

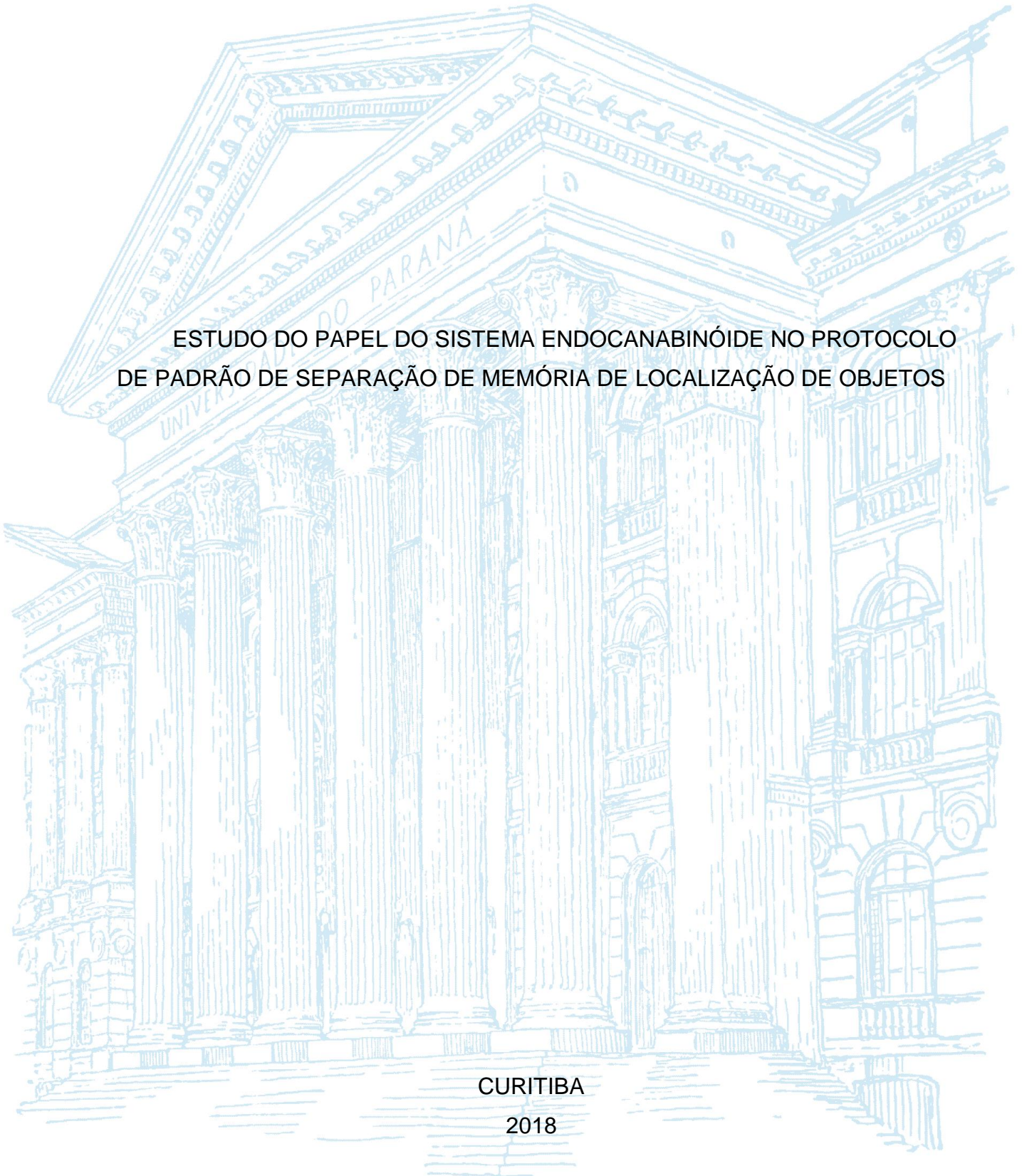
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA WUILLEUMIER SALEMME

ESTUDO DO PAPEL DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NO PROTOCOLO  
DE PADRÃO DE SEPARAÇÃO DE MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS

CURITIBA

2018



BRUNA WUILLEUMIER SALEMME

ESTUDO DO PAPEL DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NO PROTOCOLO  
DE PADRÃO DE SEPARAÇÃO DE MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS

Monografia apresentada como requisito parcial  
para a obtenção de título de Bacharel, Curso de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Aparecida Jark  
Stern

CURITIBA

2018

## TERMO DE APROVAÇÃO

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria primeiramente de agradecer à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina A. Jark Stern, por ter me acolhido em seu laboratório e aceitado me orientar nesse trabalho. É inestimável todo o conhecimento que você me passou em quase um ano de convivência.

Aos meus colegas de laboratório, que me ensinaram, orientaram, ajudaram e fizeram companhia. Agradeço especialmente à Ana Maria, que esteve comigo do início ao fim desse trabalho e fez inúmeras contribuições a ele e a mim, como pesquisadora; ao Thiago que foi a primeira pessoa a me acolher no laboratório e me ensinou praticamente tudo que eu sei; e ao Jefferson, que sempre me ajudou, orientou e me fez companhia nas noites, fins de semana e feriados de experimentos.

Agradeço à minha família, que sempre me incentivou e acreditou em mim, ao meu namorado e meus amigos, em especial à Paula e Martha Beatriz, por todo apoio emocional, paciência e carinho nessa trajetória.

Aos professores Dr. Bruno J. Martynhak e Dr. Cláudio da Cunha por terem aceitado fazer parte da minha banca avaliadora.

Por fim, ao Tesouro Nacional e programa PIBIC UFPR pela bolsa-auxílio de Iniciação Científica.

