

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

**Envolvimento do sistema endocanabinóide no efeito
promnésico induzido pelo exercício físico**

Talita Hélen Ferreira e Vieira

BELO HORIZONTE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

**Envolvimento do sistema endocanabinóide no efeito
promnésico induzido pelo exercício físico**

Talita Hélen Ferreira e Vieira

Orientador: Prof. André Ricardo Massensini

Co-Orientador: Prof. Fabrício de Araújo Moreira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

BELO HORIZONTE

2014

REITOR

Jaime Arturo Ramírez

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Ricardo Santiago Gomez

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Tomaz Aroldo da Mota Santos

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Christopher Kushmerick

COLEGIADO DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof.^a Adelina Martha dos Reis

Prof. Cândido Celso Coimbra

Prof. Christopher Kushmerick

Prof. Frédéric Jean Georges Frezard

Prof. Igor Dimitri Gama Duarte

Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes

Prof.^a Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Prof.^a Maria José Campagnole dos Santos

Prof.^a Miriam Teresa Paz Lopes

Prof.^a Silvia Carolina Guatimosim Fonseca

Prof. Steyner de França Cortes

Frederico Sander Mansur Machado (Representante Discente)

Marcelo Limborço Filho (Representante Discente)

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.
É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte”*

Albert Einstein

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos, em especial, aos meus pais, Leandro e Vânia, por sempre se fazerem presentes ao longo da minha trajetória.

Agradecimentos

À DEUS, por ter colocado em meu caminho pessoas brilhantes e por ter me possibilitado, de maneira harmoniosa, conviver e aprender com elas.

À minha família, base e razão de tudo, em especial meus pais e irmãos, pelo amor, carinho, confiança, amizade e incentivo. Sem eles jamais o primeiro passo em direção a esse sonho teria sido dado.

Ao professor e orientador André Ricardo Massensini, por ter me recebido e acolhido em seu laboratório e, acima de tudo, pela confiança ao longo desses quatro anos.

Ao professor e co-orientador Fabrício de Araújo Moreira, pela amizade, conselhos e por ter me apresentado o universo fascinante dos canabinóides.

Aos demais professores do Núcleo de Neurociência (NNC), Márcio Flávio Dutra Moraes, Grace Schenatto Pereira Moraes, Juliana Carvalho Tavares e Bruno Rezende, por criarem um ambiente fértil para o conhecimento e relações humanas e, principalmente, por terem me ensinado o real significado da expressão “fazer ciência”.

Aos meus “velhos” amigos, em especial a Rô, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, pelas palavras de consolo em momentos de tristeza e pelo incentivo em momentos cruciais.

Aos meus “novos” amigos, em especial a Cris, pela deliciosa convivência, pelo exemplo de perseverança e simplicidade e por não ter me deixado desistir em situações de desânimo.

À Brisa, que hoje não está mais no laboratório, mas que foi peça fundamental no início desse trabalho.

Aos primeiros amigos do NNC, Hércules e Lu (Luciana Drummond) pelas confidências e risadas durante os intermináveis experimentos.

Aos demais amigos do laboratório, Paulet (Paula), Queridona (Ana Raquel), Lu (Bomba), Vini (Vinícius), Hyorrana, Onésia, Roberta, Daniel, Flávio e Tomáz por

fazerem do NNC um lugar gostoso de trabalhar, onde solidariedade é uma palavra comum a todos.

Aos colegas e professores dos laboratórios de Fisiologia Cardiovascular e Sinalização de Cálcio pela ajuda imediata, sempre que necessária.

À Prof^a Maria Aparecida Vieira por ter me permitido, sem qualquer objeção, o livre acesso nas dependências do seu laboratório durante a realização de consecutivos protocolos experimentais.

Aos demais professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelas aulas e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento por se mostrarem sempre muito prestativos e dispostos a facilitar o nosso dia a dia.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade.

“Mas você - eu não posso e nem quero explicar, eu agradeço”

Clarice Lispector

Figuras e Tabelas	X
Abreviaturas e Símbolos	XII
Resumo	XVI
Abstract	XVIII
Introdução	1
1. Perspectiva Histórica.....	1
2. O Sistema Endocanabinóide.....	3
3. Sistema Endocanabinóide e Memória.....	6
4. Memória e Exercício Físico.....	9
5. Sistema Endocanabinóide: Exercício Físico e Memória.....	12
Justificativa	14
Objetivos	15
Material e Métodos	16
1. Animais	16
2. Protocolo de Exercício Físico	16
3. Administração das Drogas	18
4. Avaliação Comportamental	18
4.1. Reconhecimento Espacial de Objeto	18
4.2. Labirinto em Y.....	19
4.3. Suspensão da Cauda	20
4.4. Nado Forçado.....	21
4.5. Labirinto em Cruz Elevado.....	22
4.6. Campo Aberto.....	23

5. Análises Bioquímicas.....	24
5.1. Imunofluorescência.....	24
5.1.1. Administração de BrdU	24
5.1.2. Perfusão e Preparo das Fatias	25
5.1.3. Dupla Marcação: <i>BrdU e NeuN</i> ; <i>BrdU e GFAP</i>	25
5.1.4. Microscopia e Análise das Imagens.....	27
5.2. Western Blotting.....	28
5.2.1. Preparação da Amostra.....	28
5.2.2. Eletroforese em Gel, Transferência, Bloqueio e Incubação da Membrana com Anticorpo Primário	29
5.2.3. Revelação da Membrana.....	29
5.3. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> –ELISA.....	30
5.3.1. Preparação da amostra.....	30
5.3.2. Sensibilização, Bloqueio, Anticorpos de Detecção e Reação com Estreptavidina	30
6. Análises Estatísticas.....	31
Resultados	33
Discussão	48
Conclusão	56
Referências Bibliográficas	57
Anexos	73

Figuras

Figura 1	Imagem da planta: <i>Cannabis Sativa</i>	2
Figura 2	Estrutura bidimensional de canabinóides presentes em mamíferos.....	5
Figura 3	Imagem representativa das etapas do teste de <i>Reconhecimento Espacial de Objeto</i>	19
Figura 4	Figura esquemática e imagem respresentativa do aparato utilizado no teste do <i>Labirinto em Y</i>	20
Figura 5	Figura esquemática e imagem representativa do teste de <i>Suspensão da Cauda</i>	21
Figura 6	Figura esquemática e imagem representativa do teste do <i>Nado Forçado</i> ...	22
Figura 7	Figura esquemática e imagem respresentativa do aparato utilizado no teste do <i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	23
Figura 8	Figura esquemática e imagem respresentativa do aparato utilizado no teste do <i>Campo Aberto</i>	24
Figura 9	Imagem representativa do procedimento de <i>Imunofluorescência</i> com dupla marcação.....	28
Figura 10	O receptor CB ₁ é importante para a melhora da memória espacial induzida pelo exercício.....	34
Figura 11	O exercício físico na esteira durante 7 dias ou os tratamentos com URB597 e AM251 associados ou não ao exercício não afetam a memória de trabalho em camundongos.....	35
Figura 12	O exercício físico na esteira durante 7 dias não afeta o comportamento dos animais no teste de <i>Suspensão da Cauda</i>	36
Figura 13	O exercício físico na esteira durante 7 dias não afeta o comportamento dos animais no teste do <i>Nado Forçado</i>	37
Figura 14	O receptor CB ₁ é importante para a sinalização canabinóide durante o exercício físico.....	38
Figura 15	A expressão do receptor CB ₂ não é alterada durante o exercício físico.....	39
Figura 16	O receptor CB ₁ é importante para a expressão do BDNF induzida pelo exercício físico.....	40
Figura 17	Os níveis das neurotrofinas, NGF, NT3 e NT4, não são alterados pelo exercício físico.....	41
Figura 18	O receptor CB ₁ é importante para a proliferação celular hipocampal induzida pelo exercício físico.....	43

Figura 19	O receptor CB ₁ é importante para a astro-gliogênese hipocampal induzida pelo exercício físico.....	44
Figura 20	A neurogênese induzida pelo exercício é dependente da sinalização canabinóide.....	45
Figura 21	Antagonistas do receptor CB ₁ ou inibidores da FAAH não apresentam efeitos sobre o comportamento de ansiedade (tipo-ansioso) e atividade locomotora 24 horas após a administração.....	45

Tabelas

Tabela 1	Nível médio de atividade dos animais durante o teste de <i>Reconhecimento Espacial de Objeto</i>	34
-----------------	--	----

Abreviaturas

Δ9-THC ou THC: Delta-9- tetrahydrocannabinol

μl: Microlitro

μm: Micrômetros

2-AG: 2-aracdonil-glicerol

AEA: Aracdonil-etanolamina (Anandamida)

AM251: Antagonista seletivo do receptor CB₁

AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA: Análise de variância

BDNF: *Brain derived neurotrophic factor* (Fator neurotrófico derivado do cérebro)

BrdU: *5-bromo-2'-deoxyuridine* (5-bromo-2'-deoxiuridina)

BSA: *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)

CB₁: receptor canabinóide tipo 1

CB₂: receptor canabinóide tipo 2

CEBIO: Centro de bioterismo

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

cm: Centímetros

CP55,940: Agonista sintético do receptor CB₁

DAG: Diacil-glicerol-lipase

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio enzimático imunoadsorvente)

FAAH: *Fatty acid amide hydrolase* (Ácido graxo amida hidrolase - enzima)

Fig.: Figura

GABA: Ácido-gama- amino-butírico

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein* (proteína ácida fibrilar glial)

GPCR: *G-Protein-Coupled-Receptor* (Receptor acoplado a proteína G)

HCl: Ácido Clorídrico

HRP: *Horseradish peroxidase* (Peroxidase de raiz forte ou rabanete)

i.p: Intraperitoneal

kg: Kilograma

LTP: *Long-Term Potentiation* (Potencial de longa-duração)

m: Metro

M: Mol

mg: Miligrama

min.: Minuto

ml: Mililitro

mM: Milimolar

NaCl: Cloreto de Sódio

NeuN: Proteína nuclear específica de neurônio

NGF: *Nerve growth factor*

NGS: *Normal goat serum* (soro de cabra natural)

NT3: Neurotrofina 3

NT4: Neurotrofina 4

OPD: *O-Phenylenediamine* (Orto-fenildiamina)

PBS: Phosphate-buffered saline (solução de salina tamponada)

PBS-T: Phosphate-buffered saline plus Triton-X100 (solução de salina tamponada com triton-X100)

pH: Potencial de hidrogênio

PMSF: *Phenylmethanesulfonyl fluoride* (Fluoreto de metilfenilsulfonil)

PVDF: *Poly(vinylidene fluoride)* (Fluoreto de polivinilideno)

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*(Dodecil sulfato de sódio)

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

SR141716A: Antagonista do receptor CB₁

TBS-T: Tampão tris acrescido com Tween 20 a 0,1%

TRIS: Tris(hidroximetil) aminometano

URB597: Inibidor seletivo da FAAH

W: Watts

WIN55.212.2: Agonista sintético do receptor CB₁

Símbolos

#: diferença estatisticamente significativa intra-grupo

Δ: Delta

λ: Gama

>: Maior que

*: diferença estatisticamente significativa inter-grupo

<: Menor que

=: Igual

±: Mais ou menos

°: Grau

μ : Micro

n: Amostra

p: erro alfa

Resumo

É bem conhecido que o exercício físico apresenta efeitos positivos sobre funções cognitivas e a plasticidade hipocampal. Entretanto, as bases moleculares relacionadas aos seus efeitos sobre a memória ainda não são completamente compreendidas. Neste estudo nós investigamos a hipótese de que a melhora da memória promovida pelo exercício físico depende da facilitação do sistema endocanabinóide. Nós observamos que a memória espacial (mas não a de trabalho), avaliada pelo teste de reconhecimento espacial de objeto, não persiste em camundongos sedentários, mas o exercício físico realizado durante uma semana foi capaz de melhorá-la. Além disso, o exercício foi capaz de promover aumento na expressão hipocampal do receptor CB₁ (mas não do receptor CB₂), do BDNF (mas não de, NT3, NT4 e NGF) assim como induziu aumento na proliferação celular, astro-gliogênese e neurogênese no giro denteado. Nenhuma alteração foi encontrada em comportamentos tipo-ansiedade, tipo-depressão e atividade locomotora. Para verificar se as alterações observadas necessitavam da ativação do receptor CB₁, nós tratamos os animais com um antagonista seletivo, AM251, antes de cada sessão de exercício físico. De acordo com a nossa hipótese, essa droga preveniu a melhora da memória induzida pelo exercício e o aumento da expressão do BDNF. Além disso, o AM251 bloqueou o aumento da expressão de CB₁ e impediu a ocorrência da proliferação celular, astro-gliogênese e neurogênese. Para testar se a facilitação da sinalização endocanabinóide poderia mimetizar os efeitos observados após o exercício, nós tratamos os animais sedentários, durante uma semana, com uma droga que impede a hidrólise da anandamida, o URB597 (inibidor da FAAH). Os animais tratados com essa droga melhoraram a memória espacial e aumentaram a expressão de CB₁ e BDNF no hipocampo assim como a proliferação celular, astro-gliogênese e neurogênese,

mostrando que a potencialização da sinalização canabinóide igualmente beneficia a memória. Em resumo, nossos resultados mostraram que os efeitos do exercício físico sobre a memória espacial, expressão de BDNF, proliferação celular, astro-gliogênese e neurogênese dependem da sinalização do receptor CB₁, o que pode ser mimetizado, em animais sedentários, pela inibição da hidrólise da anandamida. Assim, nossos resultados sugerem que, pelo menos em parte, o efeito promnésico do exercício físico depende da ativação do receptor CB₁ e é mediado pelo BDNF, possivelmente, por ele induzir um processo de neurogênese hipocampal.

Palavras-chave: Hidrolase de Amida de Ácido Graxo; Receptor Canabinóide; AM251; Hipocampo; Esteira; Memória

Abstract

It is well known that physical exercise has positive effects on cognitive functions and hippocampal plasticity. The underlying mechanisms, however, have remained to be further investigated. Here we tested the hypothesis that the memory-enhancement promoted by physical exercise relies on facilitation of the endocannabinoid system. We observed that the spatial memory (not working memory) tested in the object location paradigm did not persist in sedentary mice, but could be improved by 1 week of treadmill running. In addition, exercise up-regulated both CB₁ receptor (but not CB₂) and BDNF expression (but not NT3, NT4 and NGF) in the hippocampus. It also induced increase in cellular proliferation, astroglialgenesis and neurogenesis in the dentate gyrus. No alterations were observed regarding anxiety- and depression-like behaviours and locomotor activity. To verify if the changes observed required the CB₁ activation, we treated the mice with the selective antagonist, AM251, before each period of physical activity. In line with our hypothesis, this drug prevented the exercise-induced memory enhancement and BDNF expression. Furthermore, AM251 blocked the increase of the CB₁ expression and prevented the cellular proliferation, astroglialgenesis and neurogenesis. To test if facilitating the endocannabinoid system signaling would mimic the alterations observed after exercise, we treated sedentary animals during 1 week with the anandamide-hydrolysis inhibitor, URB597 (FAAH inhibitor). Mice treated with this drug improved spatial memory and have increased levels of CB₁ and BDNF expression in the hippocampus as well as increased cellular proliferation, astroglialgenesis and neurogenesis, showing that potentiating the endocannabinoid system equally benefits memory. In summary, our results showed that the favorable effects of exercise upon spatial memory, BDNF expression, gliogenesis and

neurogenesis depend of CB₁ receptor signaling, which can be mimic, in sedentary animals, by inhibition of anandamide hydrolysis. Thus, our results suggest that, at least in part, the promnesic effect of the exercise is dependent of CB₁ receptor activation and is mediated by BDNF, possibly by increased hippocampal neurogenesis.

Key words: Fatty Acid Amide Hydrolase; Cannabinoid Receptor; AM251; Hippocampus; Treadmill; Memory

Introdução

1. Perspectiva Histórica

A planta *Cannabis sativa* (Figura 1), popularmente conhecida como cânhamo ou maconha, vem sendo cultivada e utilizada pelo homem por milhares de anos, tanto para a obtenção de fibras para manufatura têxtil quanto para fins recreacionais ou medicinais (Smith e Fathi, 2005). Entretanto, apesar do seu uso popular, foi só no século XIX, em 1848, que a *Cannabis* recebeu atenção por parte da comunidade científica, período no qual a *Farmacopéia Britânica* reconheceu os seus efeitos psicotrópicos e destacou suas propriedades analgésica e anti-espasmódica (Piomelli, 2003).

Embora nesta época a busca pelo seu componente químico ativo tenha sido bastante intensa (Piomelli, 2003) foi somente em 1967 que o constituinte ativo da *Cannabis* foi identificado, um composto terpenóide, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (Mechoulam e Gaoni, 1967; Piomelli, 2003), ao qual, rapidamente, foram atribuídas as propriedades psicoativas da planta (Paton, 1975). Apesar dessa observação, o mecanismo de ação do Δ^9 -THC não foi tão facilmente elucidado, em parte, devido a dificuldades relacionadas à natureza hidrofóbica do composto. Sustentava-se a hipótese de que não haveria um sítio de ligação específico para este composto e seus derivados, denominados canabinóides (Paton, 1975). Nesta época, acreditava-se que o principal mecanismo de ação de tais substâncias consistia na dispersão e interação dessas moléculas com a bicamada lipídica da membrana celular, o que seria capaz de modificar sua fluidez (Hillard *et al.*, 1985).

Apesar dessa hipótese ter sido aceita por algum tempo, tornou-se evidente que ela não explicava, adequadamente, a farmacologia dos canabinóides, já que os efeitos

característicos do Δ^9 -THC, como, analgesia, hipotermia, catalepsia e redução do controle motor, eram intimamente relacionados às doses utilizadas e a pequenas variações na estrutura química de sua molécula (Piomelli, 2003), o que sugeria a existência de um mecanismo envolvendo a presença de receptores específicos. O primeiro indício de que o mecanismo de ação dos canabinóides poderia ser mediado por receptores de membrana foi demonstrado por Howlett *et al.* (1984). Utilizando cultura de neuroblastoma, foi observado que o Δ^9 -THC diminuía a formação do segundo mensageiro, monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (Howlett, 1984). Posteriormente, esse achado foi complementado por estudos com ligantes marcados radioativamente (“*binding*”) (Devane *et al.*, 1988) e pela identificação da localização do receptor canabinóide no cérebro do rato (Herkenham *et al.*, 1990). Finalmente, em 1990, um receptor específico para os canabinóides foi clonado e sequenciado (Matsuda *et al.*, 1990) culminando, mais tardiamente, com a identificação e caracterização do *Sistema Endocanabinóide* (Piomelli, 2003; Di Marzo, 2008).



