

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)  
*Programa de Pós-Graduação em Neurociências*

JOHANNA MARCELA DURAN MOLINA

**MODULAÇÃO ENDOCANABINÓIDE DA EVOCAÇÃO DE  
MEMÓRIAS RECENTES OU REMOTAS: EFEITO DA INFUSÃO  
INTRA-HIPOCAMPAL DE AM251**

Porto Alegre, 2014

JOHANNA MARCELA DURAN MOLINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Jorge Alberto Quillfeldt

Porto Alegre, 2014

## DEDICATORIA

As quatro pessoas mais importantes da minha vida, o meu pai e mãe que me ensinaram tudo o que sei e aos meus irmãos Carolina e Mateo, os melhores presentes que a vida podia me dar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a minha mãe que me acompanhou sempre e apoiou todos meus sonhos, pelo amor, confiança, por dedicar sua vida a nosso cuidado, porque como ela diz “meus triunfos são os dela”.

A meu pai por acreditar em mim e pelo apoio infinito em cada um dos meus projetos.

A minha irmã por cada palavra, por acreditar em mim sempre, por ser minha confidente, meu porto seguro, por estar sempre ao meu lado.

A meu irmão por me fazer uma melhor pessoa, por querer ser cada dia melhor por você.

A todos eles obrigada pelo amor, a confiança e por entender minhas ausências, sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu namorado pela paciência em todos esses anos e pelo amor tão bonito.

Também agradeço ao professor Fernando Cárdenas por me guiar no caminho da neurociência, pelo apoio e a sabedoria com que sempre me aconselhou. Ao “Semillero de neurociência y comportamiento” da Universidad de los Andes, o lugar onde comecei este largo caminho, especialmente agradeço ao Rodrigo por me ensinar a ser uma melhor cientista e amar meu trabalho, por me ajudar cada vez que precisava e nunca desistir.

Ao professor Jorge por me aceitar no seu laboratório e me ajudar cada vez que precisava, por ser um exemplo de pessoa e cientista.

Agradeço à professora Elisa Calcagnotto pela constante ajuda, e a todo o pessoal do LPBNC: Josué, Flavia, Lucas, Fabricio, Fabiana, Luiza, em especial a Ana e a Querusche por fazer de POA o meu segundo lar, por fazer minha vida aqui mais fácil e tranquila, obrigada pela amizade e por cada sorriso, sem vocês duas não teria sido o mesmo.

À senhora Zelma pelo cuidado dos animais e o carinho infinito.

Agradeço aos meus amigos que mesmo longe e com toda a correria e ausências, me apoiaram em todos os momentos, em especial a Laura Pulido, obrigada.

À CAPES pela bolsa e à UFRGS pelos auxílios financeiros.

E por último agradeço aos ratinhos porque mesmo com as dores de cabeça, os momentos de frustração e desespero, são os que finalmente me permitiram fazer este trabalho e reiterar o amor que tenho pela ciência.

## RESUMO

O sistema endocanabinóide tem um papel modulador sobre células excitatórias e inibitórias em diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC), em particular naquelas envolvidas na formação, consolidação e evocação de novas memórias (Davies, Pertwee, and Riedel 2002). Os estudos mostram que a principal função dos endocanabinóides no encéfalo é a supressão da liberação de neurotransmissores como GABA e glutamato por meio da sinalização mediante mensageiros retrógrados (Fattore, Fadda, and Fratta 2007; Iversen 2003). O receptor canabinóides tipo 1 (CB1) apresenta uma alta densidade na área CA1 do hipocampo (Ashton et al. 2004; Hoffman, Riegel, and Lupica 2003). Poucos estudos têm sido realizados estudando o efeito da inibição do sistema endocanabinóide na evocação de memórias aversivas, e pouco se sabe acerca de seu efeito na evocação de memórias previamente extintas. Neste trabalho, investigamos o curso temporal dos efeitos do agonista inverso seletivo para o receptor CB1, AM251, sobre a evocação de memórias aversivas de longo prazo formadas ou extintas recente ou remotamente, bem como investigaremos os mecanismos subjacentes a eles. Assim, ratos Wistar foram treinados no condicionamento aversivo ao contexto (CAC), e alguns foram submetidos à extinção da memória e testados em três momentos diferentes. O AM251 CB1 foi administrado sempre 15 minutos antes do teste. Nossos resultados demonstraram diferentes efeitos dependentes do tempo do AM251 na evocação da memória. A infusão intra-hipocampal do AM251 antes de sessão de teste melhorou a evocação da memória de medo quando foi testada 72 horas após a sessão de treino, enquanto que a mesma dose de AM251 prejudicou a evocação da memória quando foi testada 15 dias após a sessão de treino. É importante ressaltar que quando o teste foi 30 dias após a sessão de treino o AM251 melhorou a evocação da memória. Também

encontramos que quando a memória foi testada 24 horas após a sessão de extinção, o AM251 bloqueou a evocação da memória de extinção, mas, quando a sessão de extinção foi realizada 14 ou 30 dias após a sessão de treino e testada 24 horas depois, o AM251 não teve efeito. Desta forma, o efeito farmacológico da AM251 pode mudar com a extinção da memória e seu efeito é dependente do tempo. Acredita-se que o efeito oposto do AM251 sobre a evocação da memória, em diferentes momentos no tempo, é o resultado de alterações na expressão e localização do receptor CB1 em neurónios excitatórios piramidais, em interneurónios GABAérgicos ou em ambos os sistemas na região CA1 do hipocampo. Estudos de imunistoquímica estão sendo realizados para avaliar as mudanças no número e localização dos receptores canabinóides CB1 em memórias recentes e remotas e assim fornecer uma explicação aos efeitos contraditórios na evocação da memória observados neste trabalho.

## ABSTRACT

Extensive evidence indicates that the endocannabinoid system plays a modulatory role on excitatory and inhibitory neural activity in central and peripheral nervous system. The CB1 cannabinoid receptors have a high concentration in important areas related to memory modulation, such as the hippocampus-responsible for the contextual component, and infralimbic cortex-involved in the maintenance of extinction. Few studies have been conducted studying the effect of inhibition of the endocannabinoid system in the recall of aversive memories, and little is known about its effect on retrieval of memories previously extinct. Here we have studied the effects of microinfusion of the CB1 receptor antagonist AM251 into the dorsal hippocampus upon the retrieval process of an aversive memory. Accordingly, Wistar rats were trained in contextual fear conditioning (CFC), in some experiments underwent memory extinction and were tested at 3 different time points. The CB1 antagonist AM251 was administered 15 minutes prior to the retrieval session. Our results showed different time-dependent effects of the AM251 on memory retrieval. Intra-hippocampal infusions of AM251 shortly before testing session improved retrieval of contextual fear memory when it was tested 72 hours after training, whereas the same dose of AM251 impaired retrieval of the memory when it was tested 15 days after training session. Importantly, when the testing session was 30 days after the training session, the AM251 improved the retrieval of the memory. We also found that, when memory was tested 24 hours after the extinction session, the AM251 blocked the retrieval of the extinction memory, but when the extinction session was performed 14 or 30 days after the training session and tested 24 hours later, the AM251 had no effect. Thus, the pharmacological effect of AM251 can change with the extinction of memory and its effect is time dependent. It is



believed that the opposite effect of AM251 on memory retrieval at different moments in time, are the result of changes in the expression and localization of the CB1 receptor in excitatory pyramidal neurons, GABAergic interneurons or both systems in the CA1 region of the hippocampus. Immunohistochemistry studies are being done to evaluate the changes in the number and location of CB1 cannabinoid receptors in different moments in time to provide an explanation for the contradictory effects observed on memory retrieval.

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG 2	Araquidonoil-glicerol
AEA	Araquidonoil etanolamida ou Anandamida
AM251	N-(Piperidin-1-yl) -5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazole-3-carboxamida
AMPA	Receptor ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BDNF	Da sigla em inglês para Fator neurotrófico derivado do encéfalo ( <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
BLA	Da sigla em inglês para Amígdala basolateral ( <i>Basolateral amygdala</i> )
CA1	Corno de Amon 1
CAC	Condicionamento aversivo ao contexto
CAMKII	Da sigla em inglês para Cinase cálcio-calmodulina tipo II ( <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase I</i> )
CaN	Calcineurina fosfatase
CB1	Da sigla em inglês para Receptor canabinóide tipo 1 ( <i>Cannabinoid receptor type 1</i> )
CB2	Da sigla em inglês para Receptor canabinóide tipo 2 ( <i>Cannabinoid receptor type 2</i> )
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
FAAH	Da sigla em inglês para ácido graxo amina hidroxilase ( <i>Fatty acid amide hydrolase</i> )

GABA	Da sigla em inglês para Ácido $\gamma$ – aminobutírico ( <i>Gamma-AminoButyric Acid</i> )
IL	Infralímbico
MAPK	Da sigla em inglês para Proteínas cinases ativados por mitógenos ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MGL	Lipase monoacilglicerol
mPFC	Da sigla em inglês para Córtex pré-frontal medial ( <i>medial prefrontal cortex</i> )
NF- $\kappa\beta$	Da sigla em inglês para Fator de Transcrição kappa $\beta$ ( <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
PFC	Da sigla em inglês para Córtex pré-frontal ( <i>Prefrontal cortex</i> )
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase dependente de cálcio
PL	Pre-límbico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TrKB	Tropomyosin related kinase B
$\Delta^9$ THC	$\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1. <i>Tipos de Memórias .....</i>	14
1.2. <i>Fases da memória.....</i>	17
1.2.1. <i>Consolidação .....</i>	19
1.2.2. <i>Evocação da memória.....</i>	20
1.2.3. <i>Reconsolidação .....</i>	22
1.2.4. <i>Extinção .....</i>	24
1.3. <i>Considerações estruturais da extinção .....</i>	25
1.4. <i>Considerações moleculares da extinção da memória .....</i>	26
1.5. <i>Cannabis sativa e sistema canabinóide.....</i>	29
1.6. <i>Sistema canabinóide e memória .....</i>	36
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
2.1. <i>Objetivo Geral.....</i>	41
2.2. <i>Objetivos Específicos.....</i>	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
3.1. <i>Animais .....</i>	42
3.2. <i>Procedimentos cirúrgicos.....</i>	42
3.2.1. <i>Anestesia.....</i>	42
3.2.2. <i>Coordenadas da estrutura, craniotomia e colocação das cânulas. ....</i>	43
3.3. <i>Pré e Pós – operatório .....</i>	45
3.4. <i>Tratamento Farmacológico – Infusão intracerebral .....</i>	45
3.5. <i>Controle Histológico das Cirurgias .....</i>	46
3.6. <i>Tarefas comportamentais .....</i>	47
3.7. <i>Análise estatística.....</i>	49
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*O acervo de nossas memórias faz com que cada um de nós seja o que é: um indivíduo, um ser para o qual não existe outro idêntico (Izquierdo, 2011).*

Um dos fenômenos mais notáveis e fascinantes do comportamento animal é a capacidade de adquirir novas informações a partir da experiência, modificar o comportamento de acordo com isso, e manter essas informações ao longo do tempo para ser evocadas quando for necessário.

Podemos definir “Memória” como a capacidade do nosso cérebro de adquirir, formar, conservar e evocar informações (Izquierdo, 2011), diferenciando sempre o aprendizado, o processo pelo qual o indivíduo adquire conhecimentos, da memória, o processo que codifica, armazena e posteriormente evoca as informações aprendidas através da experiência (Tulving, 1987; Kandel et al., 2000).

O passado, nossas memórias, nossos esquecimentos, não só nos dizem quem somos como também nos permitem projetar o futuro; isto é, nos dizem quem poderemos ser (Izquierdo, 2011). As memórias podem ser manipuladas farmacologicamente permitindo seu estudo e com isso um maior entendimento. O conhecimento que temos agora acerca dos mecanismos fisiológicos e moleculares da memória é fruto de anos de pesquisas, de perguntas, hipóteses, erros e respostas. Uma grande quantidade de sistemas de neurotransmissores e regiões encefálicas tem sido relacionadas com os diversos tipos de memória e suas fases, tentando entender o fenômeno desde todos os âmbitos possíveis, desde a influência do ambiente até o que acontece nos genes. Esse conhecimento permitiu a relação do sistema canabinóides e a memória.

Os estudos do sistema canabinóide têm aumentado bastante em número na última década, sendo uma das áreas que mais crescem na psicofarmacologia, mesmo assim ainda não se alcançou uma compreensão completa dos vários papéis dos endocanabinóides. A partir da descoberta dos receptores canabinóides e seus ligantes endógenos, no início da década de 1990, o interesse por esse sistema e seu entendimento aumento com o decorrer dos anos. De 2000 a 2010, cerca de 46% dos trabalhos neste campo foram dedicados ao estudo dos canabinóides, 31% para o estudo da *Cannabis*, e 23% para o estudo dos endocanabinóides (Pamplona and Takahashi 2012).

A ampla distribuição de receptores canabinóides de tipo 1 (CB1) no sistema nervoso central, em especial em áreas relacionadas com a modulação da memória, em conjunto com o seu papel modulador em vários sistemas de neurotransmissores (Kano et al. 2009), torna difícil a pesquisa sobre os mecanismos subjacentes ao efeito bifásico sobre as diferentes fases da memória.

### **1.1. Tipos de Memórias**

As memórias podem ser classificadas de acordo a diferentes critérios, seja por seu tempo de duração, conteúdo, funcionalidade, natureza e motivação (memórias apetitivas/recompensa e memórias aversivas).

De acordo com a duração, as memórias podem ser classificadas em memória de *trabalho*, que armazena informações por um curtíssimo período de tempo (de segundos a minutos), a fim de compará-la com as memórias/registros preexistentes, e, com base nisso, decidir qual comportamento expressar (Quillfeldt, 2005). Um exemplo é quando memorizamos um número de telefone e o esquecemos logo após discá-lo. A memória

de trabalho diferencia-se dos outros tipos de memórias em que ela não deixa traços neuroquímicos ou comportamentais duradouros e não produz arquivos no encéfalo (Izquierdo, 2011). Este tipo de memória é processada fundamentalmente pelo córtex frontal (córtex anterolateral e orbitofrontal) e suas conexões através do córtex entorrinal com a amígdala basolateral e o hipocampo (Izquierdo et al., 2002; Izquierdo, 2011).

As memórias de *curta duração* perduram por períodos maiores que a memória de trabalho, de minutos até cerca de 6 horas, mantendo as informações disponíveis para serem evocadas enquanto uma memória de longa duração ainda não foi formada. Finalmente, as memórias de *longa duração* perduram por dias, meses e anos. Aquelas memórias que podem durar até décadas, como aquelas da nossa infância, podem ser classificadas como memórias remotas (Nadel et al. 2000).

O tempo em que a memória vai persistir e a sua força vai depender da importância atribuída às informações/eventos, assim como do nível de atenção, concentração, estado de alerta, a influência de fármacos e as emoções envolvidas no momento da aquisição (Quevedo et al. 2003).

Na classificação pelo conteúdo, estão as memórias declarativas/explicítas e as memórias procedurais/implícitas (Squire, Cohen, and Zouounis 1984). As memórias *declarativas ou explícitas*, assim chamadas pelo fato de poderem ser verbalizadas (nos humanos), referem-se a memórias de fatos ou conhecimento (Memória semântica, memórias de fatos não relacionados com uma experiência – de índole geral) ou eventos (Memórias episódicas que codificam informações de eventos nos quais o indivíduo participou ou que vivenciou) (Quillfeldt, 2005; Izquierdo, 2011). O que respondemos a perguntas como “o que é um gato?”, “qual o perfume das flores?”, ou “qual é a capital do Brasil?” são exemplos de memórias semânticas; pelo contrário, uma lembrança

específica de algum evento com o seu gato, o lugar onde aconteceu, o nome e rosto das pessoas que estavam ali, são exemplos de memórias episódicas ou autobiográficas.

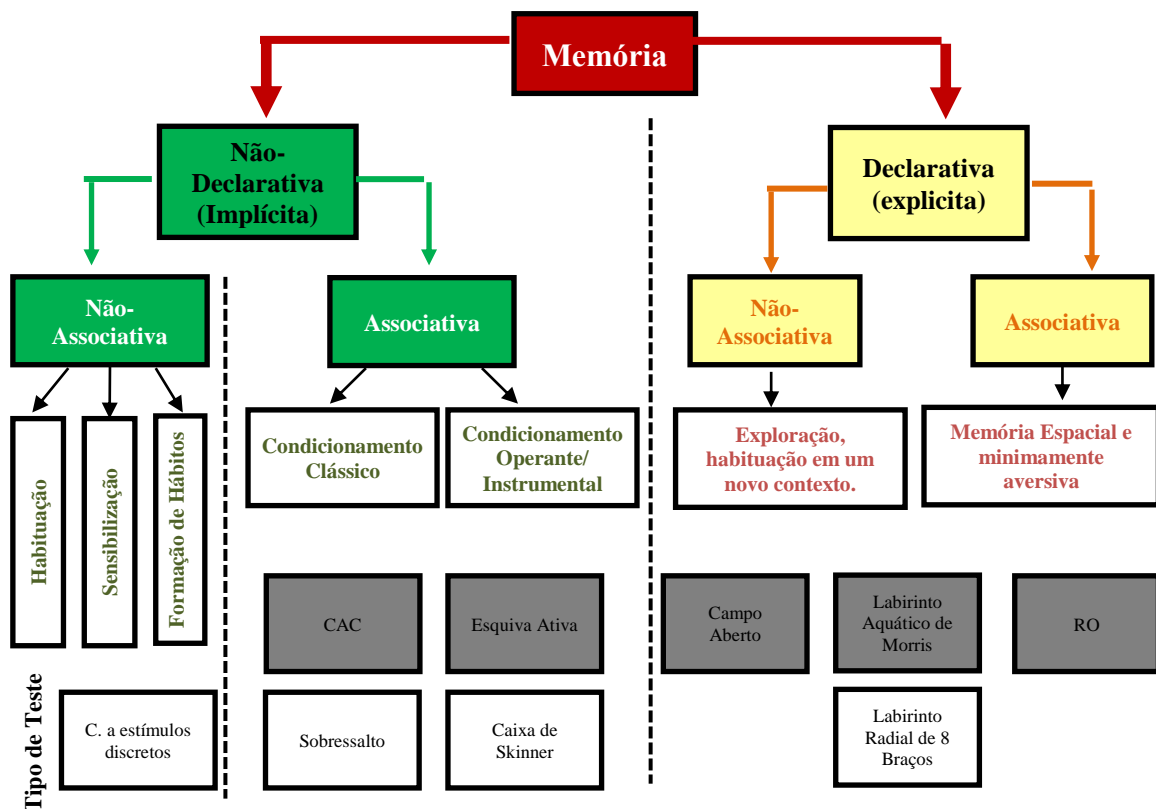
Por outro lado as memórias *implícitas ou procedurais*, também chamadas de não-declarativas, referem-se a memórias de habilidades motoras, sensoriais e hábitos, por exemplo, tarefas como andar de bicicleta, dirigir um carro, correr ou praticar um esporte como a natação. Estas memórias são em geral adquiridas de maneira implícita e não podem ser evocadas de maneira consciente, ou seja, elas podem ser recuperadas sem a necessidade de prestar atenção nelas, e são dificilmente verbalizadas, sendo a sua avaliação por meio da demonstração geralmente. Por exemplo, é mais fácil para um nadador mostrar como nada em estilo livre, que explicar verbalmente a complexidade de cada um dos movimentos que faz, e, no momento de começar o movimento a memória será evocada automaticamente sem precisar estar prestando atenção em cada batimento dos braços.