## RESUMO

O Padrão de separação (PS) permite que eventos semelhantes sejam armazenados como memórias distintas. Estudos indicam que déficits no PS ocorrem em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, levando a prejuízos cognitivos, como na doença de Alzheimer, e a generalização da resposta de medo, como no transtorno de estresse pós-traumático. Os mecanismos que melhoram o PS são de interesse terapêutico para o tratamento dessas doenças. Um trabalho do nosso grupo mostrou que a ativação dos receptores canabinóides CB1 e CB2, no hipocampo dorsal de ratos, melhorou o PS de uma memória de medo condicionado, no entanto, não se sabe se esses receptores controlam o PS de uma memória do tipo declarativa. Nosso objetivo foi avaliar o papel do sistema endocanabinoide no PS de uma memória declarativa. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos submetidos ao protocolo de PS, uma versão modificada do protocolo de localização de objetos tradicional. Na sessão de aprendizado, os animais foram expostos – por três minutos – a um campo aberto com dois objetos idênticos e alinhados. No teste de PS, a localização de um dos objetos foi modificada para a posição 5 (varia entre 1 e 5), como determinado no teste de padronização do protocolo, e o índice de discriminação (ID) foi avaliado. Foram realizados três experimentos que consistiram da administração do agonista CB1/CB2 (WIN 55,212-2; 0,25 ou 0,5 mg/kg, i.p.) ou veículo, imediatamente após o aprendizado. No experimento 1, o teste de PS foi feito 30 minutos após o aprendizado. No experimento 2, o teste de PS foi feito 1 hora após o aprendizado e no experimento 3, o teste de PS foi feito 3 horas após. Quando o teste de ANOVA foi significativo, o *posthoc* de Newman-Keuls foi aplicado. A ANOVA de 1 via mostrou que o tratamento com WIN, na dose de 0,25 mg/kg, aumenta o ID em relação ao grupo controle no tempo de 30 minutos, sugerindo uma melhora no PS. Quando o teste de PS foi feito 1 hora após o aprendizado, não houve nenhuma diferença entre os grupos. Após 3 horas, houve uma tendência da maior dose de WIN (0,5 mg/kg) reduzir o ID (ANOVA de uma via;  $P=0,08$ ) em relação ao grupo controle. Os resultados implicam que a ativação dos receptores CB1/CB2 melhora o PS de uma memória de localização de objetos nos momentos próximos ao aprendizado, sugerindo um alvo para melhorar o PS em condições como a doença de Alzheimer. No entanto, quando testados em momentos tardios em relação ao aprendizado, uma dose maior do agonista tende a prejudicar o PS. Os resultados confirmam a hipótese de que o sistema endocanabinoide participa do PS de memórias declarativas.

Palavras-chave: Padrão de Separação. Memória. Receptores CB1/CB2.

## ABSTRACT

Pattern Separation (PS) is the process of storing similar memories as highly dissimilar and non-overlapping representations. Studies indicate that PS impairments occur in neurodegenerative and psychiatric diseases, leading to cognitive impairments, as observed in Alzheimer's disease, or fear generalization, as seen in Post-Traumatic Stress Disorder. Mechanisms that improve PS are interesting alternatives to the current therapies for these diseases. A study by our group showed that the activation of CB1 and CB2 receptors in the dorsal hippocampus of rats improved the PS of a fear-conditioned memory, however, there's no evidence showing that these receptors control the PS of a declarative memory. Our goal was to evaluate the endocannabinoid system's role in the PS of a declarative memory. To achieve that, male, adult Wistar rats were subjected to the object PS task, a modified version of the Object Recognition Task. In the learning session, the animals were exposed, for 3 minutes, to an open field containing two identical objects placed in a straight line, opposite to each other. In the PS task, one of the objects was moved to the fifth position (varies from 1 to 5) and the discrimination index (DI) was evaluated. The first experiment consisted of a padronization to determine the best object location in T2. Thereafter, three tests were performed, which consisted of the administration of a CB1/CB2 receptor agonist (WIN 55,212-2; 0,25 or 0,5 mg/kg; i.p.) or vehicle immediately after the learning session. In the first experiment, the PS was measured 30 minutes after learning. In the second and third experiments, it was measured 1 and 3 hours after learning, respectively. When one-way ANOVA was significant, Newman-Keuls posthoc test was performed. One-way ANOVA showed that treatment with 0,25 mg/kg WIN 30 min after learning increases the DI, when compared to the control group, suggesting a PS improvement. When the task was performed 1 hour after learning, there was no statistical difference between groups. When measured 3 hours after learning, one-way ANOVA showed a trend ( $P=0.08$ ) that the higher dose (0,5 mg/kg WIN) would reduce the DI, when compared to the control group. The results imply that the activation of CB1/CB2 receptors improves the PS of an object location memory in moments close to learning, suggesting a target to improve PS in diseases such as Alzheimer's. However, when measured in moments farther from learning, a higher dose of the agonist tends to impair the PS. The results confirm the hypothesis that the endocannabinoid system participates in the PS of a declarative memory.

Key-words: Pattern Separation. Memory. CB1/CB2 receptors.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	O PADÃO DE SEPARAÇÃO HIPOCAMPAL.....	1
1.2	SISTEMA ENDOCANABINÓIDE .....	1
1.3	MODELO DE PS DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS.....	2
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
4.1	ANIMAIS.....	6
4.2	PROTOCOLO DE PADRÃO DE SEPARAÇÃO DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS.....	6
4.3	APARATO E OBJETOS .....	7
4.4	DROGAS .....	8
4.5	EXPERIMENTOS .....	8
4.5.1	Experimento de Padronização do Protocolo OPS .....	8
4.5.2	Experimento 1 .....	9
4.5.3	Experimento 2 .....	9
4.5.4	Experimento 3 .....	9
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	9
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>10</b>
5.1	EXPERIMENTO DE PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO OPS .....	10
5.2	EXPERIMENTO 1.....	10
5.3	EXPERIMENTO 2.....	11
5.4	EXPERIMENTO 3.....	11
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>16</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>17</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O PADÃO DE SEPARAÇÃO HIPOCAMPAL

O padrão de separação (PS) é uma função do hipocampo que nos permite distinguir entre situações similares como eventos diferentes, tendo grande influência no sucesso das nossas interações sociais e tarefas do dia a dia (Sahay et al., 2011).

