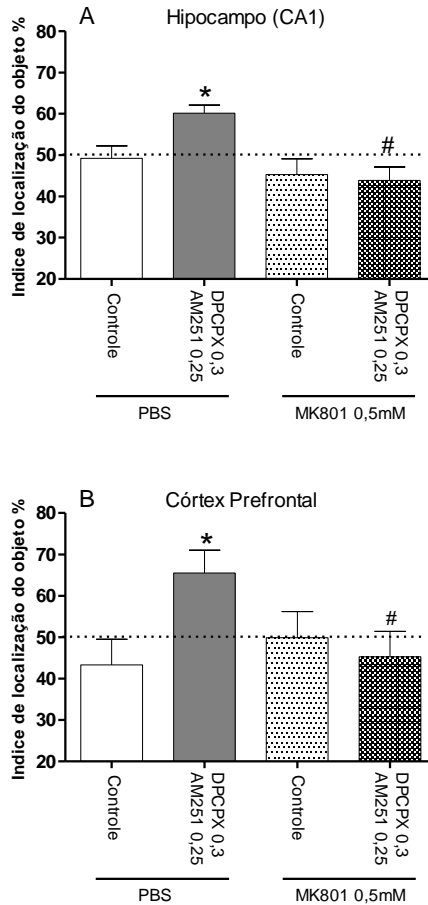


Figura 12: Participação dos receptores NMDA cortico-hipocampais na melhora de aprendizado induzida pela interação de doses sub-efetivas dos antagonistas A_1 e CB_1 . # $p < 0,05$ comparado ao grupo co-administração + PBS; N= 8-10 por grupo.

Os parâmetros registrados no treino que se referem aos dados apresentados na figura acima são mostrados na tabela 9. A análise estatística por ANOVA de duas-vias sugere que não houve diferença significativa para a locomoção durante o treino em nenhum dos experimentos: infusão intra-hipocampo: $[F(1,30)=0,03; p=0,85]$ e

infusão intra córtex pré-frontal [F(1,32)=0,51; p=0,99]. Além disso, a análise por ANOVA de três vias com medidas repetidas para a exploração dos objetos durante o treino sugere que não houve diferença entre os grupos: infusão intra-hipocampo: [F(1,30)=0,03; p=0,85] e infusão intra córtex pré-frontal [F(1,32)=0,51; p=0,99].

Tabela 8: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos Swiss no teste da localização de objetos.

Tratamento (0,5 µL/camundongo)		Locomoção (Média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
Infusão intra-CA1				
PBS	CONTROLE	58,5 ± 6,6	5,2 ± 0,8	5,7 ± 0,8
PBS	CO-AD	44,1 ± 3,9	6,4 ± 0,6	6,0 ± 0,4
MK	CONTROLE	53,2 ± 3,7	5,9 ± 0,8	5,0 ± 0,6
MK	CO-AD	50,6 ± 4,1	5,5 ± 0,3	4,8 ± 0,6
Infusão intra-Córtex Pré-frontal				
PBS	CONTROLE	44,8 ± 3,9	4,0 ± 0,8	4,5 ± 0,5
PBS	CO-AD	48,8 ± 4,0	4,2 ± 0,6	4,8 ± 0,7
MK	CONTROLE	54,7 ± 6,1	4,7 ± 0,5	3,8 ± 0,7
MK	CO-AD	54,6 ± 7,3	4,2 ± 0,7	3,6 ± 0,5

CO-AD= AM 251 0,25 mg/kg + DPCPX 0,3 mg/kg i.p.

Após caracterizar a participação dos receptores NMDA, localizados no hipocampo e no córtex pré-frontal, sobre os efeitos comportamentais produzidos pela co-administração dos antagonistas dos receptores A₁, DPCPX 0,3 mg/kg e CB₁, AM 251 0,25 mg/kg, dois ensaios bioquímicos foram realizados. No primeiro se verificou a liberação de glutamato após a co-administração sistêmica dos antagonistas. No segundo a viabilidade celular dos neurônios cortico-hipocâmpais foi avaliada através do ensaio com MTT.

A figura 14 mostra os valores da % de glutamato liberados em fatias de hipocampo (Fig 14_A) e córtex pré-frontal (Fig. 14_B) em animais tratados sistemicamente com solução controle, DPCPX 0,3 mg/kg, AM 251 0,25 mg/kg isoladamente ou em combinação. A análise estatística por ANOVA de uma-via sugere efeito significante para o tratamento tanto no ensaio realizado com fatias de hipocampo [$F(3,24)=2,97$ $p<0,05$] quanto naquele realizado com fatias de córtex pré-frontal [$F(3,24)=2,50$ $p<0,05$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls corrobora o aumento significativo da liberação de glutamato induzida pela administração conjunta dos antagonistas dos receptores A₁ e CB₁.

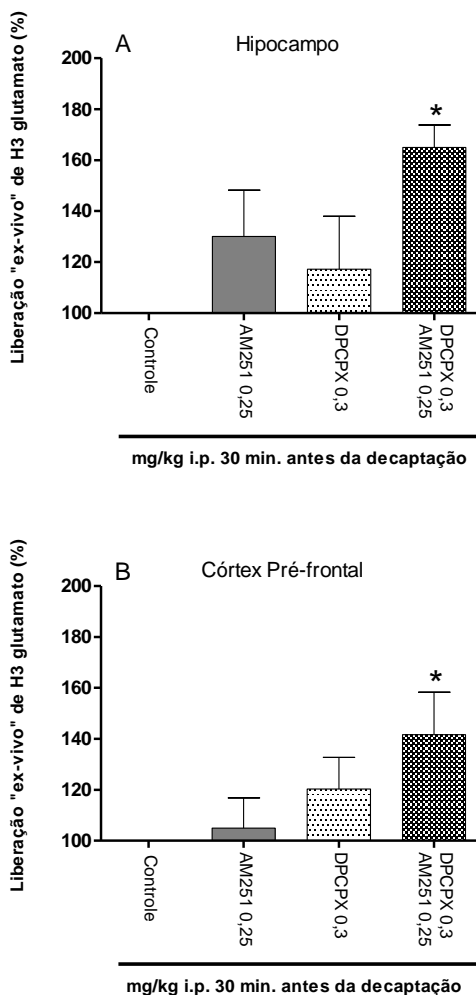


Figura 13: Liberação “ex-vivo” de L-[3H]-glutamato em fatias de hipocampo e córtex pré-frontal em camundongos tratados com AM 251 0,25 mg/kg e/ou DPCPX 0,3 mg/kg. * $p < 0,05$ contra o grupo controle.

Por fim, uma vez que a liberação de glutamato está associada à neurotoxicidade, se realizou o ensaio do MTT para averiguar a viabilidade celular das áreas previamente estudadas. Conforme se

observa na tabela 10 e confirma-se pela análise estatística por ANOVA de uma-via, não houve diferença significativa entre os tratamentos tanto no hipocampo [F(3,8)=0,39; p=0,75] quanto no córtex pré-frontal [F(3,8)=0,76; p=0,62].

Tabela 9: Redução do MTT em fatias de hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos tratados com AM 251 0,25 mg/kg e/ou DPCPX 0,3 mg/kg.

Tratamento (mg/kg)	Hipocampo (MTT % do controle)	Córtex Pré-frontal (MTT % do controle)
AM 0,25	100,14 ± 7,4	92,41 ± 7,2
DPCPX 0,3	108,30 ± 7,6	88,30 ± 14,4
CO-AD	92,55 ± 5,1	97,10 ± 3,4

CO-AD= AM 251 0,25 mg/kg + DPCPX 0,3 mg/kg i.p.

5.3. Interação funcional entre os receptores A₁ e CB₁ localizados no hipocampo no controle da amnésia induzida por agonistas de ambos os receptores.

No terceiro grupo de experimentos avaliou-se a possível interação entre os receptores A₁ e CB₁ no controle da amnésia induzida por ambos os receptores. Na figura 15 são mostrados os experimentos realizados com o objetivo de caracterizar o efeito amnésico dos agonistas dos receptores A₁ e CB₁, CCPA e WIN 55,212-2 respectivamente. A análise estatística por ANOVA de uma-via sugere efeito significativo tanto para o tratamento com CCPA [F(3,40)=2,56; p<0,05] (Fig 15_A) quanto para o tratamento com WIN 55,212-2 [F(3,38)=3,49; p<0,05] (Fig 15_B). O *post-hoc* de Newman-Keuls confirmou a redução significativa do índice de localização de objetos dos animais tratados com CCPA 0,1 mg/kg ou WIN 55,212-2 1,0 mg/kg.

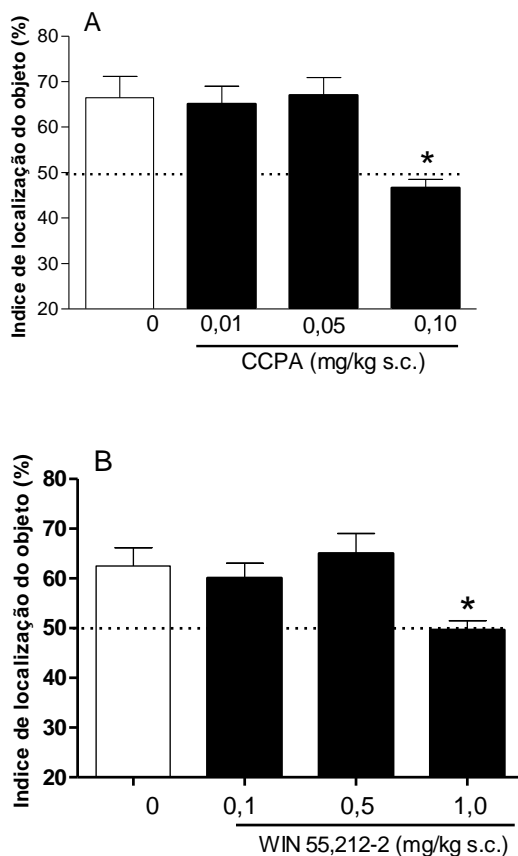


Figura 14: Efeitos do tratamento com os agonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 e canabinóides CB_1 sobre a memória de localização de objetos em camundongos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. $N = 8-12$ por grupo.

Os dados relativos ao treino dos experimentos mostrados na figura acima são descritos na tabela 11. A análise estatística sugere que não houve diferença para a atividade locomotora entre os grupos tratados com CCPA [$F(3,40) = 0,78$; $p = 0,93$] (Fig 15_A) ou WIN 55,212-2 [$F(3,38) = 0,56$; $p = 0,86$]. Além disso, a análise por ANOVA de duas-vias com medidas repetidas sugere que o tempo de exploração de cada um

dos objetos não foi diferente: CCPA [F(3,40)= 0,76; p=0,59] e WIN 55,212-2 [F(3,38)=0,67; P=0,50].

Tabela 10: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos Swiss no teste da localização de objetos.

Tratamento mg/kg (s.c.)	Locomoção (Média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
Controle	48,2 ± 4,3	4,4 ± 0,8	4,9 ± 0,9
CCPA 0,01	46,2 ± 3,1	4,0 ± 0,5	5,0 ± 0,8
CCPA 0,05	43,6 ± 5,9	4,9 ± 0,7	5,0 ± 0,8
CCPA 0,10	50,5 ± 5,2	4,5 ± 0,6	4,2 ± 0,7
Controle	38,9 ± 4,2	5,4 ± 0,7	5,9 ± 0,8
WIN 55,212-2 0,10	36,8 ± 4,3	5,9 ± 0,5	5,7 ± 1,1
WIN 55,212-2 0,50	33,5 ± 3,9	6,0 ± 1,0	6,1 ± 0,8
WIN 55,212-2 1,00	30,6 ± 3,2	5,3 ± 0,8	5,1 ± 0,9

Uma vez caracterizada a dose amnésica dos agonistas A₁ e CB₁, os próximos experimentos foram realizados para avaliar a influência da ativação ou do bloqueio de um receptor sobre o efeito amnésico do outro. Ou seja, na figura 16_A são mostrados os dados referentes à influência do bloqueio do receptor CB₁ sobre a amnésia induzida pelo CCPA. A análise estatística destes dados sugere efeito significativo do tratamento com o CCPA 0,1 mg/kg [F(1,54)=9,25 p<0,01], AM 251 [F(2,54)= 5,58 p<0,01] e a interação entre os tratamentos [F(2,54)=9,14 p<0,01]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls confirma a amnésia induzida pelo CCPA e também o bloqueio deste efeito pela administração do antagonista CB₁, AM 251 0,5 mg/kg. Por outro lado, na figura 16_B são mostrados os dados relativos ao efeito da ativação do receptor CB₁ sobre o prejuízo do aprendizado induzido pela ativação do receptor A₁. A análise estatística destes dados sugere que embora exista

efeito significativo do tratamento com CCPA [$F(1,68)=185,4$ $p<0,001$], nem o tratamento com o WIN 55,212-2 [$F(2,68)=5,4$ $p=0,11$] tampouco a interação entre tratamentos [$F(2,68)=6,4$ $p=0,93$] produziram alterações significantes.

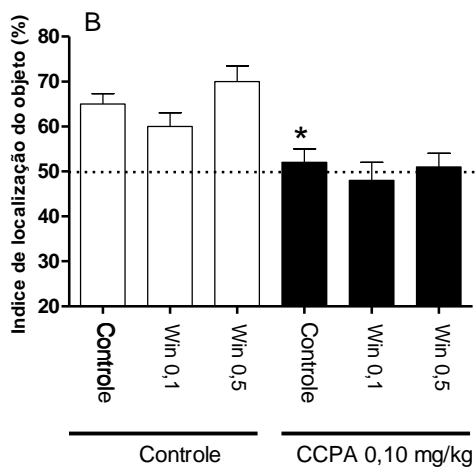
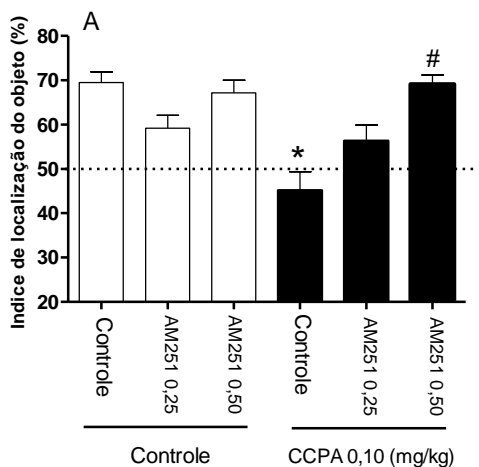


Figura 15: Avaliação da interação funcional entre receptores A_1 e CB_1 no prejuízo de memórias dependentes de hipocampo. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. N= 10-12 por grupo. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle.

Os dados do treino referente aos resultados mostrados na figura 16 podem ser observados na tabela 12. A análise estatística sugere que não houve diferença significativa para os parâmetros registrados em nenhum dos dois experimentos, seja para a exploração de ambos os objetos durante o treino: interação CCPA 0,1 X AM 251 [F(4,54= 1,45; $p=0,89$) e interação CCPA X WIN 55,212-2 [F(4,68= 3,32; $p=1,92$], ou para a atividade locomotora: interação CCPA 0,1 X AM 251 [F(2,54= 2,01; $p=1,32$] e interação CCPA X WIN 55,212-2 [F(2,68= 2,80; $p=0,87$].

Tabela 11: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos no teste da localização de objetos.

Tratamento		Locomoção (Média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
Controle	Controle	30,9 ± 3,1	3,6 ± 0,5	3,9 ± 0,8
Controle	AM 0,25	32,5 ± 2,4	3,9 ± 0,9	3,7 ± 1,1
Controle	AM 0,50	29,9 ± 3,6	4,6 ± 0,9	4,5 ± 0,7
CCPA 0,10	Controle	30,8 ± 2,8	4,3 ± 0,5	4,1 ± 0,8
CCPA 0,10	AM 0,25	33,9 ± 3,1	3,9 ± 1,0	4,2 ± 0,8
CCPA 0,10	AM 0,50	35,1 ± 3,8	3,1 ± 0,9	3,3 ± 0,8
Controle	Controle	32,2 ± 4,9	4,4 ± 0,7	3,6 ± 0,9
Controle	WIN 0,1	31,3 ± 4,8	3,9 ± 0,5	3,1 ± 1,3
Controle	WIN 0,5	29,9 ± 3,5	4,0 ± 1,0	3,8 ± 0,7
CCPA 0,10	Controle	30,2 ± 3,9	3,3 ± 0,8	3,9 ± 0,8
CCPA 0,10	WIN 0,1	31,9 ± 3,5	3,0 ± 1,0	4,8 ± 0,8
CCPA 0,10	WIN 0,5	29,2 ± 3,6	4,3 ± 0,8	4,9 ± 1,0

No experimento seguinte avaliou-se o efeito do bloqueio ou da ativação do receptor A_1 sobre a amnésia induzida pelo agonista do receptor CB_1 . Na figura 17 é mostrado o efeito do tratamento com o antagonista do receptor A_1 , DPCPX 0,3 e 1,0 mg/kg, sobre o prejuízo de aprendizado induzido pelo tratamento com o agonista do receptor CB_1 , WIN 55,212-2 1,0 mg/kg. A análise por ANOVA de duas-vias sugere que embora exista efeito significativo do tratamento com o WIN [$F(1,44)=0,77$ $p<0,05$], não foram estatisticamente significantes os efeitos do tratamento com DPCPX [$F(1,44)=0,67$ $p=0,33$] nem a interação entre os tratamentos [$F(2,44)=1,11$ $p=0,33$]. Por outro lado, na figura 17_B foram significantes tanto o efeito do tratamento com o agonista CB_1 [$F(1,48)=15,63$ $p<0,01$], quanto os efeitos do tratamento com agonista A_1 [$F(2,48)=7,14$ $p<0,05$] e a interação entre os tratamentos com WIN e CCPA [$F(2,48)=5,17$ $p<0,05$]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls confirma tanto o efeito amnésico do tratamento com WIN 1,0 mg/kg, bem como o bloqueio deste efeito nos animais que receberam a administração de CCPA 0,05 mg/kg.

