

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo do receptor CB<sub>1</sub> utilizando ferramentas de biologia computacional: avaliação do uso do *Danio rerio* como modelo biológico para o estudo da memória**

Wesley dos Santos Mateus

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba-MG

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo do receptor CB<sub>1</sub> utilizando ferramentas de biologia computacional: avaliação do uso do *Danio rerio* como modelo biológico para o estudo da memória**

Wesley dos Santos Mateus

Discente

Profa. Dra. Carla Patrícia Bejo Wolkers

Orientadora

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Coorientador

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba-MG

2022

*Dedico este trabalho à minha mãe que sempre esteve ao meu lado em todas as decisões importantes da minha vida, por me apoiar durante minha trajetória acadêmica e permitir que eu me tornasse um profissional.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, que me deu a vida e que esteve ao meu lado todo esse tempo, me apoiando e me socorrendo em momentos de crise e que em toda sua simplicidade me ensinou a lutar um dia após o outro por meus objetivos.

Agradeço minha irmã, que considero uma segunda mãe, que me apoiou nos momentos mais difíceis da minha vida, que me deu seu ombro para chorar e seus ouvidos para me ouvir e me aconselhar.

Agradeço à minha família, pelo apoio incondicional desde o primeiro momento, que me fez rir mesmo nos momentos mais sombrios da minha vida e que me transmitiu a segurança necessária para aceitar quem eu sou.

Ao meu companheiro e amor da minha vida, que esteve ao meu lado durante os anos de graduação e que suportou todos os meus surtos, minhas indecisões e minhas escolhas certas ou erradas, que não me deixou, nem me abandonou, me nutrindo sempre de positividade quanto a minha vida acadêmica e meu futuro profissional.

Ao meu cachorro, a quem considero meu filho, que chegou no momento mais intensamente estressante da minha vida e a tornou mais leve, mais alegre e mais feliz.

Agradeço também, a minha orientadora e meu coorientador por aceitarem conduzir este trabalho, e que apesar da intensa rotina de suas vidas acadêmicas dedicaram seu tempo, sua atenção e sua disposição para me ajudar em todas as etapas desta construção.

Às minhas amigas e colegas de curso, Patrícia Chaves, Mariana Siqueira e Maria Eduarda Bizinoto, por me proporcionarem momentos absolutamente incríveis, de muitas risadas, muitas fofocas, por um espaço acolhedor em suas vidas e pelas vezes que nós apoiamos para sobreviver ao curso.

Ao grupo Anéis de Coco & Cia, colegas de curso e amigos muito íntimos que fizeram o trajeto da minha vida academia mais confortável, que me apoiaram, que me ouviram e que me abraçaram.

Às minhas damas de companhia, Joao Pedro Cavalheiro e Otavio Cezar, por me fazerem rir mesmo quando eu não achei que ainda conseguia, pelas infinitas horas que passamos juntas jogando e nos distraíndo dos murros que a vida nos dava e pelos conselhos extraordinários que sempre me forneceram.

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

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

O sistema endocanabinoide está diretamente relacionado a diversos processos fisiológicos, como controle da homeostase, ingestão de alimentos, comportamentos de luta ou fuga e em processos neurológicos complexos, como a formação, consolidação e evocação de memórias, sendo filogeneticamente conservado desde os primeiros vertebrados. Este trabalho teve como objetivo descrever o gene codificador de um dos receptores desse sistema, o CB<sub>1</sub>, bem como revelar suas características bioquímicas em *Homo sapiens* e *Danio rerio*, investigando a possível existência de uma homologia entre os genes e seu receptor proteico associado, além de analisar o potencial uso do *D. rerio* para estudos sobre a influência do sistema endocanabinoide nos processos formação, consolidação e evocação de memórias. A metodologia adotada para este estudo exploratório e descritivo foi a revisão bibliográfica sobre o sistema endocanabinoide, sua relação filogenética, a expressão do gene e seu receptor proteico em artigos científicos e periódicos, além do uso de ferramentas de biologia computacional para determinar o grau de similaridade entre os genes e o receptor das duas espécies. Concluiu-se que há uma similaridade significativa entre os genes e a proteína receptora, permitindo considerar que o *D. rerio* é um modelo biológico compatível para os estudos da influência do sistema endocanabinoide nos processos ligados a formação, consolidação e evocação de memórias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Canabinoides. Homologia. Receptor CB1. Sistema Endocanabinoide.

## ABSTRACT

The endocannabinoid system is directly related to several physiological processes, such as homeostasis control, food intake, fight or flight responses and in complex neurological processes, such as memory formation, consolidation and evocation, being phylogenetically conserved since the earliest vertebrates. This study aimed to describe the coding gene for one of the receptors of this system, the CB<sub>1</sub>, as well as to reveal its biochemical characteristics in *Homo sapiens* and *Danio rerio*, investigating the possible existence of a homology between the genes and their associated protein receptor, in addition to analyzing the potential use of *D. rerio* for studies on the influence of the endocannabinoid system on the processes of formation, consolidation and evocation of memories. The methodology adopted for this exploratory and descriptive study was the bibliographic review about the endocannabinoid system, its phylogenetic relationship, the expression of the gene and its resulting protein receptor in scientific articles and journals, in addition to the use of computational biology tools to determine the degree of similarity between the genes and the receptor of the two species. It was concluded that there is a significant similarity between the genes and the receptor protein, allowing us to consider that *D. rerio* is a compatible biological model for the studies of the influence of the endocannabinoid system in the associated processes to the memories formation, consolidation and evocation.

**KEYWORDS:** Endocannabinoid System. Cannabinoids. CB1 receptor. Homology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Vias metabólicas de biossíntese e inativação de 2-AG e Anandamida .....	3
<b>Figura 2</b> - Mecanismos de transdução intracelulares após a ativação de receptores canabinoides do tipo CB <sub>1</sub> .....	4
<b>Figura 3</b> – Localização do gene <i>CNR1</i> no cromossomo 6 (6q14-15) de <i>Homo sapiens</i> (linha azul) .....	9
<b>Figura 4</b> – Expressão do gene <i>CNR1</i> em <i>Homo sapiens</i> em 27 tecidos humanos expresso em RPKM ( <i>reads per kilobase por milionmappedreads</i> ) .....	9
<b>Tabela 1</b> – Composição e frequência de aminoácidos da sequência primária do receptor CB <sub>1</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	12
<b>Figura 5</b> – Sequência de aminoácidos no formato FASTA do receptor CB <sub>1</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	13
<b>Figura 6</b> – Predição da localização dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos a partir do <i>Protter</i> do receptor CB <sub>1</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	14
<b>Tabela 2</b> – Composição de aminoácidos da sequência primária do receptor CB <sub>1a</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	15
<b>Figura 7</b> – Sequência de aminoácidos no formato FASTA do receptor CB <sub>1a</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	16
<b>Figura 8</b> – Predição da localização dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos a partir do <i>Protter</i> do receptor CB <sub>1a</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	17
<b>Tabela 3</b> – Composição e frequência de aminoácidos da sequência primária da isoforma CB <sub>1b</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	18
<b>Figura 9</b> – Sequência de aminoácidos no formato FASTA do receptor CB <sub>1b</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	19
<b>Figura 10</b> – Predição da localização dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos a partir do <i>Protter</i> do receptor CB <sub>1b</sub> de <i>Homo sapiens</i> .....	20
<b>Figura 11</b> – Alinhamento do gene <i>CNR1</i> de <i>Homo sapiens</i> e o gene <i>cnr1</i> de <i>Danio rerio</i> ....	22



<b>Figura 12</b> – Alinhamento da proteína receptora CB <sub>1</sub> de <i>Homo sapiens</i> e a proteína receptora CB <sub>1</sub> de <i>Danio rerio</i> .....	23
<b>Figura 13</b> – Localização do gene <i>cnr1</i> em <i>Danio rerio</i> .....	26
<b>Figura 14</b> – Sequência de aminoácidos no formato FASTA do receptor CB <sub>1</sub> de <i>Danio rerio</i> .....	25
<b>Figura 15</b> – Circuito hipocampal humano relacionado à formação de memórias declarativas .....	27

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	7
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	8
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	9
4.1 GENES DO RECEPTOR CANABINOIDE 1 (CB <sub>1</sub> ) DE <i>Homo sapiens</i> – <i>CNR1</i> .....	9
4.1.1 Caracterização do gene <i>CNR1</i> .....	9
4.1.2 Isoformas do gene <i>CNR1</i> .....	10
4.1.3 Caracterização bioquímica do receptor CB <sub>1</sub> .....	11
4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DO GENE E DA PROTEÍNA <i>CNR1</i> DE <i>Homo sapiens</i> E <i>Danio rerio</i> .....	21
4.3 DESCRIÇÃO DO RECEPTOR CB <sub>1</sub> DE <i>Danio rerio</i> .....	23
4.4 CANABINOIDES EXÓGENOS E SEUS EFEITOS SOBRE A MEMÓRIA .....	25
4.5 USO DO <i>Danio rerio</i> COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ESTUDOS DE MEMÓRIA E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA CANABINOIDE .....	29
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33

## 1- INTRODUÇÃO

O sistema endocanabinoide é uma descoberta relativamente recente no meio científico. Embora o principal constituinte psicoativo da *Cannabis sativa*, o  $\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol ( $\Delta^9$ -THC) tenha sido descoberto em 1964 (GAONI; MECHOULAM, 1964), foi apenas em 1988 que o primeiro receptor canabinoide foi identificado em roedores (DEVANE *et al.*, 1988).

As plantas do gênero *Cannabis*, popularmente conhecidas como maconha ou *marijuana*, são cultivadas há séculos por conterem propriedades medicinais e psicoativas (PERTWEE, 2006). Evidências indicam que estas plantas podem ter surgido originalmente na Ásia Central (MCPARTLAND, 2019) e, provavelmente, se espalharam pelo mundo através de rotas migratórias e comerciais (MALCHER-LOPES, 2007), além de estarem entre as primeiras plantas a serem usadas como medicamento, principalmente em rituais e cerimônias religiosas (MATOS *et al.*, 2017).

Embora a *Cannabis spp.* possa ser usada como fitoterápico (SMALL, 2015), ela é historicamente considerada uma droga ilícita desde 1912, a partir da Convenção Internacional do Ópio (WILLOUGHBY, 1925), sendo a mais consumida do mundo (UNODC, 2016; WHO, 2016). A principal razão para seu uso de forma recreativa é o efeito de euforia, relaxamento e alteração de percepção, que inclui a intensificação de experiências como comer, ver, ouvir e de prazer durante as relações sexuais, além de aumentar a sociabilidade (HALL, 2003). Neste caso, considera-se que o THC é o responsável pela função psicotrópica da planta, que ao entrar em contato com os receptores endocanabinoides causa os efeitos citados (GOLÇALVES, 2014).

A *Cannabis spp.* é fonte de pelo menos sessenta e seis compostos da classe dos canabinoides, dentre os quais destacam-se o  $\Delta^9$ -THC, o  $\Delta^8$ -tetrahydrocanabinol ( $\Delta^8$ -THC), o canabidiol (CBD), o canabinol (CBN), o canabigerol (CBG), o canabicromeno (CBC), o canabicitol (CBL) e a canabielsoina (CBE) (ELSOHLY, 2002), sendo todos ligantes exógenos do sistema endocanabinoide.

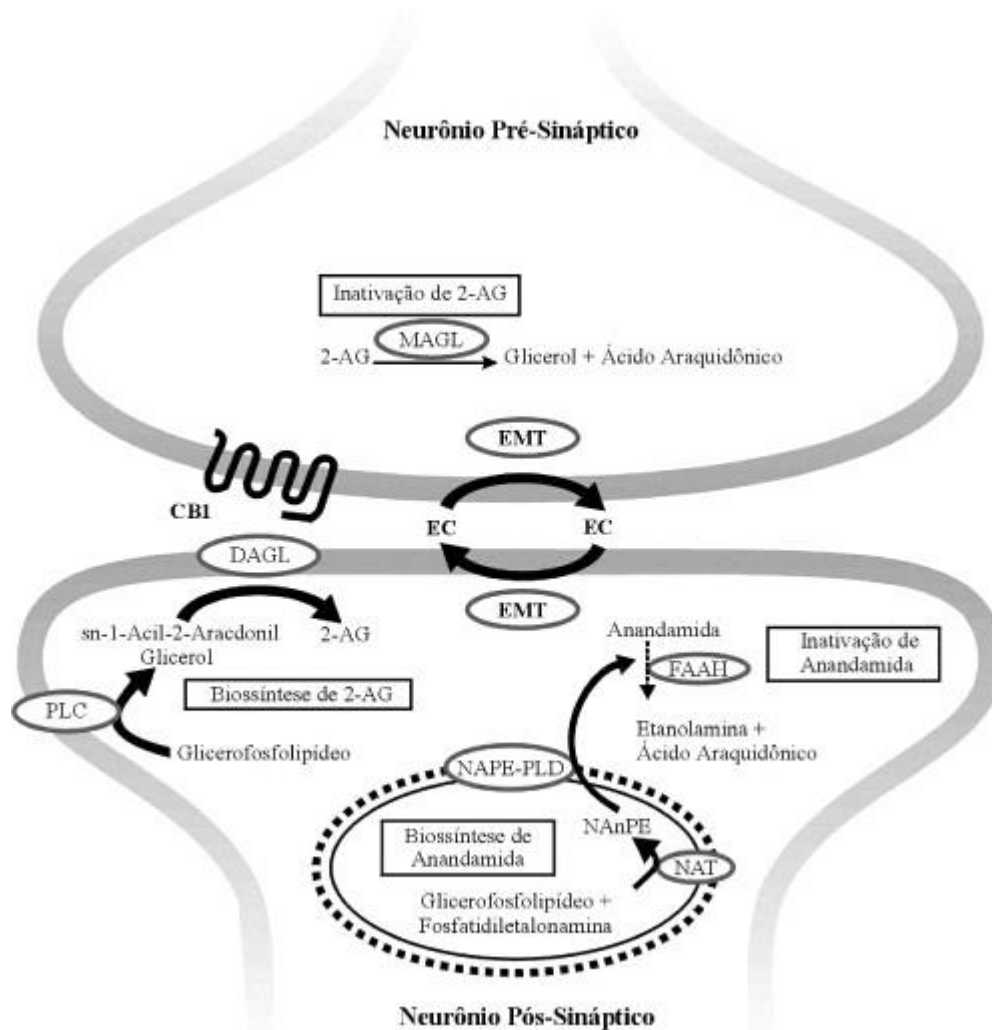
Nas últimas décadas, o interesse em conhecer os mecanismos de ação destes compostos e seus efeitos sobre a saúde tem se expandido, devido, principalmente, à demonstração do potencial de seu uso no tratamento de diversas doenças (SLEDZINSKI, 2020). Estudos clínicos verificaram que os canabinoides melhoram a qualidade de vida de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), câncer e portadores de doenças neurológicas e neurodegenerativas, como a esclerose múltipla e o Alzheimer (BONFÁ, 2008; MOLLINAR, 2020; WISNIEWSKI, 2014). As constatações positivas destes estudos com relação à sua

aplicabilidade terapêutica elevam, portanto, o grau de importância da investigação científica dos canabinoides e do sistema endocanabinoide, uma vez que possuem grande importância farmacológica e de qualidade de vida para pacientes com quadros clínicos complexos.