O PS é influenciado pela neurogênese, com grande participação do giro denteado (GD) e córtex entorrinal (CE): com a transferência de informações entre o CE e o GD, ocorre a separação e processamento individual das informações, possibilitando sua discriminação. O PS é complementado por um processo denominado *pattern completion* (PC) que envolve a região CA3 do hipocampo e faz com que a memória seja evocada de maneira específica. Dentre os mecanismos que melhoram o PS e o PC destaca-se o papel da neurogênese (Hagen et al., 2015).

Estudos indicam que déficits no PS e/ou no PC ocorrem em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, levando a prejuízos cognitivos como na doença de Alzheimer, e a generalização das respostas de medo que ocorre em transtornos psiquiátricos como no transtorno de estresse pós-traumático (TEPT); enquanto o PS excessivo pode ser visto em doenças como o autismo e transtorno obsessivo-compulsivo (Sahay et al., 2011).

Além da diminuição do PS estar relacionado com doenças neurodegenerativas, também está presente como fator normal do processo de envelhecimento (Toner et al., 2009), sendo que essa perda pode ser melhorada com o aumento da neurogênese hipocampal adulta pelo uso de fármacos (i.e.: antidepressivos), aprendizado, enriquecimento ambiental e exercício físico regular (Sahay et al., 2011).

### 1.2 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

O sistema endocanabinóide é responsável pela modulação de diversas funções neuronais, inclusive algumas relacionadas aos diferentes tipos de reações de defesa, oferecendo um contrabalanceamento às consequências de um estímulo estressante. Esse sistema é composto pelos neurotransmissores endógenos

análogos ao  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), composto que gera a maioria dos efeitos psicoativos observados no uso da *Cannabis sativa* (Howlett et al., 2002). Os principais endocanabinóides são a araquidonoil etanolamina, apelidado de anandamida e o glicerol 2-araquidonoil (2-AG), apesar de haverem muitos outros.

No sistema nervoso central, o  $\Delta^9$ -THC age primariamente no receptor canabinóide 1 (CB1) – receptor mais densamente expresso no cérebro—, podendo também agir no receptor canabinóide 2 (CB2) – que é encontrado em menor quantidade, sendo majoritariamente expresso em regiões pós-sinápticas no corpo celular de neurônios e em micróglias (Onaivi et al., 2006).

A anandamida e o 2-AG agem de maneira distinta, sendo o 2-AG um agonista total dos receptores CB1 e CB2, e a anandamida um agonista parcial desses receptores, que pode ainda se ligar aos receptores de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1). Ambos compostos são liberados em situações de estresse e controlam a liberação de outros neurotransmissores, promovendo alterações na plasticidade neural (Munro et al., 1993).

Os efeitos mediados pelos endocanabinóides têm curta duração, devido a sua rápida remoção da fenda sináptica, por difusão passiva a um gradiente de concentração, devido à sua natureza lipofílica, ou por um transportador específico (Giuffrida et al., 2001). No interior dos neurônios a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) e a monoacilglicerídeo lipase (MGL), hidrolisam, respectivamente, a anandamida e o 2-AG (McKinney & Cravatt, 2005).

Um trabalho do nosso grupo mostrou que o canabidiol (CBD), o segundo composto mais presente na *Cannabis sativa* e desprovido de efeitos psicoativos, administrado sistemicamente em ratos, prejudicou a generalização da memória de medo (Stern et al., 2017). Esse efeito dependeu da ativação dos receptores CB1 e CB2 presentes no hipocampo dorsal, sugerindo um papel para o sistema endocanabinóide na função de PS hipocampal, uma função ainda não descrita para esse sistema de neurotransmissão. Portanto, a hipótese desse trabalho é que o sistema endocanabinóide controla o PS.

### 1.3 MODELO DE PS DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS

O modelo de PS de localização de objetos (OPS) foi padronizado e descrito por Hagen et al. (2015). Esse modelo consiste em uma derivação do teste de

localização de objetos (OLT; do inglês *object location task*) onde dois objetos idênticos são apresentados ao animal em um campo aberto quadrado, posicionados em dois dos quatro cantos (escolhidos randomicamente), na sessão de aquisição; após uma pausa, na sessão teste um dos objetos é movido para outro canto da caixa e o animal é novamente exposto a esse contexto (Ennaceur et al., 1996). Do mesmo modo, o OLT deriva do teste de reconhecimento de objetos (ORT; do inglês *object recognition task*) que mantém a mesma metodologia do OLT mas, ao invés de mudar a localização de um objeto na sessão teste, ocorre a troca do objeto em si por um objeto dissimilar (Ennaceur & Delacour, 1988).

A grande diferença observada entre o OPS e o OLT é a possibilidade de avaliar, através do uso de diferentes posições para o objeto na sessão teste, a mudança de posição mínima necessária para que o roedor perceba a alteração, inferindo, assim, que está ocorrendo o uso do PS e não de outros mecanismos de memória (Hagen et al., 2015).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar o papel do sistema endocanabinóide no protocolo de padrão de separação de memória de localização de objetos através do uso de um agonista dos receptores CB1 e CB2.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar o protocolo de PS de memória de localização de objetos;

Avaliar se o tratamento com WIN 55,212-2 (agonista CB1/CB2) imediatamente após o treino melhora o PS após 30 minutos;

Avaliar se o tratamento com WIN 55,212-2 (agonista CB1/CB2) imediatamente após o treino melhora o PS após 1 hora;

Avaliar se o tratamento com WIN 55,212-2 (agonista CB1/CB2) imediatamente após o treino melhora o PS após 3 horas.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os resultados desse estudo sobre a influência do sistema endocanabinóide no padrão de separação de memória de reconhecimento de objetos podem ser úteis para o tratamento de doenças como Alzheimer e transtorno de estresse pós-traumático, além de outras doenças neurodegenerativas ou psiquiátricas onde é observada uma queda no PS hipocampal dos pacientes. Além disso, esse projeto pode auxiliar no entendimento de como os derivados da *Cannabis* como o THC e CBD melhoram os sintomas de doenças como as acima citadas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

