

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

FERNANDA TEIXEIRA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO
PREJÚÍZO DO COMPORTAMENTO SOCIAL EM RATOS EXPOSTOS A *STATUS*
EPILEPTICUS NEONATAL**

São Paulo

2018

FERNANDA TEIXEIRA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO
PREJUÍZO DO COMPORTAMENTO SOCIAL EM RATOS EXPOSTOS A *STATUS*
EPILEPTICUS NEONATAL**

Dissertação de mestrado na linha de
pesquisa Neurociências do
Desenvolvimento, apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Distúrbios do Desenvolvimento da
Universidade Presbiteriana Mackenzie.

Orientadora: Roberta M. Cysneiros

São Paulo

2018

R484i Ribeiro, Fernanda Teixeira.
Investigação da participação do sistema endocanabinoide no prejuízo do comportamento social em ratos expostos ao status epilepticus neonatal / Fernanda Teixeira Ribeiro.
38 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Distúrbios do Desenvolvimento) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2018.
Orientador: Roberta Monterazzo Cysneiros.
Referências bibliográficas: f. 33-38.

1. Endocanabinoide. 2 Motivação social. 3. Memória social. 4. Sociabilidade. 5. TEA. I. Cysneiros, Roberta Monterazzo, *orientador*. II. Título.

CDD 616.8982

Bibliotecária Responsável: Jaqueline Bay Inacio Duarte- CRB 8/9509

FERNANDA TEIXEIRA RIBEIRO

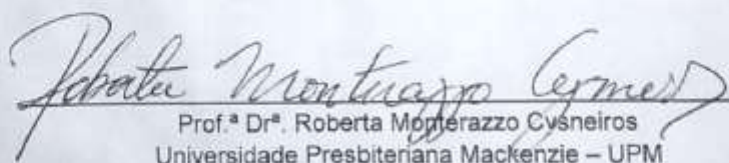
**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE
NO PREJUÍZO DO COMPORTAMENTO SOCIAL EM RATOS EXPOSTOS A
STATUS EPILEPTICUS NEONATAL**

Dissertação de mestrado na
linha de pesquisa
Neurociências do
Desenvolvimento, apresentada
ao Programa de Pós-
Graduação em Distúrbios do
Desenvolvimento da
Universidade Presbiteriana
Mackenzie.

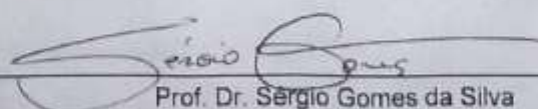
**Orientadora: Roberta M
Cysneiros**

Data da defesa: 16 de Agosto de 2018

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dr.ª Roberta Montuazzo Cysneiros
Universidade Presbiteriana Mackenzie – UPM


Prof.ª Dr.ª Miriam Oliveira Ribeiro
Universidade Presbiteriana Mackenzie – UPM


Prof. Dr. Sérgio Gomes da Silva

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora Roberta Monterazzo Cysneiros por ter abraçado a ideia inicial de meu projeto de pesquisa e ter me ajudado a lapidá-la em um real projeto, condizente com sua linha de pesquisa no Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Agradeço, Roberta, por todo o tempo e imensa dedicação disponibilizados para minha orientação. Seus direcionamentos, sempre presentes, foram fundamentais para a execução deste estudo e para a escrita da dissertação. Sua dedicação no laboratório, empenho em analisar meus resultados e disposição em me orientar foram muito além do que eu poderia esperar. Um verdadeiro aprendizado. Muito obrigada por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa.

Grandes agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa, que viabilizou que eu pudesse fazer o curso*.

Obrigada aos professores Miriam Ribeiro e Sérgio Gomes pelas considerações na banca de qualificação, que foram muito relevantes para definir os rumos e aparar as arestas deste trabalho. À Miriam, em especial, pela indicação da Roberta, na entrevista de seleção do mestrado, para que eu pudesse desenvolver meu projeto.

Agradeço ao colega Geraldo Barbosa, pelo apoio e presença na fase inicial da pesquisa. Agradeço imensamente ao veterinário Alexandre Arnold, pelos ensinamentos e pela ajuda diária na aplicação de medicação nos animais. Ao Seu Domingos e ao Junior, técnicos do biotério, sempre tão prestativos.

Agradeço enormemente às orientandas da professora Miriam, Fernanda Lorena e Bruna Pascarelli, por me ensinarem a técnica de RT-PCR e por estarem sempre disponíveis para esclarecer dúvidas. À muito querida Marcia Serro-Azul, por toda ajuda na execução do RT-PCR e ELISA. À Mariana Nejm, da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), pelos aprendizados ao longo do processo. Ao Eduardo, técnico do laboratório, sempre eficiente e gentil. Ao professor Leandro Tavares, da Universidade Mackenzie, pelo valioso auxílio com as estatísticas.

Agradeço ao Samuel Pereira, Pedro Bastos e aos demais alunos de iniciação científica do grupo da professora Roberta (muito boa, aliás, em manter a coesão e engajamento de seus alunos), sempre presentes e dispostos a ajudar. Agradeço aos professores do Programa e às maravilhosas amigas que fiz durante esse tempo, como a Izabella Paes e a Raquel de Sá.

Por fim, agradeço a pai, mãe, irmã e ao companheiro Felipe Esteves, pelo eterno apoio e amor. E aos grandes amigos, minha família de alma, que estão, com certeza, sempre presentes.

* O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil Capes – Código de Financiamento 001

RESUMO

Animais expostos a *status epilepticus* (SE) neonatal são um modelo promissor para o estudo de sistemas cerebrais específicos envolvidos no prejuízo do comportamento social que caracteriza o transtorno do espectro autista (TEA). Animais submetidos a SE neonatal mostram, na vida adulta, comportamentos característicos do TEA, como redução do interesse por interação com novidade social, apesar de manterem funções cognitivas preservadas. Este trabalho utiliza o modelo animal submetido a SE neonatal para investigar a participação do sistema endocanabinoide na neurobiologia do TEA, considerando as evidências sobre o envolvimento desse sistema na modulação da sociabilidade. Ratos *Wistar* machos foram submetidos ao SE no nono dia de vida (P9) por administração intraperitoneal de pilocarpina (380 mg/kg, i.p.) – enquanto controles receberam salina 0,9% (0,1 ml/ 10g). Em P60 os animais adultos de ambos os grupos foram subdivididos em: administrados com salina 0,9% ou com o fármaco JZL195 (0,01 mg/kg, i.p.), inibidor de enzimas catalisadoras da hidrólise de endocanabinoides, agonistas endógenos dos receptores canabinoides (CB1). Após 2 horas, os animais foram avaliados em testes comportamentais de memória social, sociabilidade e memória de curto prazo. Ao fim dos testes, foram extraídos tecidos de estruturas da via mesocorticolímbica: hipocampo, córtex pré-frontal, estriado e amígdala. O material extraído foi utilizado para análise da expressão gênica do gene *CNR1* (por RT-PCR) e quantificação de receptores CB1 (por ELISA). No teste de memória social, animais controle tratados com JZL, quando apresentados à novidade social, mostraram menos interesse em investigar a novidade social ($F(1,18)=5,481$; $p=0,03$), sem prejuízo da capacidade de discriminação ($F(1,18)=9,807$; $p=0,0058$); animais experimentais tratados com JZL não apresentaram diferença significativa no tempo de investigação da novidade social ($F(1,17)=2,509$; n.s.). O tratamento com JZL interferiu especificamente no tempo de investigação do grupo controle em todas as sessões ($F(1,175)=0,6686$; $p<0,0001$). No teste de sociabilidade, o tratamento com JZL reduziu o tempo de investigação dos animais controle ($F(1,19)=4,863$; $p=0,04$) e afetou a preferência por novidade social ($t(20)=3,356$; $p<0,01$); o JZL não afetou o tempo de investigação dos animais experimentais ($F(1,19)=0,001$; n.s.). No teste de reconhecimento de objetos, o tratamento com JZL afetou a memória de curto prazo de animais controle ($F(1,13)=4,955$; $p=0,04$), que não discriminaram o objeto, e reduziu o tempo de investigação nos animais experimentais ($F(1,11)=5,999$; $p=0,03$), sem afetar a discriminação ($F(1,11)=0,860$; n.s.). No teste de locomoção, o tratamento com JZL aumentou especificamente a locomoção total de animais controles ($F(1,24)=4,837$; $p=0,03$), não afetando de forma significativa os animais experimentais ($F(1,24)=0,341$; n.s.). Quanto à locomoção na zona central, o fármaco interferiu em ambos os grupos, reduzindo a permanência nas áreas centrais ($F(1,24)=4,547$; $p=0,04$). A PCR-RT não indicou diferença na expressão do RNAm do receptor CB1 nas estruturas analisadas. A quantificação por Elisa apontou menor concentração de CB1 no hipocampo de experimentais ($U=2000$; $p=0,03$). Nossos resultados reforçam a ideia de que o modelo animal de ratos expostos a SE neonatal é válido e relevante para estudo da motivação social, comprometida no TEA. Intervenções farmacológicas tendo como alvo os receptores CB1 podem ser um caminho para explorar essa circuitaria, tendo em vista os resultados de nossos testes comportamentais (com prejuízo específico dos controles nos testes de memória social e sociabilidade) e as alterações moleculares identificadas no hipocampo de experimentais. Nossos resultados sugerem que o sistema endocanabinoide participa da modulação de comportamento social e que existe alteração neurobiológica dessa circuitaria no TEA.