O sistema endocanabinoide é uma grande e intrincada rede de neuromodulação espalhada por diversas partes do corpo de vertebrados e invertebrados (ELPHICK; EGERTOVÁ, 2001), estando diretamente associado ao desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico bem como desempenhando papel fundamental no processamento cognitivo e fisiológico (LU; MACKIE, 2021). Este importante sistema neuromodulador é composto pelos canabinoides endógenos e seus respectivos receptores, assim como por enzimas responsáveis pela síntese e degradação destas substâncias (PACHER *et al.*, 2006).

Os ligantes endógenos deste sistema são a araquidonoiletanolamida (anandamida, AEA) (DEVANE *et al.*, 1992) e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (MECHOULAM *et al.*, 1995). A AEA é sintetizada a partir do precursor N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE), um fosfolípido presente na membrana plasmática, pela ação de clivagem da fosfolipase D (NAPE-PLD) (LIU *et al.*, 2006; DAINESE *et al.*, 2020). Já o 2-AG é sintetizado a partir do precursor ácido araquidônico inativo, pela ação das enzimas diacilglicerol lipase (DAGL, DAGL $\alpha$  e DAGL $\beta$ ) ou fosfolipase C (PLC) (MURATAEVA *et al.*, 2014). Com relação à degradação, a AEA é degradada por hidrólise pela enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) em ácido araquidônico e etanolamina (LIU *et al.*, 2006; DAINESE *et al.*, 2020), enquanto o 2-AG é degradado por hidrólise pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) em ácido araquidônico e glicerol (MURATAEVA *et al.*, 2014) (**Figura 1**).

**Figura 1** - Vias metabólicas de biossíntese e inativação de 2-AG e Anandamida



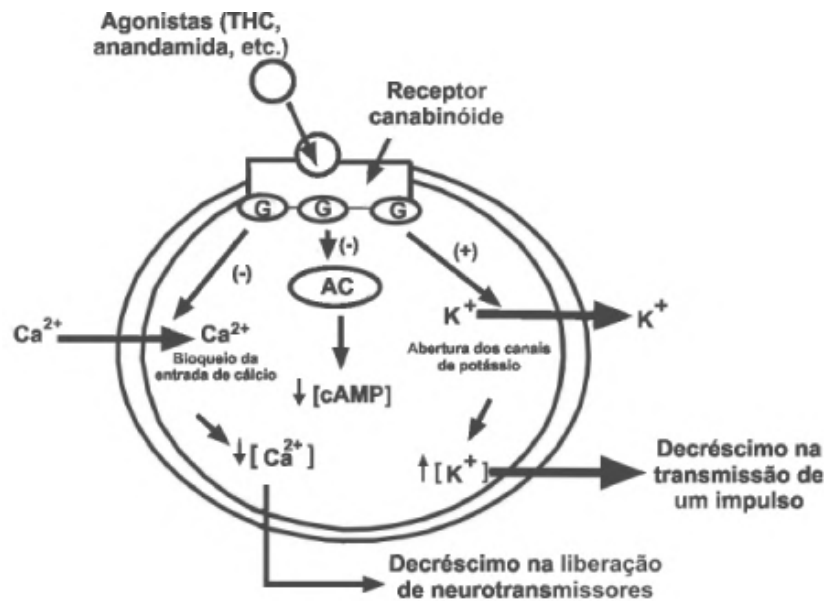
**2-AG:** 2-araquidonoil glicerol; **MAGL:** Monoacilglicerol lipase; **DAGL:** Diacilglicerol lipase; **EC:** Endocanabinóide; **EMT:** Transportador de membrana de endocanabinóides; **PLC:** Fosfolipase C; **FAAH:** Amida hidrolase de ácidos graxos; **NAPE-PLD:** N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipase D; **NAT:** N-acetiltransferase.

**Fonte:** GODOY-MATOS *et al.*, 2006.

O sistema endocanabinoide possui dois receptores, o CB<sub>1</sub> e o CB<sub>2</sub> (HOWLETT, 2005), sendo ambos associados à proteína G<sub>i/o</sub> (PERTWEE, 2005). Há, ao menos, três eventos intracelulares que podem ser desencadeados por receptores desta categoria, incluindo a inibição da adenilato ciclase com consequente redução dos níveis intracelulares de AMPc e da ativação de proteínas quinases A, mediando efeitos de curto e longo prazo; o estímulo da sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinases); a inibição de canais de Ca<sup>+2</sup> voltagem dependentes e estímulo de canais de K<sup>+</sup>, reduzindo o influxo de Ca<sup>+2</sup> e aumentando a

saída de  $K^+$  da célula; e estímulo da fosfatidilinositol-3-quinase e consequente mobilização intracelular de  $Ca^{2+}$  (para revisão ver GUZMAN, SANCHES; GAVE-ROPERH, 2002) (**Figura 2**).

**Figura 2** - Mecanismos de transdução intracelulares após a ativação de receptores canabinoides do tipo  $CB_1$



**THC:** Tetrahydrocannabinol; **AC:** Adenilato ciclase; **AMPc:** Monofosfato cíclico de adenosina; **K<sup>+</sup>:** Potássio;  
**Ca<sup>2+</sup>:** Cálcio; **G:** Proteína G.

**Fonte:** HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006.

Os receptores  $CB_1$  são encontrados principalmente, ainda que não exclusivamente, no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) e estão associados à sinalização de analgesia, controle motor, cognição, memória, respostas emocionais e homeostase em humanos e mamíferos (WALKER; HOHMANN, 2005; CAGNI, 2012). Já os receptores  $CB_2$  são encontrados nas células do sistema imune e são, provavelmente, moduladores da liberação de citocinas e migração celular do sistema imunológico (PERTWEE, 2006), estando frequentemente relacionados a sistemas periféricos, mas podendo, também, ser encontrados no SNC, atuando nas células da microglia (HOWLETT *et al.*, 2002).

O receptor  $CB_1$  possui duas variantes, o  $CB_{1a}$  e o  $CB_{1b}$  (RYBERG *et al.*, 2005; SHIRE *et al.*, 1995), e estima-se que estas variantes integrem menos que 5% do total de receptores  $CB_1$  em humanos. Estudos indicam que as variantes  $CB_{1a}$  e  $CB_{1b}$  podem ser únicas da espécie

humana, uma vez que não foram identificadas em roedores (XIAO *et al.*, 2008). Até o momento não foi identificada diferença significativa na afinidade das variantes para os agonistas exógenos do receptor CB<sub>1</sub>, entretanto, não se sabe se estas desempenham função semelhante ou igual ao receptor primário, em termos de eficácia e potencial (XIAO *et al.*, 2008).

Apesar de não terem sido identificadas as variantes do receptor CB<sub>1</sub> em outros organismos além dos seres humanos, o sistema endocanabinoide parece ser evolutivamente conservado (WOLKERS *et al.*, 2015; WOLKERS; MECESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMANN, 2017; ELPHICK; EGERTOVÁ, 2005). As enzimas responsáveis pela produção e degradação dos ligantes endógenos do sistema endocanabinoide (AEA e 2-AG) foram identificadas desde nematódeos, como o *Caenorhabditis elegans* e cnidários como a *Hydra viridis*, até teleósteos como o *Danio rerio* e vertebrados terrestres como o *Gallus gallus*, o que indica que sua origem evolutiva é filogeneticamente conservada (ELPHICK; EGERTOVÁ, 2005).

Supõe-se que os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> estejam presentes em todos os ancestrais comuns aos eucariotos (ELPHICK; EGERTOVÁ, 2005), o que indicaria que sua existência é anterior aos atuais vertebrados e invertebrados, ainda que isso não signifique que todos os eucariotos utilizem estes receptores com a mesma função; alguns organismos podem ter desenvolvido seu próprio sistema endocanabinoide com seus próprios receptores e ligantes endógenos diferentes daqueles conhecidos em humanos e outros mamíferos (ELPHICK; EGERTOVÁ, 2005).

Os receptores do sistema endocanabinoide como conhecemos, ou seja, com as funções descritas anteriormente, foram identificadas em baiacus, como o *Fugu rubripes*, e peixes menores como *D. rerio*, o que indica que a existência dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> pode ser traçado, pelo menos, até os primeiros teleósteos (YAMAGUCHI; MACRAE, BRENNER, 1996; SODERSTROM; JOHNSON, 2000; 2001). Estes receptores foram também descritos em *Chondrichthyes*, como tubarões e arraias, e em cordados mais primitivos, incluindo os peixes agnatas como as feiticeiras e as lampreias (ELPHICK; EGERTOVÁ, 2005).

Neste contexto, considerando a sua conservação do ponto de vista evolutivo, o uso de peixes como o *D. rerio* como modelo biológico para o estudo do sistema endocanabinoide e dos efeitos de substâncias canabinoides endógenas e exógenas sobre funções fisiológicas ganha destaque, considerando o crescimento no uso desta espécie para estudos neurofarmacológicos, bem como seu baixo custo e a facilidade de criação e manutenção (KALUEFF; ECHEVARRIA; STEWAERT, 2014). Ao considerar que o uso destas substâncias para o

tratamento de diversas patologias vem crescendo, a compreensão dos mecanismos fisiológicos e moleculares pelos quais elas interagem com os sistemas neurais, bem como os possíveis efeitos colaterais causados pela sua utilização devem ser investigados, visando a adequação na indicação de seu uso, avaliando-se seu custo-benefício. Neste contexto, o presente estudo busca traçar a similaridade entre o receptor CB<sub>1</sub> humano e *D. rerio* com vistas à utilização desta espécie para estudos avaliando o efeito de substâncias canabinoides sobre os processos de formação, consolidação e evocação de memórias, já que esta é uma função neural altamente influenciada pela ação do sistema endocanabinoide (MILLER, 1978; DE SOUZA *et al.*, 1994; ERICKSON *et al.*, 2006; LI; KIM, 2017; COHEN *et al.*, 2020).



## 2 - OBJETIVO GERAL

Descrever o gene codificador do receptor CB<sub>1</sub> e a proteína codificada, e avaliar a sua similaridade entre seres humanos (*H. sapiens*) e *zebrafish* (*D. rerio*) por meio de ferramentas de biologia computacional, prospectando sua utilização como modelo biológico para o estudo da memória.

### 2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever o gene codificador do receptor CB<sub>1</sub> e suas isoformas em *H. sapiens* e *D. rerio*.
- ✓ Investigar a existência de homologia entre o gene codificador do receptor CB<sub>1</sub> em *H. sapiens* com o peixe *D. rerio*;
- ✓ Checar a existência de homologia entre os aminoácidos do receptor CB<sub>1</sub> de *H. sapiens* com o CB<sub>1</sub> de *D. rerio* e inferir sua função;
- ✓ Analisar o potencial uso do *D. rerio* para estudos da influência do sistema canabinoide nos processos de formação, consolidação e evocação de memórias.

### 3 - METODOLOGIA

O estudo exploratório e descritivo foi realizado baseando-se em revisão bibliográfica e no uso de ferramentas de biologia computacional para obtenção de dados sobre o receptor endocanabinoide CB<sub>1</sub> em *H. sapiens* e em *D. rerio*.

A revisão da literatura nas bases de dados Google Scholar, SciELO, PubMed e Periódicos Capes utilizou como entrada as seguintes palavras-chave: “sistema endocanabinoide”, “receptor CB<sub>1</sub>”, “isoformas CB<sub>1a</sub> e CB<sub>1b</sub>”, “canabinoides exógenos e memória” e seus correspondentes em inglês. Além disso, os termos foram combinados utilizando o operador booleano “AND” para compor a estratégia de busca.

A localização cromossômica dos genes codificadores do receptor CB<sub>1</sub>, assim como a descrição da sua composição, foi obtida a partir do banco de dados *Genetics Home References* (<https://ghr.nlm.nih.gov/>) (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2021). As sequências de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos (FASTA) do gene do receptor CB<sub>1</sub> de *H. sapiens* e *D. rerio* foram obtidas no banco de dados NCBI - *National Center of Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no UniProtKB – UniProt Knowledge base (<https://www.uniprot.org/>). A ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (GASTEIGER *et al.*, 2005) no banco de dados ExPasy, foi utilizada para revelar as características moleculares, como o percentual individual de aminoácidos na composição da proteína, peso molecular e composição atômica. A ferramenta Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/>) foi utilizada para revelar a estrutura secundária das proteínas. Foi, ainda, utilizada a plataforma *The Zebrafish Information Network* – Zfin (<https://zfin.org/>) para descrição do gene e proteína em *D. rerio*. Análise comparativa (análise de identidade e grau de similaridade) do gene *CNR1* e da proteína CB<sub>1</sub> de *H. sapiens* e *D. rerio* foram feitas utilizando a ferramenta BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), selecionando a opção “Nucleotide>Nucleotide”; e selecionando a opção “Protein>Protein”, seguindo como “Non- redundant protein sequences (nr)” no tópico “Database”. A título de comparação, em ambas as análises ocorreu inserção do *taxid: 7955* no tópico “Organism”. Nesta análise, a identidade (%) revelou a quantidade de matches entre as sequências e o valor estatístico (*E-value*). Estes dados foram levantados no período de outubro/2021 a fevereiro/2022.