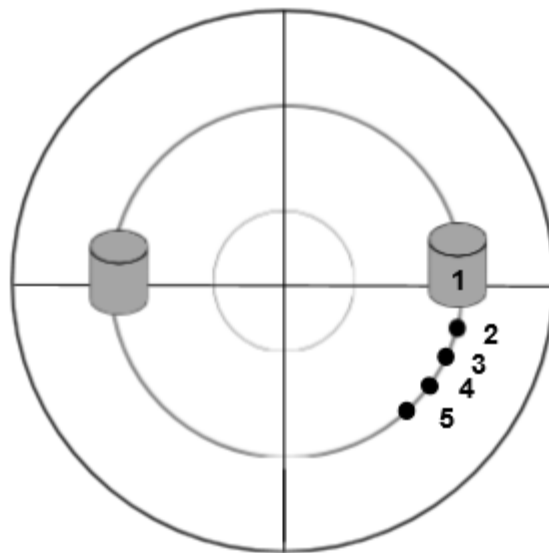
Nos experimentos foram utilizados ratos machos *Wistar* de 3 meses, pesando de 250 a 320 g, dispostos em grupos de 4 a 5 ratos por caixa (50 x 30 x 15 cm), nas seguintes condições: ciclo claro/escuro de 12 h (início da fase clara às 7:00 h), ambiente com temperatura controlada de  $22 \pm 1$  °C e livre acesso a comida e água.

### 4.2 PROTOCOLO DE PADRÃO DE SEPARAÇÃO DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS

Os experimentos foram realizados sempre no mesmo período do dia, entre 12 e 17 horas. No primeiro dia os animais foram apresentados ao Campo Aberto vazio em uma sessão de familiarização com o ambiente, onde permaneceram por 5 minutos, retornando em seguida para a caixa moradia. De acordo com a metodologia proposta por Hagen et al., 2015, a sessão de aquisição (T1) se deu no segundo dia, onde dois objetos idênticos foram colocados equidistantes em uma linha horizontal da arena a 15 cm da parede (posição 1). Em T1, os animais foram colocados na arena voltados para a parede frontal e exploraram a arena por 3 minutos, voltando para a caixa moradia em seguida. A sessão T2 ocorreu em três períodos de tempo após T1, sendo eles meia hora, 1 hora e 3 horas. Nessa sessão T2 um dos objetos foi movido a uma distância de 30 cm em relação a posição original (posição 5 de Hagen et al., 2015, sendo a posição 1 a original e a posição 5 a mudança máxima de posição). Os ratos exploraram o novo arranjo por 3 minutos. Durante as duas sessões a orientação dos objetos foi a mesma e eles foram limpos com etanol 70% para que não houvesse pistas olfatórias. O tempo de exploração dos objetos – determinado pela direção do nariz do animal a uma distância máxima de 2 cm do objeto ou quando o animal tocar o objeto com o nariz – foi quantificado manualmente com um cronometro.

### 4.3 APARATO E OBJETOS

Foi utilizado um Campo Aberto redondo medindo 1 metro de diâmetro e 43 cm de altura das paredes laterais, de madeira branca com marcações pretas no chão. Foi colocado um quadrado de papel preto (15 cm x 15 cm) na parede frontal da arena para ajudar na localização espacial dos animais. Os objetos utilizados foram dois cilindros idênticos de aço inox, de 12 cm de altura e 10 cm de diâmetro, com ambas as extremidades fechadas. Um esquema do aparato, objetos e posições utilizados pode ser observado na figura 1.



**Figura 1** – Representação esquemática do campo aberto e das posições do objeto em T2 (1, 2, 3, 4, 5). Os objetos ficam sempre localizados a 15cm da parede.

De acordo com Hagen et al., 2015, o teste de PS de localização de objetos fornece medidas de tempo de exploração e discriminação entre objetos. Essas medidas são dadas pelo tempo de exploração (TE) de cada objeto, sendo as medidas “a1” e “a2” para o TE de cada objeto em T1 e “a3” e “b” para o objeto estático e o que foi mudado de posição, respectivamente, em T2. A partir desses TE, são calculadas as variáveis e1, e2, d1 e d2, onde e1 e e2 são o tempo total de exploração dos objetos em T1 e T2, respectivamente; d1 e d2 são índices de exploração em T2, sendo d1 a diferença da exploração entre os objetos ( $d1=b-a3$ ) e d2 uma medida de discriminação, corrigida pela atividade de exploração ( $d2=d1/e2$ ). O índice d2 (Índice de Exploração; IE) é o índice utilizado nas análises e varia de -1

a 1, sendo esses extremos indicativos de mínima e máxima discriminação, respectivamente, e 0 indicativo de nenhuma discriminação.

Os valores de a1, a2, a3 e b foram obtidos por contagem manual do tempo de exploração dos objetos, com um cronômetro.

#### 4.4 DROGAS

Foi utilizada a seguinte droga: WIN 55,212-2 (agonista CB1/CB2; 0,25 ou 0,50 mg/kg) dissolvido em Tween 80 (5% da solução final) e posteriormente dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%; pH = 7,04).

#### 4.5 EXPERIMENTOS

Os experimentos tiveram como intuito avaliar o efeito da administração do agonista dos receptores CB1 e CB2 sobre o PS de localização de objeto.

Grupos independentes de ratos foram submetidos ao protocolo de PS da memória de localização de objetos durante o qual, imediatamente após T1, cada animal do grupo recebeu veículo ou WIN 55,212-2 na dose de 0,25 ou 0,5 mg/kg e 30 minutos, 1 h ou 3 h após foram expostos a T2.

##### 4.5.1 Experimento de Padronização do Protocolo OPS

Esse experimento inicial consistiu em um teste para padronizar o protocolo OPS no nosso laboratório e avaliar a melhor posição para realizar os experimentos de localização de objetos.

Os animais foram divididos em quatro grupos. Todos os grupos passaram pela sessão de familiarização ao ambiente (5 min) e no dia seguinte pela sessão de aquisição (T1; 3 min). Imediatamente após T1 todos os grupos receberam veículo e 30 min após, foram expostos a T2. Para o primeiro grupo (n=7) o objeto, em T2, permaneceu na posição 1. Para o segundo grupo (n=7) o objeto foi movido para a posição 3, para o terceiro grupo (n=6) foi movido para a posição 4 e para o quarto grupo (n=8), para a posição 5.