As memórias declarativas requerem o funcionamento correto de certas estruturas encefálicas para a aquisição, consolidação e evocação. Assim as memórias declarativas são dirigidas fundamentalmente por duas áreas intercomunicadas do lobo temporal: o hipocampo (principalmente a formação hipocampal) (Moscovitch et al. 2005) e o córtex entorrinal, ambos em comunicação com os núcleos basal e lateral da amígdala, modulando-os de acordo com informações emocionais (Ledoux 2000).

As memórias procedurais estão a cargo do núcleo caudado (inervado pela substância negra) e o cerebelo (Squire, 2009). Estas memórias sofrem pouca modulação pelas emoções ou estados de ânimo (Izquierdo, 2011) e diferem das declarativas também, por serem formadas lentamente, mas resistentes ao esquecimento (Tulving 1987).



De acordo com a sua natureza, as memórias também podem ser classificadas em memórias não associativas e memórias associativas, tarefas comportamentais que requerem associações entre estímulos e respostas, ou entre dois estímulos. Através deste tipo de memórias os animais aprendem a prever eventos futuros, a fim de expressar um comportamento antecipado adequado (Quillfeldt, 2005) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Taxonomia simplificada dos tipos de memória segundo a sua natureza associativa ou não associativa. Esta figura não faz referência ao tempo, apesar de ser obviamente aplicável a memória de longo prazo, à memória de curto prazo e à memória trabalho. CAC= Condicionamento aversivo ao contexto; RO: Reconhecimento de objetos. Adaptado de Quillfeldt JA, 2005.

## 1.2. Fases da memória

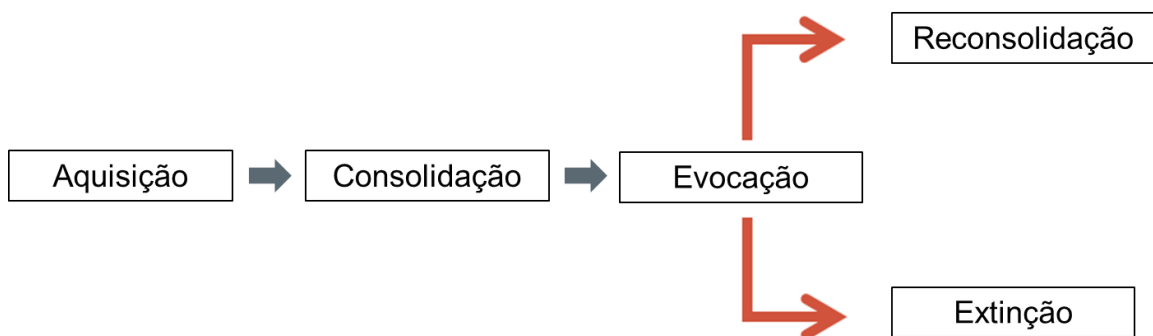
Novos aprendizados podem, ou não, ser armazenados de forma permanente, e isso vai depender de vários fatores tanto internos como externos, não todas as informações que são adquiridas se tornam memórias duradouras. Assim, as memórias

não são adquiridas imediatamente na sua forma final. Durante os primeiros minutos ou horas após sua aquisição, as memórias são suscetíveis à interferência pelo aprendizado de outras informações, por qualquer tipo de drogas, traumatismos craneanos, ou tratamentos como o eletrochoque convulsivo (Izquierdo, 1989; Mcgaugh & Alpern, 1966; McGaugh, 2000; Nader & Hardt, 2009).

Desde a teoria da consolidação da memória, proposta por Müller e Pilzecker em 1900, que afirma que os traços de memória são inicialmente instáveis e tornam-se estáveis ao longo do tempo (Müller and Pilzecker, 1900), as pesquisas têm avançado significativamente no entendimento da psicobiologia e neurofarmacologia da memória (Dudai 2004; McGaugh 2000).

A memória passa por três fases iniciais que podem ser divididas em aquisição, consolidação ou armazenamento e evocação (Izquierdo, 2011) (fig. 2).

A **aquisição** refere-se ao processo em que as informações provenientes da experiência são encaminhadas aos sistemas neurais onde esses estímulos serão codificados em um tipo de memória específica. Durante esse período de tempo, acontece a seleção dos estímulos que serão armazenados por um período de tempo, sejam segundo, dias ou até anos. Quanto maior a atenção durante a aquisição, maior a probabilidade de esse evento ser armazenado de forma permanente na memória (Kentros et al. 2004).



**Fig. 2.** Fases da memória para uma tarefa com uma única sessão de treino.

### 1.2.1. Consolidação

A consolidação é definida como o processo de estabilização, pós-aquisição do traço de memória recém-adquirido (inicialmente lábil, no qual as memórias são vulneráveis a interferências ou prejuízos) que leva ao armazenamento duradouro dessas memórias, deixando-as em uma forma estável e dificilmente sensível a interferências (Dudai, 2002, 2004; Glickman, 1961; Ji et al. 2003; Mcgaugh & Alpern, 1966; Nader & Hardt, 2009).

Ribot, psicólogo francês, foi o primeiro a sugerir que as memórias podem ser processadas ou gradualmente reorganizadas ao longo do tempo, o chamado gradiente de Ribot (Ribot, 1882). Estudos clássicos em pacientes com lesões no lobo temporal medial (Penfield and Milner 1958; Scoville and Milner 1957) forneceram a primeira evidência de que danos no hipocampo afetam principalmente memórias recentes e não remotas. Demonstrando que o hipocampo funciona como um armazenamento temporário das novas informações, porém, o armazenamento permanente depende de uma rede cortical amplamente distribuída (Frankland & Bontempi, 2005; McClelland, et al. 1995; Squire & Alvarez, 1995).

O termo consolidação é usado para descrever dois processos: a *consolidação sináptica* ou celular, rápida, que faz referencia às mudanças moleculares e celulares que ocorrem logo após a formação da memória e duram não mais do que algumas horas a alguns dias em regiões particulares do encéfalo envolvidas na aquisição e processamento inicial de novas informações (Izquierdo et al., 1997; Medina et al., 2008). Durante essa fase são estabilizadas as alterações na conectividade sináptica em circuitos localizados do hipocampo, como o crescimento de novas conexões sinápticas,

bem como a reestruturação das já existentes (Dudai 2004; Frankland and Bontempi 2005), responsáveis pela manutenção da memória.

Por outro lado a *consolidação sistêmica*, um processo mais lento/prolongado, refere-se à reorganização das regiões do encéfalo que suportam a memória, em que uma memória de longa duração dependente do hipocampo torna-se (ao longo dos anos em seres humanos e ao longo de semanas em roedores) “independente” dele (Frankland and Bontempi 2005; Squire and Alvarez 1995), envolvendo a participação das regiões neocorticais e algumas interações com as estruturas do lobo temporal medial que reorganizam o material recentemente aprendido (Dudai 2004; Medina et al. 2008). O processo pode durar de dias a anos, dependendo do sistema de memória, tarefa e da pessoa ou animal (Dudai, 2012).

A ativação dos receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA e metabotrópicos, o aumento da entrada de cálcio às células e a ativação subsequente de várias proteínas cinases, a ativação de fatores de transcrição, e as mudanças resultantes na expressão gênica durante períodos de tempo distintos após aprendizagem, são processos-chave na consolidação (Alberini 2009; de la Fuente et al., 2011; Izquierdo 2011).

### **1.2.2. Evocação da memória**

A evocação da memória é um processo muito rápido no qual um traço de memória previamente adquirida é reativado por pistas externas, como a reexposição ao contexto de formação, ou autogeradas (Cammarota et al. 2005; Gisquet-Verrier and Riccio 2012). Dependendo das condições da evocação e a força do traço original, um de dois processos antagônicos pode ser iniciado com a reativação da memória: a reconsolidação ou a extinção (Suzuki et al. 2004). Metodologicamente, o tempo de

exposição vai determinar qual dos dois processos acontecerá, quando a evocação é prolongada em ausência das contingências aprendidas, a memória pode ser extinta, e com exposições curtas aos estímulos aprendidos a memória pode ser reconsolidada (Lorenzini et al. 1993; Harris et al. 2000). Da mesma forma, quando as condições favorecem a permanência do traço, a memória é reconsolidada, e quando as condições indicam que a memória não tem razão para persistir, é extinta (Mechoulam and Parker 2013).

Desta forma, sabendo que recuperação da memória é um processo complexo através do qual a informação previamente adquirida pode ser utilizada, o que geralmente leva a uma resposta comportamental, a única forma de se verificar que uma memória existe é quando a sua evocação ocorre (James, 1890).

A evocação será melhor e mais fácil quanto mais componente dos estímulos condicionados sejam apresentados na hora do teste: é preciso recriar a memória, conclamando à ação o maior número possível de sinapses pertencentes aos estímulos condicionados dessa memória (Izquierdo, 2011).

Os mecanismos moleculares do processo de evocação de memórias de curta duração são muito menores que os da memória de longa duração. A evocação da memória de curta duração requer em CA1 receptores glutamatérgicos intactos e a ativação de receptores  $\beta$ -noradrenérgicos (sem ser imprescindíveis), e, diferente da evocação de longa duração, não requer à intervenção da proteína cinase dependente de cálcio (PKC), proteína cinase dependente de AMPc (PKA), proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) ou CaMKII. Na evocação da memória de longa duração são necessários receptores glutamatérgicos AMPA e metabotrópicos no CA1, córtex entorrinal, parietal e cíngulo anterior. A ativação desses receptores varia segundo a estrutura: AMPA e metabotrópicos em CA1 e no córtex entorrinal, AMPA, NMDA e

metabotrópicos no córtex parietal e cíngulo anterior. Também é necessária a atividade normal das vias metabólicas da PKA, PKC (isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ II) e das vias de MAPK, em forma simultânea com a ativação dos receptores glutamatérgicos (Izquierdo, 2011). Ao contrário da consolidação, a atividade da CaMKII não é necessária durante a evocação nas estruturas mencionadas.

### **1.2.3. Reconsolidação**

Durante muito tempo, mais de uma década atrás, a maioria dos estudos afirmava que a memória, depois de ser armazenada era um fenômeno estático (Dudai 2004). Foi depois de vários anos de pesquisas sobre um fenômeno agora conhecido como reconsolidação que se começou a ver a memória como um processo dinâmico de natureza flexível.

Embora a descoberta de que as memórias se tornam instáveis após reativação não seja nova (Judge and Quartermain 1982; Lewis, Misanin, and Miller 1968; Misanin, Miller, and Lewis 1968; Schneider and Sherman 1968), as condições necessárias para reativar uma memória e os mecanismos subjacentes não foram investigados até o ressurgimento dos estudos em 2000 quando Nader e colegas (2000a, 2000b) demonstraram que a memória de medo previamente consolidada podia ser prejudicada pela injeção de um inibidor da síntese proteica na amígdala basolateral (BLA), imediatamente após a reexposição dos ratos ao estímulo condicionado (EC).

A reconsolidação refere-se ao processo de consolidação que é iniciado pela reativação de uma memória previamente consolidada, período no qual a memória passa de um estado inativo para um estado ativo, tornando-se instável. Nesse período lábil, a memória é sensível a interferências ou modificações e o mesmo traço de memória pode

ser fortalecido, atualizado ou a sua precisão aumentada (De Oliveira Alvares et al. 2013). Com o tempo, essa memória se reestabiliza e entra num estado inativo, onde os tratamentos de interferência não teriam mais efeito, esta estabilização posterior seria a reconsolidação propriamente dita (Bevilaqua et al. 2008; Lewis 1979).

A consolidação e a reconsolidação compartilham diversos mecanismos similares, como a ativação de MAPK, PKA e a proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB) (Alberini 2005), porém a síntese de proteínas necessária para a reconsolidação tem processos bioquímicos diferentes daqueles apresentados durante a fase de consolidação após a aprendizagem inicial (Hoeffler et al. 2011; Lee and Hynds 2013), sugerindo que a reconsolidação não é, como o nome indica, apenas o traço de memória passando por uma consolidação adicional (Auber et al. 2013). Por exemplo, no hipocampo o fator de transcrição Zif268 está envolvido na reconsolidação, mas não na consolidação de memórias do medo contextual, onde o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é necessário para a consolidação, mas não para a reconsolidação (Lee, Everitt, and Thomas 2004). Portanto a reconsolidação não é apenas uma nova consolidação, mas sim um processo neurobiológico distinto.

Um dos processos mais característicos da reconsolidação é a degradação proteica induzida pela reativação. Molecularmente, a desestabilização é dependente da via proteolítica ubiquitina-proteassoma (Choi et al., 2010; Kaang and Choi 2011; Kaang et al., 2009), da ativação dos receptores de NMDA (especialmente a subunidade NR2) (Mamou et al., 2006), os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e os receptores CB1 (Suzuki et al. 2008).

Nem todas as memórias serão reconsolidadas cada vez que forem reativadas (Nader & Einarsson, 2010). Por exemplo, foi observado que memórias mais antigas e mais fortes são muito mais difíceis de serem labilizadas e conseqüentemente

reconsolidadas (Suzuki et al. 2004; Wang et al., 2009), demonstrando que o tempo de reativação para memórias remotas é maior que aqueles usados em memórias recentes (menos de 30 dias) (Frankland et al. 2006). Este fenômeno pode ser explicado de uma maneira adaptativa onde memórias antigas, provavelmente mais importantes para o organismo, precisam de uma estabilidade maior que as outras.

#### **1.2.4. Extinção**

Como previamente explicado, ao contrário da reconsolidação, metodologicamente, a reexposição prolongada ao contexto de treino induz a extinção da memória. Esta extinção leva à formação de uma nova memória que suprime temporariamente a memória evocada, porém sem apagá-la ou modificar o traço de memória original e, em vez disso, levam ao desenvolvimento de uma nova memória que permite o estabelecimento de circuitos inibitórios que tem por função suprimir a atividade da memória original, inibindo a resposta (Bouton 1993; Bouton et al. 2006; Fiorenza et al. 2011; Milad and Quirk 2002, 2012). O resultado é uma resposta que se recupera com o tempo, retornando espontaneamente (recuperação espontânea), quando os animais são expostos ao EC num contexto novo, separado daquele em que ocorreu a formação da extinção (renovação), ou quando a resposta de medo extinta é acionada e reaparece após a exposição ao estímulo incondicionado (Reinstalação) (Auber et al. 2013; Milad and Quirk 2012).

Desta forma, experimentalmente a extinção não apaga a associação inicial entre o EC e o estímulo incondicionado (EI), mas sim forma uma nova associação (EC- sem EI), que inibe a expressão da memória condicionada.



A terapia de extinção ou a exposição é um método amplamente utilizado na clínica no tratamento de distúrbios de ansiedade, como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) e fobias específicas, como medo de altura ou aranhas, proporcionando, um método eficaz, prático, mas não permanente de abordar as respostas emocionais patogênicas, resultando em uma diminuição progressiva do comportamento (Bouton & Bolles, 1979; Rescorla & Heth, 1975).

### **1.3. Considerações estruturais da extinção**

Uma série de estudos têm caracterizado os substratos neurais subjacentes à extinção da memória de medo, e embora uma grande variedade de estruturas cerebrais possam desempenhar um papel importante nas memórias de medo, a amígdala, o hipocampo e córtex pré-frontal medial (mPFC) têm recebido grande parte da atenção como os principais componentes do circuito do medo no encéfalo de mamíferos (Maren & Quirk, 2004; Myers & Davis, 2007; Phelps & LeDoux, 2005; Quirk & Mueller, 2008; Quirk et al., 2010).

A amígdala é importante, entre outras coisas, para a codificação do conteúdo aversivo das memórias de medo, a aquisição e a expressão da memória de extinção. Em particular, o complexo basolateral (núcleos laterais e basolateral) e as ilhas de neurônios GABAérgicos situados entre a BLA e o núcleo central da amígdala (CeA) conhecidas como as células intercaladas, são regiões críticas no processo de extinção (Myers, Carlezon, & Davis, 2011).

O hipocampo desempenha um papel fundamental no processamento associativo das informações contextuais, sendo o responsável pela codificação da informação

contextual durante o treinamento da memória de extinção e o posterior uso dessas informações para promover ou impedir a expressão da memória de extinção.

O córtex pré-frontal (PFC) assim como o hipocampo modula fortemente a atividade da amígdala, exercendo controle inibitório sobre a sua atividade, sendo um possível mecanismo de extinção (Quirk and Mueller 2008). O PFC é crucial para a recuperação/evocação e a reavaliação das memórias aversivas (Shin and Liberzon 2010).

Duas sub-regiões do mPFC, o córtex pré-límbico (PL) (similar ao córtex cingulado dorsal anterior em humanos) e o córtex infralímbico (IL) (PFC ventromedial em humanos) desempenham um papel importante na expressão e supressão do medo, respectivamente. O córtex IL é necessário para a extinção do medo, mas não para a aquisição do medo, enquanto o córtex PL é necessário para a aquisição, mas não para a extinção do medo (Sierra-Mercado et al., 2011).

#### **1.4. Considerações moleculares da extinção da memória**

Diferentes estudos mostram três sistemas de receptores/ligantes moleculares que desempenham um papel importante na extinção das respostas de medo: o receptor NMDA, o receptor TrkB e o sistema renina-angiotensina.

O receptor de NMDA foi o primeiro dos receptores de glutamato a ser relacionado com a extinção da memória e continua sendo o mais estudado. Os mecanismos dependentes desses receptores são necessários não só para a extinção senão também para a consolidação de memórias aversivas. Assim o afirmam estudos onde a administração sistêmica de antagonistas NMDA antes ou depois da sessão de extinção prejudicaram a formação e retenção da memória de extinção (Burgos-Robles et al.

2007; Chan and McNally 2009; Kelamangalath et al. 2007; Ogden et al. 2014; Sotres-Bayon et al. 2009; Sotres-Bayon, Bush, and LeDoux 2007; Storsve, McNally, and Richardson 2010). Por outro lado o aumento da função do receptor de NMDA pelo agonista parcial D-cicloserina (DCS) facilita a extinção em roedores e humanos em uma variedade de tarefas.

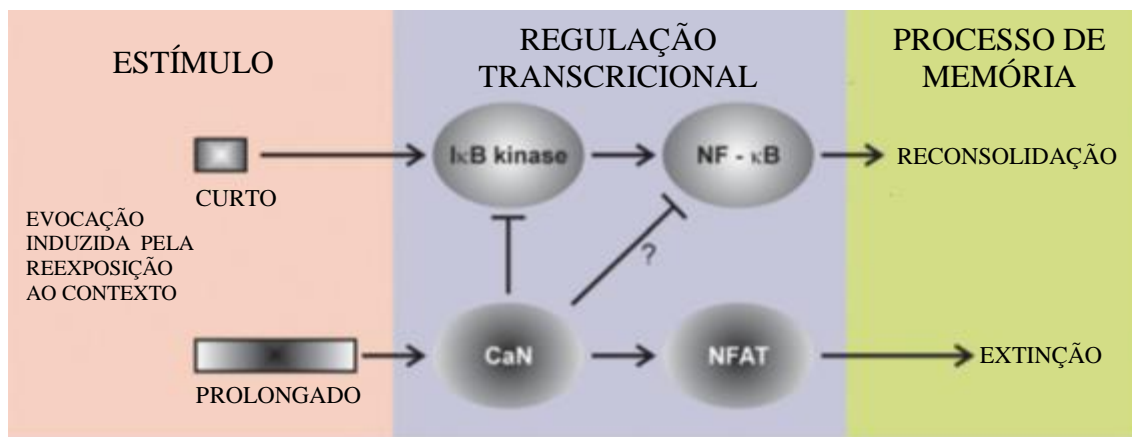
A plasticidade sináptica dependente de receptores de NMDA dentro do IL e a BLA está envolvida na codificação/aquisição e consolidação da memória de extinção, respectivamente (Myers et al., 2011). No hipocampo, a extinção do medo contextual esta associada com a diminuição da expressão das subunidades NR1, NR2A e NR2C, e o aumento da expressão de NR2B (Yamamoto et al. 2008).