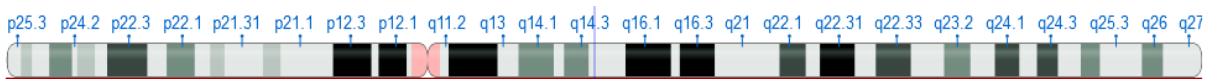
## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 GENE DO RECEPTOR CANABINOIDE 1 (CB<sub>1</sub>) DE *Homo sapiens* - *CNR1*

#### 4.1.1. Definição do gene *CNR1*

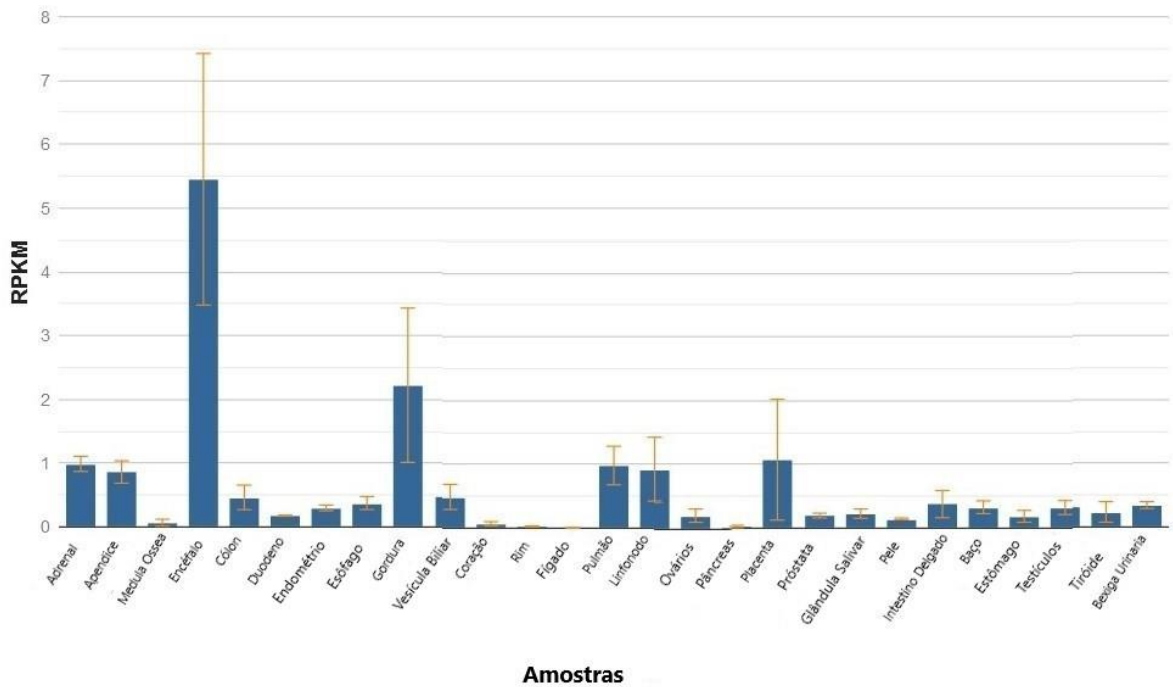
O *CNR1* é o gene que codifica um dos receptores canabinoides, o receptor CB<sub>1</sub>. Este receptor é membro da família dos receptores acoplados a proteína G, que inibem a atividade da adenilato ciclase de forma dose-dependente e estéreo seletiva. Ele está localizado no cromossomo 6, na região 6q14-15 (**Figura 3**), e é amplamente expresso no sistema nervoso central, principalmente no encéfalo (RPKM 6.2), além de outros tecidos, incluindo o tecido adiposo (RPKM 2.7) (gene ID: 1268) (NCBI, 2022a) (**Figura 4**).

**Figura 3** - Localização do gene *CNR1* no cromossomo 6 (6q14-15) de *Homo sapiens* (linha azul)



Fonte: NCBI, 2022a.

**Figura 4** -Expressão do gene *CNR1* em *Homo sapiens* em 27 tecidos humanos expresso em RPKM (*reads per kilobase por milion mapped reads*)



Fonte: Adaptado de NCBI (2022a)

#### 4.1.2. Isoformas do gene *CNR1*

O gene *CNR1* pode passar por *splicing* alternativo dentro da extremidade 5' do quarto éxon, gerando duas isoformas, a CB<sub>1a</sub> e a CB<sub>1b</sub> (SHIRE *et al.*, 1995; RYBERG *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2008), produzindo proteínas com regiões N-terminais alternativas, quando comparadas com o receptor CB<sub>1</sub>. De acordo com Shire *et al.* (1995), o CB<sub>1a</sub> é o resultado do *splicing* incomum gerado a partir do mRNA que codifica o CB<sub>1</sub> e não de um éxon separado como normalmente acontece (SHIRE *et al.*, 1995). Quando expresso o CB<sub>1a</sub> é traduzido em um receptor formado por 61 resíduos de aminoácidos a menos que o receptor CB<sub>1</sub>, com 28 resíduos de aminoácidos diferentes na região N-terminal (SHIRE *et al.*, 1995). Já o CB<sub>1b</sub> é uma segunda variante de *splicing*, onde 99 bases da porção codante são retiradas do mRNA, levando a uma deleção *in-frame* de 33 aminoácidos (RYBERG *et al.*, 2005).

Estudos indicam que o mRNA do receptor CB<sub>1</sub> é o transcrito mais abundante e que as variantes CB<sub>1a</sub> e CB<sub>1b</sub> representariam menos que 5% do total de receptores CB<sub>1</sub> (XIAO *et al.*, 2008). Em estudos mais recentes, Bagher *et al.* (2013) e Gonzalez-Mariscal *et al.* (2016) demonstraram que, em um nível funcional, os receptores CB<sub>1</sub> são mais abundantes que as variantes CB<sub>1a</sub> e CB<sub>1b</sub> nas regiões encefálicas avaliadas, entretanto não se sabe se os níveis destas três isoformas de receptores canabinoides pode mudar durante o desenvolvimento, envelhecimento ou em estados mentais alterados. Há evidências, por exemplo, que os níveis de mRNA das variantes do receptor CB<sub>1</sub> varie em linfonodos de pacientes portadores de linfoma não-Hodgkin (GUSTAFSSON *et al.*, 2008). Já em outros tecidos periféricos, como nos hepatócitos, foi encontrada predominância da isoforma CB<sub>1b</sub>, enquanto nas ilhotas pancreáticas a expressão das isoformas CB<sub>1b</sub> e CB<sub>1a</sub> foram de 60% e 25% respectivamente da expressão da isoforma CB<sub>1</sub> (GONZALEZ-MARISCAL *et al.*, 2016).

Estas três variantes transcritas de receptores canabinoides apresentam um padrão de co-expressão no encéfalo humano, e foi demonstrado que cada uma delas pode formar homodímeros e heterodímeros em células embrionárias humanas de rim (HEK 293A), de forma espontânea, na ausência de ligantes canabinoides, com maior afinidade para formação de homodímeros que heterodímeros. Além disso, o padrão de co-expressão do receptor CB<sub>1</sub> e cada uma das isoformas aumenta a expressão do receptor na superfície celular e aumenta a fosforilação da ERK dependente da proteína G<sub>i/o</sub> em resposta à agonistas canabinoides, demonstrando que as isoformas CB<sub>1a</sub> e CB<sub>1b</sub> podem desempenhar um papel importante no funcionamento do sistema endocanabinoide (BAGHER *et al.*, 2013).

#### 4.1.3. Caracterização bioquímica do receptor CB<sub>1</sub>

O gene *CNR1*, quando expresso, dá origem ao receptor CB<sub>1</sub>. O receptor CB<sub>1</sub> media diversos efeitos induzidos por substâncias canabinoides endógenas e exógenas, incluindo a modulação da ingestão de alimentos, da memória, de atividades locomotoras, da nocicepção, entre outros. O receptor CB<sub>1</sub> tem uma localização pré-sináptica (**Figura 1**), e sua ativação influencia a sinalização sináptica e a liberação de neurotransmissores. Esta localização foi demonstrada por meio da demarcação das regiões N-terminal e C-terminal da proteína utilizando anticorpos e a observação em microscopia eletrônica (para revisão ver LUTZ, 2002).

A sinalização desta proteína receptora tipicamente envolve a redução dos níveis de AMPc (RYBERG *et al.*, 2005). O receptor CB<sub>1</sub> está associado à proteína G<sub>i/o</sub>, que promove a inibição da enzima adenilato ciclase, reduzindo os níveis intracelulares de AMPc e gerando os efeitos inibitórios do receptor (PERTWEE, 2005). Além disso, a ativação do receptor também promove a inibição de canais de Ca<sup>+2</sup> voltagem dependentes e a abertura de canais de K<sup>+</sup>, modulando a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. No hipocampo, por exemplo, a ativação retrógrada de receptores canabinoides está envolvida na indução de um evento denominado supressão da inibição induzida pela despolarização (DSI), no qual a ativação de receptores canabinoides inibe transitoriamente a liberação do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) (LUTZ, 2002).

O receptor CB<sub>1</sub> (UniProtKB: P21554-1) é constituído por uma sequência de 472 aminoácidos e sua massa molecular é de 52.858 Da. A **tabela 1** apresenta a composição de aminoácidos da sequência primária do receptor CB<sub>1</sub>. A proteína apresenta um total de 39 resíduos de aminoácidos carregados negativamente (Asp + Glu) e 44 resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Arg + Lys) e sua meia vida estimada é de 30 horas em reticulócitos de mamíferos (*in vitro*) (GASTEIGER *et al.*, 2005).

**Tabela 1** - Composição e frequência de aminoácidos da sequência primária do receptor CB<sub>1</sub> de *Homo sapiens*

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Frequência (%)</b>
<b>Alanina</b>	Ala	34	7,2
<b>Arginina</b>	Arg	20	4,2
<b>Asparagina</b>	Asn	17	3,6
<b>Aspartato</b>	Asp	24	5,1
<b>Cisteína</b>	Cys	13	2,8
<b>Glutamina</b>	Gln	14	3,0
<b>Glutamato</b>	Glu	15	3,2
<b>Glicina</b>	Gly	21	4,4
<b>Histidina</b>	Hs	13	2,8
<b>Isoleucina</b>	Ile	38	8,1
<b>Leucina</b>	Leu	53	11,2
<b>Lisina</b>	Lys	24	5,1
<b>Metionina</b>	Met	16	3,4
<b>Fenilalanina</b>	Phe	28	5,9
<b>Prolina</b>	Pro	16	3,4
<b>Serina</b>	Ser	40	8,5
<b>Treonina</b>	Thr	29	6,1
<b>Triptofano</b>	Trp	5	1,1
<b>Tirosina</b>	Tyr	14	3,0
<b>Valina</b>	Val	38	8,1
<b>Pirrolisina</b>	Pyl	0	0
<b>Selenocisteína</b>	Sec	0	0

**Fonte:** Os autores. Tabela construída com dados extraídos do ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005) com base na sequência de aminoácidos no formato FASTA.

A sequência de aminoácidos (FASTA) é apresentada na **Figura 5** e a predição da localização dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos apresentada na **Figura 6**. É possível observar a distribuição dos sete domínios transmembrana e dos domínios citoplasmáticos C-terminal e extracelular N-terminal e, ainda, 4 possíveis sítios de N-glicosilação.

**Figura 5** -Sequência de aminoácidos no formato FASTA do receptor CB<sub>1</sub> de *Homo sapiens*

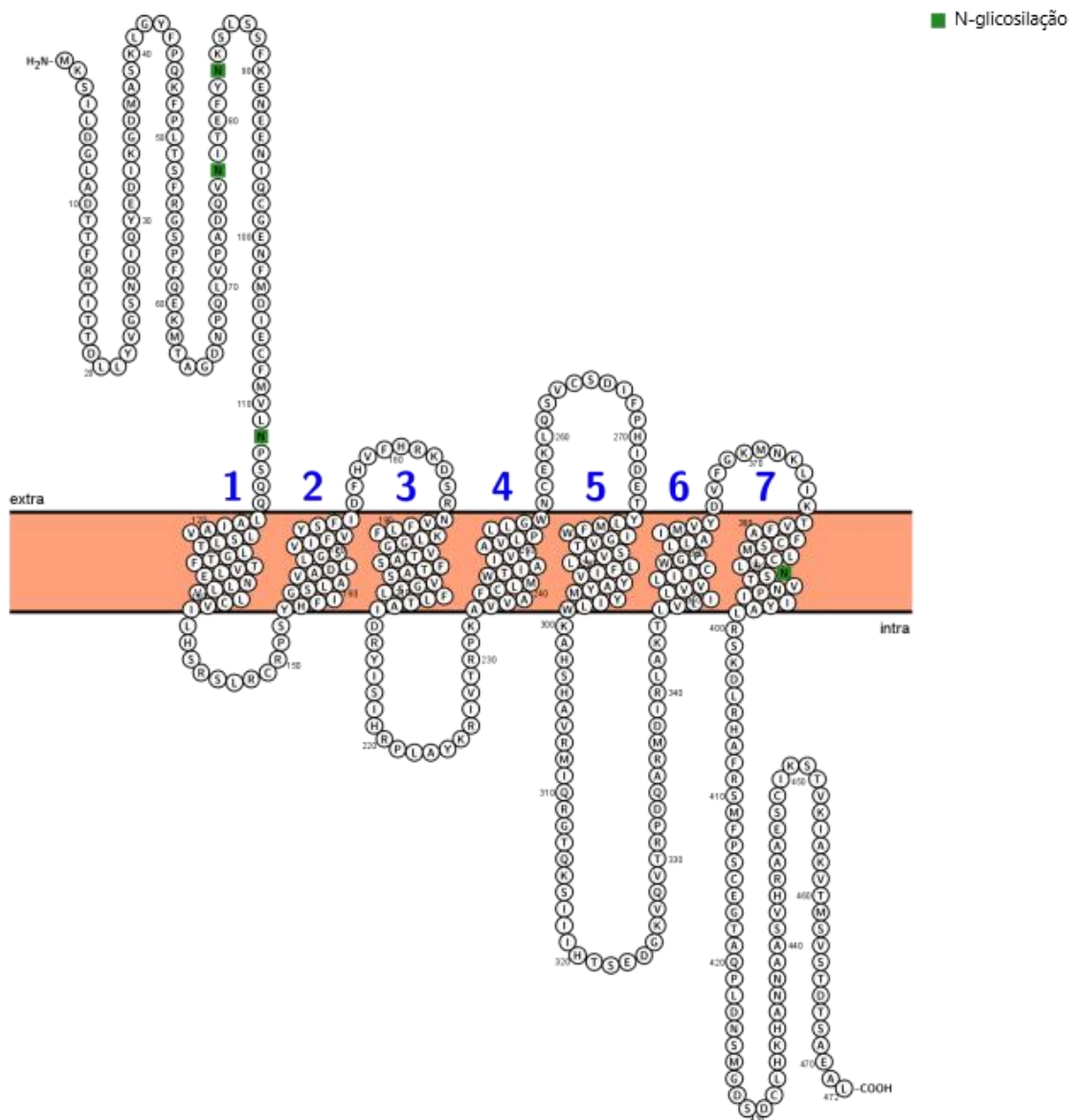
```

      10      20      30      40      50
MKSILDGLAD TTFRTITDDL LYVGSNDIQY EDIKGDMASK LGYFPQKFPL
      60      70      80      90     100
TSFRGSPFQE KMTAGDNPQL VPADQVNITE FYNKSLSSFK ENEENIQCGE
     110     120     130     140     150
NFMIDIECFMV LNPSQQLAIA VLSLTLTGFT VLENLLVLCV ILHSRSLRCR
     160     170     180     190     200
PSYHFIGSLA VADLLGSVIF VYSFIDFHFV HRKDSRVNVL FKLGGVTASF
     210     220     230     240     250
TASVGSFLT AIDRYISIHR PLAYKRIVTR PKAVVAFCLM WTIAIVIAVL
     260     270     280     290     300
PLLGWNCEKL QSVCSDFPH IDETYLMFWI GVTSVLLFI VYAYMYILWK
     310     320     330     340     350
AHSHAVRMIQ RGTQKSIIH TSEDGKVQVT RPDQARMDIR LAKTLVLILV
     360     370     380     390     400
VLIICWGPLL AIMVYDVFVK MNKLIKTVFA FCSMLCLLNS TVNPIIYALR
     410     420     430     440     450
SKDLRHAFRS MFPSCEGTAQ PLDNSMGDSD CLHKHANNAA SVHRAAESC
     460     470
KSTVKIAKVT MSVSTDTSAE AL

```

**Fonte:** UNIPROT, 2022a.

**Figura 6** -Predição da localização dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos a partir do Protter do receptor CB<sub>1</sub> de *Homo sapiens*



**Fonte:** Adaptada de OMASITS *et al.*, 2014.

Como observado, o receptor CB<sub>1</sub> possui sete domínios transmembrana e pertence à superfamília das rodopsinas. Em sua região C-terminal, pode interagir com duas Proteínas de Interação do Receptor Canabinoide chamadas CRIP<sub>1a</sub> e CRIP<sub>1b</sub>. A interação da proteína CRIP<sub>1a</sub> atenua de forma constitutiva, mas não agonista-dependente, a inibição do canal voltagem-dependente de Ca<sup>2+</sup> nos neurônios, diminuindo a ação do receptor (NIEHAUS *et al.*, 2007), modulando e alterando a interação do receptor CB<sub>1</sub> com a proteína G<sub>i/o</sub> (OLTRABELLA *et al.*, 2017).