Palavras-chave: *endocanabinoide, motivação social, memória social, sociabilidade, TEA.*

ABSTRACT

Rats exposed to neonatal seizures are a model for study brain circuits that underlies social impairment symptoms of Autism Spectrum Disorder (ASD). Animals submitted to status epilepticus neonatal (SE) – a single long-term seizure induced by pharmacological agent – show a lack of interest for social novelty and social discrimination deficit. We used this animal model for ASD to investigate a possible role of endocannabinoid system in ASD etiology, based on evidences that improve the role of endocannabinoids in multiple processes, as epileptic seizures suppression and emotion regulation. Male *Wistar* rats were submitted to SE in ninth day of life (P9) by pilocarpine injection (380 mg/kg, i.p.) – control animals received saline 0,9% (0,1 mL/ 10g). In P60 both groups were injected with JZL195 (0,01 mg/kg, i.p.) – inhibitor of FAAH and MAGL, enzymes that catalise endogenous cannabinoids agonists. After two hours, animals were submitted to behavioral tests that evaluated social memory, interest for social novelty and short-term memory (objects recognition test). Neurobiological correlation for the behavioral results was investigated by genic expression analysis of CNR1 gene (RT-PCR) and quantification of CB1 receptor (ELISA). Results of social memory test show a deficit of social investigation in control rats treated with JZL ($F(1,18)=5,481$; $p=0,03$), without affect social discrimination ($F(1,18)=9,807$; $p=0,0058$); there was no effect of JZL in experimental group ($F(1,17)=2,509$; n.s.). In social novelty test, JZL affected the investigation time in control group ($F(1,19)=4,863$; $p=0,04$) and the preference for investigating social novelty ($t(20)=3,356$; $p<0,01$); JZL had no effect on experimental group ($F(1,19)=0,001$; n.s.). In the test of objects recognition, JZL caused object discrimination deficit in control group ($F(1,13)=4,955$; $p=0,04$) and affected time investigation in experimental group ($F(1,11)=5,999$; $p=0,03$), without affect in discrimination ($F(1,11)=0,860$; n.s.). The analysis of total locomotion in open field showed that JZL caused hyperlocomotion specifically in control animals ($F(1,24)=4,837$; $p=0,03$); analysis of central locomotion showed that JZL affected both groups, reducing time spent in central area ($F(1,24)=4,547$; $p=0,04$). Genic expression analysis of CNR1 gene did not present any difference in mRNA expression in hippocampus, pre-frontal cortex, striatum and amygdala. CB1 quantification presented a difference in hippocampus of experimental animals ($U=2000$; $p=0,03$). Our results reinforce the idea that the animal model of rats exposed to neonatal SE is valid and relevant to the study of social motivation, compromised in ASD. Pharmacological interventions targeting CB1 receptors are a way to explore this circuitry, given the results of our behavioral tests (with specific impairment of controls on social memory and sociability tests) and the molecular differences identified in the hippocampus of experimental group. Our results suggest that the endocannabinoid system participates in the modulation of social behavior and that there is a neurobiological alteration of this circuit in ASD.

Key-words: *endocannabinoid, social motivation, social memory, sociability, ASD.*

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Esquema do método	16
Fig. 2 – Representação gráfica do teste de memória social	21
Fig. 3 – Representação gráfica do teste de sociabilidade	23
Fig. 4 – Representação gráfica do teste de reconhecimento de objetos	24
Fig. 5 – Representação gráfica do teste de locomoção	25
Fig.6 – Expressão de mRNA para receptor CB1	26
Fig.7 – Quantificação de receptor CB1	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. HIPÓTESE	13
3. OBJETIVO	14
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. MÉTODO	15
4.1 ANIMAIS	15
4.2 INDUÇÃO AO <i>STATUS EPILEPTICUS</i> (SE)	15
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	16
4.3.1 MEMÓRIA SOCIAL	16
4.3.2 SOCIABILIDADE	17
4.3.3 RECONHECIMENTO DE OBJETOS	17
4.4 ANÁLISE DOS TECIDOS PÓS-TESTES COMPORTAMENTAIS	18
4.4.1 RT-PCR	18
4.4.2 ELISA	18
4.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
5. RESULTADOS	20
5.1 MEMÓRIA SOCIAL	20
5.2 SOCIABILIDADE	22
5.3 RECONHECIMENTO DE OBJETOS	24
5.4 LOCOMOÇÃO	25
5.5 RT-PCR	26
5.6 ELISA	27
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

De origem provavelmente multifatorial (combinação entre condições neurobiológicas e fatores ambientais), o Transtorno do Espectro Autista (TEA) é caracterizado pelo “tripé” problemas na comunicação, prejuízos na interação social e padrões repetitivos de comportamento. O termo “espectro” engloba a variabilidade com que os sintomas se manifestam, podendo se combinar de forma singular em cada indivíduo. Pessoas com o diagnóstico de TEA apresentam dificuldades em se adaptar a novos ambientes, em responder a estímulos sociais, em fazer inferências sobre sentimentos e comportamentos alheios, tendo, assim, prejuízos de sociabilidade.

As causas neurobiológicas do autismo ainda não são compreendidas. Nos últimos anos, modelos animais têm se revelado úteis para sua investigação, apontando, inclusive, a possibilidade de etiologia comum ao autismo e a outros distúrbios, como a epilepsia (LOPES et al, 2016; CASTELHANO et al, 2010, 2013, 2015; LUGO et al, 2014; HOLMES et al, 2004). Em específico, modelos animais expostos a um único episódio de *status epilepticus* (SE) (atividade convulsiva contínua ou intermitente de ao menos de 30 minutos, de acordo com a Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra Epilepsia – ILAE, 1989) no período neonatal têm se mostrado promissores para o estudo de regiões e de sistemas cerebrais envolvidos na modulação de comportamentos sociais e da relação entre possíveis prejuízos nesses circuitos e o desenvolvimento de sintomas característicos do TEA (BARBOSA et al, 2017; LEITE et al, 2016; CASTELHANO et al, 2010, 2013, 2015; FABBRONI et al, 2013).

Nesse sentido, faz-se importante ressaltar a alta comorbidade entre epilepsia e TEA (MAZARATTI et al, 2017; SRIVASTAVA et al, 2017; TUCHMAN et al, 2013; TALOS et al, 2012). Uma porcentagem significativa de crianças diagnosticadas com TEA apresenta epilepsia – dados variam de 9% a 22% (SRIVASTAVA et al, 2017). Tal relação merece atenção, considerando que, na população geral, a prevalência de epilepsia varia de 0,4% a 1% (ILAE, 1997; WHO, 2005). Estudos com eletroencefalograma (EEG) revelam que mais de 60% dos indivíduos com TEA apresentam atividade cerebral epileptiforme, mesmo que assintomáticos para epilepsia (SPENCE et al, 2009). Esses dados reforçam a hipótese de etiologia comum aos dois transtornos.

Estudos com modelos animais indicam que crises convulsivas no período neonatal (sétimo ao décimo dia de vida) estão relacionadas à alta probabilidade de anormalidades no comportamento social. Ratos machos adultos que foram expostos a um episódio único de SE

neonatal, induzido por injeção de pilocarpina, apresentaram déficit de interação social (LEITE et al, 2016; CASTELHANO et al, 2010, 2013, 2015; FABBRONI et al, 2013) e de discriminação social (PACÍFICO, 2016). No entanto, esse mesmo modelo mostrou-se com funções cognitivas preservadas (BARBOSA et al, 2017), de forma que esse modelo animal se revela como útil para estudar prejuízos específicos de comportamento social.

É possível que as crises convulsivas neonatais interfiram no desenvolvimento de estruturas da via mesocorticolímbica, como hipocampo (HOLMES et al, 1998; LYNCH et al, 2000; VILLENEUVE et al, 2000; NISHIMURA et al, 2011; OKUYAMA et al, 2016; GARRIDO et al, 2016), amígdala (SULEYMANOVA et al, 2016; MCDONALD et al, 2016; GARRIDO et al, 2016) e córtex pré-frontal (ISAEVA et al, 2010; MENDES et al, 2016). Essas estruturas recebem projeção dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA), cuja descarga de dopamina é crucial para mediação da sensação de recompensa (CAO et al, 2010). O circuito mesocorticolímbico associa recompensa a situações necessárias à sobrevivência, de modo que tem função adaptativa. Esse sistema desempenha um papel importante, complexo e ainda pouco elucidado na motivação, no pensamento orientado para metas, na regulação emocional, na saliência emocional de estímulos e no reforço positivo (STANDAERT e GOLAN, 2014; TAN et al, 2014).

A menor preferência por novidade social observada nos modelos animais submetidos a SE neonatal sugere que a crise convulsiva no início da vida pode alterar a rede neural subjacente à motivação social. Na tentativa de investigar essa circuitaria ainda desconhecida, direcionamos a atenção para o sistema endocanabinoide. Esse sistema é constituído pelos receptores canabinoides – do tipo CB1 e CB2, sendo o CB1 o mais abundante no SNC –, os seus ligandos endógenos – os já referidos endocanabinoides – e as proteínas envolvidas na sua síntese e inativação (MECHOULAM et al, 2014).

Os endocanabinoides se diferenciam dos neurotransmissores clássicos basicamente por dois fatores: não são armazenados em vesículas (sua produção ocorre sob demanda, em resposta ao influxo de cálcio na célula) e por terem um sistema de transmissão retrógrado, ou seja, sua transmissão ocorre do neurônio pós-sináptico para o pré-sináptico. Isso significa que os endocanabinoides e os receptores CB1 influenciam eventos que ocorrem no neurônio pré-sináptico, como a liberação dos neurotransmissores como GABA e glutamato, envolvidos no balanço inibitório-excitatório das células. Sendo assim, os receptores CB1 influenciam de forma indireta a liberação da dopamina, pois inibem o efeito inibidor do GABA sobre a dopamina, de forma que esta é liberada em diversas estruturas do cérebro, incluindo as que fazem parte do sistema de recompensa, de forma que há aumento de dopamina no cérebro em

resposta ao aumento da disponibilidade de canabinoides nas fendas sinápticas (FERNANDEZ-RUIZ et al, 2010).

Estudos que avaliaram a liberação de dopamina em resposta ao aumento da disponibilidade de canabinoides nas fenda sinápticas, induzida por fármacos, evidenciam o aumento das quantidades de dopamina em regiões cerebrais da via mesocorticolímbica, como o córtex pré-frontal e o estriado (POLISSIDIS et al, 2013, 2010; MALONE e TAYLOR, 1999). Os receptores CB1 são expressos abundantemente em estruturas que participam da via mesocorticolímbica (FERNANDEZ-RUIZ et al, 2010), desempenhando papel na modulação da neurotransmissão excitatória e inibitória de GABA e glutamato.

Trabalhos com modelos animais sugerem que a sinalização endocanabinoide participa tanto da supressão de crises epiléticas (DE CARO et al, 2017; LUTZ et al, 2014; WALLACE et al, 2003) quanto da modulação do comportamento social (KAHRSON et al, 2016; MANDUCA et al, 2015; CHAKRABARTI et al, 2015; CAMPOLONGO et al, 2012). A sinalização de endocanabinoides cerebrais influencia a motivação para recompensas naturais (como comida, atividade sexual e interação social) e modula os efeitos gratificantes de drogas recreativas (PARSONS et al, 2015). De forma que elegemos o sistema endocanabinoide como alvo para o estudo da motivação social, que se mostra prejudicada nos estudos com modelo animal exposto a SE (LEITE et al, 2016; CASTELHANO et al, 2010, 2013, 2015; FABBRONI et al, 2013).

Os endocanabinoides atualmente mais estudados, a anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) são moléculas sinalizadoras lipídicas envolvidas em vários processos neurobiológicos (ARAQUE et al, 2017; MANDUCA et al, 2015; ALGER et al, 2011). Ambas têm a capacidade de ligação aos receptores CB1 e CB2, embora apresentem diferenças na afinidade e eficácia de ativação. Enquanto a AEA é agonista parcial dos receptores CB1 e agonista pouco potente dos receptores CB2, o 2-AG é um agonista completo de ambos os receptores (BLANKMAN et al, 2013; HOWLET et al, 2002). Como já mencionado, os endocanabinoides agem no SNC como neuromoduladores retrógrados, pois o estímulo que leva à sua síntese e libertação tem origem no neurónio pós-sináptico. A sua ação é limitada por processos de degradação. A AEA e o 2-AG são catalisados principalmente pelas enzimas FAAH (ácido graxo hidrolase de amido) e MAGL (lipase dos monoglicerois), respectivamente (MECHOULAM et al, 2014).