O BDNF e a sua ação no receptor de TrkB desempenha um papel importante tanto na aquisição como na extinção de uma memória de medo no hipocampo, o PFC e na amígdala. Assim o mostram estudos onde a supressão do BDNF no hipocampo resulta em déficits na extinção, mas não tem nenhum efeito sobre a consolidação do medo (Heldt, Stanek, Chhatwal, & Ressler, 2007; Peters, Dieppa-Perea, Melendez, & Quirk, 2010). No PFC a infusão de BDNF no IL aumenta a extinção do medo. Em contraste, a supressão do BDNF no PL resulta em déficits na aquisição da memória, mas não afeta a sua extinção (Andero and Ressler 2012; Chhatwal et al. 2006; Rattiner et al. 2004). Finalmente, na amígdala, infusões intra-BLA do vetor lentiviral TrkB.t1 antes da sessão de extinção, causaram déficit na retenção da extinção, demonstrando a importância do TrkB na consolidação e retenção da memória de extinção.

Além de regular um número considerável de funções fisiológicas (regulação da pressão sanguínea, níveis de sódio e água no corpo), o sistema renina-angiotensina, demonstrou desempenhar um papel importante nos transtornos relacionados ao estresse e a ansiedade, além de ser crucial nos mecanismos de aprendizagem e memória como

regulador da aquisição, consolidação e evocação de memórias (Morrison and Ressler 2013; Wright et al. 2002).

Vários receptores, moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição que desencadeiam a síntese proteica estão envolvidos na reconsolidação e extinção da memória e, possivelmente, em sua interação (Auber et al. 2013). No entanto mecanismos moleculares específicos são ativados quando uma memória entra em processo de reconsolidação, ou quando começa a se estabelecer a extinção, por exemplo, uma reativação de curta duração, que induz o processo de reconsolidação, aumenta a atividade do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no hipocampo dorsal e induz a expressão dos genes alvo, por outro lado com uma reativação de longa duração, que induz a extinção da memória, a calcineurina fosfatase (CaN) é ativada, bloqueando a ativação da NF- $\kappa$ B (de la Fuente et al. 2011) (Fig. 3).



**Fig. 3.** Fatores de transcrição envolvidos na reconsolidação e na extinção da memória. Uma breve exposição ao contexto onde foi adquirida a memória, leva à ativação de cinase I $\kappa$ B que induz a translocação para o núcleo e a ativação da NF- $\kappa$ B. Por outro lado, a exposição prolongada ao contexto de formação da memória ativa a CaN que bloqueia a ativação da NF- $\kappa$ B, induzindo a translocação do NFAT e sua ativação por desfosforilação direta, levando à extinção da memória. I $\kappa$ B= proteína cinase I $\kappa$ B, CaN= Calcineurina fosfatase, NFAT= fator nuclear de células T ativadas. Adaptado de De la Fuente, 2011

O sistema canabinóide tem sido amplamente relacionado com a extinção, consolidação e evocação da memória. Por isso o sistema canabinoide se tornou um alvo

terapêutico promissor para o tratamento de transtornos emocionais relacionados ao estresse (Abush & Akirav, 2013; Fraser, 2009; Ganon-Elazar & Akirav, 2012; Hill et al., 2010; Rabinak & Phan, 2013; Rabinak et al., 2013).

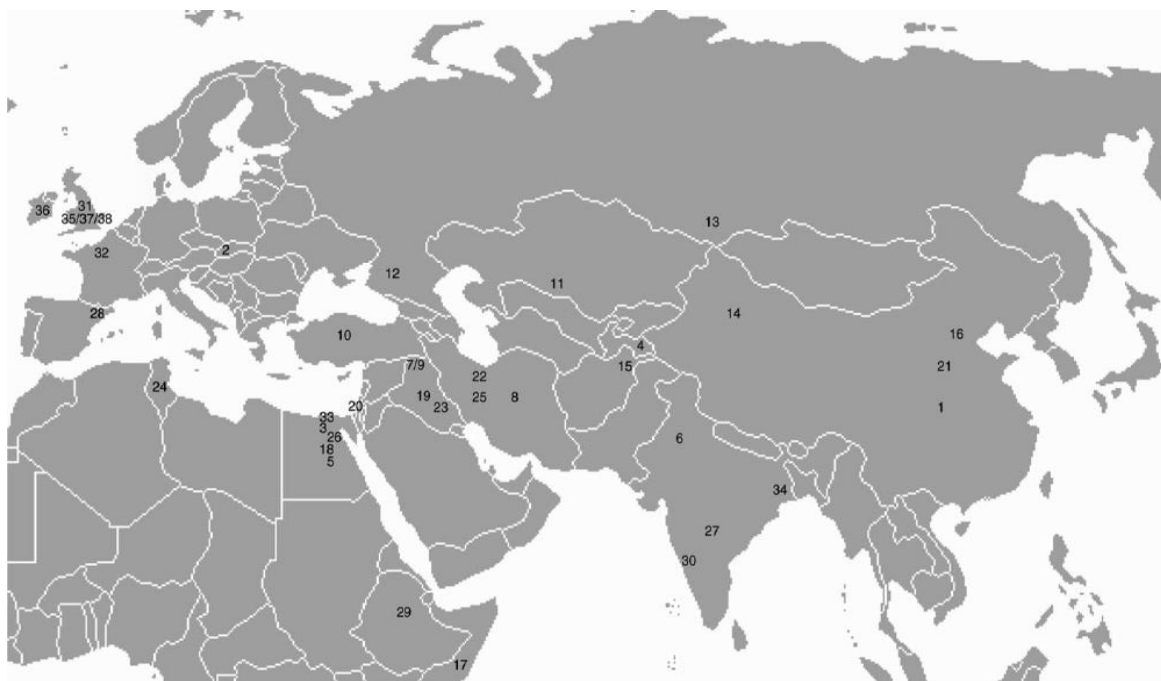
### **1.5. *Cannabis sativa* e sistema canabinóide**

As preparações da *Cannabis* têm sido utilizadas há milênios em uma infinidade de culturas, tanto por suas propriedades medicinais como por seus efeitos psicoativos (Mechoulam & Parker, 2013; Russo, 2007).

O primeiro relatório formal da *Cannabis* como medicamento surgiu na China aproximadamente 5000 anos atrás, quando ele foi recomendado para diversas doenças e sintomas, como a malária, enxaqueca, constipação, o controle da dor (p.e., dores reumáticas), obstetrícia (no momento do parto) e, misturado com vinho, como um analgésico cirúrgico (Mechoulam 1986 em Robson, 2001).

Sendo sem dúvida umas das primeiras plantas cultivadas pelo homem, e com a mais longa história, há registros de sua utilização em toda a Ásia (principalmente na Índia), Oriente Médio, África do Sul e América do Sul (Fig. 4).

A pesquisa médico-científica sobre a *Cannabis* começou há cerca de 150 anos, quando o médico W.B. O'Shaughnessy e o psiquiatra, J.J. Moreau realizaram ensaios clínicos com *Cannabis* indiana e norte-africana, respectivamente, descrevendo os efeitos psicológicos nos pacientes (a maioria deles opostos uns aos outros) e mostrando a sua utilidade em diferentes doenças neurológicas e fisiológicas (Di Marzo, 2006; Mechoulam, 2011).



- |   |  |  |
|---|--|--|
| 1. Hemp, China, 10,000 BCE                                | 14. Yanghai Tombs, Turpan, 400 BCE             | 27. Anandakanda, Southern India, 1200 CE           |
| 2. Cannabis use, Bylony Culture, Central Europe, 5000 BCE | 15. Pliny, Bactria, 1st century CE             | 28. <i>Sheshet Benveniste</i> , Barcelona, 1350 CE |
| 3. Pyramid Texts, Memphis, 2350 BCE                       | 16. Shen Nung Pen Tshao Ching, China, 150 BCE  | 29. Ethiopian pipes, 1350 CE                       |
| 4. Margiana, 2000 BCE                                     | 17. Cannabis pollen, Africa, year 0            | 30. <i>Garcia da Orta</i> , Goa, India, 1563       |
| 5. Egyptian Papyri, Thebes, 1700-1300 BCE                 | 18. Fayyum Medical Book, Fayyum, 160 CE        | 31. <i>Parkinson</i> , England, 1640               |
| 6. Atharva Veda, India, 1600 BCE                          | 19. Babylonian Talmud, 200 CE                  | 32. <i>Marcandier</i> , France, 1758               |
| 7. Sumerian/Akkadian cuneiform, Nineveh, circa 1500 BCE   | 20. Burnt cannabis, Beit Shemesh, 350 CE       | 33. <i>Aubert-Roche</i> , Alexandria, 1836         |
| 8. Zend Avesta, Persia, 750 BCE                           | 21. Taoist mystical usage, China, 570 CE       | 34. <i>O'Shaughnessy</i> , Calcutta, 1839          |
| 9. kunubu in holy rites, Kouyounjik, 680 BCE              | 22. <i>Sabur ibn Sahl</i> , Persia, 850 CE     | 35. <i>Clendinning</i> , London, 1843              |
| 10. Hemp fabric, Gordion, 650 BCE                         | 23. <i>al-Kindi</i> , Iraq, 875 CE             | 36. <i>Donovan</i> , Dublin, 1845                  |
| 11. Herodotus, Massagetae, 450 BCE                        | 24. <i>Ishak al-Israeli</i> , Kairouan, 950 CE | 37. <i>Gowers</i> , London, 1888                   |
| 12. Herodotus, Scythians, 450 BCE                         | 25. <i>al-Razi</i> , Persia, 950 CE            | 38. <i>Reynolds</i> , London, 1890 (and before)    |
| 13. Frozen Tombs, Pazyryk, 400 BCE                        | 26. <i>Maimonides</i> , Egypt 1150 CE          |  |

**Fig. 4.** Mapa pictórico da história da *Cannabis* (Russo 2007).

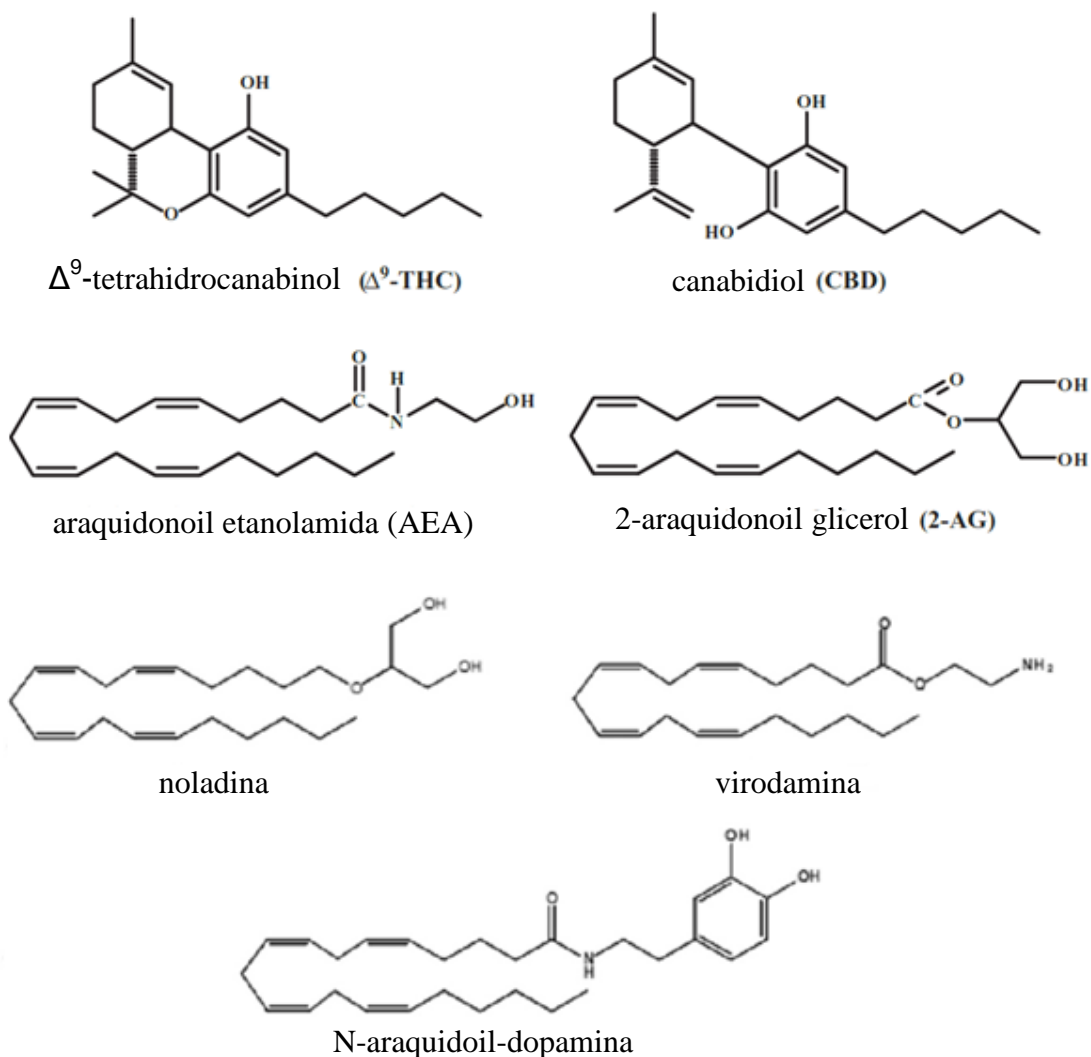
Apesar da descoberta da *Cannabis* e seus efeitos, o avanço na pesquisa demorou aproximadamente duas décadas por falta de conhecimentos sobre a sua composição química básica e farmacologia. Foi a partir da identificação do  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ THC), o constituinte psicoativo da planta em 1964 pelo Raphael Mechoulam (Gaoni and Mechoulam 1964) que a área dos canabinóides atraiu o interesse de muitos pesquisadores e consequentemente o aumento da pesquisa nesse campo.

No entanto, o mecanismo de ação da *Cannabis* permaneceu desconhecido até que o THC começou a ser sintetizado e disponibilizado para a pesquisa. Inicialmente pensava-se que, devido a sua natureza lipofílica, os canabinóides agiam através de um mecanismo não específico associado à membrana plasmática, porém a especificidade da

ação de alguns canabinóides sintéticos apontava para um mecanismo mais específico (Mechoulam & Parker, 2013). O primeiro indício de que os canabinóides poderiam atuar através de receptores surgiu quando Howlett demonstrou que canabinóides inibiam a formação de AMPc em cultura de neuroblastoma, sugerindo que esses receptores eram acoplados à proteína G (Howlett et al., 1986; Howlett 1984).

Em 1988 foi identificado o CB1 (Devane et al. 1988), localizado neuroanatomicamente (Herkenham et al. 1990) e clonado (Matsuda et al. 1990). Alguns anos após a descoberta, o primeiro ligante endógeno canabinóide [endocanabinóides (eCB)] foi extraído do encéfalo de porco (Devane et al. 1992). Este agonista endocanabinóide é a “etanolamina de ácido araquidônico” e foi nomeado *anandamida* ou *araquidonoil etanolamida* (AEA), inspirado na palavra sânscrita ananda (que significa “felicidade”). Um segundo endocanabinóide, o *2-araquidonoil-glicerol* (2-AG) foi identificado alguns anos mais tarde (Mechoulam et al. 1995). Em 1993 o receptor canabinóide de tipo 2, CB2, foi identificado no baço de ratos.

Além dos dois principais endocanabinóides AEA e 2AG, depois de alguns anos outros lipídeos foram identificados como ligantes endógenos dos receptores canabinóides, como a noladina, a virodamina (O-araquidonil-etanolamina) e a N-araquidoil-dopamina (Fig. 5). Porém, outras moléculas candidatas a ser endocanabinóides estão sendo investigadas, e o número real de endocanabinóides pode chegar a mais do que oito (Pamplona and Takahashi 2012). Há mais de 60 constituintes de *Cannabis* que foram identificados até agora, com estruturas intimamente relacionadas quimicamente e propriedades físicas parecidas, tornando a sua separação e identificação difícil.



**Fig 5.** Representação das estruturas moleculares do  $\Delta^9$ THC e cannabidiol, dos canabinóides endógenos anandamida (AEA) e 2-araquidonoil glicerol, e de outras três moléculas canabinomiméticas endógenas que foram identificadas. Adaptada de Pamplona & Takahashi, 2012.

A expressão do receptor CB1 no encéfalo é extremamente elevada, sendo um dos receptores ligados a proteína G (GPCRs) mais abundante no SNC dos mamíferos, estando presente também numa grande variedade de tecidos periféricos. As maiores densidades de receptores CB1 no encéfalo são encontradas em estruturas do sistema límbico como o hipocampo e o complexo basolateral da amígdala (em níveis baixos no núcleo central), o córtex pré-frontal, o córtex cingulado, os núcleos da base e o cerebelo, e em níveis menores na substância negra, o globo pálido e o hipotálamo.

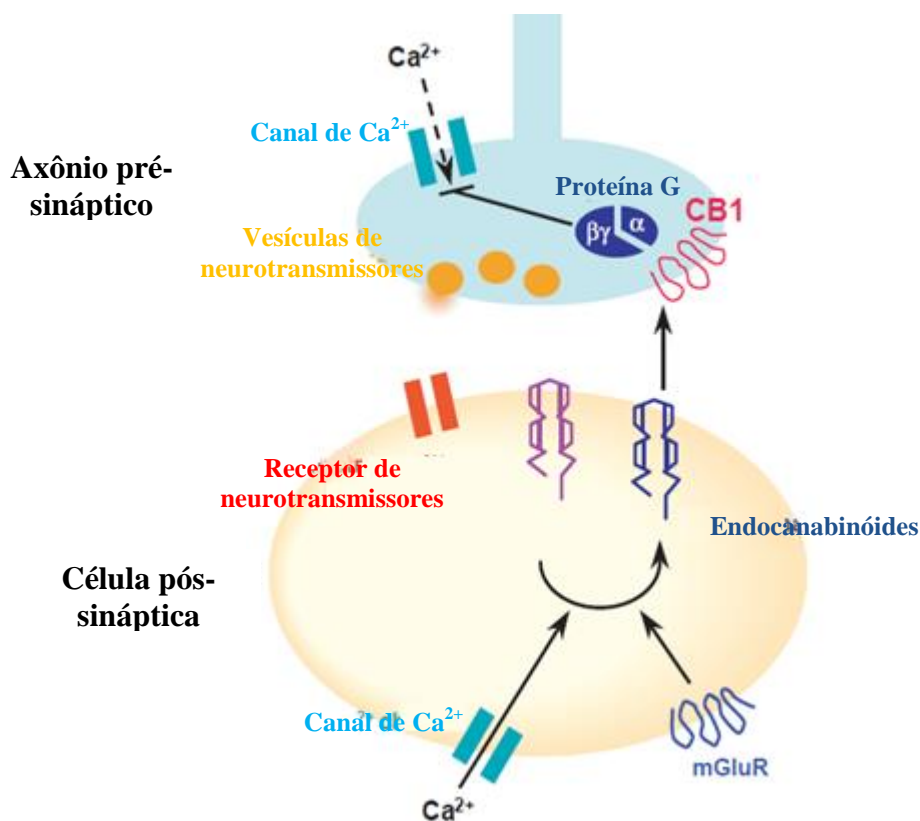


Dentro destas regiões límbicas, o receptor CB1 é expresso em níveis muito elevados em interneurônios GABAérgicos, principalmente nos neurônios em cesto que liberam colecistoquinina (Katona et al. 1999; Morozov et al., 2009) e em níveis moderados nos terminais de células piramidais glutamatérgicas (Kano et al. 2009; Kawamura et al. 2006; Takahashi and Castillo 2006).