Este receptor possui duas isoformas identificadas como CB<sub>1a</sub> (UniProtKB: P21554-2) e CB<sub>1b</sub> (UniProtKB: P21554-3), diferindo em sua composição de aminoácidos na região N-terminal (SHIRE *et al.*, 1995). A isoforma CB<sub>1a</sub> possui uma sequência de 411 aminoácidos e massa molecular de 45.874 Da. Apresenta 61 aminoácidos a menos que a isoforma CB<sub>1</sub>, diferindo nos 28 primeiros aminoácidos da região N-terminal (SHIRE *et al.*, 1995). A tabela 2 apresenta a composição e a frequência de aminoácidos da sequência primária do receptor CB<sub>1a</sub>. A proteína apresenta um total de 28 resíduos de aminoácidos carregados negativamente (Asp + Glu) e 37 resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Arg + Lys) e sua meia vida estimada é de 30 horas em reticulócitos mamíferos (*in vitro*) (GASTEIGER *et al.*, 2005). A sequência de aminoácidos (FASTA) da isoforma CB<sub>1a</sub> é apresentada na **Figura 7** e a predição da localização dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos apresentada na **Figura 8**.

**Tabela 2**– Composição e frequência de aminoácidos da sequência primária do receptor CB<sub>1a</sub> de *Homo sapiens*

Aminoácido	Abreviatura	Quantidade	Frequência (%)
Alanina	Ala	33	8,0
Arginina	Arg	18	4,4
Asparagina	Asn	13	3,2
Aspartato	Asp	16	3,9
Cisteína	Cys	14	3,4
Glutamina	Gln	11	2,7
Glutamato	Glu	12	2,9
Glicina	Gly	15	3,6
Histidina	Hs	13	3,2
Isoleucina	Ile	34	8,3
Leucina	Leu	47	11,4
Lisina	Lys	19	4,6
Metionina	Met	15	3,6
Fenilalanina	Phe	22	5,4
Prolina	Pro	15	3,6
Serina	Ser	37	9,0
Treonina	Thr	26	6,3
Triptofano	Trp	6	1,5
Tirosina	Tyr	10	2,4
Valina	Val	35	8,5
Pirrolisina	Pyl	0	0
Selenocisteína	Sec	0	0

**Fonte:** Os autores. Tabela construída com dados extraídos do ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005) com base na sequência de aminoácidos no formato FASTA.

**Figura 7** - Sequência de aminoácidos no formato FASTA do receptor CB<sub>1a</sub> de *Homo sapiens*

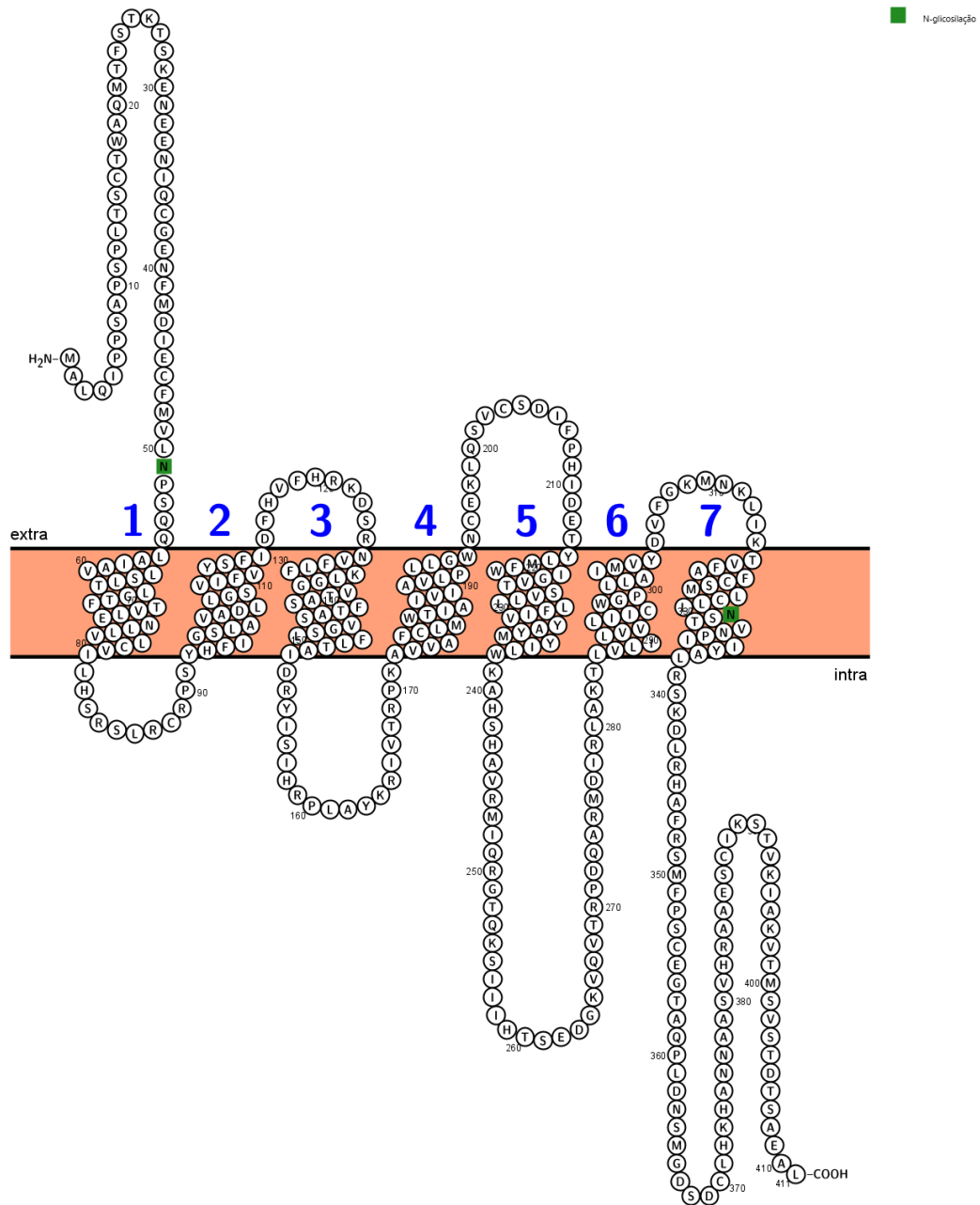
```

      10      20      30      40      50
MALQIPPSAP SPLTSCTWAQ MTFSTKTSKE NEENIQCGEN FMDIECFMVL
      60      70      80      90     100
NPSQQLAIAV LSLTLGTFTV LENLLVLCVI LHSRSLRCRP SYHFIGSLAV
     110     120     130     140     150
ADLLGSVIFV YSFIDFHFVH RKDSRNVFLF KLGGVNASFT ASVGSFLFTA
     160     170     180     190     200
IDRYISIHPR LAYKRIVTRP KAVVAFCLMW TIAIVIAVLP LLGWNCEKLQ
     210     220     230     240     250
SVCSDIFPHI DETYLMFWIG VTSVLLLFIV YAYMYILWKA HSHAVRMIQR
     260     270     280     290     300
GTQKSIIIHT SEDGKVQVTR PDQARMDIRL AKTLVLILV LIICWGPLLA
     310     320     330     340     350
IMVYDVFGKM NKLIKTVFAF CSMLCLLNST VNPPIYALRS KDLRHAFRSM
     360     370     380     390     400
FPSCEGTAQP LDNSMGSDSC LKHANNAAS VHRAAESCIC STVKIAKVTM
     410
SVSTDTSAEA L

```

**Fonte:** UNIPROT, 2022a.

**Figura 8** - Predição da localização dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos a partir do *Protter* do receptor CB<sub>1a</sub> de *Homo sapiens*



Fonte: Adaptada de OMASITS *et al.*, 2014.

A isoforma CB<sub>1b</sub> possui uma sequência de 439 aminoácidos e massa molecular de 49.060 Da. Esta isoforma é gerada pelo *splicing* que resulta em uma deleção *in-frame* de 33 aminoácidos da proteína CB<sub>1</sub> na região N-terminal (RYBERG *et al.*, 2005). A tabela 3 apresenta a composição de aminoácidos da sequência primária do receptor CB<sub>1b</sub>. A proteína apresenta um total de 35 resíduos de aminoácidos carregados negativamente (Asp + Glu) e 40 resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Arg + Lys) e sua meia vida estimada é de 30 horas em reticulócitos mamíferos (*in vitro*) (GASTEIGER *et al.*, 2005) A sequência de aminoácidos da isoforma CB<sub>1b</sub> é apresentada na **Figura 9**, a predição dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos é apresentada na **Figura 10**.

**Tabela 3**– Composição e frequência de aminoácidos da sequência primária do receptor CB<sub>1b</sub> de *Homo sapiens*

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Frequência (%)</b>
<b>Alanina</b>	Ala	33	7,5
<b>Arginina</b>	Arg	19	4,3
<b>Asparagina</b>	Asn	16	3,6
<b>Aspartato</b>	Asp	21	4,8
<b>Cisteína</b>	Cys	13	3,0
<b>Glutamina</b>	Gln	12	2,7
<b>Glutamato</b>	Glu	14	3,2
<b>Glicina</b>	Gly	18	4,1
<b>Histidina</b>	Hs	13	3,0
<b>Isoleucina</b>	Ile	36	8,2
<b>Leucina</b>	Leu	51	11,6
<b>Lisina</b>	Lys	21	4,8
<b>Metionina</b>	Met	15	3,4
<b>Fenilalanina</b>	Phe	25	5,7
<b>Prolina</b>	Pro	14	3,2
<b>Serina</b>	Ser	37	8,4
<b>Treonina</b>	Thr	28	6,4
<b>Triptofano</b>	Trp	5	1,1
<b>Tirosina</b>	Tyr	11	2,5
<b>Valina</b>	Val	37	8,4
<b>Pirrolisina</b>	Pyl	0	0
<b>Selenocisteína</b>	Sec	0	0

**Fonte:** Os autores. Tabela construída com dados extraídos do ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005) com base na sequência de aminoácidos no formato FASTA.

**Figura 9** - Sequência de aminoácidos no formato FASTA do receptor CB<sub>1b</sub> de *Homo sapiens*

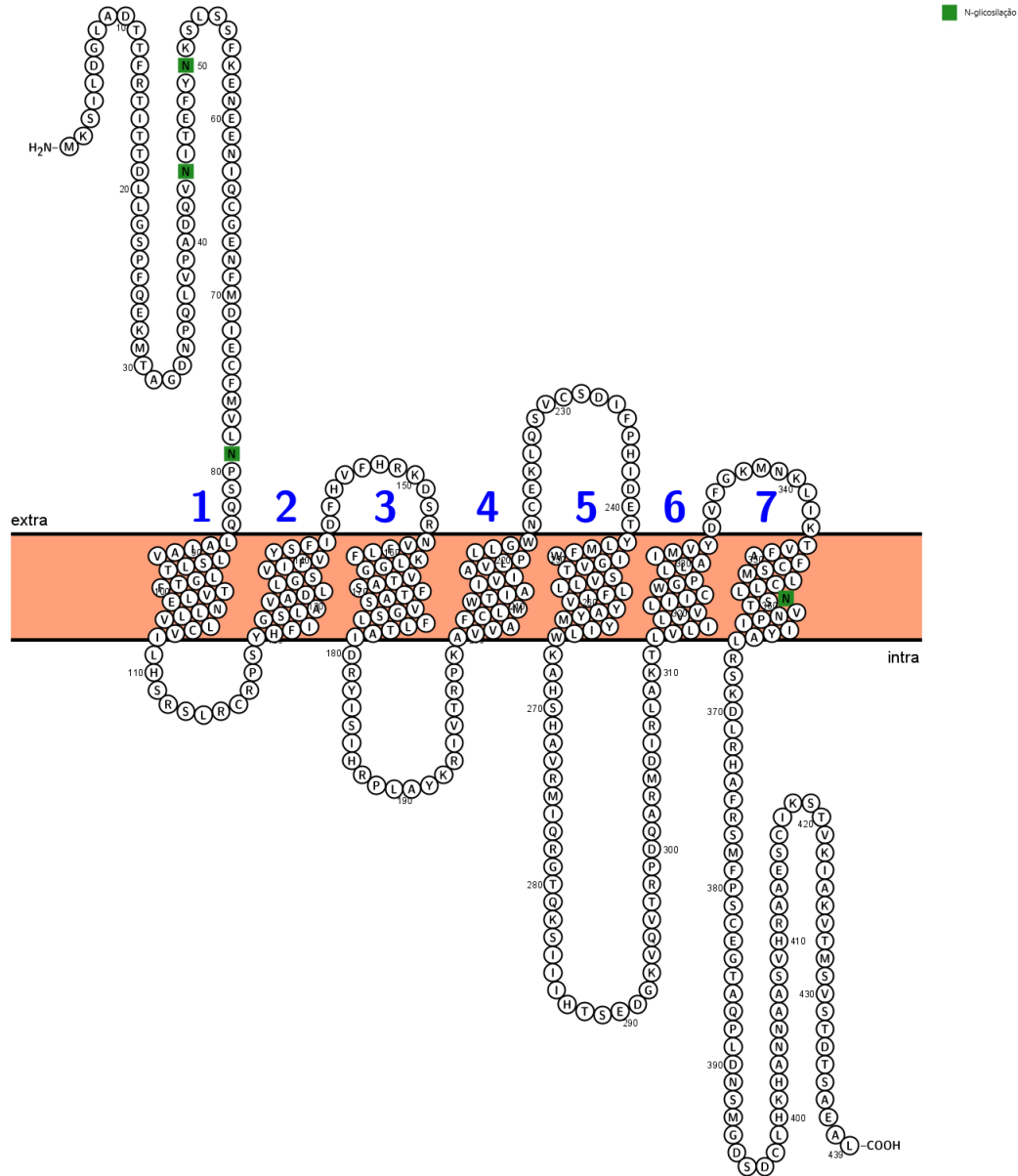
```

      10      20      30      40      50
MKSILDGLAD TTFRTITDDL LGSPFQEKMT AGDNPQLVPA DQVNITEFYN
      60      70      80      90     100
KSLSSFKENE ENIQCGENFM DIECFMVLNP SSQLAIAVLS LTLGTFTVLE
     110     120     130     140     150
NLLVLCVILH SRSLRCRPSY HFIGSLAVAD LLGSVIFVYS FIDFHFVHRK
     160     170     180     190     200
DSRNVFLFKL GGVTASFTAS VGSLFLTAID RYISIHRPLA YKRIVTRPKA
     210     220     230     240     250
VVAFLMWTI AIVIAVLPLL GWNCEKLQSV CSDIFPHIDE TYLMFWIGVT
     260     270     280     290     300
SVLLLFIVYA YMYILWKAHS HAVRMIQRGT QKSIIHTSE DGKVQVTRPD
     310     320     330     340     350
QARMDIRLAK TLVLILVLI ICWGPLLAIM VYDVF GKMNK LIKTVFAFCS
     360     370     380     390     400
MLCLLNSTVN PIIYALRSKD LRHAFRSMFP SCEGTAQPLD NSMGDSACLH
     410     420     430
KHANNAASVH RAAESCIKST VKIAKVTMSV STDTSAEAL

```

**Fonte:** UNIPROT, 2022a

**Figura 10** -Predição da localização dos domínios transmembrana citoplasmáticos e não citoplasmáticos a partir do *Protter* do receptor CB<sub>1b</sub> de *Homo sapiens*



**Fonte:** Adaptada de OMASITS *et al.*, 2014.

Os receptores canabinoides CB<sub>1</sub> estão localizados predominantemente no meio intracelular na ausência de ligantes, enquanto os dois receptores oriundos de *splicing* alternativo, CB<sub>1a</sub> e CB<sub>1b</sub>, estão localizados na membrana plasmática, quando expressos em células HEK 293A. Diferenças no comprimento ou na sequência da região N-terminal nas

isoformas CB<sub>1a</sub> e CB<sub>1b</sub> quando comparadas ao CB<sub>1</sub> poderia facilitar a localização destas variantes na membrana plasmática (BAGHER *et al.*, 2013).