Figura 1: IMAGEM DA PLANTA *CANNABIS SATIVA*.

2. O Sistema Endocanabinóide

O *Sistema Endocanabinóide*, como qualquer outro sistema de neurotransmissão, já previamente identificado (por exemplo, dopaminérgico), é composto por ligantes endógenos, maquinaria celular responsável pela síntese e degradação desses ligantes e por receptores específicos (Bisogno *et al.*, 2005; Wang e Ueda, 2009).

Os receptores canabinóides, CB₁ e CB₂ (assim chamados pela ordem cronológica em que foram identificados) apresentam sete domínios transmembrana e pertencem à superfamília dos receptores de membrana acoplados a proteína G_{i/o} (GPCR; *G-Protein-Coupled-Receptor*) (Bisogno *et al.*, 2005). A ativação desses receptores, tipicamente, inibe a adenilato ciclase com consequente fechamento dos canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo N e P/Q (Wilson e Nicoll, 2002; Piomelli, 2003), abertura dos canais para potássio (Howlett *et al.*, 2002) e estimulação de proteínas quinases (Ameri, 1999).

O receptor CB₁ é o receptor metabotrópico mais abundante no sistema nervoso central (SNC), apesar de também ser encontrado no sistema nervoso periférico (SNP). Ele é expresso, predominantemente, em neurônios pré-sinápticos, sendo densa sua distribuição nos núcleos da base, cerebelo, hipocampo, algumas regiões do córtex cerebral, estriado ventral, amígdala, substância cinzenta periaquedutal e em núcleos do hipotálamo (Herkenham *et al.*, 1990; Di Marzo, 2009). Acredita-se que, por apresentar essa ampla distribuição no SNC, ele seja o responsável por mediar os efeitos centrais dos canabinóides (Cabral e Marciano-Cabral, 2005; Di Marzo, 2009). Já os receptores CB₂ estão presentes nas células do sistema imunológico, especialmente em linfócitos B, T, mastócitos e macrófagos, portanto estão envolvidos, primariamente, com respostas

inflamatórias (Munro *et al.*, 1993; Galiegue *et al.*, 1995). Entretanto, trabalhos recentes demonstraram a presença de receptores CB₂ em neurônios e células gliais (Brusco *et al.*, 2008), porém o seu papel fisiológico no SNC ainda não é bem entendido. Existem também evidências farmacológicas e fisiológicas que sugerem a existência de outros subtipos de receptores canabinóides, porém eles ainda não foram isolados nem clonados (Di Marzo *et al.*, 2004).

Os principais agonistas endógenos dos receptores canabinóides (ou seja, endocanabinóides) são a aracdonil-etanolamida (AEA), mais conhecida como anandamida (que significa “felicidade” no sânscrito) e o 2-aracdonil-glicerol (2-AG), ambos compostos derivados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, principalmente do ácido aracdônico (Mechoulam *et al.*, 1998; Di Marzo e Matias, 2005). Além desses, outros ligantes, também derivados do ácido aracdônico, foram propostos como possíveis endocanabinóides, são eles: a N-aracdonoil-dopamina (Bisogno *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002), o 2-aracdonoil-gliceril éter (noladina) (Hanus *et al.*, 2001) e a O-aracdonoil-etanolamina (virodamina) (Porter *et al.*, 2002) (Figura 2).

A anandamida e o 2-AG não estão confinados no sistema nervoso central, eles agem também como mediadores locais em muitos tecidos e são produzidos por “demanda” após alterações agudas ou crônicas da homeostase celular (Marsicano *et al.*, 2003). A atividade desses compostos é restrita no tempo e no espaço devido a uma série de fatores, como por exemplo, a dependência de fosfolípides, a sensibilidade de algumas enzimas ao íon cálcio e a natureza lipofílica destes compostos (Di Marzo, 2009).

Segundo o modelo atual, os endocanabinóides agem como mensageiros cerebrais retrógrados (Christie e Vaughan, 2001; De Petrocellis *et al.*, 2004). O estímulo

começa no neurônio pós-sináptico e a excitação neuronal leva à despolarização e ao consequente influxo de íons cálcio o que, por sua vez, estimula fosfolipases de membrana iniciando, assim, a síntese dos endocanabinóides. Estes não ficam armazenados em vesículas, sendo prontamente sintetizados e liberados quando são necessários. Portanto, a sua disponibilidade é regulada por mecanismos de captação-degradação (Christie e Vaughan, 2001). Uma vez na fenda sináptica, eles se difundem livremente para ativar os receptores (especialmente o CB₁) localizados nos terminais pré-sinápticos neuronais (Di Marzo e Matias, 2005). Por atuarem sobre terminais pré-sinápticos, alguns achados sugerem que os endocanabinóides podem regular a liberação de diversos neurotransmissores (Murray *et al.*, 2007) incluindo o ácido- λ -aminobutírico (GABA), glutamato, noradrenalina, acetilcolina e dopamina (Chaperon e Thiebot, 1999).

Após liberados, eles são inativados, principalmente, por recaptação por neurônios e glia e, posteriormente, hidrolizados por enzimas específicas. A anandamida é hidrolisada pela enzima hidrolase de amida de ácido graxo (*Fatty Acid Amide Hydrolase* - FAAH) em etanolamina e ácido aracdônico. Já o 2-AG é metabolizado, principalmente, pela enzima diacil-glicerol lipase (DAG) (Mechoulam *et al.*, 1998; Goparaju *et al.*, 1999; Di Marzo *et al.*, 2005), finalizando dessa forma o ciclo de produção-degradação.

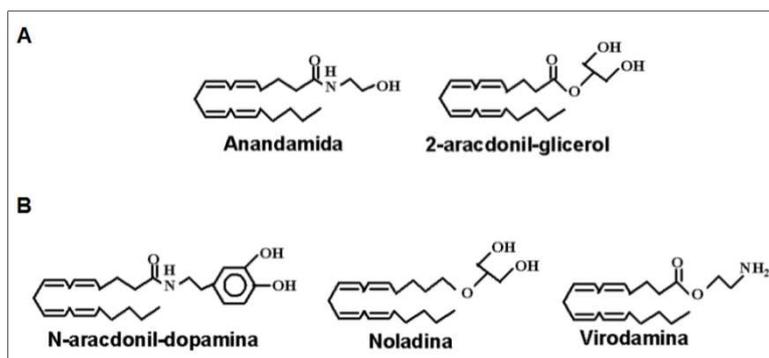


Figura 2: ESTRUTURA BIDIMENSIONAL DE ENDOCANABINÓIDES PRESENTES EM MAMÍFEROS.

(A) Principais endocanabinóides. (B) Possíveis endocanabinóides. Modificado de Di Marzo e cols.(Piomelli, 2003).

3. Sistema Endocanabinóide e Memória

Devido à ampla distribuição dos receptores CB_1 no SNC, especialmente no hipocampo (Matsuda *et al.*, 1990; Davies *et al.*, 2002), cuja importância nos fenômenos de aprendizado e memória já estão bem estabelecidos (Broadbent *et al.*, 2004), não é surpresa que essa estrutura seja facilmente modulada por exo e endocanabinóides. Consistente com isso, estudos mostraram por diferentes paradigmas (como o labirinto radial de 8 braços, labirinto em T, teste de reconhecimento de contexto, labirinto aquático de Morris, dentre outros) que a utilização de canabinomiméticos, naturais ou sintéticos, administrados de forma central ou periférica, pode afetar diretamente respostas cognitivas mediadas pelo hipocampo.

Por exemplo, Wise *et al.* (2009) demonstraram que a administração intraperitoneal de THC ou do agonista canabinóide sintético, CP55,940, prejudica a memória espacial de ratos no labirinto radial de oito braços (Wise, Thorpe, *et al.*, 2009). Trabalhos que utilizaram microinjeções intrahipocampal de Δ^9 -THC (Egashira *et al.*, 2002) e CP55,940 (Lichtman *et al.*, 1995) encontraram resultados semelhantes.

De acordo com Suenaga *et al.* (2002) outros agonistas sintéticos, como o WIN55.212.2, quando administrados diretamente no hipocampo também promovem efeitos deletérios sobre o desempenho de ratos em tarefas de memória espacial e de trabalho, de maneira dose-dependente (Suenaga *et al.*, 2008). Além disso, a infusão local do antagonista CB₁, SR141716A, (Wise, Thorpe, *et al.*, 2009) ou a deleção genética do receptor CB₁ (Varvel e Lichtman, 2002) é capaz de prevenir os déficits de memória induzidos pelos agonistas canabinóides, o que sugere que a ativação do receptor CB₁ interfere com a modulação de funções cognitivas.

De fato, algumas evidências obtidas através de estudos de eletrofisiologia mostraram que o receptor CB₁ está envolvido em mecanismos importantes relacionados ao processo de formação de memória como, por exemplo, o fenômeno de potenciação de longa duração (*Long Term-Potentialiation – LTP*) (Terranova *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1998), o qual consiste em um processo de facilitação do sistema nervoso que tem como consequência a amplificação da magnitude da resposta pós-sináptica (Izquierdo, 2002). De acordo com Terranova *et al.* (1995) o bloqueio da LTP induzido por canabinóides ocorre via ativação do receptor CB₁. Em seu estudo eles demonstraram, em fatias de hipocampo de ratos, que na presença de antagonistas do receptor CB₁ a anandamida ou o WIN55.212.2 não são capazes de bloquear o fenômeno da LTP, mostrando que o receptor CB₁ está envolvido nesse processo (Terranova *et al.*, 1995). Paton *et al.* (1998) em um estudo que falhou em demonstrar o envolvimento da transmissão GABAérgica nesse contexto encontraram resultados semelhantes (Paton *et al.*, 1998). Em um trabalho mais recente, Hoffman *et al.* (2007) também relataram que o tratamento por 7 dias com THC bloqueia a ocorrência da LTP induzida tanto por estímulo de alta frequência quanto por estimulação theta por um mecanismo envolvendo a ativação do receptor CB₁ (Hoffman *et al.*, 2007).

Enquanto a utilização de extratos da *Cannabis* e de agonistas canabinóides sintéticos (ambos exocanabinóides) são bem conhecidos por seus efeitos deletérios sobre a função hipocampal e memória (Egashira *et al.*, 2002; Suenaga *et al.*, 2008), alguns estudos sugerem que o aumento endógeno dos níveis de endocanabinóides, especialmente da anandamida, pode ter efeitos positivos sobre funções cognitivas. Por exemplo, camundongos *knockout* para a enzima FAAH apresentam melhor desempenho durante a aquisição do aprendizado em tarefas aversivas quando comparados com animais selvagens (Wise, Harloe, *et al.*, 2009). De forma semelhante, a inibição farmacológica da FAAH, através da utilização do URB597, também apresenta efeitos satisfatórios em melhorar a memória utilizando uma tarefa de esQUIVA passiva (Mazzola *et al.*, 2009). Em tarefas de memória espacial, tanto a deleção genética quanto a inibição farmacológica da FAAH facilitam a ocorrência dos eventos de aquisição e extinção (Varvel *et al.*, 2007), sugerindo que a facilitação canabinóide, possivelmente, através do aumento dos níveis endógenos de endocanabinóides, pode induzir efeitos pró-cognitivos.

No que se refere à questões celulares, alguns trabalhos encontraram evidências de que os endocanabinóides podem estar associados a eventos ligados ao aprimoramento cognitivo, como a produção de neurotrofinas (Raichlen *et al.*, 2013) e a proliferação celular hipocampal (Hill *et al.*, 2010). Apesar disso, a importância dos endocanabinóides na função hipocampal, especialmente nos mecanismos de aprendizado e memória, ainda não foi bem estabelecida e permanece controversa (Elphick e Egertova, 2001; Panlilio *et al.*, 2013).

4. Memória e Exercício Físico

Alguns trabalhos mostraram que vários fatores (Aguado *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 2006; Olson *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2013), incluindo o exercício físico (Bekinschtein *et al.*, 2011), são capazes de influenciar o funcionamento hipocampal e, portanto, interferir com fenômenos cognitivos. Neste contexto, técnicas de neuroimagem assim como a aplicação de testes de memória vêm sendo, amplamente, utilizados para avaliar os efeitos do exercício físico sobre a atividade e o funcionamento do SNC (Hillman *et al.*, 2008).

Vários trabalhos demonstraram que o exercício físico apresenta impacto positivo na função cerebral e na qualidade de vida dos indivíduos (Cotman e Berchtold, 2002; Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005; Hillman *et al.*, 2008). Por exemplo, um estudo realizado por Clarkson-Smith e cols. (1989), utilizando a aplicação de testes específicos, investigou a relação entre o exercício físico e a melhora de habilidades cognitivas em 62 indivíduos idosos. Neste estudo, os participantes, após responderem um questionário (capaz de traçar o nível de atividade física de cada indivíduo), foram submetidos à realização de tarefas que envolviam raciocínio, memória de trabalho e tempo de reação. Após as análises multivariadas que levaram em consideração fatores como idade e escolaridade, os resultados mostraram que o desempenho dos indivíduos que realizaram exercício físico foi melhor em todos os parâmetros avaliados quando comparados com indivíduos que não se exercitaram (Clarkson-Smith e Hartley, 1989).

As adaptações que o exercício físico promove no cérebro de indivíduos que se exercitam são bastante variadas e parecem depender de diversos fatores como: a intensidade, duração/tempo e modalidade do exercício em questão. Dessa forma, dependendo do parâmetro avaliado, um tipo de exercício pode apresentar melhor

resultado que outro. Por exemplo, de acordo com Lou *et al.* (2008) o exercício físico de baixa intensidade (11m/mim, durante 20 min), realizado na esteira (Lou *et al.*, 2008) ou na roda de corrida (Olson *et al.*, 2006), parece ser melhor indutor de neurogênese hipocampal que o exercício realizado em intensidades mais elevadas. Entretanto, para o parâmetro desempenho cognitivo o exercício físico em intensidade moderada (em torno de 60% da carga máxima) parece ser o mais recomendado (Albeck *et al.*, 2006; Drumond *et al.*, 2012).

Em relação à modalidade, Ra *et al.* (2002) relataram que não há diferença entre a natação e a corrida quando o parâmetro avaliado é a proliferação celular (Ra *et al.*, 2002). Entretanto, quando levado em consideração o fato do exercício ser do tipo forçado (corrida em esteira) ou espontâneo (corrida na roda voluntária), Leasure *et al.* (2008) mostraram que eles afetam de forma diferente não somente a proliferação celular hipocampal, mas também o comportamento de roedores (Leasure e Jones, 2008). No que se refere ao fator tempo (duração) alguns autores também mostraram que essa variável pode interferir, por exemplo, com a expressão de genes relacionados à produção de neurotrofinas (Molteni *et al.*, 2002).

Apesar das divergências, é consenso que o exercício físico, independente dos fatores associados (modalidade, duração e intensidade), tem potencial para afetar o funcionamento cerebral, tanto no que se refere ao aspecto celular quanto ao desempenho geral do indivíduo (Cotman e Berchtold, 2002; Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005; Hillman *et al.*, 2008).

Do ponto de vista molecular, o exercício físico aumenta a expressão hipocampal de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Neeper *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2003; Soya *et*

al., 2007) além de induzir, também no hipocampo, proliferação celular, neurogênese (Van Praag *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2006; Bekinschtein *et al.*, 2011) e facilitar a ocorrência da LTP (Van Praag *et al.*, 1999; O'callaghan *et al.*, 2007). Ele também promove aumento de conexões dendríticas e melhora a eficiência das funções de processamento do SNC (Radak *et al.*, 2001). Além disso, nós demonstramos que o exercício é capaz de aumentar a defesa antioxidante hipocampal (Leite *et al.*, 2012) (Anexo II) assim como de reduzir a expressão e a atividade de componentes pró-apoptóticos quando o cérebro é submetido a um dano isquêmico (Anexo II).

No que se refere ao nível comportamental, ele promove melhora do desempenho de humanos (Hillman *et al.*, 2008) e animais (Griffin *et al.*, 2009) em diversas tarefas cognitivas (Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005; Hillman *et al.*, 2008), incluindo aquelas relacionadas à memória (Clarkson-Smith e Hartley, 1989; Suijo *et al.*, 2012). Por exemplo, Erickson *et al.* (2011) em um estudo randomizado e controlado realizado com 120 adultos mostraram que o exercício aeróbio, realizado regularmente, além de aumentar o tamanho do hipocampo (em 2%) induz melhora na memória espacial dos indivíduos exercitados (Erickson *et al.*, 2011).

Em animais, recentemente nosso grupo também demonstrou que ratos submetidos a um protocolo de treinamento físico na piscina, por 8 semanas, apresentam melhora na memória espacial de curta duração quando comparados a animais sedentários (Drumond *et al.*, 2012). Similarmente, um protocolo de exercício físico realizado na esteira por apenas 7 dias, também melhora a memória de reconhecimento de objetos e a LTP no giro denteado de roedores (O'callaghan *et al.*, 2007). Griffin *et al.* (2009) também relataram aumento da expressão de BDNF no hipocampo e córtex perirrinal em roedores submetidos a sessões de exercício na esteira por um período de 7 dias, o que sugere que uma semana de exercício físico (na esteira) é suficiente para

induzir alterações plásticas no hipocampo capazes de refletir em melhora cognitiva (Griffin *et al.*, 2009).

Apesar dessas evidências, os mecanismos moleculares pelos quais o exercício físico modifica a função cerebral e a cognição ainda não são bem definidos.

5. O Sistema Endocanabinóide: Exercício Físico e Memória

Conforme mencionado no item anterior, ainda não é claro como o exercício influencia o funcionamento hipocampal e as funções cognitivas. Entretanto, alguns achados mais recentes sugerem que o sistema endocanabinóide pode ser um dos possíveis candidatos a mediar, pelo menos em parte, os efeitos neurobiológicos induzidos pelo exercício físico.

No que se refere ao envolvimento do sistema canabinóide com respostas cognitivas, alguns trabalhos já apresentaram resultados que mostram que o aumento endógeno de endocanabinóides (especialmente anandamida) parece ser o responsável por facilitar o funcionamento hipocampal. De fato, Varvel *et al.* (2007) (Varvel *et al.*, 2007) e outros (Mazzola *et al.*, 2009; Wise, Harloe, *et al.*, 2009; Panlilio *et al.*, 2013) mostraram que estratégias farmacológicas ou manipulações genéticas que interferem com os níveis endógenos de anandamida aprimoram o desempenho de roedores em tarefas de memória.