A sinalização do receptor CB1 não é a mesma em todo o SNC, dependendo da região encefálica e do tipo celular, a expressão desses receptores pode mudar (Marsicano and Lutz 1999). A nível subcelular, a maioria dos receptores CB1 estão localizados nos terminais pré-sinápticos dos axônios neuronais, porém também podem ser encontrados em baixo nível nos dendritos axonais proximais, ou no corpo celular (Leterrier et al. 2006; Nyíri et al. 2005), diferentemente dos CB2, que são expressos principalmente nos processos dendríticos pós-sinápticos e no corpo celular (Onaivi et al. 2006).

Tanto os CB1 como os CB2 são receptores acoplados a proteínas Gi/o, as quais inibem a atividade da adenililciclase, reduzindo conseqüentemente os níveis de AMPc, ativando canais de potássio (Tipo A) e inibindo canais de cálcio dependentes de voltagem (tipo L, N, P, Q) (fig. 6) (Howlett et al. 2002). Mas diferentemente dos receptores CB1, os CB2 estão localizados principalmente no sistema nervoso periférico (SNP), sendo que recentemente se confirmou que eles também podem ser expressos (em menor quantidade que os CB1 -100 vezes menos) em neurônios e células gliais em diversas regiões encefálicas (Onaivi et al. 2006; Van Sickle et al. 2005).

Uma das principais funções do sistema endocanabinóide é a inibição da liberação de neurotransmissores, principalmente de GABA e glutamato à medida que são encontrados na sua maioria nestes neurônios, porém também são encontrados em terminais dopaminérgicos serotoninérgicos e noradrenérgicos.



**Fig 6.** Sinalização retrógrada dos endocanabinóides. A despolarização pós-sináptica abre canais  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de voltagem; o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ativa as enzimas que sintetizam os endocanabinóides a partir de precursores lipídicos. A ativação de mGluRs pós-sinápticos também pode gerar endocanabinóides, possivelmente através da ativação de fosfolipase C, gerando diacilglicerol, que é então clivado pela diacilglicerol lipase para produzir 2-AG. A ativação dos receptores CB1 pelos endocanabinóides leva a uma diminuição do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), acumulação e por conseguinte a inibição da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), o que em conjunto levará a uma inibição da liberação dos neurotransmissores. Adaptado de Wilson and Nicoll 2002.

AEA e 2-AG não são armazenados nas vesículas sinápticas, são sintetizados por fosfolipídeos da membrana que são hidrolisados por meio das vias das fosfolipase a neurotransmissor final e liberados dos neurônios pós-sinápticos a demanda dependendo da estimulação celular (atividade neuronal) (Di Marzo and Deutsch 1998). O estímulo no neurônio pós-sináptico e a excitação neuronal leva à despolarização e ao influxo de íons cálcio que estimulam várias fosfolipases, iniciando assim a síntese dos endocanabinóides, que diferentemente da maioria dos neurotransmissores, agem como mensageiros retrógrados que são liberados pelo neurônio na fenda sináptica e se difundem livremente para estimular os receptores CB1 nos terminais pré-sinápticos.

Uma característica comum de todas as vias de síntese dos endocanabinóides é a sua dependência do aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (Stella et al., 1997).

Após a sua liberação, os endocanabinóides são rapidamente removidos do espaço extracelular através de um processo de transporte de membrana, um sistema de recaptção presente em neurônios e células gliais que ainda não foi completamente caracterizado (Beltramo et al. 1997; Di Marzo and Deutsch 1998). Sugere-se a existência de uma proteína que funciona como um transportador endocanabinóide, já que se encontrou que a recaptção endocanabinóide é seletiva, dependente da temperatura, saturável, sensível à inibição farmacológica, e inteiramente compartilhada por AEA e 2-AG (Beltramo and Piomelli 2000; Bisogno et al. 2001; Hillard and Jarrahian 2000). A proteína que medeia a recaptção ainda não foi identificada.

Uma vez recaptada para o interior da célula a AEA é hidrolisada pela enzima microsomal ácido graxo amina hidroxilase (FAAH) em ácido araquidônico e etanolamina (Gaetani et al. 2009; Ueda et al. 2000). 2-AG é metabolizada principalmente em ácido araquidônico e glicerol pela lipase monoacilglicerol (MGL), mas também pode ser hidrolisado enzimaticamente, pela FAAH (Cravatt et al. 2001; Dinh et al. 2002). FAAH e MGL são amplamente expressos no encéfalo, mas enquanto a FAAH é expressa nas estruturas pós-sinápticas, MGL é geralmente associada às terminações nervosas (Cravatt et al. 1996).

Finalmente, diferentes estudos em camundongos *knockout* CB1 que tiveram algum efeito a diferentes agonistas e antagonistas canabinóides sintéticos, sugerem que pode haver um terceiro receptor canabinóides: "CB3", que seria sensível ao antagonista SR141716A (rimonabanto) e insensíveis ao antagonista AM251 (Begg et al. 2005; Brown 2007). No entanto, o receptor ainda não foi caracterizado de forma confiável.

## 1.6. Sistema canabinóide e memória

Através dos anos os estudos com endocanabinóides têm aumentado significativamente, trazendo cada vez mais entendimento sobre esse sistema e sua importância na transmissão neuronal em diferentes fenômenos como a memória. Porém, ainda não se tem um conhecimento completo devido à complexidade do sistema canabinóide e os resultados contraditórios.

Nas tabelas 2-5 estão resumidos alguns resultados das pesquisas avaliando os efeitos de canabinóides nas diferentes fases da memória e mostrando assim os resultados controversos e difíceis de explicar (Morena and Campolongo 2014).

Devido a que os canabinóides podem alterar a função motora, afetar os níveis de ansiedade e outros processos motivacionais (Cosenza et al. 2000; Järbe et al., 2002; Rodríguez de Fonseca et al. 1998; Solinas and Goldberg 2005), concluir a partir de estudos acerca da influência dos canabinóides em diferentes tarefas de memória quanto injetados pré-treino torna-se difícil, porque não se tem certeza quais efeitos são puramente cognitivos ou variáveis de confusão (por exemplo, alteração na sensibilidade à dor e/ou atividade locomotora e/ou motivação) (Morena and Campolongo 2014).

Mesmo assim, existe um consenso geral sobre o efeito prejudicial da ativação do sistema endocanabinóide sobre a aquisição de memória como mostrado na Tabela 1, onde aparecem estudos avaliando esta fase da memória em diferentes tarefas e com agonistas canabinóides como o  $\Delta^9$ -THC ou WIN. No entanto, a administração de antagonistas como o rimonabanto ou o AM251 também prejudica a aquisição da memória em diferentes tarefas e doses (Robinson et al. 2008; Tan et al. 2011). Porém outros estudos mostram que a infusão dos mesmos fármacos e AM281 melhoram (Bialuk & Winnicka, 2011; Lichtman, 2000; Lin et al., 2011) ou não

influenciam/alteram a aquisição da memória (De Oliveira Alvares et al. 2008). Corroborando desta forma, a dificuldade para chegar a uma conclusão sobre o seu efeito e fazer uma comparação entre eles devido à diferença das doses, drogas e o tipo de via de administração (intraperitoneal vs intracerebral).

**Tabela 1.** Efeitos dos canabinóides na aquisição da memória em roedores.

Droga	Dose	Administração	Animais	Paradigma	Efeito	Referências
<sup>1</sup> Agonista do receptor CB1/CB2						
WIN	2.5–5 mg/kg	i.p.	Wistar	CFC	Prejudica	Pamplona and Takahashi (2006) Schneider, Schomig, and Leweke (2008) Abush and Akirav (2010)
	1.2 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	RO	Prejudica	
	5 µg/side	Intra-CA1	Sprague-Dawley	MWM	Prejudica	
Δ <sup>9</sup> -THC	10 mg/kg	i.p.	FAAH –/–, +/- Camundongo	MWM	Prejudica	Wise et al. (2012)
	20 µg/side	Intra-DH-VH-DMT	Wistar	Labirinto radial de oito braços	Prejudica	Egashira et al. (2002)
Antagonistas CB1 (e agonistas inversos)						
AM251	50–500 ng/side	Intra-BLA	Sprague-Dawley	Medo condicionado olfativo	Prejudica	Tan et al. (2011)
Rimonabant	3 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	Labirinto radial	Melhora	Lichtman (2000)
AM281	3 mg/kg	i.p.	Lister Hooded rats	MWM	Prejudica	Robinson et al. (2008)
	2.5 mg/kg	i.p.	C57BL/6j Camundongo	CFC	Melhora	Lin et al. (2011)
	0.05 µg/rat	Intra-CA1	C57BL/6j Camundongo	CFC	Prejudica	Lin et al. (2011)
Agonistas indiretos						
AM404 (Inibidor da captação de AEA)	0.5–1 mg/kg	i.p.	Wistar	Campo aberto	Prejudica	Campolongo et al. (2012)
URB597 (Inibidor da FAAH)	1 µg/rat	Intra-CA1	C57BL/6j Camundongo	CFC	Prejudica	Lin et al. (2011)
	0.1–1.0 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	IA	Prejudica	Mazzola et al. (2009)
JZL195 (Inibidor da FAAH e MAGL)	20 mg/kg	i.p.	FAAH –/– Camundongo	MWM	Prejudica	Wise et al. (2012)
	20 mg/kg	i.p.	FAAH +/- Camundongo	MWM	Prejudica	Wise et al. (2012)
JZL184 (Inibidor da MAGL)	20–40 mg/kg	i.p.	FAAH –/– Camundongo	MWM	Prejudica	Wise et al. (2012)
	40 mg/kg	i.p.	FAAH +/- Camundongo	MWM	Prejudica	Wise et al. (2012)

AEA= anandamida; FAAH= ácido graxo amina hidroxilase; i.p.= intraperitoneal; MAGL= Lipase monoacilglicerol; CFC= condicionamento aversivo ao contexto; MWM= Labirinto aquático de Morris; IA= esQUIVA inibitória; BLA= amígdala basolateral; CeA= amígdala central; DH= Hipocampo dorsal; VH= Hipocampo ventral; DMT= Núcleos talâmico dorsomedial. Adaptado de Morena and Campolongo, 2014.

Os dados sobre os efeitos dos canabinóides na consolidação da memória não são muito alentadores. Como mostrado na tabela 2, dados conflitantes também têm sido registrados em relação aos efeitos de canabinóides sobre a consolidação da memória (Morena and Campolongo 2014), desta vez dependendo da via de administração dos fármacos. A infusão intra-BLA do agonista canabinóide WIN melhorou a consolidação da memória na esQUIVA inibitória, ao contrário o antagonista AM251 prejudicou a

consolidação da memória na mesma tarefa e no condicionamento aversivo ao contexto (Bucherelli et al. 2006; Campolongo et al. 2009). Do mesmo modo, a infusão intra-CA1 de AEA melhorou a consolidação da memória na esquiiva inibitória, porém o AM251 a prejudicou (de Oliveira Alvares et al. 2005; De Oliveira Alvares et al. 2008). Entretanto, outros estudos mostram que a infusão intra-CA1 do agonista WIN na mesma tarefa prejudica a consolidação da memória (Moshfegh et al. 2011; Zarrindast et al. 2012).

Por outro lado, quando os fármacos são administrados intraperitonealmente os dados são contraditórios. Esses efeitos podem ser devido à distribuição dos receptores canabinóides no SNC e SNP, pelo que tais fármacos podem ser degradados ou interagir com muitos sistemas de neurotransmissores em diversas regiões encefálicas.

**Tabela 2.** Efeitos dos canabinóides na consolidação da memória em roedores.

Droga	Dose	Administração	Animais	Paradigma	Efeito	Referências
<b>Agonista do receptor CB1/CB2</b>						
AEA	0.17 ng/side	Intra-CA1	Wistar	IA	Melhora	De Oliveira Alvares et al. (2008)
HU-210	0.1 mg/kg	i.p.	Wistar	CFC	Prejudica	Mackowiak et al. (2009)
WIN	1-3 mg/kg	i.p.	Long-Evans	MWM	Prejudica	Yim et al. (2008)
	0.3 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	HA- RO	Melhora	Campolongo et al. (2013)
	50 ng/side	Intra-BLA	Sprague-Dawley	IA	Melhora	Campolongo, Roozendaal, Trezza, Hauer, et al. (2009)
	0.1-0.25 µg/ rat	Intra-CeA	Wistar	IA	Prejudica	Zarrindast, Ghiasvand, Rezayof, and Ahmadi (2012)
	0.25-0.5 µg/ rat	Intra-CA1	Wistar	IA	Prejudica	Moshfegh, Babaei, Oryan, Soltani, and Zarrindast (2011)
	0.1-0.5 µg/ rat	Intra-CA1	Wistar	IA	Prejudica	Nasehi, Sahebgharani, Haeri-Rohani, and Zarrindast (2009)
	0.25-0.5 µg/ rat	Intra-CA1	Wistar	IA	Prejudica	Jamali-Raeufy et al. (2011)
	10 nmol/side	Intra-CA1	Wistar	RO	Prejudica	Clarke et al. (2008)
<b>Antagonistas CB1 (e agonistas inversos)</b>						
AM251	0.28 ng/side	Intra-BLA	Sprague-Dawley	IA	Prejudica	Campolongo, Roozendaal, Trezza, Hauer, et al. (2009)
	0.28 ng/side	Intra-BLA	Wistar	CFC	Prejudica	Bucherelli, Baldi, Mariottini, Passani, and Blandina (2006)
Rimonabant	5.5 ng/side	Intra-CA1	Wistar	IA	Prejudica	de Oliveira Alvares et al. (2005)
	1 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	Labirinto radial de 8 bracos	Melhora	Wolff and Leander (2003)
CE	1 mg/kg	i.p.	Swiss albino mice	LCE	Melhora	Takahashi, Pamplona, and Fernandes (2005)
	0.1 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	Labirinto radial	Melhora	Wise et al. (2008)
<b>Agonistas indiretos</b>						
URB597 (Inibidor da FAAH)	0.3-1 mg/kg	i.p.	Swiss albino	RO	Prejudica	Busquets-Garcia et al. (2011)
	1 mg/kg	i.p.	Swiss albino	Reconhecimento do contexto	Prejudica	Busquets-Garcia et al. (2011)

AEA= anandamida; FAAH= ácido graxo amina hidroxilase; i.p= intraperitoneal; CFC= condicionamento aversivo ao contexto; MWM= Labirinto aquático de Morris; HA= alta excitação; LCE= labirinto em cruz elevado; IA= esquiiva inibitória; BLA= amígdala basolateral. Adaptado de Morena and Campolongo, 2014.

Diferente das outras fases da memória, os estudos avaliando os efeitos dos canabinóides na evocação da memória são poucos e não existe controvérsia entre eles nas diferentes tarefas experimentais investigadas até agora (Tabela 3) (Morena and Campolongo 2014). Estudos demonstram que a infusão de agonistas canabinóides como o WIN e o  $\Delta^9$ -THC prejudica a evocação da memória em diferentes tarefas. Concluindo que os canabinóides prejudicam a evocação da memória.

**Tabela 3.** Efeitos dos canabinóides na evocação da memória em roedores.

Droga	Dose	Administração	Animais	Paradigma	Efeito	Referências
Agonista do receptor CB1/CB2						
WIN	0.3 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	HA-RO	Prejudica	<a href="#">Campolongo et al. (2013)</a>
	0.3 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	LA-RO	Melhora	<a href="#">Campolongo et al. (2013)</a>
	10-30 ng/side	Intra-CA1	Sprague-Dawley	CFC	Prejudica	<a href="#">Atsak, Hauer, et al. (2012)</a>
	0.25-0.5 µg/rat	Intra-CA1	Wistar	IA	Prejudica	<a href="#">Piri and Zarrindast (2011)</a>
	5 µg/side	Intra-VSub	Sprague-Dawley	CFC	Prejudica	<a href="#">Segev and Akirav (2011)</a>
$\Delta^9$ -THC	5.6 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	Labirinto radial	Prejudica	<a href="#">Wise, Thorpe, and Lichtman (2009)</a>
	6 mg/kg	i.p.	Wistar	L. radial de 8 braços	Prejudica	<a href="#">Mishima et al. (2001)</a>
	10 mg/kg	i.p.	C57BL/6J	MWM	Prejudica	<a href="#">Niyuhire, Varvel, et al. (2007)</a>
	10 mg/kg	i.p.	Wistar	IA	Prejudica	<a href="#">Mishima et al. (2001)</a>

i.p.= intraperitoneal; CFC= condicionamento aversivo ao contexto; MWM= Labirinto aquático de Morris;; IA= esQUIVA inibitória; HA= alta excitação; LA= Baixa excitação; VSub= Subiculum central. Adaptado de Morena and Campolongo, 2014.

Finalmente, os diferentes estudos avaliando os efeitos dos canabinóides na extinção da memória em diferentes tarefas e regiões encefálicas, mostram que a ativação do sistema canabinóide facilita a extinção das memórias aversivas (Marsicano et al., 2002; Do Monte et al. 2013; Varvel and Lichtman 2002) (Tabela 4). Estes efeitos parecem ser específicos na extinção de comportamento aversivamente motivados, como o indicam experimentos onde camundongos *knockouts* para CB1 e camundongos selvagens (*wild-type*) tratados com rimonabanto, não apresentam déficits na extinção de uma resposta operante reforçada com comida (Hölter et al. 2005; Niyuhire et al. 2007).

**Tabela 4.** Efeitos dos canabinóides na extinção da memória

Droga	Dose	Administração	Animais	Paradigma	Efeito	Referências
Agonista do receptor CB1/CB2						
WIN	0,25 mg/kg	i.p.	Wistar	CFC	Melhora	<a href="#">Pamplona et al. (2006)</a>
	5 µg/side	Intra-CA1	Sprague-Dawley	IA	Melhora	<a href="#">Abush and Akirav (2010)</a>
Antagonistas CB1 (e agonistas inversos)						
Rimonabant	1,5–5 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	FPS	Prejudica	<a href="#">Chhatwal et al. (2005)</a>
	3 mg/kg	i.p.	C57BL/6J	Medo condicionado auditivo	Prejudica	<a href="#">Marsicano et al. (2002)</a>
	3–10 mg/kg	i.p.	C57BL/6J	CFC	Prejudica	<a href="#">Suzuki et al. (2004)</a>
	3 mg/kg	i.p.	C57BL/6J	MWM	Prejudica	<a href="#">Varvel et al. (2005)</a>
	3 mg/kg	i.p.	C57BL/6J	IA	Prejudica	<a href="#">Niyuhire, Varvel, Thorpe, et al. (2007)</a>
Agonistas indiretos						
AM404 (Inibidor da captação de AEA)	10 mg/kg	i.p.	Sprague-Dawley	FPS	Melhora	<a href="#">Chhatwal et al. (2005)</a>
	1 µg/rat	i.c.v.	Wistar	CFC	Melhora	<a href="#">Bitencourt, Pamplona, and Takahashi (2008)</a>
(Inibidor da OL-135 FAAH)	30 mg/kg	i.p.	C57BL/6J	MWM	Melhora	<a href="#">Varvel et al. (2007)</a>

i.p= intraperitoneal; FAAH= ácido graxo amina hidroxilase; CFC= condicionamento aversivo ao contexto; MWM= Labirinto aquático de Morris;; IA= esQUIVA inibitória; FPS=sobresalto potenciado pelo medo. Adaptado de Morena and Campolongo, 2014.

