UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

PRISCILA MATTER BORGES

Influência da inibição da degradação dos endocanabinóides na potenciação a longo prazo hipocampal.

RIBEIRÃO PRETO

2019

PRISCILA MATTER BORGES

**Influência da inibição da degradação dos endocanabinóides na
potenciação a longo prazo hipocampal.**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo M. X. Leão

Ribeirão Preto-SP

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Priscila Matter

Influência da inibição da degradação dos endocanabinóides na potenciação a longo prazo hipocampal.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Leão, Ricardo M. X.

1. Endocanabinoide 2. Potenciação de Longo Prazo 3. CB1 4. TRPV1 5. Inibidores farmacológicos 6. Hipocampo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Borges, Priscila Matter **Influência da inibição da degradação dos endocanabinóides na potenciação a longo prazo hipocampal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Departamento de Fisiologia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

A todos que acreditam na ciência do nosso país.

A todos os pesquisadores sérios, que dedicam suas vidas a pesquisa e

que dedicam mais tempo ainda para repassar adiante o bem

mais precioso que alguém pode adquirir: o conhecimento.

Agradecimentos

- *A Deus*
- *Aos meus pais Elisângela e Gerson pelos sacrifícios que fizeram, por abdicarem parte de suas vidas para que eu pudesse realizar muitos sonhos e por me orientarem na boa educação.*
- *Aos meus Avós Jandira Cavalheiro, Erico Matter e Dulci Isabela Borges, por fazerem parte da minha educação na infância e por todo amor e carinho que a mim dedicaram.*
- *A minha irmã Júlia, que amo e é como um raio de sol, que me dá a oportunidade de viver o amor da irmandade*
- *Ao meu estimado orientador Ricardo Leão, por ter acreditado em mim (quando nem eu mesma acreditava), por ter me dado a oportunidade de entrar no laboratório e por ter tido paciência e bondade ao me ensinar.*
- *A minha segunda família amada que foram meus amigos e parceiros de laboratório Alexandra Cunha, Júnia Lara, César, Nikollas, Paulo, Elena, Fernando, Cahue, André que eu tanto prezo e amo!! Obrigada por serem minha segunda família nesses dois anos de convivência, obrigada pelos abraços, puxões de orelha, pelas risadas, cervejadas, comilanças, conselhos, cantorias, por terem paciência em me ajudar a entender a rotina do laboratório, protocolos, lidar com os animais, com as alegrias e frustrações do dia a dia e por me ensinarem a ter sensibilidade e inteligência no agir e pensar, nesse mundo que chama pós-graduação.*
- *Aos meus amados e queridos amigos que foram extremamente importantes nessa jornada e que eu jamais esquecerei pois tenho boas memórias com cada um de vocês: Natany, Isabelle, Gabriela, Eduardo, Heitor, Aline, Matheus, Aldo, Barbara, Mariana, Gabriel, Juliana V., Juliana G., Thaís (Bic), Adriana Galante...*
- *Ao Prof Leonardo Resstel FMRP-USP, do departamento de Farmacologia pela colaboração na doação dos animais KO TRPV1.*
- *As Secretárias do Departamento de Fisiologia Elisa e Claudia, pelo carinho e tantas ajudas com a burocracia.*
- *A Universidade de São Paulo, pelo ensino*
- *A Capes, pelo apoio financeiro*
- *Aos animais pelo sacrifício.*

*“A glória é tanto mais tardia quanto mais duradoura há de ser, porque todo fruto delicioso
amadurece lentamente”*

Schopenhauer

Resumo

Borges, M.P. Influência da inibição da degradação dos endocanabinóides na potenciação a longo prazo hipocampal. 2019 Tese de Mestrado – Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, 2019.

Os endocanabinóides (ECs) são neuromoduladores lipídicos que são produzidos por demanda tendo ação retrógrada. Existem duas moléculas que são atualmente reconhecidas como os principais ECs, a anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG). O hipocampo sintetiza endocanabinóides e expressa seus receptores (CB1, CB2, TRPV1). Existe uma discrepância de efeitos dos 2 endocanabinóides na potenciação a longo prazo (LTP) hipocampal que pode ser um resultado da AEA agir tanto em receptores CB1 quanto em receptores TRPV1. Tendo em vista que a ativação dos receptores TRPV1 potencializam a LTP hipocampal, e não a inibem como é observado com a AEA, então qual seria o mecanismo de ação da AEA em inibir a LTP? Seria possível que a AEA estivesse preferencialmente inibindo a produção de 2-AG e assim inibindo a LTP? Para testar essa hipótese usamos inibidores farmacológicos da degradação hidrolítica do 2-AG e da AEA e também usamos antagonistas dos receptores TRPV1 e um animal knock-out para o receptor TRPV1. Camundongos machos BlackC57 e knockout(KO) para TRPV1 com idade entre 35 a 49 dias foram utilizados para obtenção de fatias do hipocampo (400µm), e a potenciação a longo prazo na via Schaffer-CA1 estudada. Não observamos efeito dos inibidores da degradação hidrolítica e oxidativa dos endocanabinóides na LTP. A LTP do camundongo *knock-out* era inibida, porém o antagonismo farmacológico dos receptores TRPV1 não minetizou esse efeito. Já o agonista dos receptores canabinóides WIN55212-2 inibiu a indução da LTP. Concluimos que o aumento dos endocanabinóides pela inibição da sua degradação não foi eficiente em alterar a LTP hipocampal em nosso modelo experimental.

Aprovação do CONCEA-FMRP- nº008/2017.

Palavras chave: hipocampo; LTP; endocanabinóides; TRPV1; neurotransmissão; JZL 184.

Abstract

Borges, M.P. Influence of inhibition of endocannabinoid degradation on long-term hippocampal potentiation. Master's thesis - School of Medicine, Ribeirão Preto, 2019.

1670/5000

Endocannabinoids (ECs) are lipid neuromodulators that are produced on demand having retrograde action. There are two molecules that are currently recognized as the major ECs, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). The hippocampus synthesizes endocannabinoids and expresses their receptors (CB1, CB2, TRPV1). There is a discrepancy of endocannabinoid effects on hippocampal long term potentiation (LTP) which may be a result of AEA acting on both CB1 and TRPV1 receptors. Given that the activation of TRPV1 receptors potentiate hippocampal LTP, and do not inhibit it as observed with AEA, then what would be the mechanism of action of AEA in inhibiting LTP? Was it possible that AEA was preferentially inhibiting 2-AG production and thus inhibiting LTP? To test this hypothesis, we used pharmacological inhibitors of the hydrolytic degradation of 2-AG and AEA and also used TRPV1 receptor antagonists and a knock-out animal for the TRPV1 receptor. Male BlackC57 mice and TRPV1 knockout (KO) aged 35 to 49 days were used to obtain hippocampal slices (400 μ m), and the long-term potentiation in the Schaffer-CA1 pathway studied). The LTP of the knock-out mouse was inhibited, but the pharmacological antagonism of TRPV1 receptors did not mimic this effect, whereas the WIN55212-2 cannabinoid receptor agonist inhibited the induction of LTP. We conclude that increasing the levels of endocannabinoids by inhibiting their degradation was not efficient in altering hippocampal LTP in our experimental model.

Approval of CONCEA-FMRP- nº 008/2017.

Key words: hippocampus; LTP; endocannabinoids; neurotransmission; TRPV1; JZL 184.

Lista de Figuras

Figura 1 – Sinalização endocanabinóide na sinapse	Erro! Indicador não definido.
Figura 2 - Mecanismo de formação de anandamida .	6
6Figura 3 - Fatia coronária através do eixo transversal do hipocampo	8
Figura 4 - Mecanismos subjacentes à LTP	11
Figura 5 - A liberação de glutamato de neurônios pré-sinápticos	12
Figura 6 – Sequencia do protocolo para obter as fatias do hipocampo.	17
Figura 7-Aparelhos.	18
Figura 8 Aparelhos	19
Figura 9 - Esquema simplificado do protocolo Theta Burst	20
Figura 10 - Indução da LTP na região CA1 do hipocampo de camundongos	23
Figura 11 - O veículo de diluição da droga interfere na neurotransmissão?	24
Figura 12. O efeito do JZL184 sobre a potenciação das sinapses Schaffer-piramidais CA1.	26
Figura 13 Efeito da inibição da degradação de FAAH sobre a plasticidade sináptica Schaffer-CA1	28
Figura 14 Efeitos da inibição da COX2 sobre a plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1.	29
Figura 15 Efeitos da ativação dos receptores CB1 sobre a plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1.	31
Figura 16 Efeitos da ativação dos receptores CB1 sobre a plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1.	34
Figura 17 Efeitos da ativação de receptores TRPV sobre a plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1	36
Figura 18 Plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1 em fatias de animais knockout para receptores TRPV1	38
Figura 19 A droga AMG9810 mimetiza o resultado dos camundongos KO?	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG: 2-araquidonoil glicerol

AA- Ácido Aracdônico

AEA: Anandamida

CB1: Receptor de canabinoide 1

CB2: Receptor de canabinoide 2

CDB: Canabidiol

COX-2: Ciclooxygenase 2

DAGL: Diacilglicerol Lipase

eCBs: Endocanabinoides

FAA: Amida-hdrolase de acido graxo

LTD – Long term depression (depressão de longo prazo)