Embora os conhecimentos acerca dos papéis biológicos desempenhados pelas isoformas do receptor CB<sub>1</sub> ainda sejam restritos, a isoforma CB<sub>1b</sub> parece ter relação com o metabolismo de glicose. Estudos indicam que, o tecido pancreático apresenta elevados níveis de expressão do receptor CB<sub>1</sub>, sendo que a isoforma CB<sub>1b</sub> é expressa apenas nas células  $\beta$ , regulando suas funções (GONZALÉZ-MARISCAL *et al.*, 2016; BERMUDEZ-SILVA, 2008; KIM *et al.*, 2011; NAKATA; YADA, 2008). González-Mariscal *et al.* (2016) demonstraram que o sistema endocanabinoide de ilhotas pancreáticas isoladas desempenham um papel importante na redução da secreção de insulina, colocando este receptor como um possível alvo para o desenvolvimento de terapias para o tratamento do diabetes e da obesidade. Nas células  $\beta$  pancreáticas o receptor CB<sub>1b</sub> influencia a atividade da enzima adenilato ciclase e seu bloqueio aumenta a secreção de insulina de forma glicose dependente (GONZALÉZ-MARISCAL *et al.*, 2016).

Assim como muitos receptores acoplados a proteínas G, o receptor CB<sub>1</sub> apresenta sítios de ligação alostéricos, nos quais ligantes podem alterar a afinidade ou a eficiência dos ligantes ortostéricos, alterando as ações dos ligantes endógenos, sendo possíveis sítios de intervenção medicamentosa (ROSS, 2007).

#### 4.2. ANÁLISE COMPARATIVA DO GENE *CNR1* E DA PROTEÍNA CB<sub>1</sub> DE *Homo sapiens* E *Danio rerio*

Foi realizado o alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *CNR1* de *H. sapiens* contra o genoma completo do *D. rerio* (taxid: 7955). Os resultados demonstraram a presença de um gene *cnr1* em *D. rerio* (NM\_212820.2) apresentando 76% de identidade (710/940 nt), com *E-value* de 0 e 0% de *gaps* (6/940). Os resultados do alinhamento das proteínas demonstraram a presença de uma proteína receptora CB<sub>1</sub> em *D. rerio* (NP\_997985.1) apresentando 71% de identidade (341/482 aa) com positivos de 81% (395/482) e 5% de *gaps* (26/482). Os alinhamentos de nucleotídeos e aminoácidos são apresentados nas **Figuras 11 e 12**.

**Figura 11** - Alinhamento do gene *CNR1* de *Homo sapiens* e o gene *cnr1* de *Danio rerio*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
651 bits(721)	0.0	710/940(76%)	6/940(0%)	Plus/Plus
Query 897	CAGTGTGGGGGAGAACTTCATGGACATAGAGTGTTCATGGTCCCTGAACCCAGCCAGCAG	956		
Sbjct 439	CAGTGTGGGGGAGAACTTTATGGATATGGAGTGCTTCATGATACTGACTCCCAGTCAGCAG	498		
Query 957	CTGGCCATTGCAGTCCCTGTCCCTCACGCTGGGCACCTTCACGGTCCCTGGAGAACCTCCTG	1016		
Sbjct 499	CTAGCCATAGCGGTGTTATCTCTAACTCTGGGGACGTTTACGGTGTGGAGAATTTGGTG	558		
Query 1017	GTGCTGTGCGTCATCCCTCCACTCCCGCAGCCTCCGCTGCAGGCCCTTCCCTACCACTTCATC	1076		
Sbjct 559	GTGTTGTGTGTGATTCTGCAGTCGCGTACGCTGCGCTGCAGGCCCTTCCCTACCACTTCATT	618		
Query 1077	GGCAGCCTGGCGGTGGCAGACCTCCTGGGAGTGTTCATTTTTGTCTACAGCTTCATGAC	1136		
Sbjct 619	GGCAGCTTAGCCATCGCTGATCTCCTCGGCAGTGTATATTCTGCTACAGCTTCCTAGAC	678		
Query 1137	TTCCACGTGTTCCACCCGCAAAGATAGCCGCAACGTGTTTCTGTTCAAACCTGGGTGGGGTC	1196		
Sbjct 679	TTTCACGTCTTTCACCGAAAAGACGCCCTAACGTTTCTGTTCAAGCTAGGAGGCGTT	738		
Query 1197	ACGGCCTCCTTCACTGCCTCCGTGGGCAGCCTGTTCCTCACAGCCATCGACAGGTACATA	1256		
Sbjct 739	ACGGCATCCTTCAACGCTTCTGTGGGAAGCCTGTTTCTCACTGCCATCGACCGATATGTG	798		
Query 1257	TCCATTACAGGCCCTTGGCCTATAAGAGGATGTGCACCAGGCCAAGGCCGTGGTGGCG	1316		
Sbjct 799	TCCATCCATCGCCCGCTGTCGTACCGGCGCATCGTGACGCGCACGAAAGCAGTGATCGCC	858		
Query 1317	TTTTCGCTGATGTGGACCATAGCCATTGTGATCGCCGTGCTGCCTCTCCTGGGCTGGAAC	1376		
Sbjct 859	TTCTGCATGATGTGGGCGATCTCTATTATCATCGCCGTGCTGCCGCTGCTGGGCTGGAAC	918		
Query 1377	TGCGAGAAACTGCAATCTGTTGCTCAGACATTTTCCCACACATTGATGAAACCTACCTG	1436		
Sbjct 919	TGCAAGCGGCTCAACTCGGTGTGCTCCGACATCTTCCCGCTCATCGATGAGAATTATCTG	978		
Query 1437	ATGTTCTGGATCGGGGTCACCAGCCTACTGCTTCTGTTTCATCGTGTATGCGTACATGTAT	1496		
Sbjct 979	ATGTTCTGGATCGGGGTCACCAGCCTACTGCTTCTGTTTCATCGTGTATGCGTACATGTAT	1038		
Query 1497	ATCTCTGGAAGGCTCACAGCCACGCCGTCCGCATGATTCAGCGTGGCACCCAGAAGAGC	1556		
Sbjct 1039	ATCTCTGGAAGGCCACCACATGCAGTGAGGATGCTGAGGCGCACGTCACAGAAGAGC	1098		
Query 1557	ATCATCATCCACACGCTCTGAGGATGGGAAGGTACAGGTGACCCGGCCAGACCAAGCCCGC	1616		
Sbjct 1099	CTGGTCGTGCACTCGGCGGACGGCACAAAGGTGCAGACCCCGACCGGACCAGGCACGC	1158		
Query 1617	ATGGACATTAGGTTAGCCAAGACCCTGGTCCCTGATCCTGGTGGTGTGATCATCTGCTGG	1676		
Sbjct 1159	ATGGACATCCGCTCTGGCCAAGACGCTGGTGTGATCCTGGTGGTGTGATCATCTGCTGG	1218		
Query 1677	GGCCCTCTGCTTGCAATCATGGTGTATGATGCTTT-TG--GGAAGATGAACAAGCTCATT	1733		
Sbjct 1219	GGCCCTCTGCTGGCCATCATGGTGTATGATGCTTTCTGGCGGATGGGGGACAA---CATC	1275		
Query 1734	AAGACGGTGTGTCATTCTGCAGTATGCTCTGCTGCTGAACTCCACCGTGAACCCCATC	1793		
Sbjct 1276	AAGACCGTGTGTCATTCTGCAGTATGCTCTGCTGCTGAACTCCACCGTGAACCCCATC	1335		
Query 1794	ATCTATGCTCTGAGGAGTAAGGACCTGCGACACGCTTTCC	1833		
Sbjct 1336	ATCTACGCACTGCGGAGTAAAGACCTGCGCCGGCCCTTCC	1375		

Fonte: NCBI, 2022b.



**Figura 12** - Alinhamento da proteína receptora CB<sub>1</sub> de *Homo sapiens* e a proteína receptora CB<sub>1</sub> de *Danio rerio*

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
648 bits(1672)	0.0	Compositional matrix adjust.	341/482(71%)	395/482(81%)	26/482(5%)
Query 1		MKSILDGLADTTFRITITDLLLVGSNDIQYED--IKGDMASKLGYFPQKFPLTSFRGSPF			58
Sbjct 10		+KS+LDG+A+TTFRITIT+ L Y+GSNDI Y+D I GD SK GY P P ++R S F			67
Query 59		VKSVLGDGVAETTFRITITSGLQYIGSNDIGYDDHIIDGDF-SKSGY-PLPKPFAAYRRSSF			67
Sbjct 68		QEKMTAGDNPQLVPADQVNITEFYNKLSLSSFKEN-----EENIQCGENFMDIECFMVLNP			113
Query 114		+K+ A D +V FY + S N + ++QCGENFMD+ECFM+L P			113
Sbjct 122		ADKV-APDEELIVKG-----LPFYPTNSSDVFGNWSHAEDGSLQCGENFMDMECFMILTP			121
Query 174		SQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYS			173
Sbjct 182		SQQLAIAVLSLTLGTFTVLENL+VLCVIL SR+LRCRPSYHFIGSLA+ADLLGSVIFVYS			181
Query 234		FIDFHVHFRKDSRNVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAIDRYISIHRPLAYKRIVTRPKA			233
Sbjct 241		F+DFHVHFRKDS NVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAIDRY+SIHRPL+Y+RIVTR KA			241
Query 294		FIDFHVHFRKDSPNVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAIDRYVSIHRPLSYRRIVTRTKA			241
Query 234		VVAFCLMWTIAIVIAVLP LLGWNC EKLQSVCSDFIPPHIDETYL MFWIGVTSV LLLFIVYA			293
Sbjct 242		V+AFC+MW I+I+IAVLP LLGWNC++L SVCSDFIP IDE YLMFWIGVTSV L+LFI+YA			301
Query 294		VIAFCMMWAISIIIAVLP LLGWNCRLNSVCSDFIPFLIDENYLMFWIGVTSV LVLFIYA			301
Query 354		YMYILWKAHSHAVRMIQRGTQKSIIHTSEDGKVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLILVWLI			353
Sbjct 361		YMYILWKAH HAVRM++R +QKS+++H+++ KVQ RPDQARMDIRLAKTLVLILVWLI			361
Query 413		YMYILWKAHHAVRMLRRTS QKSLVHVSADGTKVQTPRPDQARMDIRLAKTLVLILVWLV			361
Query 354		ICWGPELLAIMVYDVF GKMNKLIKTVFAFC SMLCLLNSTVNP IIALRSKDLRHAFRSMFP			413
Sbjct 362		ICWGPELLAIMVYD+F +M IKTVFAFC SML LLNSTVNP IIALRSKDLR AF +			421
Query 414		ICWGPELLAIMVYDLFWRMGDN IKTVFAFC SMLTLLNSTVNP IIALRSKDLRRAFLAACQ			421
Query 471		SCEGTAQ---PLDNSMGDS DCLHKHANNAASVHRAAESCIKSTVKIAKVTMSVSTDTSAE			470
Sbjct 422		C GT+ LDNS+ +SDC H N HRAAESC+K+TVKIAK+TMSVS +TSAE			473
Query 471		AL 472			
Sbjct 474		A+ 475			
Query 471		AV 475			

Fonte: NCBI, 2022b.

#### 4.3. DESCRIÇÃO DO RECEPTOR CB<sub>1</sub> DE *Danio rerio*

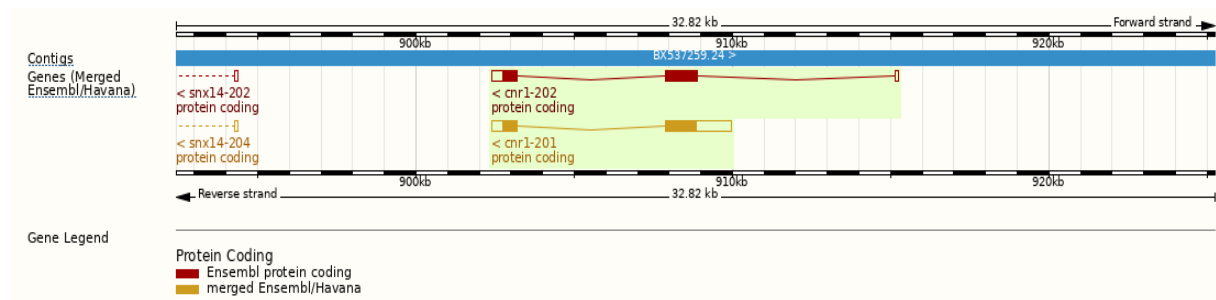
O gene *cnr1* em *D. rerio* está localizado no cromossomo 20, na posição 902.412-915-234 (**Figura 13**) (ZFIN, 2022; ENSEMBL, 2022). Apresenta duas variantes proteicas por meio de *splicing* alternativo identificadas como *CNR1-201* e *CNR1-202*, que, diferentemente do transcrito em humanos e camundongos, os quais apresentam um único exon, apresentam dois e três exons, respectivamente (OLTRABELLA *et al.*, 2017). Quando expresso, este gene origina a proteína receptora CB<sub>1</sub> constituída por 475 aminoácidos massa molecular de 53.044 Da e sete domínios transmembrana para ambas as variantes (UNIPROT, 2022a; 2022b). A sequência FASTA de aminoácidos do receptor é apresentada na **Figura 14**.