Trabalhos mais recentes têm sugerido que os efeitos dos endocanabinóides na extinção da memória podem refletir os seus efeitos sobre a reconsolidação da memória que exige a sua reativação, como mostrado pelo Lin e colegas (2006) onde a infusão na amígdala do agonista canabinóide WIN após a sessão de reativação, bloqueou a reconsolidação da memória de medo (Lin et al., 2006).

Suzuki et al. (2008) propuseram que o sistema endocanabinóide é importante para a desestabilização das memórias aversivas no momento da reativação, isto significa que a reconsolidação ou a extinção dependem de uma cascata molecular (síntese proteica e transcrição de cAMP) que é impedida pelo bloqueio dos receptores CB1. Sugerindo desta forma que a memória de medo não pode ser alterada durante a reestabilização se ela não foi desestabilizada antes via ativação do receptor CB1 (Mechoulam & Parker, 2013).

No entanto o papel do sistema endocanabinóide na evocação da memória de extinção é desconhecido.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Determinar o efeito do antagonista AM251 na evocação de uma memória aversiva ao contexto previamente extinta ou não, em diferentes momentos após a sua consolidação.

### **2.2. Objetivos Específicos**

2.2.1. Verificar o efeito da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 sobre a evocação da memória do condicionamento aversivo ao contexto (CAC) 72 horas após o treino;

2.2.2. Verificar o efeito da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 sobre a evocação da memória do CAC 15 dias após o treino;

2.2.3. Verificar o efeito da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 sobre a evocação da memória do CAC 30 dias após o treino;

2.2.4. Verificar o efeito da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 na evocação, 48h após o treino, de uma memória de CAC previamente extinta;

2.2.5. Verificar o efeito da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 na evocação, 15 dias após o treino, de uma memória de CAC previamente extinta;

2.2.6. Verificar o efeito da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 na evocação, 30 dias após o treino, de uma memória de CAC previamente extinta.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos, com idade igual ou superior a 80 dias (290-350 g), fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos no ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC) dentro do Departamento de Biofísica, IB, e alojados em gaiolas de plexiglas (65 x 25 x 15 cm), cobertas com grades metálicas (4-5 ratos por gaiola). No assoalho, espalha-se maravalha seca e limpa, trocada a cada dois dias. A área foi climatizada (22-26 °C, umidade constante) e submetida a um ciclo de iluminação de 12h claro/12h escuro. Ração padronizada e água fresca foram fornecidas *ad libitum*. Todos os animais foram manipulados por 2 min durante 5 dias antes de começar os experimentos comportamentais.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a legislação e diretrizes de cuidado animal nacional, e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade (Projeto aprovado pelo CEUA N° 23441).

#### 3.2. Procedimentos cirúrgicos

##### 3.2.1. Anestesia

Para as cirurgias, os animais foram anestesiados com anestésico geral, Cloridato de *Cetamina 10%* (“Cetamin” fabricação Syntec) juntamente com Cloridato de *Xilazina*

2% (“Xilazin” de fabricação Syntec ou “Anasedam” de fabricação Vetbrands), um sedativo/miorrelaxante/analgésico, administrados intraperitonealmente, nas doses de 75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente.

Depois de confirmada a ausência de resposta a diferentes estímulos nociceptivos, iniciavam-se os procedimentos cirúrgicos.

### **3.2.2. Coordenadas da estrutura, craniotomia e colocação das cânulas.**

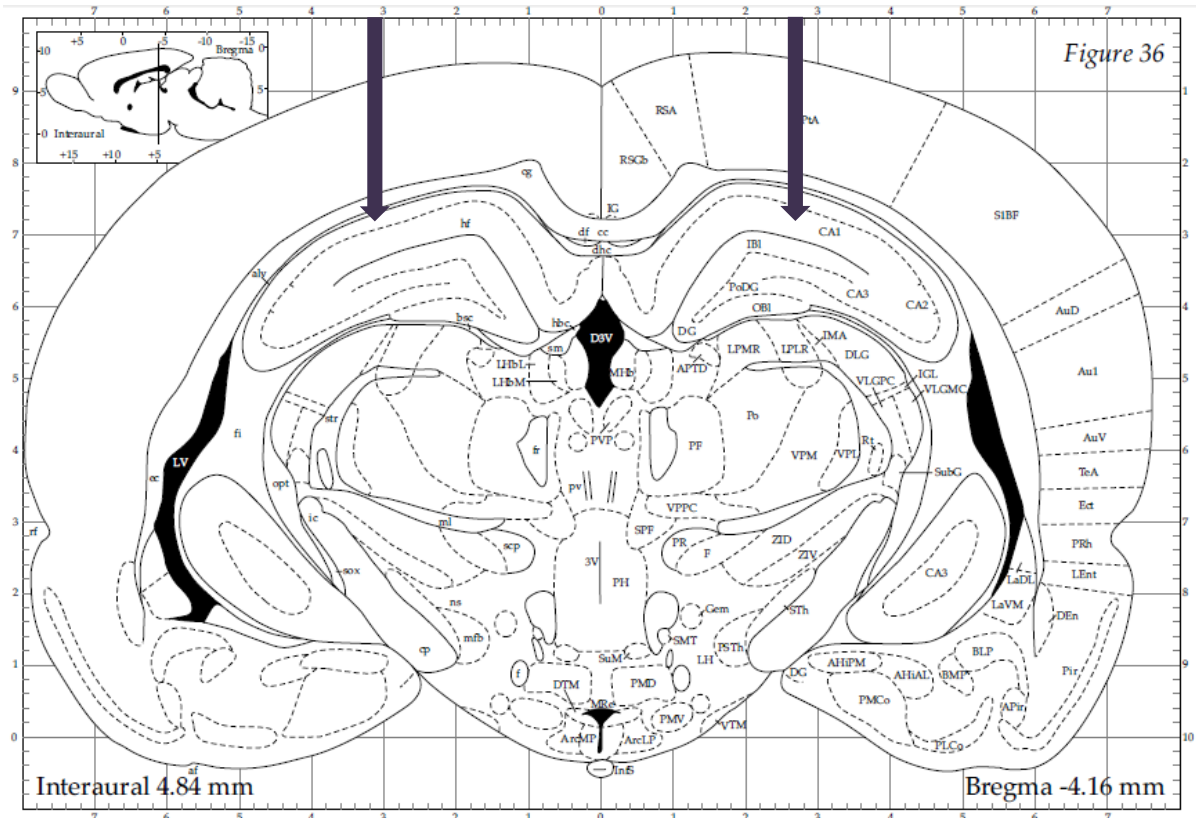
As coordenadas foram obtidas a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986), de acordo com a faixa de peso dos animais utilizados e ajustadas/confirmadas em cirurgias pilotos prévias para nossos animais.

As coordenadas finais para o Hipocampo dorsal (para a posição da ponta da cânula, 1 mm acima do verdadeiro alvo), medidas a partir do bregma, foram as seguintes (sempre com inclinação da cabeça de -0,33 cm):

- Ântero-posterior (AP – posição com relação ao bregma): - 0,40 cm
- Látero-lateral (LL - posição com relação à linha sagital):  $\pm$  0,30 cm
- Dorso-ventral (DV – Posição sobre a dura-mater): - 0,16 cm

Depois de anestesiado cada animal foi colocado em um Aparelho Estereotáxico, e a superfície de seu crânio exposta mediante incisão sagital com bisturi. Uma craniotomia bilateral foi feita com o emprego de uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas AP e LL do hipocampo dorsal. Uma cânula de aço inoxidável (manufaturada a partir de agulha com diâmetro interno de 0,7 mm, calibre ou *gauge* 27, e diâmetro interno de 0,3 mm), foi posicionada cuidadosamente através de cada um dos orifícios feitos na calota craniana e baixada lentamente até encostar-se à dura-máter - a

coordenada DV definitiva (Fig. 7). As cânulas foram fixadas nesta posição com acrílico dentário para formar uma espécie de "capacete" sobre o osso do crânio, fechando a janela óssea produzida.



**Fig. 7.** Corte coronal do encefálo de rato mostrando o Hipocampo dorsal e representando o posicionamento das cânulas (zetas). Adaptado do Atlas de Paxinos e Watson (1998).

Através das cânulas intracerebrais foram injetadas as substâncias por meio de uma agulha mais fina ("mizzy", de calibre 30), introduzida por dentro da primeira. A mizzy penetrava 1mm a mais que a cânula, evitando que a droga que sai pela ponta da "mizzy" suba por capilaridade no espaço entre esta e a cânula que a envolve, alterando a quantidade efetivamente administrada da substância na estrutura.

### **3.3. Pré e Pós – operatório**

Para reduzir o índice de infecção pós-operatório, os animais receberam, antes da cirurgia, a administração do antibiótico *Tilosina* (“Tilomai”, de fabricação Lumai) 10mg/Kg via intramuscular (i.m). No período imediatamente posterior à cirurgia, os animais foram mantidos levemente aquecidos sob uma lâmpada vermelha de 40W, durante 2h, colocada acima da gaiola, e cuidado controlado. Os animais não enxergam no comprimento de onda da luz vermelha evitando com isso interferir no ciclo claro/escuro.

### **3.4. Tratamento Farmacológico – Infusão intracerebral**

O antagonista dos receptores endocanabinóides CB1, AM251 (tocris) foi dissolvido em uma solução veiculo de 8% DMSO em 0.1M de TFS. Observações anteriores mostraram que esta concentração de DMSO não causa qualquer efeito por si só. Um volume de 0,5uL de AM251 (5,5 ng/lado) ou veiculo (DSMO 8%- grupos controle) foi lentamente infundido durante 90s. As doses de AM251 e veiculo foram selecionados com base em estudos anteriores do nosso grupo (De Oliveira Alvares et al., 2005, 2006, 2008).

A administração dos fármacos foi feita através da agulha mizzy inserida na cânula e conectada por um tubo P10 de polietileno a uma microseringa Hamilton de 10ul contendo a droga. A microseringa foi acionada (automaticamente) para administrar 0,5 uL da solução do fármaco com fluxo de 20ul/hora (90 segundos), aguardando mais 30s depois de completada a infusão antes remover a mizzy para garantir a difusão do

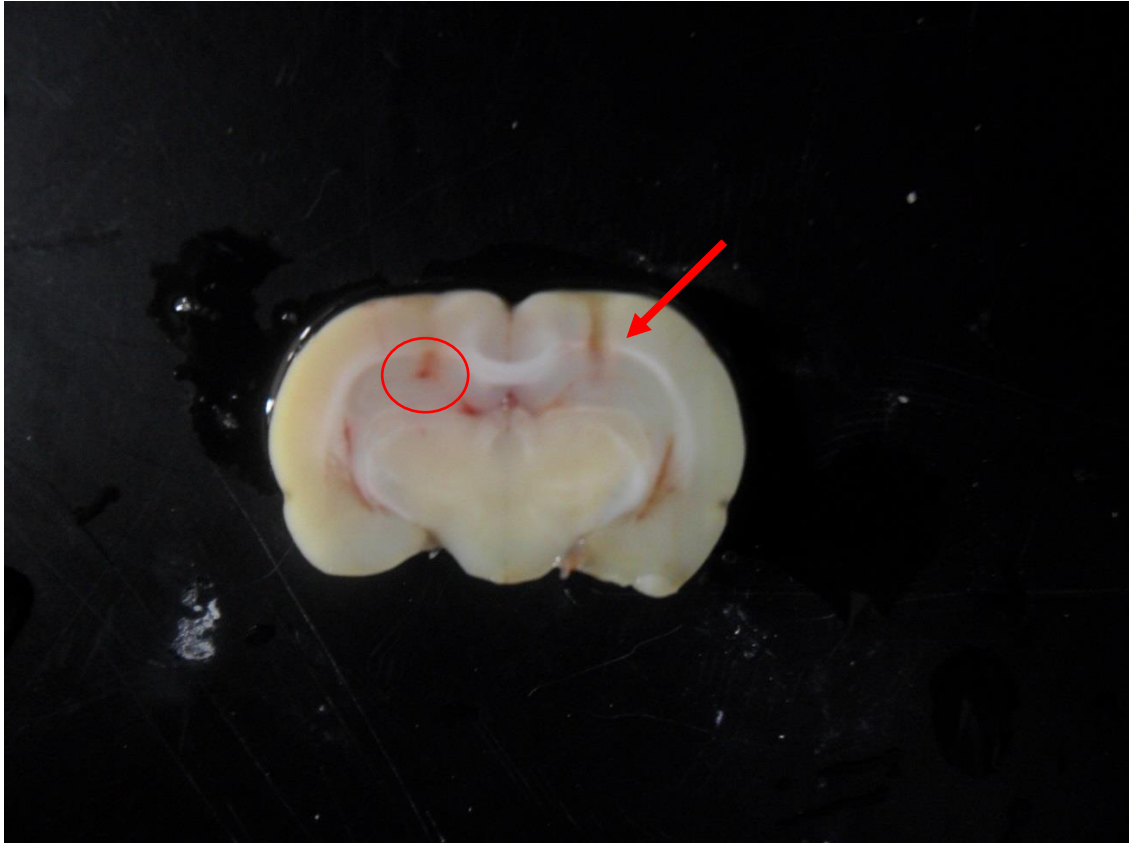
fármaco e evitar o refluxo. Esta operação foi realizada simultaneamente em ambos os lados.

Dependendo da fase da memória a ser estudada, os fármacos eram injetados em dois tempos diferentes: para avaliar o efeito na consolidação da memória, o AM251 ou veículo eram administrados imediatamente após o treino; para avaliar a evocação da memória, os fármacos eram administrados 15 minutos antes do teste.

O lapso de tempo de 15 minutos mostrou-se eficaz e está bem dentro da janela de tempo definida por outros autores que estudaram medicamentos semelhantes (como anandamida) infundidos ou 10 minutos (Barros et al., 2004) ou 30 min (Egashira, Mishima, Iwasaki, & Fujiwara, 2002).

### **3.5. Controle Histológico das Cirurgias**

Após a realização das tarefas comportamentais, os animais foram sacrificados por guilhotinamento e em seguida injetado azul de metileno em cada cânula, no mesmo volume empregado na administração das drogas em cada caso (0,5 ml). A seguir os cérebros foram dissecados e colocados em solução de formaldeído a 10 % por 72 horas. Posteriormente, os encéfalos foram analisados para conferir o posicionamento das cânulas. Apenas os animais que apresentaram o posicionamento correto das cânulas foram considerados para análise estatística (Fig. 8).



**Fig. 8.** Fotografia do corte coronal do encéfalo de rato mostrando a localização das cânulas no hipocampo dorsal.

### **3.6. Tarefas comportamentais**

Condicionamento aversivo ao contexto: A caixa de condicionamento consiste em uma caixa de acrílico (25 X 25 X 25 cm) iluminada com uma lâmpada fluorescente branca. O assoalho é uma grade de barras de aço inoxidável de 1mm de diâmetro cada, espaçadas 1cm uma das outras. A parede frontal é de vidro, através do qual se observava o animal (Fig. 9).



**Fig. 9.** Caixa do Condicionamento aversivo ao contexto.

Na sessão de condicionamento (treino), os ratos foram colocados na câmara, durante 3 minutos, e, em seguida, receberam dois choques nos pés de 0,7mA (2 segundos), separados por um intervalo de 30 segundos. Os animais foram mantidos na caixa por 30 segundos adicionais antes de voltar para as caixas moradias.

Sessão de extinção da memória: Passadas 48 horas, 14 ou 29 dias da sessão de condicionamento (dependendo do experimento), os animais eram reexpostos por 30 minutos no mesmo contexto sem receber choque (EC, sem o EI) para induzir a extinção da memória.



Sessão de teste: Os animais eram testados por 4 minutos no mesmo contexto (EC, sem o EI) 72 horas, 15 dias e 30 dias após a sessão de condicionamento, dependendo do experimento. As infusões com o AM251 intrahipocampais foram sempre feitas 15 minutos antes do teste.

O tempo de congelamento definido por Blanchard and Blanchard (1969) como imobilidade em uma posição estereotipada de agachamento, com exceção dos movimentos necessários para respiração, foi registrado por um observador experiente que não tinha conhecimento dos tratamentos, e usado como um índice de memória.

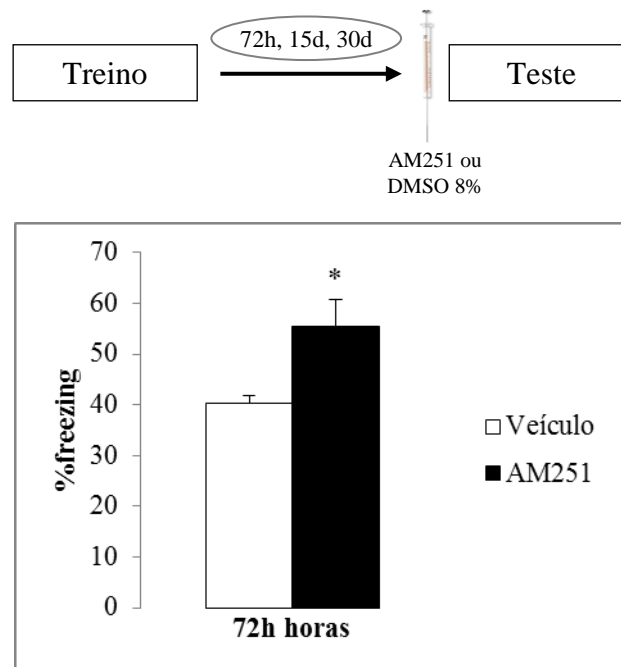
### **3.7. Análise estatística**

Em todos os experimentos foi aplicado o teste *t* independente para a comparação entre grupos. Significância fixada em  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### Experimentos 1-3: Efeitos do AM251 na evocação da memória

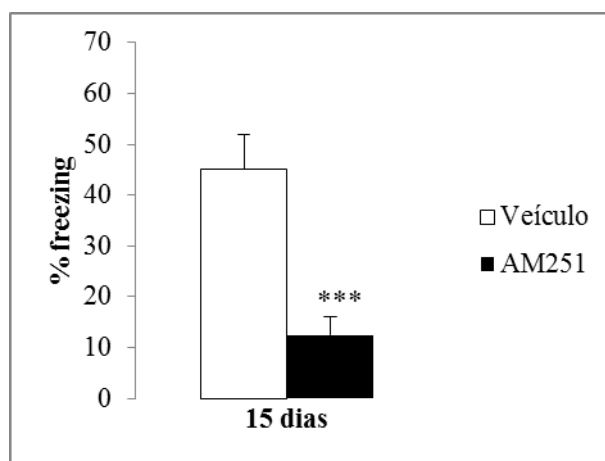
Para estudar o efeito do antagonista CB1 sobre a evocação da memória, os ratos foram submetidos ao treinamento de condicionamento aversivo ao contexto e testados 72 horas depois. Quinze minutos antes do teste os ratos foram infundidos intrahipocampalmente com o antagonista CB1 AM251. O teste *t* mostrou diferenças significativas entre o grupo veículo (DMSO 8%) (n=7) e o grupo AM251 (n=6) (P = 0,0112). Durante o teste os animais tratados com AM251 apresentaram um aumento significativo do congelamento em comparação com o grupo controle. O resultado indica que o AM251 tem um efeito facilitatório sobre a evocação memória quando injetado 15 minutos antes do teste. \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (Fig. 10).