#### 4.5.2 Experimento 1

Os animais foram divididos em três grupos. Todos os grupos passaram pela sessão de familiarização ao ambiente (5 min) e no dia seguinte pela sessão de aquisição (T1; 3min). Imediatamente após T1, o primeiro grupo recebeu veículo, o segundo grupo recebeu uma dose de 0,25 mg/kg de WIN 55,212-2 e o terceiro grupo recebeu uma dose de 0,5 mg/kg do mesmo composto (n=8 animais/grupo). 30 minutos após, foram expostos a T2.

#### 4.5.3 Experimento 2

Os animais foram divididos em três grupos. Todos os grupos passaram pela sessão de familiarização ao ambiente (5min) e no dia seguinte pela sessão de aquisição (T1; 3min). Imediatamente após T1, o primeiro grupo recebeu veículo, o segundo grupo recebeu uma dose de 0,25 mg/kg de WIN 55,212-2 e o terceiro grupo recebeu uma dose de 0,5 mg/kg do mesmo composto (n=6-10 animais/grupo). 1 hora após, foram expostos a T2.

#### 4.5.4 Experimento 3

Os animais foram divididos em três grupos. Todos os grupos passaram pela sessão de familiarização ao ambiente (5min) e no dia seguinte pela sessão de aquisição (T1; 3min). Imediatamente após T1, o primeiro grupo recebeu veículo, o segundo grupo recebeu uma dose de 0,25 mg/kg de WIN 55,212-2 e o terceiro grupo recebeu uma dose de 0,5 mg/kg do mesmo composto (n=4-7 animais/grupo). 3 horas após, foram expostos a T2.

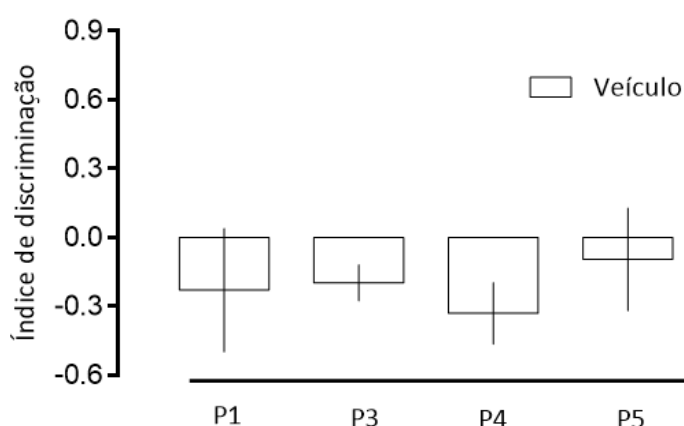
### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os diferentes intervalos de tempo e doses foram comparados usando ANOVA de uma via, quando o teste de ANOVA foi significativo, o *posthoc* de Newman-Keuls foi aplicado. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0.05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXPERIMENTO DE PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO OPS

A ANOVA de uma via mostrou que após 30 minutos não houve uma diferença entre a discriminação de T2 nas posições 1, 3, 4 e 5 [Fig. 2;  $F(3,24)=0,24$ ;  $P=0,87$ ]. Entretanto, escolhemos a posição 5 para a continuidade aos experimentos, devido a maior tendência de discriminação nessa posição.



**Figura 2** – O gráfico representa, em barras, a média  $\pm$  E.P.M de cada índice de discriminação nas diferentes localizações do objeto, 30 min após T1. P1, P3, P4 e P5 correspondem às posições 1, 3, 4 e 5, respectivamente.

### 5.2 EXPERIMENTO 1

A ANOVA de 1 via mostrou um efeito significativo do tratamento com WIN quando os animais foram expostos a T2 após 30 minutos [Fig. 3;  $F(2,24) = 4,23$ ;  $P=0,03$ ]. O teste de *posthoc* de Newman-Keuls mostrou que a menor dose de WIN (0,25 mg/kg) aumentou o ID, sugerindo uma melhora no PS.

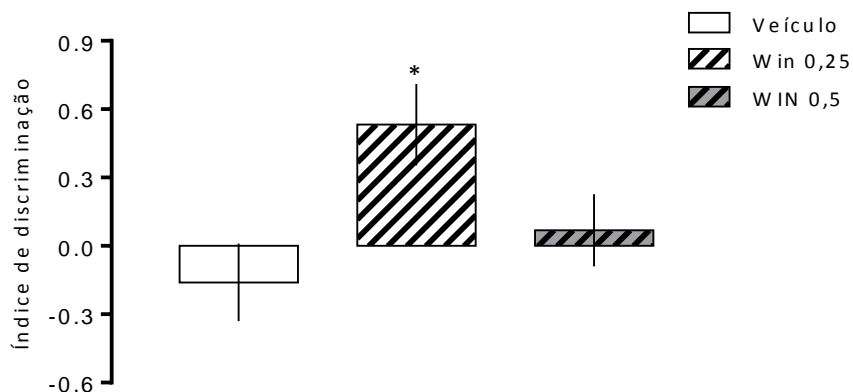


Figura 3 – O tratamento com WIN 55,212-2 na dose de 0,25 mg/kg melhora o ID quando testado 30 minutos após T1. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  em comparação ao grupo veículo.

### 5.3 EXPERIMENTO 2

A ANOVA de uma via mostrou que 1 hora após T1 não houve diferença estatística entre os grupos experimentais [Fig. 4;  $F(2,26) = 0,81$ ;  $P = 0,47$ ].