Considerando que a disponibilidade de endocanabinoides é regulada por captação-degradação, a inativação, por via farmacológica, das enzimas FAAH e MAGL resulta em maior disponibilidade de AEA e 2-AG nas fendas sinápticas. De forma que elegemos esse

tipo de intervenção para analisar os efeitos do aumento da disponibilidade de endocanabinoides sobre o comportamento social no modelo animal para TEA, que, conforme estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, apresenta déficit de interesse por novidade social.

Este trabalho busca contribuir com novas informações para a compreensão da participação do sistema endocanabinoide na modulação do interesse social, aspecto crucial na caracterização do TEA. Para isso, submetemos ratos adultos expostos a SE no início da vida a testes comportamentais de memória social, sociabilidade e memória de curto prazo. Antes dos testes, administramos o fármaco JZL 195, inibidor das enzimas FAAH e MAGL, visando aumentar os níveis de canabinoides endógenos dos animais e, assim, poder observar possíveis efeitos da alteração desse sistema sobre o comportamento social e a cognição. Correlações moleculares para os resultados comportamentais foram investigadas por análises biomoleculares de tecidos do hipocampo, córtex pré-frontal, estriado e amígdala, com intenção de analisar as concentrações de receptores CB1 e a sua expressão gênica em estruturas-chave da via mesocorticolímbica.

2. HIPÓTESE

O aumento da sinalização endocanabinoide por via farmacológica pode reverter prejuízos de comportamento social em ratos expostos a *status epilepticus* neonatal.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Investigar participação do sistema endocanabinoide na modulação do comportamento social em ratos expostos a *status epilepticus* (SE) neonatal.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar o efeito da aplicação de JZL195 (inibidor das enzimas FAAH e MAGL, catalisadoras dos endocanabinoides AEA e 2-AG) sobre a sociabilidade dos animais em testes que avaliam memória social e motivação social.
- b) Analisar o efeito do mesmo fármaco sobre a cognição em teste de reconhecimento de objetos que avalia memória de curto prazo.
- c) Avaliar se o insulto neonatal causa alterações na expressão gênica e proteica dos receptores CB1 no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e amígdala.

4. MÉTODO

4.1 Animais

Os procedimentos adotados estiveram de acordo com os protocolos para o cuidado dos animais estabelecidos pelo do Comitê Ético da Universidade Presbiteriana Mackenzie (CEUA/UPM nº 142/08/2016) Ratos *Wistar* machos recém-nascidos foram mantidos em condições controladas (7:00-19:00h, ciclo luz/escuro; 22-24°C) com suas mães. Idades foram determinadas a partir do dia de nascimento (P0).

4.2 Indução de *status epilepticus* (SE)

Na idade P9 o grupo controle recebeu injeção intraperitoneal de salina (0.1 ml/10g), enquanto o grupo experimental foi administrado com pilocarpina 3,8% em salina (380mg/kg, i.p), com intenção de provocar SE (atividade convulsiva contínua ou intermitente de ao menos de 30 minutos, de acordo com a Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra Epilepsia – ILAE, 1989). Após 4 horas da indução do SE os animais retornaram às mães. Em P21, foram separados das mães e distribuídos em 4 grupos (4-5 animais por gaiola). Considerando que o número total de animais utilizados (40) dificultaria o alojamento e os estudos comportamentais, os experimentos foram divididos em 4 experimentos de 8 a 12 animais cada.

- a) **Grupo controle:** 13 ratos administrados com salina em P9 e com salina 2 horas antes de cada teste comportamental em P60.
- b) **Grupo controle + tratamento:** 7 ratos administrados com salina em P9 e com o inibidor JZL195 (0,01mg/kg, ip) 2 horas antes de cada teste comportamental em P60.
- c) **Grupo experimental:** 11 ratos administrados com pilocarpina em P9 e com salina 2 horas antes de cada teste comportamental em P60.
- d) **Grupo experimental + tratamento:** 8 ratos administrados com pilocarpina em P9 e com o inibidor JZL195 (0,01mg/kg, ip) 2 horas antes de cada teste comportamental em P60.

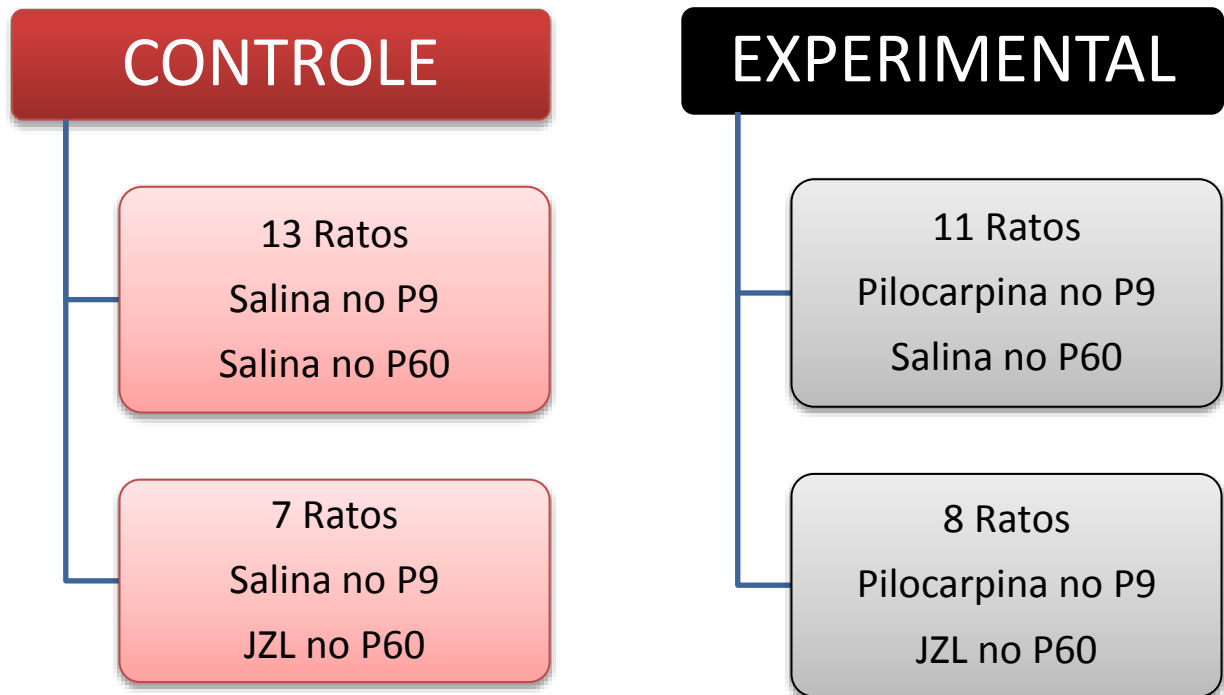


Fig.1 – Esquema do método: grupos e subgrupos

4.3 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram executados a partir de 60 dias pós-natal. Foram realizados sempre na mesma sala de observação e filmados.

4.3.1 Memória social

A memória social do animal foi avaliada pelo paradigma de habituação e desabituação. O protocolo utilizado foi adaptado do descrito por Guan e Dluzen (1994). Os animais foram habituados na sala de experimentação 60 minutos precedentes às sessões. O teste sempre foi realizado no mesmo horário para diminuir os efeitos circadianos, sendo os animais dos diferentes grupos observados de forma alternada. No intervalo entre as sessões, os equipamentos foram limpos com uma solução de etanol 5%, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo sujeito anterior.

Para habituação com o equipamento, o animal teste foi colocado no centro de uma arena circular de acrílico branco com 60 cm de diâmetro x 50 cm de altura (Insight Ltda., Brasil) concomitantemente com uma caixa de acrílico (23.5 cm x 21 cm x 32 cm) contendo pequenos orifícios para permitir detecção das pistas olfativas, por 3 minutos. Após o período de habituação, um rato com 30 dias de idade (estímulo social) foi introduzido dentro da caixa de acrílico por 3 minutos. O procedimento foi repetido 3 vezes (sessão 1 a sessão 3) com intervalos de 6 minutos. Nos intervalos, o animal teste era removido da arena e o equipamento era limpo com etanol 5%. Nas duas sessões subsequentes (sessões 4 e 5), foi utilizado um novo estímulo social da mesma idade do anterior. Foram mensurados o número e o tempo dos contatos olfativos entre os animais.

4.3.2 Sociabilidade

O protocolo utilizado foi adaptado de Novaes (2012), de Crawley (2007). Caixa retangular de acrílico dividida em três compartimentos de tamanho equivalente (39x26x41) por portas retráteis. O animal foi habituado por 10 minutos no aparato, logo antes do início do teste, dividido em 3 fases sequenciais de 10 minutos cada. Durante o período de habituação, o rato foi colocado no compartimento do meio com as portas retráteis fechadas. Cada um dos dois lados continha uma gaiola de arame idêntica. Na fase de aproximação social, um rato desconhecido foi colocado em uma das gaiolas de arame. Na fase de novidade social, um novo rato desconhecido foi colocado dentro da gaiola de arame no compartimento oposto. Foram mensurados o tempo passado em cada compartimento e o tempo de contato olfativo com cada estímulo em cada fase.

4.3.3 Reconhecimento de objetos

O protocolo foi adaptado de Rachetti et al., (2013). A memória de curto prazo do animal foi avaliada pelo paradigma de habituação e desabituação. Para habituação com o equipamento, o animal teste foi colocado no centro de uma arena circular de acrílico branco com 60 cm de diâmetro x 50 cm de altura (Insight Ltda., Brasil) por 10 minutos. Após o período de habituação, o animal foi exposto a dois objetos idênticos por 3 minutos. Três horas depois o animal foi colocado novamente na arena, com um dos objetos da triagem anterior e um novo objeto, por 3 minutos. Foi mensurado o tempo de investigação total de cada objeto.

4.4 Análise dos tecidos pós-testes comportamentais

Ao fim dos testes comportamentais, os animais foram decapitados sob anestesia profunda (uretana 1,2 g/kg, ip), o cérebro foi removido, os tecidos (córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo e estriado) foram dissecados e armazenados em freezer -80°C até o momento da análise.