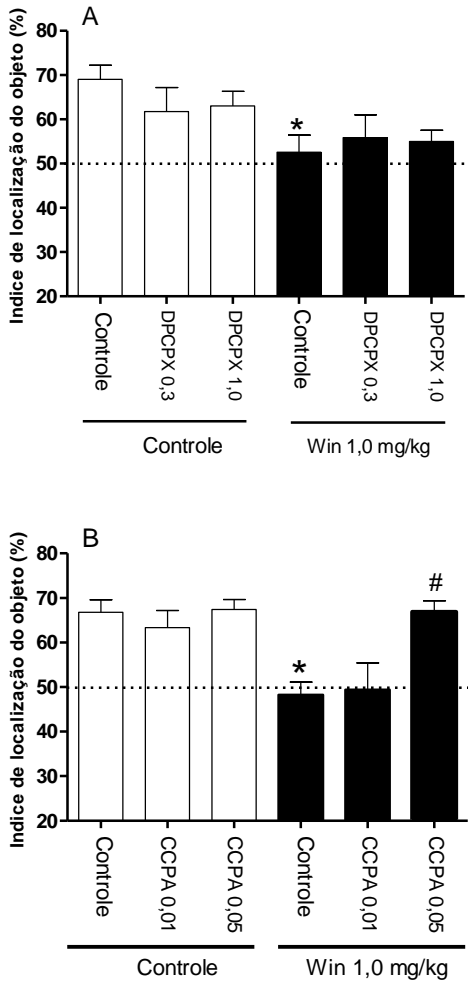


Figura 16: Avaliação da interação funcional entre receptores A_1 e CB_1 no prejuízo de memórias dependentes de hipocampo. * $p < 0,05$ contra o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle. $N = 8-10$ por grupo.

Os parâmetros comportamentais registrados no treino dos experimentos apresentados acima são descritos na tabela 13. A análise estatística sugere que não houve diferença significativa para os

parâmetros registrados em nenhum dos dois experimentos, ou seja, os animais exploraram os dois objetos de maneira semelhante: interação WIN X DPCPX [F(4,44)= 0,68 p=2,70] e interação WIN x CCPA [F(4,48)= 0,97 p=2,35]. Além disso, não houveram diferenças significativas na atividade locomotora: interação WIN X DPCPX [F(2,44)= 1,58 p=0,90] e interação WIN x CCPA [F(2,48)= 3,01 p=4,55].

Tabela 12: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos Swiss no teste da localização de objetos.

Tratamento		Locomoção (Média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
Controle	Controle	35,2 ± 4,2	3,2 ± 0,6	3,5 ± 1,0
Controle	DPCPX 0,3	36,3 ± 3,6	3,9 ± 0,6	4,1 ± 1,1
Controle	DPCPX 1,0	34,9 ± 5,3	3,8 ± 1,2	2,8 ± 0,9
WIN 1,0	Controle	35,2 ± 4,8	3,1 ± 0,8	4,0 ± 0,9
WIN 1,0	DPCPX 0,3	36,9 ± 5,3	2,9 ± 1,2	3,8 ± 0,9
WIN 1,0	DPCPX 1,0	28,2 ± 6,3	3,3 ± 0,8	3,9 ± 1,1
Controle	Controle	37,1 ± 4,1	5,4 ± 0,9	5,6 ± 0,9
Controle	CCPA 0,01	34,9 ± 4,4	5,9 ± 0,8	5,1 ± 1,0
Controle	CCPA 0,05	33,8 ± 4,0	4,1 ± 1,1	3,9 ± 0,8
WIN 1,0	Controle	34,3 ± 3,2	5,3 ± 0,5	5,1 ± 0,7
WIN 1,0	CCPA 0,01	35,6 ± 4,4	5,0 ± 1,2	4,7 ± 1,3
WIN 1,0	CCPA 0,05	33,5 ± 3,0	5,3 ± 1,0	4,5 ± 1,3

Os experimentos seguintes foram elaborados com o objetivo de avaliar a participação da região CA1 do hipocampo de camundongos sobre os seguintes efeitos observados anteriormente: 1) o bloqueio do efeito amnésico do agonista A₁ através da administração do antagonista dos receptores CB₁; 2) a reversão do prejuízo de aprendizado induzida pela agonista CB₁, WIN 55,212-2, após o tratamento com o agonista dos receptores A₁, CCPA.

Dada a inexistência de trabalhos sugerindo a faixa de dose na qual o CCPA – quando infundido na região CA1 do hipocampo – induzia efeito amnésico, foi realizada uma curva-resposta para os efeitos da infusão desta droga sobre a memória de localização de objetos (fig. 18). A análise estatística por ANOVA de uma-via sugere efeito significativo do tratamento [$F_{3,44}=4,94$; $p<0,01$] e o *post-hoc* de Newman-Keuls confirma o efeito amnésico da infusão intra-hipocampal de CCPA 10 nMOL.

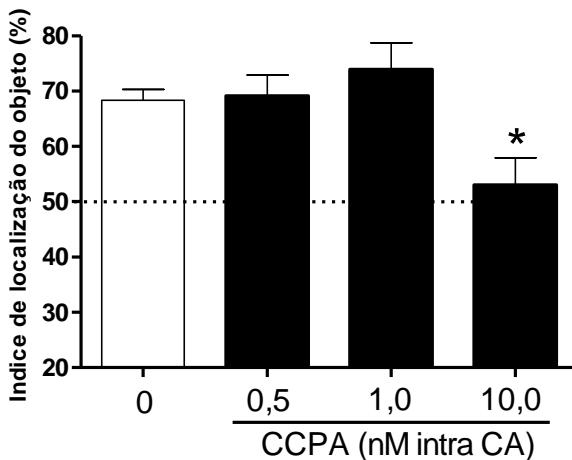


Figura 17: Efeitos da infusão na região CA1 do hipocampo do agonista dos receptores adenosinérgicos A_1 , CCPA, sobre a memória de localização de objetos em camudongos Swiss. * $p<0,05$ contra o grupo controle. N= 12 por grupo.

Na outra página são mostrados os dados relativos ao treino dos animais que receberam a infusão intra-hipocampal de PBS ou CCPA (0,5; 1,0 ou 10 nM). A análise estatística - ANOVA de uma via - para o efeito do tratamento sobre a locomoção dos animais sugere que não houve diferença significativa [$F(3,44)=0,35$; $p=2,69$]. Além disso, a análise por ANOVA de duas-vias com medidas repetidas para o tempo de exploração de cada um dos objetos durante o treino, sugere que o tempo de exploração de ambos foi semelhante [$F(6,86)=0,56$; $p=0,80$].

Tabela 13: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos no teste da localização de objetos.

Tratamento nM intra CA1	Locomoção (Média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
Controle	49,1 ± 5,1	3,1 ± 0,5	3,5 ± 0,4
CCPA 0,5	45,9 ± 4,3	2,9 ± 0,8	3,1 ± 0,6
CCPA 1,0	43,8 ± 5,0	3,1 ± 0,9	3,0 ± 0,5
CCPA 10,0	47,4 ± 5,2	3,3 ± 0,4	3,1 ± 0,7

No experimento seguinte investigou-se o papel dos receptores A_1 e CB_1 da região CA1 do hipocampo sobre o bloqueio da amnésia induzida pelo agonista A_1 , CCPA, evidenciado após o tratamento com o antagonista dos receptores CB_1 , AM 251. Na figura 19_A são mostrados os efeitos da infusão intra-CA1 do antagonista CB_1 , AM 251 1 μ MOL, sobre a ação da administração sub-cutânea do agonista A_1 , CCPA 0,1 mg/kg. A análise por ANOVA de duas-vias sugere efeito significativo do tratamento com CCPA [F(1,28)=4,65 p<0,05] e da interação entre os tratamentos com AM 251 e CCPA [F(1,28)=4,55 p<0,05], porém não há indicação de efeito significativo exclusivamente para o AM 251 [F(1,28)=2,67 p=0,11]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls confirma o efeito amnésico da administração sistêmica do CCPA e o bloqueio deste efeito pela infusão intra-CA1 do antagonista CB_1 , AM 251. Na figura 19_B é exposto o efeito da infusão intra-CA1 do agonista A_1 na presença ou na ausência do antagonista CB_1 , AM 251, o qual foi administrado sistemicamente. A análise por ANOVA de duas-vias sugere efeito significativo da infusão com CCPA 10 nMOL [F(1,26)=4,52 p<0,05], do tratamento sistêmico com AM 251 0,5 mg/kg [F(1,26)=1,25 p<0,05] e por fim, da interação entre ambos os tratamentos [F(1,26)=4,26 p<0,05]. O *post-hoc* por Newman-Keuls confirma o prejuízo do aprendizado pela infusão do CCPA e também o bloqueio deste efeito pela administração do AM 251.

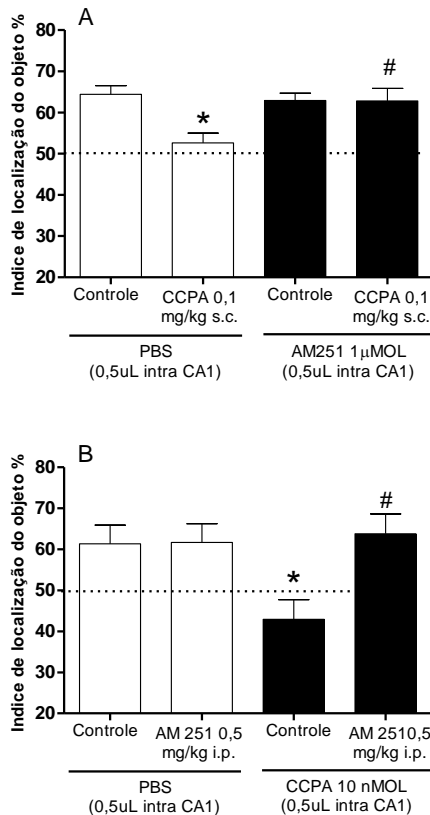


Figura 18: Participação da região CA1 do hipocampo na interação funcional entre receptores A_1 e CB_1 no prejuízo da memória de localização de objetos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle. $N = 7-8$ por grupo.

As possíveis alterações na atividade locomotora, bem como no tempo de exploração de cada um dos objetos durante o treino dos animais são apresentados na tabela 14. Para a atividade locomotora, a análise por ANOVA de duas-vias sugere que não houve diferença significativa induzida por nenhum dos tratamentos: interação AM x CCPA [$F(1,28) = 2,0$ $p = 0,8$] e interação CCPA x AM [$F(1,26) = 0,68$; $p = 2,21$]. Além disso, quando avaliada a diferença de exploração dos

dois objetos apresentados durante o treino, a análise por ANOVA de três-vias com medidas repetidas não indicou diferença significativa entre os grupos: [F(2,28)=0,75 p=0,30] (Fig 19_A) e [F(2,26)=2,15 p=1,39] (Fig 19_B).

Tabela 14: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos no teste da localização de objetos.

Tratamento (via)		Locomoção (Média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
PBS (intra-CA1)	Controle (s.c.)	36,3 ± 4,6	4,8 ± 1,5	4,6 ± 1,2
PBS (intra-CA1)	CCPA 0,1 (s.c)	35,6 ± 4,7	5,2 ± 1,0	5,5 ± 1,3
AM (intra-CA1)	Controle (s.c.)	34,9 ± 4,4	3,3 ± 0,6	3,8 ± 0,7
AM (intra-CA1)	CCPA 0,1 (s.c)	35,4 ± 3,5	4,4 ± 0,9	4,0 ± 0,6
PBS (intra-CA1)	Controle (i.p.)	37,1 ± 4,1	3,2 ± 0,8	2,6 ± 0,9
PBS (intra-CA1)	AM 0,5 (i.p.)	34,9 ± 4,4	3,8 ± 0,9	3,1 ± 1,0
CCPA (intra-CA1)	Controle (i.p.)	33,8 ± 4,0	4,4 ± 1,0	3,9 ± 0,8
CCPA (intra-CA1)	AM 0,5 (i.p.)	34,3 ± 3,2	4,3 ± 1,1	4,1 ± 0,7

Por fim, investigou-se a participação dos receptores A₁ e CB₁ localizados na região CA1 do hipocampo, sobre a reversão do prejuízo de aprendizado induzido pelo agonista CB₁ observado após a administração do agonista A₁. Na figura 20_A observa-se o efeito da infusão intra-CA1 de uma dose do agonista A₁, CCPA 1nMOL, sobre os efeitos da administração sub-cutânea do agonista CB₁, WIN 1,0 mg/kg. A análise estatística por ANOVA de duas-vias sugere efeito

significativo da infusão do CCPA [$F(1,26)=7,65$ $p<0,05$]; da administração do agonista CB_1 WIN 55,212-2 [$F(1,26)=4,53$ $p<0,05$] e da interação entre os tratamentos [$F(1,26)=4,17$ $p<0,05$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls confirma o efeito amnésico do agonista CB_1 e também o bloqueio deste efeito pela ativação dos receptores A_1 localizados na região CA1 do hipocampo. A análise estatística dos dados apresentados na figura 20_B sugere efeito significativo da infusão com WIN 55,212-2 10 nMOL [$F(1,28)=4,86$ $p<0,05$]; da administração sub-cutânea do agonista A_1 [$F(1,28)=12,16$ $p<0,05$] e da interação entre os tratamentos [$F(1,28)=12,72$ $p<0,05$]. A análise *post-hoc* confirma o bloqueio do prejuízo do aprendizado induzido pelo agonista CB_1 após a administração do agonista A_1 .

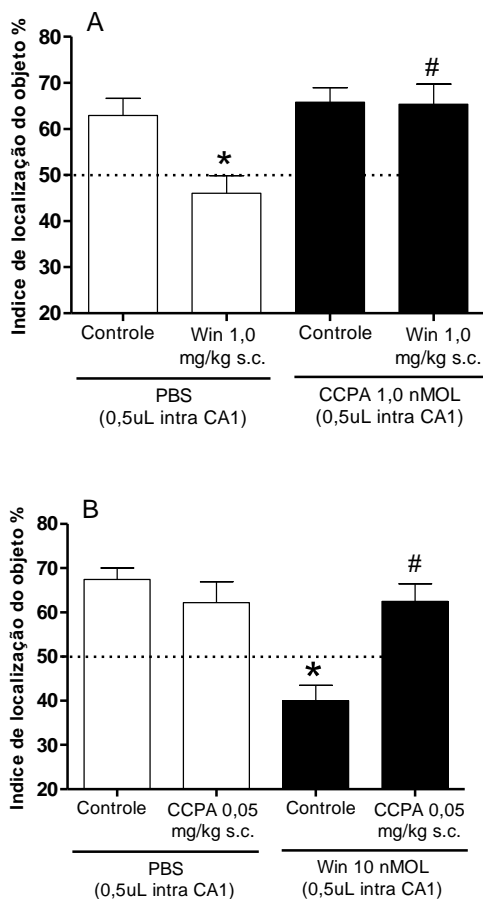


Figura 19: Participação da região CA1 do hipocampo na interação funcional entre receptores A_1 e CB_1 no prejuízo da memória de localização de objetos. * $p < 0,05$ contra o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle. $N = 7-8$ por grupo.

Os parâmetros registrados durante o treino foram analisados e não se observou diferenças significativas. A análise por ANOVA de duas-vias para a atividade locomotora não indicou diferenças significativas: interação CCPA x WIN [$F(1,26) = 0,49$; $p = 0,70$];

interação WIN x CCPA [$F(1,28)=0,65$ $p=0,30$]. Por fim, quando avaliada a diferença de exploração dos dois objetos durante o treino, a análise por ANOVA de três-vias com medidas repetidas não indicou diferença significativa entre os grupos: [$F(2,26)=0,82$; $p=0,94$] (Fig 20_A) e [$F(2,28)=0,89$; $p=0,70$] (Fig 20_B).

Tabela 15: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os parâmetros comportamentais registrados durante o treino de camundongos no teste da localização de objetos.