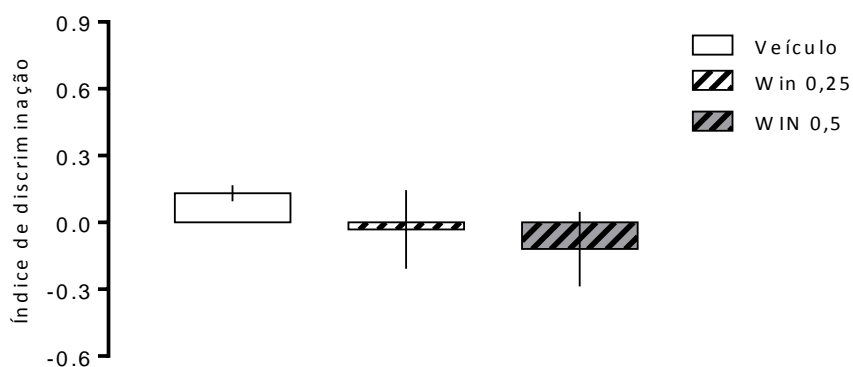


Figura 4 – O tratamento com WIN imediatamente após T1 não afeta a discriminação da localização do objeto após 1 hora. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M.

### 5.4 EXPERIMENTO 3

A ANOVA de uma via mostrou que 3 horas após T1 não houve diferença estatística entre os grupos experimentais [Fig. 5;  $F(2,16) = 2,90$ ;  $P = 0,08$ ]. Entretanto, houve uma tendência ( $P = 0,08$ ) de que a maior dose de WIN reduza o ID, sugerindo uma piora no PS nessa dose e nesse tempo.

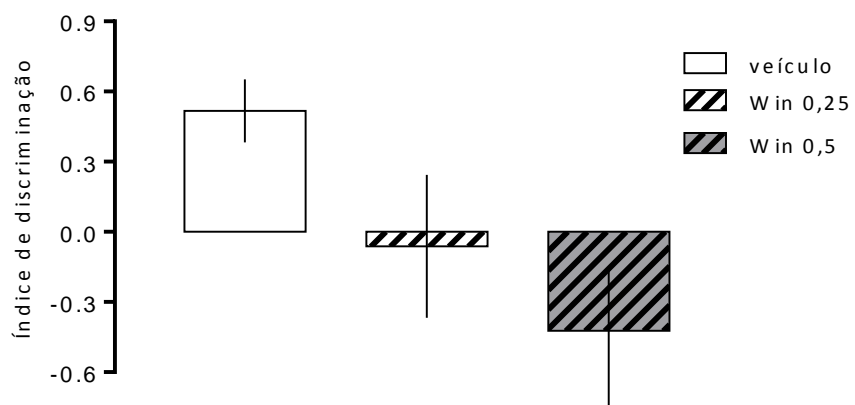


Figura 5 – O tratamento com WIN imediatamente após T1 não afeta a discriminação da localização do objeto após 3 horas. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M.

## 6 DISCUSSÃO

A padronização do protocolo de OPS foi baseada no protocolo proposto por Hagen et al. (2015). Algumas modificações ocorreram no momento da padronização do protocolo no laboratório – como por exemplo a localização do objeto em T2: enquanto o autor utilizou P3, na nossa padronização não houve diferença no ID entre as posições no tempo de 30 min após T1 (Fig. 2), então foi utilizada a posição 5 que apresentou maior tendência ao resultado esperado, e onde, segundo o protocolo seguido como base, os animais ainda utilizam o PS para completar a tarefa e não outras funções de memória. Em P5, apesar de não haver discriminação pelos animais controle (veículo) no tempo de 30 min (Fig. 3), essa discriminação pode ser observada nos grupos de 1 h e 3 h (Fig.4 e Fig.5, respectivamente). As diferenças encontradas no nosso trabalho em relação a Hagen et al. (2015) podem ter ocorrido devido às diferenças de linhagem dos animais utilizados, embora ambos os trabalhos tenham sido feitos em ratos machos. Curiosamente, nas nossas condições, após 1 ou 3 horas, o ID aumenta nos animais controle em relação ao tempo de 30 minutos, o contrário do que foi visto por Hagen et al. (2015).

Os animais tratados com a menor dose de WIN 55,212-2 (0,25 mg/kg) imediatamente após T1, quando testados 30 min após, em T2, apresentaram um aumento significativo no ID, sugerindo que a ativação CB1/CB2 imediatamente após a aquisição da tarefa melhora o PS. Quando testados 1 h e 3 h após T1, os ratos que receberam a dose de 0,25 mg/kg do agonista CB1/CB2 não tiveram um maior ID, o que indica que a ativação desses receptores melhora o PS 30 min após a aquisição, mas não 1 h ou 3 h após, sugerindo uma participação desse sistema no controle do PS apenas nos momentos iniciais.

No entanto, os animais tratados com a maior dose de WIN (0,5 mg/kg) imediatamente após T1 apresentaram uma tendência de piora do ID 3 horas depois, sugerindo uma redução no PS. Esse resultado pode ter ocorrido devido ao fato de que o WIN 55,212-2 funciona produzindo uma curva em “U” dependendo da dose (Renard et al., 2017). De fato, estudos demonstraram que uma dose baixa dessa droga (0.01  $\mu$ M) é capaz de ativar receptores CB1 e exercer atividade neuroprotetora, enquanto em doses altas (10  $\mu$ M), ativa receptores TRPA1 que interferem com esse efeito (Koch et al., 2011); e que doses baixas de WIN (50 ng; intra-PLC) aumentam significativamente o disparo espontâneo de neurônios

dopaminérgicos da área tegmentar ventral, enquanto doses altas (500 ng; intra-PLC) inibem esses disparos (Draycott et al., 2014), o que reforça a afirmação de que essa droga apresenta efeitos antagônicos, de maneira dose-dependente. Ainda, um estudo demonstrou que o WIN na dose de 1 mg/kg é capaz de afetar negativamente a memória de reconhecimento de objetos, enquanto em doses maiores (3 e 5 mg/kg) é capaz de diminuir a atividade exploratória (Baek et al., 2009). Sugere-se também que o mecanismo de extinção de memórias de medo depende do PS (Benevento et al., 2017). Curiosamente, baixas doses de WIN, inclusive a mesma utilizada nesse trabalho (0,25 mg/kg), melhoram o processo de extinção (Pamplona et al., 2006), enquanto que doses mais altas não interferem nesse processo (Chhatwal et al., 2005), no entanto, permanece por ser investigado se essa melhora da extinção depende de uma melhora no PS. Considerando que endocanabinóides são liberados sob demanda após um estímulo, é possível inferir que o WIN, principalmente em doses mais altas, pode agir mesmo em receptores de sinapses não ativas, o que levaria à ausência ou perda de efeito. Por isso, é necessário que em experimentos futuros, também seja avaliado o efeito de antagonistas dos receptores CB1/CB2 no PS.