Similarmente, alguns estudos (Sparling *et al.*, 2003; Raichlen *et al.*, 2012; Raichlen *et al.*, 2013) também apresentaram evidências que o exercício físico é capaz de alterar os níveis de anandamida o que torna plausível propor que os efeitos cognitivos induzidos pelo exercício são mediados pela ativação do sistema endocanabinóide. O primeiro estudo que apresentou resultados neste sentido foi realizado por Sparling *et al.*

(2003). Neste estudo foram avaliados voluntários que se exercitaram em bicicletas ergométricas ou esteiras por um período de 6 meses. Eles demonstraram que os indivíduos que realizaram o exercício físico, independente da modalidade, apresentaram maiores níveis de anandamida na circulação sanguínea quando comparados a indivíduos sedentários (Sparling *et al.*, 2003). Recentemente, Raichlen *et al.* (2013) também analisaram os níveis circulantes de endocanabinóides em corredores. Eles, além de confirmarem os resultados anteriores, mostraram que a sinalização endocanabinóide depende da intensidade do exercício (Raichlen *et al.*, 2013).

Resultados similares também foram encontrados, em roedores, nos quais 8 dias de exercício foram suficientes para aumentar os níveis de anandamida (Hill *et al.*, 2010) bem como para alterar a expressão de receptores CB₁ no hipocampo (Gomes Da Silva *et al.*, 2010). Outro estudo realizado por Heyman *et al.* (2012), o qual corroborou os resultados anteriores, foi capaz de demonstrar uma correlação positiva entre os níveis de anandamida e os níveis de BDNF (Heyman *et al.*, 2012). Em conjunto, estas evidências sugerem que a ativação endógena do sistema canabinóide, durante o exercício físico, pode ser um dos fatores envolvidos na melhora das funções cognitivas, especialmente a memória, observadas após o exercício físico.

Justificativa

É bem conhecido que o exercício físico afeta, positivamente, o funcionamento do hipocampo e o desempenho cognitivo, entretanto as bases moleculares envolvidas nesse processo ainda não são completamente compreendidas. Apesar de trabalhos anteriores (Sparling *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2010) apresentarem evidências que colocam o sistema endocanabinóide como um potencial candidato para mediar as respostas neurobiológicas induzidas pela prática de exercício físico, pouco se sabe a respeito do envolvimento desse sistema neste contexto.

Até o presente momento, grande parte dos trabalhos que demonstrou resultados neste sentido destinou a mostrar apenas a existência da relação entre exercício físico e a ativação do sistema canabinóide (seja em humanos (Raichlen *et al.*, 2012) ou em roedores (Hill *et al.*, 2010)), sem se preocupar com os mecanismos envolvidos nesse processo ou com a relevância da sinalização canabinóide para facilitar algumas das respostas cognitivas induzidas pelo exercício como, por exemplo, a melhora da memória (efeito promnésico).

Estudos delineados com o objetivo de esclarecer como o sistema endocanabinóide atua durante a prática de exercício físico podem contribuir para o melhor entendimento a cerca da fisiologia desse sistema assim como podem representar uma importante forma de ampliar o conhecimento sobre as bases moleculares da neurobiologia do exercício.

Considerando que os resultados dos estudos de Sparling *et al.* (2003) (Sparling *et al.*, 2003), Hill *et al.* (2010) (Hill *et al.*, 2010) e Raichlen *et al.* (2013, 2012) (Raichlen *et al.*, 2012; Raichlen *et al.*, 2013) estão de acordo com o envolvimento do

sistema endocanabinóide durante a realização do exercício físico e, conhecendo as evidências à respeito dos efeitos do exercício sobre o processo de formação de memória (Van Praag *et al.*, 1999; O'callaghan *et al.*, 2007; Griffin *et al.*, 2009) nós conduzimos esse estudo para testar a hipótese de que o sistema endocanabinóide é um dos responsáveis por mediar o efeito promnésico induzido pelo exercício físico.

Objetivos

Geral: Avaliar o envolvimento do sistema endocanabinóide em mediar o efeito promnésico induzido pelo exercício físico.

Específicos: *Avaliar em camundongos submetidos ou não a um protocolo de exercício físico na esteira por 7 dias:*

- Se o exercício físico induz melhora da memória espacial e de trabalho;
- Se o exercício físico interfere com outros comportamentos hipocampo-dependente como, “comportamento tipo-depressivo” (fenótipo de depressão);
- Se o tratamento, durante o exercício físico, com o antagonista seletivo do receptor CB₁ - AM251 bloqueia o efeito promnésico induzido pelo exercício;
- Se o tratamento de animais sedentários com o inibidor seletivo da FAAH - URB597 mimetiza o efeito do exercício;
- Se o tratamento de animais treinados com o inibidor seletivo da FAAH - URB597 potencializa o efeito do exercício;
- Se o tratamento com o AM251 e URB597 interfere no comportamento geral dos animais, como na locomoção e no comportamento “tipo-ansiedade”.

Avaliar no hipocampo dos mesmos animais citados acima:

- A expressão dos receptores CB₁, CB₂ e BDNF;
- O nível das neurotrofinas: 3, 4 e NGF (*Nerve Growth Factor*);
- A proliferação celular, a astro-gliogênese e neurogênese (no giro denteado)

Material e Métodos

1. Animais

Camundongos *Swiss* machos (n=108; 7-8 semanas de idade), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG biotério) foram alojados em condições ambientais controladas e com livre acesso a alimento e água. Três blocos de 36 animais foram utilizados, por vez, com os seguintes objetivos: Primeiro bloco – destinado à realização das tarefas comportamentais de memória e experimentos de western blotting; segundo bloco – destinado à realização das tarefas para avaliação dos comportamentos de ansiedade e locomoção além dos experimentos de imunofluorescência; terceiro bloco – destinado à realização das tarefas para avaliação do fenótipo de depressão e ensaios imunoenzimáticos pela técnica de ELISA. Todos os experimentos foram conduzidos com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) sob o protocolo n ° 09/2010.

2. Protocolo de Exercício Físico

Todos os animais foram familiarizados com uma esteira motorizada durante três dias consecutivos, 5 min/dia a uma velocidade de 6 m/min e com 5° de inclinação. Posteriormente, os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos (sedentário ou treinado, n = 18 por grupo) e, em seguida subdivididos em três subgrupos de acordo com o tratamento que receberam (veículo, AM251 ou URB597, n = 6/subgrupo). O protocolo de exercício consistiu em 7 dias consecutivos de corrida na esteira com 5° de inclinação, a uma velocidade de 11m/min, uma sessão/dia, durante 30 min, conforme modificação no protocolo proposto por O'callaghan *et al.* (2007) (O'callaghan *et al.*,

2007). Os animais pertencentes ao grupo sedentário foram colocados todos os dias na esteira, 5min/dia, a uma velocidade de 5m/min. O protocolo de exercício forçado foi a primeira escolha em razão dos animais serem menos propensos a correr quando apresentam um bloqueio da sinalização endocanabinóide (Dubreucq *et al.*, 2010; Chaouloff *et al.*, 2011). Apesar disso, o nosso protocolo não envolveu a punição do animal para induzir a corrida.

3. Administração das drogas

Os animais receberam injeções diárias de AM251 - antagonista do receptor CB₁ - (1mg.kg⁻¹) (Hill *et al.*, 2010), URB597 – inibidor da enzima Hidrolase de Amida de Graxo Amida - (0,5 mg.kg⁻¹) (Moreira *et al.*, 2008) ou veículo (1:1:18 - solução de etanol; cremofor EL; solução salina estéril a 0,9%) (Patel e Hillard, 2006; Moreira *et al.*, 2008), durante 7 dias consecutivos, 30 minutos antes do exercício na esteira. Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p) em um volume de 10 ml.kg⁻¹.

4. Avaliação Comportamental

Todos os testes comportamentais foram realizados 24 horas após o último dia de exercício durante a fase clara do ciclo.

4.1. Tarefa de Reconhecimento Espacial de Objeto

Para acessar a memória espacial dependente do hipocampo (Galani *et al.*, 1998) os animais foram submetidos a tarefa de reconhecimento espacial de objeto. Essa tarefa baseia-se no fato dos roedores apresentarem maior interesse em explorar objetos

que não são familiares (ou que aparentemente não são) quando comparados com aqueles familiares (Gresack e Frick, 2006).

Primeiramente, os animais foram habituados a uma caixa retangular durante 5 minutos. Vinte e quatro horas após, os animais foram re-habituados por 1 minuto na mesma caixa e, posteriormente, dois objetos idênticos foram inseridos na mesma. Nesta fase de amostragem, era permitido aos animais investigar livremente os objetos até que eles acumulassem um total de 30 segundos de exploração. Trinta minutos depois (fase de escolha), o mesmo protocolo foi repetido, entretanto um dos objetos teve sua localização modificada (Figura 3). O tempo de exploração em cada um dos objetos foi registrado e utilizado como parâmetro para avaliação da memória espacial (Gresack e Frick, 2006).

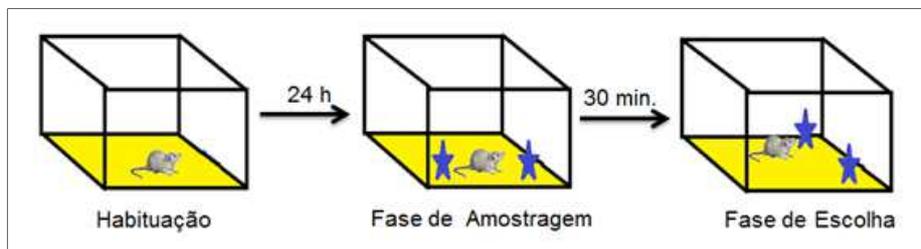


Figura 3: RECONHECIMENTO ESPACIAL DE OBJETO - Imagem representativa das etapas do teste.

4.2. Labirinto em Y

A memória de trabalho imediata foi analisada pela avaliação do comportamento de alternância espontânea do animal durante uma única sessão no labirinto em Y (Lazaroni *et al.*, 2012) (Figura 4). Cada animal foi colocado no final de um dos braços do labirinto e deixado mover-se livremente durante uma sessão de 8 minutos. A série de entradas nos braços foi registrada. A alternância foi definida como

uma entrada sucessiva em três diferentes braços. O número de seqüências de entrada (por exemplo, ABC, BCA) foi definido como o número de alternâncias. A porcentagem de alternância foi calculada de acordo com Lazzaroni *et al.* (2012) (Lazzaroni *et al.*, 2012) conforme a seguinte fórmula: $[\text{total de alternância} / (\text{total de entrada nos braços} - 2)] \times 100$. Uma porcentagem de alternância menor ou igual a 50% (correspondente ao acaso) foi considerada como indicativa de déficit de memória.

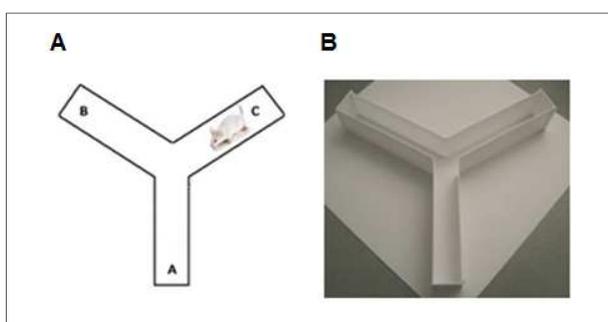


Figura 4: LABIRINTO EM Y - (A) Figura esquemática e (B) imagem representativa do aparato utilizado no teste.

4.3. Suspensão da Cauda

O teste da suspensão da cauda é um modelo amplamente utilizado para analisar compostos farmacológicos com potencial atividade antidepressiva. O teste é baseado no fato de que roedores quando são submetidos a curtos períodos de estresse inescapável tendem a desenvolver uma postura imóvel por se resignarem àquela situação (Steru *et al.*, 1985).

Neste protocolo, com o auxílio de uma fita adesiva, os animais foram suspensos pela cauda e fixados em uma haste posicionada a 50 cm acima do chão. Foi permitido ao animal movimentar-se livremente ao longo de 5 minutos. Entretanto, o tempo total em que o animal permaneceu imóvel, enquanto estava suspenso, foi

registrado (Figura 5). O animal foi considerado imóvel quando apenas o movimento de sua caixa torácica era percebido (Steru *et al.*, 1985).

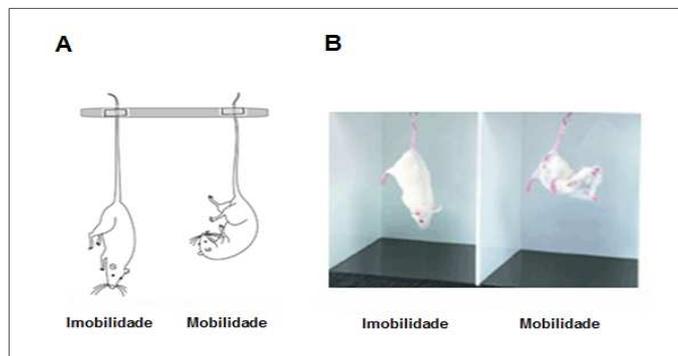


Figura 5: SUSPENSÃO DA CAUDA - (A) Figura esquemática e (B) imagem representativa do teste de *Suspensão da Cauda* mostrando os comportamentos dos animais em situações de imobilidade e mobilidade, respectivamente. (Modificado de Abelaira e cols.(2013) (Abelaira *et al.*, 2013) e *getdomainsvids.com.*, respectivamente)

4.4. Nado Forçado

O teste do nado forçado foi executado conforme proposto por Porsolt *et al.* (1977) (Porsolt *et al.*, 1977). Esse teste baseia-se na observação de que quando um roedor é obrigado a nadar em uma situação na qual não há escapatória, após um período de atividade, ele tende a parar os movimentos, fazendo o mínimo esforço, apenas para manter a cabeça fora da água. Esse comportamento de imobilidade sugere um estado de “desespero” do animal, no qual ele aprende que não há saída e acaba desistindo de nadar (Porsolt *et al.*, 1977).

Neste protocolo os animais foram colocados individualmente em um cilindro de vidro transparente (20 cm x 40 cm) contendo água limpa à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e profundidade de 25 cm. Foi permitido ao animal nadar livremente neste recipiente por um período de

5 minutos. O tempo que o animal permaneceu imóvel na água foi registrado. O animal foi considerado imóvel quando apenas o movimento da caixa torácica era percebido (Figura 6). Ao término da sessão, os animais foram retirados do cilindro, secos com o auxílio de uma flanela e deixados por 15 minutos sob uma lâmpada de luz vermelha (40W) (Porsolt *et al.*, 1977).

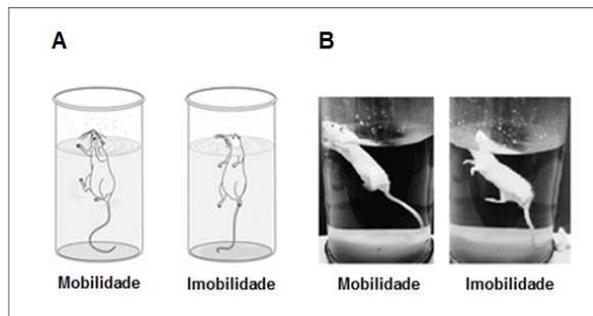


Figura 6: NADO FORÇADO - (A) Figura esquemática e (B) imagem representativa do teste do *Nado Forçado* mostrando os comportamentos dos animais em situações de mobilidade e imobilidade, respectivamente. (Modificado de Abelaira e cols.(2013) (Abelaira *et al.*, 2013) e retirado de German Neuroscience Society – GNS, respectivamente)

4.5. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado é um método utilizado para a avaliação do comportamento incondicionado de ansiedade (tipo-ansiedade), de ratos e camundongos, o qual se baseia no comportamento natural de exploração dos mesmos mediante ambientes novos e na sua aversão natural a áreas abertas e elevadas (Lister, 1987).

O aparato é constituído de 4 braços, 2 abertos (30 cm x 5 cm) e 2 fechados (30 cm x 5 cm x 15 cm), elevados a 50 cm do chão e dispostos perpendicularmente, uns aos outros, se cruzando ao centro (6 cm x 6 cm)(Figura 7). Os animais têm acesso a todos os braços. Durante a realização da tarefa o animal foi permitido circular livremente entre

os braços abertos e fechados do labirinto durante 5 minutos. Uma vez que os animais têm medo inato de lugares abertos e elevados, eles tendem a permanecer por um curto período nos braços abertos, em comparação com os braços fechados. O número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos foram utilizados como índices de ansiedade induzida pelo espaço aberto (Lister, 1987; Moreira *et al.*, 2008).

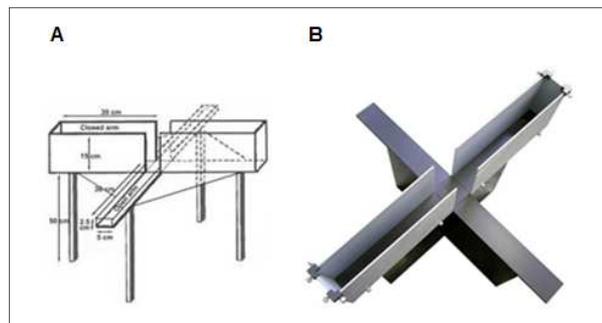


Figura 7: LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO – (A) Figura esquemática e (B) imagem representativa do aparato utilizado no teste do *Labirinto em Cruz Elevado*

4.6. Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea dos animais foi avaliada no teste do campo aberto (Sousa *et al.*, 2006). O campo aberto consiste de uma caixa aberta de 60 cm x 40 cm x 60 cm, com o piso subdividido em 16 quadrantes (Figura 8). Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena, durante uma sessão única. O número de segmentos cruzados e o tempo gasto pelos animais no quadrante central da arena foram analisados durante 300 segundos.

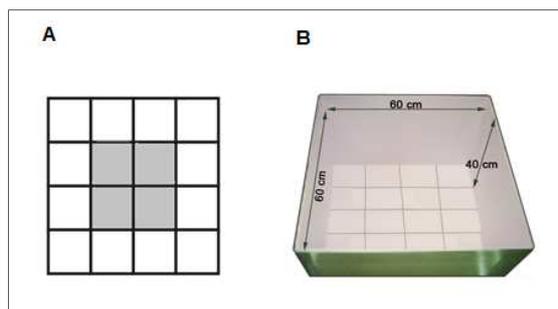


Figura 8: CAMPO ABERTO - (A) Figura esquemática e (B) imagem representativa do aparato utilizado no teste do *Campo Aberto*

5. Análises Bioquímicas

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no hipocampo dos animais, os quais foram extraídos, imediatamente, após a realização das tarefas comportamentais.