Tratamento (via)		Locomoção (Média ± EPM)	Tempo explorando objeto 1 (s) (média ± EPM)	Tempo explorando objeto 2 (s) (média ± EPM)
PBS (intra- CA1)	Controle (s.c.)	39,1 ± 3,2	4,7 ± 0,9	4,6 ± 0,6
PBS (intra- CA1)	WIN 1,0 (s.c.)	38,3 ± 3,6	4,3 ± 0,8	4,5 ± 0,9
CCPA (intra- CA1)	Controle (s.c.)	29,1 ± 4,4	3,4 ± 0,5	4,0 ± 0,9
CCPA (intra- CA1)	WIN 1,0 (s.c.)	31,3 ± 3,9	4,9 ± 0,8	5,1 ± 0,6
PBS (intra- CA1)	Controle (s.c.)	47,1 ± 5,1	3,8 ± 0,5	3,6 ± 0,8
PBS (intra- CA1)	CCPA (s.c.)	44,9 ± 4,0	4,0 ± 0,6	4,1 ± 1,0
WIN (intra- CA1)	Controle (s.c.)	43,8 ± 5,5	3,4 ± 0,6	3,1 ± 0,7
WIN (intra- CA1)	CCPA (s.c.)	44,3 ± 5,4	3,6 ± 1,1	4,2 ± 0,9

Uma vez que os experimentos comportamentais sugeriam a interação entre os receptores A_1 e CB_1 no hipocampo, realizamos ensaios de ligação contra os ligantes radioativos dos receptores A_1 (3H -DPCPX) e CB_1 (3H -SR141716a). Na figura 21, observam-se os dados do ensaio de ligação de concentrações crescentes do agonista CB_1 (WIN 0,1 – 10,0 μ M) ou do antagonista CB_1 (AM 0,1 – 10 μ M) contra o ligante radioativo dos receptores A_1 , (3H -DPCPX 5nM). A análise estatística destes dados sugere que o AM 251, na concentração de 10 μ M, desloca a ligação do 3H -DPCPX em aproximadamente 50% ($t=6,9$ $p<0,001$), com uma IC_{50} sugerida de 2,0 μ M.

Depois de caracterizada a interação do antagonista dos receptores CB_1 com o receptor A_1 , na figura 22 é mostrada os resultados do ensaio de ligação de concentrações crescentes do agonista A_1 (CCPA 0,1 – 10,0 μ M) ou do antagonista A_1 (DPCPX 0,1 – 10,0 μ M) contra o antagonista CB_1 radioativo (3H -SR141716a 0,5nM). Como se pode observar, nenhuma das drogas afetou a ligação do 3H -SR141716a nos receptores hipocampais.

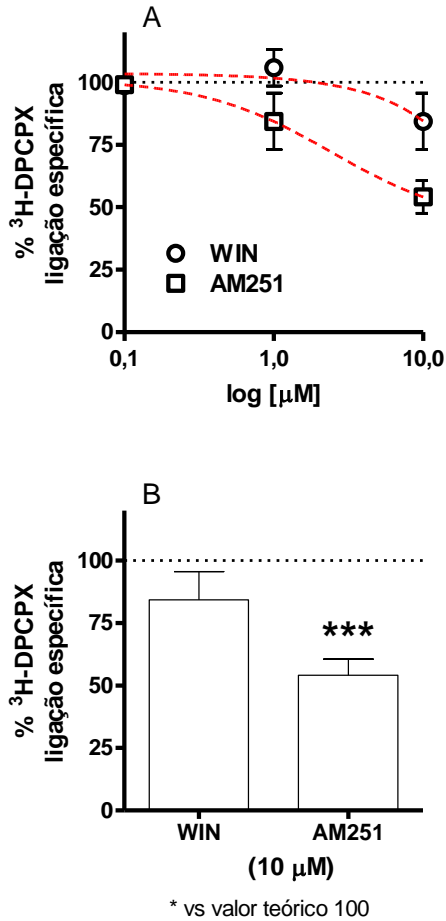


Figura 20: Ensaio para a avaliação da interação de ligantes do receptor CB_1 e a ligação do antagonista radioativo do receptor A_1 , $^3\text{H-DPCPX}$. Todos os pontos representam a média \pm EPM de 4-6 amostras. Além disso, cada curva de saturação foi feita em duplicata.

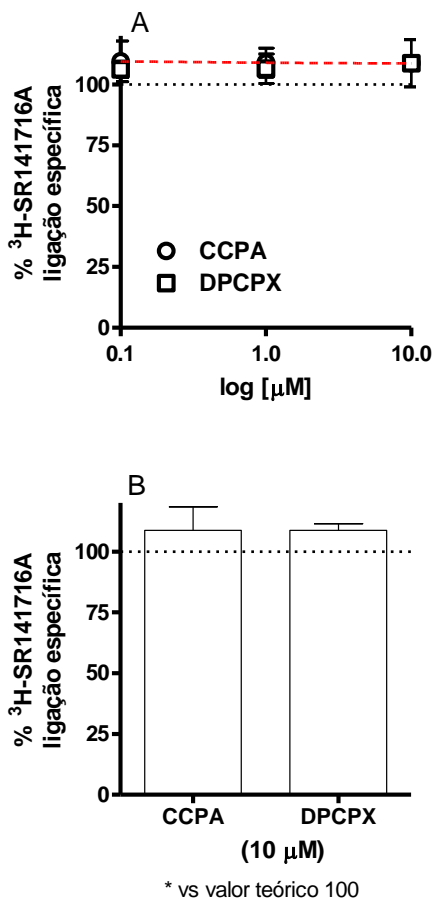


Figura 21: Ensaio para a avaliação da interação de ligantes do receptor A_1 e a ligação do antagonista radioativo do receptor CB_1 , $^3\text{H-SR141716A}$. Todos os pontos representam a média \pm EPM de 4-6 amostras. Além disso, cada curva de saturação foi feita em duplicata.

6. DISCUSSÃO

Nos experimentos realizados nesta tese avaliou-se a interação entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 , no controle da memória espacial. Para atingir este objetivo, primeiramente foi realizada a validação farmacológica do modelo da localização de objetos em camundongos. Depois de certificada a aplicabilidade do modelo, observou-se que a co-administração de doses sub-efetivas dos antagonistas A_1 e CB_1 exerce efeito pró-cognitivo. Este efeito é mediado, pelo menos em parte, pela liberação de glutamato e a interação deste com os receptores NMDA no córtex pré-frontal e no hipocampo. Além disso, foi demonstrada a interação funcional entre os receptores A_1 e CB_1 na amnésia induzida por agonistas de ambos os receptores. Ou seja, a amnésia induzida pelo agonista A_1 , CCPA, pode ser bloqueada pelo antagonista CB_1 . Por outro lado, a amnésia induzida pelo agonista CB_1 é atenuada pelo agonista A_1 .

O desenvolvimento de camundongos transgênicos e “knockouts” tem sido um recurso valioso na farmacologia comportamental. Todavia, a maioria dos modelos animais é validada para ratos e, uma vez que nem sempre diferentes espécies podem ser comparadas cognitivamente (Whishaw e Tomie, 1996), o uso de camundongos nestas tarefas necessita de validação prévia. Além disso, mesmo quando se compara diferentes linhagens de camundongos percebe-se que pode haver diferenças de comportamento. Por exemplo, Koopmans e colaboradores (2003) mostraram que os camundongos C57BL desempenhavam melhor uma tarefa a ser executada em um labirinto circular do que os camundongos *Swiss*, BALB/c e 129/sv. Desta forma, como seriam utilizados camundongos *Swiss*, inicialmente validou-se o comportamento destes animais no modelo da localização de objetos.

O modelo da localização de objetos foi proposto por Ennaceur e colaboradores (1997), estes perceberam que ratos eram capazes não só de codificar e armazenar características do objeto, mas também a localização espacial dos mesmos. A opção pelo modelo deu-se porque este não submete os animais a situações estressantes, como natação forçada ou privação de comida. Sendo assim, poder-se-ia avaliar as interações entre os receptores A_1 e CB_1 no controle da memória espacial com menos interferências. Uma vez que há trabalhos mostrando a participação dos dois receptores em comportamentos alterados pelo

estresse e no comportamento alimentar (Coupar e Tan, 2002; Bermudez-Silva *et al.*, 2010).

Primeiramente percebemos que a expressão da memória de localização de objetos varia conforme o intervalo entre treino e teste. Ou seja, animais testados 90 ou 180 min após o treino percebem a mudança no ambiente, enquanto aqueles testados 30 ou 360 min não diferenciam os dois objetos. Resultados semelhantes foram demonstrados por Murai e colaboradores (2007), os quais evidenciaram que camundongos testados 60 e 120 minutos após o treino apresentavam índices de localização de objetos significativamente maiores do que aqueles testados com intervalos maiores. Por outro lado, observamos que os animais testados com 30 minutos de intervalo não distinguiram entre o objeto trocado de lugar e aquele que não foi movimentado. Este resultado faz sentido quando se considera que as memórias não são armazenadas imediatamente após a aquisição, ou seja, precisam ser consolidadas para que então possam ser evocadas (McGaugh, 2000). Desta forma percebemos que o teste da localização de objetos possui uma janela para a sua expressão. Sendo assim, diferentes intervalos entre treino e teste podem ser utilizados para a avaliação de drogas e/ou procedimentos com efeito amnésico e/ou pró-mnemônicos.

A validade preditiva do modelo da localização de objetos foi verificada utilizando-se drogas que modulam dois receptores amplamente relacionados ao aprendizado e a memória, são eles: os receptores colinérgicos muscarínicos (para revisão ver Hasselmo e Sarter, 2011) e os receptores NMDA (para revisão ver Riedel *et al.*, 2003). De maneira geral, pode-se perceber que camundongos *Swiss* avaliados no modelo da localização de objetos responderam tanto a drogas amnésicas quanto a pró-mnemônicas, as quais modularam direta ou indiretamente os dois receptores.

A sensibilidade do modelo a drogas com efeito amnésico foi avaliada através da administração do antagonista dos receptores colinérgicos muscarínicos, a escopolamina, ou do antagonista do receptor NMDA, MK-801. O prejuízo do aprendizado induzido por ambos é conhecido há décadas (Izquierdo, 1989; Benvenga e Spaulding, 1988), sendo que as duas drogas vêm sendo amplamente utilizadas na validação farmacológica de modelos animais (Murai *et al.*, 2007; Belzung e Berton, 1997) ou na busca por drogas com ação nootrópica (Buccaffusco, 2009; da Silva *et al.*, 2009). Na mesma linha de raciocínio, o efeito pró-mnemônico do inibidor da enzima acetilcolinesterase (iAChE), tacrina, e do agonista do sítio da glicina dos

receptores NMDA, d-cicloserina, são descritos em diferentes trabalhos pré-clínicos, tanto em ratos (Murakami *et al.*, 2000) quanto em camundongos (Saxena *et al.*, 2008). Além disso, os iAChE são utilizados clinicamente para o tratamento da doença de Alzheimer (Winslot *et al.*, 2011) e a d-cicloserina tem seu uso sugerido para a diminuição dos sintomas negativos e distúrbios cognitivos presentes em pacientes com esquizofrenia (Buchanan *et al.*, 2007).

Conforme mencionado na Introdução, o hipocampo possui papel fundamental no controle da memória espacial. Embora o modelo da localização de objetos tenha sido validado em ratos para estudos relacionados à memória espacial (Ennaceur *et al.*, 1997) e outros autores utilizem-no avaliando o efeito de drogas sobre a memória dependente de hipocampo em camundongos (Ferguson e Sapolsky, 2007). Este trabalho confirmou a participação da região CA1 do hipocampo na aquisição da memória de localização de objetos em camundongos. Em resumo, este grupo de resultados sugere que os camundongos *Swiss* exibem memória de localização de objetos num intervalo de tempo entre 90 e 180 min depois de treinados. A aquisição desta memória parece ser dependente de hipocampo e pode ser influenciada por drogas amnésicas. Além disso, drogas pró-mnemônicas parecem estender a expressão da memória de localização de objetos para um tempo de 360 minutos.

Nos experimentos seguintes avaliamos a interação entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através de seus receptores A₁ e CB₁, no controle da memória espacial. Para isso empregamos o modelo da localização de objetos (Assini *et al.*, 2009) e o labirinto aquático (Morris, 1984). Os resultados sugerem que a co-administração de doses sub-efetivas dos antagonistas A₁ e CB₁ exerce efeito pró-mnemônico em animais avaliados na duas tarefas comportamentais.

O papel da adenosina e dos eCB sobre a memória espacial foi revisado na Introdução. Brevemente, a adenosina e agonistas do receptor A₁ prejudicam a LTP e o comportamento de animais avaliados em modelos de aprendizado e memória (de Mendonça e Ribeiro, 2001). Por outro lado, antagonistas do receptor A₁ parecem exercer efeito pró-cognitivo (Stone *et al.*, 1995) e Fredholm e colaboradores (1999) sugerem que os efeitos da cafeína sobre a cognição devam-se ao bloqueio do receptor A₁. De mesma forma, eCBs e agonistas do receptor CB₁, prejudicam a LTP e a aquisição da memória espacial (Lichtman *et al.*, 1995) enquanto que antagonistas induzem melhora cognitiva (Terranova *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2005). Em nossos experimentos, o tratamento pré-treino de camundongos com o

antagonista A_1 , DPCPX, ou com o antagonista CB_1 , AM 251, melhorou a expressão da memória tanto no modelo da localização de objetos quanto no labirinto aquático. Estes resultados corroboram os efeitos descritos por outros autores (Fraser *et al.*, 1997; Nawata *et al.*, 2010; De Bruin *et al.*, 2010; Mioranza *et al.*, 2011) e confirmam a sensibilidade do modelo da localização de objetos para os antagonistas A_1 e CB_1 .

Uma vez que tanto o bloqueio do receptor A_1 quanto do CB_1 levou a efeito pró-mnemônico, especulamos que ambos os sistemas participavam da amnésia exibida pelos animais controles. Sendo assim, a co-administração das doses sub-efetivas de ambos os antagonistas poderia levar a sinergismo ou efeito aditivo. Desta forma, administramos diferentes combinações dos antagonistas A_1 e CB_1 em animais que foram avaliados na tarefa da localização do objeto ou no labirinto aquático. Os resultados mostram que a variação da dose dos antagonistas A_1 ou CB_1 não interfere no efeito pró-mnemônico observado, uma vez que todos os tratamentos foram capazes de melhorar a memória espacial em pelo menos um dos modelos utilizados.

Os estudos de interações entre drogas fazem parte da história da farmacologia e diferentes cálculos vêm sendo utilizados para a caracterização destas interações (para revisão ver Tallarida, 2007). Todavia, devido à natureza de nossos experimentos, ou seja: a resposta não se intensifica com a dose e o efeito máximo é muito próximo do mínimo, a realização de isobogramas ou o cálculo do índice de interação torna-se inviável, dificultando a definição do efeito pró-mnemônico da co-administração como aditivo ou sinérgico. Na literatura existem evidências que os receptores A_1 e CB_1 interagem de maneira aditiva. De Santy e Dar (2001) mostraram que a incoordenação motora induzida pelo agonista CB_1 – CP55,920 – pode ser acentuada pela administração intra-cerebelar do agonista A_1 , CPA. Recentemente, Serpa e colaboradores (2009) avaliaram a liberação de glutamato, através da inibição do potencial excitatório pós-sináptico (PEPS), induzido pelos agonistas A_1 (CPA) e CB_1 (WIN 55,212-2) em fatias de hipocampo. Estes autores concluíram que a co-infusão dos agonistas produziu uma inibição do PEPS semelhante à soma da inibição induzida por cada uma das drogas em separado, sugerindo que os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através de seus receptores A_1 e CB_1 , compartilham vias intracelulares associadas à liberação de glutamato em sinapses hipocámpais. Nesta tese demonstramos que a co-administração dos antagonistas A_1 e CB_1 produziu efeito pró-cognitivo, este foi evidenciado com a utilização de doses até 20 vezes menores do que

aquelas necessárias para produzir o mesmo efeito quando administradas isoladamente, permitindo-nos inferir que os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide interagem no controle do processo de memória avaliado.

Embora diferentes autores tenham mostrado a participação tanto dos receptores A_1 (Pereira *et al.*, 2002) quanto CB_1 (Clarke *et al.*, 2008) nos mecanismos de consolidação e evocação da memória, a co-administração das doses não-efetivas de DPCPX (0,3 mg/kg) e AM 251 (0,25 mg/kg) não alterou estes processos em camundongos avaliados tanto no modelo da localização de objetos quanto no labirinto aquático. A falta de efeito poderia ser justificada porque as doses utilizadas foram muito baixas e não interferiram com a consolidação ou a evocação. Desta forma, para descartar a ausência da interação A_1/CB_1 seriam necessários experimentos com outras doses. Por outro lado, uma vez que havíamos observado interação entre os receptores na aquisição da memória espacial em dois modelos animais, optamos por investigar um possível mecanismo pelo qual a co-administração pré-treino melhorava a memória dos camundongos.