O receptor CB<sub>1</sub> em *D. rerio* é ortólogo ao receptor CB<sub>1</sub> de *H. sapiens* (PHANTER, 2022), sendo que, no que concerne a estimulação pelos endocanabinoides (AEA e 2-AG), desempenha funções semelhantes ao observado em seres humanos, mediando a regulação de funções como atividade locomotora, respostas de fuga, ingestão de alimentos, processos inflamatórios, controle de estresse, sistema de recompensa e desenvolvimento neural (KRUG; CLARK 2015; GOMEZ *et al.*, 2008). Em outras espécies de peixes, como o *Leporinus macrocephalus*, por exemplo, foi demonstrado que o sistema endocanabinoide pode estar envolvido na modulação nocicepção, mediando respostas de analgesia endógena induzida por estresse (WOLKERS *et al.* 2015; WOLKERS; MECESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMAN;2017), tendo sido sugerido que receptores CB<sub>1</sub> presentes na região do telencéfalo dorsomedial, região supostamente homóloga à amígdala (PORTAVELLA *et al.*, 2004), estariam envolvidos nesta resposta (WOLKERS; MECESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMAN, 2017).

Em *D. rerio*, CB<sub>1</sub> é extensamente expresso no sistema nervoso central, sistema digestivo, cabeça e oócitos (AGR, 2022). Estudo utilizando hibridização *in situ* demonstrou a expressão do gene *cnr1* na região da área preóptica, telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo, além do bulbo olfatório em diferentes fases do desenvolvimento larval. No adulto, o gene *cnr1* é altamente expresso no encéfalo, baço e testículos (OLTRABELLA *et al.*, 2017).

Assim como observado em seres humanos, o *D. rerio* também apresenta em sua região C-terminal um sítio que pode interagir com uma proteína de Interação do Receptor Canabinoide chamada CRIP<sub>1a</sub>, detectada no encéfalo do peixe já durante seu estágio larval, incluindo regiões como tronco encefálico e mesencéfalo (OLTRABELLA *et al.*, 2017).

**Figura 13** - Localização do gene *cnr1* em *Danio rerio*



**Fonte:** ENSEMBL, 2022.

**Figura 14** - Sequência de aminoácidos no formato FASTA do receptor CB<sub>1</sub> de *D. rerio*

10	20	30	40	50
MLFPASKSDV	KSVLDGVAET	TFRTITSGLQ	YIGSNDIGYD	DHIIDGDFSK
60	70	80	90	100
SGYPLPKPFA	AYRRSSFADK	VAPDEELIVK	GLPFYPTNSS	DVFGNWSHAE
110	120	130	140	150
DGSLQCGENF	MDMECFMILT	PSQQLAIAVL	SLTLGTFTVL	ENLVVLCVIL
160	170	180	190	200
QSRTRLRCRPS	YHFIGSLAIA	DLLGSVIFVY	SFLDFHVFHR	KDSPNVFLFK
210	220	230	240	250
LGGVTASFTA	SVGSLFLTAI	DRYVSIHRPL	SYRRIVTRTK	AVIAFCMMWA
260	270	280	290	300
ISIIIAVLPL	LGWNCKRLNS	VCSDFPLID	ENYLMFWIGV	TSVLVLFIIY
310	320	330	340	350
AYMYILWKAH	HHAVRMLRRT	SQKSLVHSA	DGTKVQTPRP	DQARMDIRLA
360	370	380	390	400
KTLVLILVVL	VICWGPLLAI	MVYDLFWRMG	DNIKTVFAFC	SMLTLLNSTV
410	420	430	440	450
NPIIYALRSK	DLRRAFLAAC	QGCRGTSTTP	LQLDNSLESD	CHRNQHRAAE
460	470			
SCVKTTVKIA	KLTMSVSAET	SAEAV		

Fonte: UNIPROT, 2022b.

#### 4.4. CANABINOIDES EXÓGENOS E SEUS EFEITOS SOBRE A MEMÓRIA

Os efeitos dos canabinoides sejam eles endógenos ou exógenos são primariamente mediados pelos receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (MATSUDA, 1997), como previamente discutido. O receptor CB<sub>1</sub>, em especial, apresenta um papel mediador importante nos processos de memória e aprendizado, devido à sua localização em áreas relacionadas ao processamento destas funções no sistema nervoso central, como no córtex frontal, giro cingulado, córtex motor, gânglio basal, hipocampo e cerebelo (MACKIE, 2005).

A aprendizagem e a formação de memórias consistem em funções superiores do sistema nervoso central e estão relacionadas à aquisição de informações sobre nosso ambiente interno ou externo que poderão produzir modificações nos comportamentos exibidos, de forma permanente ou transitória. O processo de aquisição de memórias é construído por fases sequenciais que se iniciam pela aquisição da informação, seguida pela consolidação, armazenamento e sua evocação, quando necessário (LORENZINI *et al.*, 1999). A memória não

se trata de processo unitário, mas de processos variados, incluindo tipos de memórias diferentes que são processadas também por regiões encefálicas distintas, que, no dia a dia, operam de forma paralela, interagindo umas com as outras (HENKE, 2010).

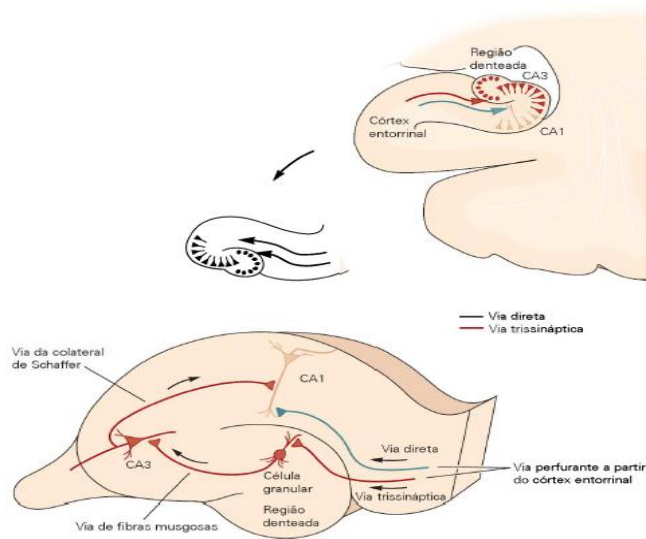
Dentre os diferentes tipos de memórias, existem as memórias implícitas ou não declarativas e as memórias explícitas ou declarativas (HENKE, 2010; KANDEL, 2014). A memória explícita apresenta-se de duas formas, memória episódica e memória semântica. A memória episódica, ou ainda, memória autobiográfica, é utilizada para evocar informações sobre acontecimentos, lugares, sons e experiências, enquanto a memória semântica é utilizada para aprender o significado de palavras e conceitos novos (KANDEL, 2014; BARCLAY *et al.*, 1974; BLAKEMORE, 1977). Já as memórias não declarativas envolvem a memória de procedimentos, habilidades motoras, de hábitos e condicionamentos, sendo responsável por armazenar informações que são adquiridas sem consciência, e que orientam nosso comportamento de modo inconsciente (SCHACTER, 1987).

As memórias podem, ainda, ser categorizadas de acordo com sua durabilidade, sendo que a memória de curto prazo se refere a um armazenamento limitado de informações por um curto período de tempo, em geral, inferior a um minuto, e estas memórias devem ser evocadas periodicamente para que continuem fazendo parte deste armazenamento até que possam ser retidas por tempos mais prolongados, passando a fazer parte da memória de longo prazo (COWAN, 2008). A memória de longo prazo, diferente da memória de curto prazo, armazena uma quantidade ilimitada de informações por tempo indefinido (RANGANATHAN, 2006; BADDELEY, 1999). A memória de trabalho ou memória operacional trata-se de uma memória de curto prazo que é marcada pela capacidade de manipulação das informações oriundas da percepção e da memória de longo prazo armazenada, sendo, portanto, uma combinação de diversos componentes da memória (MILLER, 1956; BADDELEY *et al.*, 1975; ERICSSON, 1995).

Evidências experimentais indicam que o hipocampo é uma área necessária para a aprendizagem associativa e formação de memórias, tanto a curto quanto a longo prazo. O hipocampo primata se conecta reciprocamente com todas as áreas de associação neocorticais, seja diretamente ou indiretamente, a partir dos Cornos de Amon 1, 2 e 3 (CA1, CA2 e CA3) ou do *subiculum* para regiões do córtex frontal (CF), temporal (CT), cíngulo (CC) e retrosplênico (CR), ou ainda por meio do córtex parahipocampal (CPh), perirrinal (CPr) ou entorrinal (CEr). Além disso, o hipocampo recebe projeções corticais com informações altamente elaboradas que poderão ser armazenadas na forma de memórias (para revisão ver HENKE, 2010) (**Figura 15**).

A ativação do hipocampo com estímulos de alta frequência a partir de regiões como o CER pela via perfurante promovem potenciações de longa duração (LTP do inglês *long-term potentiation*) que consistem em um aumento da eficácia sináptica que pode durar horas, dias ou até semanas, envolvendo a liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, atuando em receptores não-NMDA. As LTP são eventos eletrofisiológicos necessários à formação de memórias de longo prazo (KANDEL, 2014).

**Figura 15** - Circuito hipocampal humano relacionado à formação de memórias declarativas.



**Fonte:** Imagem modificada de KANDEL, 2014.

Estudos comportamentais em humanos demonstraram que canabinoides exógenos provenientes das plantas *Cannabis spp.*, bem como o uso de canabinoides sintéticos (COHEN *et al.*, 2020) causam prejuízo nas memórias de curto-prazo (MILLER, 1978), na memória espacial (VASEGHI *et al.*, 2018), na memória condicionada (NASEHI, 2017), na memória aversiva (KERAMATI-NOJEDEHSADAT *et al.*, 2017), na memória de trabalho (COHEN *et al.*, 2020) e na memória emocional (KHODAYAR *et al.*, 2016), sendo a memória de trabalho e a de curto-prazo as mais afetadas (MILLER, 1978; DE SOUZA *et al.*, 1994; ERICKSON *et al.*, 2006; LI; KIM, 2017; COHEN *et al.*, 2020).

Os mecanismos específicos pelos quais o uso de canabinoides exógenos causam prejuízos na memória não são completamente conhecidos. Estudos usando exames de imagem demonstraram alterações físicas no sistema nervoso central, causadas pelo uso de canabinoides, na região pré-frontal e límbica, associadas às funções cognitivas e emocionais (WEINSTEIN;

LIVNY; WEIZMAN, 2016). Além disso, as áreas hipocampais associadas à formação de memórias, como as regiões CA1, 2 e 3 apresentam alta densidade de receptores CB<sub>1</sub> (HEYSER *et al.* 1993), o que pode sugerir que a alteração da função do sistema endocanabinoide na região do hipocampo esteja por trás dos prejuízos de memória observados.

Canabinoides exógenos podem aumentar a atividade do sistema endocanabinoide (MASSA *et al.*, 2004), mas ao contrário do que a lógica propõe, essa ativação nem sempre reflete uma potencialização do papel dos endocanabinoides; na verdade, em processos neurais complexos os efeitos gerados pelos agonistas canabinoides não são capazes de imitar as ações do sistema endocanabinoide em sua condição fisiológica (RANGANATHAN; D'SOUZA, 2006). Provavelmente, esta diferença entre a ativação deste sistema por agonistas exógenos e endógenos se dá pelas diferentes formas de ativação dos receptores canabinoides para ambos (MARSICANO, 2009; PERTWEE, 2008). A aplicação de agonistas exógenos no encéfalo leva a ativação generalizada dos receptores canabinoides na área de aplicação ou em todo o corpo cerebral. Já a ativação do sistema endocanabinoide pelos seus ligantes endógenos é regulada de forma mais restritiva, limitadas pelo tempo de ativação e local (MARSICANO, 2009; PERTWEE, 2008; STRAIKER; MACKIE, 2007). Neste sentido, acredita-se que apenas algumas poucas células por um período curto de tempo (de segundos a minutos) estejam sob o controle da ativação fisiológica do sistema endocanabinoide, e esta seletividade celular permite que o sistema endocanabinoide funcione de forma mais controlada. Durante uma atividade neuronal específica como o processamento das memórias, é possível que o sistema endocanabinoide seja ativado em regiões limitadas do encéfalo e dentro de um período curto de tempo, o que explicaria o porquê de as ações generalizadas e duradouras dos agonistas exógenos não imitarem as funções fisiológicas do sistema endocanabinoide (MARSICANO, 2009), podendo ser responsáveis por prejuízos nestas funções.

Especificamente no que concerne a memória e o papel do sistema endocanabinoide hipocampal podemos citar a DSI, que se trata de uma função eletrofisiológica típica do sistema endocanabinoide no hipocampo (ALGER, 2002). Uma curta despolarização dos neurônios piramidais do hipocampo induz a produção e liberação de endocanabinoides, que irão retrogradamente atravessar a fenda sináptica e ativar os receptores CB<sub>1</sub> presentes nos terminais pré-sinápticos dos interneurônios inibitórios GABAérgicos (ALGER, 2002; FREUND *et al.*, 2003). Esta supressão induz uma inibição de curta duração da liberação do neurotransmissor GABA, o que impede, temporariamente, as células piramidais de sua função GABAérgica inibitória. Carlson *et al.* (2002) demonstrou que esta plasticidade sináptica rápida e de curto

prazo pode facilitar a indução da LTP dos neurônios piramidais, e como a LTP é o modelo mais conhecido para o armazenamento de informações de longo prazo no encéfalo, é provável que a supressão da DSI esteja diretamente envolvida com os processamentos de memória no hipocampo (MARSICANO, 2009).

Evidências de que o sistema endocanabinoide é o principal sinalizador retrógrado da DSI derivam de dois experimentos simultâneos de grupos independentes. Em ambos os experimentos a DSI foi bloqueada pela aplicação de um antagonista do receptor CB<sub>1</sub>. Além disso, a aplicação de um agonista do receptor CB<sub>1</sub> promoveu a oclusão dos sítios de ligação para os endocanabinoides que os impediu de se ligarem nos mesmos receptores e causarem a DSI (MAEJIMA *et al.*, 2001; WILSON; NICOLL, 2001; MARSICANO, 2009). De acordo com os autores, considerando que a DSI participa dos processos de memória que em condições fisiológicas acontecem de forma restrita em tempo e local, a ativação causada pelos agonistas exógenos do receptor CB<sub>1</sub> pode impedir a ativação na hora e local adequados, da mesma forma que um antagonista de CB<sub>1</sub>, resultando em prejuízo em funções cerebrais complexas como a memória e o aprendizado (MARSICANO, 2009; FRIDE, 2005; IVERSEN 2003; RIEDEL; DAVIES, 2005).

Neste contexto, o uso de canabinoides exógenos sintéticos ou extraídos de *Cannabis spp.* poderiam prejudicar a formação e retenção de memórias por meio da alteração dos mecanismos fisiológicos associados à geração de LTPs no hipocampo, por meio da inibição ou ativação da DSI. Os mecanismos envolvidos na formação de memórias e o efeito dos canabinoides sobre este processo é um campo de pesquisas relativamente recente, sendo que novos estudos são necessários para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos envolvidos nesta modulação, utilizando-se diferentes ferramentas e modelos biológicos.