4.4.1 RT-PCR Reação em cadeia da polimerase

A expressão gênica do receptor CB1 foi analisada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR-RT). O RNA total dos tecidos foi extraído com o auxílio da solução de TRizol e do kit comercial Invitrogen (Termo Fisher do Brasil) para PCR-RT, utilizando o equipamento de espectrofotometria NanoDrop 2000, com comprimento de onda de 260nm a 280nm. Em seguida, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA). Após isso, foi realizada a PCR em tempo real com SYBR® Green PCR. Para a preparação das reações, foram utilizadas concentrações específicas de cDNA e primers do gene CNR1. Ao término dessa etapa, foi realizada a verificação da especificidade da geração obtida do fragmento amplificado por meio da determinação do *melting curve*, sendo que o cDNA obtido foi utilizado para a determinação da expressão do mRNA do gene CNR1. A Beta-actina foi utilizada como gene constitutivo.

4.4.2 Elisa

A quantificação de receptores CB1 foi feita por Elisa, com uso do Elisa Kit para Receptor Canabinoide 1 (Cloud-Clone), com microplaca pré-revestida com anticorpo específico para CB1. Seguindo o *data sheet* do kit, os tecidos foram homogeneizados e sonificados com Diluente Padrão do Kit e, em seguida, foram centrifugados por 5 minutos a $5000 \times g$. O sobrenadante foi removido e o ensaio foi feito em seguida. O padrão foi reconstituído com 1,0 ml de diluente padrão, mantido por 10 minutos em temperatura ambiente, agitado suavemente. A concentração de padrão na solução-mãe é de 10 ng / ml. Em seguida foram preparados 7 tubos contendo 0,5 ml de diluente padrão e produzida uma série de dupla diluição. Serão estabelecidos 7 pontos de padrão diluído: 10 ng / ml, 5 ng / ml, 2,5

ng / ml, 1,25 ng / ml, 0,625 ng / ml, 0,312ng / ml, 0,156 ng / ml, sendo o último branco, com 0ng / ml. Em seguida, reagentes de detecção A e B que acompanham o kit foram diluídos em diluentes A e B (1:100). Padrões diluídos e branco foram colocados em 7 pontos da placa de leitura, coberta com papel selante e levada a incubação por 2 horas, a 37 °C. O líquido foi removido de cada poço e em seguida foi adicionado em cada um 100 µl de Reagente de Detecção A, seguido de incubação por 1 hora a 37 °C. O líquido foi aspirado e cada poço lavado com 350 µl de Solução de Lavagem, três vezes. Reagente de Detecção B foi pipetado (100 µl) em cada poço, coberto com papel selante e incubado por 30 minutos a 37°C. Processo de aspiração/ lavagem foi feito novamente 5 vezes. Em seguida, 90 µl de Solução Substrato foram colocados em cada poço da placa, incubada a 37 °C por 20-25 minutos. Foram adicionados em cada poço 50 µl de Solução Stop. De imediato, a placa foi colocada para leitura no espectrômetro. A concentração de CB1 foi determinada via comparação de O.D. das amostras e curva padrão. A sensibilidade de detecção desse teste é de 0.156-10ng/ml.

4.4.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism. Os resultados dos testes de sociabilidade, memória de reconhecimento social e reconhecimento de objetos foram analisados por ANOVA Mista, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os grupos (controle x experimental) e o tratamento (salina x JZL) foram considerados como as variáveis intergrupo e os tempos de exploração dos objetos ou dos coespecíficos familiar e não familiar como a variável intragrupo. Os resultados foram representados com média \pm desvio padrão. Resultados de PCR-RT e Elisa foram submetidos aos testes Komolgorov-Smirnov e Shapiro de normalidade. Dados que passaram pelo teste de normalidade foram comparados pelo teste t-Student para amostras independentes e os resultados sem distribuição normal, foram analisados em teste não-paramétrico de Mann Whitney, sendo expressos como mediana \pm intervalo. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Memória social

Animais controles tratados com JZL investigaram os estímulos sociais por menos tempo em cada uma das sessões, em comparação aos controles sem tratamento ($F(1,18)=8,943$; $p<0,0001$) (2A). Na sessão 4, quando apresentados à novidade social, mostraram menos interesse em investigar o novo animal por efeito do tratamento ($F(1,18)=5,481$; $p=0,03$), sem prejuízo da capacidade de discriminação ($F(1,18)=9,807$; $p=0,0058$) (2B). Animais experimentais tratados com JZL não apresentaram diferença significativa no tempo de investigação da novidade social ($F(1,17)=2,509$; n.s.) (2D), mas investigaram os estímulos sociais familiares por mais tempo, em comparação aos experimentais não tratados ($F(1,17)=7,642$; $p<0,0001$) (2C). Quando analisado o efeito cumulativo (soma do tempo de investigação em todas as sessões), o tratamento com JZL interferiu especificamente no tempo de investigação do grupo controle em todas as sessões ($F(1,175)=0,6686$; $p<0,0001$) (2E e 2F).

Memória social

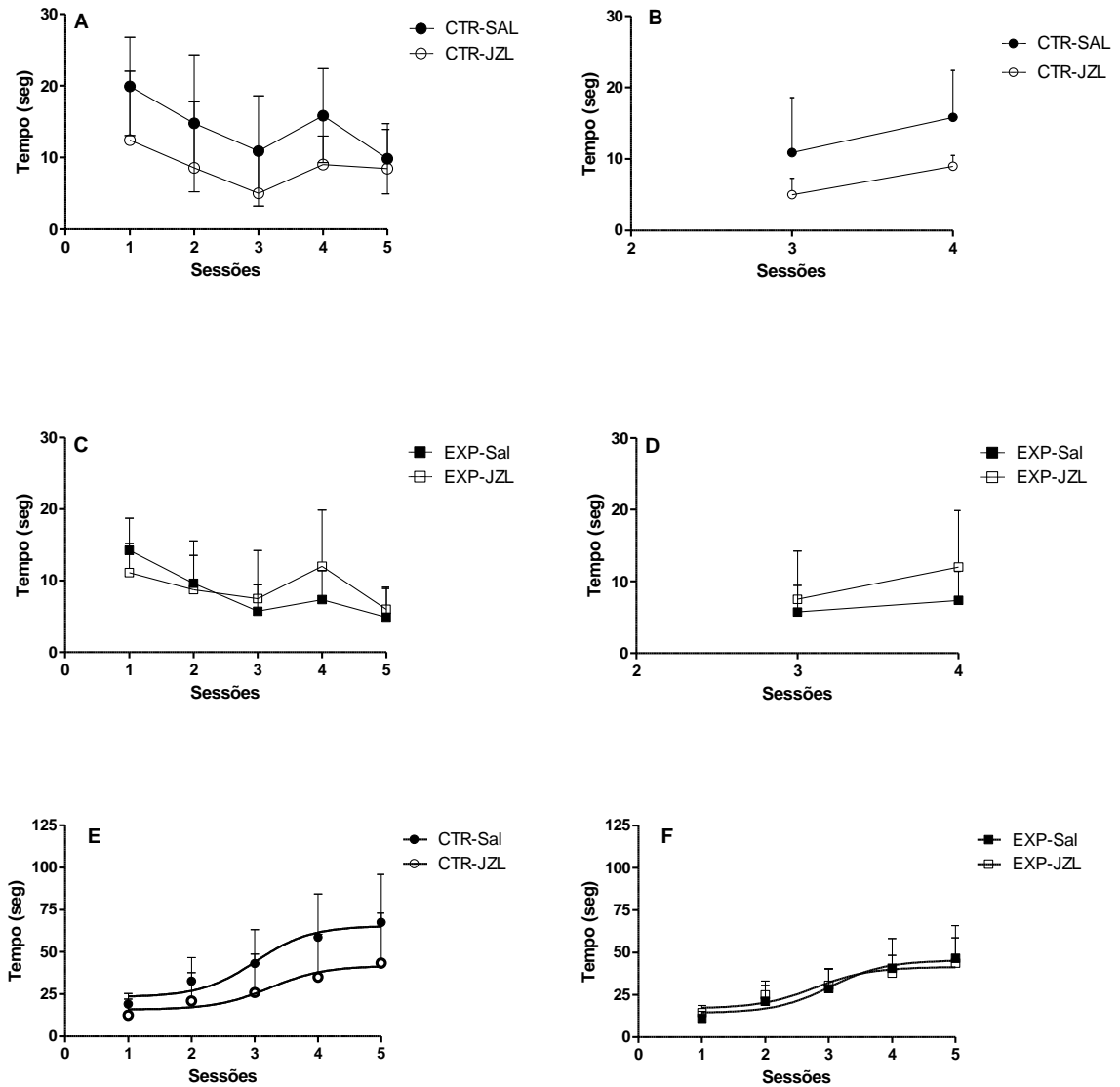


Fig.2 Teste de habituação/deshabituação expresso como média \pm desvio padrão dos grupos: controle salina (n=13) e controle JZL (n=7); experimental salina (n=11) e experimental JZL (n=8).

5.2 Sociabilidade

Animais controle que receberam salina discriminaram animal familiar da novidade social ($t=3,356$; $p<0,01$) e aqueles que receberam o tratamento com JZL apresentaram redução no tempo de investigação em comparação aos controles não tratados ($F(1,19)=4,863$; $p=0,04$), (3A). Animais experimentais tratados com JZL não apresentaram diferença significativa no tempo de investigação dos estímulos sociais ($F(1,19)=0,001$; n.s), em comparação aos não tratados; tanto experimentais tratados como não tratados não mostraram preferência estatisticamente significativa pela novidade social ($F(1,19)=2,239$; n.s.) (3B).