A hipótese levantada baseou-se no papel inibitório da adenosina e dos eCB, através dos receptores A_1 e CB_1 , e na evidência que antagonistas A_1 (Sehmisch *et al.*, 2001) e CB_1 (García-Arencibia *et al.*, 2008) bloqueiam este tônus inibitório, aumentando a liberação de diferentes neurotransmissores. Em comum, os dois receptores modulam a excitose de glutamato (Poli *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 1999), dopamina (Chowdhury e Fillenz, 1991; Cadogan *et al.*, 1997) e acetilcolina (Brown *et al.*, 1990; Gessa *et al.*, 1998), levando-nos a especular que a co-administração estaria aumentando a liberação de um ou mais destes neurotransmissores para produzir seus efeitos pró-cognitivos. Embora o papel da acetilcolina (Pepeu e Giovannini, 2010) e da dopamina (El Ghundi *et al.*, 2007) sobre a memória espacial seja incontestável, optamos por avaliar a interação da co-administração com a neurotransmissão glutamatérgica devido ao bem fundamentado papel do receptor NMDA sobre o aprendizado (Robbins e Murphy, 2006) e a LTP (Nakazawa *et al.*, 2004). Além das já mencionadas evidências (Serpa *et al.*, 2009) da interação dos agonistas dos receptores A_1 e CB_1 no controle da liberação de glutamato em sinapses hipocampais.

Nossos resultados sugerem a participação do glutamato nos efeitos observados em animais que receberam a co-administração e foram avaliados tanto no teste da localização de objetos quanto no labirinto aquático. Nesta linha de raciocínio, a interação comportamental

entre os receptores A_1 ou CB_1 e os efeitos do glutamato mediados pelo receptor NMDA já foram demonstradas separadamente. Ou seja, há evidências que a amnésia induzida pelo antagonista NMDA, MK-801, pode ser revertida tanto com antagonistas A_1/A_{2A} (Mihara *et al.*, 2007) quanto com antagonistas CB_1 (De Bruin *et al.*, 2010).

É válido lembrar que tanto os receptores A_1 quanto os receptores CB_1 são expressos em diferentes áreas relacionadas ao aprendizado e a memória, como o hipocampo e o córtex pré-frontal (Mahan *et al.*, 1991; Herkenham *et al.*, 1990). Desta forma, a administração sistêmica não excluiu a possibilidade dos efeitos observados serem produzidos pela interação dos sistemas em mais de uma área cerebral. Sendo assim, como observamos o efeito da infusão do antagonista NMDA no hipocampo e no córtex pré-frontal, podemos sugerir que o efeito pró-mnemônico investigado é mediado pelas ações do glutamato nas duas áreas cerebrais avaliadas.

Uma vez que a interação entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 , em modelos animais de memória espacial e sua relação com a neurotransmissão glutamatérgica é pouco estudada. Nossos resultados podem ser justificados de maneira indireta tanto pela ampla expressão dos receptores A_1 e CB_1 nas duas áreas avaliadas (Mahan *et al.*, 1991; Herkenham *et al.*, 1990), quanto pela relação de ambos os receptores com a neurotransmissão glutamatérgica cortico-hipocampal. Por exemplo, os eCB ligam-se a receptores CB_1 localizados em terminais pré-sinápticos de neurônios glutamatérgicos (Xu *et al.*, 2010) e inibem a liberação de glutamato (Misner e Sullivan, 1999). Além disso, Abush e Akirav (2010) mostraram que o agonista CB_1 (WIN 55,212-2) inibe a LTP hipocampal. Por outro lado, há evidências que o bloqueio dos receptores CB_1 também prejudica a LTP hipocampal (de Oliveira Alvares *et al.*, 2006; Abush e Akirav, 2010). Com relação ao sistema adenosinérgico, a adenosina inibe a LTP hipocampal predominantemente por ligar-se aos receptores A_1 (Forghani e Krnjevic, 1995) e os antagonistas do receptor A_1 , DPCPX (Canhão *et al.*, 1994) e 8-ciclopentilteofilina (CPT) (Klishin *et al.*, 1995) facilitam a ocorrência de PEPS mediados pelo receptor NMDA em neurônios hipocampais. Sobre o córtex pré-frontal, de maneira semelhante ao hipocampo, a ativação dos receptores A_1 (Marek *et al.*, 2009) ou CB_1 (Lafourcade *et al.*, 2007) inibe a liberação de glutamato. Sendo assim, especulamos que o DPCPX e o AM 251 bloquearam o tônus inibitório adenosinérgico e endocanabinóide, aumentando os níveis de glutamato nas sinapses

cortico-hipocampais e levando a melhora cognitiva observada nos animais tratados.

Esta hipótese foi confirmada pelos resultados que mostraram o aumento da liberação de glutamato em fatias de hipocampo e córtex pré-frontal dos animais que receberam a co-administração de DPCPX e AM 251. Embora existam poucas evidências do efeito de antagonistas A_1 e CB_1 sobre a liberação de glutamato especificamente no córtex pré-frontal. Trabalhos avaliando outras áreas sugerem que tanto a administração sistêmica (Borycz *et al.*, 2007) quanto a infusão local (Quarta *et al.*, 2004) do antagonista A_1 , CPT, levaram a um aumento da liberação de glutamato no núcleo acumbens. Além disso, o DPCPX aumenta os níveis de glutamato em fatias de hipocampo (Sehmisch *et al.*, 2001), sugerindo a presença de um tônus basal inibitório de adenosina nestas preparações. Para o sistema eCB, García-Arencibia e colaboradores (2008) mostraram que a administração sistêmica do antagonista CB_1 , SR141716a, aumenta a liberação de glutamato em sinapses estriatais. No hipocampo, há evidências que tanto o agonista, WIN 55,212-2, quanto o antagonista CB_1 , AM 251, podem inibir a liberação de glutamato em sinaptosomas por um mecanismo independente do receptor CB_1 (Kofalvi *et al.*, 2003). Uma vez que utilizamos fatias das áreas do cérebro estudadas, não podemos desconsiderar a participação de células da glia nos resultados descritos. Todavia, trabalhos recentes sugerem que é a ativação e não o bloqueio dos receptores A_1 (Stone *et al.*, 2009) ou CB_1 (Navarrete e Araque, 2010) que aumenta a liberação de glutamato por astrócitos, levando-nos a crer que nossos efeitos estariam relacionados ao bloqueio dos receptores A_1 e CB_1 em células neuronais. Uma vez que os níveis de glutamato aumentados também estão associados à neurotoxicidade (para revisão ver Gilessen *et al.*, 2002), realizamos ensaio de viabilidade celular que descartou esta hipótese. Desta forma, podemos concluir que a co-administração dos antagonistas A_1 e CB_1 exerce seus efeitos por bloquear o tônus inibitório exercido por ambos os sistemas, aumentando os níveis de glutamato em sinapses cortico-hipocampais em concentrações que não interferem com a viabilidade celular.

No último bloco de experimentos avaliou-se a interação funcional entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 , no controle da amnésia induzida por agonistas de ambos os receptores. Inicialmente confirmamos o efeito amnésico do agonista do receptor A_1 , CCPA, e do receptor CB_1 , WIN 55,212-2, administrados por via sistêmica ou intra-hipocampal, o qual já havia

sido demonstrado por outros autores. Por exemplo, Von Lubitz e colaboradores (1993) mostraram que a administração intraperitoneal do agonista A_1 , CPA, prejudicou o aprendizado avaliado no labirinto aquático. Por outro lado, embora existam grandes quantidades de receptores A_1 na região CA1 do hipocampo, a participação desta área na amnésia induzida por agonistas deste receptor foi demonstrada apenas por Ohno e Watanabe (1996), os quais mostraram que a infusão intra-CA1 do agonista A_1 , CHA, aumentou o número de erros em animais avaliados em modelo de memória de procedimentos. Para os receptores CB_1 existem mais evidências, ou seja, a administração do THC prejudica aprendizado dependente de hipocampo em modelos de memória espacial (Ferrari, *et al* 1999; Heyser, *et al* 1993; Nakamura, *et al* 1991; Varvel, *et al* 2001). Confirmando a participação do hipocampo neste efeito, Hampson e Deadwyler (2000) mostraram que o prejuízo de aprendizado induzido pelo WIN 55,212-2 está relacionado a uma diminuição da quantidade de potenciais de ação registrados em neurônios hipocampais. Além disso, a infusão intrahipocampal do THC, WIN 55,212-2 ou CP55,940, prejudicou a memória nos animais avaliados no labirinto radial (Egashira *et al.*, 2002), labirinto em T (Suenaga *et al.*, 2008) e no labirinto aquático (Yim *et al.*, 2008).

Nos experimentos seguintes mostramos que o efeito amnésico do agonista A_1 poderia ser bloqueado pelo antagonista CB_1 , mas não pelo agonista WIN 55,212-2. Por outro lado, o prejuízo de aprendizado induzido pelo agonista CB_1 foi atenuado pelo agonista A_1 , mas não pelo antagonista DPCPX. Embora tenhamos observado interação funcional entre os receptores A_1 e CB_1 , outros autores demonstraram que a inibição do PEPS induzida pelo agonista A_1 não sofre influência da ativação ou do bloqueio dos receptores CB_1 e que a inibição do PEPS induzida pelo WIN 55,212-2 não é alterada pela presença do CCPA ou do DPCPX (Serpa *et al.*, 2009).

Esta aparente discrepância pode ser justificada por dois aspectos. Primeiramente, poderíamos sugerir que apesar da relação entre o efeito amnésico dos agonistas A_1 e CB_1 e a inibição do PEPS no hipocampo, os protocolos possuem grandes diferenças do ponto de vista de mecanismos envolvidos. Ou seja, enquanto Serpa e colaboradores utilizaram eletrofisiologia de fatias de hipocampo – o que lhes permitia conclusões pontuais - nossos resultados decorreram da administração sistêmica interferindo em respostas comportamentais. Desta forma, não podemos descartar que outras áreas cerebrais ou mesmo outros sistemas de neurotransmissão estejam participando do processo. Outra diferença

relevante encontra-se nas espécies utilizadas, enquanto Serpa e colaboradores (2009) utilizaram fatias de hipocampo de ratos, nosso trabalho foi desenvolvido com camundongos. Com relação às diferenças entre espécies para os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, Hoffman e colaboradores (2005) mostraram que a inibição da transmissão glutamatérgica induzida pelo WIN 55,212-2 era evidente em fatias de hipocampo de camundongos CD1 e ratos Sprague-Dawley, mas não em camundongos C57BL/6J. Além disso, há evidências que camundongos C57BL/6J possuam maiores níveis endógenos de adenosina no hipocampo do que ratos Sprague Dawley (Hoffman *et al.*, 2010). Estas evidências são reforçadas por trabalhos que demonstram que o aumento no PEPS induzido pela teofilina é proporcional as concentrações endógenas de adenosina do hipocampo (Dunwiddie e Diao, 1994; Brundage e Dunwiddie, 1996).

Uma vez caracterizada a interação funcional entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 , no controle da amnésia induzida por agonistas de ambos os receptores, passamos a investigar o papel da região CA1 do hipocampo nestas interações. O desenho experimental levou em consideração tanto a ampla distribuição dos receptores A_1 e CB_1 pelo SNC, quanto à intrincada comunicação entre neurônios não só dentro da formação hipocampal (Brun *et al.*, 2002), mas também através de aferências ou eferências com outras áreas do cérebro (Thierry *et al.*, 2000). Desta forma, a interação A_1 x CB_1 na região CA1 não poderia ser sugerida apenas com a infusão local de uma droga e o bloqueio dos seus efeitos através da administração sistêmica de outra, ou ainda a co-administração intra-hipocampal de duas drogas seria inviável por questões relacionadas ao tempo de difusão da droga e ao estresse dos animais. Sendo assim, optamos por realizar dois experimentos com objetivos semelhantes, porém desenhados para mostrar a participação dos receptores A_1 e CB_1 localizados na região CA1 do hipocampo nos efeitos observados.

Uma vez que este é o primeiro relato da interação comportamental dos sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 localizados na região CA1 do hipocampo, tornam-se necessário buscar por evidências indiretas que sustentem tal constatação. Em trabalho recente, Pandolfo e colaboradores (2011) mostraram que o AM 251 inibe a captação de adenosina em sinaptosomas de hipocampo de ratos. Caso este efeito fosse extrapolado aos nossos resultados, as concentrações de adenosina na sinapse estariam aumentadas e potencializariam as ações do CCPA. Todavia

observamos um bloqueio do efeito do CCPA após a infusão do AM 251. Esta discrepância poderia ser explicada pela diferença entre as doses do AM 251 utilizada em ambos os experimentos. A IC_{50} do AM 251 nos ensaios avaliando a inibição da captação de adenosina foi de 7,36 μ M (Pandolfo *et al.*, 2011) enquanto que a concentração infundida no hipocampo em nossos experimentos foi de 1 μ M, levando-nos a sugerir que nas concentrações utilizadas em nosso protocolo o AM 251 parece não interferir com a captação de adenosina. Esta dose foi selecionada baseada no trabalho de Nasehi e colaboradores (2009), os quais realizaram uma curva dose resposta para o AM 251 infundido na região CA1 de ratos e evidenciaram que a dose de 1 μ M não exerceu efeito algum sobre o aprendizado no teste da esQUIVA inibitória, enquanto que doses maiores foram capazes de reverter o prejuízo de aprendizado induzido pela apomorfina. Por outro lado, no cerebelo a incubação conjunta do agonista CB_1 , WIN 55,212-2, e do agonista A_1 , PIA, produziu efeito próximo do aditivo (Selley *et al.*, 2004). Ou seja, um aumento de aproximadamente 80% da estimulação da ativação do [35 S]-GTP γ S, ou uma inibição da produção da AMPc induzida pela forskolina de aproximadamente 60%, quando comparada a droga que produziu o maior efeito incubada isoladamente (Selley *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem que as vias de ativação de ambos os receptores convergem parcialmente e que são limitadas pela atividade da adenilato ciclase. Além disso, caso pudessem ser extrapolados para células hipocâmpais, reforçariam nossa hipótese da participação do tónus endocanabinoide, através da ativação do receptor CB_1 , no controle da amnésia induzida pelo agonista A_1 .

A segunda interação confirmada através da infusão de drogas na região CA1 do hipocampo foi a atenuação da amnésia induzida pelo agonista CB_1 , WIN 55,212-2, após a administração do agonista A_1 , CCPA. Estes resultados sugerem que a exacerbação do tónus adenosinérgico, via receptor A_1 , modula negativamente os efeitos da ativação do receptor CB_1 . De acordo com estes resultados, Moore e colaboradores (2000) mostraram que o metabolismo da adenosina endógena, pela presença da enzima adenosina d-aminase, leva a um aumento na ativação do [35 S]-GTP γ S induzida por agonistas CB_1 no hipocampo de ratos. Recentemente foi demonstrado que a adenosina endógena, ligando-se em receptores A_1 no hipocampo, regula negativamente a inibição da liberação de glutamato (Hoffman *et al.*, 2010) e de GABA (Souza *et al.*, 2011) induzida pelo WIN 55,212-2 em sinapses hipocâmpais. A participação do receptor GABA $_B$, que também

ativa proteínas $G_{\alpha 0}$ e é expressado em interneurônios semelhantes aos receptores CB_1 (Neu *et al.*, 2007; Sloviter *et al.*, 1999), parece não estar relacionada com este efeito (Souza *et al.*, 2011) apontando para uma interação seletiva entre receptores A_1 e CB_1 no hipocampo.

Nos resultados discutidos anteriormente, demonstramos que a co-administração dos antagonistas A_1 e CB_1 exercia efeito pró-cognitivo através de um aumento da liberação de glutamato. Por outro lado, o papel da neurotransmissão GABAérgica sobre o efeito amnésico de agonistas CB_1 (Wise *et al.*, 2009) não pode ser descartado. Uma vez que o efeito inibitório de agonistas CB_1 sobre a excitação de GABA em interneurônios hipocámpais é crítico para os prejuízos de memória espacial induzido por estas drogas (Hajos *et al.*, 2000; Robbe e Buzsáki, 2009; Robbe *et al.*, 2006). Entretanto, é importante lembrar que estes interneurônios recebem aferências de neurônios glutamatérgicos (Freund e Buzsáki, 1996; Freund e Katona, 2007), que também expressam receptores CB_1 (Katona *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 2006) e A_1 (Ochiishi *et al.*, 1999). Sendo assim, ciente das limitações do nosso protocolo, podemos sugerir que a ativação do receptor A_1 modula negativamente o efeito amnésico do agonista CB_1 , WIN 55,212-2 e que novos trabalhos serão necessários para melhor elucidar os mecanismos de tal interação.