**Figura 10. Injeção do AM251 pré-teste tem efeito facilitatório na evocação de uma memória aprendida 72 horas antes.** Os gráficos mostram a porcentagem do tempo de congelamento (% *freezing*) e estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$ , diferença significativa entre o grupo veículo e AM251 (Teste *t* de amostras independentes,  $p = 0,01$ ,  $N = 7$  e  $6$ ).

Tem sido sugerido que a memória contextual começa a ser generalizada após um período de tempo e a perder os seus detalhes (Wiltgen 2007, 2010). Aqui, perguntamos se o efeito do AM251 na evocação da mesma memória de medo, aprendida 15 dias antes, poderia ser diferente daquela testada 72 horas depois do treino. Deste modo, os ratos foram treinados e testados 15 dias depois, no mesmo contexto, com a infusão do AM251 15 minutos antes da reexposição.

Durante o teste os animais injetados previamente com AM251 apresentam uma diminuição significativa do congelamento (*freezing*) em comparação com o grupo controle. O teste *t* mostrou diferenças significativas entre o grupo veículo (DMSO 8%) (n=9) e o grupo AM251 (n=10) (P = 0,0003). O resultado indica que o AM251 tem um efeito amnésico sobre a memória aos 15 dias de ter aprendido a tarefa. \*\*\* p<0,001 comparado com o grupo controle (Fig. 11).



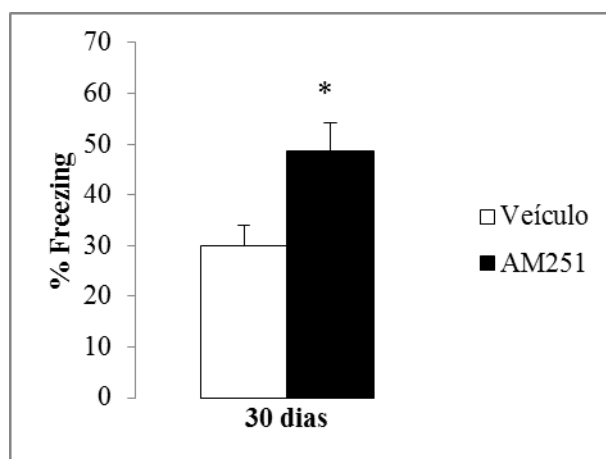
**Figura 11. Injeção de AM251 pré-teste tem efeito amnésico na evocação de uma memória aprendida 15 dias antes.** Os gráficos mostram a porcentagem do tempo de congelamento (% *freezing*) e estão expressos como média ± SEM. \*\*\*P<0,001, diferença significativa entre o grupo veículo e AM251 (Teste *t* de amostras independentes, p=0,0003, N=9 e 10).

Estudos mostram que depois de certo tempo as memórias passam a ser independentes do hipocampo e a memória é mais estável e menos vulnerável ao esquecimento (Frankland and Bontempi 2005). Isto é verificado em experimentos onde a

lesão do hipocampo dorsal 24 dias após o treino não tem efeitos na evocação da memória (Restivo et al. 2009). Nesse experimento nos perguntamos se o AM251 continuaria tendo efeito sobre a evocação da memória de medo aprendida 30 dias antes.

Para responder à pergunta, os ratos foram treinados com os mesmo parâmetros, e testados 30 dias depois com a infusão do AM251 15 minutos antes do teste.

O teste t mostrou diferenças significativas entre o grupo veículo (DMSO 8%) (n=9) e o grupo AM251 (n=9) (P = 0,0238). Durante o teste os animais tratados com AM251 apresentam um aumento significativo do congelamento (*freezing*) em comparação com o grupo controle. O resultado indica que o AM251 continua tendo efeito na evocação de uma memória previamente aprendida (30 dias), ao contrário dos dados encontrados na literatura a respeito do tempo em que a reconsolidação sistêmica ocorre. \* p<0,05 comparado com o grupo controle (Fig. 12).

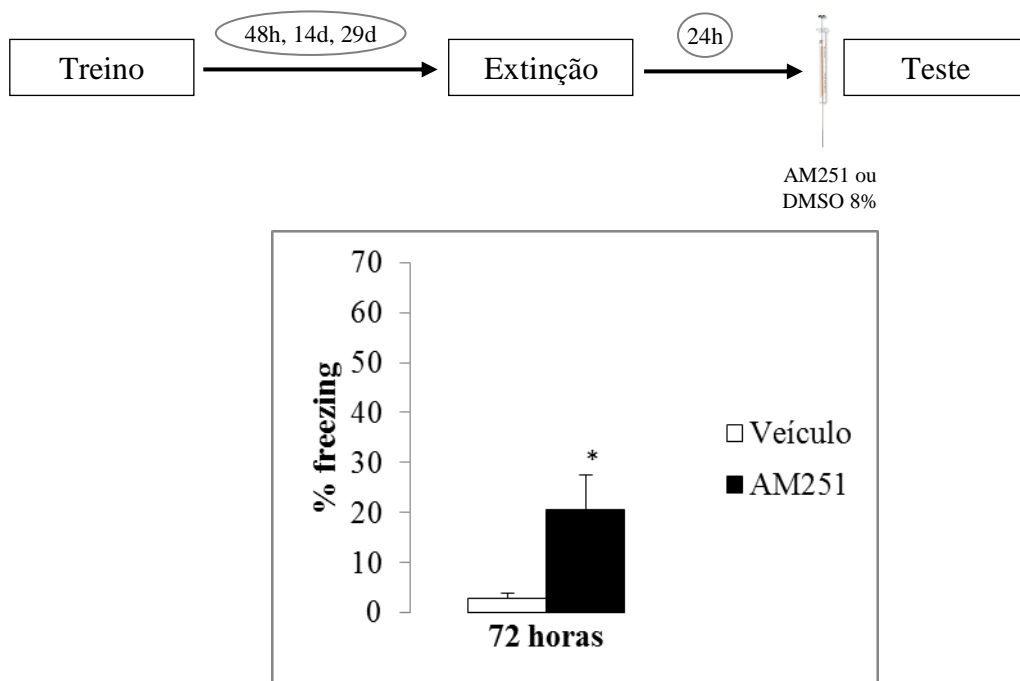


**Figura 12. Injeção de AM251 pré-teste tem efeito facilitatório na evocação de uma memória aprendida 30 dias antes.** Os gráficos mostram a porcentagem do tempo de congelamento (% *freezing*) e estão expressos como média ± SEM. \*P<0,05, diferença significativa entre o grupo veículo e AM251 (Teste t de amostras independentes, p=0,02, N=9).

#### Experimentos 4-6: Efeitos do AM251 na evocação de memórias previamente extintas

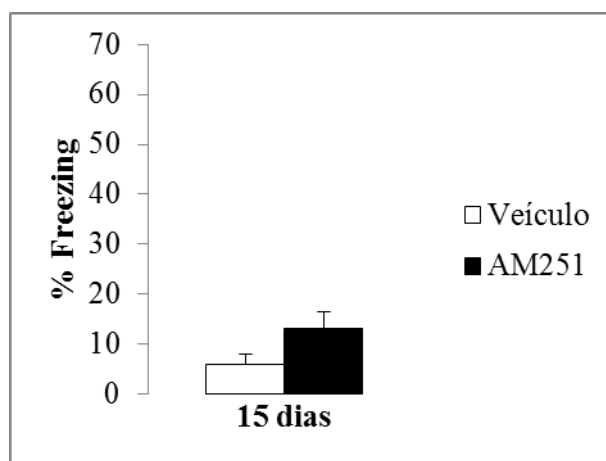
Para estudar os efeitos do AM251 sobre a evocação de uma memória previamente extinguida, os animais foram treinados e 48h depois reexpostos ao contexto por 30 minutos para induzir a extinção da memória. O teste foi realizado 24h depois e o AM251 foi infundido 15 min antes da reexposição ao contexto.

Durante o teste os animais que passaram pela sessão de extinção um dia antes do teste, e que foram injetados com AM251 apresentaram um aumento significativo do congelamento (*freezing*) em comparação com o grupo controle. O teste *t* mostrou diferenças significativas entre o grupo veículo (DMSO 8%) (n=8) e o grupo AM251 (n=7) (P = 0,0165). O resultado indica que o AM251 prejudicou a evocação da memória de extinção quando injetado 15min antes do teste. \*p<0,05 (Fig. 13).



**Figura 13. Injeção de AM251 pré-teste inibiu a evocação de uma memória previamente extinta e aprendida 72 horas.** Os gráficos mostram a porcentagem do tempo de congelamento (% *freezing*), estão expressos como média  $\pm$  SEM. \*P<0,05, diferença significativa entre o grupo veículo e AM251 (Teste *t* de amostras independentes, p=0,01, N=8 e 7).

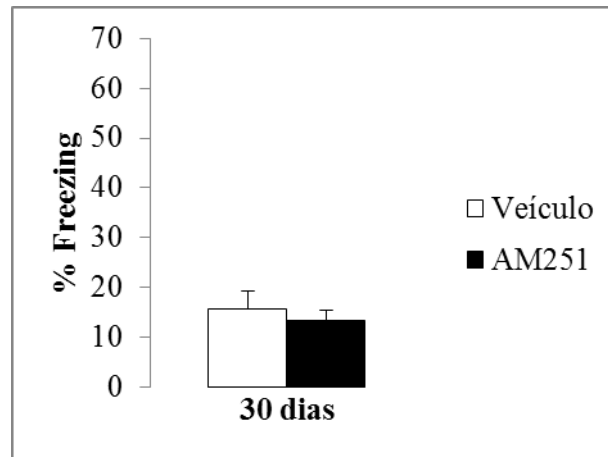
Nos animais treinados 15 dias antes, a infusão de AM251 pré-teste não teve efeito na evocação da memória no teste feito um dia após a sessão de extinção. O teste *t* não mostrou diferenças significativas entre o grupo veículo (DMSO 8%) (n=9) e o grupo AM251 (n=9) (P = 0,08195) (Fig. 14).



**Figura 14. Infusão do AM251 pré-teste não tem efeito na evocação de uma memória previamente extinta e aprendida 15 dias antes.** Os gráficos mostram a porcentagem do tempo de congelamento (% *freezing*), estão expressos como média ± SEM. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o AM251 (Teste *t* de amostras independentes,  $p > 0,05$ , N=9).

Se sabe que as memórias remotas são mais resistentes a interferência e tem maior dificuldade para serem labilizadas, precisando de mais tempo. Para verificar se uma memória de 30 dias poderia ser extinta e o AM251 ter algum efeito na sua evocação no momento do teste, animais foram treinados no CAC, 30 dias depois passaram pela sessão de extinção e 24h depois foram reexpostos ao contexto por 4 min.

A infusão de AM251 pré-teste não teve efeito na evocação da memória no teste feito um dia após a sessão de extinção. O teste *t* não mostrou diferenças significativas entre o grupo veículo (DMSO 8%) (n=9) e o grupo AM251 (n=9) (P = 0,5954) (Fig. 15)



**Figura 15. Injeção de AM251 pré-teste não tem efeito na evocação de uma memória previamente extinta e aprendida 30 dias antes.** Os gráficos mostram a porcentagem do tempo de congelamento (% *freezing*), estão expressos como média  $\pm$  SEM. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o AM251 (Teste *t* de amostras independentes,  $p > 0,05$ ,  $N=9$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a inibição dos receptores canabinóides CB1 facilitou a evocação da memória de medo quando esta é testada 72 horas após a sessão de treino. Isto é consistente com outros estudos que demonstraram que a ativação do sistema canabinóide com diferentes agonistas, como o WIN e o  $\Delta^9$ THC, prejudica a evocação da memória em diferentes tarefas (Atsak et al. 2012; Piri and Zarrindast 2011; Segev and Akirav 2011; Wegener et al., 2008).

Um resultado interessante foi que quando a memória foi testada 30 dias após o treino, o AM251 continuava facilitando a evocação da memória. No entanto, quando a memória de medo foi testada no meio deste longo intervalo, 15 dias após a sessão de treino, a infusão de AM251 prejudicou a evocação da memória.

Estudos sobre o papel do hipocampo na evocação de memórias remotas têm mostrado resultados contraditórios. A teoria padrão da consolidação sistêmica postula que o armazenamento e a recuperação da memória recente dependem do hipocampo e que, em fases posteriores, o hipocampo interage com regiões neocorticais onde as conexões cortico-corticais se desenvolvem progressivamente e, em última análise, são as únicas responsáveis pelo o armazenamento e a evocação da memória remota (Frankland and Bontempi 2005; Squire and Alvarez 1995; Squire and Bayley 2007). Por outro lado, a teoria dos múltiplos traços propõe que o hipocampo, em conjunto com regiões corticais, é necessário mesmo na evocação de memórias remotas. Nossos resultados parecem apoiar essa última teoria uma vez que a infusão do AM251 continua produzindo um efeito facilitatório na evocação, ou seja, existe a possibilidade que mesmo após 30 dias a memória ainda seja dependente do hipocampo. Isso, porém, depende de sabermos se a consolidação sistêmica *de fato* se daria já aos 30 dias nestes



animais, pois em nosso laboratório o período para a conclusão da *consolidação sistêmica* – o fim da dependência do hipocampo, com as regiões neocorticais assumindo o controle – tem-se mostrado variante, entre 26 a 40 dias, e pode bem ser o caso aqui: faltaria um experimento mais tardio, digamos, aos 45-50 dias para confirmar isso, e só então avançar para conclusões mais profundas. Estudos em andamento em nosso laboratório estão tentando estabelecer esse padrão temporal de armazenamento para determinar a função do hipocampo na evocação de memórias remotas.

O problema está no ponto intermediário, 15 dias, que, em sendo verdade, exigiria um verdadeiro “malabarismo” na dinâmica dos receptores ou da própria circuitaria hipocampal: esse experimento em particular, porém, foi realizado apenas uma vez, enquanto que o das 72 horas e dos 30 dias foram refeitos pelo menos duas vezes, sempre encontrando o mesmo resultado. Como existe essa possibilidade de ser um experimento problemático (algo muito comum em farmacologia comportamental – por isso costumamos repetir os mais duvidosos), não tentaremos elaborar maiores interpretações sobre o achado antes de replicá-lo cuidadosamente: no entanto, caso se confirme, será um achado extraordinário. Com o que temos até o momento, porém, seria precipitado tirar conclusões, portanto afirmamos nossa confiança apenas nos pontos de 72 horas e 30 dias referentes à consolidação.

A exposição prolongada ao contexto onde foi adquirida a memória aversiva, na ausência do EI induz a extinção de memória e, conseqüentemente, a diminuição da resposta de medo, o que significa que o animal aprende que o contexto não prediz o choque. Nos seguintes experimentos, os animais foram treinados no CAC, e 24 horas antes do teste, que ocorreu em diferentes momentos após o treino, foram reexpostos ao contexto por 30 min para induzir a extinção da memória. Nos ratos que passaram pela sessão de extinção 48h após o treino, a infusão pré-teste de AM251 no hipocampo

dorsal bloqueou a evocação da memória de extinção no teste realizado após 24 horas. Entretanto, quando testados 15 ou 30 dias após o treino, o AM251 pré-teste não teve nenhum efeito sobre a evocação da memória. Esses resultados poderiam ser explicados por pelo menos duas hipóteses: 1) a idade da memória de extinção, e 2) o estado motivacional do animal.

Tem-se demonstrado que a reativação de memórias remotas exige um tempo maior de reexposição ao contexto que aquele usado para memórias recentes (Frankland et al. 2006). Esse fenômeno parece estar associado com a dificuldade de labilizar memórias remotas e, a resistência destas a qualquer perturbação/interferência. É possível que memórias remotas tenham sua estabilidade favorecida por razões adaptativas, o que explicaria o achado na extinção da memória e sua evocação após 30 dias do treino.

Outros estudos mostram que, durante o teste, as condições e o nível de estresse associados à tarefa ou ao próprio contexto (por exemplo, a intensidade do choque), bem como as experiências estressantes anteriores (completamente alheias à tarefa, como as condições na caixa moradia ou a forma de manipulação dos animais antes do teste) podem influenciar os efeitos dos canabinóides sobre a memória (Campolongo et al. 2012; Morena and Campolongo 2014). Talvez esses motivos pudessem explicar a variabilidade dos dados. No entanto, todos os animais passaram pelos mesmos procedimentos de manipulação e condições experimentais. Mesmo assim, não podemos descartar a possibilidade de que algum fator no momento do teste ou treino, ou no biotério, pudesse alterar o estado emocional dos animais. As cirurgias, por exemplo, ocorreram em momentos diferentes; os animais que iam ser testados 72 horas após o treino foram operados uma semana antes de começar os procedimentos experimentais,

já os que iam ser testados 15 ou 30 dias após o treino, foram operados uma semana antes do teste, ou seja, passaram pelo procedimento cirúrgico após serem treinados.

Esses resultados sugerem que o tratamento canabinoide exógeno agudo pode depender (i) do estado emocional do animal no momento da tarefa, (ii) da idade da memória ou (iii) da região encefálica envolvida (Abush and Akirav 2010; Ganon-Elazar and Akirav 2009; de Oliveira Alvares et al. 2005; Suzuki et al. 2004).

É possível que os receptores CB1 produzam efeitos comportamentais opostos dependendo da sua localização anatômica. Como é sabido, os receptores CB1 são expressos principalmente nos terminais pré-sinápticos e podem suprimir a liberação de neurotransmissores fundamentais, como o GABA e o glutamato, os quais, na maioria das vezes, tem efeitos contrários no controle de processos mnemônicos. Assim, é possível que o efeito oposto do AM251 na evocação de memórias de diferentes idades seja consequência de mudanças na expressão e localização dos receptores CB1 em neurônios piramidais excitatórios e/ou interneurônios GABAérgicos, na região CA1 do hipocampo. A influência dos canabinóides no comportamento pode ser qualitativamente diferente dependendo das sinapses ativadas e dos circuitos neuronais recrutados em uma situação especial (Morena and Campolongo 2014). Além disso, a densidade dos receptores canabinóides é diferente entre os tipos de sinapses em geral, onde a maior densidade dos receptores CB1 é encontrada nos interneurônios GABAérgicos e os menores níveis são encontrados em sinapses glutamatérgicas no hipocampo (Kawamura et al. 2006; Morozov et al. 2009; Takahashi and Castillo 2006). Desta forma, acreditamos que as mudanças na localização dos receptores sejam dependentes do tempo/idade da memória, onde o número de receptores CB1 nos interneurônios GABAérgicos no hipocampo dorsal, especialmente na área CA1, pode variar ao longo do tempo em relação aos neurônios glutamatérgicos. Levando em consideração que o

equilíbrio na atividade neuronal inibitória e excitatória é modulado pelos receptores CB1, ao igual que o impacto emocional dos estímulos ambientais, qualquer mudança no ambiente (por exemplo, uma extinção prévia da memória) ou no tempo (memórias recentes e remotas) pode alterar a localização e a densidade desses receptores nas sinapses GABAérgicas em relação às glutamatérgicas, pelo que um *desequilíbrio* desse sistema pode ser o responsável pelos efeitos contraditórios dos canabinóides nos processos de aprendizagem e memória.

Vale mencionar que também fizemos uma tentativa de estudo dos efeitos da infusão pré-teste sobre memórias previamente *reconsolidadas* e testadas 72h, 15 e 30 dias pós-condicionamento – neste caso, a reexposição foi de apenas 3 min sem a presença do EI (dados não mostrados), na qual, porém, apenas as medidas aos 15 dias foram aproveitáveis - não houve efeito.