LTP – Long term potentiation (potencial de longo prazo)

MAGL – Monoacil glicerol lipase

PG EA- Prostaglandina etanolamina

PG Gs – Prostaglandina gliceril éster

PG- Prostagrالدinas

PSES potenciais sinápticos extracelulares

TRPV1: receptor vanilóide de potencial transitório do tipo 1

SUMÁRIO

1-Introdução	1
1.2 Histórico	1
1.3 Endocanabinoides – eCBs	2
1.4 Sistema Endocanabinoide	4
1.5 Síntese e degradação	5
1.6 Hipocampo	7
1.7 Plasticidade Sináptica	9
1.8 LTP	9
1.9 LTP dependente de NMDA	10
1.10 LTP e eCBs	12
2- Objetivos	14
3- Hipótese	15
4- Materiais e Métodos	16
4.1. Animais	16
4.2 Obtenção das fatias de hipocampo	16
4.3. Eletrofisiologia	17
4.4 Registros extracelulares para estudo de fenômenos de plasticidade sináptica	18
4.5. Protocolos experimentais	20
4.6 Análise dos dados	22
4.7 Análise Estatística	22
5- Resultados	23
5.1 Protocolo de indução de LTP e análise do veículo para diluição de drogas	23
5.2) O inibidor da enzima monoacilglicerol lipase, JZL184, interfere na indução da Early-LTP?	25
5.3) O URB597 interfere na indução da Early-LTP? Ou A inibição da FAAH interfere na indução da Early-LTP?	27
5.4) A inibição da Ciclooxigenase 2 (COX2) interfere na indução da Early-LTP?	29
5.5) O agonismo do CB1 interfere na indução da Early-LTP?	31
5.6) Antagonista de receptor CB1 interfere na indução da Early-LTP?	33

5.7) A ativação dos receptores TRPV1 interfere na indução da Early-LTP?	35
5.8) <i>A ausência dos canais TRPV1 interfere na indução da Early-LTP?</i>	37
5.9) Mimetizar o KO TRPV1 com a droga AMG9810 , terá o mesmo efeito que o KO para TRPV1?	39
6- Discussão	42
7- Referências	47

1-Introdução

1.1 Histórico

O estudo dos endocanabinoides (eCBs) provém da década de 90, ou seja, faz aproximadamente 28 anos que se estuda o sistema endocanabinoide. Primeiro foi descoberto e clonado o receptor CB1 (1990), posteriormente foi descoberto o mensageiro lipídico Anandamida (1992), em seguida foi estudado e clonado o receptor CB2 (1993), e em 1995 foi feita a descoberta de outro mensageiro lipídico o 2-AG.

A identificação do canabidiol (CBD), e do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), nos anos de 1960 (GAONI, Y. MECHOULAM, R. 1964; R. MECHOULAM, SHVO, Y. 1963) foram grandes avanços, uma vez que esses dois compostos, sendo os dois mais abundantes metabólitos secundários da Cannabis, provavelmente explicariam a maioria de suas ações farmacológicas (PERTWEE, 2015).

Os primeiros sítios de ligação específica para um análogo sintético radiomarcado e enantiomericamente puro do THC foram identificados no cérebro apenas em 1988 (DEVANE, et al, 1988), e essa grande conquista abriu o caminho para a identificação do primeiro receptor específico de THC, denominado CB1 (MATSUDA, L. A. et al. 1990). O segundo receptor canabinóide, denominado CB2, foi então identificado por clonagem de homologia e, interessantemente, acabou por ser bastante diferente do CB1 na sua sequência de aminoácidos (MUNRO, S. K. L. THOMAS, ABU-SHAAR, M 1993). Embora o CB1 fosse extremamente abundante no cérebro, e fosse imediatamente sugerido que ele fosse responsável pela psicoatividade do THC, o CB2 era mais abundante nas células do sistema imune (PERTWEE, 2015).

O primeiro desses compostos a ser descoberto foi anandamida (arachidonoil etanolamida, da palavra sânscrita ananda para 'bem-aventurança') (DEVANE, W. A. et al. 1992), e esse achado foi logo seguido pela identificação das propriedades canabiniméticas de um metabólito endógeno já conhecido, o 2-araquidonoilglicerol. (2-AG). (R. MECHOULAM, R. et al. 1995; SUGIURA T. et al., 1995)

Embora outros eCBs quimicamente similares tenham sido identificados nos últimos 10 anos, incluindo, em ordem cronológica, 2-araquidonilgliceril-éter (HANUS, L. et al. 2001) , N -araquidonoil dopamina (NADA) (BISOGNO, T. et al. 2000; HUANG, S. M. et al. 2002) e virodamina (PORTER, A. C. et al., 2002), anandamida e 2-AG permaneceram os únicos cuja atividade farmacológica e metabolismo foram mais bem investigados. Portanto, esses dois compostos ainda são referidos como os "principais" eCBs.

1.2 Endocanabinoides – eCBs

Endocanabinoides são neuromoduladores e que possuem algumas características bem estabelecidas até o presente momento, como:

são mensageiros lipídicos;

tem ação retrógrada;

são produzidos por demanda por precursores na membrana plasmática;

não são armazenados em vesículas;

possuem três tipos de receptores (CB1, CB2 e TRPV1);

Os eCBs são importantes nas modulações e funções sinápticas, acredita-se que, modulando a força sináptica, os endocanabinoides podem regular uma ampla gama de funções neurais, incluindo cognição, controle motor, comportamentos alimentares e dor. Além disso, a desregulação do sistema eCBs pode estar implicada em condições neuropsiquiátricas, como depressão e ansiedade (MECHOULAM and PARKER, 2013). Esses mensageiros lipídicos podem regular várias funções neurais e comportamentais quando ativam seus receptores, encontrados no sistema nervoso central (CASTILLO, et al., 2012).

Os eCBs são produzidos em resposta a entrada de cálcio no neurônio pós-sináptico, essa entrada de cálcio ocorre devido a despolarização neuronal (HASHIMOTODANI

et al., 2007). Sua produção e armazenamento se diferem da produção de outros neurotransmissores, pois eCBs não são armazenados em vesículas e sim sintetizados por demanda (CASTILHO et al., 2012). Sua sinalização retrógrada, que consiste em um neurotransmissor sintetizado pelo neurônio pós-sináptico, age em receptores pré-sinápticos, como se fosse o processo de “trás para frente” (retrógrado) da sinapse clássica. Esse é o meio pelo qual medeiam formas curtas e longas de plasticidade sináptica, podendo ser tanto sinapses excitatórias como inibitórias. No entanto há evidências que sugerem que eCBs também podem sinalizar de maneira não retrógrada (CASTILLO, et al., 2012).

A N- araquidonoiletanolamida (anandamida) é o primeiro endocanabinóide identificado e melhor estudado (DEVANE et al., 1992). Ele se liga aos receptores CB1 e CB2 (GLASS E NORTHUP, 1999), mas sua afinidade pelo receptor CB2 é aproximadamente quatro vezes menor do que para os receptores CB1 (FELDER et al., 1995). Os níveis mais altos de anandamida foram encontrados em áreas do cérebro com altas densidades de CBs, como hipocampo, estriado, cerebelo e córtex (EGERTOVA, ELPHICK, 2000). A anandamida é sintetizada pelos neurônios pós-sinápticos e atua como uma molécula mensageira retrógrada para modular a liberação de neurotransmissores a partir de terminais pré-sinápticos que expressam CB1 (EGERTOVA, ELPHICK, 2000).

Além dos CBs, a anandamida também ativa o receptor vanilóide de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1), comportando-se como um agonista completo, mas com afinidade de ligação relativamente baixa (ZYGMENT et al., 1999). A co-expressão celular dos receptores CB1 e do TRPV1 pode resultar no aumento dos efeitos biológicos induzidos pelos agonistas desses receptores (CRISTINO et al., 2006). No entanto, um estudo recente com camundongos knockout para a enzima degradadora da anandamida, a ácido graxos amina hidrolase (FAAH) e dos receptores CB1, indica que o receptor CB1 é o alvo predominante que medeia os efeitos comportamentais da anandamida (WISE et al., 2007).

2-AG foi o segundo endocanabinóide identificado (MECHOULAM et al., 1995; SUGIURA et al., 1995). O 2-AG pode ser o ligante natural para os receptores CB1 e CB2 (SUGIURA E WAKU, 2000). Embora exiba uma menor afinidade para CB1 do que anandamida, está presente no cérebro em níveis mais elevados do que a

anandamida. Portanto, o 2-AG é considerado o canabinóide endógeno primário no cérebro como um agonista completo nos receptores CB1 (PERTWEE., 2015).

1.3 Sistema Endocanabinoide

O sistema endocanabinóide compreende em:

Dois receptores acopladas a proteínas G, podendo ser do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2);

Ligantes eCBs, AEA e 2-AG;

Enzimas que sintetizam e degradam os eCBs.