5.1. Imunofluorescência

5.1.1. Administração de BrdU

O 5-bromo-2'-deoxiuridina ou BrdU, foi utilizado como marcador da proliferação de células precursoras neurais. O BrdU é um análogo da timidina, o qual incorpora ao DNA das células durante a fase-S da mitose (fase de autoduplicação do DNA). Logo, o BrdU é amplamente utilizado como um marcador de proliferação celular (Van Praag *et al.*, 1999). Um grupo de 36 animais recebeu 1 injeção diária de BrdU, (Sigma) intraperitonealmente, (diluído em solução de NaCl a 0,9%), na dose de 75 mg/kg, durante 7 dias, 60 minutos antes da realização do protocolo de exercício físico na esteira.

5.1.2. Perfusão e Preparo das Fatias

Vinte e quatro horas após a última injeção de BrdU, os animais foram profundamente anestesiados (xilazina, 15 mg/Kg e cetamina, 80 mg/kg) e submetidos à perfusão transcardíaca com 10 ml de solução salina tamponada (PBS - 0,1M), seguida de 10 ml de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Após a perfusão os encéfalos foram coletados e pós-fixados na solução fixadora, durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, os encéfalos foram transferidos para uma solução contendo sacarose a 30% diluída em tampão fosfato 0,1M. Após 72 horas, os encéfalos foram congelados e cortados em fatias de 40µm com o auxílio de um criostato (Monteiro *et al.*, 2014). Fatias contendo a região do hipocampo dorsal foram identificadas com o auxílio de um atlas (Franklin, 2001), coletadas e armazenadas a 4°C em solução crioprotetora até a realização dos procedimentos para a imunofluorescência com dupla marcação (Figura 9).

5.1.3. Dupla Marcação: *BrdU e NeuN*; *BrdU e GFAP*

A imunofluorescência com dupla marcação foi utilizada para a avaliação da proliferação celular e identificação da população celular (astrócitos e neurônios) que, eventualmente, havia proliferado ao longo dos 7 dias de experimento (Van Praag *et al.*, 1999). O método utilizado foi o *free-floating*, conforme Monteiro *et al.* (2014) (Monteiro *et al.*, 2014).

Primeiramente, as fatias contendo o hipocampo foram, consecutivamente lavadas em: PBS a 0,01M (3 vezes por 5 minutos), PBS-T (PBS a 0,01M associado a 0,3% Triton-X100 v/v; 3 vezes por 5 minutos) e NaCl, 0,9% (3 vezes por 5 minutos). Em seguida, elas foram incubadas, a 37°C, por 10 e 30 minutos em solução de HCl a

2M e 3M, respectivamente. Posteriormente, as fatias foram lavadas em tampão borato a 0,1M (3 vezes por 5 minutos) e em PBS-T (3 vezes por 5 minutos). Imediatamente após a última lavagem elas foram submetidas à etapa de bloqueio.

A etapa de bloqueio foi realizada, por 1 hora, utilizando soro normal de cabra (*Normal Goat Serum - NGS*) a 5% em PBS-T. Após essa etapa, foram adicionados aos poços contendo as fatias os anticorpos primários anti-BrdU (1:800, monoclonal de rato - *Abcam*), anti-NeuN (1:500, monoclonal de camundongo - *Millipore*) e o anti-GFAP (1:500, policlonal de coelho - *Millipore*). A incubação foi realizada a 4°C, sob leve agitação, por um período de 72 horas, para a marcação do BrdU e por 24 horas para a marcação do NeuN e GFAP.

Após o período de incubação com os anticorpos primários, as fatias foram submetidas a etapas de lavagem em PBS (3 vezes por 5 minutos) e, em seguida, incubadas com anticorpos secundários fluorescentes (1:400, anti-camundongo - *Alexa Fluor 568*; 1:400, anti-rato - *Alexa Fluor 488* e 1:400, anti-coelho - *Alexa Fluor 647 - Invitrogen*) por 90 minutos, ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Ao final dessa etapa as fatias foram, novamente, lavadas em PBS (4 vezes por 10 minutos) e as lâminas foram montadas (Tashiro *et al.*, 2007).

A montagem das lâminas foi realizada em ambiente com baixa luminosidade e utilizando o *Vectashield* como fixador (*Vector Laboratories*). Após a finalização do processo as lâminas foram acondicionadas em recipiente refrigerado e protegido de luz até o dia seguinte, quando foram analisadas com o auxílio de um microscópio.

Ao longo de todo o procedimento foram realizados dois controles essenciais: um sem anticorpo primário e outro sem anticorpo secundário, os quais foram

importantes para identificar a presença de ligações inespecíficas e a eficácia do procedimento.

5.1.4. Microscopia e Análise das Imagens

As diferentes populações celulares presentes no hipocampo foram identificadas com o auxílio de um microscópio de epifluorescência convencional (*Zeiss, Imager*) através da utilização de filtros com distintos comprimentos de onda de excitação (Ex.) e emissão (Em.). Células BrdU positivas (BrdU+ - marcação de cor verde) NeuN positivas (NeuN+ - marcação de cor vermelha) e GFAP positivas (GFAP+ - marcação de cor azul) foram identificadas, respectivamente, pelos filtros (Ex/Em): 495/517 nm; 653/669 nm; 576/603 nm (Figura 9).

A aquisição das imagens foi realizada utilizando a série-Z através do software *Carl Zeiss Axiovision 4.8*, com objetivas de 10x, 20x e 40x. Tal procedimento nos possibilitou identificar células co-localizadas. A análise final das imagens e a quantificação do número total de células foram feitas utilizando-se o software *Image J*.

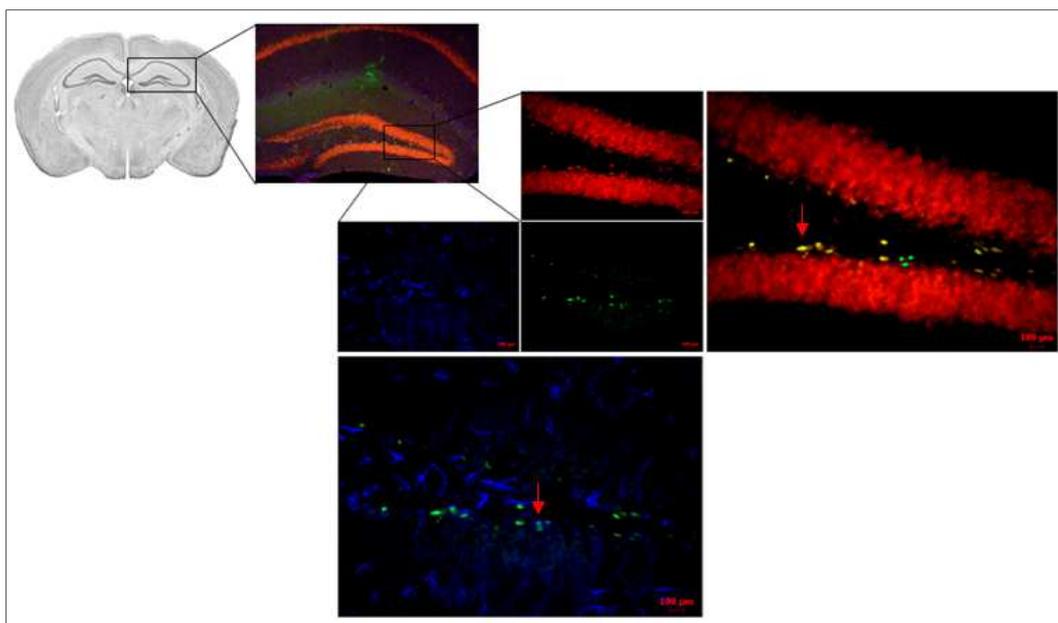


Figura 9: IMAGEM REPRESENTATIVA DO PROCEDIMENTO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM DUPLA MARCAÇÃO – Fatia de hipocampo (giro denteado) dos animais mostrando células (aumento de 40x) BrdU+ (verde), GFAP (azul escuro) e Neu+ (vermelho). As setas vermelhas apontam as células co-localizadas. As células BrdU+/NeuN+ estão representadas em amarelo e as BrdU+/GFAP+ em azul claro

5.2. Western Blotting

5.2.1. Preparação da Amostra

Imediatamente, após os testes comportamentais (teste de reconhecimento espacial e labirinto em Y), 36 animais foram eutanasiados e os hipocampos, rapidamente, recolhidos e armazenados a -80°C até utilização. As amostras foram então, homogeneizadas em tampão de RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM (pH=7.4), EDTA 1 mM, Nonidet P40 1%, PMSF 1 mM, Na deoxicolato 0.5%) em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a 2040.35 G (*Centrífuga Eppendorf 5415R - Alemanha*) a 4°C por 15 minutos e a concentração total de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando a proteína albumina de soro bovino (BSA) (1mg/ml) como padrão.

5.2.2. Eletroforese em Gel, Transferência, Bloqueio e Incubação da Membrana com Anticorpo Primário

As amostras, contendo 50 µg de proteínas totais, foram desnaturadas em tampão de amostra (100 mM Tris-HCl pH=6.8, 4% SDS, 0.2% azul de bromofenol, 20% glicerol, 20% H₂O, 0.5% β-mercaptoetanol) a 100° C por 4 minutos, carregadas e separadas no gel de SDS-poliacrilamida (12 ou 15%) e, então transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno, PVDF (*PVDF, Immobilon-P, Millipore, Massachusetts, USA*). Após bloqueio de 24 horas em TBST (tampão Tris com 0,1% de tween 20) contendo 5% de leite sem gordura e 0,3% BSA, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos - β-actina (1:2500, *Santa Cruz Biotechnology Inc, sc-69879*), CB₁ (1:1000, *Calbiochem, #209550*), CB₂ (1:1000, *Santa Cruz Biotechnology Inc, sc-25494*) e BDNF (1:500, *Santa Cruz Biotechnology Inc, sc-546*).

5.2.3. Revelação da Membrana

Para a visualização quimioluminescente, as membranas foram incubadas, em temperatura ambiente, por 1 hora, com anticorpos secundários anti-camundongo (1:5000) ou anti-coelho (1:5000) conjugados com uma peroxidase. As bandas de proteínas foram detectadas utilizando o sistema de detecção Western ECL (Pierce) e a densidade das mesmas foi quantificada pelo software *ImageJ* (Versão 1.44p, National Institute Health, USA).

5.3. ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

O ensaio imuno-enzimático para as dosagens das neurotrofinas NGF, NT3 e NT4 foi realizado com os kits da *R&D Systems* levando em consideração as orientações do fabricante e de acordo com método de Miranda *et al.* (2011) (De Miranda *et al.*, 2011).

5.3.1. Preparação da Amostra

Imediatamente, após os testes comportamentais (teste de suspensão da cauda e nado forçado), 36 animais foram eutanasiados e os hipocampos rapidamente recolhidos e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até utilização. As amostras foram então, pesadas e homogeneizadas (1 ml/100 mg) em tampão de extração de citocinas e, em seguida, centrifugadas a 9296.0 G (*Centrífuga Eppendorf 5415R - Alemanha*) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Após a centrifugação o *pellet* foi descartado e o sobrenadante utilizado para o ensaio imunoenzimático.

5.3.2. Sensibilização da Placa, Bloqueio, Anticorpos de Detecção, Reação com Estreptavidina e Leitura no Espectrofotômetro.

Primeiramente, placas de 96 poços (*MaxiSorp; NUNC*) foram incubadas *overnight* a 4°C com $100\mu\text{l}$ ($55,5\text{ }\mu\text{l}$ de anticorpo diluídos em $10,5\text{ ml}$ de PBS estéril) de anticorpos de captura específicos (anti-NGF, anti-NT3 e anti-NT-4) com a finalidade de sensibilizar os poços em que seriam adsorvidas as amostras. Após a sensibilização as placas foram lavadas (4 vezes) com tampão de lavagem específico (PBS + tween 20 a 1%) e, em seguida foram submetidas a etapa de bloqueio. Essa etapa consistiu na adição de $200\mu\text{l}$ de tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS) em cada poço e sequente incubação em temperatura ambiente, por 2 horas.

Posteriormente ao bloqueio, as placas foram lavadas e, em cada poço, foi adicionado 100µl de solução padrão (específica para cada neurotrofina) ou 100µl de amostras de hipocampo, previamente preparadas. As placas foram então, vedadas e incubadas *overnight* a 4°C.

Ao final desse período foram realizadas 4 etapas de lavagem e, sequencialmente, adicionado a cada poço 100µl de anticorpo de detecção biotilado (55,5 µl de anticorpo de detecção diluídos em 10,5 ml de PBS com BSA a 0,1%). O anticorpo de detecção permaneceu incubado na placa em temperatura ambiente por um período de 2 horas.

Após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas e incubadas por 30 minutos (100 µl/poço) com estreptavidina-HRP (50 µl de estreptavidina diluída em 10,5 ml de PBS com BSA a 0,1%). Em seguida elas foram, novamente lavadas e adicionados a cada poço 100 µl de substrato OPD (o-fenildiamina). As placas foram então, vedadas e incubadas por mais 20-30 minutos, em temperatura ambiente. Para finalizar a reação foi adicionado a cada poço 50 µl de ácido sulfúrico. Imediatamente, após os procedimentos anteriores, as placas foram levadas para um espectrofotômetro, no qual foi feita a leitura em 450 nm.

6. Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância de duas vias (Two way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni e, quando necessário (avaliação das tarefas de memória), pelo teste-t para uma amostra (One sample t-test) (Baker e Kim,

2002; Gresack e Frick, 2006; Lazaroni *et al.*, 2012; Suarez *et al.*, 2012). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

Resultados

O receptor CB₁ é importante para a melhora da memória espacial induzida pelo exercício

No primeiro experimento, avaliamos o papel do sistema endocanabinóide na melhora da memória espacial induzida pelo exercício. O paradigma de exercício utilizado foi capaz de melhorar a memória espacial dos animais ($t(4) = 3,773$, $p = 0,0196$). O teste t de uma amostra também revelou que o tratamento com URB597, seja associado ($t(4) = 3,102$, $p = 0,0362$) ou não ao exercício ($t(5) = 4,557$, $p = 0,0061$), também melhora a memória espacial, indicando que uma potencialização ou facilitação do sistema endocanabinóide pode mimetizar os efeitos do exercício (Figura 10 B). Além disso, o tratamento com AM251 impediu a melhora da memória induzida pelo exercício ou o tratamento com URB597, sugerindo que o receptor CB₁ desempenha um papel importante na regulação das respostas mediadas pelo exercício (Figura 10 B). A ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni* mostrou um efeito do tratamento ($F_{2,32} = 11,30$, $p = 0,0002$) e uma tendência para interação entre o exercício e os tratamentos ($F_{2,32} = 2,531$, $p = 0,0954$). O tempo necessário para acumular 30 segundos de exploração dos objetos durante a fase de amostragem não foi afetado pelo exercício e pelos tratamentos com AM251 ou URB597 (Tabela 1). Além disso, nenhum dos grupos testados mostrou preferência por um dos objetos idênticos localizados nos lados direito e esquerdo da caixa durante a fase de amostragem (Figura 10 A).

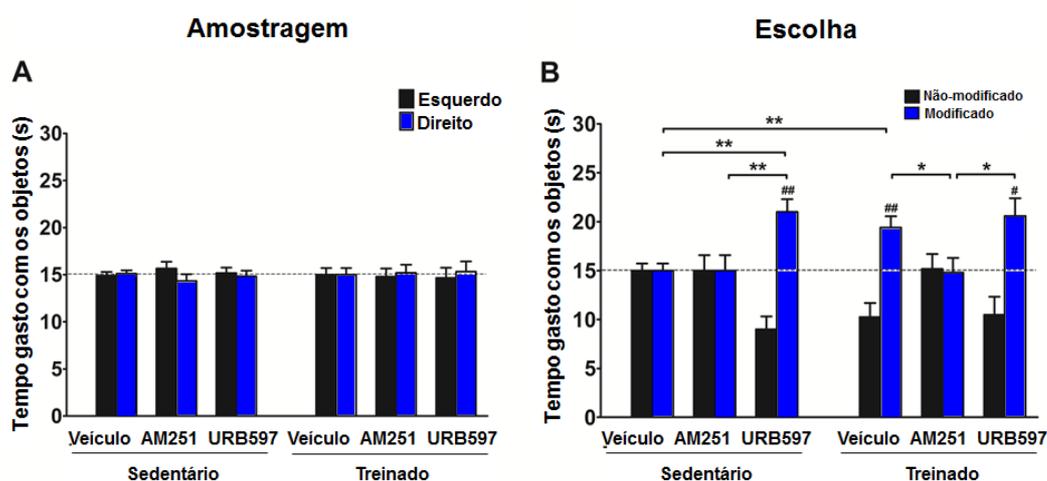


Figura 10: O receptor CB₁ é importante para a melhora da memória espacial induzida pelo exercício. (A) O exercício sozinho e os tratamentos com AM251 ou URB597 associados ou não ao exercício físico não afetaram a fase de amostragem do teste de reconhecimento espacial de objeto. Não houve preferência dos animais pelos objetos idênticos. (B) O antagonismo do receptor CB₁ impediu a melhora da memória espacial induzida pelo exercício físico. Os animais tratados com AM251 não diferiram no tempo de exploração dos objetos modificado e não modificado durante a fase de escolha. Os dados são expressos como média ± erro padrão, n = 5-6 em cada grupo. * Indica comparação intergrupos, * P <0,05, ** P <0,01. # Indica comparação intragrupo; # P <0,05; ## P <0,05.

Tabela 1: Média ± erro padrão do nível de atividade durante a tarefa de reconhecimento espacial de objeto

Grupo	Tempo gasto (s)		Valor de P
	Amostragem	Escolha	
Sedentário Veículo	302,5±45,6	310,2±75,9	n.s
Sedentário AM251	278,7±84,2	378,8±134,3	n.s
Sedentário URB597	298,5±42,5	306,2±139,3	n.s
Treinado Veículo	270,3±101,0	303,8±74,4	n.s
Treinado AM251	285,1±96,2	183,6±41,6	n.s
Treinado URB597	276,8±69,3	194,6±39,9	n.s

Tabela 1: Nível médio de atividade dos animais durante o teste de reconhecimento espacial de objeto.