Com relação a um possível mecanismo molecular, trabalhos prévios mostraram que os receptores A_1 e CB_1 compartilham isoformas da subunidade α da proteína G. Neste sentido Straiker e colaboradores (2002) mostraram – através da inibição de potenciais excitatórios em culturas de hipocampo de ratos – que os receptores A_1 podem ligar-se às seguintes isoformas da proteína G: $G_{\alpha 01}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}$ e $G_{\alpha 13}$; enquanto que os receptores CB_1 ligam-se às isoformas: $G_{\alpha 01}$, $G_{\alpha 12}$ e $G_{\alpha 13}$, mas não a $G_{\alpha 11}$. Esta e outras evidências (Moore *et al.*, 2000; Selley *et al.*, 2004) poderiam justificar neuroquimicamente a interação A_1/CB_1 . Nossos resultados sugerem que as vias de sinalização estão interligadas em algum ponto, desta maneira a ativação ou bloqueio de um receptor pode influenciar nos efeitos do outro (Selbie e Hill, 1998). Esta interação é um fenômeno amplo que acontece em diferentes células, as quais normalmente possuem muitos tipos de GPCR. Todavia, estes receptores compartilham uma grande quantidade de segundos mensageiros e isto aumenta a possibilidade de interações (Brink *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas outro tipo de interação entre receptores vem sendo sugerida. São as interações intramembrana receptor-receptor que foram descritas inicialmente em diferentes áreas do cérebro através

de ensaios de *binding* (Fuxe *et al.*, 1983). O mecanismo molecular para estas interações foi proposto por Zoli e colaboradores (1993) através da existência de homo ou heterodímeros de receptores. Atualmente, sugere-se que a ligação de agonistas a um receptor provoca alterações conformacionais que podem propagar-se ao outro e desta forma alterar a afinidade do segundo receptor por seus ligantes (Ferre *et al.*, 2007). Uma vez que demonstramos a interação entre receptores A_1 e CB_1 na modulação de memórias dependentes de hipocampo, optamos por utilizar um ensaio de *binding* para complementar à avaliação da interação de ligantes de ambos os receptores. Após a realização deste ensaio podemos perceber que somente o bloqueio dos receptores CB_1 diminui a ligação máxima para o ligante radioativo do receptor A_1 , 3H -DPCPX. De maneira semelhante aos nossos resultados, Savinainen e colaboradores (2003) demonstraram que os antagonistas CB_1 , AM 251 e SR141716a, na concentração de $10\mu M$, deslocaram para a direita a curva para a ativação do $[^{35}S]$ -GTP γ S induzida pelo agonista A_1 , 2-cloro-adenosina, sem reduzir o efeito máximo, sugerindo um mecanismo de antagonismo competitivo. Nossos resultados demonstram que o AM 251, na concentração de $10\mu M$, altera a afinidade de ligantes do receptor A_1 por seu sítio de ligação. Sendo que alguns autores sugerem que este efeito poderia estar associado às ações do AM 251 como agonista inverso (Pertwee, 2005).

Embora os receptores A_1 formem dímeros com os receptores adenosinérgico A_{2A} , dopaminérgico D_1 , purinérgico P_{2Y1} e glutamatérgico $mGLU_1$ (Franco *et al.*, 2005) e a existência de dímeros para a receptor CB_1 seja proposta com os receptores dopaminérgico D_2 , μ -opióide, adrenérgico β_2 e o adenosinérgico A_{2A} (Hudson *et al.*, 2010). Não existem trabalhos até o momento evidenciando ou descartando a existência de dímeros A_1/CB_1 . Apesar de nossos resultados demonstrarem a interação e ensaios de *binding* servirem de evidências iniciais para a formação de dímeros. Não podemos sugerir que existam heterodímeros A_1/CB_1 no hipocampo de camundongos, pois precisaríamos acrescentar dados de experimentos utilizando técnicas de BRET-FRET a nossos resultados. Todavia, até mesmo esta técnica tem suas limitações, uma vez que receptores com distâncias equivalentes a até 50 nm são considerados dímeros (Gurevich e Gurevich, 2008). Entretanto, a maioria dos pesquisadores aceita a existência de dímeros em linhagens de células transfectadas após a utilização destas técnicas de fluorescência bimolecular (Carriba *et al.*, 2008).

Apesar de Hoffman e colaboradores (2010) terem mostrado que o bloqueio dos receptores A_1 potencialize o efeito inibitório do WIN 55,212-2 sobre sinapses glutamatérgicas hipocampais, em nossos experimentos o tratamento com o DPCPX não alterou a amnésia induzida pelo WIN 55,212-2. Este fato poderia ser explicado pelas características do modelo da localização de objetos, ou seja, o mesmo possui um valor de exploração mínimo (aproximadamente 50% do tempo exploração do objeto) o qual não pode ser diminuído ainda mais, impossibilitando-nos de evidenciar a interação DPCPX/WIN 55,212-2. Um experimento simples, porém não realizado, que descartaria ou corroboraria tal hipótese seria a co-administração de uma dose sem efeito de WIN 55,212-2 associada ao DPCPX. Outro resultado, sem interação evidente a ser mencionado, é a amnésia induzida pelo agonista A_1 , CCPA, a qual não foi atenuada pela ativação dos receptores CB_1 . Nesta linha de raciocínio, Souza e colaboradores (2011) demonstraram que a inibição da liberação de glutamato em sinapses hipocampais não é inibida pela co-incubação do agonista CB_1 WIN 55,212-2, enquanto que o efeito inibitório do WIN é atenuado pelo CCPA, sugerindo que a ação modulatória negativa dos receptores A_1 sobre os receptores CB_1 parece não ser recíproca.

Por fim, embora os efeitos comportamentais tenham sido observados no teste a administração das drogas foi realizada antes do treino. Desta forma, não podemos afirmar que seus efeitos aconteçam somente na aquisição do aprendizado. Sendo mais coerente sugerir que estão influenciando tanto a aquisição quanto o início da consolidação deste aprendizado. Com relação a possíveis efeitos sobre a evocação, o uso de intervalos entre treino e teste longos - 180 a 360 minutos – faz com que efeitos residuais sejam pouco prováveis. Além disso, o tempo de meia vida de todos os tratamentos varia entre 30 e 120 minutos (Hunter *et al.*, 1989; Perlstein *et al.*, 2002; Vezzani *et al.*, 1989; Wlaz *et al.*, 1994), fato que minimiza ainda mais a possibilidade de efeitos sobre a evocação. Ainda, como qualquer alteração sobre a atividade locomotora dos animais seria relevante para a interpretação dos resultados. É importante destacar que nenhum dos tratamentos afetou a ambulação dos animais durante o treino. Um possível efeito ansiogênico ou ansiolítico dos tratamentos que viesse a interferir na aquisição da memória é minimizado pela posição dos objetos no aparelho. Ou seja, ambos foram colocados a uma distância de 7 cm das paredes e por isso localizavam-se próximas a elas. Dada a tendência natural dos camundongos a explorar os cantos do aparato (File, 2001), o efeito de

drogas sobre o nível basal de ansiedade dos animais dificilmente impediria que os mesmos explorassem os objetos durante o treino. É fato que se tivéssemos registrado o tempo de ambulação no centro do campo aberto durante o treino esta afirmação poderia ser feita com maior ênfase.

Desta forma, esta tese propôs-se a estudar as interações as entre os sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 , na modulação da memória espacial em camundongos. O estudo da interação entre receptores permitirá à psicofarmacologia a busca por tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos. Primeiro porque as psicopatologias estão envolvidas com anormalidades em mais de um sistema de neurotransmissão e segundo porque a interação permitirá a utilização de doses menores de cada um dos fármacos. Uma vez reduzidas às doses, aumentam-se as chances de ligação apenas no sítio primário de cada droga, por consequência a facilidade de prever efeitos adversos importantes. Com relação aos sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, ambos modulam diferentes sistemas de neurotransmissão, permitindo potencializar ou inibir as ações de determinados neurotransmissores sem utilizar agonistas ou antagonistas diretos de seus receptores.

Observando o conjunto de nossos resultados podemos sugerir que o bloqueio simultâneo dos sistemas adenosinérgico e endocanabinóide, através dos receptores A_1 e CB_1 , é uma alternativa a ser considerada em situações onde seja necessária a melhora cognitiva. Além disso, os efeitos do antagonista CB_1 sobre as ações mediadas pelo receptor A_1 , apontam tanto para o papel dos eCBs sobre os efeitos de agonistas A_1 quanto para uma possível explicação para efeitos inesperados do AM 251. Finalmente, uma vez que o prejuízo de memória é um limitante do uso clínico de agonistas CB_1 . Caso a atenuação dos efeitos de agonistas CB_1 pela ativação do receptor A_1 limite-se às sinapses hipocâmpais, a associação das duas drogas seria interessante para possibilitar as ações do agonista CB_1 sobre outras áreas cerebrais, sem as alterações promovidas pela ativação deste receptor no hipocampo.

7. CONCLUSÕES

O modelo da localização de objetos é útil para a avaliação de drogas com potencial amnésico ou pró-mnemônico em camundongos Swiss machos;

O bloqueio do tônus adenosinérgico e endocanabinóide, através da administração conjunta dos antagonistas dos receptores A_1 e CB_1 , produz uma melhora cognitiva em doses 10-20 vezes menores do que aquelas necessárias para produzir o mesmo efeito quando bloqueados isoladamente;

A melhora cognitiva da co-administração é dependente da liberação de glutamato – em concentrações que não alteram a viabilidade celular - e da interação deste com os receptores NMDA no hipocampo e no córtex pré-frontal;

O tônus endocanabinóide parece ser relevante para o efeito amnésico de agonistas do receptor A_1 . Uma vez que a amnésia induzida pelo agonista A_1 , CCPA, pode ser bloqueada pelo antagonista CB_1 , AM 251. Este efeito é mediado pelos receptores A_1 e CB_1 localizados na região CA1 do hipocampo;

Por outro lado, a ativação do receptor A_1 na região CA1 do hipocampo atenua o prejuízo de aprendizado induzido pelo agonista CB_1 , WIN 55,212-2, apontando para o papel do receptor A_1 no efeito de agonistas canabinóides mediados pelos receptores CB_1 hipocampais.

7. REFERÊNCIAS

Abood, M.E., Ditto, K.E., Noel, M.A., Showalter, V.M. e Tao, Q. Isolation and expression of a mouse CB1 cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB1 receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*, v.53, n.2, p.207-14. 1997.

Abrahams, S., Pickering, A., Polkey, C.E. 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. e Akirav, I. Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus*, v.20, n.10, p.1126-38. 2010.

Aherne, C.M., Kewley, E.M. e Eltzhig, H.K. The resurgence of A2B adenosine receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, v.1808, n.5, p.1329-39. 2011.

Alexander, S.P. e Kendall, D.A. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br. J. Pharmacol*, v.152, p.602–23. 2007.

Ambrosio, A.F., Malva, J.O., Carvalho, A.P., e Carvalho, A.M. Inhibition of N-, P/Q- and other types of Ca channels in rat hippocampal nerve terminals by adenosine A receptor. *Eur. J. Pharmacol*, v.340, p.301–10. 1997.

Arai, A., Kessler, M. e Lynch, G. The effects of adenosine on the development of long-term potentiation. *Neurosci Lett*, v.119, p.41– 4. 1990.

Assini, F.L., Duzzioni, M. e Takahashi, R.N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Research*, v.204, p.206-11. 2009.

Astur, R.S., Taylor, L.B., Mamelak, A.N., Philpott, L. e Sutherland, R.J. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioral Brain Research*, v.132, n.1, p.77–84. 2002.

Azad, S.C., Kurz, J., Marsicano, G., Lutz, B., Zieglgansberger, W. e Rammes, G. Activation of CB1 specifically located on GABAergic interneurons inhibits LTD in the lateral amygdala. *Learning and Memory*, v.15, p.143–52. 2008.

Barch, D.M. The cognitive neuroscience of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol*, v.1, p.321–53. 2005.

Batista, L.C., Prediger, R.D., Morato, G.S. e Takahashi, R.N. Blockade of adenosine and dopamine receptors inhibits the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacol*, v.181, n.4, p.714-21. 2005.

Beinfeld, M.C. e Connolly, K. Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystokinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. *Neurosci Lett*, v.301, p.69–71. 2001.

Belardinelli, L. e Isenberg, G. Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am J Physiol*, v.244, n.5, p734-7. 1983.

Belzung, C. e Berton, F. Further pharmacological validation of the BALB/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety. *Behav Pharmacol*, v.8, n.6-7, p.541-8. 1997.

Benamar, K., Geller, E.B. e Adler, M.W. First in vivo evidence for a functional interaction between chemokine and cannabinoid systems in the brain. *J Pharmacol Exp Ther*, v.325, n.2, p.641-5. 2008.

Benhamou, S. e Poucet, B. A comparative analysis of spatial memory processes. *Behav Process*, v.35, p.113–26. 1996.

Bermudez-Silva, F.J., Viveros, M.P., McPartland, J.M. e Rodriguez de Fonseca, F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav*, v.95, n.4, p375-82. 2010.

Biala, G. e Kruk, M. Cannabinoid receptor ligands suppress memory-related effects of nicotine in the elevated plus maze test in mice. *Behav Brain Res*, v.192, n.2, p.198-202. 2008.

Biber, K., Klotz, K.N. e Berger, M. Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J Neurosci*, v.17, p.4956-64. 1997.

Blankman, J.L., Simon, G.M. e Cravatt, B.F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol*, v.14, p.1347-56. 2007.

Bliss, T.V. e Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. V.361, n.6407, p.31-9. 1993.

Bohme, G.A., Laville, M., Ledent, C., Parmentier, M. e Imperato, A. Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience*, v.95, n.1, p.5-7. 2000.

Bolla, K.I., Cadet, J.L. e London, E.D. The neuropsychiatry of chronic cocaine abuse. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, v10, p280-89. 1998.

Borea, P.A., Gessi, S., Bar-Yehuda, S. e Fishman, P. A3 adenosine receptor: pharmacology and role in disease. *Handb Exp Pharmacol*, v.193, p.297-327. 2009.

Bornheim, L.M., Kim, K.Y. e Chen, B. Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem Pharmacol*, v.50, p.677-86. 1995.

Borycz, J., Pereira, M.F., Melani, A., Rodrigues, R.J., Köfalvi, A., Panlilio, L., Pedata, F., Goldberg, S.R., Cunha, R.A. e Ferré, S. Differential glutamate-dependent and glutamate-independent adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine release in different striatal compartments. *J Neurochem*, v.101, n.2, p.355-63. 2007.

Bouaboula, M., Hilaiet, S., Marchand, J., Fajas, L., Fur, G.L. e Casellas, P. Anandamide induced PPAR γ transcriptional activation and

3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol*, v.517, p.174–81. 2005.

Breivogel, C.S., Walker, J.M, Huang, S. e Childers, S.R. Cannabinoid signaling in cultured rat cerebellar granule cells. *Symposium on the Cannabinoids; 1999* Jun 18–20; Acapulco, Mexico. pp 10, International Cannabinoid Research Society, Burlington, Vermont, 1999.

Brink, C.B., Harvey, B.H., Bodenstein, J., Venter, D.P. e Oliver, D.W. Recent advances in drug action and therapeutics: relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology. *Br J Clin Pharmacol*, v.57, n.4, p.373-87. 2004.

Brown, S.J., James, S., Reddington, M. e Richardson, P.J. Both A1 and A2A purine receptors regulate striatal acetylcholine release. *J Neurochem*, v.55, p.31–8. 1990.

Brun, V.H., Otnass, M.K., Molden, S., Steffenach, H.A., Witter, M.P., Moser, M.B. e Moser, E.I. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science*. v 296, n.5576, p.2243-6. 2002.

Brundege, J.M. e Dunwiddie, T.V. Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, v.16, p.5603–12. 1996.

Buccafusco, J.J. *The Revival of Scopolamine Reversal for the Assessment of Cognition-Enhancing Drugs*. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 17. *Frontiers in Neuroscience*. 2009.

Buchanan, R.W., Javitt, D.C., Marder, S.R., Schooler, N.R., Gold, J.M., McMahon, R.P., Heresco-Levy, U., Carpenter, W.T. The Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia Trial (CONSIST): the efficacy of glutamatergic agents for negative symptoms and cognitive impairments. *Am J Psychiatry*.v.164, n.10, p1593-602. 2007.

Budd, D.C. e Nichols, D.G. Protein kinase C-mediated suppression of the presynaptic adenosine A1 receptor by a facilitatory metabotropic glutamate receptor. *J Neurochem*, v.65, p.615–21. 1995.

Burgess, N. Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. *Trends Cog Sci*, v.10, p.551–7. 2006.

Cadogan, A.K., Alexander, S.P.H., Boyd, E.A. e Kendall, D.A. Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem*, v.69, p.1131–37. 1997.

Canhão, P., de Mendonça, A., Ribeiro, J.A. 1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine attenuates the NMDA response to hypoxia in the rat hippocampus. *Brain Res*. Oct 24;661(1-2):265-73. 1994

Carruthers, A.M., Sellers, L.A., Jenkins, D.W., Jarvie, E.M., Feniuk, W. e Humphrey, P.P. Adenosine A(1) receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. *Mol Pharmacol*. v.59, p.1533–41. 2001.

Chowdhury, M. e Fillenz, M. Presynaptic adenosine A2 and NMDA receptors regulate dopamine synthesis in rat striatal synaptosomes. *J Neurochem*. v.56, p.1783–88. 1991.

Clark, L., Chamberlain, S.R. e Sahakian, B.J. Neurocognitive mechanisms in depression: implications for treatment. *Annu Rev Neurosci* v.32, p.57–74. 2009.

Clarke, J.R., Rossato, J.I., Monteiro, S., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I. e Cammarota, M. Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*. v.90, n.2, p374-81. 2008.