Uma das funções dos ECs é inibir a liberação de neurotransmissores via inibição de canais de cálcio pré-sinápticos. Essa ação ocorre devido à ativação de receptores CB1 (KUSHMERICK et al., 2004; HASHIMOTODANI et al., 2007). O receptor CB1 é considerado um dos mais abundantes receptores acoplados a proteína G em cérebros de mamíferos, estando presente no neocórtex, hipocampo, gânglio basal, cerebelo e tronco cerebral (HU e MACKIE, 2015). A ativação do receptor CB1 suprime a liberação de neurotransmissores (Figura 1A). No entanto, também há evidências que sugerem que os eCBs podem modular a função neural e a transmissão sináptica, envolvendo o receptor vanilóide TRPV1 e também receptores CB1 localizados dentro da célula pós-sináptica (Figura 1B). Finalmente, estudos recentes indicam que os eCBs podem sinalizar via astrócitos e modular indiretamente a função pré-sináptica ou pós-sináptica (Figura 1 C).

Figura 1 – Sinalização endocanabinóide na sinapse (A) Sinalização endocanabinóide retrógrada (eCB). Os eCBs são mobilizados a partir de neurônios pós-sinápticos e receptores pré-sinápticos de canabinóides tipo 1 (CB₁Rs) para suprimir a liberação do neurotransmissor. (B) sinalização negativa de eCB. Os eCB produzidos em neurônios pós-sinápticos ativam os canais CB₁Rs pós-sinápticos ou os canais vanilloid tipo 1 (TRPV1) dos receptores transitórios. (C) Sinalização de neurônios e astrocitos eCB. Os eCBs liberados a partir de neurônios pós-sinápticos estimulam as CB₁R astrocíticas, desencadeando a transmissão de gliotransmissão. Glu, glutamato. (Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function | <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>)

1.4 Síntese e degradação

Existem duas moléculas que são atualmente reconhecidos como os principais eCBs, a anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Dentre eles, o 2-AG responde pela maioria dos efeitos centrais dos endocanabinóides (HASHIMOTODANI et al., 2007). O 2-AG é produzido a partir do diacilglicerol que contém ácido araquidônico (AA) pela enzima diacilglicerol lipase (DAGL) e hidrolisado principalmente pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) presente nos terminais pré-sinápticos (SAVINAINEN et al., 2012). A inibição da degradação de endocanabinóides por inibidores da 2-AG in vitro potencia a ação do 2-AG sobre a neurotransmissão (PAN et al., 2009; MARTIN et al., 2015). Por outro lado a aplicação crônica in vivo de inibidores da 2-AG ou a deleção genética dessa enzima aumenta os níveis de 2-AG no cérebro o que potencia

as ações do 2-AG, mas também pode levar a dessensibilização dos receptores CB1 (SCHLOSBERG et al., 2010; LIU et al., 2016)

Já a anandamida (AEA) é sintetizada pela catálise da fosfatidiletanolamina pela enzima N-aciltransferase, formando o N-araquidonoil-PE, que por sua vez é catalisado pela fosfolipase D, gerando a AEA (HASHIMOTODANI et al, 2007). Sua degradação ocorre pela ação da enzima amida-hidrolase de ácido graxo (FAAH) expressa no soma e dendritos dos neurônios (HASHIMOTODANI et al, 2007). A AEA além de atuar nos receptores canabinóides clássicos (CB1, central e CB2, majoritariamente periférico) também é um agonista dos receptores vanilóides (TRPV1) (DI MARZO e PETROCELLI, 2012). Esse receptor originalmente encontrado periféricamente e envolvido com a detecção de calor, também é presente no sistema nervoso central.

Figura 2 - Mecanismo de formação de anandamida Neurônios. Considera-se que a sequência de reações inclui: primeiro a síntese do precursor de anandamida N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (PE), catalisado pela enzima N-aciltransferase; Em segundo lugar, a clivagem de N-araquidonoil-PE para produzir anandamida, catalisada pela fosfolipase D. (*Nature Reviews Neuroscience* **4**, 873-884 (November 2003) | doi:10.1038/nrn1247).

Uma outra via de degradação de eCBs é a via oxidativa (PĂUNESCU et al., 2011). Especificamente, a ciclooxygenase-2 (COX-2) uma enzima chave na oxigenação do

ácido araquidônico (AA) em prostanóides como prostaglandinas (PG), leucotrienos, tromboxanos e prostaciclina, também oxigena o 2-AG e a AEA, respectivamente em prostaglandina gliceril éster (PG-Gs) e prostaglandina etanolamina (PG-EA), consideradas novas formas de PG (KOZAC et al., 2002). A interferência com essa via com o uso de inibidores da COX-2 pode potencializar a modulação da neurotransmissão por eCBs (KIM e ALGER, 2004).

Uma terceira via degradativa são as das serina hidrolases ABHD6 and ABHD12 (d' et al., 2012). Essas enzimas estão mais presentes nas membranas das células gliais ou pós sinapticamente. Entretanto a inibição dessas enzimas não se demonstrou eficaz em aumentar a sinalização de endocanabinóides no córtex ou cerebelo (MARRS et al., 2010; ZHONG et al., 2011).

1.5 Hipocampo

O papel bem estabelecido do hipocampo nos processos cognitivos, como a formação da memória, depende, entre outras coisas, de características anatômicas notáveis. Em contraste com a conectividade recíproca da maioria das outras estruturas corticais, o hipocampo é caracterizado por uma passagem amplamente unidirecional de informações através de seus circuitos. (STEPAN et al., 2015). Nos seres humanos, o hipocampo é uma estrutura alongada enterrada no interior do lobo temporal medial. Sua semelhança a um cavalo marinho inspirou sua nomeação após esta criatura marinha (gênero *Hippocampus*). Em roedores, o hipocampo é uma estrutura relativamente grande, em forma de caju, logo abaixo do neocórtex. Um corte transversal de seu longo eixo revela a clássica descrição textual da conectividade anatômica do hipocampo, a chamada "alça trissináptica" (Fig. 3). O córtex entorrinal fornece a entrada cortical principal para o hipocampo, com suas projeções mais fortes através do caminho perfurante para a região do giro denteado (DG) (Sinapse 1). A DG projeta-se para a região CA3 através da via da fibra musgosa (Sinapse 2). O CA3 projeta-se para a região CA1 através da via de Schaffer (Sinapse 3). Finalmente, CA1 projeta de volta ao córtex entorrinal, completando o circuito. Uma adição importante aos circuitos trissinápticos clássicos é que os axônios CA3, além de suas projeções

para CA1, enviam colaterais que fazem sinapses em outros neurônios CA3. Esta via colateral recorrente inspirou várias teorias influentes de CA3 como um sistema de memória autoassociativo, exibindo dinâmicas de atratores que são críticas para suportar uma memória distribuída.

Current Biology

Figura 3 - Fatia coronal através do eixo transversal do hipocampo. As linhas pretas traçam o clássico 'circuito trissináptico'. As linhas vermelhas descrevem outras vias importantes no hipocampo, incluindo as projeções diretas do córtex entorrinal (EC) para todos os três campos de CA. (Adaptado)

1.6 Plasticidade Sináptica

A plasticidade sináptica é a capacidade de modificação na eficiência da transmissão sináptica (aumento ou diminuição da resposta pós-sináptica) pela atividade gerada por uma experiência. Esse tipo de alteração na fisiologia sináptica é que deve estar envolvida nos processos de aprendizado e memória no sistema nervoso. A existência de plasticidade no sistema nervoso significa que ele não se comporta de forma rígida, mas que se adapta de acordo com diferentes situações, o que faz sentido já que podemos aprender e memorizar informações e habilidades, então obviamente o sistema nervoso não pode ser rígido e estereotipado, mas se comportar de forma dinâmica se adaptando a diferentes demandas e necessidades.

Podemos subdividir os fenômenos de plasticidade sináptica em duas categorias:

- 1- plasticidade de curta duração
- 2 - plasticidade de longa duração

1.7 Potenciação de longa duração - LTP

Diferente da plasticidade de curta duração, a plasticidade de longa duração, gera alterações que duram horas ou até dias e pode ser estudada através de dois mecanismos: a potenciação de longa duração (ou LTP, do inglês *long term potentiation*) e a depressão de longa duração (ou LTD, do inglês *long-term depression*). A LTP é observada experimentalmente quando estímulos elétricos são aplicados em alta frequência sobre uma determinada população de neurônios. Similar à memória, a LTP pode ser gerada rapidamente e é fortalecida e prolongada por repetição. Ela também exhibe cooperatividade, associatividade e especificidade (HEIDELBERGER et al., 2014). Cooperatividade diz respeito à propriedade de que a LTP pode ser induzida pela ativação coincidente de um número crítico de sinapses, ou seja, para induzirmos LTP não basta estimular uma via, é preciso que se use um estímulo forte para que se recrute o maior número de fibras neuronais possível. Associatividade é a capacidade de potencializar uma informação neuronal fraca

(mediada por um pequeno número de sinapses) quando esta é ativada em associação temporal com uma informação neuronal forte (proveniente de um grande número de sinapses ativadas), a interpretação desse fato é que o neurônio pós-sináptico precisa estar despolarizado sincronicamente com a estimulação tetânica da via pré-sináptica para poder gerar LTP. Finalmente, especificidade indica que a LTP só pode ser induzida em sinapses ativadas e não em sinapses adjacentes inativas (segundo Hebb “Neurônios que disparam em conjunto se conectam em conjunto”).