Na tarefa de memória de trabalho não foi encontrado diferença para nenhuma das variáveis avaliadas. Como mostrado na figura 11, nem o exercício nem os tratamentos farmacológicos foram capazes de afetar a memória de trabalho dos animais. Todos os animais foram capazes de alternar acima do acaso (50%) (exercício: $F_{2,28} = 0,1807$; tratamento: $F_{2,28} = 1,383$; interação: $F_{2,28} = 0,4559$, ns; fig 11 A) e não houve diferença entre os grupos em relação ao número de braços visitados (exercício: $F_{2,28} = 2,608$; tratamento: $F_{2,28} = 0,3976$, interação: $F_{2,28} = 0,6801$, ns; fig 11 B). Assim, nossos resultados demonstraram que apenas a memória espacial induzida pelo exercício físico é afetada pela modulação do sistema endocanabinoide.

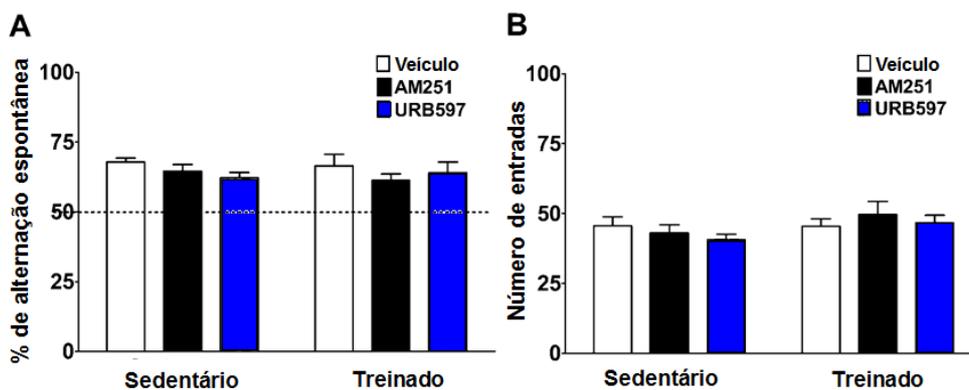


Figura 11: O exercício físico na esteira durante 7 dias ou os tratamento com URB597 e AM251 associados ou não ao exercício não afetam a memória de trabalho de camundongos. (A) Não houve nenhuma diferença na porcentagem de alternação espontânea entre os grupos no labirinto em Y. (B) Não houve diferença no número total de entradas nos braços. Os dados são expressos como média \pm erro padrão, $n = 5-6$ em cada grupo.

O exercício físico, por sete dias, não afeta o desempenho dos animais nos testes de suspensão da cauda e nado forçado

Como os experimentos anteriores mostraram que apenas a memória espacial foi modulada pelo exercício físico decidimos avaliar se outros comportamentos também hipocampo-dependentes (como, o “comportamento tipo-depressivo”), mas não relacionados com a memória, poderiam ser afetados pelo protocolo de exercício físico na esteira. Conforme apresentado nas figuras 12 (A e B) e 13 (A e B), respectivamente, o exercício físico não foi capaz de modificar o desempenho dos animais nos testes de suspensão da cauda (fig. 12 A - imobilidade: $t(10) = 0,4878$; $p = 0,6362$; fig. 12 B - latência: $t(10) = 0,3423$; $p = 0,7392$) e nado forçado (fig. 13 A - imobilidade: $t(10) = 0,4166$; $p = 0,6857$; fig. 13 B - latência: $t(10) = 1,495$; $p = 0,1658$) mostrando que, em relação aos comportamentos hipocampo-dependentes avaliados neste estudo, somente a memória espacial é afetada pelo exercício físico.

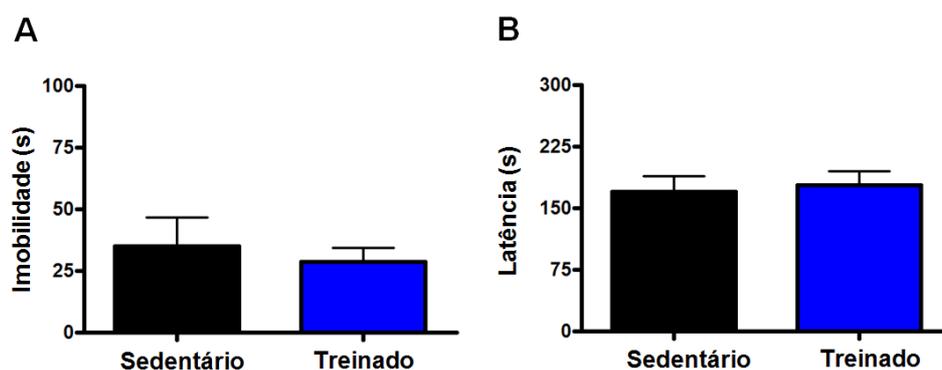


Figura 12: O exercício físico na esteira, durante 7 dias, não afeta o comportamento dos animais no teste de suspensão da cauda. (A) Não houve diferença entre os grupos em relação ao tempo total de imobilidade. (B) Não houve diferença entre os grupos em relação ao tempo gasto para iniciar o período de imobilidade (latência). Os dados são expressos como média \pm erro padrão, $n = 6$ em cada grupo.

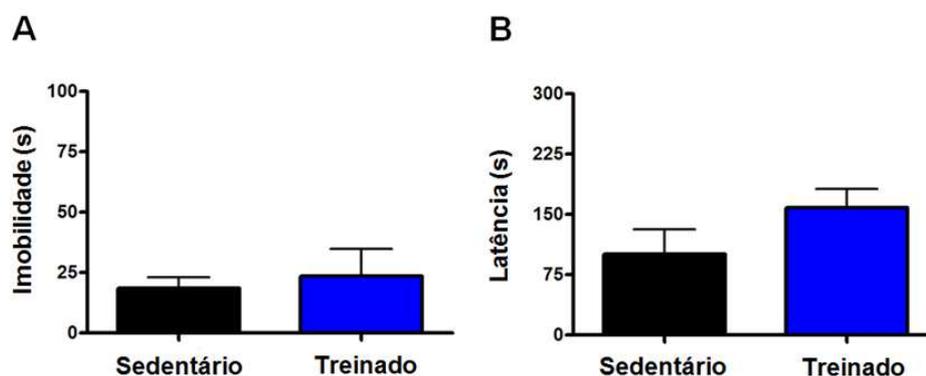


Figura 13: O exercício físico na esteira, durante 7 dias, não afeta o comportamento dos animais no teste do nado forçado. (A) Não houve diferença entre os grupos em relação ao tempo total de imobilidade na água. (B) Não houve diferença entre os grupos em relação ao tempo gasto para iniciar o período de imobilidade (latência). Os dados são expressos como média \pm erro padrão, $n = 6$ em cada grupo.

Expressão de CB₁, mas não CB₂, é aumentada no hipocampo após o exercício físico

Considerando que o primeiro experimento indicou que a ativação endocanabinóide é importante para mediar o efeito promnésico do exercício físico, decidimos investigar se haveria alguma mudança na expressão hipocampal dos receptores CB₁ e CB₂ dos animais submetidos ao programa de exercício. A análise de variância de duas vias detectou uma interação entre o exercício e os tratamentos ($F_{2,26} = 8,174$, $p = 0,0021$) e as análises *post-hoc* confirmaram que, de acordo com a nossa hipótese, o exercício físico foi capaz de promover aumento na expressão do receptor CB₁ no hipocampo (Fig. 14 A e B) dos animais. Além disso, o tratamento com o inibidor da FAAH, o qual foi capaz de mimetizar os efeitos comportamentais do exercício, promoveu um efeito semelhante em animais sedentários. De forma também semelhante ao resultado comportamental, os efeitos do exercício foram impedidos em animais tratados com o

antagonista CB₁. Estes resultados sugerem que o receptor CB₁ é importante para mediar a sinalização endocanabinóide durante o exercício.

De forma interessante, a associação do exercício físico ao tratamento com URB597 promoveu uma redução na expressão do receptor CB₁, sugerindo que talvez haja uma alça de retroalimentação de endocanabinóides sobre a expressão do receptor CB₁.

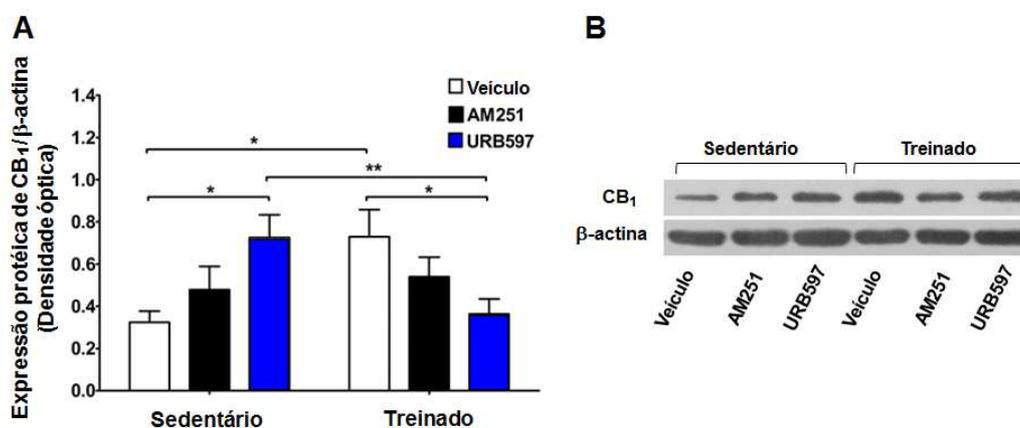


Figura 14: O receptor CB₁ é importante para a sinalização canabinóide durante o exercício físico. (A) O exercício físico e o tratamento com URB597, durante 7 dias, induziram um aumento na expressão do receptor CB₁ no hipocampo dos animais. O tratamento com o antagonista CB₁ preveniu este aumento. A associação do treinamento com o tratamento com URB597 induziu uma *subregulação* do receptor CB₁. (B) Imunoblots representativos demonstrando a expressão do receptor CB₁ em cada grupo experimental. Os dados são expressos como média ± erro padrão, n = 5-6 em cada grupo. * P <0,05, ** P <0,01.

A respeito da expressão do receptor CB₂ (Fig. 15 A e B) nenhuma alteração foi encontrada (exercício: $F_{1,26}=0.0009$; tratamentos: $F_{2,26}=0.02368$; interação: $F_{2,26}=0.2874$; ns) sugerindo que apenas o receptor CB₁ é necessário para mediar a sinalização canabinóide durante o exercício.

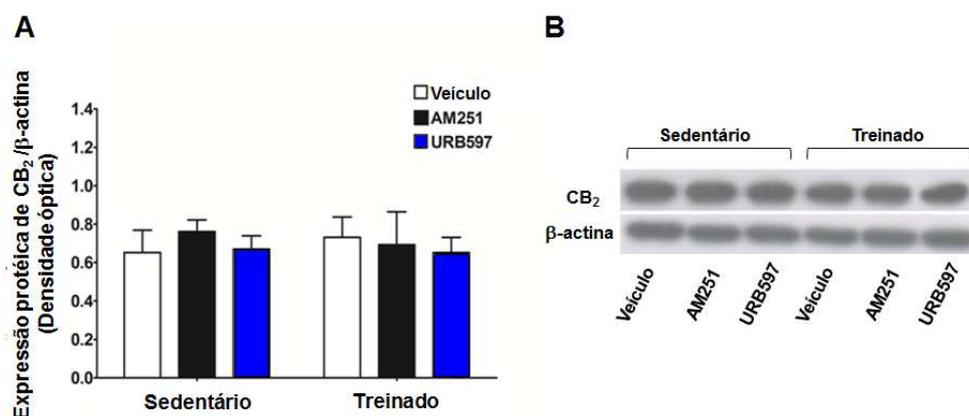


Figura 15: A expressão do receptor CB₂ não é alterada durante o exercício físico. (A) Nem o exercício físico nem os tratamentos com AM251 ou URB597 alteraram a expressão do receptor CB₂ no hipocampo dos animais. (B) Imunoblots representativos demonstrando a expressão do receptor CB₂ em cada grupo experimental. N = 5-6 em cada grupo.

O receptor CB₁ é necessário para a expressão hipocampal de BDNF induzida pelo exercício

Na tentativa de elucidar um possível mecanismo pelo qual a sinalização canabinoide pudesse mediar o efeito promnésico do exercício, decidimos avaliar a expressão hipocampal de um marcador de plasticidade sináptica, o BDNF. A análise de variância de duas vias detectou uma interação entre o exercício físico e os tratamentos ($F_{2,18} = 5.265$, $p = 0,0158$) e um efeito significativo do tratamento ($F_{2,18} = 7,266$, $p = 0,0049$). Além disso, houve uma tendência para efeito do exercício ($F_{1,18} = 3,728$, $p = 0,0694$). A análise *post-hoc* confirmou que o exercício físico induziu um aumento na expressão de BDNF no hipocampo dos animais. Do mesmo modo, o tratamento com URB597, o qual mimetizou o efeito promnésico do exercício, foi capaz de induzir um aumento na expressão de BDNF em animais sedentários bem como em animais treinados (Fig. 16 A e B). De acordo com o resultado da tarefa de memória espacial, o aumento da

expressão de BDNF induzida pelo exercício foi impedido em animais tratados com o antagonista CB₁ (Fig. 16 A e B), sugerindo que a sinalização canabinóide durante o exercício é mediada pelo BDNF.

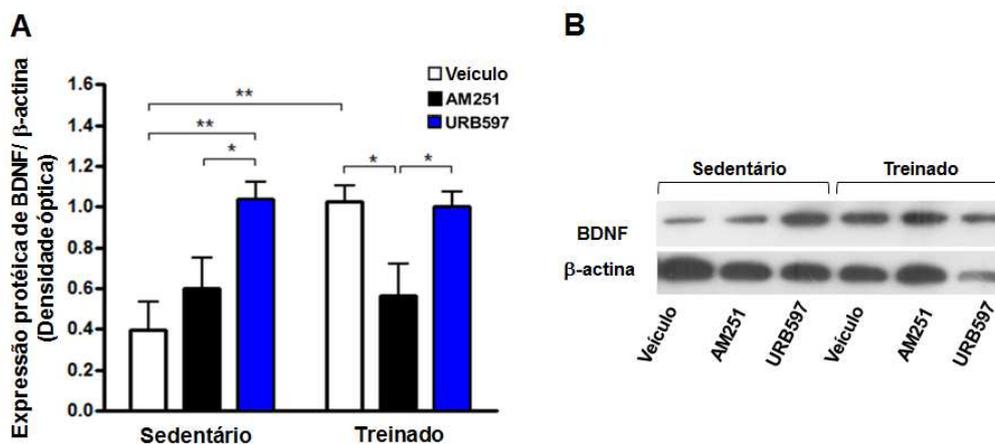


Figura 16: O receptor CB₁ é importante para a expressão do BDNF induzida pelo exercício.(A) O exercício físico associado ou não ao tratamento com URB597, durante 7 dias, induziu um aumento na expressão de BDNF no hipocampo dos animais. O tratamento com o antagonista CB₁ preveniu este aumento. (B) Imunoblots representativos demonstrando a expressão de BDNF em cada grupo experimental. Os dados são expressos como média ± erro padrão, n = 4 em cada grupo. * P <0,05, ** P <0,01.

As neurotrofinas NGF, NT3 e NT4 não são alteradas pelo exercício

Pelo fato do BDNF pertencer a família das neurotrofinas, decidimos avaliar se o papel em mediar a sinalização canabinóide era exclusivo a ele ou se haveria o envolvimento das demais proteínas que compõem essa família, como o NGF a NT3 e a NT4. A análise de variância de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni* mostrou que os tratamentos com AM251 e URB597 (NGF: $F_{2,26}=0.3579$; ns; NT3: $F_{2,27}=1.993$; ns; NT4:

$F_{2,25}=1.932$; ns) assim como o protocolo de exercício utilizado (NGF: $F_{1,26}=0.2115$; ns; NT3: $F_{1,27}=0.04831$; ns; NT4: $F_{1,25}=0.3133$; ns) não foram capazes de alterar os níveis de nenhuma das neurotrofinas avaliadas (Figura 17 A, B e C), sugerindo que apenas o BDNF está envolvido com a sinalização canabinóide durante o exercício.

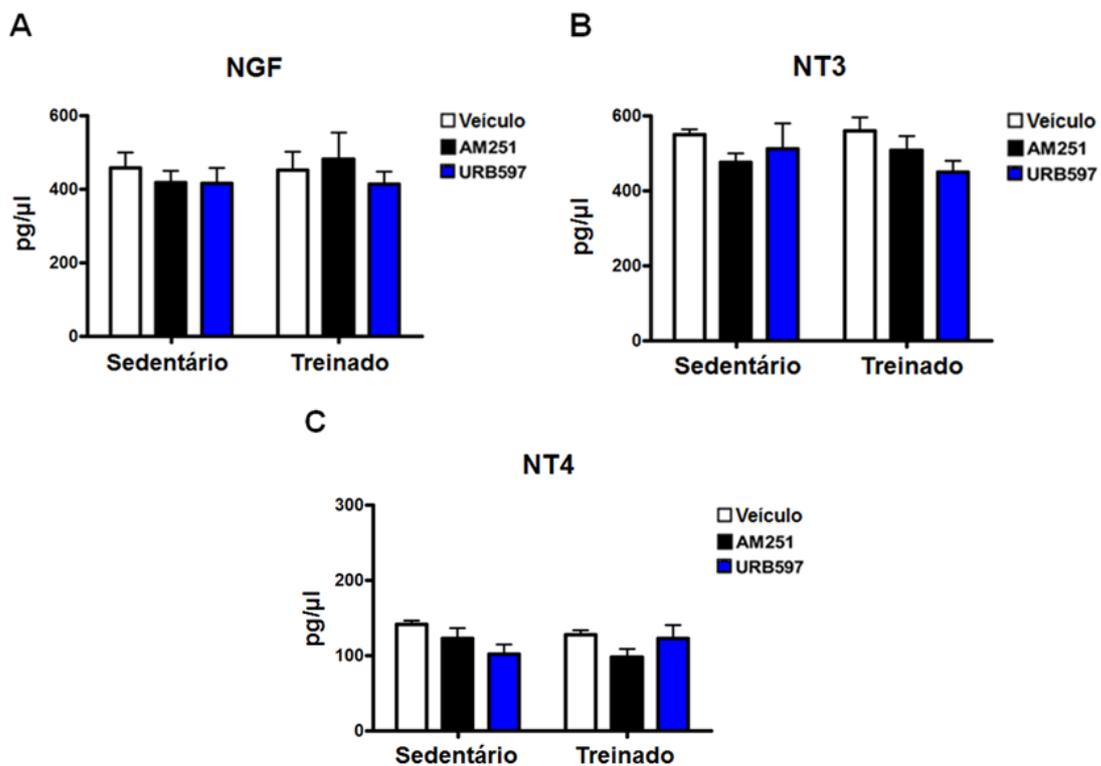


Figura 17: Os níveis das neurotrofinas (NGF, NT3 e NT4) não são alterados pelo exercício. (A) Nem o exercício físico nem os tratamentos com AM251 ou URB597 alteraram os níveis de NGF, (B) NT3 e (C) NT4 no hipocampo dos animais. Os dados são expressos como média \pm erro padrão, n = 4 - 6 em cada grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

O receptor CB₁ é importante para a proliferação celular e neurogênese induzida pelo exercício físico

Como os resultados anteriores mostraram que a sinalização canabinóide durante o exercício físico é mediada pelo BDNF, decidimos investigar a proliferação celular hipocampal e identificar o fenótipo das células, eventualmente, proliferadas (astrócitos e neurônios), já que o aumento da formação de neurônios (neurogênese), assim como o evento de proliferação celular, por si, são fenômenos fortemente associados ao BDNF (Park e Poo, 2013) e envolvidos na formação de memória (Hillman *et al.*, 2008).