Collingridge, G.L., Kehl, S.J. e McLennan, H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*. v.334, p.33-46. 1983.

Cordeaux, Y., Ijzerman, A.P. e Hill, S.J. Coupling of the human A1 adenosine receptor to different heterotrimeric G proteins: evidence for

agonist-specific G protein activation. *Br J Pharmacol*, v.143, p.705-14. 2004.

Coupar, I.M. e Tran, B.L. Effects of adenosine agonists on consumptive behaviour and body temperature. *J Pharm Pharmacol*. v.54, n.2.p.289-94. 2002.

Cunha, R.A., Milusheva, E., Vizi, E.S., Ribeiro, J.A. e Sebastião, A.M. Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2A adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J Neurochem* v.63, p.207-14, 1994.

Cunha, R.A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic Signal*. v.1, n.2, p111-34. 2005.

Cunha, R.A., Ferré, S., Vaugeois, J.M. e Chen, J.F. Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des*. v.14, n.15, p.1512-24. 2008.

Cunha-Reis, D., Ribeiro, J.A. e Sebastião, A.M. A1 and A2A receptor activation by endogenous adenosine is required for VIP enhancement of K⁺-evoked [3H]-GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurosci Lett* v.430, p.207-12. 2008.

Da Silva, G. e Takahashi, R.N. SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. v.26, p321-25. 2002.

da Silva, A.L., Silva Martins, B., Linck V.de, M., Herrmann, A.P., Mai, N., Nunes, D.S. e Elisabetsky, E. MK801- and scopolamine-induced amnesias are reversed by an Amazonian herbal locally used as a "brain tonic". *Psychopharmacology (Berl)*. v.202, n.1-3, p.165-72. 2009.

Dar, M.S. Cerebellar CB(1) receptor mediation of Delta(9)-THC-induced motor incoordination and its potentiation by ethanol and modulation by the cerebellar adenosinergic A(1) receptor in the mouse. *Brain Res*. v.864, n.2, p.186-94. 2000.

de Bruin, J.P., Moita, M.P., de Brabander, H.M. e Joosten, R.N. Place and response learning of rats in a Morris water maze: differential effects of fimbria fornix and medial prefrontal cortex lesions. *Neurobiol Lear Mem.* v.75, n.2, p164–78. 2001.

de Bruin, N.M., Prickaerts, J., Lange, J.H., Akkerman, S., Andriambelosen, E., de Haan, M., Wijnen, J., van Drimmelen, M., Hissink, E., Heijink, L. e Kruse, C.G. SLV330, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, ameliorates deficits in the T-maze, object recognition and Social Recognition Tasks in rodents. *Neurobiol Learn Mem.* v.93, n.4, p.522-31. 2010.

de Mendonça, A. e Ribeiro, J.A. Adenosine and synaptic plasticity. *Drug Dev. Res.* v.52, p.283–90. 2001.

de Oliveira Alvares, L., Genro, B.P., Vaz Breda, R., Pedroso, M.F., Da Costa, J.C. e Quillfeldt, J.A. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res.* v.1075, n.1,p.60-7. 2006.

de Oliveira Alvares, L., Pasqualini Genro, B., Diehl, F., Molina, V.A. e Quillfeldt, J.A. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience.* v.154, n.4, p.1648-55. 2008.

DeSanty, K.P. e Dar, M.S. Involvement of the cerebellar adenosine A(1) receptor in cannabinoid-induced motor incoordination in the acute and tolerant state in mice. *Brain Res.* v.905, n.1-2, p178-87. 2001.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. e Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v.258, n.5090, Dec 18, p.1946-9. 1992.

Di Marzo, V., Breivogel, C.S., Tao, Q., Bridgen, D.T., Razdan, R.K. e Zimmer, A.M. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem.* v.75, p. 2434–44. 2000.

Di Marzo, V., Fontana, A. e Cadas, H. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* v.372, p.686–91. 1994.

Di Marzo, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov.* v.7, n.5, p.438-55. 2008.

Di Marzo, V. e Petrosino, S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr. Opin. Lipidol.* v.18, p.129–40. 2007.

Di Marzo, V. e Deutsch, D. G. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis*, v.5, n.6 Pt B, Dec, p.386-404. 1998.

Doyle, A.E. Executive functions in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry.* v.67, n.8, p.21–6. 2006.

Duarte, C., Alonso, R., Bichet, N., Cohen, C., Soubrié, P. e Thiébot, M.H. Blockade by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant (SR141716), of the potentiation by quinolorane of food-primed reinstatement of food-seeking behavior. *Neuropsychopharmacol.* v.29, n.5, p.911–20. 2004.

Dunwiddie, T.V., e Diao, L. Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J Pharmacol Exp Ther.* v.268,p.537–45. 1994.

Dunwiddie, T.V. e Masino, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* v.24,p.31–55. 2001.

Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K. e Fujiwara, M. Intracerebral microinjections of delta 9- tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. *Brain Res.* v.952, p.239–45, 2002.

Eichenbaum, H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res.* v.127, n.1-2, p.199-207. 2001

El-Ghundi, M., O'Dowd, B.F. e George, S.R. Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci.* v.18, n.1, p.37-66. 2007.

el-Hashim, A., D'Agostino, B., Matera, M.G. e Page, C. Characterization of adenosine receptors involved in adenosine-induced bronchoconstriction in allergic rabbits. *Br J Pharmacol.* v.119, n.6, p.1262-8. 1996.

Endoh, T. Pharmacological characterization of inhibitory effects of postsynaptic opioid and cannabinoid receptors on calcium currents in neonatal rat nucleus tractus solitarius. *Brit J Pharmacol* v.147,p.391-401 2006.

Ennaceur, A., Neave, N. e Aggleton, J.P. Spontaneous object recognition and object location memory in rats, the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res.* v.113, p.509-19. 1997.

Fastbom, J., Pazos, A. e Palacios, J.M. The distribution of adenosine A1 receptors and 50-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience.* v. 22, p.813-26. 1987.

Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J. e Axelrod, J. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* v.393, p.231-35. 1996.

Ferguson, D. e Sapolsky, R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci,* v.27, p.8046-52. 1996.

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

- Ferre, S., Ciruela, F., Woods, A.S., Lluís, C. e Franco, R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci*, v.30, p.440–46. 2007.
- File, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*. v.125, n.1-2, p151-7. 2001.
- Fisyunov, A., Tsintsadze, V., Min, R., Burnashev, N. e Lozovaya, N. Cannabinoids modulate the P-type high-voltage-activated calcium currents in purkinje neurons. *J Neurophysiol* v.96,p.1267–77. 2006.
- Floran, B., Barajas, C., Floran, L., Erlij, D. e Aceves, J. Adenosine A1 receptors control dopamine D1-dependent [(3)H]GABA release in slices of substantia nigra pars reticulata and motor behavior in the rat. *Neuroscience*. v.115, p.743–51. 2002.
- Forghani, R. e Krnjevic, K. Adenosine antagonists have differential effects on induction of long-term potentiation in hippocampal slices. *Hippocampus*. v.5, p.71–77. 1995.
- Franco, R., Ciruela, F., Casadó, V., Cortes, A., Canela, E.I., Mallol, J., Agnati, L.F., Ferré, S., Fuxe, K. e Lluís, C. Partners for adenosine A1 receptors. *J Mol Neurosci*. v.26, n.2-3:p.221-32. 2005.
- Fraser, C.M., Fisher, A., Cooke, M.J., Thompson, I.D. e Stone, T.W. The involvement of adenosine receptors in the effect of dizocilpine on mice in the elevated plus-maze. *Eur Neuropsychopharmacol*. v.7, n.4, p.267-73. 1997a.
- Fraser, C.M., Fisher, A., Cooke, M.J., Thompson, I.D. e Stone, T.W. Purine modulation of dizocilpine effects on spontaneous alternation. *Psychopharmacol*, v.130, p.334–42. 1997b.
- Fredholm, B.B., Fried, G. e Hedqvist, P. Origin of adenosine released from rat vas deferens by nerve stimulation. *Eur J Pharmacol*. v.79, n.3-4,p.233-43. 1982.
- Fredholm, B.B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. e Zvartau, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*, v. 51, p.83-133. 1999.

Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P. e Jacobson, K.A. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, v.53, p.527-52. 2001.

Fredholm, B.B., Chen, J.F., Masino, S.A. e Vaugeois, J.M. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. v.45, p.385-412. 2005.

Freund, S., Ungerer, M. e Lohse, M.J. A1 adenosine receptors expressed in CHO-cells couple to adenylyl cyclase and to phospholipase C. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. v.350, n.1, p.49-56. 1994.

Freund, T.F. e Buzsaki, G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. v.6, p.347-470. 1996.

Freund, T.F., Katona, I. e Piomelli, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*. v.83, n.3, p.1017-66. 2003

Freund, T.F. e Katona, I. Perisomatic inhibition. *Neuron*. v.56, p.33-42. 2007.

Froldi, G. e Belardinelli, L. Species-dependent effects of adenosine on heart rate and atrioventricular nodal conduction. Mechanism and physiological implications. *Circ Res*. v.67, n.4, p.960-78. 1990.

Fuxe, K., Agnati, L.F., Benfenati, F., Celani, M., Zini, I., Zoli, M. e Mutt, V. Evidence for the existence of receptor-receptor interactions in the central nervous system. Studies on the regulation of monoamine receptors by neuropeptides. *J Neural Transm Suppl*, v.18, p.165-179. 1983.

Gao, Y., Vasilyev, D.V., Goncalves, M.B., Howell, F.V., Hobbs, C. e Reisenberg, M. Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, v.30, p.2017-24. 2010.

Gaoni, Y. e Mechoulam, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, v.86, p.1646. 1964.

García-Arencibia, M., Ferraro, L., Tanganelli, S. e Fernández-Ruiz, J. Enhanced striatal glutamate release after the administration of rimonabant to 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci Lett.* v.438, n.1, p.10-3. 2008.

Gebicke-Haerter, P.J., Christoffel, F. e Timmer, J. Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem Int.* v.29, p.37-42. 1996.

Gebremedhin, D., Lange, A.R., Campbell, W.B., Hillard, C.J. e Harder, D.R. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol.* v.276, p.2085–2093. 1999.

Geiger, J.D. e Fyda, D.M. Adenosine transport in nervous system tissues. In: Stone TW, editor. Adenosine in the nervous system. San Diego: Academic Press; p. 1e23. 1991.

Gerard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G. e Parmentier, M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* v.279, n.1, p.129–34. 1991.

Gerber, U., Greene, R.W., Haas, H.L. e Stevens, D.R. Characterization of inhibition mediated by adenosine in the hippocampus of the rat in vitro. *J Physiol (Lond)* v.417, p.567–78. 1989.

Gerwins, P. e Fredholm, B.B. Activation of phospholipase C and phospholipase D by stimulation of adenosine A1, bradykinin or P2U receptors does not correlate well with protein kinase C activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* v.351, n.2, p.194-201. 1995.

Gessa, G.L., Casu, M.A., Carta, G. e Mascia, M.S. Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol.* v.355, p.119–24. 1998.

Gillessen, T., Budd, S.L. e Lipton, S.A. Excitatory amino acid neurotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* v.513, p.3-40. 2002.

Giménez-Llort, L., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Fredholm, B.B., Tobeña, A., Pekny, M. e Johansson, B. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci.* v.16, n.3, p.547-50. 2002.

Giménez-Llort, L., Masino, S.A., Diao, L., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Halldner, L. e Fredholm, B.B. Mice lacking the adenosine A1 receptor have normal spatial learning and plasticity in the CA1 region of the hippocampus, but they habituate more slowly. *Synapse.* v.57, n.1, p.8-16. 2005.

Glass, M. e Felder, C.C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB₁ and dopamine D₂ receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a G_s linkage to the CB₁ receptor. *J. Neurosci.* v.17, p.5327-33. 1997.

Gobel, I., Trendelenburg, A.U., Cox, S.L., Meyer, A. e Starke, K. Electrically evoked release of [3H]noradrenaline from mouse cultured sympathetic neurons: release-modulating heteroreceptors. *J Neurochem.* v.75, p.2087-94. 2000.

Griffin, G., Tao, Q. e Abood, M.E. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* v.292, p.886-94. 2000.

Guidali, C., Viganò, D., Petrosino, S., Zamberletti, E., Realini, N., Binelli, G., Rubino, T., Di Marzo, V. e Parolaro, D. Cannabinoid CB1 receptor antagonism prevents neurochemical and behavioural deficits induced by chronic phencyclidine. *Int J Neuropsychopharmacol.* v.14, n.1, p.17-28. 2011.

Guo, J. e Ikeda, S.R. Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol.* v.65, p.665-74. 2004.

Haas, H.L. e Selbach, O. Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* v.362, n.4-5, p.375-81. 2000.

Hájos, N., Katona, I., Naiem, S.S., MacKie, K., Ledent, C., Mody, I. e Freund, T.F. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci.* v.12, n.9, p3239-49. 2000.

Haller, J., Varga, B., Ledent, C. e Freund, T.F. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol.* v.15, n.4, p299-304. 2004.

Hampson, R.E. e Deadwyler, S.A. Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. *J Neurosci.* v.20, p.8932-42. 2000.

Hasan, M. e Glees, P. Ultrastructural age changes in hippocampal neurons, synapses and neuroglia. *Exp Gerontol,* v.8, n.2, p75-83. 1973.

Hasselmo, M.E. e Sarter, M. Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacol.* v.36, n.1,p.52-73. 2011

Hayes, E.S. Adenosine receptors and cardiovascular disease: the adenosine-1 receptor (A1) and A1 selective ligands. *Cardiovasc Toxicol* v.3, n.1, p.71-88. 2003

Henry, D.J. e Chavkin, C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* v.186, p.91-94. 1995.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. e Rice, K.C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* v.11, n.2, p.563-83. 1991.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. e Rice, K.C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.87, p.1932-36. 1990.

Heyser, C.J., Hampson, R.E. e Deadwyler, S.A. Effects of Δ^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.

Hirst, R.A., Almond, S.L. e Lambert, D.G. Characterisation of the rat cerebella CB1 receptor using SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist. *Neurosci Lett.* v.220, n.2, p.101-4. 1996.

Hitchcott, P.K., Harmer, C.J. e Phillips, G.D. Enhanced acquisition of discriminative approach following intra-amygdala d-amphetamine. *Psychopharmacol.* v.132, p.237–46. 1997.

Hoffman, A.F., Macgill, A.M., Smith, D., Oz, M. e Lupica, C.R. Species and strain differences in the expression of a novel glutamate-modulating cannabinoid receptor in the rodent hippocampus. *Eur J Neurosci.* v.22, p.2387–91. 2005.

Hoffman, A.F., Laaris, N., Kawamura, M., Masino, S.A. e Lupica, C.R. Control of cannabinoid CB1 receptor function on glutamate axon terminals by endogenous adenosine acting at A1 receptors. *J Neurosci.* v.30, n.2, p.545-55. 2010.

Howlett, A.C. e Fleming, R.M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol.* v.26, p.532–38. 1984.

Howlett, A.C. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol.* v.27, p.429–36. 1985.

Howlett, A.C., Qualy, J.M. e Khachatrian, L.L. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol.* v.29, p.307–13. 1986

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R. e Pertwee, R.G. International Union of Pharmacology.

XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* v.54, n.2, p.161-202. 2002.

Howlett, A.C. Cannabinoid receptor signalling. *Hand Exp Pharmacol.* v.168, p.53-79. 2005

Huang, S.M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al Hayani, A., De Petrocellis, L. e Fezza, F. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.99, p.8400-05. 2002.

Hudson, B.D., Hébert, T.E. e Kelly, M.E. Physical and functional interaction between CB1 cannabinoid receptors and beta2-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* v.160, n.3, p.627-42. 2010.

Hunter, A.J., Murray, T.K., Jones, J.A., Cross, A.J. e Green, A.R. The cholinergic pharmacology of tetrahydroaminoacridine in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* v.98, p.79-86. 1989.

Izquierdo, I. Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. *Trends Pharmacol Sci.* v.10, n.5, p.175-7. 1989.

Jennings, E.A., Vaughan, C.W. e Christie, M.J. Cannabinoid actions on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. *J Physiol.* v.534, p.805-12. 2001.

Johansson, B., Georgiev, V., Lindström, K. e Fredholm, B.B. A1 and A2A adenosine receptors and A1 mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Res.* v.762, n.1-2, p.153-64. 1997.

Johnston, D., Amaral, D.G. Hippocampus. In: *The synaptic organization of the brain* (Shepherd GM, ed.), pp455-498. Oxford: Oxford University Press. 2004.

Kandel, E., Schwartz, J. e Jessel, T.M. *The Principles of Neural Science*, 4 ed. McGraw-Hill. 2000.

Katona, I., Urban, G.M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K.M. e Piomelli, D. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci.* v.26, p.5628-37. 2006.

Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E. e Watanabe, M. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* v.26, p.2991–3001.

Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K. e Glass, M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol*. v.67, p.1697–704. 2005.

Kenakin, T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol*. v.72, p.1393–401. 2007.