A captação do transmissor pelas vesículas sinápticas é mediada por transportadores vesiculares específicos que compreendem VGLUT1, VGLUT2 e VGLUT3 para glutamato e VGAT/VIAAT para GABA (Zander, 2010). No SNC, a presença de qualquer VGLUT1/2 ou VGAT define os neurônios excitatórios e inibitórios, respectivamente.

Para testar a hipótese da mudança na localização e número dos receptores CB1, foi realizada imunofluorescência indireta com marcação tripla, utilizando anticorpos específicos contra VGAT, VGLUT, e CB1, além de NeuN e GFAP para avaliar a localização dos receptores canabinóides tipo 1 nos interneurônios GABAérgicos, neurônios glutamatérgicos ou nas células gliais no hipocampo dorsal dos animais. Essa técnica tem a vantagem de ser capaz de mostrar a distribuição e localização exata dos receptores expressos na região CA1 do hipocampo dorsal e não só a quantidade deles como o *Western blot*. Sua maior desvantagem, neste caso, seria que pela tripla-

marcação os anticorpos podem interagir entre si e interferir com a emissão da cor do outro, processo conhecido como “*quenching*” onde ocorre uma diminuição da intensidade da fluorescência de uma das substâncias. Este fenômeno de *quenching* possivelmente ocorreu no nosso trabalho, impedindo a diferenciação de dois dos anticorpos na tripla marcação (CB1 + VGLUT ou VGAT + NeuN ou GFAP) e evitando desta forma, a identificação dos transportadores vesiculares de VGLUT ou VGAT.

Assim, estamos tentando adaptar o protocolo da imunistoquímica indireta de tripla marcação, para posteriormente conseguirmos avaliar as mudanças na quantidade e na localização dos receptores CB1 em diferentes momentos, o que nos ajudaria a encontrar uma resposta aos resultados conflitantes encontrados nesse trabalho.

## 6. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que o efeito farmacológico do AM251 pode mudar com a extinção da memória e seu efeito sobre a evocação é dependente do tempo, sendo que em memórias mais recentes, 72 horas após a sessão de treino, o AM251 teve efeito facilitatório, mas 15 dias após a sessão de treino teve o efeito contrario prejudicando a evocação da memória de medo. No caso de memórias remotas, ou seja, quando o teste foi 30 dias após a sessão de treino, o AM251 melhorou a evocação da memória. Em memórias previamente extintas, o AM251 bloqueou a evocação da memória de extinção quando testada 72 horas após a sessão de treino, mas, quando a sessão de extinção foi realizada 14 ou 29 dias após a sessão de treino e testada 24 horas depois, o AM251 não teve efeito.

No quadro abaixo, estão listados os experimentos relacionados a cada um dos objetivos e suas respectivas conclusões específicas e gerais.

<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Figura</b>	<b>Resultados</b>
2.2.1. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 sobre e evocação da memória 72h após o treino	Fig. 10	A inibição dos receptores CB1 com AM251 tem efeito facilitatório sobre a evocação da memória de medo.
2.2.2. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 sobre e evocação da memória 15 dias após o treino.	Fig. 11	Numa memória aprendida 15 dias antes, a injeção de AM251 pré-teste tem efeito amnésico na evocação da memória.
2.2.3. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 sobre e evocação da memória 30 dias após o treino.	Fig. 12	A infusão intrahipocampal de AM251 tem efeito facilitatório na evocação de uma memória aprendida 30 dias antes.
2.2.4. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 na evocação, 48h após o treino, de uma memória previamente extinta.	Fig. 13	Injeção de AM251 pré-teste inibiu a evocação da memória de extinção aprendida 72h antes e testada 24 horas após a sessão de extinção.
2.2.5. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 na evocação, 15 dias após o treino, de uma memória previamente extinta.	Fig. 14	A infusão de AM251 pré-teste não teve efeito na evocação da memória no teste feito um dia após a sessão de extinção, nos animais treinados 15 dias antes.
2.2.6. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal do antagonista CB1 AM251 na evocação, 30 dias após o treino, de uma memória previamente extinta.	Fig. 15	O AM251 não teve efeito sobre a evocação da memória de extinção aprendida 30 dias antes.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abush, Hila, and Irit Akirav. 2010. "Cannabinoids Modulate Hippocampal Memory and Plasticity." *Hippocampus* 20(10):1126–38.
- Abush, Hila, and Irit Akirav. 2013. "Cannabinoids Ameliorate Impairments Induced by Chronic Stress to Synaptic Plasticity and Short-Term Memory." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38(8):1521–34.
- Alberini, Cristina M. 2005. "Mechanisms of Memory Stabilization: Are Consolidation and Reconsolidation Similar or Distinct Processes?" *Trends in neurosciences* 28(1):51–56.
- Alberini, Cristina M. 2009. "Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity." 121–45.
- Ambrogio Lorenzini, C., E. Baldi, C. Bucherelli, and G. Tassoni. 1993. "Forced Extinction as a Means to Evaluate Consolidation Gradient of a Passive Avoidance Response in the Rat." *Physiology & behavior* 53(5):873–77.
- Andero, R., and K. J. Ressler. 2012. "Fear Extinction and BDNF: Translating Animal Models of PTSD to the Clinic." *Genes, brain, and behavior* 11(5):503–12.
- Ashton, John C., Yiwen Zheng, Ping Liu, Cynthia L. Darlington, and Paul F. Smith. 2004. "Immunohistochemical Characterisation and Localisation of Cannabinoid CB1 Receptor Protein in the Rat Vestibular Nucleus Complex and the Effects of Unilateral Vestibular Deafferentation." *Brain research* 1021(2):264–71.
- Atsak, Piray et al. 2012. "Glucocorticoids Interact with the Hippocampal Endocannabinoid System in Impairing Retrieval of Contextual Fear Memory." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(9):3504–9.
- Auber, Alessia, Vincenzo Tedesco, Carolyn E. Jones, Marie-H. Monfils, and Christian Chiamulera. 2013. "Post-Retrieval Extinction as Reconsolidation Interference: Methodological Issues or Boundary Conditions?" *Psychopharmacology* 226(4):631–47.
- Barros, D. M., Carlis, V., Maidana, M., Silva, E. S., Baisch, A. L., Ramirez, M. R., et al. (2004). Interactions between anandamide-induced anterograde amnesia and posttraining memory modulatory systems. *Brain Research*, 1016, 66–71.
- Begg, Malcolm et al. 2005. "Evidence for Novel Cannabinoid Receptors." *Pharmacology & therapeutics* 106(2):133–45.



- Beltramo, M. et al. 1997. "Functional Role of High-Affinity Anandamide Transport, as Revealed by Selective Inhibition." *Science (New York, N.Y.)* 277(5329):1094–97.
- Beltramo, M., and D. Piomelli. 2000. "Carrier-Mediated Transport and Enzymatic Hydrolysis of the Endogenous Cannabinoid 2-Arachidonylglycerol." *Neuroreport* 11(6):1231–35.
- Berlese, Daiane Bolzan et al. 2005. "Time-Dependent Modulation of Inhibitory Avoidance Memory by Spermidine in Rats." *Neurobiology of learning and memory* 83(1):48–53.
- Bevilaqua, Lia R., Jorge H. Medina, Iván Izquierdo, and Martín Cammarota. 2008. "Reconsolidation and the Fate of Consolidated Memories." *Neurotoxicity research* 14(4):353–58.
- Bialuk, Izabela, and Maria M. Winnicka. 2011. "AM251 , Cannabinoids Receptors Ligand , Improves Recognition Memory in Rats." *Pharmacological Reports* 63(3):670–79.
- Bisogno, T. et al. 2001. "Molecular Targets for Cannabidiol and Its Synthetic Analogues: Effect on Vanilloid VR1 Receptors and on the Cellular Uptake and Enzymatic Hydrolysis of Anandamide." *British journal of pharmacology* 134(4):845–52.
- Blanchard, R. J., and D. C. Blanchard. 1969. "Passive and Active Reactions to Fear-Eliciting Stimuli." *Journal of comparative and physiological psychology* 68(1):129–35.
- Bouton, M. E. 1993. "Context, Time, and Memory Retrieval in the Interference Paradigms of Pavlovian Learning." *Psychological bulletin* 114(1):80–99.
- Bouton, M. E., and R. C. Bolles. 1979. "Role of Conditioned Contextual Stimuli in Reinstatement of Extinguished Fear." *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes* 5(4):368–78.
- Bouton, Mark E., R. Frederick Westbrook, Kevin A. Corcoran, and Stephen Maren. 2006. "Contextual and Temporal Modulation of Extinction: Behavioral and Biological Mechanisms." *Biological psychiatry* 60(4):352–60.
- Brown, a J. 2007. "Novel Cannabinoid Receptors." *British journal of pharmacology* 152(5):567–75.
- Bucherelli, Corrado, Elisabetta Baldi, Chiara Mariottini, Maria Beatrice Passani, and Patrizio Blandina. 2006. "Aversive Memory Reactivation Engages in the Amygdala Only Some Neurotransmitters Involved in Consolidation." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13(4):426–30.

- Burgos-Robles, Anthony, Ivan Vidal-Gonzalez, Edwin Santini, and Gregory J. Quirk. 2007. "Consolidation of Fear Extinction Requires NMDA Receptor-Dependent Bursting in the Ventromedial Prefrontal Cortex." *Neuron* 53(6):871–80.
- Cammarota, Martín et al. 2005. "Retrieval and the Extinction of Memory." *Cellular and molecular neurobiology* 25(3-4):465–74.
- Campolongo, Patrizia et al. 2009. "Endocannabinoids in the Rat Basolateral Amygdala Enhance Memory Consolidation and Enable Glucocorticoid Modulation of Memory." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(12):4888–93.
- Campolongo, Patrizia et al. 2012. "The Endocannabinoid Transport Inhibitor AM404 Differentially Modulates Recognition Memory in Rats Depending on Environmental Aversiveness." *Frontiers in behavioral neuroscience* 6(March):11.
- Chan, Wan Yee Macy, and Gavan P. McNally. 2009. "Conditioned Stimulus Familiarity Determines Effects of MK-801 on Fear Extinction." *Behavioral neuroscience* 123(2):303–14.
- Chhatwal, J. P., L. Stanek-Rattines, Michael Davis, and K. J. Ressler. 2006. "Amygdala BDNF Signaling Is Required for Consolidation but Not Encoding of Extinction." *Nature neuroscience* 9(7):870–72.
- Choi, Jun-Hyeok, Jung-Eun Kim, and Bong-Kiun Kaang. 2010. "Protein Synthesis and Degradation Are Required for the Incorporation of Modified Information into the Pre-Existing Object-Location Memory." *Molecular brain* 3:1.
- Cosenza, M. et al. 2000. "Locomotor Activity and Occupancy of Brain Cannabinoid CB1 Receptors by the Antagonist/inverse Agonist AM281." *Synapse (New York, N.Y.)* 38(4):477–82.
- Cravatt, B. F. et al. 1996. "Molecular Characterization of an Enzyme That Degrades Neuromodulatory Fatty-Acid Amides." *Nature* 384(6604):83–87.
- Cravatt, B. F. et al. 2001. "Supersensitivity to Anandamide and Enhanced Endogenous Cannabinoid Signaling in Mice Lacking Fatty Acid Amide Hydrolase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16):9371–76.
- Davies, S. N., R. G. Pertwee, and G. Riedel. 2002. "Functions of Cannabinoid Receptors in the Hippocampus." 42:993–1007.
- Devane, W. A. et al. 1992. "Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor." *Science (New York, N.Y.)* 258(5090):1946–49.
- Devane, W. A., F. A. Dysarz, M. R. Johnson, L. S. Melvin, and A. C. Howlett. 1988. "Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain." *Molecular pharmacology* 34(5):605–13.

- Dinh, T. P. et al. 2002. "Brain Monoglyceride Lipase Participating in Endocannabinoid Inactivation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(16):10819–24.
- Dudai, Yadin. 2002. "Molecular Bases of Long-Term Memories: A Question of Persistence." *Current opinion in neurobiology* 12(2):211–16.
- Dudai, Yadin. 2004. "The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable Is the Engram?" *Annual review of psychology* 55:51–86.
- Dudai, Yadin. 2012. "The Restless Engram: Consolidations Never End." *Annual review of neuroscience* 35:227–47.
- Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K., & Fujiwara, M. (2002). Intracerebral microinjections of delta 9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. *Brain Research*, 952(2), 239–245.
- Fattore, Liana, Paola Fadda, and Walter Fratta. 2007. "Endocannabinoid Regulation of Relapse Mechanisms." 56:418–27.
- Fiorenza, Natália G., Dagieli Sartor, Jociane C. Myskiw, and Iván Izquierdo. 2011. "Treatment of Fear Memories: Interactions between Extinction and Reconsolidation." *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83(4):1363–72.
- Frankland, Paul W. et al. 2006. "Stability of Recent and Remote Contextual Fear Memory." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13(4):451–57.
- Frankland, Paul W., and Bruno Bontempi. 2005. "The Organization of Recent and Remote Memories." *Nature reviews. Neuroscience* 6(2):119–30.
- Fraser, George A. 2009. "The Use of a Synthetic Cannabinoid in the Management of Treatment-Resistant Nightmares in Posttraumatic Stress Disorder (PTSD)." *CNS neuroscience & therapeutics* 15(1):84–88.
- Fulton, Daniel, Ildiko Kemenes, Richard J. Andrew, and Paul R. Benjamin. 2005. "A Single Time-Window for Protein Synthesis-Dependent Long-Term Memory Formation after One-Trial Appetitive Conditioning." *The European journal of neuroscience* 21(5):1347–58.
- Gaetani, Silvana et al. 2009. "The Endocannabinoid System as a Target for Novel Anxiolytic and Antidepressant Drugs." *International review of neurobiology* 85:57–72.
- Ganon-Elazar, Eti, and Irit Akirav. 2009. "Cannabinoid Receptor Activation in the Basolateral Amygdala Blocks the Effects of Stress on the Conditioning and Extinction of Inhibitory Avoidance." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29(36):11078–88.

- Ganon-Elazar, Eti, and Irit Akirav. 2012. "Cannabinoids Prevent the Development of Behavioral and Endocrine Alterations in a Rat Model of Intense Stress." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37(2):456–66.
- Gaoni, Y., and R. Mechoulam. 1964. "Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish." *Journal of the American Chemical Society* 86(8):1646–47.
- Gisquet-Verrier, Pascale, and David C. Riccio. 2012. "Memory Reactivation Effects Independent of Reconsolidation." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 19(9):401–9.
- Glickman, S. E. 1961. "Perseverative Neural Processes and Consolidation of the Memory Trace." *Psychological bulletin* 58:218–33.
- Harris, J. A., M. L. Jones, G. K. Bailey, and R. F. Westbrook. 2000. "Contextual Control over Conditioned Responding in an Extinction Paradigm." *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes* 26(2):174–85.
- Heldt, S. A., L. Stanek, J. P. Chhatwal, and K. J. Ressler. 2007. "Hippocampus-Specific Deletion of BDNF in Adult Mice Impairs Spatial Memory and Extinction of Aversive Memories." *Molecular psychiatry* 12(7):656–70.
- Heldt, Scott A., and Kerry J. Ressler. 2007. "Training-Induced Changes in the Expression of GABAA-Associated Genes in the Amygdala after the Acquisition and Extinction of Pavlovian Fear." *The European journal of neuroscience* 26(12):3631–44.
- Herkenham, M. et al. 1990. "Cannabinoid Receptor Localization in Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(5):1932–36.
- Hill, Matthew N. et al. 2010. "Functional Interactions between Stress and the Endocannabinoid System: From Synaptic Signaling to Behavioral Output." 30(45):14980–86.
- Hillard, C. J., and A. Jarrahian. 2000. "The Movement of N-Arachidonylethanolamine (anandamide) across Cellular Membranes." *Chemistry and physics of lipids* 108(1-2):123–34.
- Hoeffler, Charles A. et al. 2011. "Inhibition of the Interactions between Eukaryotic Initiation Factors 4E and 4G Impairs Long-Term Associative Memory Consolidation but Not Reconsolidation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(8):3383–88.
- Hoffman, Alexander F., Arthur C. Riegel, and Carl R. Lupica. 2003. "Functional Localization of Cannabinoid Receptors and Endogenous Cannabinoid Production

- in Distinct Neuron Populations of the Hippocampus.” *European Journal of Neuroscience* 18(3):524–34.
- Hölter, Sabine M. et al. 2005. “Cannabinoid CB1 Receptor Is Dispensable for Memory Extinction in an Appetitively-Motivated Learning Task.” *European journal of pharmacology* 510(1-2):69–74.
- Howlett, A. C. 1984. “Inhibition of Neuroblastoma Adenylate Cyclase by Cannabinoid and Nantradol Compounds.” *Life sciences* 35(17):1803–10.
- Howlett, A. C. et al. 2002. “International Union of Pharmacology . XXVII . Classification of Cannabinoid Receptors.” 54(2):161–202.
- Howlett, A. C., J. M. Qualy, and L. L. Khachatrian. 1986. “Involvement of Gi in the Inhibition of Adenylate Cyclase by Cannabimimetic Drugs.” *Molecular pharmacology* 29(3):307–13.
- Iversen, Leslie. 2003. “*Cannabis* and the Brain.” 1252–70.
- Izquierdo, I. 1989. “Different Forms of Post-Training Memory Processing.” *Behavioral and neural biology* 51(2):171–202.
- Izquierdo, I. et al. 1997. “Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats.” *The European journal of neuroscience* 9(4):786–93.
- Izquierdo, Luciana a et al. 2002. “Molecular Pharmacological Dissection of Short- and Long-Term Memory.” *Cellular and molecular neurobiology* 22(3):269–87.
- Izquierdo I (2011) Memória. Artmed Porto Alegre. 133p
- James W (1890). *The principles of psychology*. Henry Holt, New York, NY.
- Järbe, Torbjörn U. C., Matthew E. Andrzejewski, and Nicholas V DiPatrizio. 2002. “Interactions between the CB1 Receptor Agonist Delta 9-THC and the CB1 Receptor Antagonist SR-141716 in Rats: Open-Field Revisited.” *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 73(4):911–19.
- Ji, Jin-Zhao, Xin-Ming Wang, and Bao-Ming Li. 2003. “Deficit in Long-Term Contextual Fear Memory Induced by Blockade of Beta-Adrenoceptors in Hippocampal CA1 Region.” *The European journal of neuroscience* 17(9):1947–52.
- Judge, M. E., and D. Quartermain. 1982. “Characteristics of Retrograde Amnesia Following Reactivation of Memory in Mice.” *Physiology & behavior* 28(4):585–90.