#### 4.5. USO DO *D. RERIO* COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ESTUDOS DE MEMÓRIA E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA CANABINOIDE

Apesar de bem estabelecidos, os modelos biológicos para o estudo da memória em mamíferos, incluindo roedores, podem apresentar algumas desvantagens, principalmente por se tratarem de modelos biológicos de alto custo, além da dificuldade de se acompanhar os efeitos de determinadas substâncias durante o desenvolvimento fetal, por exemplo, abrindo a necessidade da definição de novos modelos biológicos nesta área do conhecimento.

Nesta perspectiva, o uso de peixes e, em especial, do *D. rerio* como modelo biológico para o estudo de memória e a sua relação com o sistema canabinoide apresenta uma série de vantagens práticas como fertilização externa e a alta taxa de fecundidade que podem ser controladas de forma mais eficiente; a transparência óptica, o que permite visualizar mudanças estruturais e acompanhar o desenvolvimento encefálico larval sob a ação das drogas citadas, além do baixo custo de criação e manutenção (KALUEFF, 2014; LAWRENCE, 2017).

Outro ponto a ressaltar é que seu sequenciamento genético é amplamente conhecido, havendo bases de dados específicas para a espécie, como o *Zfin* ([www.zfin.org](http://www.zfin.org)), além de ser facilmente manipulável do ponto de vista genético, o que permite a criação de animais com mutações específicas por meio de técnicas de engenharia genética (HOWE, 2013). Apresenta, ainda, ciclo de vida curto, o que favorece a avaliação de substâncias no decorrer de vários momentos da vida (BASNET, 2019).

Além disso, o *D. rerio* apresenta similaridade morfológica e genética significativa com mamíferos, incluindo o ser humano, podendo atingir até 80% em determinados genes. Considera-se, ainda, que esta espécie de peixe é um excelente modelo comportamental, por apresentar uma ampla gama de comportamentos complexos, incluindo comportamentos sociais, de ansiedade, de aprendizagem e memória, e respostas de luta e fuga, o que nos permite avaliar também doenças neurológicas e psiquiátricas (FRIEDRICH, 2012; LANGE, 2012; MORRIS, 2009).

No que concerne, especificamente, o sistema endocanabinoide, o presente estudo demonstrou que o *D. rerio* possui o receptor CB<sub>1</sub> que apresenta 76% de similaridade com o receptor CB<sub>1</sub> de *H. sapiens* na sequência de nucleotídeos e 71% na sequência de aminoácidos, sendo este considerado um gene ortólogo ao de humanos. Há, ainda, evidências que o receptor CB<sub>1</sub> de *D. rerio* se liga a compostos canabinoides e apresenta efeitos biológicos similares aos observados em humanos (BRAIDA *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2008; VIVEROS *et al.*, 2005; STEWART; KALUEFF, 2014; AKHTAR *et al.*, 2013; MIGLIARINI; CARNEVALI, 2008, 2009; OSEI-HYAMAN *et al.*, 2005; PAI *et al.*, 2013).

Há evidências que CB<sub>1</sub> de *D. rerio*, se ligam a canabinoides naturais extraídos da *cannabis*, promovendo efeitos biológicos. Estudos demonstram que altas doses do canabinoide exógeno  $\Delta^9$ -THC causam mudanças na atividade locomotora em *D. rerio*, reduzindo a distância e velocidade do nado (VIVEROS *et al.*, 2005; STEWART; KALUEFF, 2014). Já a aplicação da AEA, via banho por duas horas nos ovos de *D. rerio* aumenta a taxa de transcrição do gene



cnr1 durante a fase de eclosão, acompanhado por um aumento da expressão de genes relacionados ao crescimento e ao metabolismo lipídico, que inclui a proteína de ligação do elemento regulador de esterol e o fator de crescimento semelhante a insulina 1 e 2 (OSEI-HYAMAN *et al.*, 2005; MIGLIARINI; CARNEVALI, 2008; PAI *et al.*, 2013).

A afinidade dos receptores canabinoides de *D. rerio* aos compostos sintéticos conhecidos por apresentarem ações agonistas e antagonistas neste receptor em mamíferos também é demonstrada em diversos estudos. O agonista canabinoide sintético WIN55212-2 se liga aos receptores CB<sub>1</sub>, demonstrando efeitos ansiolíticos em *D. rerio* adulto, aumentando seu comportamento de cardume e diminuindo o estresse em teste de escototaxia (caixa claro/escuro) (CONNORS *et al.*, 2014). Em embriões, a exposição a este mesmo agonista e ao agonista sintético CP55940 causa edema pericárdico e do saco vitelino (AKHTAR *et al.*, 2013). Já o tratamento com o antagonista canabinoide SR141716A em *D. rerio* adulto provoca alterações na atividade locomotora e nas preferências condicionadas de local, e em embriões aumenta consideravelmente o tamanho do saco vitelino enquanto diminui a quantidade de lipídios na região do telencéfalo e ao redor dos olhos (BRAIDA *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2008). Evidências indicam, ainda que a exposição ao antagonista canabinoide sintético AM251 durante a embriogênese de *D. rerio* causa alterações nas taxas de eclosão e atraso na motilidade das larvas (MIGLIARINI; CARNEVALI, 2009).

Neste contexto, o *D. rerio* pode ser considerado um modelo biológico compatível para o estudo dos efeitos de compostos canabinoides exógenos em processos fisiológicos, incluindo processos de desenvolvimento neural e formação e retenção de memórias. De fato, existem protocolos experimentais que permitem avaliar a memória em *D. rerio*. Há protocolos estabelecidos, por exemplo, para a avaliação da memória condicionada, utilizando-se choque elétrico como estímulo incondicionado e luz como estímulo condicionado (XU *et al.*, 2007). Já com relação à memória episódica, Hamilton *et al.* (2016) desenvolveu um protocolo que permite a avaliação deste tipo de memória utilizando-se atributos que incluem a familiaridade com arena de teste e objetos. Este protocolo experimental refinado permitiu demonstrar que o *D. rerio* é capaz de reconhecer qual objeto foi observado, o local onde o objeto foi visto e o contexto (cor do tanque). Dessa forma, podemos concluir que há na literatura testes que permitem a avaliação de diferentes categorias de memória, utilizando este peixe, permitindo seu uso em uma abordagem neurofarmacológica utilizando-se de compostos canabinoides.

O uso do *D. rerio* como modelo biológico para o estudo do efeito destas substâncias é ainda favorecido pelas diversas vias de administração possíveis para esta espécie. Em

experimentos utilizando peixes, é possível realizar a administração de drogas por meio de diluição na água e consequente receptação branquial do composto (STEWART; KALUEFF, 2014), o que permite a aplicação da substância sem a necessidade de manipulação do animal e consequentemente, ocasionando menor risco de estresse durante os experimentos. Além disso, pode-se, ainda, aplicar as drogas por via alimentar, por meio da suplementação da ração com estas substâncias (WOLKERS et al., 2012), o que também permite a administração com menor risco de desencadear respostas de estresse. Ademais, o *D. rerio* também permite a aplicação de drogas por meios diretos, incluindo a injeção intraperitoneal (KINKEL et al., 2010) onde a dose aplicada pode ser calculada com precisão, além da possibilidade de se realizar injeções intracerebrais (BARBOSA-JÚNIOR et al., 2012), o que permite avaliar o efeito de substâncias agindo diretamente no tecido encefálico.

Sendo assim, considerando a similaridade observada entre os receptores CB<sub>1</sub> humano e páscio, além de todos os protocolos experimentais apresentados, consideramos que o *D. rerio* pode ser um excelente modelo biológico para os estudos dos efeitos dos canabinoides exógenos sobre os processos neurais da formação, consolidação e evocação das memórias, bem como de comportamentos relacionados a estes processos. A implementação de novos modelos biológicos como este cria novas possibilidades para o desenvolvimento desta área científica, com a realização de experimentos que permitem uma avaliação detalhada, durante as diferentes fases do desenvolvimento do sistema nervoso, desde a fase larval até a maturidade, possibilitando um maior aprofundamento na área.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGR. Alliance GenomeResources, 2022. Disponível em:<https://www.alliancegenome.org/gene/ZFIN:ZDB-GENE-040312-3> Acesso em: 24 de janeiro de 2022.
- AKHTAR, M. T. *et al.* Developmental effects of cannabinoids on zebrafish larvae. **Zebrafish**, v. 10, p. 283–293, 2013. DOI: 10.1089/zeb.2012.0785.
- ALGER, E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. **Progress in Neurobiology**, v.68, p.247–286, 2002. DOI: 10.1016/s0301-0082(02)00080-1.
- BADDELEY, A. D. **Essentials of human memory**. Psychology Press/Taylor & Francis, 1999.
- BADDELEY, A.D.; THOMSON, N. BUCHANAN, M. Word length and the structure of short-term memory. **Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior**, v. 14, p. 575–589, 1995.
- BAGHER, A. M. *et al.* Co-expression of the human cannabinoid receptor coding region splice variants (hCB<sub>1</sub>) affects the function of hCB<sub>1</sub> receptor complexes. **European Journal of Pharmacology**, v. 721(1-3), p. 341-54, 2013DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.09.002
- BARBOSA-JÚNIOR, A. Rapid Method for Acute Intracerebroventricular Injection in Adult Zebrafish. *In*: KALUEFF, A.V.; STEWART, M (ed) **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**, ed. 1, p. 323-330, 2012.
- BARCLAY, C. R. *et al.* Comprehension and semantic flexibility. **Verbal Learning Verbal Behavior**, v. 13,p. 471-481, 1974. DOI:10.1016/S0022-5371(74)80024-1
- BASNET, R. M. *et al.* Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 23, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>

- BERMÚDEZ-SILVA F. J. *et al.* Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. **Diabetologia**, v. 51, n. 3, p. 476-87, 2008. DOI: 10.1007/s00125-007-0890.
- BONFÁ, L. Uso de canabinoides na dor crônica e em cuidados paliativos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 3, p. 267-279, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-70942008000300010>
- BLAKEMORE C. **Mechanics of the Mind**. Cambridge University Press: Cambridge, 1977.
- BRAIDA D. *et al.* Hallucinatory and rewarding effect of salvinorin A in zebrafish: kappa-opioid and CB1-cannabinoid receptor involvement. **Psychopharmacology**, v.190 p.441–448, 2007. DOI: 10.1007/s00213-006-0639-1.
- CAGNI, P. L. Efeitos de ligantes do receptor canabinoide CB1 nos comportamentos de ansiedade e na hiper vigilância induzida por cocaína em micos-estrela. TCC. **Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde**. Brasília, 2012.
- CARLSON, G.; WANG, Y.; ALGER, B. E. Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. **Nature Neurosciences**, v. 5, p. 723–724, 2002. DOI: 10.1038/nn879.
- COHEN, K. *et al.* Chronic Use of Synthetic Cannabinoids is Associated with Impairment in Working Memory and Mental Flexibility. **Front Psychiatry**, v. 11, p. 602, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00602>
- CONNORS, K. A. *et al.* Similar anxiolytic effects of agonists targeting serotonin 5-HT1A or cannabinoid CB receptors on zebrafish behavior in novel environments. **Aquatic toxicology**, v.151, p. 105–113, 2014. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.12.005.
- COWAN, N. Chapter 20 What are the differences between long-term, short-term, and working memory? **Progress in Brain Research**, v. 169, p. 323-338, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00020-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00020-9).
- DAINESE, E. *et al.* The endocannabinoid hydrolase FAAH is and allosteric enzyme. **Scientific Reports**, v.10, p. 2292, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59120-1>.

- DE SOUZA, N.J. *et al.* Stimulation of GABAB receptors in the basal forebrain selectively impairs working memory of rats in the double Y-maze. **Brain Research**, v. 641, p. 29–38, 1994. DOI: 10.1016/0006-8993(94)91811-2.
- DEVANE, W.A. *et al.* Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, p. 605-613, 1988.
- DEVANE, W. A. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, p. 1946-1949, 1992.
- DORIS, J. M.; MILLAR, S. A.; IDRIS, I.; O'SULLIVAN, S. E. Genetic polymorphisms of the endocannabinoid system in obesity and diabetes. **Diabetes Obesity and Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 382-387, 2019. DOI: 10.1111/dom.13504
- ELPHICK, M. R.; EGERTOVÁ, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signaling. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 356, p. 381-408, 2001. DOI:10.1098/rstb.2000.0787.
- ELPHICK, M. R.; EGERTOVÁ, M. The phylogenetic distribution and evolutionary origins of endocannabinoid signalling. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.168, p.283-297, 2005. DOI: 10.1007/3-540-26573-2\_9.
- ELSOHLY, M. A. **Chemical constituents of cannabis**. *In*: Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential. New York: Haworth Press Inc, p. 27-36, 2002.
- ENSEMBLE. Ensemble Genomes, 2022. Disponível em: [http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio/Gene/Summary?g=ENSDARG00000009020;r=20:902412-915234](http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Gene/Summary?g=ENSDARG00000009020;r=20:902412-915234). Acesso em: 24 de janeiro de 2022.
- ERICSSON, K. A.; KINTSCH, W. Long-term working memory. **Psychological Review**, v. 102, n. 2, p. 211–245, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1037/0033-295X.102.2.211>.
- ERICKSON, E.J., WATTS, K.D., PARENT, M.B. Septal co-infusions of glucose with a GABAB agonist impair memory. **Neurobiology Learning Memory**, v. 85, p. 66–70, 2006. DOI: 10.1016/j.nlm.2005.08.008.

- FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiological Review**, v. 83, p. 1017–1066, 2003. DOI: 10.1152/physrev.00004.2003.
- FRIDE, E. Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. **Current Drug Targets CNS Neurological Disorders**, v. 4, p. 633–642, 2005. DOI: 10.2174/156800705774933069.
- FRIEDRICH, T. *et al.* Mutation of zebrafish dihydrolipoamide branched-chain transacylase e2 results in motor dysfunction and models maple syrup urine disease. **Disease Models Mechanisms**, v. 5, p. 248-25, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1242/dmm.008383>.
- GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1645-1647, 1964. DOI:<https://doi.org/10.1021/ja01062a046>.
- GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *In*: WALKER, J. M. (ed) **The Proteomics Protocols Handbook**, Totowa: Human Press, p. 571-607, 2005. Disponível em: [https://web.expasy.org/docs/expasy\\_tools05.pdf](https://web.expasy.org/docs/expasy_tools05.pdf). Acesso em: 10 de março de 2022.
- GODOY-MATOS, A. F. *et al.* O sistema endocanabinoide: novo paradigma no tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 2006, v. 50, n. 2, p. 390-399, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000200025>.
- GONÇALVES, G. A. M.; SCHLICHTING, C. L. R. Efeitos benéficos e maléficos da *Cannabis sativa*. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n.2, p. 92-97, 2014.
- GONZÁLEZ-MARISCAL, I. *et al.* Human CB1 Receptor Isoforms, present in Hepatocytes and  $\beta$ -cells, are Involved in Regulating Metabolism. **Scientific Reports**, v.6, p. 33302, 2016. DOI: 10.1038/srep33302.
- GOMEZ, M.; HERNANDEZ, M.; FERNANDEZ-RUIZ, J. Cannabinoid signaling system: does it play a function in cell proliferation and migration, neuritic elongation and guidance and synaptogenesis during brain ontogenesis? **Cell adhesion & Migration**, v. 2, p. 246-248, 2008. DOI: 10.4161/cam.2.4.6749.