Kentros, C. Hippocampal place cells: the "where" of episodic memory? *Hippocampus*. v.16, n.9, p.743-54. 2006.

Kessels, R.P.C., de Haan, E.H.F., Kappelle, L.J. e Postma, A. Varieties of human spatial memory: ameta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Rev*. v.35, p.295–303. 2001.

Kiesman, W.F., Elzein, E. e Zablocki, J. A1 adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. *Exp Pharmacol*. v.193, p.25-58. 2009.

Klatzky, R.L. Allocentric and egocentric spatial representations: definitions, distinctions, and interconnections. In: Freksa C, Habel C, Wender KF, editors. Spatial cognition—an interdisciplinary approach to representation and processing of spatial knowledge. Berlin: Springer-Verlag; p. 1–17. 1998

Klishin, A., Lozovaya, N. e Krishtal, O. A1 adenosine receptors differentially regulate the N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated components of hippocampal excitatory postsynaptic current in a Ca²⁺/Mg(2+)-dependent manner. *Neuroscience*. v.65, n.4, p.947-53. 1995.

Köfalvi, A., Vizi, E.S., Ledent, C. e Sperlág, B. Cannabinoids inhibit the release of [3H]glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB1 receptor-independent action. *Eur J Neurosci*. v.18, n.7, p.1973-8. 2003.

- Koopmans, G., Blokland, A. van Nieuwenhuijzen, P. e Prickaerts, J. Assessment of spatial learning abilities of mice in a new circular maze. *Physiol Behav.* v.79, n.4-5, p.683-93. 2003
- Kouznetsova, M., Kelley, B., Shen, M. e Thayer, S.A. Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol.* v.61, n.3, p.477-85. 2002.
- Lafourcade, M., Elezgarai, I., Mato, S., Bakiri, Y., Grandes, P. e Manzoni, O.J. Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One.* v.2, n.8, p709. 2007.
- Lang, U.E., Lang, F., Richter, K., Vallon, V., Lipp, H.P., Schnermann, J. e Wolfer, D.P. Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knock out mice. *Behav Brain Res,* v.145, p.179–88. 2003.
- Le Crom, S., Prou, D. e Vernier, P. Autocrine activation of adenosine A1 receptors blocks D1A but not D1B dopamine receptor desensitization. *J Neurochem* v.82, p.1549–52. 2002.
- Lee, B., Groman, S., London, E.D. e Jentsch, J.D. Dopamine D2/D3 receptors play a specific role in the reversal of a learned visual discrimination in monkeys. *Neuropsychopharmacol.* v.32, p.2125–34. 2007.
- Lee, H.K., Choi, E.B. e Pak, C.S. The current status and future perspectives of studies of cannabinoid receptor 1 antagonists as anti-obesity agents. *Curr Top Med Chem.* v.9, n.6, p.482-503. 2009.
- Leterrier, C., Laine, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J. e Lenkei, Z. Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J Neurosci,* v.26, n.12, Mar 22, p.3141-53. 2006.

Lichtman, A.H., Dimen, K.R. e Martin, B.R. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacol.* v.119, p.282–90. 1995.

Lichtman, A.H., Martin, B.R., Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacol* v.126, p.89-96. 1996.

Lichtman, A.H. SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. *Eur J Pharmacol.* v.404, p.55-64, 2000.

Ligresti, A. Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem. J.* v.380, p.265–72. 2004.

Liu, Q.R., Pan, C.H., Hishimoto, A., Li, C.Y., Xi, Z.X. e Llorente-Berzal, A. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav.* v8, p.519–30. 2009.

Liu, J. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* v.54, p.1–7 (2008).

Lopes, L.V., Halldner, L., Rebola, N., Johansson, B., Ledent, C., Chen, J.F., Fredholm, B. B. e Cunha, R.A. Binding of the prototypical adenosine A(2A) receptor agonist CGS 21680 to the cerebral cortex of adenosine A(1) and A(2A) receptor knockout mice. *Br J Pharmacol*, v.141, p.1006-14. 2004.

Lukawski, K., Kamiński, R.M. e Czuczwar, S.J. Effects of selective inhibition of N-acetylated-alpha-linked-acidic dipeptidase (NAALADase) on mice in learning and memory tasks. *Eur J Pharmacol.* v.579, n.1-3, p.202-7. 2007.

Lynch, M.A. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* v.84, n.1, p.87–136, 2004.

Maccarrone, M., Valverde, O., Barbaccia, M.L., Castane, A., Maldonado, R., Ledent, C., Parmentier, M. e Finazzi-Arigo, A. Age-

related changes of anandamide metabolism in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: correlation with behaviour. *Eur J Neurosci.* v.15, p.1178–86. 2002.

Mackie, K. e Hille, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.89, p.3825–29. 1992.

Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R. e Mitchell, R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.* v.15, p.6552–61. 1995.

Mackie, K. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes (Lond).* v.30, S19–23. 2006.

Maguire, E.A., Burke, T., Phillips, J. e Staunton, H. Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. *Neuropsychologia.* v.34, n.10, p.993–1001.1996.

Mahan, L.C., McVittie, L.D., Smyk-Randall, E.M., Nakata, H., Monsma Jr, F.J., Gerfen, C.R. e Sibley, D.R. Cloning and expression of an A₁ adenosine receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* v.40, p.1–7. 1991.

Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A. e Waxham, M.N. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature.* v.340, n6234, p.554–57, 1989.

Manzanedo, C., Rodríguez-Arias, M., Daza-Losada, M., Maldonado, C., Aguilar, M.A. e Miñarro, J. Effect of the CB1 cannabinoid agonist WIN 55212-2 on the acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in mice. *Behav Brain Funct.* v.22, p.6–19. 2010.

Marek, G.J. Activation of adenosine(1) (A(1)) receptors suppresses head shakes induced by a serotonergic hallucinogen in rats. *Neuropharmacology.* v.56, n.8, p.1082–7. 2009.

Marsicano, G. e Lutz, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci.* v.11, n.12, p.4213-25. 1999.

Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutiérrez, S.O., van der Stelt, M., López-Rodríguez, M.L., Casanova, E., Schütz, G., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V., Behl, C. e Lutz, B. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science.* v.302, n.5642, p.84-8. 2003.

Matsuda, L.A., Bonner, T.I. e Lolait, S.J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol.* v.327, n.4, p.535-50. 1993.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J. e Brownstein, M.J. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* v.346, p.561-64. 1990.

Mayfield, R.D., Jones, B.A., Miller, H.A., Simosky, J.K., Larson, G.A. e Zahniser, N.R. Modulation of endogenous GABA release by an antagonistic adenosine A1/dopamine D1 receptor interaction in rat brain limbic regions but not basal ganglia. *Synapse.* v.33, p.274-81. 1999.

Mazzola, C., Micale, V. e Drago, F. Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur J Pharmacol.* v.477, n.3, p.219-25. 2003.

McAllister, S.D., Griffin, G., Satin, L.S. e Abood, M.E. Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a *Xenopus* oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Therapeutics.* v.291, p.618-26. 1999.

McGaugh, J.L. Memory—a century of consolidation. *Science.* v.287, n.5451, p.248-51. 2000

McIntosh, H.H., Song, C. e Howlett, A.C. CB1 cannabinoid receptor: cellular regulation and distribution in N18TG2 neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res.* v.53, n.1-2, p.163-73. 1998.

Medeiros, R., Prediger, R.D., Passos, G.F., Pandolfo, P., Duarte, F.S., Franco, J.L., Dafre, A.L., Di Giunta, G., Figueiredo, C.P., Takahashi, R.N., Campos, M.M. e Calixto, J.B. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci.* v.27, n.20, p.5394-404. 2007.

Meghji, P. Adenosine production and metabolism. In: Stone TW, editor. Adenosine in the nervous system. San Diego: Academic Press; p. 25e41. 1991.

Mihara, T., Mihara, K., Yarimizu, J., Mitani, Y., Matsuda, R., Yamamoto, H., Aoki, S., Akahane, A., Iwashita, A. e Matsuoka, N. Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A1 and A2A receptor dual antagonist, 5-[5-amino-3-(4-fluorophenyl)pyrazin-2-yl]-1-isopropylpyridine-2(1H)-one (ASP5854), in models of Parkinson's disease and cognition. *J Pharmacol Exp Ther.* v.323, n.2, p.708-19. 2007.

Mingaud, F., Le Moine, C., Etchamendy, N., Mormède, C., Jaffard, R. e Marighetto, A. The hippocampus plays a critical role at encoding discontinuous events for subsequent declarative memory expression in mice. *Hippocampus.* v.17, n.4, p.264-70. 2007.

Mioranza, S., Costa, M.S., Botton, P.H., Ardais, A.P., Matte, V.L., Espinosa, J., Souza, D.O. e Porciúncula, L.O. Blockade of adenosine A(1) receptors prevents methylphenidate-induced impairment of object recognition task in adult mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* v.35, n.1, p.169-76. 2011.

Mishima, K., Egashira, N., Hirosawa, N., Fujii, M., Matsumoto, Y., Iwasaki, K. e Fujiwara, M. Characteristics of learning and memory impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* v.87, p.297-308. 2001.

Misner, D.L. e Sullivan, J.M. Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci.* v.19, n.16, p.6795-805. 1999.

Mogul, D.J., Adams, M.E. e Fox, A.P. Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca²⁺ current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* v.10, p.327–34. 1993.

Monory, K., Massa, F., Egertová, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., Kelsch, W., Jacob, W., Marsch, R., Ekker, M., Long, J., Rubenstein, J.L., Goebbels, S., Nave, K.A., During, M., Klugmann, M., Wölfel, B., Dodt, H.U., Zieglgänsberger, W., Wotjak, C.T., Mackie, K., Elphick, M.R., Marsicano, G. e Lutz, B. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*. v.51, n.4, p.455-66. 2006.

Moore, R.J., Xiao, R., Sim-Selley, L.J. e Childers, S.R. Agonist-stimulated [35S]GTPγ binding in brain modulation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology*. v.39, n.2. p.282-9. 2000.

Moscovitch, M., Nadel, L., Winocur, G., Gilboa, A. e Rosenbaum, R.S. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* v.16, p.179–90. 2006.

Mukhopadhyay, S., Shim, J.Y., Assi, A.A., Norford, D. e Howlett, A.C. CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signalling. *Chemistry and Physics of Lipids*. v.121, p.91–109. 2002.

Mukhopadhyay, S. e Howlett, A.C. Chemically distinct ligands promote differential CB1 cannabinoid receptor–Gi protein interactions. *Mol Pharmacol*. v.67, p.2016–24. 2005.

Munro, S., Thomas, K. L. e Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v.365, n.6441, Sep 2, p.61-5. 1993.

Murai, T., Okuda, S., Tanaka, T. e Ohta, H. Characteristics of object location memory in mice: behavioral and pharmacological studies. *Physiol Behav*, v.90, p.16–24. 2007.

Murakami, Y., Ikenoya, M., Matsumoto, K., Li, H., Watanabe, H. Ameliorative effect of tacrine on spatial memory deficit in chronic two-

vessel occluded rats is reversible and mediated by muscarinic M1 receptor stimulation. *Behav Brain Res*, v.109, n.1, p.83-90. 2000.

Nakamura, E.M., da Silva, E.A., Concilio, G.V., Wilkinson, D.A. e 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.167-75. 1991.

Nakazawa, K., McHugh, T.J., Wilson, M.A. e Tonegawa, S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci*. v.5, n.5, p.361-72. 2004

Nakazi, M., Bauer, U., Nickel, T., Kathmann, M., Schlicker, E. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. v.361, p.19-24. 2001.

Nasehi, M., Sahebgharani, M., Haeri-Rohani, A., Zarrindast, M.R. Effects of cannabinoids infused into the dorsal hippocampus upon memory formation in 3-days apomorphine-treated rats. *Neurobiol Learn Mem*. v.92, n.3, 391-9. 2009.

Navarrete, M. e Araque, A. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*, v.68, p.113-26. (2010).

Nawata, Y., Hiranita, T. e Yamamoto, T. A cannabinoid CB(1) receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacol*, v.35, n.2, p.515-20. 2010.

Neu, A., Földy, C. e Soltesz, I. Postsynaptic origin of CB1-dependent tonic inhibition of GABA release at cholecystokinin-positive basket cell to pyramidal cell synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Physiol*. v.578, n.1, p.233-47. 2007.

Normile, H.J. e Barraco, R.A. N6-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A1 receptors. *Brain Res Bull*. v.27, n.1, p.101-4. 1991.

Nyiri, G., Cserep, C., Szabadits, E., Mackie, K. e Freund, T. F. CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience*, v.136, n.3, p.811-22. 2005.

O'Keefe, J. e Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, v.34, p.171-5. 1971.

O'Neill, C., Nolan, B.J., Macari, A., O'Boyle, K.M. e O'Connor, J.J. Adenosine A1 receptor mediated inhibition of dopamine release from rat striatal slices is modulated by D1 dopamine receptors. *Eur J Neurosci*, v.26, p.3421-428. 2007.

Ochiishi, T., Chen, L., Yukawa, A., Saitoh, Y., Sekino, Y. e Arai, T. Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody. *J Comp Neurol*, v.411, p.301-16. 1999.

Ochiishi, T., Saitoh, Y., Yukawa, A., Saji, M., Ren, Y., Shirao, T., Miyamoto, H., Nakata, H. e Sekino, Y. High level of adenosine A1 receptor-like immunoreactivity in the CA2/CA3a region of the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, v.93, n.3, p.955-67. 1999.

Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T., Kataoka, K. e Schubert, P. Adenosine enhances intracellular Ca²⁺ mobilization in conjunction with metabotropic glutamate receptor activation by t-ACPD in cultured hippocampal astrocytes. *Neurosci Lett*, v.170, p.5-8. 1994.

Ohno, M. e Watanabe, S. Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A1 receptors in rats. *Neuroreport*, v.7, n.18, p.3013-6. 1996.

Okada, M., Nutt, D.J., Murakami, T., Zhu, G., Kamata, A., Kawata, Y. e Kaneko, S. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci*, v.21, n.2, p.628-40. 2001.

O'Keefe, J. e Nadel, L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press, Oxford, 1978.

Onaivi, E.S., Chakrabarti, A. e Chaudhuri, G. Cannabinoid receptor genes. *Prog Neurobiol*, v.48, p.275–305. 1996.

O'Sullivan, S.E., Kendall, P.J. e Kendall, D.A. Endocannabinoids and the cardiovascular response to stress. *J Psychopharmacol*. 2011 Jun 27 in press.

Othman, T., Yan, H. e Rivkees, S.A. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia*, v.44, p.166–72. 2003.

Overton, H.A., Babbs, A.J., Doel, S.M., Fyfe, M.C., Gardner, L.S. e Griffin, G. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*, v.3, p.167–75. 2006.

Pamplona, F.A., Prediger, R.D.S., Pandolfo, P. e Takahashi, R.N. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212–2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacol*, v.188, n.4, p.641–49. 2006.

Pandolfo, P., Silveirinha, V., dos Santos-Rodrigues, A., Venance, L., Ledent, C., Takahashi, R.N., Cunha, R.A. e Köfalvi, A. Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *Eur J Pharmacol*, v.655, n.1-3, p.38-45. 2011.

Paradisi, A., Pasquariello, N., Barcaroli, D. e Maccarrone, M. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *J Biol Chem*, v.283, p. 6005–12. 2008.

Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K. e Haydon, P.G. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, v.310, p.113-116. 2005.

Paxinos, G. e Frankin, K.B. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic, San Diego), 2nd Ed., pp. 39–64. 2001.

Pepeu, G. e Giovannini, M.G. Cholinesterase inhibitors and memory. *Chem Biol Interact*, v.187, n.1-3, p.403-8. 2010.

Pereira, G.S., Mello e Souza, T., Vinadé, E.R., Choi, H., Rodrigues, C., Battastini, A.M., Izquierdo, I., Sarkis, J.J. e Bonan, C.D. Blockade of adenosine A1 receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. *Eur J Pharmacol*, v.437, n.3, p.151-4. 2002.

Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Elrick, D.B., Mechoulam, R. e Corbett, A.D. Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol*, v.105, p.980-9. 1992.

Pertwee, R.G. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. p.1-51. 2005.

Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R. e Ross, R.A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev*, v.62, n.4, p.588-631. 2010

Pitsikas, N. e Borsini, F. The adenosine A1 receptor antagonist BIIP 20 counteracts scopolamine-induced behavioral deficits in the passive avoidance task in the rat. *Eur J Pharmacol*, v.328, n.1, p.19-22. 1997.

Poli, A., Lucchi, R., Vibio, M. e Barnabei, O. Adenosine and glutamate modulate each other's release from rat hippocampal synaptosomes. *J Neurochem*, v.57, p.298-306. 1991.

Pontieri, F.E., Monnazzi, P., Scontrini, A., Buttarelli, F.R. e Patacchioli, F.R. Behavioral sensitization to heroin by cannabinoid pretreatment in the rat. *Eur J Pharmacol*. v.421, p.1-3. 2001

Pouzet, B., Zhang, W.N., Feldon, J. e Rawlins, J.N. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behav Brain Res*, v.133. n.2, p.279-291, 2002.