O PS é uma função hipocampal atribuída principalmente ao giro denteado e ao córtex entorrinal. Há estudos que evidenciam a ocorrência do PS no GD e na região CA3 de roedores através de registros eletrofisiológicos e *immediate-early gene imaging*, e em humanos através de fMRI (Yassa et al., 2011).

Foi demonstrado, também, que o PS depende da neurogênese hipocampal, uma vez que camundongos que sofreram ablação da neurogênese hipocampal apresentaram déficits ao completar tarefas de reconhecimento espacial tanto em um labirinto radial como numa tarefa no aparato *touch screen*, quando essas tarefas eram relacionadas ao PS (Clelland et al., 2009). Ainda, um aumento na neurogênese hipocampal de camundongos levou a uma melhora no PS (Sahay et al., 2011).

Em humanos, sugere-se que o PS esteja comprometido em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (Hanson & Madison, 2010; Ally et al. 2013) e em doenças psiquiátricas como a esquizofrenia, a ansiedade generalizada e o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT; Besnard & Sahay, 2016; Lopresto et al., 2016). A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por progressiva perda de memória e da capacidade cognitiva. Estudos demonstram, também, que há uma diminuição da

neurogênese no GD do hipocampo em pacientes com DA (Crews et al., 2010) – processo que é indispensável para o PS (Clelland et al., 2009; Sahay et al., 2011). Além disso, a diminuição do PS é um sintoma normal do envelhecimento, sendo observado em diversos estudos com idosos saudáveis (Holden et al., 2013; Cès et al., 2018; Reagh et al., 2018; Dillon et al., 2017). Curiosamente, em indivíduos idosos ou mesmo com DA, o uso de canabidiol e/ou  $\Delta^9$ -THC, dois fitocannabinóides que dependendo da dose aumentam a neurogênese, melhora os sintomas cognitivos dos pacientes. Assim, de maneira especulativa, pode ser que ao aumentar a neurogênese, essas substâncias melhoram o PS, no entanto, futuros experimentos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

A realização desse trabalho foi incentivada pelo fato de que uma pesquisa do nosso grupo demonstrou que a ativação dos receptores canabinóides CB1 e CB2 melhoraram o PS de uma memória de medo condicionada (Stern et al., 2017) de modo que nossa hipótese foi a de que a ativação desses receptores, ou seja, a modulação pelo sistema endocanabinóide – além dos mecanismos já descritos de ativação do GD/CA3 e neurogênese – seria capaz de melhorar o PS de uma memória neutra. De maneira preliminar, nossos resultados confirmam a nossa hipótese, sugerindo que o sistema endocanabinóide pode ser um importante alvo para o controle do PS.

## 7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados desse trabalho, confirma-se a hipótese de que o sistema endocanabinóide participa do processo de PS, modulando seu funcionamento.

Experimentos adicionais serão necessários para verificar qual o mecanismo de ação através do qual o sistema endocanabinóide modula o PS e o efeito de outros canabinóides – como  $\Delta^9$ -THC e CBD – no PS.

Apesar de ser um trabalho inicial, acredito que possa ser utilizado como base para diversos outros estudos relacionados ao PS, DA, TEPT ou envelhecimento.

## REFERÊNCIAS

- ALLY, B. A., HUSSEY, E. P., KO, P. C. e MOLITOR, R. J., Pattern separation and pattern completion in Alzheimer's disease: Evidence of rapid forgetting in amnesic mild cognitive impairment. **Hippocampus**, 27 de Junho de 2013, 23: 1246-1258.
- BAEK, J., ZHENG, Y., DARLINGTON, C. L., SMITH, P. F., The CB1 Receptor Agonist, WIN55,212-2, Dose-dependently Disrupts Object Recognition Memory in Adult Rats. **Neuroscience Letters**, 16 de Outubro de 2009, 464(1):71-73.
- BENEVENTO, M., OOMEN, C. A., HORNER, A. E., AMIRI, H., JACOBS, T., PAUWELS, C., FREGA, M., KLEEFSTRA, T., KOPANITSA, M. V., GRANT, S. G., BUSSEY, T. J., SAKSIDA, L. M., VAN der ZEE, C. E. E. M., van BOKHOVEN, H., GLENNON, J. C., KASRI, N. N., Haploinsufficiency of EHMT1 Improves Pattern Separation and Increases Hippocampal Cell Proliferation. **Scientific Reports**, 2017, 7:40284.
- BESNARD, A., SAHAY, A., Adult Hippocampal Neurogenesis, Fear Generalization, and Stress. **Neuropsychopharmacology**, 2016, 41: 24-44.
- CÈS, A., BURG, T., HERBEAUX, K., HÉRAUD, C., BOTT, J. B., MENSAH-NYAGAN, A. G., MATHIS, C., Age-related Vulnerability of Pattern Separation in C57BL/6J Mice. **Neurobiology of Aging**, Fevereiro de 2018, 62:120-129
- CHHATWAL JP, DAVIS M, MAGUSCHAK KA, RESSLER KJ. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**. Março de 2005, 30(3):516-524.
- CLELLAND, C.D., CHOI, M., ROMBERG, C., CLEMENSON, G.D. Jr., FRAGNIERE, A., TYERS, P., JESSBERGER, S., SAKSIDA, L.M., BARKER, R.A., GAGE, F.H., BUSSEY, T.J., A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. **Science**, 10 de Julho de 2009, 325(5937):210-3.
- CREWS, L., ADAME, A., PATRICK, C., DELANEY, A., PHAM, E., ROCKENSTEIN, E., HANSEN, L., MASLIAH, E., Increased BMP6 Levels in the Brains of Alzheimer's Disease Patients and APP Transgenic Mice are Accompanied by Impaired Neurogenesis. **Journal of Neuroscience**, 15 de Setembro de 2010, 30(37):12252-12262.
- DILLON, S. E., TSIVOS, D., KNIGHT, M., MCCANN, B., PENNINGTON, C., SHIEL, A. I., CONWAY, M. E., NEWSON, M. A., KAUPPINEN, R. A., COULTHARD, E. J., The Impact of Ageing Reveals Distinct Roles for Human Dentate Gyrus and CA3 in Pattern Separation and Object Recognition Memory. **Scientific Reports**, 2017, 7:14069.
- DRAYCOTT, B., LOUREIRO, M., AHMAD, T., TAN, H., ZUNDER, J., LAVIOLETTE, S., Cannabinoid Transmission in the Prefrontal Cortex Bi-Phasically Controls Emotional Memory Formation via Functional Interactions with the Ventral Tegmental Area. **Journal of Neuroscience**, 24 de Setembro de 2014, 34(39):13096-13109.