1.8 LTP dependente de NMDA

A LTP que ocorre nas sinapses excitatórias da região CA1 do hipocampo e é a forma de plasticidade melhor estudada, servindo de modelo para vários outros tipos de LTP que ocorrem no encéfalo (HEIDELBERGER et al., 2014). Neste tipo de LTP, uma grande quantidade de glutamato é liberada na fenda sináptica após uma estimulação de alta frequência. O glutamato se liga tanto aos receptores do tipo AMPA quanto aos NMDA. Porém, esses últimos estão bloqueados pelo magnésio extracelular quando a célula se encontra no potencial de repouso. Com a ativação dos receptores AMPA e o consequente influxo de sódio, o neurônio se despolariza e o íon magnésio se dissocia do sítio de ligação do receptor NMDA permitindo a passagem de íons sódio e cálcio pelo canal (LÜSCHER e MALENKA. 2012).

A ativação de receptores NMDA e o aumento da $[Ca^{++}]$ intracelular, acima de um determinado limiar, ativam a maquinaria bioquímica responsável pela indução da LTP. Portanto, para que ocorra a indução da LTP, o receptor NMDA precisa estar ativado e a célula deve estar despolarizada. (MALINOW e TSIEN, 1990; Fig. 4)

Figura 4 - Mecanismos subjacentes à LTP.. Durante a transmissão glutamatérgica, o canal de NMDA (rosa) se abre somente após despolarização suficiente da célula. Os íons Ca^{++} que entram na célula ativam proteínas cinases que podem atuar inserindo novos receptores AMPA na espinha pós-sináptica, aumentando assim, a sensibilidade ao glutamato.

A fase tardia da LTP (definida como a potencialização após 1-2 h depois de sua indução) depende de síntese proteica no espinho dendrítico bem como de transcrição gênica no núcleo celular (LÜSCHER e MALENKA, 2012). A sinalização para essa transcrição nuclear parece depender de uma série de enzimas como proteína cinase A (PKA), cálcio-calmodulina cinase II (CaMKII) e MAP-cinase (MAPK) que ativam fatores de transcrição como CREB e genes de transcrição imediata como c-Fos . Esses complexos transcripcionais promovem a expressão de genes requeridos para a manutenção da potencialização sináptica. Outra possibilidade para a manutenção da LTP (fase tardia) é o remodelamento estrutural das sinapses potencializadas. Diversos estudos demonstram que mudanças morfológicas acompanham a LTP. Essas mudanças incluem crescimento de novos espinhos dendríticos, aumento de espinhos pré existentes e suas respectivas densidades pós-sinápticas (PSDs), e a divisão de um espinho em dois terminais pós-sinápticos funcionais. (Fig. 5)

Figura 5 - A liberação de glutamato de neurônios pré-sinápticos leva à ativação de receptores AMPA (AMPA) e à despolarização do neurônio pós-sináptico. (b) A despolarização do neurônio pós-sináptico e concomitante ativação por glutamato levam à remoção do Mg^{2+} dos receptores NDMA (NMDAR) e ao influxo de Ca^{2+} no espinho dendrítico. A despolarização também ativa canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), outra fonte de Ca^{2+} pós-sináptico. (c) O influxo de Ca^{2+} na sinapse ativa cinases que, por sua vez, modulam a atividade de seus substratos. Esses substratos contribuem para mudanças locais, como alterações morfológicas, através de regulação de proteínas do citoesqueleto ou indução da transcrição de RNA no núcleo através de fatores de transcrição. (d) RNAm levam à formação de proteínas que são capturadas pelas sinapses ativadas e contribuem para a estabilização de mudanças na espinha dendrítica. A LTP pode induzir crescimento (tempo na figura relativo à indução de LTP) de novas espinhas dendríticas, indicados por setas (microscopia de dois fótons).

1.9 LTP e eCBs

O hipocampo sintetiza endocanabinóides e expressa tanto receptores CB1 e CB2 (CRISTINO ET AL., 2006). O antagonismo de receptores CB1 tem efeito inibitório sobre a potenciação a longo prazo (LTP) hipocampal, efeito esse que depende da neurotransmissão inibitória (CARLSON, WANG, ALGER, 2002). A deleção genética da MAGL por sua vez potencia a LTP hipocampal (PAN et al., 2011) sugerindo que a

2-AG inibe a inibição da neurotransmissão GABAérgica, facilitando a LTP. Por outro lado a anandamida inibe a LTP hipocampal (TERRANOVA et al., 1995) e o inibidor da degradação hidrolítica da anandamida (URB597) tem também seu efeito inibitório (BASAVARAJAPPA et al., 2014), sugerindo um efeito oposto da anandamida em relação ao 2-AG sobre a LTP hipocampal.

2- Objetivos

Partindo do princípio que a ativação de receptores TRPV1 hipocampais por capsaicina potencia a LTP (BENNION et al., 2011) e a deleção genética da MAGL também leva a potenciação do LTP (PAN et al., 2011). E que segundo Marsch et al., 2007, camundongos geneticamente modificados que não expressam o receptor TRPV1, se observa uma redução na LTP hipocampal. Propomos estudar a discrepância de efeitos dos dois eCBS na LTP hipocampal. Através da inibição farmacológica da degradação dos eCBS.

Tendo em vista que a ativação dos receptores TRPV1 potenciam a LTP, e não a inibem como é observado com a AEA, então qual seria o mecanismo de ação da anandamida em inibir a LTP? Por exemplo, recentemente foi demonstrado que a anandamida inibe a produção de 2-AG em neurônios corticais via a ativação de receptores TRPV1 (LEE et al., 2015).

3- Hipótese

Seria possível que a anandamida estivesse preferencialmente inibindo a produção de 2-AG e assim inibindo a LTP?

Para testar essa hipótese usaremos inibidores farmacológicos da degradação hidrolítica do 2-AG e da AEA e também serão usados antagonistas dos receptores TRPV1.

4- Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL, com idade entre 35 e 49 dias, mantidos no Biotério de camundongos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com ciclo claro/escuro de 12/12hs (luzes às 7:00), temperatura (25 °C) e umidade (55%) controladas com água e ração *ad libitum*. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP protocolo número: 8/2017.

4.2 Obtenção das fatias de hipocampo

Inicialmente, os animais foram anestesiados com isoflurano e decapitados. Em seguida, seus cérebros foram rapidamente removidos da calota craniana e colocados em solução de fluido cérebro-espinhal artificial (aCSF) parcialmente congelado com a seguinte composição em mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 25 Dextrose, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0,4 Ac. Ascórbico. Os hemisférios com a porção medial voltada para cima foram separados, levemente tirado o excesso de aCSF e então eram colados com cola de cianoacrilato em um suporte. Para facilitar os cortes, os hemisférios eram encostados em um anteparo de agarose, e em seguida o suporte era acoplado a um vibrátomo (Vibratome, VT1000Plus) para corte de fatias coronais com espessura de 400 µm. O córtex foi separado do hipocampo após os corte, e cada fatia foi colocada em um bequer contendo aCSF. Esse bequer se encontrava em um banho com temperatura controlada em aproximadamente 34°C. Os cortes permaneceram em descanso por 45 minutos no banho, bem como em pH (7,4) e oxigenação controlados com o uso ininterrupto de mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Após este período, o bequer de repouso era retirado do banho e os cortes

Figura 7- Em A pode-se ver a estante que contém o Amplificador Multiclamp 2A 700B sinalizado pelo círculo de cor verde e a Placa conversora Digidata 1440A sinalizada pelo círculo de cor laranja, sinalizado em rosa se tem o controlador de temperatura. Em B a seta vermelha sinaliza a armação de platina onde se prendem fios de nylon para segurar a fatia no banho, durante o experimento. A seta azul sinaliza o eletrodo de estimulação e a seta amarela sinaliza o eletrodo de registro.

4.4 Registros extracelulares para estudo de fenômenos de plasticidade sináptica

Os fenômenos de plasticidade sináptica hipocampal são tradicionalmente estudados usando os registros extracelulares. Isso se deve à suscetibilidade desses fenômenos à diálise do citoplasma que acontece durante registros intracelulares que dificultam a manutenção da plasticidade por tempos longos (>1 hora). Além disso, os registros extracelulares permitem o registro do conjunto de centenas de sinapses de uma vez, minimizando variações individuais entre as sinapses.

Para realizarmos esses experimentos, um eletrodo bipolar concêntrico foi posicionado sobre as fibras de Schaffer próximo à região CA1 do hipocampo dorsal. Esse eletrodo é conectado a um estimulador de voltagem variável modelo Master-9 (AMPI, Jerusalen, Israel) conectado a um isolador de estímulo Iso-Flex (AMPI, Jerusalen, Israel). Para os registros extracelulares foi utilizado microeletrodos confeccionados a partir de capilares de borosilicato (BF0150-85-10, Sutter Instruments, Novato, CA,

EUA) tracionados em um estirador Sutter P87 (Sutter Instruments, Novato, CA) conectado a um “probe” do amplificador por meio de um fio de prata cloretado. O microeletrodo era preenchido com aCSF e apresentava uma resistência entre 1 a 2 M Ω . Foi usado um eletrodo de registro, posicionado na camada apical dendrítica (*stratum radiatum*) da região CA1 (Figura 8). Os registros eram feitos no modo “current-clamp”. No eletrodo posicionado no *stratum radiatum*, medimos as alterações de potenciais sinápticos extracelulares (PSEs) evocados por estímulos de voltagem nas vias de Schaffer.