Como pode ser observado nas figuras 18, 19 e 20, o exercício assim como o tratamento com o URB597 associado ou não ao exercício induziu um aumento tanto na proliferação celular (figura 18 A e B) quanto na astro-gliogênese – formação de astrócitos - (figura 19 A e B) e neurogênese (figura 20 A e B) no giro denteado dos animais. De forma semelhante ao encontrado para a expressão de BDNF e para o resultado comportamental (efeito promnésico) o tratamento com o antagonista CB₁ preveniu esses aumentos, indicando que a sinalização canabinóide durante o exercício é importante para mediar os eventos de proliferação celular, astro-gliogênese e neurogênese hipocampal. Esses resultados sugerem ainda que a neurogênese induzida pelo exercício pode ser um dos mecanismos pelos quais o BDNF medeia a melhora da memória dos animais.

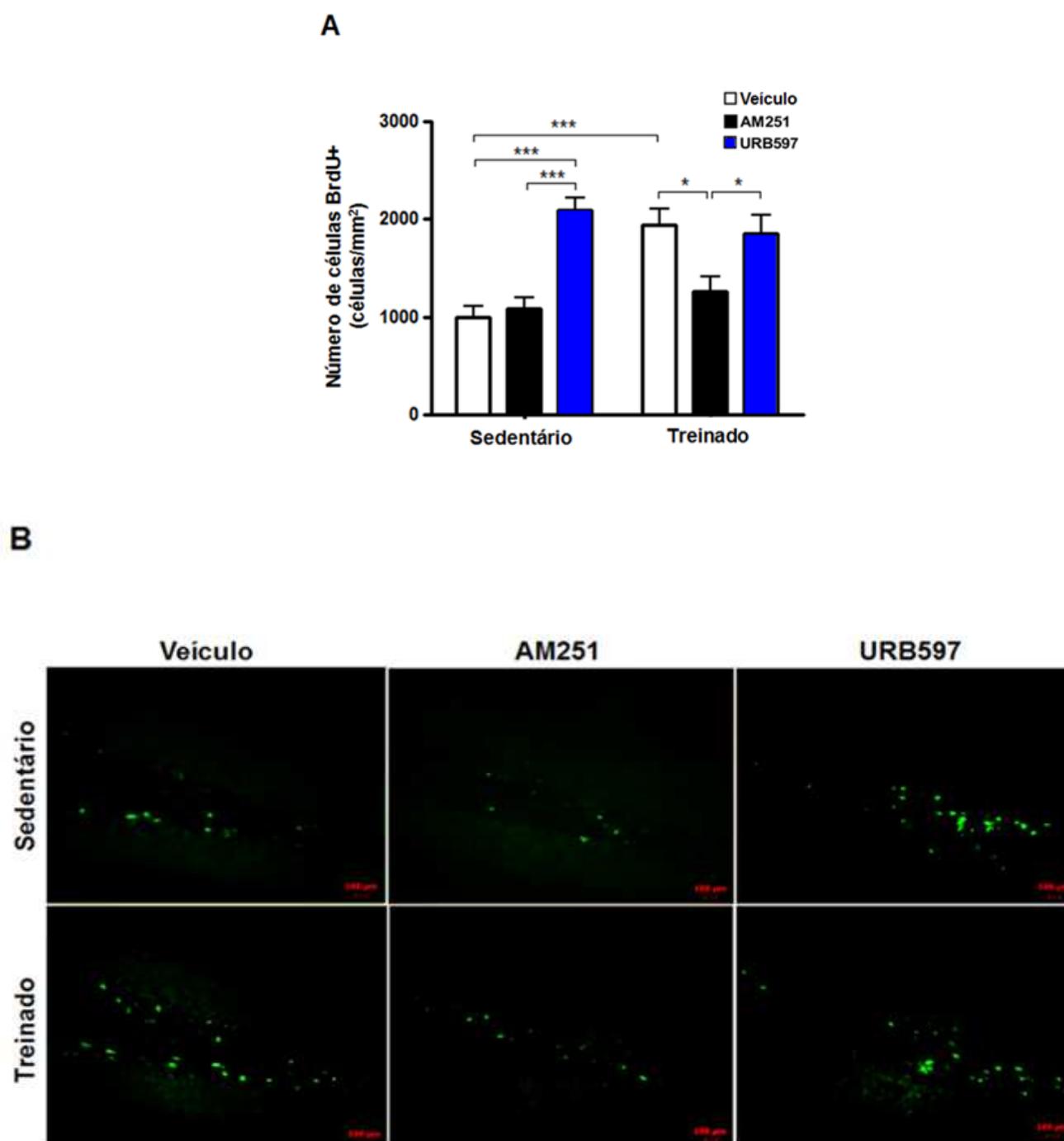


Figura 18: O receptor CB_1 é importante para a proliferação celular hipocampal induzida pelo exercício físico. (A) O exercício físico associado ou não ao tratamento com URB597, durante 7 dias, induziu um aumento na proliferação celular no giro denteado dos animais. O tratamento com o antagonista CB_1 preveniu este aumento. (B) Imagens representativas demonstrando a marcação de células BrdU+ (verde) em cada grupo experimental. Os dados são expressos como média \pm erro padrão, $n = 5-6$ em cada grupo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

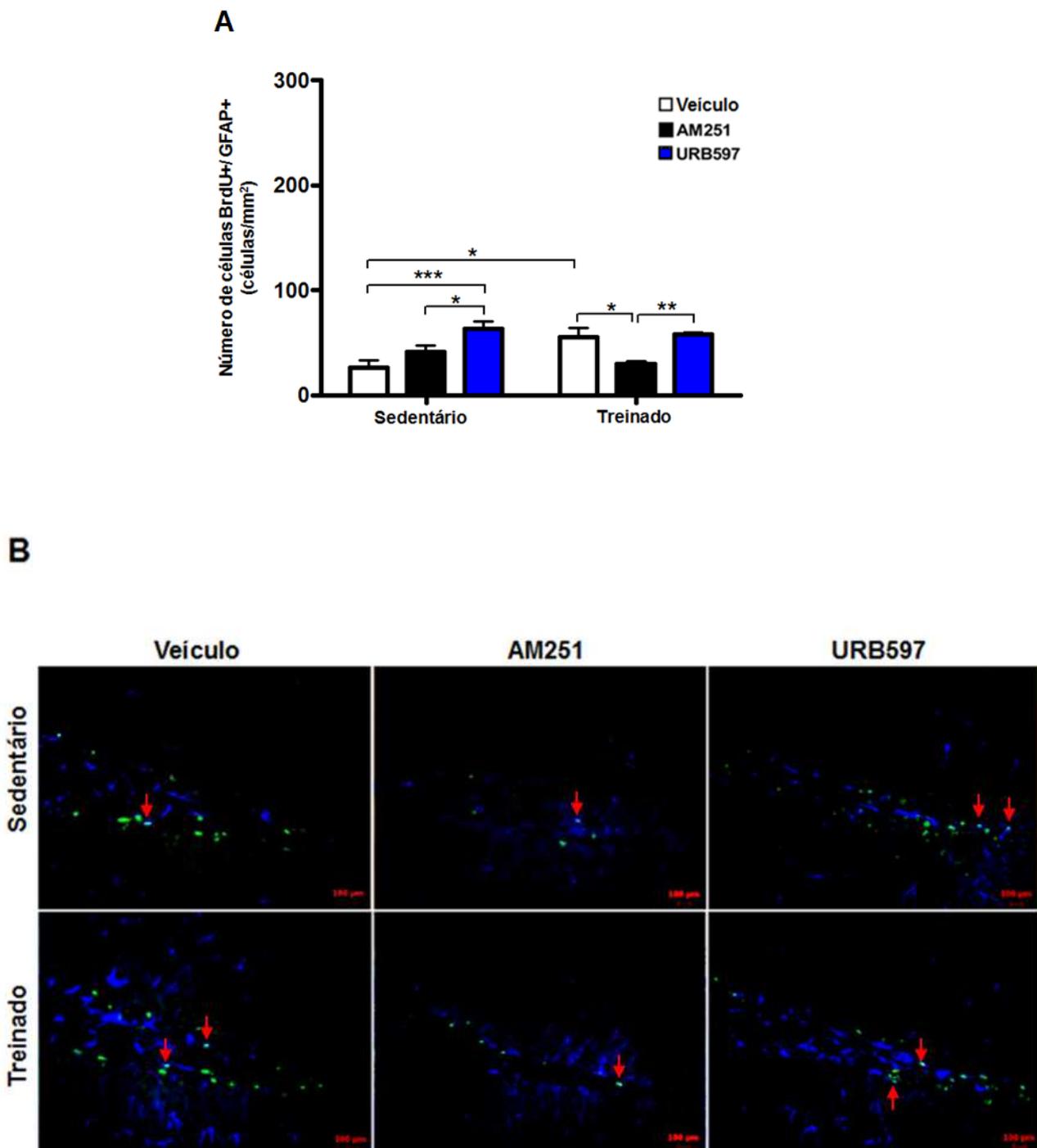


Figura 19: O receptor CB_1 é importante para a formação de astrócitos induzida pelo exercício físico.(A) O exercício físico associado ou não ao tratamento com URB597, durante 7 dias, induziu aumento na astrogliogênese no giro denteado dos animais. O tratamento com o antagonista CB_1 preveniu este aumento. (B) Imagens representativas demonstrando a co-localização (azul claro, seta vermelha) de células BrdU+ (verde) e células GFAP+ (azul), em cada grupo experimental. Os dados são expressos como média \pm erro padrão, $n = 5-6$ em cada grupo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

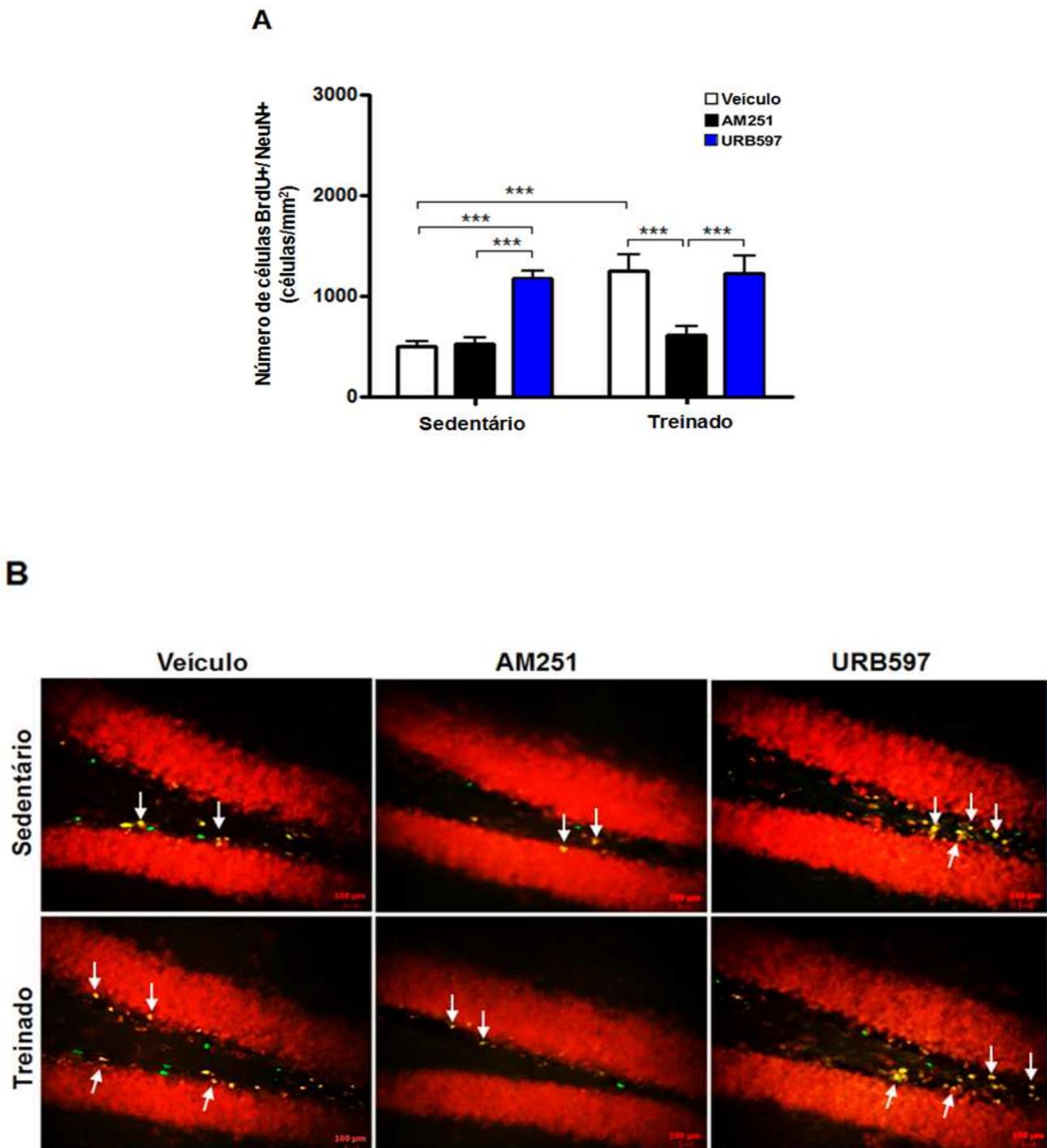


Figura 20: A neurogênese induzida pelo exercício é dependente da sinalização canabinóide.(A) O exercício físico associado ou não ao tratamento com URB597, durante 7 dias, induziu um aumento da neurogênese no giro denteado dos animais. O tratamento com o antagonista CB₁ preveniu este aumento. (B) Imagens representativas demonstrando a co-localização (amarelo e setas brancas) de células BrdU⁺ (verde) e células NeuN⁺ (vermelho) em cada grupo experimental. Os dados são expressos como média ± erro padrão, n = 5-6 em cada grupo. *** P < 0,001.

Antagonistas CB₁ e inibidores da FAAH não apresentam efeito sobre o comportamento de ansiedade (tipo-ansioso) ou atividade locomotora espontânea 24 horas após sua administração

Uma vez que o tratamento com antagonistas do receptor CB₁, bem como com inibidores da FAAH, poderiam interferir, em poucos minutos com os comportamentos, locomotor e “tipo-ansiedade” dos animais (Moreira *et al.*, 2008), decidimos avaliar os efeitos destas drogas 24 horas após a sua administração. A Figura 21 mostra o comportamento dos animais 24 horas após o tratamento com o antagonista CB₁, AM251 e com o inibidor da FAAH, URB597. Como mostrado pelo teste do labirinto em cruz elevado (fig. 21 A e B, respectivamente), o comportamento dos animais tratados com AM251 ou URB597 não diferiu dos animais controle tratados com veículo para % de tempo dispendido nos braços abertos, uma medida do comportamento tipo-ansiedade (exercício: $F_{1,28} = 0,1300$; tratamento: $F_{2,28} = 0,7640$; interação: $F_{2,28} = 1,163$, ns) ou para o número de entradas nos braços fechados, uma medida da atividade locomotora (exercício: $F_{1,28} = 1,666$; tratamento: $F_{2,28} = 3,150$; interação: $F_{2,28} = 0,01531$; ns). Da mesma forma, quando os animais foram avaliados na arena do campo aberto, nenhuma diferença foi encontrada no tempo gasto no quadrante central (figura 21 C) (exercício: $F_{1,28} = 2,126$; tratamento: $F_{2,28} = 1,364$; interação: $F_{2,28} = 0,1588$, ns) e no número de cruzamentos (figura 21 D) (exercício: $F_{1,28} = 0,7207$; tratamento: $F_{2,28} = 0,3875$; interação: $F_{2,28} = 0,3302$, ns) o que sugere que essas drogas também não afetaram a atividade motora basal dos animais.