Sociabilidade

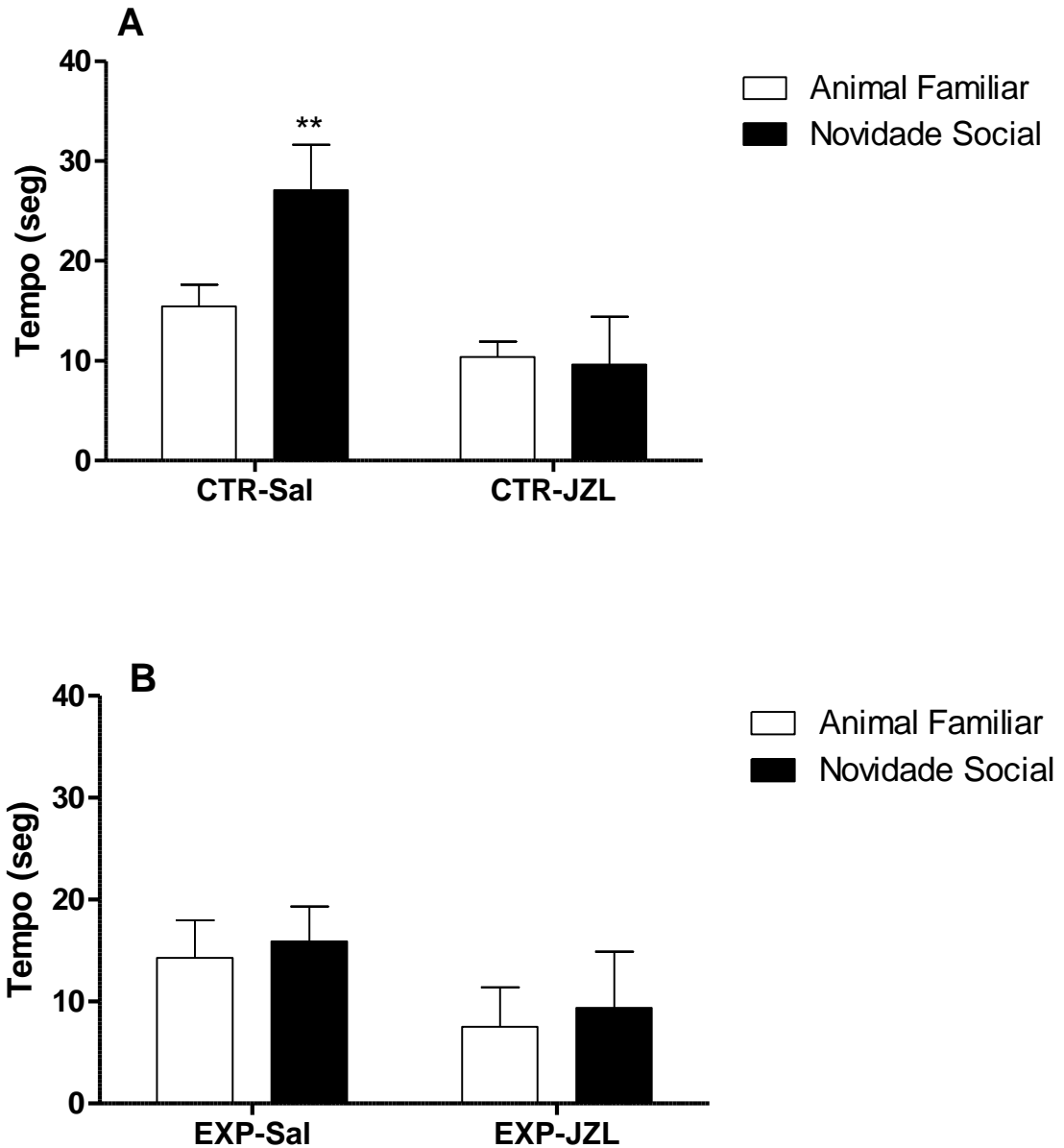


Fig.3 Tempo de interação social com animal familiar e novidade social expresso como média \pm erro padrão dos grupos: controle salina (n=13) e controle JZL (n=7); experimental salina (n=11) e experimental JZL (n=8). ** $p < 0,01$.

5.3 Reconhecimento de objetos

O tratamento com JZL afetou a capacidade de discriminação de objetos nos animais controle ($F(1,13)=4,955$; $p=0,04$) (4A) e reduziu o tempo de investigação nos animais experimentais ($F(1,11)=5,999$; $p=0,03$), sem afetar a capacidade de discriminação ($F(1,11)=0,860$; n.s.) (4B).

Reconhecimento de objetos

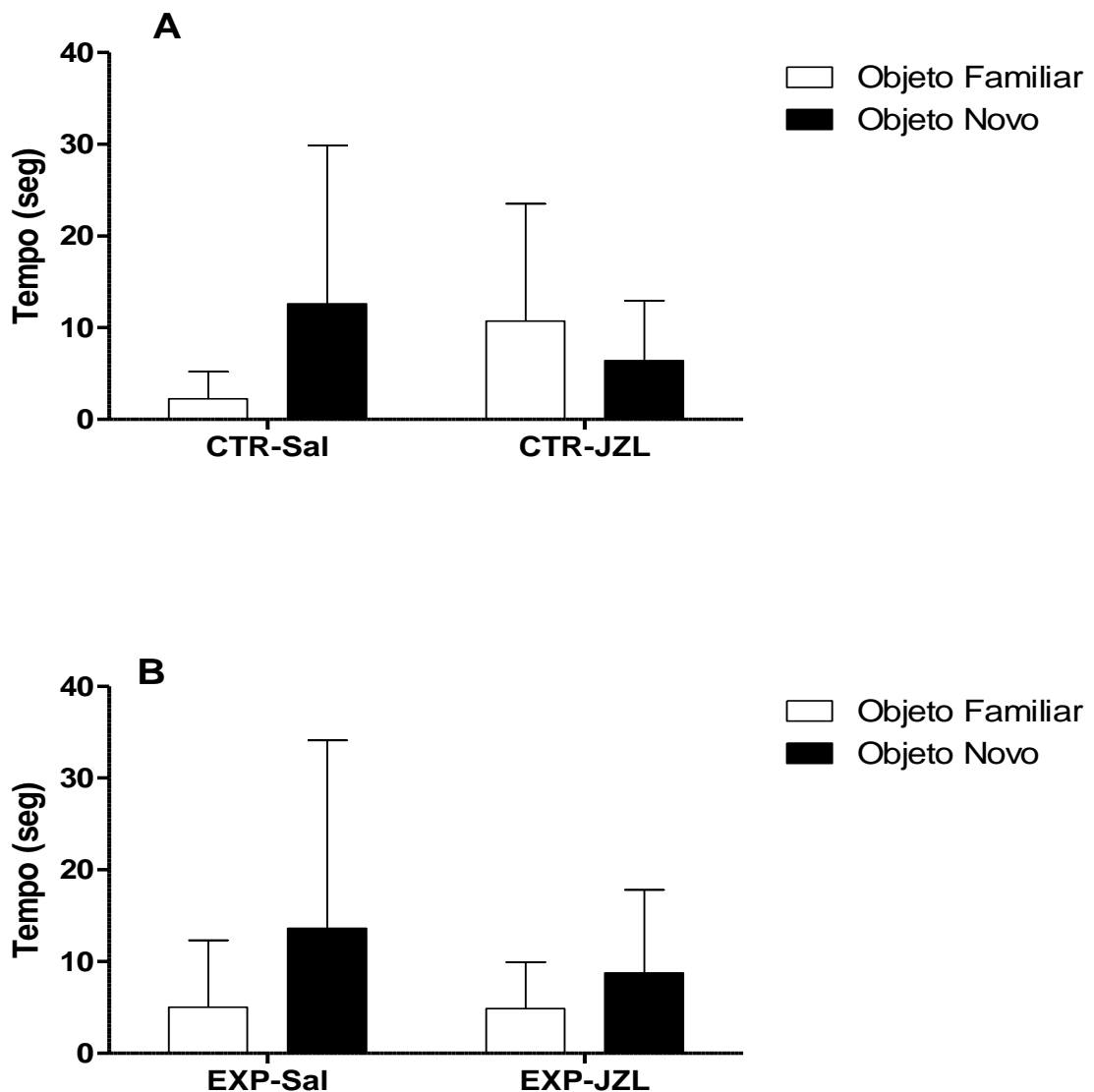


Fig.4 Tempo de investigação de objetos expresso como média \pm erro padrão dos grupos: controle salina (n=8) e controle JZL (n=7); experimental salina (n=5) e experimental JZL (n=8).

5.4 Locomoção

O tratamento com JZL aumentou especificamente a locomoção total de animais controles ($F(1,24)=4,837$; $p=0,03$), não afetando de forma significativa os animais experimentais ($F(1,24)=0,341$; n.s.) (5A). Quanto à locomoção na zona central, o fármaco interferiu em ambos os grupos, reduzindo a permanência nas áreas centrais ($F(1,24)=4,547$; $p=0,04$) (5B).

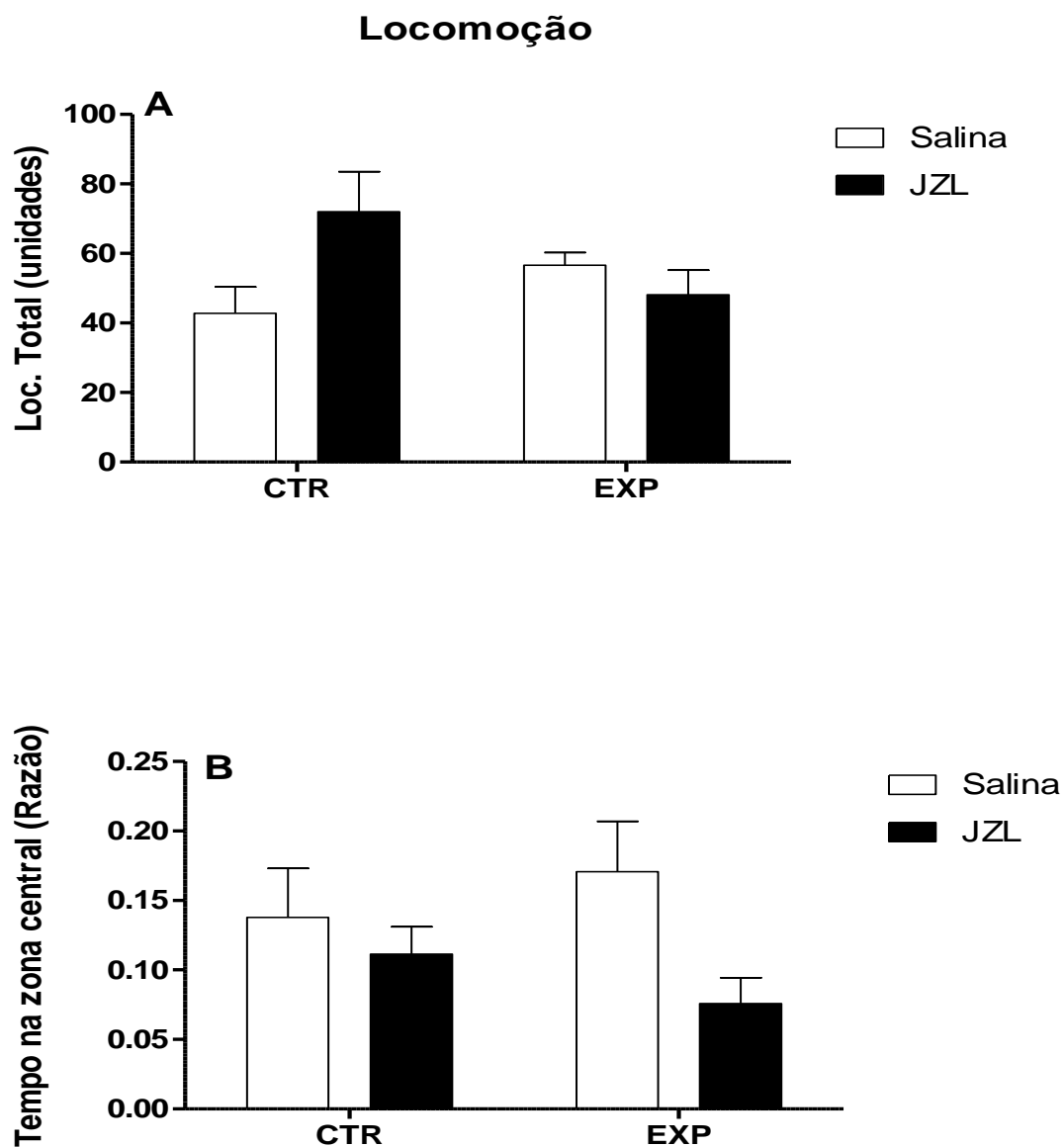


Fig.5 Locomoção total e tempo na zona central expressos como média \pm erro padrão dos grupos controle salina ($n=8$), controle JZL ($n=7$), experimental salina ($n=5$) e experimental JZL ($n=8$).