ENNACEUR, A., DELACOUR, J., A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data, **Behavioural Brain Research**, 1988, 31(1):47-59.

ENNACEUR, A., NEAVE, N., 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. **Experimental Brain Research**, Março de 1997, 113(3):509-519.

GIUFFRIDA, A., BELTRAMO, M., PIOMELLI, D., Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Julho de 2001, 298(1):7-14.

HANSON, J. E., MADISON, D. V., Imbalanced Pattern Completion vs. Separation in Cognitive Disease: Network Simulations of Synaptic Pathologies Predict a Personalized Therapeutic Strategy. **BMC Neuroscience**, 13 de Agosto de 2010, 11:96.

HOLDEN, H. M., TONER, C., PIROGOVSKY, E., KIRWAN, C. B., GILBERT, P. E., Visual Object Pattern Separation Varies in Older Adults. **Learning & Memory**, 2013, 20:358-362.

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., PERTWEE, R. G., International Union of Pharmacology, XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. **Pharmacological Reviews**, 1 de Junho de 2002, 54 (2).

KOCH, M., KREUTZ, S., BÖTTGER, C., GRABIEC, U., GHADBAN, C., KORF, H., DEHGhani, F., The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB<sub>1</sub> receptors and modulated by TRPA1 and Ca<sub>v</sub>2.2 channels. **Hippocampus**, 2011, 21: 554-564.

LOPRESTO, D., SCHIPPER, P., HOMBERG, J. R., Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 31 de Janeiro de 2016, 60:31-42.

MCKINNEY, M.K., CRAVATT, B.F., Structure and function of fatty acid amide hydrolase. **Annual Review of Biochemistry**, 2005, 74:411-32.

MUNRO, S., THOMAS, K.L., ABU-SHAAR, M., Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, 2 de Setembro de 1993, 365(6441):61-65.

ONAIWI, E.S., ISHIQURO, H., GONG, J.P., PATEL, S., PERCHUK, A., MEOZZI, P.A., MYERS, L., MORA, Z., TAGLIAFERRO, P., GARDNER, E., BRUSCO, A., AKINSHOLA, B.E., LIU, Q.R., HOPE, B., IWASAKI, S., ARINAMI, T., TEASENFITZ, L., UHL, G.R., Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid

CB2 receptors in the brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Agosto de 2006, 1074:514-536.

PAMPLONA, F. A., PREDIGER, R. D., PANDOLFO, P., TAKAHASHI, R. N., The Cannabinoid Receptor Agonist WIN 55,212-2 Facilitates the Extinction of Contextual Fear Memory and Spatial Memory in Rats. **Psychopharmacology**, Novembro de 2006, 188(4):641-649.

REAGH, Z. M., NOCHE, J. A., TUSTISON, N. J., DELISLE, D., MURRAY, E. A., YASSA, M. A., Functional Imbalance of Anterolateral Entorhinal Cortex and Hippocampal Dentate/CA3 Underlies Age-Related Object Pattern Separation Deficits. **Neuron**, 7 de Março de 2018, 97:1187-1198.

RENARD, J., ROSEN, L., RUSHLOW, W. J., LAVIOLETTE, S. R., Role of the Prefrontal Cortex in Addictive Disorders. In: (Ed.) CECHETTO, D. F., WEISHAUP, N., *The Cerebral Cortex in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders*, **Academic Press**, 2017, p: 289-309.

SAHAY, A., SCOBIE, K.N., HILL, A.S., O'CARROLL, C.M., KHEIRBEK, M.A., BURGHARDT, N.S., FENTON, A.A., DRANOVSKY, A., HEN, R., Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, 28 de Abril de 2011, 472(7344):466-470.

SAHAY, A., WILSON, D.A., HEN, R., Patter Separation: A Common Function for New Neurons in Hippocampus and Olfactory Bulb. **Neuron**, 26 de Maio de 2011, 70(4):582-588.

STERN, C. A. J., da SILVA, T. R., RAYMUNDI, A. M., de SOUZA, C. P., HIROAKI-SATO, V. A., KATO, L., GUIMARÃES, F. S., ANDREATINI, R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J., Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors. **Neuropharmacology**, 2017, 125: 220-230.

STERN, C.A.J, de CARVALHO, C.R., BERTOGLIO, L.J., TAKAHASHI, R.N., Effects of cannabinoid drugs on aversive or rewarding drug-associated memory extinction and reconsolidation. **Neuroscience**, 17 de Julho de 2017.

TONER, C.K., PIROGOVSKY, E., KIRWAN, C.B., GILBERT, P.E., Visual object pattern separation deficits in nondemented older adults. **Learning & Memory**, 29 de Abril de 2009, 16(5):338-42.

Van HAGEN, B.T., van GOETHEM, N.P., LAGATTA, D.C., PRICKAERTS, J., The Object Pattern Separation (OPS) task: a behavioral paradigm derived from the object recognition task. **Behavioural Brain Research**, 25 de Maio de 2015, 285, 44-52.

YASSA, M. A., STARK, C. E. L., Pattern Separation in the Hippocampus. **Trends in Neurosciences**, 2011. 34(10):515-525.