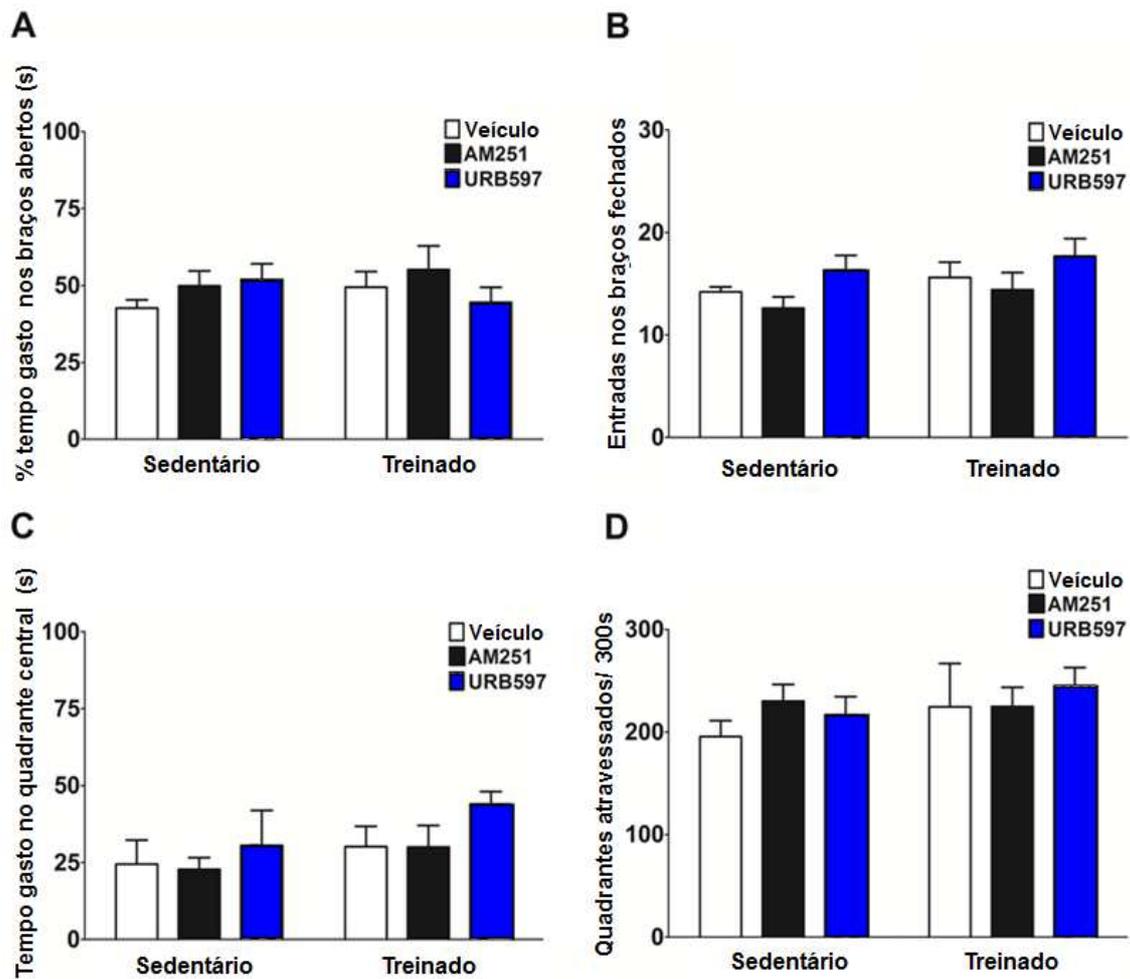


Figura 21: Antagonistas do receptor CB_1 ou inibidores da FAAH não apresentam efeitos sobre o comportamento de ansiedade (tipo-ansioso) e atividade locomotora 24 horas após a administração. (A) Não houve diferença no tempo gasto pelos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado vinte e quatro horas após 7 dias de tratamento com AM251 e URB597. (B) Não houve diferença entre o número de entradas nos braços fechados no labirinto em cruz elevado. (C) Não houve diferença no tempo gasto no quadrante central do campo aberto. (D) Não houve diferença na distância total percorrida no campo aberto. Os dados são expressos como média \pm erro padrão, $n = 5-6$ em cada grupo.

Discussão

No presente estudo, o exercício físico na esteira foi capaz de melhorar a memória espacial em camundongos. Este efeito foi prevenido pelo tratamento simultâneo com o antagonista do receptor CB₁, AM251, indicando que a sinalização endocanabinóide é importante para mediar o efeito promnésico induzido pelo exercício. De acordo com isso, este efeito foi mimetizado em animais sedentários pelo tratamento com o inibidor da FAAH, o URB597. Além disso, o exercício físico promoveu aumento da expressão hipocampal do receptor CB₁ e do BDNF (sem interferir com as demais neurotrofinas), bem como induziu um aumento na proliferação celular, astro-gliogênese e neurogênese no giro denteado desses animais. Da mesma forma que os dados comportamentais, estas alterações moleculares foram impedidas pelo tratamento com o AM251 e reproduzidas em animais sedentários tratados com o URB597. A memória de trabalho, os comportamentos indicativos de fenótipo “tipo-depressivo” e as respostas relacionadas com a ansiedade e atividade locomotora permaneceram inalteradas após o exercício ou tratamento com as drogas.

O efeito benéfico do exercício sobre a memória está de acordo com trabalhos anteriores, nos quais o mesmo melhorou funções cognitivas hipocampo-dependentes em roedores (O'callaghan *et al.*, 2007; Griffin *et al.*, 2009). Apesar disso, no nosso estudo o exercício não afetou a memória de trabalho. Tal fato pode ser explicado por, pelo menos, duas razões: Primeiro, por um maior recrutamento do córtex pré-frontal, em vez do hipocampo, neste tipo de tarefa de memória (Zoubovsky *et al.*, 2011) e, segundo, por uma variabilidade dos parâmetros inerentes ao exercício como a intensidade, duração e modalidade do exercício em questão (Kim *et al.*, 2003). Embora esteja bem estabelecido

que o hipocampo participa direta ou indiretamente em todas as tarefas de memória utilizados neste estudo, ainda existe controvérsia sobre o grau de importância dessa estrutura na memória de trabalho. Neste contexto, alguns estudos têm ressaltado a importância do córtex pré-frontal para o processamento cognitivo (Niwa *et al.*, 2010; Zoubovsky *et al.*, 2011). Por exemplo, Niwa *et al.* (2009), em um estudo que objetivou criar um modelo animal para estudar esquizofrenia, relacionaram a redução da proteína DISC₁ (*disrupted in schizophrenia 1*) em neurônios piramidais do córtex pré-frontal com alterações comportamentais relacionadas ao processamento da informação e da cognição (Niwa *et al.*, 2010).

Além disso, conforme mencionado anteriormente, outros estudos também demonstraram que pequenas alterações no protocolo de exercício podem afetar de forma diferente os parâmetros cognitivos. Evidências recentes sugerem que, dependendo da modalidade (natação ou esteira), o protocolo de exercício precisa ter duração diferente para ser capaz de induzir efeitos pró-cognitivo (Griffin *et al.*, 2009; Drumond *et al.*, 2012). Kim *et al.* (2003), em um estudo que avaliou o impacto de diferentes protocolos de exercício físico na esteira sobre a proliferação celular hipocampal de ratos, também encontraram que, dependendo do tempo e da intensidade, o exercício pode ter efeitos significativamente diferentes (Kim *et al.*, 2003). Assim, é provável que o protocolo de exercício utilizado em nosso estudo tenha sido adequado para induzir alterações capazes de promover a melhora da memória espacial, mas não tenha sido suficiente para potencializar (já que não houve déficit) a memória de trabalho.

Além disso, nossos resultados sugerem que o protocolo de exercício físico utilizado afetou, principalmente, a região dorsal do hipocampo dos animais, haja vista que a principal função cognitiva mediada por essa porção (memória espacial) (Fanselow

e Dong, 2010) foi a única que sofreu alteração após os 7 dias de exercício. De acordo com isso, nenhuma diferença foi encontrada em relação ao desempenho dos animais nos testes de suspensão da cauda e nado forçado os quais, por se tratarem de tarefas emocionalmente motivadas, são frequentemente associadas a porção ventral do hipocampo (Fanselow e Dong, 2010). De fato, resultados obtidos anteriormente mostraram que algumas regiões/porções cerebrais são mais susceptíveis aos efeitos do exercício que outras, como é o caso do hipocampo, córtex posterior e médio (Neeper *et al.*, 1996).

Os mecanismos pelos quais o exercício físico facilita a memória espacial ainda não são bem definidos, mas acredita-se que alguns fatores possam estar envolvidos, como a produção de BDNF (Griffin *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011) a potencialização da transmissão glutamatérgica (O'callaghan *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011), a proliferação celular (Van Praag *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2011) e a neurogênese (Uda *et al.*, 2006). No que diz respeito ao sistema endocanabinóide, o nosso estudo mostrou que a melhora da memória espacial induzida pelo exercício foi impedida pelo bloqueio simultâneo do receptor CB₁ com o AM251 e facilitada em animais sedentários pelo tratamento com o URB597 o que indica que, pelo menos em parte, o aumento da sinalização endocanabinóide contribui para o efeito promnésico do exercício.

O fato de nós não termos observado uma melhora adicional na memória dos animais treinados e tratados simultaneamente com URB597 pode ser devido a uma limitação do método de avaliação utilizado ou a uma possível saturação dos receptores CB₁ mediante os níveis muito elevados de anandamida.

Os nossos achados podem ser suportados por vários estudos que demonstraram que o exercício físico induz aumento dos níveis circulantes de endocanabinóides (especialmente da anandamida) (Sparling *et al.*, 2003; Raichlen *et al.*, 2012; Raichlen *et al.*, 2013), além de ativar a sinalização mediada pelo receptor CB₁ (Hill *et al.*, 2010), a qual parece ser essencial para uma série de eventos celulares e moleculares importantes para o processo de aprendizado e memória tais como a formação de LTP (Lin *et al.*, 2011; Madronal *et al.*, 2012), a produção de neurotrofinas (Butovsky *et al.*, 2005; Aso *et al.*, 2008) e a proliferação celular/neurogênese (Aguado *et al.*, 2005; Aguado *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2010).

No que diz respeito à facilitação da transmissão endocanabinóide, outros trabalhos também encontraram resultados positivos em relação ao desempenho cognitivo de animais. Por exemplo, a elevação dos níveis cerebrais de anandamida, seja através de deleção genética ou da inibição farmacológica da FAAH, pode resultar na facilitação de processos de extinção de memória no labirinto aquático de Morris (Varvel *et al.*, 2007). Resultados semelhantes também foram encontrados em relação à aquisição da memória no aprendizado de esquiva passiva (Mazzola *et al.*, 2009).

A fim de reforçar os presentes resultados, buscamos encontrar alterações moleculares que pudessem estar relacionadas ao efeito comportamental induzido pelo exercício. Dessa forma, realizamos a avaliação da expressão hipocampal dos receptores canabinóides, CB₁ e CB₂, bem como a expressão de uma importante neurotrofina utilizada como marcador de plasticidade sináptica, o BDNF. Nós observamos que tanto a expressão de CB₁ quanto a expressão de BDNF foram aumentados após o exercício e, que esses aumentos foram prevenidos pelo bloqueio do receptor CB₁ durante a realização do exercício. Além disso, todos esses efeitos foram mimetizados em animais

sedentários pelo tratamento com o URB597. Como esperado, o exercício físico associado ao tratamento com URB597 resultou em subregulação do receptor CB₁, em linha com a nossa hipótese da saturação dos receptores CB₁.

Não foram observadas quaisquer alterações em relação à expressão do receptor CB₂ no hipocampo dos animais. Tal fato também já era esperado, uma vez que tanto sua expressão quanto função estão relacionadas a respostas inflamatórias (Munro *et al.*, 1993; Derocq *et al.*, 1995; Galiegue *et al.*, 1995; Carlisle *et al.*, 2002). Embora existam trabalhos mostrando a existência de imunoreatividade do receptor CB₂ em algumas regiões da formação hipocampal (Gong *et al.*, 2006; Brusco *et al.*, 2008) e em culturas de neurônios (Onaivi *et al.*, 2006) o papel funcional desse receptor no SNC ainda não é bem entendido (Atwood e Mackie, 2010). Um dos trabalhos que, recentemente, apresentou evidências mostrando o envolvimento do receptor CB₂ com o funcionamento hipocampal sugere que ele pode ser importante para a consolidação de memórias aversivas (Garcia-Gutierrez *et al.*, 2013).

A possibilidade de que os resultados encontrados neste estudo sejam secundários a fatores relacionados à ansiedade ou a atividade locomotora dos animais foi descartada após a realização dos testes comportamentais adequados. Dessa forma, estes resultados expandem as investigações neste campo e mostram que a facilitação da sinalização endocanabinóide é necessária para o exercício atuar como um potencializador/facilitador cognitivo.

Trabalhos anteriores também relataram aumento do receptor CB₁ em roedores após o exercício. Animais expostos ao ambiente enriquecido e à roda de corrida voluntária apresentaram aumento na transcrição de RNA mensageiro para o receptor

CB₁ no hipocampo (Wolf *et al.*, 2010). Hill *et al.* (2010) também mostraram que o exercício voluntário aumenta a ligação do receptor CB₁ no hipocampo de camundongos (Hill *et al.*, 2010).

Neste contexto seria plausível especular a existência de uma alça de retroalimentação entre endocanabinóides e a expressão do receptor CB₁. Dessa forma estímulos capazes de induzir aumento nos níveis de anandamida (como o exercício) deveriam induzir, em curto prazo, aumento na expressão de receptores CB₁, ao passo que estímulos de grande magnitude (por exemplo, realização de exercício associado ao tratamento com URB597 ou tratamentos duradouros com inibidores da FAAH ou agonistas CB₁) deveriam levar ao efeito oposto, provavelmente por induzir uma superativação do receptor CB₁ e sua consequente internalização (subregulação).

Consistentemente com essa ideia, alguns trabalhos mostraram que a administração repetida de URB597 (Marco *et al.*, 2009) e de agonistas canabinóides (Romero *et al.*, 1998; Sim-Selley *et al.*, 2006) diminuem o *binding* do receptor CB₁ no hipocampo de camundongos. Similarmente, a redução na expressão de receptores CB₁ também ocorre no hipocampo de animais submetidos a um longo programa de treinamento físico (Gomes Da Silva *et al.*, 2010).

Nosso estudo também mostrou que a ativação do receptor CB₁, durante o exercício, parece ser importante para desencadear a produção de BDNF e, conseqüentemente, o efeito pró-cognitivo. Como o BDNF é uma neurotrofinas capaz de mediar vários processos celulares no cérebro de mamíferos (Park e Poo, 2013) é possível que ele tenha sido o responsável em mediar o efeito promnésico do exercício,

possivelmente, por induzir o processo de proliferação celular e neurogênese hipocampal.

Em concordância com essa hipótese, o tratamento com AM251 foi capaz de bloquear tanto o efeito promnésico induzido pelo exercício quanto a expressão de BDNF. Além disso, o antagonismo do receptor CB₁, durante 7 dias de exercício na esteira, preveniu a proliferação celular, a astro-gliogênese e a neurogênese hipocampal. Tal fato é bastante aceitável uma vez que o BDNF é apontado como capaz de mediar vários eventos celulares, incluindo o crescimento e diferenciação neuronal, a plasticidade sináptica e funções cognitivas especializadas (Park e Poo, 2013). Kim *et al.* (2014), em um estudo recente, que utilizou um modelo animal para a doença de Alzheimer (A β 25-35), mostraram que o exercício físico realizado na esteira, durante 4 semanas, melhora a memória de curta duração dos animais, provavelmente, por induzir aumento na expressão de BDNF e neurogênese hipocampal (Kim *et al.*, 2014).

O fato de não termos encontrado nenhuma alteração nos níveis hipocampais dos demais fatores tróficos (NT3, NT4 e NGF) após o exercício coloca o BDNF como uma neurotrofina chave para mediar os efeitos dos endocanabinóides sobre a melhora da memória espacial induzida pelo exercício. Em relação a ausência de alteração na expressão das outras neurotrofinas após o exercício, trabalhos anteriores encontraram resultados semelhantes (Molteni *et al.*, 2002; Ogborn e Gardiner, 2010; Keeler *et al.*, 2012).

Apesar de nós não termos realizado experimentos que demonstram uma relação causal entre a redução na expressão do BDNF e a ocorrência de déficits de memória, evidências obtidas em estudos com humanos também sugerem que o mecanismo pelo

qual os endocanabinóides medeiam os efeitos do exercício sobre os sintomas da depressão é dependente da expressão do BDNF (Heyman *et al.*, 2012).

Hill *et al.* (2010) em um estudo que avaliou o papel do sistema canabinóide em mediar a proliferação celular hipocampal induzida pelo exercício voluntário, também mostrou que sinalização canabinóide endógena durante o exercício é fundamental para a ocorrência desse fenômeno (Hill *et al.*, 2010), sustentando a ideia de que o BDNF possa ser o mediador da sinalização canabinóide durante o exercício. De acordo com isso, outros trabalhos também mostraram que a ausência do receptor CB₁ está relacionada a um prejuízo emocional e a uma redução dos níveis hipocampais do BDNF (Aso *et al.*, 2008) o que sugere uma importante ligação entre a ativação do receptor CB₁ e o papel crucial desempenhado pelo BDNF em mediar respostas cognitivas (Griffin *et al.*, 2009)/emocionais (Aso *et al.*, 2008).

Em conjunto, os nossos resultados sugerem que o sistema endocanabinóide medeia o efeito promésico do exercício através da produção de BDNF, supostamente, por interferir com vias intracelulares diretamente relacionadas ao controle da neurogênese hipocampal.

Conclusão

Enquanto substâncias exógenas que ativam diretamente os receptores CB₁ prejudicam a função hipocampal (Hoffman *et al.*, 2007) e o aprendizado (Lichtman *et al.*, 1995), o presente estudo revelou que a facilitação da sinalização endocanabinóide, por sete dias, através do exercício físico ou da inibição FAAH, melhora a memória espacial de curta duração em animais. Os nossos resultados também fornecem evidência que o aumento da expressão do BDNF possa ser um dos mecanismos envolvidos nesse processo, possivelmente por induzir proliferação celular e neurogênese hipocampal.

Referências Bibliográficas

ABELAIRA, H. M.; REUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35 Suppl 2, p. S112-20, 2013. ISSN 1809-452X (Electronic)

1516-4446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271223> >.

AGUADO, T. et al. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. **FASEB J**, v. 19, n. 12, p. 1704-6, Oct 2005. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037095> >.

AGUADO, T. et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. **J Biol Chem**, v. 282, n. 33, p. 23892-8, Aug 17 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556369> >.

ALBECK, D. S. et al. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. **Behav Brain Res**, v. 168, n. 2, p. 345-8, Apr 3 2006. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16388860> >.

AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Prog Neurobiol**, v. 58, n. 4, p. 315-48, Jul 1999. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368032> >.

ASO, E. et al. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. **J Neurochem**, v. 105, n. 2, p. 565-72, Apr 2008. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047561> >.

ATWOOD, B. K.; MACKIE, K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 3, p. 467-79, Jun 2010. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20590558> >.

BAKER, K. B.; KIM, J. J. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. **Learn Mem**, v. 9, n. 2, p. 58-65, Mar-Apr 2002. ISSN 1072-0502 (Print)

1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992016> >.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 5, p. 536-42, Jul 2011. ISSN 1096-3634 (Electronic)

1084-9521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767656> >.

BISOGNO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 2, p. 224-38, Jun 2005. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935454> >.

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. **Biochem J**, v. 351 Pt 3, p. 817-24, Nov 1 2000. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042139> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 40, p. 14515-20, Oct 5 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452348> >.