5.5 RT-PCR

Não houve diferença significativa na expressão do RNAm do receptor CB1 no hipocampo (U=8000; n.s.) (6A), córtex pré-frontal (U=5000; n.s.) (6B), estriado (U=8000; n.s.) (6C) e amígdala (U=5000; n.s.) (6D).

Expressão do receptor CB1

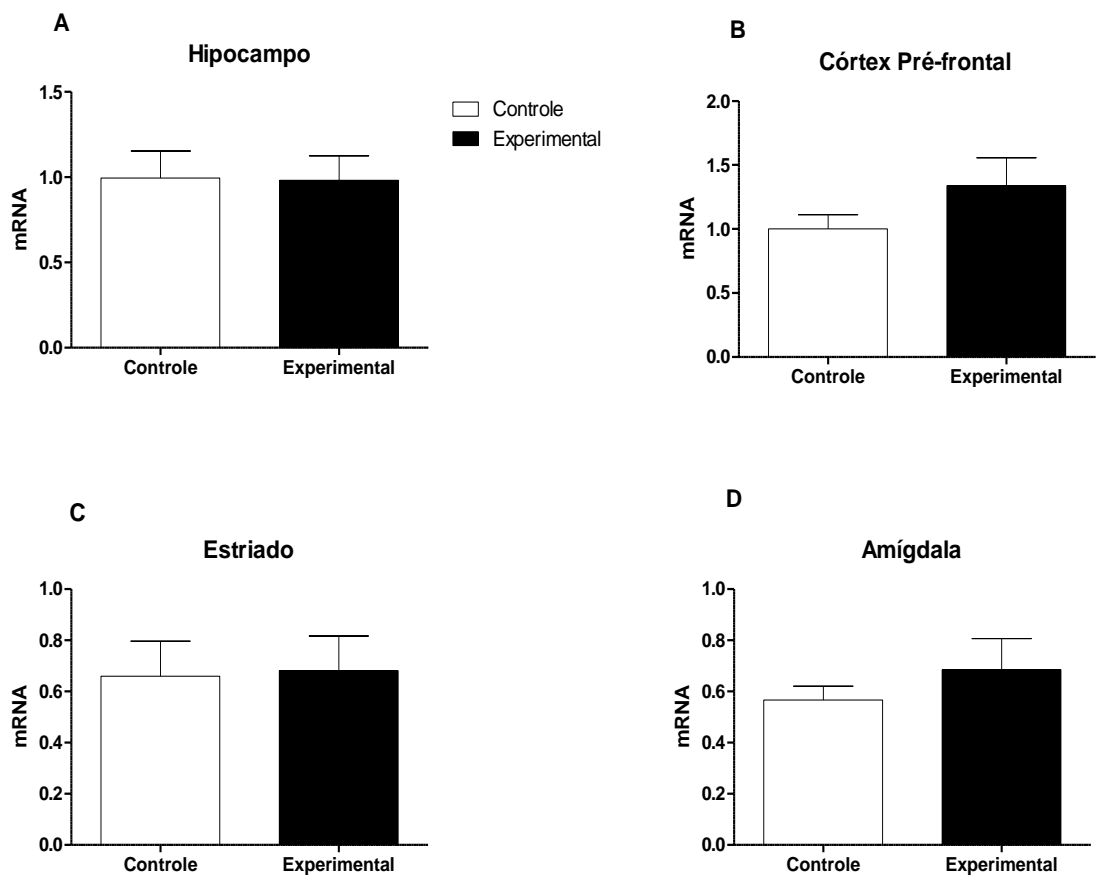


Fig.6 Expressão do mRNA do receptor CB1 expressa como mediana \pm intervalo dos grupos controle (n=4) e experimental (n=4).

5.6 ELISA

Houve diferença significativa na concentração de receptor CB1 no hipocampo ($U=2000$; $p<0,03$) (7A) dos animais experimentais em comparação com os controles. Não houve diferença significativa no córtex pré-frontal ($U=8000$; n.s.) (7B), no estriado ($U=1100$; n.s.) (7C) e na amígdala ($U=1100$; n.s.) (7D).

Quantificação do receptor CB1

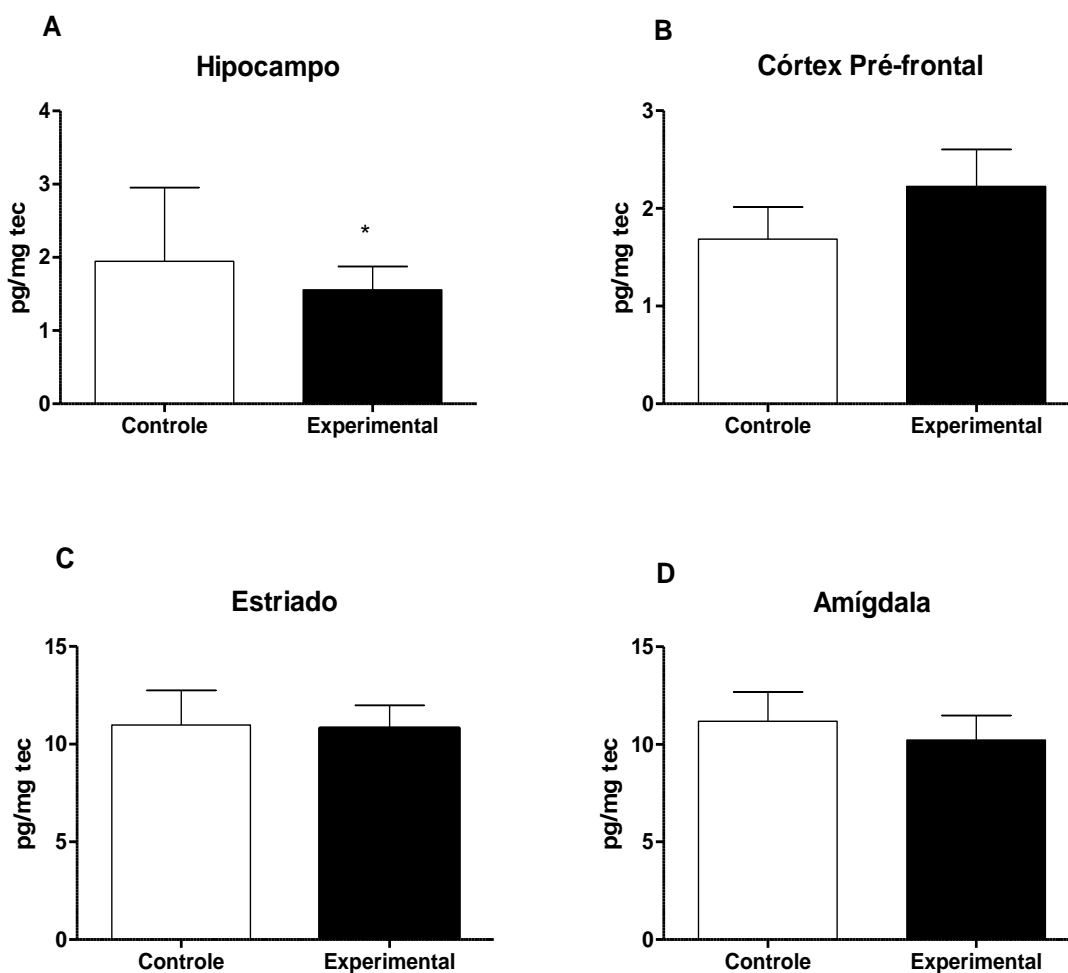


Fig.7 Concentração do receptor CB1 expressa como mediana \pm intervalo dos grupos controle (n=5) e experimental (n=5). * $p= 0,03$.

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a participação do sistema endocanabinoide na modulação do comportamento social de ratos expostos a *status epilepticus* (SE) neonatal, modelo animal que tem sido utilizado para estudo dos prejuízos sociais que caracterizam o transtorno do espectro autista (TEA). Para isso, animais experimentais (submetidos a SE no nono dia de vida) e controles foram subdivididos em dois grupos, que receberam injeção de salina ou do fármaco JZL195, bloqueador da ação de enzimas catalisadoras de endocanabinoides, com a intenção de causar aumento da disponibilidade de canabinoides endógenos no cérebro dos animais, duas horas antes de serem feitos os testes comportamentais.

No teste que avaliou a memória de reconhecimento social, o tratamento com JZL reduziu o tempo de investigação especificamente nos animais controles, que investigaram menos os estímulos sociais em todas as sessões, tanto os familiares quanto a novidade social, apesar de terem mantido a capacidade de discriminação social. Nossa hipótese é que a sinalização endocanabinoide interfere na neurotransmissão dopaminérgica, alterando o funcionamento normal do sistema de recompensa diante de uma situação de interação social.

Os endocanabinoides e seus receptores CB1 funcionam em sistema de sinalização retrógrada em muitas sinapses no SNC, particularmente nas sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas. Também desempenham uma função moduladora na transmissão de dopamina (FERNANDEZ-RUIZ et al, 2010; BREIVOGEL et al, 2009; KANO et al, 2009). Portanto, os efeitos dos canabinoides na transmissão dopaminérgica e nos comportamentos relacionados a esta são geralmente indiretos e exercidos através da modulação de *inputs* de GABA e glutamato recebidos por neurônios dopaminérgicos. Evidências sugerem, no entanto, que certos canabinoides podem ativar diretamente os receptores TRPV1, que foram encontrados em algumas vias dopaminérgicas, permitindo assim uma regulação direta da função dopaminérgica (FERNANDEZ-RUIZ et al, 2010). Através deste mecanismo direto ou através de mecanismos indiretos que envolvem neurônios de GABA ou glutamato, os canabinoides podem de alguma maneira interagir com a transmissão dopaminérgica no SNC, o que pode interferir de forma importante em vários processos neurobiológicos relacionados à transmissão dopaminérgica, como a já referida motivação/ recompensa social, bem como em diferentes neuropatologias que afetam esses processos.

Trabalhos com modelos animais, que provocaram alterações no sistema endocanabinoide via indução farmacológica, identificaram déficits em funções relacionadas à neurotransmissão dopaminérgica, como desregulação no processamento de estímulos

compensatórios e aversivos (TAN et al, 2014). Uma literatura robusta demonstra que neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) são fortemente ativados mediante recompensa ou mesmo pistas de recompensa social, bem como por estímulos aversivos (HOLLY et al, 2016; ANSTROM et al, 2009). Também foi demonstrado que o comprometimento de terminais dopaminérgicos em áreas que recebem projeção da VTA reduziu o comportamento exploratório de ratos, que foi restaurado por ação de agonistas dopaminérgicos (FINK e SMITH, 1980).