Figura 8 Em A indicado pelo círculo verde se tem o estimulador Master - 9. Em B sinalizado pela seta azul clara se tem o eletrodo de estímulo, a seta amarela sinaliza o eletrodo de registro a seta vermelha sinaliza os corpos celulares dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo e em azul se tem sinalizado os dendritos dos neurônios piramidais da região da CA1.

Primeiramente fizemos uma curva intensidade-estímulo das PSES, aumentando gradativamente o estímulo necessário para evocar as PSES. Escolhemos a intensidade de estímulo que leva a produzir uma PSES equivalente a aproximadamente 60% da PSES máxima. A PSES máxima era considerada a maior PSES antes do aparecimento de *population spikes*, que refletem os potenciais de ação

vindos do corpo celular. Registramos então, nessa intensidade, 100 PSES estimulados a cada 30 segundos, esse registro é denominado linha de base com duração de 50 minutos, para os grupos controles. Após o registro dessa linha de base o protocolo de indução da LTP foi aplicado, o protocolo escolhido foi o de estimulação por *theta burst* que é considerado o que melhor reflete a estimulação fisiológica do hipocampo durante a exploração ambiental (LARSON, MUNKÁCSY, 2015). Esse protocolo consistiu de 4 pulsos de 100 Hz de estimulação de 30 ms de duração dados em intervalos de 200 milissegundos. Esse protocolo foi repetido 3 vezes com intervalos de 5 segundos entre cada. Logo após a aplicação desse protocolo, os PSEs continuarão sendo registrados por 60 minutos para registro da LTP. Na maioria dos experimentos registramos os PSEs por 20 minutos (1 estímulo a cada 30 segundos) para avaliarmos a *early-LTP*, que não foi diferente da *late-LTP* (Figura 9).

Os sinais foram adquiridos a 20 kHz e filtrados (passa baixa; Bessel) a 2 kHz e armazenadas em disco rígido para análise posterior.

Figura 9. Esquema do protocolo de *theta-burst*

4.5. Protocolos experimentais

A. Grupo controle aCSF. O estudo desse grupo consiste na confirmação da eficácia do protocolo *Theta Burst* e também como parâmetro para os dados dos demais grupos.

B. Grupo controle DMSO. O estudo desse grupo teve o objetivo de avaliar a não influência do veículo de diluição das drogas sobre a neurotransmissão e a LTP.

C. Estudou-se o efeito da inibição da degradação hidrolítica do 2-AG sobre a neurotransmissão e LTP hipocampal usando-se o inibidor específico da MAGL, **JZL184 (1 μ M)**.

D. Estudou-se o efeito da inibição da degradação hidrolítica da anandamida sobre a neurotransmissão e LTP hipocampal usando o inibidor específico da FAAH, **URB597 (1 μ M)**.

E. Estudou-se o efeito da inibição da degradação oxidativa do 2-AG e anandamida sobre a neurotransmissão e LTP hipocampal usando-se o inibidor da COX-2 **Valdecoxib (500 nM)**.

F. Estudou-se o efeito do envolvimento do receptor CB1 sobre a LTP e neurotransmissão hipocampal usando agonista CB1 **WIN 212-2 (5 μ M)**.

G. Estudou-se o envolvimento dos receptores TRPV1 sobre a LTP e neurotransmissão hipocampal usando animais *Knockout* (KO) TRPV1.

H. Estudou-se o envolvimento dos receptores TRPV1 sobre a LTP e neurotransmissão hipocampal usando o antagonista dos receptores TRPV1 **AMG9810 (1 μ M)**.

I. Estudou-se o envolvimento dos receptores TRPV1 sobre a LTP e neurotransmissão hipocampal usando agonista TRPV1 **Capsaicina (1 μ M)**.

J. Estudou-se o efeito do antagonismo dos receptores CB1 sobre a neurotransmissão e LTP hipocampal usando-se o o com a droga **AM251 (5 μ M)**.

As drogas foram diluídas em dimetilulsofóxido (DMSO) em soluções estoque 1000 vezes concentrada e diluídas em aCSF no dia dos experimentos.

Cada grupo foi composto de pelo menos 5 animais, com pelo menos 2 fatias de cada animal registradas, uma com a droga, ou com DMSO (veículo das drogas) e comparadas com o grupo controle. As drogas foram perfundidas 20 a 40 minutos antes da indução do LTP e por mais 15 minutos após. registramos por mais 10 minutos após a lavagem. Foi usado aproximadamente 70 animais (7 grupos droga mais 3 grupos controle).

4.6 Análise dos dados

Os dados foram analisados offline usando-se o programa de análises ClampFit (Molecular Devices, EUA). OS PSES registrados na camada dendrítica foram analisados quanto à inclinação do potencial ajustando-se a porção linear do traçado com uma função linear. A LTP foi quantificada nos últimos 10 minutos de registro e expressa como fração da linha de base. A potenciação pós-tetânica correspondia ao primeiro PSES após o TB.

4.7 Análise Estatística

Os dados são apresentados como média e erro padrão (EPM) e analisados por meio de estatística descritiva. A comparação entre as variáveis foi realizada utilizando-se a ANOVA One-Way e o Teste T não pareado. O nível de significância para todos os testes foi de 5% ($P < 0,05$). Para o processamento estatístico dos resultados e elaboração dos gráficos foi utilizado o programa Prism versão 5.0.

5- Resultados

5.1 Protocolo de indução de LTP e análise do veículo para diluição de drogas

Os primeiros experimentos tiveram como finalidade mostrar a eficácia do protocolo *theta burst* reproduzido neste presente estudo e que o mesmo levaria a LTP hipocampal. A figura 1A mostra a média de fatias registradas no experimento, onde foram perfundidas com aCSF. Podemos observar que protocolo de *theta burst*, de fato foi efetivo para a indução da LTP hipocampal (Figura 10).

Figura 10 - Indução da LTP na região CA1 do hipocampo de camundongos Black C57. Grupos controle: aCSF. Slope normalizado do PSEs antes e após o estímulo de *Theta Burst* (indicado pela seta). $n = 7$

Em seguida foram feitos experimentos para analisar se o veículo de diluição das drogas (DMSO 0,1%) iria interferir na neurotransmissão, a comparação foi feita entre a *early* LTP dos grupos, onde não observamos diferença (LTP: aCSF = $1,53 \pm 0,14$ e DMSO = $1,45 \pm 0,20$; $p = 0,70$). Na Figura 11-A, pode-se ver a comparação das médias das fatias controles de aCSF e DMSO. Após o estímulo de indução da LTP hipocampal, foi registrado a manutenção dessa potenciação. Entretanto notamos uma queda dos PSEs após a retirada do DMSO em algumas fatias. Esses dados mostram que o DMSO não interferiu com a indução e manutenção da potenciação induzida pelo *theta burst*. Porém por algum motivo os PSEs diminuía de amplitude após a lavagem

em algumas fatias. Nos experimentos seguintes iremos estudar a fase de indução e expressão da LTP que é a *early-LTP*, 20 minutos após o estímulo de *theta burst*.

Figura 11 - O veículo de diluição da droga interfere na neurotransmissão? A: Indução da LTP na região CA1 do hipocampo de camundongos Black C57, grupos controle: aCSF e DMSO (0,1%). *Slope* normalizado do PSES antes e após o estímulo de *Theta Burst* (indicado pela seta). B: Linha de base do grupo perfundido por aCSF e por DMSO, não houve diferença entre os grupos, ou seja, o DMSO não interfere na linha de base. C: Análise entre grupos controle, não houve diferença entre os mesmos, corroborando com o resultado de que o veículo de diluição não tem interferência sobre a neurotransmissão. Foram considerados $p < 0.05$. Teste t-Student, não pareado.

Em 11-B pode-se observar a comparação da mudança da linha de base entre os grupos controle. Nossos dados mostram que o DMSO não interfere na linha de base

dos registros, ou seja, é um veículo de diluição seguro para ser utilizado. A comparação da *early-LTP* - potenciação da resposta após 20 minutos (*early-LTP*) não mostrou diferença entre os grupos controle (aCSF = $1,53 \pm 0,14$ e DMSO = $1,45 \pm 0,20$; $p = 0,73$). Com esse resultado tivemos a confirmação de que o DMSO é um veículo seguro de diluição para as drogas que foram usadas no experimento.

5.2) O inibidor da enzima monoacilglicerol lipase, JZL184, interfere na indução da LTP?

A droga JZL184 é inibidora da enzima monoacilglicerol lipase, a qual é a principal enzima de degradação do 2-AG. A aplicação de JZL184 leva ao aumento dos níveis de 2-AG na fenda sináptica. Nossos dados mostram que não houve diferença na indução da LTP entre as fatias de hipocampo do grupo controle e as do grupo tratado com JZL184 (controle = $1,43 \pm 0,09$ e JZL 184 = $1,62 \pm 0,22$; $p = 0,38$). Na figura 12-A. temos as médias das fatias do grupo controle e do grupo perfundido com droga. A droga JZL184 foi perfundida durante 40 minutos antes do estímulo TB e após o estímulo foram registrados por mais 20 minutos .