Prather, P.L., Martin, N.A., Breivogel, C.S. e Childers, S.R. Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55212-2 produces

coupling to multiple G protein alpha-subunits with different potencies. *Mol Pharmacol*, v.57, p.1000–10. 2000.

Prediger, R.D., da Silva, G.E., Batista, L.C., Bittencourt, A.L. e Takahashi, R.N. Activation of adenosine A1 receptors reduces anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal (hangover) in mice. *Neuropsychopharmacol*, v.10, p.2210-20. 2006.

Prediger, R.D., Franco, J.L., Pandolfo, P., Medeiros, R., Duarte, F.S., Di Giunta, G., Figueiredo, C.P., Farina, M., Calixto, J.B., Takahashi, R.N. e Dafre, A.L. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav Brain Res*, v.177, n.2, p.205-13. 2007.

Prediger, R.D. e Takahashi, R.N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A(2A) receptors. *Neurosci Lett*. v.376, n.3, p.160-5. 2005

Qian, J., Colmers, W.F. e Saggau, P. Inhibition of synaptic transmission by neuropeptide Y in rat hippocampal area CA1: modulation of presynaptic Ca²⁺ entry. *J Neurosci*, v.17, p.8169–77. 1997.

Quarta, D., Borycz, J., Solinas, M., Patkar, K., Hockemeyer, J., Ciruela, F., Lluís, C., Franco, R., Woods, A.S., Goldberg, S.R. e Ferré, S. Adenosine receptor-mediated modulation of dopamine release in the nucleus accumbens depends on glutamate neurotransmission and N-methyl-D-aspartate receptor stimulation. *J Neurochem*, v.91, n.4, p.873-80. 2004.

Ranganathan, M. e D'Souza, D. The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review, *Psychopharmacol*, v.188, p.425–444. 2006.

Rebola, N., Pinheiro, P.C. e Oliveira, C.R. Subcellular localization of adenosine A1 receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res*, v.98, p.49-58. 2003.

Reibaud, M., Obinu, M.C., Ledent, C., Parmentier, M., Bohme, G.A. e Imperato, A. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol*, v.379, R1–R2, 1999.

Rezayof, A., Sharifi, K., Zarrindast, M.R. e Rassouli, Y. Modulation of ethanol state-dependent learning by dorsal hippocampal NMDA receptors in mice. *Alcohol*, v.42, n.8, p.667-74. 2008.

Rhee, M.H., Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R. e Vogel, Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, v.71, p.1525-34. 1998.

Ribeiro, J.A. e Sebastião, A.M. Modulation and metamodulation of synapses by adenosine. *Acta Physiol (Oxf)*. v.199, n.2, p.161-9. 2010.

Riedel, G., Platt, B. e Micheau, J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res*, v.140, p.1-47. 2003.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubrié, P., Brelière, J.C. e Le Fur, G. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*, v.350, p.240-44, 1994.

Robbe, D. e Buzsaki, G. Alteration of theta timescale dynamics of hippocampal place cells by a cannabinoid is associated with memory impairment. *J Neurosci*, v.29, p.12597-605. 2009.

Robbe, D., Montgomery, S.M., Thome, A., Rueda-Orozco, P.E., McNaughton, B.L., Buzsaki, G. Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci*, v.9, p.1526-33. 2006.

Robbins, T.W. e Murphy, E.R. Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. *Trends Pharmacol Sci*, v.27, n.3, p.141-8. 2006.

Robinson, L., Goonawardena, A.V., Pertwee, R.G., Hampson, R.E e Riedel, G. The synthetic cannabinoid HU210 induces spatial memory deficits and suppresses hippocampal firing rate in rats. *Br. J. Pharmacol*, v.151, p.688-700. 2007.

- Robledo, P., Berrendero, F., Ozaita, A. e Maldonado, R. Advances in the field of cannabinoid–opioid cross-talk. *Addict Biol*, v.13, p.213–24. 2008.
- Robson, S.C., Sevigny, J. e Zimmermann, H. The ENTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic. Signal*, v.2, p.409-430. 2006.
- Roche, R., Hoareau, L., Bes-Houtmann, S., Gonthier, M.P., Laborde, C. e Baron, J.F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol*, v.126, p.177–87. 2006.
- 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. 1673–79. 2004.
- Rosenbaum, R.S., Priselac, S., Kohler, S., Black, S.E., Gao, F., Nadel, L. e Moscovitch, M. Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. *Nature Neurosci*, v.3, n.10, p.1044–48, 2000.
- Roser, P., Vollenweider, F.X. e Kawohl, W. Potential antipsychotic properties of central cannabinoid (CB1) receptor antagonists. *World J Biol Psychiatry*. v.11, p.208-19.
- Rouzer, C.A. e Marnett, L.J. Non-redundant functions of cyclooxygenases: oxygenation of endocannabinoids. *J. Biol. Chem*. v.283, p.8065–69. 2008.
- Rozenfeld, R. e Devi, L.A. Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3. *FASEB J*. Jul;22(7):2311-22. 2008.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T. e Greasley, P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. v.152, n.7, p.1092-101. 2007.

Salinas, J.A., Introini-Collison, I.B., Dalmaz, C., McGaugh, J.L. Posttraining intraamygdala infusions of oxotremorine and propranolol modulate storage of memory for reductions in reward magnitude. *Neurobiol Learn Mem*, v.68, p.51–59. 1997.

Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Rueda, D. e Guzmán, M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol*. v.54, n.5, p.834-43. 1998.

Savinainen, J.R., Saario, S.M., Niemi, R., Järvinen, T. e Laitinen, J.T. An optimized approach to study endocannabinoid signaling: evidence against constitutive activity of rat brain adenosine A1 and cannabinoid CB1 receptors. *Br J Pharmacol*. v.140, n.8, p.1451-9. 2003.

Saxena, G., Singh, S.P., Agrawal, R. e Nath, C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol*. v.581, n.3, p.283-9. 2008.

Schingnitz, G., Kufner-Muhl, U., Ensinger, H., Lehr, E. e Kuhn, F.G. Selective A1-antagonists for treatment of cognitive deficits. *Nucleosides Nucleotides*, v.10, p.1067–76, 1991.

Scoville, W.B. e Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol, Neurosurg Psych*, v.20, n.1, p.11–21, 1957.

Sebastiao, A. e Ribeiro, J.A. Adenosine Receptors and the Central Nervous System C.N. Wilson and S.J. Mustafa (eds.), *Adenosine Receptors in Health and Disease*, Handbook of Experimental Pharmacology 193, 2009.

Sehmisch, S., Blauth, E., Thorn, D., Cassel, J.C., Kelche, C., Feuerstein, T.J. e Jackisch, R. Electrically evoked release of glutamate in rat hippocampal slices: effects of various drugs and fimbria-fornix lesions. *Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v.363, n.5, p.481-90. 2001.

Selbie, L.A. e Hill, S.J. G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci*, v.19, n.3, p.87-93. 1998.

- Selley, D.E., Cassidy, M.P., Martin, B.R. e Sim-Selley, L.J. Long-term administration of Delta9-tetrahydrocannabinol desensitizes CB1-, adenosine A1-, and GABAB-mediated inhibition of adenylyl cyclase in mouse cerebellum. *Mol Pharmacol*, v.66, n.5, p.1275-84. 2004.
- Serpa, A., Ribeiro, J.A. e Sebastião, A.M. Cannabinoid CB(1) and adenosine A(1) receptors independently inhibit hippocampal synaptic transmission. *Eur J Pharmacol*, v.623, n.1-3, p.41-6. 2009.
- Shankar, S., Teyler, T.J. e Robbins, N. Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1. *J Neurophysiol*, v.79, n.1, p.334-41, 1998.
- Shire, D., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Oustric, D., Pessegue, B., Bonnin-Cabanne, O. Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta*, v.1307, p.132-6. 1996.
- Sloviter, R.S., Ali-Akbarian, L., Elliott, R.C., Bowery, B.J. e Bowery, N.G. Localization of GABA(B) (R1) receptors in the rat hippocampus by immunocytochemistry and high resolution autoradiography, with specific reference to its localization in identified hippocampal interneuron subpopulations. *Neuropharmacol*, v.38, n.11, 1707-21. 1999.
- Sousa, V.C., Assaife-Lopes, N., Ribeiro, J.A., Pratt, J.A., Brett, R.R. e Sebastião, A.M. Regulation of hippocampal cannabinoid CB1 receptor actions by adenosine A1 receptors and chronic caffeine administration: implications for the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on spatial memory. *Neuropsychopharmacol*. v.36, n.2, p472-87. 2011.
- Spielman, W.S., Arend, L.J. Adenosine receptors and signaling in the kidney. *Hypertension*, v.17, n.2, p.117-30. 1991.
- Squire, L.R. Mechanisms of memory. *Science*, v.232, p.1612-9. 1986.
- Stone, T.W., Ceruti, S., Abbracchio, M.P. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Hand Exp Pharmacol*, v.193, p.535-87. 2009.

Stone, T.W., Collis, M.G., Williams, M., Miller, L.P., Karasawa, A., Hillaire-Buys, D. Adenosine: some therapeutic applications and prospects. In: Cuello AC, Collier B (Eds.), *Pharmacological Sciences: Perspectives for Research and Therapy in the Late 1990s*. *Birkhauser Verlag Basel*, pp. 303-309. 1995.

Straiker, A., Stella, N., Piomelli, D., Mackie, K., Karten, H.J. e Maguire, G. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signalling system. *PNAS*, v.96, p.14565–570. 1999.

Straiker, A.J., Borden, C.R., Sullivan, J.M. G-protein alpha subunit isoforms couple differentially to receptors that mediate presynaptic inhibition at rat hippocampal synapses. *J Neurosci*, v.22, n.7, p. 2460-8. 2002.

Suenaga, T. e Ichitani, Y. Effects of hippocampal administration of a cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on spontaneous object and place recognition in rats. *Behav Brain Res*, v.190, p.248–252. 2008.

Suenaga, T., Kaku, M. e Ichitani, Y. Effects of intrahippocampal cannabinoid receptor agonist and antagonist on radial maze and T-maze delayed alternation performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v.91, p. 91-96. 2008.

Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S. e Gokoh, M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, v.45, p.405–46. 2006.

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

Sun, Y., Alexander, S.P.H., Garle, M.J., Gibson, C., Hewitt, K. e Kendall, D.A. Cannabinoid activation of PPAR α ; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol*, v.152, n.5, p.734-43. 2007.

Suzuki, F.J., Shimada, S., Shiozaki, S., Ichikawa, A., Ishii, J., Nakamura, H., Nonaka, H. e Kobayashi, E. Adenosine A1 antagonists. 3. Structure-activity relationships on amelioration against scopolamine- or N6-((R)- phenylisopropyl)adenosine-induced cognitive disturbance. *J Med Chem*, v.36, p.2508-18. 1993.

Swanson, T.H., Drazba, J.A. e Rivkees, S.A. Adenosine A1 receptors are located predominantly on axons in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*, v.363, p.517-31. 1995.

Takahashi, R.N., Pamplona, F.A., Fernandes, M.S. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett*, v.380, p.270-75. 2005.

Takigawa, T. e Alzheimer, C. Phasic and tonic attenuation of EPSPs by inward rectifier K⁺ channels in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol*, v.539, p.67-75. 2002.

Tallarida, R.J. Interactions between drugs and occupied receptors. *Pharmacol Ther.* v.113, n.1, p.197-209. 2007.

Terranova, J.P., Storme, J.J., Lafon, N., Perio, A., Rinaldi-Carmona, M. e Le Fur, G. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacol.* v. 126, p.165-72. 1996.

Tersigni, T.J. e Rosenberg, H.C. Local pressure application of cannabinoid agonists increases spontaneous activity of rat substantia nigra pars reticulata neurons without affecting response to iontophoretically-applied GABA. *Brain Res*, v.733, p.184-92. 1996.

Tetzlaff, W., Schubert, P. e Kreutzberg, G.W. Synaptic and extrasynaptic localization of adenosine binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience*, v.21, p.869-75. 1987.

Thierry, A.M., Gioanni, Y., Dégénétais, E. e Glowinski, J. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*. v.10, n.4, p.411-9. 2000.

Thinus-Blanc, C. Exploration and spatial knowledge. In: *Animal Spatial Cognition. Behavioral and Neural Approaches*. 1st ed. Singapore: World Scientific; p. 1–42. 1996.

Tolman, E.C. Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev*, v.55, p.189–208. 1948.

Tulving, E. e Schacter, D.L. Priming and human memory systems. *Science*, v.247, p.301–6. 1990.

Twitchell, W., Brown, S. e Mackie, K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol*, v.78, p.43–50. 1997.

Ueda, N., Yamamoto, K. e Yamamoto, S. Lipoxygenase catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochim Biophys Acta*, v.1254, p.127–34. 1995.

van Calker, D., Müller, M. e Hamprecht, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem*. v.33, n.5, p.999-1005. 1979.

Varvel, S.A., Hamm, R.J., Martin, B.R. e Lichtman, A.H. Differential effects of delta9-THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacol*, v.157, p.142–150. 2001.

Varvel, S.A., Anum, E., Niyuhire, F., Wise, L.E. e Lichtman, A.H. Delta(9)-THCinduced cognitive deficits in mice are reversed by the GABA(A) antagonist bicuculline. *Psychopharmacol*, v.178, p.317–27. 2005.

Vezzani, A., Serafini, R., Stasi, M.A., Caccia, S., Conti, I. e Tridico, R.V. Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, v.249, n.1, p.278-83. 1989.

Vigano, D., Valenti, M., Cascio, M.G., Di Marzo, V., Parolaro, D. e Rubino, T. Changes in endocannabinoid levels in a rat model of

- behavioural sensitization to morphine. *Eur J Neurosci*, v.20, p.1849–57. 2004.
- Von Lubitz, D.K., Paul, I.A., Bartus, R.T. e Jacobson, K.A. Effects of chronic administration of adenosine A1 receptor agonist and antagonist on spatial learning and memory. *Eur J Pharmacol*, v.249, n.3, p.271-80. 1993.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K. e Stella, N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci*, v.23, n.4, p.1398-405. 2003.
- Wegener, M., Kuhnert, S., Thuns, S., Roese R. e Koch, M. Effects of acute systemic and intra-cerebral stimulation of cannabinoid receptors on sensorimotor gating, locomotion and spatial memory in rats, *Psychopharmacol*, v.198, p.375–85, 2008.
- Whishaw, I.Q. e Tomie, J.A. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav*, v.60, p.1191– 7. 1996.
- Winslow, B.T., Onysko, M.K., Stob, C.M. e Hazlewood, K.A. Treatment of Alzheimer disease. *Am Fam Physician*, v.83, n.12, p.1403-12. 2011.
- Wise, L.E., Iredale, P.A. e Lichtman, A.H. The cannabinoid CB(1) receptor antagonist CE prolongs spatial memory duration in a rat delayed radial arm maze memory task. *Eur J Pharmacol*, v.590, n.1-3, p.246-9. 2008.
- Wise, L.E., Thorpe, A.J. e Lichtman, A.H. Hippocampal CB(1) receptors mediate the memory impairing effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol, *Neuropsychopharmacol*, v.34, p.2072–80. 2009.
- Wlaż, P., Baran, H. e Löscher, W. Effect of the glycine/NMDA receptor partial agonist, D-cycloserine, on seizure threshold and some pharmacodynamic effects of MK-801 in mice. *Eur J Pharmacol*, v.257, p.217-225. 1994.

Wolff, M.C. e Leander, J.D. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. *Eur J Pharmacol* v.477, p.213–17. 2003.

Wu, L.G. e Saggau, P. Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* v.12, p.1139–48. 1994.

Xu, J.Y., Chen, R., Zhang, J. e Chen, C. Endocannabinoids differentially modulate synaptic plasticity in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS One*. v.22, n.5, p.10306.

Yim, T.T., Hong, N.S., Ejaredar, M., McKenna, J.E. e McDonald, R.J. Post-training CB1 cannabinoid receptor agonist activation disrupts long-term consolidation of spatial memories in the hippocampus. *Neuroscience*. v.151, n.4, p.929-36. 2008.

Yoon, K.W. e Rothman, S.M. Adenosine inhibits excitatory but not inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci*, v.11, p.1375– 80. 1991.

Zhao, Q., Murakami, Y., Tohda, M., Obi, R., Shimada, Y. e Matsumoto, K. Chotosan, a kampo formula, ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced deficits in object recognition behaviors and central cholinergic systems in mice. *J Pharmacol Sci*, v.103, p.360-73. 2007.

Zlomuzica, A., De Souza Silva, M.A., Huston, J.P. e Dere, E. NMDA receptor modulation by D-cycloserine promotes episodic-like memory in mice. *Psychopharmacol*, v.193, p.503-09. 2007.

Zoli, M., Agnati, L.F., Hedlund, P.B., Li, X.M., Ferre, S. e Fuxe, K. Receptor– receptor interactions as an integrative mechanism in nerve cells. *Mol Neurobiol*, v.7, p.293-334. 1993.