Nesse sentido, é importante atentar para o papel da via mesocorticolímbica na formação da memória emocional. O córtex pré-frontal (CPF) e estruturas subcorticais do sistema de recompensa estão altamente interconectados. Neurônios da VTA que se projetam em regiões como hipocampo, estriado e amígdala são modulados por *inputs* do CPF. Sabe-se que esta região está relacionada às funções executivas, “pacote” de funções essenciais para a atenção dirigida e a regulação emocional. Estudos com modelos animais utilizando JZL reportaram efeitos sobre as funções cognitivas similares aos induzidos pelo delta-9-tetra-hidrocanabinol (THC), principal componente da *Cannabis sativa* (MANDUCA, 2015), como o “estado amotivacional”, caracterizado pela falta de interesse em recompensas sociais e de aprendizagem (ZLEBNIK e CHEER, 2016).

Já os animais experimentais tratados com JZL não apresentaram diferença significativa no tempo de investigação da novidade social nesse mesmo teste. No entanto, investigaram os estímulos sociais familiares por mais tempo, em comparação aos experimentais não tratados. Assim, consideramos a ausência de efeito do fármaco sobre a motivação para interagir com novidade social como indício de prejuízos funcionais ou estruturais na via mesocorticolímbica induzidos pelo *status epilepticus*. Quanto ao aumento da investigação dos estímulos sociais já conhecidos, é possível que o fármaco favoreça, nesse modelo animal, a sociabilidade em situações de exposição repetida. Estudos sugerem que a experiência emocional tem efeito modulador sobre a plasticidade sináptica das conexões ao longo das comunicações CPF-estruturas subcorticais (TAN et al, 2014; MAROUN et al, 2006), áreas com densidade considerável de receptores CB1 que, conforme já mencionado, modulam tanto a liberação de glutamato de terminais pré-sinápticos como a de GABA a partir de elementos inibitórios de interneurônios locais (REA et al, 2013; MARSICANO e LUTZ, 1999). Assim, canabinoides que atuam nas regiões mesocorticolímbicas são capazes de modular a atividade de *output* das populações neuronais e afetar a via mesolímbica da dopamina, dado as relações entre sistema endocanabinoide e neurotransmissão dopaminérgica (FERNANDEZ-RUIZ et al, 2010).

No teste de sociabilidade, que avaliou a motivação do animal para interagir com novidade social (mediante exposição simultânea a animal familiar e a animal desconhecido), o fármaco JZL reduziu, nos animais controles, o tempo de investigação dos estímulos sociais e afetou a preferência por investigar a novidade social, comportamento evidente em controles não tratados. Nos animais experimentais, o fármaco não interferiu no tempo de investigação nem na preferência por novidade (também não apresentada por experimentais não tratados). Esses resultados reforçam a hipótese de uma interferência específica do JZL sobre a motivação social de animais saudáveis. A não interferência do tratamento em experimentais pode evidenciar a existência de um prejuízo estrutural ou funcional na via mesocorticolímbica induzida pelo SE neonatal, que detalharemos melhor adiante, na discussão dos resultados na análise biomolecular.

A hipótese de uma anormalidade do sistema endocanabinoide específica de circuitaria relacionada ao comportamento social faz-se relevante frente aos resultados do teste cognitivo de reconhecimento de objetos, no qual avaliamos memória de curto prazo: tanto os animais controle como os experimentais que não foram tratados com JZL mostraram preservação das funções cognitivas, resultados que foram ao encontro aos relatados por nosso grupo (BARBOSA et al, 2017). No entanto, considerando-se os animais de ambos os grupos administrados com o fármaco JZL195, verificou-se prejuízo na discriminação de objetos tanto em controles como em experimentais, o que interpretamos como possível indício de alteração da sinalização endocanabinoide em regiões processadoras de estímulos de motivação-recompensa social. A interferência do JZL na memória de curto prazo em animais submetidos a testes com paradigma de discriminação de objetos já foi relatada por estudos anteriores (WISE et al, 2012; LONG et al, 2009), que descreveram prejuízos na atenção e na memória de curto prazo. Efeitos, como já referido, similares aos induzidos pelo fitocanabinoide THC (MANDUCA, 2015).

A avaliação da atividade locomotora mostrou que o JZL aumentou a locomoção total especificamente de animais controles. A hiperlocomoção em animais saudáveis administrados com pequenas doses de fármacos agonistas de receptores CB1 já foi observada (POLISSIDIS et al, 2013, 2010). Um desses trabalhos, usando a técnica de microdiálise *in vivo*, identificou aumento da liberação de dopamina no CPF e no estriado, enquanto a liberação de glutamato foi aumentada no CPF e reduzida no estriado (POLISSIDIS et al, 2013). A ausência de efeitos do JZL na locomoção total de animais experimentais reforça a hipótese de alteração da sinalização canabinoide (e conseqüentemente na neuromodulação de dopamina e glutamato) no modelo animal submetido a SE. Quanto à locomoção na zona central, o fármaco reduziu a

permanência nas áreas centrais em ambos os grupos. Estudos anteriores que utilizaram o JZL como agonista de receptores de CB1 observaram aumento de comportamentos ansiolíticos em animais saudáveis, induzidos pelo fármaco (MANDUCA, 2015). Em nosso trabalho, o JZL aumentou a ansiedade também nos animais experimentais, o que sugere que o déficit de motivação social não está relacionado à ansiedade social nesse nosso modelo para o TEA. Um estudo de nosso grupo, que avaliou efeitos do ansiolítico Diazepam nesse mesmo modelo animal, submetido ao mesmo teste de sociabilidade utilizado por nós, não identificou nenhuma alteração do comportamento de falta de interesse por novidade social, característico desse modelo (CASTELHANO, 2015).

Por fim, a quantificação de receptores CB1 por Elisa identificou concentração reduzida dessas proteínas no hipocampo de animais experimentais. O receptor CB1 é altamente expresso no sistema nervoso dos mamíferos, particularmente no hipocampo, onde se encontra, em alta densidade nos terminais pré-sinápticos de interneurônios inibitórios (TAKÁCS et al, 2014). A ativação da sub-região do hipocampo ventral é conhecida por aumentar tanto a atividade dos neurônios dopaminérgicos localizados na VTA quanto os níveis de dopamina em regiões cerebrais relacionadas à recompensa (LOUREIRO et al, 2015). Um estudo que registrou a atividade eletrofisiológica de animais durante teste comportamental de sociabilidade, demonstrou que a ativação de CB1 no hipocampo ventral induz a déficits de sociabilidade natural e de comportamentos de reconhecimento social (LOUREIRO et al, 2015), identificando a transmissão endocanabinoide hipocampal como um modulador crítico da via mesocorticolímbica da dopamina e do processamento de fenômenos comportamentais relacionados à recompensa social. Um volume considerável de estudos tem apontado o papel do hipocampo para comportamentos adaptativos, explorando, em específico, as comunicações amígdala-hipocampo na formação de memória emocional e comportamentos aversivos (DESMEDT et al, 2015).

O déficit que detectamos por Elisa na concentração de proteína CB1 no hipocampo de animais submetidos a SE neonatal pode explicar a ausência de efeito do fármaco que observamos nos animais experimentais e a redução da motivação social nos testes de memória social e de sociabilidade que observamos nos controles. Estudos de monitoramento eletrofisiológico de animais adultos submetidos a SE neonatal com pilocarpina mostraram que esses animais apresentam atividade epileptiforme no hipocampo, em específico na região CA1 (SANTOS et al, 2000), na qual foi mostrada a participação do receptor CB1 na calibração do balanço sináptico excitatório (MONORY, 2015). Interessante relacionar essa hiperexcitabilidade em estruturas mesocorticolímbicas, característica do cérebro que mostra

atividade epileptiforme relacionada a SE neonatal, aos tratamentos para epilepsia refratária com fitocanabinoide, cujo efeito anticonvulsivante já foi bem demonstrado (CARLINI e MECHOULAM, 1975), estabelecendo a relação entre sinalização endocanabinoide e neurotransmissão excitatória e inibitória.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados reforçam que o modelo animal de ratos expostos a SE neonatal é válido e relevante para estudo da motivação social e das alterações neurobiológicas subjacentes aos sintomas do TEA. Nossos dados sugerem que o sistema endocanabinoide participa da modulação de comportamento social e que existe alteração neurobiológica dessa circuitaria no TEA. Intervenções farmacológicas nos receptores CB1 podem ser um caminho relevante para explorar essa circuitaria, tendo em vista os resultados de nossos testes comportamentais e as alterações na concentração de CB1 que identificamos no hipocampo de experimentais.

REFERÊNCIAS

ALGER, B; KIM, J. Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci.* 2011 Jun; 34(6): 304–315.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM-5. 5º ed. Artmed, 2014.

ANSTROM, K. et al. Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. *Neuroscience.* 2009 Jun 16;161(1):3-12. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.03.023.

ARAQUE, A. et al. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology.* 2017 Sep 15;124:13-24. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.017.

BARBOSA, G.; BATISTA, S.; SANTOS, P.; CYSNEIROS, R. Single neonatal status epilepticus does not impair cognitive function in rats. *Epilepsy Behav.* 2017 Jul; 72:200-202. DOI: 10.1016/j.yebeh.2017.04.031. Epub 2017 Jun 16.

BICKS, L. et al. Prefrontal cortex and social cognition in mouse and man. *Front Psychol.* 2015 Nov 26;6:1805. DOI: 10.3389/fpsyg.2015.01805.

BLANKMAN, J.; CRAVATT, B. Chemical probes of endocannabinoid metabolism. *Pharmacol Rev* 2013, 65:849–871.

BREIVOGEL C., SIM-SELLEY, L. Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *Int Rev Psychiatry.* 2009;21(2):113-21.

CAMPOLONGO, P.; TREZZA, V. The endocannabinoid system: a key modulator in emotion and cognition. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 2012.

CAO, J. et al. Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *J Neurosci.* 2010, Dec 8; 30(49): 16453–16458.

CARLINI, E.; MECHOULAM, R. Anticonvulsant activity of four oxygenated cannabidiol derivatives. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1975 Sep;12(1):1-15.

CASTELHANO, A. S.; SCORZA, F. A.; TEIXEIRA, M. C.; ARIDA, R. M.; CAVALHEIRO, E. A.; CYSNEIROS, R. M. Social play impairment following status epilepticus during early development. *J. Neural Transmiss.* 2010. 117, 1155–1160.

CASTELHANO, A.; CYSNEIROS, R. et al. Altered anxiety-related and abnormal social behaviors in rats exposed to early life seizures. *Front Behav Neurosci.* 2013; 7: 36.