Figura 12. O efeito do JZL184 sobre a potenciação das sinapses Schaffer-piramidais CA1. 3-A: Potenciais excitatórios pós-sinápticos normalizados. Média das respostas das fatias controle em comparação com a média das fatias tratadas com JZL184 (1 μ M) antes e após a estimulação de TB. A seta mostra o tempo onde foi aplicado o TB. B: Média dos *slopes* dos PSEs das fatias controle e tratadas com JZL 184 antes do estímulo TB (linha de base). C: Média dos *slopes* dos PSEs durante o PTP do grupo controle e do grupo tratado com JZL 184. D: Média dos *slopes* dos PSEs durante *early*-LTP dos grupo controle e do grupo tratado com JZL 184. Dados mostram média $\pm$ EPM. Foram considerados $p < 0.05$. Teste t-Student, não pareado.

A comparação entre as linhas de base do grupo controle e do grupo perfundido JZL184 mostrou que o JZL184 não interfere com os potenciais de campo das células piramidais da CA1 do hipocampo evocados pela estimulação das fibras colaterais de Schaffer (Figura 12-B). Além disso, a comparação dos PSEs durante o PTP entre os grupos controle x droga também não demonstrou diferença estatística (controle = $1,48 \pm 0,12$ e JZL 184 = $1,76 \pm 0,22$; $p = 0,25$) (Figura 12-C). Finalmente, a comparação dos PSEs entre os grupos controle e perfundido pela droga durante a LTP, também não mostrou diferença estatística entre os grupos (controle = $1,43 \pm 0,09$ e JZL 184 = $1,62 \pm 0,22$; $p = 0,38$) (Figura 12-D).

5.3) A inibição da FAAH pela droga URB597 interfere na indução da LTP?

A droga URB597 inibe a enzima hidrolase de de ácidos graxos (FAAH), seu uso tende a aumentar os níveis de anandamida na fenda sináptica. Já se sabe que a anandamida se liga ao receptor CB1 do neurônio pré-sináptico desencadeando o DSI. No presente experimento não foi observada diferença na indução da LTP entre o grupo controle e o grupo da droga, porém houve diferença no PTP no grupo perfundido pela droga URB597, em relação ao grupo controle.

Figura 13 Efeito da inibição da degradação de FAAH sobre a plasticidade sináptica Schaffer-CA1. A: Potenciais excitatórios pós-sinápticos normalizados. Média das respostas das fatias controle em comparação com a média das fatias tratadas com URB597 (1 μ M) antes e após a estimulação de TB (indicado pela seta). B: Média dos PSEs durante a linha de base do grupo controle e do grupo tratado com a droga. C: Média dos PSEs durante a PTP entre o grupo controle e o grupo da droga. D: Média dos PSEs durante a Early-LTP entre o grupo controle e o grupo da droga. Dados foram demonstrados como média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$. Teste t-Student. não pareado.

Os nossos dados mostram que a aplicação do inibidor da FAAH URB597 não interfere com a resposta basal da via Schaffer-CA1 (Figura 13-B). No entanto, as respostas das fatias tratadas com URB597 foram significativamente maiores do as fatias controles durante o PTP, (controle = $1,48 \pm 0,12$ e URB597 = $2,08 \pm 0,31$; $p = 0,02$) (Figura 13-C). Com relação a LTP não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (controle = $1,43 \pm 0,09$ e URB597 = $1,68 \pm 0,28$; $p = 0,29$) (Figura 13-D).

5.4) A inibição da Cicloxigenase 2 (COX2) interfere na indução da LTP?

A droga valdecoxib é um inibidor seletivo da enzima COX2. A COX2 é uma das importantes vias de degradação dos ECBs, sendo que a aplicação do valdecoxib tende a aumentar os níveis de anandamida e 2-AG na fenda sináptica.

Os nossos dados mostram que a aplicação do inibidor da COX2, valdecoxibe não interfere com a resposta basal da via Schaffer-CA1 (Figura 14-B). Resultados semelhantes foram encontrados durante o PTP, onde as inclinações dos PSESs das fatias tratadas com valdecoxibe foram equivalentes as inclinações do as fatias controles (controle = $1,48 \pm 0,12$ e URB597 = $1,61 \pm 0,36$; $p = 0,67$) (Figura 14-C). Com relação a Early-LTP não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (aCSF = $1,43 \pm 0,09$ e URB597 = $1,51 \pm 0,03$; $p = 0,76$) (Figura 14-D).

Figura 14 Efeitos da inibição da COX2 sobre a plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1. A. Potenciais excitatórios pós-sinápticos normalizados. Média das respostas das fatias controle em comparação com a média das fatias tratadas com Valdecoxibe (500 nM) antes e após a estimulação de TB B: Média dos PSEs durante a execução da linha de base.. C: Média dos PSEs durante o PPT. . D: Média dos PSEs durante a *early*-LTP. Dados estão representados como média $\pm$ EPM. Foi considerado $p < 0.05$. Teste t-Student, não pareado.

5.5) O agonismo do CB1 interfere na indução da Early-LTP?

A droga WIN55,212-2 é agonista do receptor CB1. A ligação do WIN55212-2 aumenta a atividade do receptor CB1, mimetizando os ECBs nos neurônios pré e pós-sinápticos. Nossos dados mostram que a aplicação do WIN55212-2 diminui a *early-LTP* com relação ao grupo controle aCSF = $1,43 \pm 0,09$ e WIN55212-2 = $1,01 \pm 0,10$; $p = 0,02$) (Figura 15).

Os nossos dados mostram que a aplicação do WIN55212-2 não interfere com a resposta basal da via Schaffer-CA1 (Figura 15-B). Resultados semelhantes foram encontrados durante o PTP, onde as inclinações dos PSEs das fatias tratadas com WIN55212-2 foram equivalentes às inclinações das fatias controles (controle = $1,48 \pm 0,12$ e WIN212-2 = $1,43 \pm 0,14$; $p = 0,81$) (Figura 15-C). Com relação a Early-LTP não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (controle = $1,436 \pm 0,1$ e WIN55212-2 = $1,015 \pm 0,1$; $p = 0,0265$) (Figura 15-D).

Figura 15 Efeitos da ativação dos receptores CB1 sobre a plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1. A. Potenciais excitatórios pós-sinápticos normalizados. Média das respostas das fatias controle em comparação com a média das fatias tratadas com Win55,212-2 (5 μ M) antes e após a estimulação de TB B: Média dos PSESs durante a execução da linha de base.. C: Média dos PSESs durante o PPT. D: Média dos PSESs durante a Early-LTP. Dados estão representados como média $\pm$ EPM. Foi considerado $p < 0.05$. Teste t-Student, não pareado.

5.6) Antagonista de receptor CB1 interfere na indução da Early-LTP?

A droga AM251 é antagonista/agonista inverso do receptor CB1. A ligação do diminui assim a sinalização dos ECBs. Nossos dados mostram que a aplicação do ligação do AM251 não influencia na LTP com relação ao grupo controle aCSF = $1,43 \pm 0,09$ e WIN55212-2 = $1,01 \pm 0,10$; $p = 0,02$; Figura 16A,E). Porém houve diferença na linha de base, potenciando os PSES quando comparado o grupo controle com o grupo perfundido com a droga (Figura 16-B).

Figura 16 Efeitos da ativação dos receptores CB1 sobre a plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1. A. Potenciais excitatórios pós-sinápticos normalizados. Média das respostas das fatias controle em comparação com a média das fatias tratadas com AM251 antes e após a estimulação de TB. B: Média dos PSES 2 durante a execução da linha de base. C: Média dos PSES durante o PPT. D: Média dos PSES durante a Early-LTP. Dados estão representados como média $\pm$ EPM. Foi considerado $p < 0.05$. Teste t-Student, não pareado.

5.7) A ativação dos receptores TRPV1 interfere na indução da Early-LTP?

Sabe-se que a capsaicina é agonista do canal TRPV1 e também sabe-se que a anandamida também é agonista do canal TRPV1. Usando a Capsaicina procuramos mimetizar ativação desse canal e se há interferência na indução da LTP. Podemos observar que nesse experimento não houve uma diferença estatística entre os grupos de comparação entre PTP (controle = $1,48 \pm 0,12$ e Capsaicina = $1,18 \pm 0,06$; $p = 0,08$) (Figura 16-C).e Early-LTP (controle = $1,43 \pm 0,09$ e Capsaicina = $1,25 \pm 0,16$; $p = 0,34$) (Figura 16-D). Porém houve uma potenciação da linha de base, quando comparado o grupo controle com o grupo perfundido com a droga (Figura 16-B).

Figura 17 Efeitos da ativação de receptores TRPV sobre a plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1. A. Potenciais excitatórios pós-sinápticos normalizados. Média das respostas das fatias controle em comparação com a média das fatias tratadas com Capsaicina ($1\mu\text{M}$) antes e após a estimulação de TB B: Média dos PSESs durante a execução da linha de base.C: Média dos PSESs durante o PPT. D: Média dos PSESs durante a Early-LTP. Dados estão representados como média $\pm$ EPM. Foi considerado $p < 0.05$. Teste t-Student,não pareado

5.8) A ausência dos canais TRPV1 interfere na indução da Early-LTP?