BRUSCO, A. et al. Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1139, p. 450-7, Oct 2008. ISSN 1749-6632 (Electronic)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991892> >.

BUTOVSKY, E. et al. In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol. **J Neurochem**, v. 93, n. 4, p. 802-11, May 2005. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857384> >.

CABRAL, G. A.; MARCIANO-CABRAL, F. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 6, p. 1192-7, Dec 2005. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16204639> >.

CAO, X. et al. The timing of maternal separation affects morris water maze performance and long-term potentiation in male rats. **Dev Psychobiol**, May 25 2013. ISSN 1098-2302 (Electronic)

0012-1630 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23712516> >.

CARLISLE, S. J. et al. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. **Int Immunopharmacol**, v. 2, n. 1, p. 69-82, Jan 2002. ISSN 1567-5769 (Print)

1567-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11789671> >.

CHAOULOFF, F. et al. Endocannabinoids and motor behavior: CB1 receptors also control running activity. **Physiology (Bethesda)**, v. 26, n. 2, p. 76-7; author reply 78, Apr 2011. ISSN 1548-9221 (Electronic)

1548-9221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487025> >.

CHAPERON, F.; THIEBOT, M. H. Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. **Crit Rev Neurobiol**, v. 13, n. 3, p. 243-81, 1999. ISSN 0892-0915 (Print)

0892-0915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803637> >.

CHRISTIE, M. J.; VAUGHAN, C. W. Neurobiology Cannabinoids act backwards. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 527-30, Mar 29 2001. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11279473> >.

CLARKSON-SMITH, L.; HARTLEY, A. A. Relationships between physical exercise and cognitive abilities in older adults. **Psychol Aging**, v. 4, n. 2, p. 183-9, Jun 1989. ISSN 0882-7974 (Print)

0882-7974 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2789745> >.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 295-301, Jun 2002. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086747> >.

DAVIES, S. N.; PERTWEE, R. G.; RIEDEL, G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 8, p. 993-1007, Jun 2002. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12128000> >.

DE MIRANDA, A. S. et al. Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA). **Neurosci Lett**, v. 491, n. 3, p. 202-6, Mar 24 2011. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256928> >.

DE PETROCELLIS, L.; CASCIO, M. G.; DI MARZO, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. **Br J Pharmacol**, v. 141, n. 5, p. 765-74, Mar 2004. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744801> >.

DEROCQ, J. M. et al. Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations. **FEBS Lett**, v. 369, n. 2-3, p. 177-82, Aug 7 1995. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544292> >.

DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 34, n. 5, p. 605-13, Nov 1988. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848184> >.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 5, p. 438-55, May 2008. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18446159> >.

_____. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. **Pharmacol Res**, v. 60, n. 2, p. 77-84, Aug 2009. ISSN 1096-1186 (Electronic)

1043-6618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559360> >.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 9, p. 771-84, Sep 2004. ISSN 1474-1776 (Print)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15340387> >.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L.; BISOGNO, T. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. **Handb Exp Pharmacol**, n. 168, p. 147-85, 2005. ISSN 0171-2004 (Print)

0171-2004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596774> >.

DI MARZO, V.; MATIAS, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 5, p. 585-9, May 2005. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856067> >.

DRUMOND, L. E. et al. Differential effects of swimming training on neuronal calcium sensor-1 expression in rat hippocampus/cortex and in object recognition memory tasks. **Brain Res Bull**, v. 88, n. 4, p. 385-91, Jul 1 2012. ISSN 1873-2747 (Electronic)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521426> >.

DUBREUCQ, S. et al. CB1 receptor deficiency decreases wheel-running activity: consequences on emotional behaviours and hippocampal neurogenesis. **Exp Neurol**, v. 224, n. 1, p. 106-13, Jul 2010. ISSN 1090-2430 (Electronic)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20138171> >.

EGASHIRA, N. et al. Intracerebral microinjections of delta 9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. **Brain Res**, v. 952, n. 2, p. 239-45, Oct 18 2002. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376185> >.

ELPHICK, M. R.; EGERTOVA, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, n. 1407, p. 381-408, Mar 29 2001. ISSN 0962-8436 (Print)

0962-8436 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11316486> >.

ERICKSON, K. I. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 7, p. 3017-22, Feb 15 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282661> >.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, Jan 14 2010. ISSN 1097-4199 (Electronic)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152109> >.

FERREIRA, A. F. et al. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity. **Brain Res**, v. 1425, p. 111-22, Nov 24 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035567> >.

FRANKLIN, G. P. A. K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. Second Edition. 2001. 350.

GALANI, R. et al. Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. **Behav Brain Res**, v. 96, n. 1-2, p. 1-12, Nov 1998. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9821539> >.

GALIEGUE, S. et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **Eur J Biochem**, v. 232, n. 1, p. 54-61, Aug 15 1995. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556170> >.

GARCIA-GUTIERREZ, M. S. et al. Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 388-96, Oct 2013. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796670> >.

GOMES DA SILVA, S. et al. Physical exercise in adolescence changes CB1 cannabinoid receptor expression in the rat brain. **Neurochem Int**, v. 57, n. 5, p. 492-6, Nov 2010. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621146> >.

GONG, J. P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Res**, v. 1071, n. 1, p. 10-23, Feb 3 2006. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472786> >.

GOPARAJU, S. K. et al. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 57, n. 4, p. 417-23, Feb 15 1999. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9933030> >.

GRESACK, J. E.; FRICK, K. M. Effects of continuous and intermittent estrogen treatments on memory in aging female mice. **Brain Res**, v. 1115, n. 1, p. 135-47, Oct 18 2006. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920082> >.

GRIFFIN, E. W. et al. Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism. **Hippocampus**, v. 19, n. 10, p. 973-80, Oct 2009. ISSN 1098-1063 (Electronic)

1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19437410> >.

HANUS, L. et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 7, p. 3662-5, Mar 27 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259648> >.

HERKENHAM, M. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 5, p. 1932-6, Mar 1990. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2308954> >.

HEYMAN, E. et al. Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans--possible implications for reward and depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 6, p. 844-51, Jun 2012. ISSN 1873-3360 (Electronic)

0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029953> >.

HILL, M. N. et al. Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 20, n. 4, p. 513-23, Apr 2010. ISSN 1098-1063 (Electronic)

1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19489006> >.

HILLARD, C. J.; HARRIS, R. A.; BLOOM, A. S. Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 232, n. 3, p. 579-88, Mar 1985. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2983062> >.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 58-65, Jan 2008. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094706> >.

HOFFMAN, A. F. et al. Opposing actions of chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinoid antagonists on hippocampal long-term potentiation. **Learn Mem**, v. 14, n. 1-2, p. 63-74, Jan-Feb 2007. ISSN 1549-5485 (Electronic)

1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202425> >.

HOWLETT, A. C. Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. **Life Sci**, v. 35, n. 17, p. 1803-10, Oct 22 1984. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6090851> >.

HOWLETT, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 2, p. 161-202, Jun 2002. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037135> >.

HUANG, S. M. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 8400-5, Jun 11 2002. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060783> >.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: 2002.

JOHNSON, R. A. et al. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 increases more in mice selected for increased voluntary wheel running. **Neuroscience**, v. 121, n. 1, p. 1-7, 2003. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946694> >.

KEELER, B. E. et al. Acute and prolonged hindlimb exercise elicits different gene expression in motoneurons than sensory neurons after spinal cord injury. **Brain Res**, v. 1438, p. 8-21, Feb 15 2012. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22244304> >.

KIM, B. K. et al. Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing neurogenesis in amyloid beta-induced Alzheimer disease rats. **J Exerc Rehabil**, v. 10, n. 1, p. 2-8, Feb 2014. ISSN 2288-176X (Print)

2288-176X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678498> >.

KIM, Y. P. et al. Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. **Int J Sports Med**, v. 24, n. 2, p. 114-7, Feb 2003. ISSN 0172-4622 (Print)

0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669257> >.

LAZARONI, T. L. et al. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 97, n. 1, p. 113-23, Jan 2012. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067210> >.

LEASURE, J. L.; JONES, M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. **Neuroscience**, v. 156, n. 3, p. 456-65, Oct 15 2008. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721864> >.

LEITE, H. R. et al. Swim training attenuates oxidative damage and promotes neuroprotection in cerebral cortical slices submitted to oxygen glucose deprivation. **J Neurochem**, v. 123, n. 2, p. 317-24, Oct 2012. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913494> >.

LICHTMAN, A. H.; DIMEN, K. R.; MARTIN, B. R. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 119, n. 3, p. 282-90, Jun 1995. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7675962> >.

LIN, Q. S. et al. Hippocampal endocannabinoids play an important role in induction of long-term potentiation and regulation of contextual fear memory formation. **Brain Res Bull**, v. 86, n. 3-4, p. 139-45, Oct 10 2011. ISSN 1873-2747 (Electronic)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801815> >.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110839> >.

LIU, H. L. et al. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. **Behav Brain Res**, v. 218, n. 2, p. 308-14, Apr 15 2011. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192984> >.

LOU, S. J. et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Res**, v. 1210, p. 48-55, May 19 2008. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423578> >.

MADRONAL, N. et al. Involvement of cannabinoid CB1 receptor in associative learning and in hippocampal CA3-CA1 synaptic plasticity. **Cereb Cortex**, v. 22, n. 3, p. 550-66, Mar 2012. ISSN 1460-2199 (Electronic)

1047-3211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673070> >.

MARCO, E. M. et al. Long-term consequences of URB597 administration during adolescence on cannabinoid CB1 receptor binding in brain areas. **Brain Res**, v. 1257, p. 25-31, Feb 27 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19133243> >.

MARSICANO, G. et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. **Science**, v. 302, n. 5642, p. 84-8, Oct 3 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14526074> >.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-4, Aug 9 1990. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2165569> >.

MAZZOLA, C. et al. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. **Learn Mem**, v. 16, n. 5, p. 332-7, May 2009. ISSN 1549-5485 (Electronic)

1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403796> >.

MECHOULAM, R.; FRIDE, E.; DI MARZO, V. Endocannabinoids. **Eur J Pharmacol**, v. 359, n. 1, p. 1-18, Oct 16 1998. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9831287> >.

MECHOULAM, R.; GAONI, Y. Recent advances in the chemistry of hashish. **Fortschr Chem Org Naturst**, v. 25, p. 175-213, 1967. ISSN 0071-7886 (Print)

0071-7886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4879547> >.

MITRA, R. et al. Social stress-related behavior affects hippocampal cell proliferation in mice. **Physiol Behav**, v. 89, n. 2, p. 123-7, Sep 30 2006. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16837015> >.

MOLTENI, R.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 1107-16, Sep 2002. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12383240> >.

MONTEIRO, B. M. et al. Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. **Hippocampus**, v. 24, n. 2, p. 239-48, Feb 2014. ISSN 1098-1063 (Electronic)

1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24123782> >.

MOREIRA, F. A. et al. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 141-50, Jan 2008. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709120> >.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-5, Sep 2 1993. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689702> >.

MURRAY, R. M. et al. Cannabis, the mind and society: the hash realities. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 885-95, Nov 2007. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17925811> >.

NEEPER, S. A. et al. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res**, v. 726, n. 1-2, p. 49-56, Jul 8 1996. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8836544> >.

NIWA, M. et al. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. **Neuron**, v. 65, n. 4, p. 480-9, Feb 25 2010. ISSN 1097-4199 (Electronic)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188653> >.

O'CALLAGHAN, R. M.; OHLE, R.; KELLY, A. M. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. **Behav Brain Res**, v. 176, n. 2, p. 362-6, Jan 25 2007. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113656> >.

OGBORN, D. I.; GARDINER, P. F. Effects of exercise and muscle type on BDNF, NT-4/5, and TrKB expression in skeletal muscle. **Muscle Nerve**, v. 41, n. 3, p. 385-91, Mar 2010. ISSN 1097-4598 (Electronic)

0148-639X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19813200> >.

OLSON, A. K. et al. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 250-60, 2006. ISSN 1050-9631 (Print)

1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16411242> >.

ONAIVI, E. S. et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1074, p. 514-36, Aug 2006. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105950> >.

PANLILIO, L. V.; JUSTINOVA, Z.; GOLDBERG, S. R. Inhibition of FAAH and activation of PPAR: New approaches to the treatment of cognitive dysfunction and drug addiction. **Pharmacol Ther**, Jan 16 2013. ISSN 1879-016X (Electronic)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333350> >.

PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 7-23, Jan 2013. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254191> >.

PATEL, S.; HILLARD, C. J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 318, n. 1, p. 304-11, Jul 2006. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569753> >.

PATON, G. S.; PERTWEE, R. G.; DAVIES, S. N. Correlation between cannabinoid mediated effects on paired pulse depression and induction of long term potentiation in the rat hippocampal slice. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 9, p. 1123-30, Sep 1998. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9833642> >.

PATON, W. D. Pharmacology of marijuana. **Annu Rev Pharmacol**, v. 15, p. 191-220, 1975. ISSN 0066-4251 (Print)

0066-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/807151> >.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p. 873-84, Nov 2003. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595399> >.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, Apr 21 1977. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/559941> >.

PORTER, A. C. et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 301, n. 3, p. 1020-4, Jun 2002. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023533> >.

RA, S. M. et al. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. **Neurosci Lett**, v. 333, n. 2, p. 123-6, Nov 22 2002. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419496> >.

RADAK, Z. et al. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochem Int**, v. 38, n. 1, p. 17-23, Jan 2001. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913684> >.

RAICHLLEN, D. A. et al. Wired to run: exercise-induced endocannabinoid signaling in humans and cursorial mammals with implications for the 'runner's high'. **J Exp Biol**, v. 215, n. Pt 8, p. 1331-6, Apr 15 2012. ISSN 1477-9145 (Electronic)

0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22442371> >.

RAICHLLEN, D. A. et al. Exercise-induced endocannabinoid signaling is modulated by intensity. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 4, p. 869-75, Apr 2013. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990628> >.

ROMERO, J. et al. Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta9-tetrahydrocannabinol. **Synapse**, v. 30, n. 3, p. 298-308, Nov 1998. ISSN 0887-4476 (Print)

0887-4476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9776133> >.

SIM-SELLEY, L. J. et al. Prolonged recovery rate of CB1 receptor adaptation after cessation of long-term cannabinoid administration. **Mol Pharmacol**, v. 70, n. 3, p. 986-96, Sep 2006. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760363> >.

SMITH, R. A.; FATHI, Z. Recent advances in the research and development of CB1 antagonists. **IDrugs**, v. 8, n. 1, p. 53-66, Jan 2005. ISSN 1369-7056 (Print)

1369-7056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15650943> >.

SOUSA, N.; ALMEIDA, O. F.; WOTJAK, C. T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. **Genes Brain Behav**, v. 5 Suppl 2, p. 5-24, 2006. ISSN 1601-1848 (Print)

1601-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16681797> >.

SOYA, H. et al. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 358, n. 4, p. 961-7, Jul 13 2007. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524360> >.

SPARLING, P. B. et al. Exercise activates the endocannabinoid system. **Neuroreport**, v. 14, n. 17, p. 2209-11, Dec 2 2003. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625449> >.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3923523> >.

SUAREZ, L. M. et al. Systemic injection of kainic Acid differently affects LTP magnitude depending on its epileptogenic efficiency. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e48128, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118939> >.

SUENAGA, T.; KAKU, M.; ICHITANI, Y. Effects of intrahippocampal cannabinoid receptor agonist and antagonist on radial maze and T-maze delayed alternation performance in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 1, p. 91-6, Nov 2008. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639576> >.

SUIJO, K. et al. Resistance Exercise Enhances Cognitive Function in Mouse. **Int J Sports Med**, Oct 5 2012. ISSN 1439-3964 (Electronic)

0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041964> >.

TASHIRO, A.; MAKINO, H.; GAGE, F. H. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. **J Neurosci**, v. 27, n. 12, p. 3252-9, Mar 21 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376985> >.

TERRANOVA, J. P. 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 352, n. 5, p. 576-9, Nov 1995. ISSN 0028-1298 (Print)

0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8751088> >.

UDA, M. et al. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. **Brain Res**, v. 1104, n. 1, p. 64-72, Aug 9 2006. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824490> >.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13427-31, Nov 9 1999. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10557337> >.

VARVEL, S. A.; LICHTMAN, A. H. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 301, n. 3, p. 915-24, Jun 2002. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023519> >.

VARVEL, S. A. et al. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 5, p. 1032-41, May 2007. ISSN 0893-133X (Print)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17047668> >.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 19, n. 4, p. 283-95, Dec 2005. ISSN 1545-9683 (Print)

1545-9683 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263961> >.

WANG, J.; UEDA, N. Biology of endocannabinoid synthesis system. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 89, n. 3-4, p. 112-9, Sep 2009. ISSN 1098-8823 (Print)

1098-8823 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126434> >.

WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. **Science**, v. 296, n. 5568, p. 678-82, Apr 26 2002. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11976437> >.

WISE, L. E.; HARLOE, J. P.; LICHTMAN, A. H. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) knockout mice exhibit enhanced acquisition of an aversive, but not of an appetitive, Barnes maze task. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, n. 4, p. 597-601, Nov 2009. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524055> >.

WISE, L. E.; THORPE, A. J.; LICHTMAN, A. H. Hippocampal CB(1) receptors mediate the memory impairing effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 9, p. 2072-80, Aug 2009. ISSN 1740-634X (Electronic)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322169> >.

WOLF, S. A. et al. Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 12, 2010. ISSN 1478-811X (Electronic)

1478-811X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565726> >.

ZOUBOVSKY, S. P. et al. Working memory deficits in neuronal nitric oxide synthase knockout mice: potential impairments in prefrontal cortex mediated cognitive function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 408, n. 4, p. 707-12, May 20 2011. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21539806 >.

ANEXO I

PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS DIRETAMENTE RELACIONADAS À TESE:

- **Artigo Publicado:** Hippocampus, 2014 - *A Role for the Endocannabinoid System in Exercise-Induced Spatial Memory Enhancement in Mice;*
- **2º Lugar - Prêmio Juarez Aranha Ricardo, SBNeC 2013:** *Involvement of the endocannabinoid system in promnesic effect induced by physical exercise;*

ANEXO II

PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS AFINS À TESE:

- **a) Artigo Publicado (colaboração):** Journal of Neurochemistry, 2013 - *Swim training attenuates oxidative damage andpromotes neuroprotection in cerebral cortical slices submitted to oxygenglucose deprivation.*
- **b) Artigo Publicado (colaboração):** Journal of Neurochemistry, 2014 - *Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to in vitro ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers.*