- Kaang, Bong-Kiun, and Jun-Hyeok Choi. 2011. "Protein Degradation during Reconsolidation as a Mechanism for Memory Reorganization." *Frontiers in behavioral neuroscience* 5(February):2.
- Kaang, Bong-Kiun, Sue-Hyun Lee, and Hyoung Kim. 2009. "Synaptic Protein Degradation as a Mechanism in Memory Reorganization." *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 15(5):430–35.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000). Principles of Neural Science. 4th edition. New York, McGraw-Hill, 1414 p.
- Kano, Masanobu, Takako Ohno-shosaku, Yuki Hashimoto-dani, and Motokazu Uchigashima. 2009. "Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission." *Physiology & behavior* 309–80.
- Katona, I. et al. 1999. "Presynaptically Located CB1 Cannabinoid Receptors Regulate GABA Release from Axon Terminals of Specific Hippocampal Interneurons." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 19(11):4544–58.
- Kawamura, Yoshinobu et al. 2006. "The CB1 Cannabinoid Receptor Is the Major Cannabinoid Receptor at Excitatory Presynaptic Sites in the Hippocampus and Cerebellum." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26(11):2991–3001.
- Kelamangalath, Lakshmi, Jarod Swant, Michael Stramiello, and John J. Wagner. 2007. "The Effects of Extinction Training in Reducing the Reinstatement of Drug-Seeking Behavior: Involvement of NMDA Receptors." *Behavioural brain research* 185(2):119–28.
- Kentros, Clifford G., Naveen T. Agnihotri, Samantha Streater, Robert D. Hawkins, and Eric R. Kandel. 2004. "Increased Attention to Spatial Context Increases Both Place Field Stability and Spatial Memory." *Neuron* 42(2):283–95.
- Klann, Eric, and J. David Sweatt. 2008. "Altered Protein Synthesis Is a Trigger for Long-Term Memory Formation." *Neurobiology of learning and memory* 89(3):247–59.
- De la Fuente, Verónica, Ramiro Freudenthal, and Arturo Romano. 2011. "Reconsolidation or Extinction: Transcription Factor Switch in the Determination of Memory Course after Retrieval." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31(15):5562–73.
- Lechner, Hilde A., Larry R. Squire, John H. Byrne, and Georg Mu. 1999. "100 Years of Consolidation — Remembering Müller and Pilzecker." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 77–87.
- Ledoux, Joseph E. 2000. "Emotion Circuits in the Brain." *Annual review of neuroscience* 155–84.

- Lee, Jonathan L. C., Barry J. Everitt, and Kerrie L. Thomas. 2004. "Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation." *Science (New York, N.Y.)* 304(5672):839–43.
- Lee, Jonathan L. C., and Robert E. Hynds. 2013. "Divergent Cellular Pathways of Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation." *Hippocampus* 23(3):233–44.
- Leterrier, Christophe et al. 2006. "Constitutive Activation Drives Compartment-Selective Endocytosis and Axonal Targeting of Type 1 Cannabinoid Receptors." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26(12):3141–53.
- Lewis, D. J. 1979. "Psychobiology of Active and Inactive Memory." *Psychological bulletin* 86(5):1054–83.
- Lewis, D. J., J. R. Misanin, and R. R. Miller. 1968. "Recovery of Memory Following Amnesia." *Nature* 220(5168):704–5.
- Lichtman, A. H. 2000. "SR 141716A Enhances Spatial Memory as Assessed in a Radial-Arm Maze Task in Rats." *European journal of pharmacology* 404(1-2):175–79.
- Lin, Hui-Ching, Sheng-Chun Mao, and Po-Wu Gean. 2006. "Effects of Intra-Amygdala Infusion of CB1 Receptor Agonists on the Reconsolidation of Fear-Potentiated Startle." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13(3):316–21.
- Lin, Qing-Shu et al. 2011. "Hippocampal Endocannabinoids Play an Important Role in Induction of Long-Term Potentiation and Regulation of Contextual Fear Memory Formation." *Brain research bulletin* 86(3-4):139–45.
- Ben Mamou, Cyrinne, Karine Gamache, and Karim Nader. 2006. "NMDA Receptors Are Critical for Unleashing Consolidated Auditory Fear Memories." *Nature neuroscience* 9(10):1237–39.
- Maren, Stephen, and Gregory J. Quirk. 2004. "Neuronal Signalling of Fear Memory." *Nature reviews. Neuroscience* 5(11):844–52.
- Marsicano, G., and B. Lutz. 1999. "Expression of the Cannabinoid Receptor CB1 in Distinct Neuronal Subpopulations in the Adult Mouse Forebrain." *The European journal of neuroscience* 11(12):4213–25.
- Marsicano, Giovanni, Carsten T. Wotjak, and Shahnaz C. Azad. 2002. "The Endogenous Cannabinoid System Controls Extinction of Aversive Memories." 418(August):557–60.
- Di Marzo, V., and D. G. Deutsch. 1998. "Biochemistry of the Endogenous Ligands of Cannabinoid Receptors." *Neurobiology of disease* 5(6 Pt B):386–404.

- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, and T. I. Bonner. 1990. "Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned cDNA." *Nature* 346(6284):561–64.
- McClelland, J. L., B. L. McNaughton, and R. C. O'Reilly. 1995. "Why There Are Complementary Learning Systems in the Hippocampus and Neocortex: Insights from the Successes and Failures of Connectionist Models of Learning and Memory." *Psychological review* 102(3):419–57.
- McGaugh, J. L. 2000. "Memory--a Century of Consolidation." *Science* 287(5451):248–51.
- Mcgaugh, James L., and HP Alpern. 1966. "Effects of Electroshock on Memory: Amnesia without Convulsions." *Science* 152:665–66.
- Mechoulam, R. et al. 1995. "Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors." *Biochemical pharmacology* 50(1):83–90.
- Mechoulam, Raphael, and Linda A. Parker. 2013. "The Endocannabinoid System and the Brain." (July 2012).
- Medina, Jorge H., Pedro Bekinschtein, Martín Cammarota, and Iván Izquierdo. 2008. "Do Memories Consolidate to Persist or Do They Persist to Consolidate?" *Behavioural brain research* 192(1):61–69.
- Milad, Mohammed R., and Gregory J. Quirk. 2002. "Neurons in Medial Prefrontal Cortex Signal Memory for Fear Extinction." *Nature* 420(6911):70–74.
- Milad, Mohammed R., and Gregory J. Quirk. 2012. "Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress." *Annual review of psychology* 63:129–51.
- Misanin, J. R., R. R. Miller, and D. J. Lewis. 1968. "Retrograde Amnesia Produced by Electroconvulsive Shock after Reactivation of a Consolidated Memory Trace." *Science (New York, N.Y.)* 160(3827):554–55.
- Do Monte, Fabricio H., Rimenez R. Souza, Rafael M. Bitencourt, Juliana a Kroon, and Reinaldo N. Takahashi. 2013. "Infusion of Cannabidiol into Infralimbic Cortex Facilitates Fear Extinction via CB1 Receptors." *Behavioural brain research* 250:23–27.
- Morena, Maria, and Patrizia Campolongo. 2014. "The Endocannabinoid System : An Emotional Buffer in the Modulation of Memory Function." *NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY*.
- Morozov, Yury M., Masaaki Torii, and Pasko Rakic. 2009. "Origin, Early Commitment, Migratory Routes, and Destination of Cannabinoid Type 1 Receptor-Containing Interneurons." *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 19 Suppl 1(July):i78–89.



- Morrison, Filomene G., and Kerry J. Ressler. 2013. "From the Neurobiology of Extinction To Improved Clinical Treatments." *Depression and anxiety* 12:1–12.
- Moscovitch, Morris et al. 2005. "Functional Neuroanatomy of Remote Episodic, Semantic and Spatial Memory: A Unified Account Based on Multiple Trace Theory." *Journal of anatomy* 207(1):35–66.
- Moshfegh, Azam, Parvin Babaei, Shahrbanoo Oryan, Bahram Soltani, and Mohammad-Reza Zarrindast. 2011. "Involvement of Dorsal Hippocampal  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptors in the Effect of WIN55,212-2 on Memory Retrieval in Inhibitory Avoidance Task." *Neuroscience letters* 489(2):69–73.
- Myers, K. M., and M. Davis. 2007. "Mechanisms of Fear Extinction." *Molecular psychiatry* 12(2):120–50.
- Myers, Karyn M., William A. Carlezon, and Michael Davis. 2011. "Glutamate Receptors in Extinction and Extinction-Based Therapies for Psychiatric Illness." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36(1):274–93.
- Nadel, L., a Samsonovich, L. Ryan, and M. Moscovitch. 2000. "Multiple Trace Theory of Human Memory: Computational, Neuroimaging, and Neuropsychological Results." *Hippocampus* 10(4):352–68.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1:216-219.
- Nader, Karim, and Einar Orn Einarsson. 2010. "Memory Reconsolidation: An Update." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1191:27–41.
- Nader, Karim, and Oliver Hardt. 2009. "A Single Standard for Memory: The Case for Reconsolidation." *Nature reviews. Neuroscience* 10(3):224–34.
- Niyuhire, Floride et al. 2007. "The Disruptive Effects of the CB1 Receptor Antagonist Rimonabant on Extinction Learning in Mice Are Task-Specific." *Psychopharmacology* 191(2):223–31.
- Nyíri, G., C. Cserép, E. Szabadits, K. Mackie, and T. F. Freund. 2005. "CB1 Cannabinoid Receptors Are Enriched in the Perisynaptic Annulus and on Preterminal Segments of Hippocampal GABAergic Axons." *Neuroscience* 136(3):811–22.
- Ogden, Kevin K., Alpa Khatri, Stephen F. Traynelis, and Scott A. Heldt. 2014. "Potentiation of GluN2C/D NMDA Receptor Subtypes in the Amygdala Facilitates the Retention of Fear and Extinction Learning in Mice." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39(3):625–37.

- De Oliveira Alvares, Lucas et al. 2005. "Amnestic Effect of Intrahippocampal AM251, a CB1-Selective Blocker, in the Inhibitory Avoidance, but Not in the Open Field Habituation Task, in Rats." *Neurobiology of learning and memory* 83(2):119–24.
- De Oliveira Alvares, Lucas, Ana Paula Crestani, Lindsey Cassini, Fabiana Santana, and Jorge Alberto Quillfeldt. 2013. "Reactivation Enables Memory Updating, Precision-Keeping and Strengthening: Exploring the Possible Biological Roles of Reconsolidation." *NEUROSCIENCE*.
- De Oliveira Alvares, Lucas, Bruna Pasqualini Genro, Felipe Diehl, and Jorge a Quillfeldt. 2008. "Differential Role of the Hippocampal Endocannabinoid System in the Memory Consolidation and Retrieval Mechanisms." *Neurobiology of learning and memory* 90(1):1–9.
- Onaivi, Emmanuel S. et al. 2006. "Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB2 Receptors in Brain." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1074:514–36.
- Pamplona, FA, and RN Takahashi. 2012. "Psychopharmacology of the Endocannabinoids: Far beyond Anandamide." *How to get published* (June 2011).
- Penfield, W., and B. Milner. 1958. "Memory Deficit Produced by Bilateral Lesions in the Hippocampal Zone." *A.M.A. archives of neurology and psychiatry* 79(5):475–97.
- Peters, Jamie, Laura M. Dieppa-Perea, Loyda M. Melendez, and Gregory J. Quirk. 2010. "Induction of Fear Extinction with Hippocampal-Infralimbic BDNF." *Science (New York, N.Y.)* 328(5983):1288–90. R
- Phelps, Elizabeth a, and Joseph E. LeDoux. 2005. "Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior." *Neuron* 48(2):175–87.
- Piri, Morteza, and Mohammad-Reza Zarrindast. 2011. "Modulation of WIN55,212-2 State-Dependent Memory by  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptors of the Dorsal Hippocampus." *Archives of Iranian medicine* 14(6):389–95.
- Quevedo, João et al. 2003. "Differential Effects of Emotional Arousal in Short- and Long-Term Memory in Healthy Adults." *Neurobiology of learning and memory* 79(2):132–35.
- Quillfeldt JA. (2005). Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats, Em: Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research. p 340-383
- Quirk, Gregory J. et al. 2010. "Erasing Fear Memories with Extinction Training." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30(45):14993–97.

- Quirk, Gregory J., and Devin Mueller. 2008. "Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33(1):56–72.
- Rabinak, Christine A. et al. 2013. "Cannabinoid Facilitation of Fear Extinction Memory Recall in Humans." *Neuropharmacology* 64:396–402.
- Rabinak, Christine A., and K. Luan Phan. 2013. "Cannabinoid Modulation of Fear Extinction Brain Circuits: A Novel Target to Advance Anxiety Treatment." *Current pharmaceutical design*.
- Rattiner, Lisa M., Michael Davis, Christopher T. French, and Kerry J. Ressler. 2004. "Brain-Derived Neurotrophic Factor and Tyrosine Kinase Receptor B Involvement in Amygdala-Dependent Fear Conditioning." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24(20):4796–4806.
- Rescorla, R. A., and C. D. Heth. 1975. "Reinstatement of Fear to an Extinguished Conditioned Stimulus." *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes* 1(1):88–96.
- Restivo, Leonardo, Gisella Vetere, Bruno Bontempi, and Martine Ammassari-Teule. 2009. "The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29(25):8206–14.
- Robinson, Lianne et al. 2008. "Hippocampal Endocannabinoids Inhibit Spatial Learning and Limit Spatial Memory in Rats." *Psychopharmacology* 198(4):551–63.
- Robson, Philip. 2001. "Therapeutic Aspects of *Cannabis* and Cannabinoids." *The British Journal of Psychiatry* 178:107–15.
- Rodríguez de Fonseca, F., I. Del Arco, J. L. Martín-Calderón, M. A. Gorriti, and M. Navarro. 1998. "Role of the Endogenous Cannabinoid System in the Regulation of Motor Activity." *Neurobiology of disease* 5(6 Pt B):483–501.
- Russo, Ethan B. 2007. "History of *Cannabis* and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet." 4:1614–48.
- Sacktor, T. C. et al. 1993. "Persistent Activation of the Zeta Isoform of Protein Kinase C in the Maintenance of Long-Term Potentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(18):8342–46.
- Sacktor, T. C. 2011. "How Does PKM $\zeta$  Maintain Long-Term Memory?" *Nature reviews. Neuroscience* 12(1):9–15.
- Sacktor, T. C. 2012. "Memory Maintenance by PKM $\zeta$ --an Evolutionary Perspective." *Molecular brain* 5:31.

- Schneider, A. M., and W. Sherman. 1968. "Amnesia: A Function of the Temporal Relation of Footshock to Electroconvulsive Shock." *Science (New York, N.Y.)* 159(3811):219–21.
- Scoville, W. B., and B. Milner. 1957. "Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesions." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20(1):11–21.
- Segev, Amir, and Irit Akirav. 2011. "Differential Effects of Cannabinoid Receptor Agonist on Social Discrimination and Contextual Fear in Amygdala and Hippocampus." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 18(4):254–59.
- Shin, Lisa M., and Israel Liberzon. 2010. "The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35(1):169–91.
- Van Sickle, Marja D. et al. 2005. "Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB2 Receptors." *Science (New York, N.Y.)* 310(5746):329–32.
- Sierra-Mercado, Demetrio, Nancy Padilla-Coreano, and Gregory J. Quirk. 2011. "Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36(2):529–38.
- Solinas, Marcello, and Steven R. Goldberg. 2005. "Motivational Effects of Cannabinoids and Opioids on Food Reinforcement Depend on Simultaneous Activation of Cannabinoid and Opioid Systems." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30(11):2035–45.
- Sotres-Bayon, Francisco, David E. A. Bush, and Joseph E. LeDoux. 2007. "Acquisition of Fear Extinction Requires Activation of NR2B-Containing NMDA Receptors in the Lateral Amygdala." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32(9):1929–40.
- Sotres-Bayon, Francisco, Llorenç Diaz-Mataix, David E. A. Bush, and Joseph E. LeDoux. 2009. "Dissociable Roles for the Ventromedial Prefrontal Cortex and Amygdala in Fear Extinction: NR2B Contribution." *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 19(2):474–82.
- Squire, L. R. 2009. "Memory and Brain Systems: 1969-2009." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29(41):12711–16.
- Squire, L. R., and P. Alvarez. 1995. "Retrograde Amnesia and Memory Consolidation: A Neurobiological Perspective." *Current opinion in neurobiology* 5(2):169–77.

- Squire, L. R., N. J. Cohen, and J. a Zouounis. 1984. "Preserved Memory in Retrograde Amnesia: Sparing of a Recently Acquired Skill." *Neuropsychologia* 22(2):145–52.
- Squire, Larry R., and Peter J. Bayley. 2007. "The Neuroscience of Remote Memory." *Current opinion in neurobiology* 17(2):185–96.
- Stella, N., P. Schweitzer, and D. Piomelli. 1997. "A Second Endogenous Cannabinoid That Modulates Long-Term Potentiation." *Nature* 388(6644):773–78.
- Storsve, Andreas Berg, Gavan P. McNally, and Rick Richardson. 2010. "US Habituation, like CS Extinction, Produces a Decrement in Conditioned Fear Responding That Is NMDA Dependent and Subject to Renewal and Reinstatement." *Neurobiology of learning and memory* 93(4):463–71.
- Suzuki, Akinobu et al. 2004. "Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(20):4787–95.
- Suzuki, Akinobu, Takuya Mukawa, Akinori Tsukagoshi, Paul W. Frankland, and Satoshi Kida. 2008. "Activation of LVGCCs and CB1 Receptors Required for Destabilization of Reactivated Contextual Fear Memories." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 15(6):426–33.
- Takahashi, K. A., and P. E. Castillo. 2006. "The CB1 Cannabinoid Receptor Mediates Glutamatergic Synaptic Suppression in the Hippocampus." *Neuroscience* 139(3):795–802.
- Tan, Huibing et al. 2011. "Cannabinoid Transmission in the Basolateral Amygdala Modulates Fear Memory Formation via Functional Inputs to the Prelimbic Cortex." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(14):5300–5312.
- Tulving, E. 1987. "Multiple Memory System and Consciousness." *Human Neurobiology* 67–80.
- Ueda, N., R. A. Puffenbarger, S. Yamamoto, and D. G. Deutsch. 2000. "The Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)." *Chemistry and physics of lipids* 108(1-2):107–21.
- Varvel, S. A., and Aron H. Lichtman. 2002. "Evaluation of CB1 Receptor Knockout Mice in the Morris Water Maze." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 301(3):915–24.
- Wallenstein, G. V, R. Vago, and A. M. Walberer. 2002. "Time-Dependent in v Ol v Ement of PKA / PKC in Contextual Memory Consolidation." *Behavioural brain research* 133:159–64.
- Wang, Szu-Han, Lucas de Oliveira Alvares, and Karim Nader. 2009. "Cellular and Systems Mechanisms of Memory Strength as a Constraint on Auditory Fear Reconsolidation." *Nature neuroscience* 12(7):905–12.

- Wegener, Nico, Sybille Kuhnert, and Annika Thüns. 2008. "Effects of Acute Systemic and Intra-Cerebral Stimulation of Cannabinoid Receptors on Sensorimotor Gating, Locomotion and Spatial Memory in Rats." 375–85.
- Wilson, Rachel I., and Roger A. Nicoll. 2002. "Endocannabinoid Signaling in the Brain." *Neuroscience* 678(2002):678–82.
- Wright, John W., Jennifer R. Reichert, Christopher J. Davis, and Joseph W. Harding. 2002. "Neural Plasticity and the Brain Renin-Angiotensin System." *Neuroscience and biobehavioral reviews* 26(5):529–52.
- Yamamoto, Shigeto et al. 2008. "Effects of Single Prolonged Stress and D-Cycloserine on Contextual Fear Extinction and Hippocampal NMDA Receptor Expression in a Rat Model of PTSD." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33(9):2108–16.
- Zarrindast, M. R., M. Ghiasvand, A. Rezayof, and S. Ahmadi. 2012. "The Amnesic Effect of Intra-Central Amygdala Administration of a Cannabinoid CB1 Receptor Agonist, WIN55,212-2, Is Mediated by a B-1 Noradrenergic System in Rat." *Neuroscience* 212:77–85.
- Zander, Johannes-Friedrich; Munster-Wandowski, Agnieszka; Brunk, Irene; Pahner, Ingrid; Gómez-Lira, Gisela; Heinemann, Uwe; Gutierrez, Rafael; Laube, Gregor; and Ahnert-Hilger, Gudrun. (2010). Synaptic and Vesicular Coexistence of VGLUT and VGAT in Selected Excitatory and Inhibitory Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 30(22):7634 –7645