Neste experimento foram usados animais KO para o canal TRPV1. Em A se tem o gráfico de comparação das médias das fatias dos grupos controle e do grupo KO TRPV1. Observa-se que há uma diminuição da *early-LTP* do grupo KO quando comparado com o grupo controle (controle = $1,43 \pm 0,1$ e KO TRPV1 = $0,96 \pm 0,12$; $p = 0,0067$) (Figura 18).

Não foram observadas diferenças entre as respostas das fatias dos animais knockout comparados com as dos animais controles durante a PPT (controle = $1,48 \pm 0,12$ e KO TRPV1 = $1,18 \pm 0,06$; $p = 0,08$) (Figura 18).

Figura 18 Plasticidade sináptica hipocampal na via Schaffer-CA1 em fatias de animais knockout para receptores TRPV1. A. Potenciais excitatórios pós-sinápticos normalizados. Média das respostas das fatias controle em comparação com a média das fatias dos animais KO antes e após a estimulação de TB. B: Média dos PSES durante a execução da linha de base. C: Média dos PSES durante o PPT. . D: Média dos PSES durante a *early*-LTP. Dados estão representados como média $\pm$ EPM. Foi considerado $p < 0.05$. Teste t-Student, não pareado

5.9) Mimetizar o KO TRPV1 com a droga AMG9810 , terá o mesmo efeito que o KO para TRPV1?

Para saber se a falta de LTO nos animais KO para o receptor TRPV1 se deve a um efeito durante o desenvolvimento do animal, usamos a droga AMG9810 um antagonista do receptor TRPV1. No presente experimento não foi observada diferença na indução da LTP e do PTP entre o grupo controle e o da droga. Não teve diferença na linha de base a comparação foi feita entre a *early* LTP dos grupos, onde não observamos diferença (LTP: controle = $1,4 \pm 0,1$ e AMG9810 = $1,52 \pm 0,26$; $p = 0,74$). Além disso, a comparação dos PSEs durante o PTP entre os grupos controle e droga também não demonstrou diferença estatística (controle = $1,48 \pm 0,12$ e AMG9810 = $1,60 \pm 0,35$; $p = 0,74$) (Figura 19-C).

Figura 19 **A droga AMG9810 mimetiza o resultado dos camundongos KO?** **A.** Potenciais excitatórios pós-sinápticos normalizados. Média das respostas das fatias controle em comparação com a média das fatias tratadas com AMG9810 (1 μ m) antes e após a estimulação de TB (indicado pela seta). **B:** Média dos PSESs durante a execução da linha de base, houve diferença entre os grupos, ou seja, o DMSO interfere na linha de base **C:** Média dos PSESs durante o PPT. . **D:** Média dos PSESs durante a Early-LTP. Dados estão representados como média $\pm$ EPM. Foi considerado $p < 0.05$. Teste t-Student não pareado.

Os nossos dados mostram que a aplicação do AMG9810 não interfere com a resposta basal da via Schaffer-CA1 (Figura 19-B). Com relação a Early-LTP não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (controle = $1,43 \pm 0,09$ e WIN55212-2 = $1,01 \pm 0,10$; $p = 0,02$) (Figura 19-D) e com relação ao PTP também não houve diferença estatística (controle = $1,48 \pm 0,12$ e AMG9810 = $1,60 \pm 0,35$; $p = 0,74$) (Figura 19-C). Os resultados não foram semelhante ao encontrado nos camundongos KO, uma das hipóteses para esse resultado seria o fato da deleção genética do TRPV1 causar uma adaptação de respostas neurais das vias Schaffer-CA1 ao longo da vida do animal KO, não ocorrendo o mesmo com a mimetização com a droga em um camundongo *naïve*.

6- Discussão

Este trabalho teve como estratégia inibir a degradação dos eCBs por meio do uso de antagonistas farmacológicos, e avaliar o impacto na potenciação a longo prazo hipocampal. Nossos dados mostram que a inibição da degradação do 2-AG por uso da droga JZL184, não causou alteração na indução da LTP. Porém um trabalho feito por, PAN et al. 2011, que usou camundongos *knockout* para a enzima MAGL, obteve como resultado o aumento da LTP na sinapse Schaffer-CA1 usando o protocolo de *theta burst*. Ou seja, a deleção genética de MAGL alterou as respostas mediadas pelo receptor eCB1, porém em nosso trabalho com o uso da droga para mimetizar os camundongos KO MAGL, não obtivemos o mesmo resultado. No protocolo de indução da LTP utilizamos um estímulo TB de 4 bursts enquanto que no trabalho de Pan foi utilizado um estímulo de 5 e 15 bursts. Seria a deficiência da LTP nos animais Ko um efeito da falta da MAGL durante o desenvolvimento, e não um efeito agudo da falta da MAGL?

Também utilizamos animais geneticamente modificados para estudo da indução da LTP, no nosso caso usamos animais KO para TRPV1, visto que já se sabe que o receptor TRPV1 tem papel na modulação da plasticidade sináptica (GIBSON et al., 2008; SAFFARZADEH et al, 2015). Esse receptor tem como agonista endógeno a anandamida (HUANG et al., 2002) e a droga que escolhemos como agonista exógeno foi a capsaicina e AMG9810 foi a droga escolhida como antagonista do receptor. Ao comparar os resultados das fatias de animais KO com as fatias dos animais controle, houve diminuição da LTP. Esse resultado também foi encontrado em um trabalho de MARSCH, et al., 2007, onde também utilizou-se camundongos *knock-out* para TRPV1 e ficou demonstrada uma redução da LTP de CA1 de animais KO em comparação com controles do tipo selvagem.

Ao tratar fatias de animais *naïve* com a droga AMG9810, não tivemos o mesmo resultado de diminuição da LTP. Uma das hipóteses para esse resultado seria o fato da deleção genética do TRPV1 causar alterações no desenvolvimento das sinapses hipocampais como as vias Colaterais de Schaffer-CA1 ou ao longo da vida do animal, não ocorrendo o mesmo com a inibição farmacológica aguda.

No trabalho de SAFFARZADEH et al, 2015, foi visto que a aplicação de capsaicina resultou em aumento significativo da LTP quando comparado ao controle do veículo com DMSO. Nossos dados não apresentaram mudança na facilitação na indução da LTP com o uso da capsaicina, porém houve um aumento da neurotransmissão glutamatérgica nas fatias tratadas com a droga, quando comparadas com o grupo controle, sugerindo uma participação dos receptores TRPV1 na modulação da neurotransmissão glutamatérgica hipocampal.

Surpreendentemente nossos resultados utilizando a droga URB597 que tem como função inibir a enzima hidrolase de de ácidos graxos (FAAH), aumentando assim a quantidade de anandamida na fenda, mostrou que a ativação de CB1 com anandaminada não interfere na indução da LTP, porém aumenta o potenciação pós tetânica do grupo de fatias que foram tratadas com a droga, divergindo de um trabalho feito por BASAVARAJAPPA, et al. 2014, que utilizou o URB597 de forma injetável em camundongos WT e KO para o receptor CB1. O estímulo TB para indução de LTP é semelhante ao utilizado neste trabalho. Os resultados que eles tiveram foi diferente, visto que a LTP foi inibida em camundongos do tipo WT para CB1 na presença da droga URB597. Por outro lado, outro trabalho de SLANINA, et al. 2005, também não observou em seus resultados aumento hipocampal da região de CA1 com a droga URB597.

Outro experimento para inibir outra via de degradação dos eCBs foi a utilização da droga valdecoxib que é um inibidor seletivo da enzima COX2. A COX2 é uma das importantes vias de degradação dos ECBs, sendo que a aplicação do valdecoxib tende a aumentar os níveis de anandamida e 2-AG na fenda. Neste trabalho não foi observada nenhuma modificação tanto da *early*-LTP quanto do PTP quando comparado o grupo controle do grupo tratado. Em um trabalho de SLANINA, et al. 2005, utilizou o inibidor meloxicam para inibir a COX-2 e teve como resultado o impedimento da LTP. Quando misturou as drogas meloxicam e AM251 obteve um resultado contrário, obtendo a LTP. A supressão da LTP pelo meloxicam foi evitada pelo AM251, a droga AM251 é antagonista do receptor CB1. A ligação do AM251 bloqueia os ligantes endógenos, diminuindo assim a sinalização dos ECBs. Em fatias pré-tratadas com 1 μ M AM251 e 20 μ M meloxicam, com esse resultado entende-se que a inibição da LTP pelo meloxicam ocorreu através de um mecanismo dependente

do CB1. Porém em nosso trabalho não obtivemos essa diferença na indução da LTP com o uso do Valdecoxib. Nossos dados mostram que a aplicação do AM251 não influencia na *early*-LTP com relação ao grupo controle. Porém houve diferença na linha de base, quando comparado o grupo controle com o grupo perfundido com a droga, sugerindo uma influência da ativação basal dos receptores CB1 na neurotransmissão glutamatérgica hipocampal.