CASTELHANO, A. S. S.; RAMOS, F.O.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M. Early life seizures in female rats lead to anxiety-related behavior and abnormal social behavior

characterized by reduced motivation to novelty and deficit in social discrimination. *Journal of Neural Transmission* 2015, 122, 349-355.

CASTELHANO, A.S.S.; CASSANE, G. S.T.; SCORZA, F.; CYSNEIROS, R.M. Altered anxiety-related and abnormal social behaviors in rats exposed to early life seizures. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2013, 7: 36.

CHAKRABARTI, B. et al. Endocannabinoid signaling in autism. *Neurotherapeutics* 2015, Oct; 12(4):837-47

CODY, H.; PELPHREY, K.; PIVEN, J. Structural and functional magnetic resonance imaging of autism. *Int J Devl Neuroscience*, v. 20, p. 421-38, 2002.

COSTA, J.; et al. Neurobiologia da *Cannabis*: do sistema endocanabinoide aos transtornos por uso de *Cannabis*. *J. bras. psiquiatr.* Rio de Janeiro, 2011.

CRAWLEY, J.N. (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* 17, 448–459.

CYSNEIROS, R. et al. Impaired executive functions in experimental model of temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr* 2016;74(6):470-477

DE CARO, C. et al. The potential role of cannabinoids in epilepsy treatment. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2017 Sept. DOI: dx.DOI.org/10.1080/14737175.2017.1373019

DESMEDT, A. et al. Adaptive emotional memory: the key hippocampal-amygdalar interaction. *Stress*, 2015;18(3):297-308.

FABBRONI, B.L.; CYSNEIROS, R. M. As crises neonatais produzem efeitos neurológicos deletérios de longo prazo: evidências clínicas e experimentais. *Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento* 2014, 14, 85-94.

FERNANDEZ-RUIZ, J. et al. Cannabinoid–dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther.* 2010 Jun;16(3):e72-91. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2010.00144.x

FINK, J. e SMITH, G. Mesolimbic cortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. *Brain Res.*, 199 (1980), pp. 359–384.

GAIGG, S. The Interplay between emotion and cognition in autism spectrum disorder: implications for developmental theory. *Front Integr Neurosci.* 2012; 6: 113. Published online 2012 Dec 4. DOI: 10.3389/fnint.2012.00113

GARRIDO, C.; IZQUIERDO, I. et al. Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Aug 16;113(33):E4914-9.

GOFFIN, K. et al. In vivo activation of endocannabinoid system in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain* 2011: 134; 1033–1040.

HOLLY, E.; MICZEK, K.A. *Psychopharmacology*. 2016, 233: 163. DOI.org/10.1007/s00213-015-4151-3

HOLMES, G. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2004; 10(2):101-5.

HOLMES, G. L.; GAIRSA, J. L.; CHEVASSUS-AU-LOUIS, N.; BEN-ARI, Y. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. *Ann. Neurol*. 1998, 44, 845–857.

HOWLETT, A.C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G; CASELLAS, P.; DEVANE, W. A., et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacology Rev*. 2002; 54(2):161-202.

ILAE Commission Report. The epidemiology of the epilepsies: future directions. *Epilepsia*, 1997, 38:614–618.

ISAEVA, E.; ISAEV, D.; SAVRASOVA, A.; KHAZIPOV, R.; HOLMES, G. L. Recurrent neonatal seizures result in long-term increases in neuronal network excitability in the rat neocortex. *Eur. J. Neurosci*. 2011, 31, 1446–1455.

KAHRSON, D. et al. Endocannabinoid signaling in social functioning: an RDoC perspective. *Transl Psychiatry*. 2016 Sep 27;6(9):e905. DOI: 10.1038/tp.2016.169.

KANO, M., et al. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 2009; 89:309–380.

KATONA, I. Cannabis and endocannabinoid signaling in epilepsy. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2015, vol 231, pp 285-316.

KERR, D. M.; DOWNEYA, L.; CONBOYA, M.; FINNB, D.; ROCHEA, M. Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism *Behavioural Brain Research* 2013, 249, 124– 132.

LEITE, I.S.; CASTELHANO, A.S.S.; CYSNEIROS, R.M. Effect of diazepam on sociability of rats submitted to neonatal seizures. *Data in Brief* 2016, 7, 686-691.

LONG, J. et al. Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106, 20270–20275.

LOPES, M. et al. Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2016 Feb;55:92-100.

LOUREIRO, M. et al. Hippocampal cannabinoid transmission modulates dopamine neuron activity: impact on rewarding memory formation and social interaction. *Neuropsychopharmacology*. 2015 May; 40(6): 1436–1447. DOI: 10.1038/npp.2014.329.

LUGO, J. N.; SWANN, J. W.; ANDERSON, A.E. Early-life seizures result in deficits in social behavior and learning. *Exp Neurol*. 2014, 256, 74–80.

LUTZ, B. On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochemical Pharmacology* 2004, Volume 68, Issue 9, 1 Pages 1691–1698

LYNCH, M.; SAYIN, U.; GOLARAI, G.; SUTULA, T. Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 2000, 12, 2252–2264.

MALONE, D. et al. Modulation by fluoxetine of striatal dopamine release following Delta9-tetrahydrocannabinol: a microdialysis study in conscious rats. *British Journal of Pharmacology* 199; 128, 21–26.

MANDUCA, A.; MORENA, M.; CAMPOLONGO, P; et al. Distinct roles of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in social behavior and emotionality at different developmental ages in rats. *European Neuropsychopharmacology* 2015, 25, 1362–1374.

MAROUN, M. et al. Stress reverses plasticity in the pathway projecting from the ventromedial prefrontal cortex to the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci*, 2006 24(10):2917–2210.1111/j.1460-9568.2006.05169.x

MARSICANO, G.; LUTZ, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 1999 11:4213–2510.1046/j.1460-9568.1999.00847.x

MAZARATTI, A. et al. Neurobehavioral comorbidities of epilepsy: Role of inflammation. *Epilepsia*. 2017 July 4; Volume 58, Issue S3: 48–56.

MCDONALD, A.; MOTT, D. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J Neurosci Res*. 2016 Feb 14.

MECHOULAM, R., HANUS, L.O., PERTWEE, R., HOWLETT, A.C. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat.Rev.Neurosci.* 2014, 15,757–764.

MENDES, A.; SAMPAIO, L. Brain magnetic resonance in status epilepticus: a focused review. *Seizure*. 2016 May; 38:63-7.

MONORY, K. et al. Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *J Neurosci*. 2015 Mar 4;35(9):3842-50.

NISHIMURA, M.; SWANN, J. W. Seizures in early life suppress hippocampal dendrite growth while impairing spatial learning. *Neurobiol. Dis.* 2011, 44, 205–214.

OKUYAMA. T.; KITAMURA, T. et al. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science* 2016, vol 353, issue 6307.

PACÍFICO, A.; CYSNEIROS, R. Avaliação da expressão gênica do sistema ocitocinérgico em ratos expostos ao status epilepticus neonatal. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

PARSONS, L.; HURD, Y. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2015, Out; 16(10):579-94.

PATRIQUIN, M.; RAMUS, T.; et al. Neuroanatomical and neurofunctional markers of social cognition in autism spectrum disorder. *Hum Brain Mapp* 2016, Jun 22.

POLISSIDIS, A. et al. The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013 Mar;16(2):393-403. DOI: 10.1017/S1461145712000156.

POLISSIDIS, A. et al. Individual differences in the effects of cannabinoids on motor activity, dopaminergic activity and DARPP-32 phosphorylation in distinct regions of the brain. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2010 13, 1175–1191.

RACHETTI, A.; CYSNEIRO, R. Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. *Behavioural Brain Research* 2013, Volume 237, Pages 283-289.

REA, K. et al. Evidence for a role of GABAergic and glutamatergic signalling in the basolateral amygdala in endocannabinoid-mediated fear-conditioned analgesia in rats. *Pain* 2013; 154:576–8510.1016/j.pain.2012.12.021

SANTOS, N. et al. Multiple pilocarpine-induced status epilepticus in developing rats: a long-term behavioral and electrophysiological study. *Epilepsia.* 2000;41 Suppl 6:S57-63.

SPENCE, S.; SCHNEIDER, M. The role of epilepsy and epileptiform EEGs in autism spectrum disorders (ASD). *Pediatric Research* 2009, Jun; 65(6): 599–606.

SRIVASTAVA, S. e SAHIN, M. Autism spectrum disorder and epileptic encephalopathy: common causes, many questions. *Journal of Neurodevelopmental Disorders.* 2017 June 23.

STANDAERT, M.; GOLAN, D. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. *Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacologia.* Editora Guanabara Koogan, 3ª Ed. 2014.

SULEYMANOVA, E.; GULYAEV, M.; ABBASOVA, K. Structural alterations in the rat brain and behavioral impairment after status epilepticus: an MRI study. *Neuroscience* 2016 Feb 19; 315:79-90.

SVIZENSKA I, DUBOVY P, SULCOVA A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures: a short review. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;90(4):501-11

TAKÁCS, V. et al. Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus. *Brain Struct Funct* 2014. DOI:10.1007/s00429-013-0692-6

TALOS, D.; SUN, H.; ZHOU, X.; FITZGERALD, E. The interaction between early life epilepsy and autistic-like behavioral consequences: a role for the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *PLoS ONE* 2012, 7(5): e35885.

TAN, H.; AHMAD, T.; LOUREIRO, M. et al. The role of cannabinoid transmission in emotional memory formation: implications for addiction and schizophrenia. *Front Psychiatry*. 2014; 5: 73. DOI: 10.3389/fpsy.2014.00073.

TUCHMAN R. et al. 2013. NINDS epilepsy and autism spectrum disorders workshop report. *Neurology*. 2013; 81: 1630–1636

VILLENEUVE, N.; BEN-ARI, Y.; HOLMES, G. L.; GAIARSA, J. L. Neonatal seizures induced persistent changes in intrinsic properties of CA1 rat hippocampal cells. *Ann. Neurol*. 2000, 47, 729–738.

WALLACE, M.; BLAIR, R.; FALENSKI, K.; MARTIN, B.; Delorenzo, R. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003, 307:129–137.

WISE, L. et al. Dualfattyacidamidehydrolase and monoacylglycerollipase blockade produces THC-like Morris water maze deficits in mice. *ACS Chem. Neurosci.* 3,369–378.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Atlas: epilepsy care in the world, 2005.

YOUNTS, T. J.; CHEVALEYRE, V.; CASTILLO, P. CA1 pyramidal cell theta-burst firing triggers endocannabinoid-mediated long-term depression at both somatic and dendritic inhibitory synapses. *J Neurosci*. 2013, 33:13743–13757.

ZLEBNIK, N; CHEER, J. Drug-induced alterations of endocannabinoid-mediated plasticity in brain reward regions. *J Neurosci*. 2016 Oct 5;36(40):10230-10238.