- GUZMAN, M.; SANCHEZ, C.; GALVE-ROPERH I: Cannabinoids and cell fate. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 95, p. 175-184, 2002. DOI: 10.1016/s0163-7258(02)00256-5.
- GUSTAFSSON, K. *et al.* Expression of cannabinoid receptors type 1 and type 2 in non-Hodgkin lymphoma: Growth inhibition by receptor activation. **International journal of cancer**, v. 123, n. 5, p. 1025-1033, 2008. DOI: 10.1002/ijc.23584.
- HALL, W.; PACULA, R. L. **Cannabis use and dependence: Public Health and Public Policy**. Cambridge University Press: Cambridge, p. 38, 2003. DOI: 10.1017/CBO9780511470219.
- HAMILTON, T. J. *et al.* Episodic-like memory in zebrafish. **Animal Cognition**, v. 19, p.1071–1079, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10071-016-1014-1>
- HENKE, K. A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 523-32, 2010. DOI: 10.1038/nrn2850.
- HEYSER, C. J. *et al.* Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 264, n. 1, p. 294-307, 1993.
- HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Química nova**, v. 29, p. 318-325, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200024>.
- HOWE, K., CLARK, M., TORROJA, C. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p.498–503, 2013. DOI:<https://doi.org/10.1038/nature12111>.
- HOWLETT, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacology Review**, v. 54, p. 161-202, 2002. DOI: 10.1124/pr.54.2.161.
- HOWLETT, A. C. Cannabinoid receptor signaling. **In: Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 55-79, 2005. DOI: 10.1007/3-540-26573-2\_1.

- IVERSEN, L. Cannabis and the brain. **Brain**, v. 126, p. 1252–1270, 2003. DOI: 10.1093/brain/awg143.
- JONES K. S. *et al.* A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. **Nutrition & Metabolism**, v.5 p.23, 2008. DOI: 10.1186/1743-7075-5-23.
- KALUEFF, A.V.; ECHEVARRIA, D.J.; STEWART, A.M. Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 55, p. 1–6, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.01.022>.
- KANDEL, E. R. **Aprendizado e Memória**. *In*: Princípios de Neurociências. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, p. 1256-1270, 2014.
- KANDEL, E. R. **Córtex pré-frontal, hipocampo e biologia do armazenamento da memória explícita**. *In*: Princípios de Neurociências. 5. ed., Porto Alegre: AMGH, p. 1301, 2014.
- KERAMATI-NOJEDEHSADAT, M. *et al.* Activation and Deactivation of 5-HT1 Receptor of Accumbens Shell Area does not Alter ACPA-induced Aversive Memory Deficit in Male Rat. **Archives Iran Medicine**, v. 20, p. 185–192, 2017.
- KHODAYAR, E. *et al.* Effect of nucleus accumbens shell 5-HT4 receptors on the impairment of ACPA-induced emotional memory consolidation in male Wistar rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 27, p. 12–20, 2016. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000174.
- KIM, W. *et al.* Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in pancreatic  $\beta$ -cells. **Diabetes**, v. 60, n. 4, p. 1198-209, 2011. DOI: 10.2337/db10-1550.
- KINKEL, M. D. *et al.* Intraperitoneal Injection into Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v. 42, p. e. 2126, 2010. DOI: 10.3791/2126.
- KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three dimensional protein structure homology models. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. 230–234, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh008>.



- KRUG, R. G.; CLARK, K. J. Elucidating cannabinoid biology in zebrafish (*Danio rerio*). **Gene**, v. 570, n. 2, p. 168-179, 2015. DOI: 10.1016/j.gene.2015.07.036.
- LANGE, M. *et al.* The adhd-susceptibility gene *lphn3.1* modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. **Molecular Psychiatry**, v.17, p. 946-954, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2012.29>.
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1–20, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>.
- LORENZINI, C. G. *et al.* Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 71, n. 1, p. 1-18, 1999. DOI: 10.1006/nlme.1998.3865.
- LU, H.; MACKIE, K. Review of endocannabinoid system. **Society of Biological Psychiatry CNI**, v. 6, p. 607-615, 2021. DOI: 10.1016/j.bpsc.2020.07.016.
- LUTZ, B. Molecular biology of cannabinoid receptors. Prostaglandins, **Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 66, p. 123-142, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1054/plf.2001.0342>
- LI, Y.; KIM, J. Distinct roles of neuronal and microglial CB2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus. **Neuroscience**, v. 363, p. 11-25, 2017. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.08.053
- LIU, J. *et al.* A biosynthetic pathway for anandamide. **National Academy of Sciences**, v. 103, n. 36, p. 13345-13350, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0601832103.
- MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 299–325, 2005. DOI: 10.1007/3-540-26573-2\_10.
- MAEJIMA, T.; OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. **Neuroscience Research**, v. 40, p.205–210, 2001. DOI: 10.1016/s0168-0102(01)00241-3.

- MALCHER-LOPES, R.; RIBERIO, S. *Maconha, cérebro e saúde*. Rio de Janeiro: Vieira & Lent, ed. 1, 2007.
- MARSICANO, G.; LAFANETRE, P. Roles of the Endocannabinoid System in Learning and Memory. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, p. 201-230, 2009. DOI: 10.1007/978-3-540-88955-7-8.
- MASSA F. *et al.* The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 1202–1209, 2004. DOI: 10.1172/JCI19465.
- MATOS, R. L. A. *et al.* O uso do cannabidiol no tratamento da epilepsia. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.9, n.2, p. 786-814, 2017.
- MATSUDA L.A. Molecular aspects of cannabinoid receptors. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 11, p. 143–166, 1997. DOI: 10.1615/critrevneurobiol.v11.i2-3.30.
- MCPARTLAND, J. M.; HEGMAN, W.; LONG, T. Cannabis in Asia: its center of origin and early cultivation, based on a synthesis of subfossil pollen and archaeobotanical studies. **Vegetation History and Archaeobotany**, v. 28, p. 691-702, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00334-019-00731-8>.
- MECHOULAM, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, p. 83-90, 1995. DOI: 10.1016/0006-2952(95)00109-d.
- MILLER L.L.; CORNETT T.L. Marijuana: dose effects on pulse rate, subjective estimates of intoxication, free recall and recognition memory. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 9, p. 573–577, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(78\)90205-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(78)90205-8).
- MILLER G. A. The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. **Psychological Review**, v. 63, p. 81–97, 1956. DOI: <https://doi.org/10.1037/h0043158>.
- MIGLIARINI, B.; CARNEVALI, O. Anandamide modulates growth and lipid metabolism in the zebrafish *Danio rerio*. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 286, p. 12–16, 2008. DOI: 10.1016/j.mce.2008.01.021.

- MIGLIARINI, B.; CARNEVALI, O. A novel role for the endocannabinoid system during zebrafish development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299 p. 172–177, 2009. DOI: 10.1016/j.mce.2008.11.014.
- MOLLINAR, A. B. P. *et al.* O uso da maconha para o tratamento da esclerose múltipla. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n. 10, p. 77565-77575, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-256>.
- MORRIS, J. A. Zebrafish: A model system to examine the neurodevelopmental basis of schizophrenia. **Progress in Brain Research**, v. 179, p. 97–106, 2009. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17911-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17911-6).
- MURATAEVA, N.; STRAIKER, A.; MACKIE, K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. **British Journal of Pharmacology**, v.171, n. 6, p. 1379-1391, 2014. DOI: 10.1111/bph.12411.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Genetics Home Reference**. U.S. National Library Medicine. 2021. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 10 de março de 2021.
- NAKATA, M.; YADA, T. Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. **Regulatory Peptides**, v. 145, p. 49-53, 2008. DOI: 10.1016/j.regpep.2007.08.009.
- NASEHI, M. *et al.* Role of the amygdala GABA-A receptors in ACPA-induced deficits during conditioned fear learning. **Brain Research Bulletin**, v. 131, p. 85–92, 2017. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2017.03.008.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information, 2022a. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1268\\_](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1268_) Acesso em: 24 de janeiro de 2022.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information, 2022b. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Acesso em: 24 de janeiro de 2022.
- NIEHAUS, J. L. *et al.* CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP 1a. **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 1557-1566, 2007. DOI 10.1124/mol.107.039263.

- OLTRABELLA, F. *et al.* Role of the endocannabinoid system in vertebrates: Emphasis on the zebrafish model. **Development, growth & differentiation**, v. 59, n. 4, p. 194-210, 2017. DOI: 10.1111/dgd.12351.
- OMASITS, U. *et al.* Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. **Bioinformatics**, v. 30, n.6, p. 884-6, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt607.
- OSEI-HYIAMAN D. *et al.* Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. **The Journal of clinical investigation**. v. 115, p. 1298–1305, 2005. DOI: 10.1172/JCI23057.
- PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacology Review**, v. 58(3), p. 389-462, 2006. DOI: 10.1124/pr.58.3.2.
- PAI, W. Y. *et al.* Cannabinoid receptor 1 promotes hepatic lipid accumulation and lipotoxicity through the induction of SREBP-1c expression in zebrafish. **Transgenic research**, v.22, p.823–838, 2013. DOI: 10.1007/s11248-012-9685-0.
- PANTHER. Panther Classification System, 2022. Disponível em:  
<http://pantherdb.org/treeViewer/treeViewer.jsp?book=PTHR22750&species=agr&seq=ZFIN=ZDB-GENE-040312-3> Acesso em: 24 de janeiro de 2022.
- PERTWEE, R. G. Pharmacological actions of cannabinoids. In: Cannabinoids. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 1-51, 2005. DOI: 10.1007/3-540-26573-2\_1.
- PERTWEE, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 163-171, 2006. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706406.
- PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 199–215, 2008. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707442.

- PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v.74, n. 2, p. 129-180, 1997. DOI: 10.1016/s0163-7258(97)82001-3.
- RANGANATHAN, M.; D'SOUZA D. C. The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review. **Psychopharmacology**,v. 188, p. 425–444, 2006. DOI: 10.1007/s00213-006-0508-y.
- RIEDEL, G.; DAVIES, S.N. Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 445–477, 2005. DOI: 10.1007/3-540-26573-2\_15.
- ROSS, R. A. Allosterism and cannabinoid CB1 receptors: the shape of things to come. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, p. 567-572, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.10.006>
- RYBERG, E. *et al.* Identification and characterization of a novel splice variant of the human CB1 receptor. **FEBS Letter**, v. 579, n. 1, p. 259-264, 2005. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.11.085.
- SCHACTER, D. L. Implicit Memory: history and current status. *Journal of Experimental Psychology Learning Memory and Cognition*, v. 13, p. 501-518, 1987. DOI: 10.1037/0278-7393.13.3.501.
- SLEDZINSKI, P. *et al.* “Cannabinoids in Medicine: Cancer, Immunity, and Microbial Diseases.” **International journal of molecular sciences**, v. 22, p. 263. 2020, DOI: 10.3390/ijms22010263
- SHIRE, D. *et al.* An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. **The Journal of Biological Chemistry**. v.270. n 8, p. 3726-3731, 1995. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.8.3726>.
- SMALL, E. Evolution and classification of *Cannabis sativa*. In: Relation to Human Utilization. **Botanical Review**, v.81, p. 189-294, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12229-015-9157>.
- SODERSTROM, K.; JOHNSON, F. CB1 cannabinoid receptor expression in brain regions associated with zebra fish finch song control. **Brain Research**,v. 857, p. 151-157, 2000. DOI: 10.1016/s0006-8993(99)02393-8.

SODERSTROM, K.; JOHNSON, F. Zebra finch CB1 cannabinoid receptor: pharmacology and in vivo and in vitro effects of activation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, p. 189-197, 2001.

STEWART, A. M.; KALUEFF, A. V. The behavioral effects of acute Delta(9)-tetrahydrocannabinol and heroin (diacetylmorphine) exposure in adult zebrafish. **Brain Research**, v.1543, p.109–119, 2014. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.11.002.

STRAIKER, A.; MACKIE, K. Metabotropic suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurons. **Journal of Physiology**, v. 578, p. 773–785, 2007. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.117499.

UNIPROT. The Universal Protein Resource, 2022a. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P21554> Acesso em: 24 de janeiro de 2022.

UNIPROT. The Universal Protein Resource, 2022b. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q7T3Q3> Acesso em: 24 de janeiro de 2022.

UNODC. **United Nations Office on Drugs and Crime**. *In: World Drug Report 2016*. New York: United Nations Publication, 2016. Disponível em: <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/world-drug-report-2016.html> Acesso em 10 de março de 2022.

VASEGHI, S. *et al.* 2018. The role of CA1 CB1 receptors on lithium-induced spatial memory impairment in rats. **EXCLI Journal**, v. 17, p. 916–934, 2018. DOI: 10.17179/excli2018-1511.

VIVEROS, M. P.; MARCO, E. M.; FILE, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v.81, p. 331–342, 2005. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.01.029.

WALKER, J. M.; HOHMANN, A. G. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. In: **Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 509-554, 2005. DOI: 10.1007/3-540-26573-2\_17.

WEINSTEIN A.; LIVNY A.; WEIZMAN A. Brain imaging studies on the cognitive, pharmacological and neurobiological effects of cannabis in humans: evidence from

studies of adult users. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n.42, p. 6366–79, 2016. DOI: 10.2174/1381612822666160822151323

WILLOUGHBY, W. W. **Opium as an international problem: The Geneva conferences**. The Josh Hopkins Press: Baltimore, 1 ed., 1925.

WISNIEWSKI, T.; GONI, F. Immunotherapy for Alzheimer's disease. **Biochemical Pharmacology**, v.88, n.4, p. 499-507, 2014. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.12.020.

WILSON, R.I.; NICOLL, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 410, p. 588–592, 2001. DOI: 10.1038/35069076.

WHO. World Health Organization. The health and social effects of nonmedical cannabis use. **WHO Press**, Geneva, 2016.

WOLKERS, C. P. B. *et al.* Acute administration of a cannabinoid CB1 receptor antagonist impairs stress-induced antinociception in fish. **Physiology & behavior**, v. 142, p. 37-41, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.01.038>.

WOLKERS, C. P. B.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. Cannabinoid system of dorsomedial telencephalon modulates behavioral responses to noxious stimulation in the fish *Leporinus macrocephalus*. **Physiology & behavior**, v. 179, p. 504-509, 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.07.027.

XIAO, J. C. *et al.* Similar in vitro pharmacology of human cannabinoid CB1 receptor variants expressed in CHO cells. **Brain Research**, v. 1238, p. 36-43, 2008. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.08.027.

XU, X. *et al.* Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*), **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, p. 72-77, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.06.002>.

YAMAGUCHI, F.; MACRAE, A. D.; BRENNER, S. Molecular cloning of two cannabinoid type 1-like receptor genes from the puffer fish *Fugu rubripes*. **Genomics**, v. 35, p. 603-605, 1996. DOI: 10.1006/geno.1996.0406.

ZFIN, The Zebrafish Information Network, 2022. Disponível em: <https://zfin.org/ZDB-GENE-040312-3#summary> Acesso em: 24 de janeiro de 2022