A droga WIN55,212-2 é agonista do receptor CB1. A ligação do WIN55212-2 aumenta a atividade do receptor CB1, mimetizando os ECBs nos neurônios pré e pós-sinápticos. Nossos dados mostram que a aplicação de WIN55212-2 diminui a *early*-LTP com relação ao grupo controle. O trabalho de Misner & Sullivan, 1999, mostra que ao fazer o experimento com a droga WIN55-212,2 os pesquisadores também obtiveram como resultado a diminuição da amplitude do EPSC. O WIN55, 212-2 reduz os EPSCs nos neurônios CA1 do hipocampo pela ativação dos receptores canabinóides CB1. Para estabelecer que a redução na amplitude do EPSC era atribuível à ativação do receptor canabinóide e não a algum efeito inespecífico, o autor aplicou a forma inativa do WIN55, 212-2 (WIN 55, 212-3) a fatias do hipocampo. Em conjunto, estes resultados indicaram que a diminuição na amplitude do EPSC causada pela ativação do receptor canabinóide é atribuível a uma diminuição na quantidade de neurotransmissor liberado de forma pré-sináptica (Shen et al., 1996 ; Sullivan, 1999) e não a qualquer diminuição na sensibilidade pós-sináptica ao glutamato.

Recentemente um artigo demonstrou que a ação do 2-AG depende do protocolo de indução da LTP. Nesse trabalho (SILVA-CRUZ, et al, 2017), foi observado dois tipos de respostas com dois diferentes protocolos de TB, o primeiro ele chamou de *theta burst* fraco, que consiste em: cinco séries de 100Hz, 4 Estímulos, separados por 200ms. E observou uma inibição da LTP. No outro experimento foi usado um estímulo de TB denominado de forte: onde eram 10 séries de 100Hz, 4 estímulos, separados por 200ms. E nessa circunstância a aplicação do JZL194 facilitou a LTP induzida por um protocolo de TB forte, mas não com o protocolo de TB fraco. Nosso protocolo consiste em 4 pulsos de 100 Hz de estimulação de 30 ms de duração dados em intervalos de 200 milissegundos. Esse protocolo foi repetido 3 vezes com intervalos de 5 segundos entre cada. Pode-se observar que nosso protocolo é semelhante ao protocolo de TB fraco, que foi usado no Trabalho de SILVA-CRUZ, et al, 2017, o que

poderia ser o motivo de não termos observado efeito do JZL194 na LTP, como seria esperado pelos resultados dos animais KO para a MAGL.

7- Conclusão

Concluimos que em nossas condições experimentais a inibição farmacológica da degradação dos endocanabinóides não afetou a LTP na via Schaffer-CA1. Apenas a ativação do agonista dos receptores canabinoides, WIN545212-2 afetou a LTP, inibindo-a. Possivelmente não observamos efeitos dos antagonistas da degradação dos endocanabinóides devido ao tipo de protocolo de indução da LTP, como foi mostrado por SILVA-CRUZ, et al, 2017.

8- Referências

- BASAVARAJAPPA, B.S. et al., Elevation of endogenous anandamide impairs LTP, learning, and memory through CB1 receptor signaling in mice. **Hippocampus**, 24:808-188. 2014.
- BENNION D, et al., Transient receptor potential vanilloid 1 agonists modulate hippocampal CA1 LTP via the GABAergic system. **Neuropharmacology**. Sep;61(4):730-8. 2011.
- BISOGNO, T. et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. **Biochemical Journal**, 351:817-824. 2000.
- CARLSON G, WANG Y, ALGER BE. Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. **Nature Neuroscience**, 5(8):723-724. 2002.
- CASTILLO, P. E. et. Al. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. **Neuron**. 76(1):70-81. 2012.
- CATERINA, M.J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 292:R64-R76. 2007.
- CRISTINO, L. et al. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neuroscience**, 139:1405-1415. 2006;
- DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, 34:605-613. 1998.
- DEVANE, W.A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, 258: 1946-1949. 1992.
- DI MARZO V, DE PETROCELLIS L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? **Philosophical Transactions Royal Society of London B Biological Sciences**, 367:3216-28. 2012.
- EGERTOVA, M; ELPHICK , M. R. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB1. **Journal of Comparative Neurology**. 422:159-171.2000.
- FELDER, C. C. et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Molecular Pharmacology**, 48:443-450. 1995.

- GAONY, I, MECHOULAM, R. Isolation Structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical Society**, 86:1646-1647. 1964.
- GIBSON, H. E., et al., TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. **Neuron**, 57: 746–759. 2008.
- GLASS, M; NORTHUP, J. K. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. **Molecular Pharmacology**, 56:1362-1369.1999.
- HANUS, L. et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. **The Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, 98:3662-3665. 2001.
- HASHIMOTODANI Y, OHNO-SHOSAKU T, KANO M. Ca⁽²⁺⁾-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. **Current Opinion in Neurobiology**. 17:360-5. 2007
- HEILDEBERGER R. et al. . Synaptic plasticity. In: **From Molecules to networks**, 3rd ed, Editores: Byrne, Heidelberger e Waxhan. Academic Press p:533-571. 2014.
- HU SS, MACKIE K. Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 231:59-93. 2015.
- HUANG, S. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proceedings of National Academy of Science USA**, 99:8400-8405. 2002.
- KIM J, ALGER BE. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. **Nature Neuroscience**. 7: 697-8. 2004.
- KOZAC KR, et al., Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. **Journal of Biological Chemistry**. 277: 44877-44885. 2002.
- KUSHMERICK C, et al. Retroinhibition of presynaptic Ca²⁺ currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. **Journal of Neuroscience**. 24:5955-5965. 2004.
- LARSON J, MUNKÁCSY E. Theta-burst LTP. **Brain Research**. 1621:38-50. 2015.
- LEE SH, et al., Multiple Forms of Endocannabinoid and Endovanilloid Signaling Regulate the Tonic Control of GABA Release. **Journal of Neuroscience**. 35:10039-10057. 2015.
- LIU, X. et al., Coordinated regulation of endocannabinoid-mediated retrograde synaptic suppression in the cerebellum by neuronal and astrocytic monoacylglycerol lipase. **Scientific Reports**, 24;6:35829. 2016.

- LÜSCHER C, MALENKA RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). **Cold Spring Harbor Perspective Biology**. 4(6), 2012.
- MALINOW R, TSIEN RW. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. **Nature**. 346(6280):177-80. 1990.
- MARSCH, R. et al. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, 27:832-839. 2007.
- MARTIN HG et al. Endocannabinoids Mediate Muscarinic Acetylcholine Receptor-Dependent Long-Term Depression in the Adult Medial Prefrontal Cortex. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 1;9:457. 2015.
- MARRS, W. R. et al., The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. **Nature Neuroscience**, 13:951–957. 2010.
- MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, 346:561-564.1990.
- MECHOULAM, R; SHVOHASHISH, Y. I. The structure of cannabidiol **Tetrahedron**, 19 :2073-2078. 1963.
- MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, 50:83-90. 1995.
- MECHOULAM R, PARKER LA. The endocannabinoid system and the brain. **Annual Review of Psychology**. 64:21-47. 2013.
- MISNER DL, SULLIVAN JM. Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. **Journal of Neuroscience**, 19:6795-6805. 1999.
- MUNRO, S; THOMAS, K. L; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, 365:61-65. 1993.
- PAN, B. et al. Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (JZL184) enhances retrograde endocannabinoid signaling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 331:591-597. 2009.
- PAN, B. et al. Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning and memory in monoacylglycerol lipase knockout mice. **Journal of Neuroscience**. 31: 13420–13430. 2011.
- PĂUNESCU H, et al., Cannabinoid system and cyclooxygenases inhibitors. **Journal of Medicine and Life**, 4(1); 11-20. 2011.

- PERTWEE, RG Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. **Handboof of Experimental Pharmacology**.231:1-37. 2015.
- PORTER, A.C. et al.Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 301:1020-1024; 2002.
- SAFFARZADEH, F. et al., Effects of TRPV1 on the hippocampal synaptic plasticity in the epileptic rat brain. **Synapse**. 69:375-83. 2015.
- SAVINAINEN, J. R., SAARIO, S. M., & LAITINEN, J. T.. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2- arachidonoylglycerol signaling through cannabinoid receptors. **Acta Physiologica**, 204:267–276. 2012.
- SCHLOSBERG JE et al., Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. **Nature Neuroscience**, 13:1113-1119. 2010.
- SILVA-CRUZ A, et al., Dual Influence of Endocannabinoids on Long-Term Potentiation of Synaptic Transmission. **Frontiers in Pharmacology**. 8:921. 2017.
- SLANINA KA, ROBERTO M, SCHWEITZER P. Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. **Neuropharmacology**, 49:660-8. 2005.
- STEPAN, J; DINE, J; EDER, M. Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. **Frontiers in Neuroscience**. 6;9:16. 2015.
- SUGIURA, T. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 215: 89-97. 1995.
- SUGIURA, T; WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol and cannabinoid receptors. **Chemistry and Physics of Lipids**, 108:89-106. 2000.
- TERRANOVA JP, et al., Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 352:576-579. 1995.
- WISE, L.E. et al. Assessment of anandamide's pharmacological effects in mice deficient of both fatty acid amide hydrolase and cannabinoid CB1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, 557:44-48. 2007.
- ZHONG, P. et al., Genetic deletion of monoacylglycerol lipase alters endocannabinoid-mediated retrograde synaptic depression in the cerebellum. **Journal of Physiology**, 589:4847–4855. 2011.

ZYGMUNT, P. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, 400: 452-457. 1999.