UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Laura Willers de Souza

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO PROCESSO DE ESQUECIMENTO

Porto Alegre
2019

Laura Willers de Souza

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO PROCESSO DE ESQUECIMENTO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação:

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Coorientadora: Dra. Paula Santana Lunardi

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

de Souza, Laura Willers
Participação do sistema endocanabinoide no processo de esquecimento / Laura Willers de Souza. -- 2019.
97 f.
Orientador: Lucas de Oliveira Alvares.

Coorientadora: Paula Santana Lunardi.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Memória. 2. Esquecimento. 3. Sistema endocanabinoide. I. Alvares, Lucas de Oliveira, orient. II. Lunardi, Paula Santana, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Laura Willers de Souza

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO PROCESSO DE ESQUECIMENTO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: 05 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Denise Maria Zancan - UFRGS

_____

Prof. Dr. Luciano Sturmer de Fraga - UFRGS

_____

Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares - UFRGS (orientador)

_____

Dra. Paula Santana Lunardi - UFRGS (coorientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelo imenso apoio emocional (e financeiro) e pelo seu amor incondicional. Sou muito grata a tudo o que me ensinaram e proporcionaram, principalmente a buscar sempre pelo conhecimento.

Agradeço também ao meu irmão, quem sempre me ajudou a continuar com o sorriso no rosto e sempre esteve disposto a me ajudar no que fosse preciso.

Não há palavras suficientes para agradecer todo o apoio de meu namorado, aquele que aguentou todos os momentos difíceis ao meu lado e me ajudou a dar a volta por cima todas às vezes. Muito obrigada pelo imenso cuidado, carinho e amor e por todas as comidas maravilhosas.

Sou imensamente grata por todas as amizades feitas durante essa graduação. A Bruna dos Santos, que está comigo desde o primeiro dia, muito obrigada por todos os momentos que passamos juntas, por todos os aprendizados, todas as risadas, lágrimas, carinhos e diversões. Enfim, por todo o suporte que uma amiga poderia precisar, você sempre esteve disposta a me ajudar. Ao Jeferson Dalmago e Paula Bortoli, muito obrigada por essa amizade tão bonita e verdadeira.

Também preciso agradecer aos meus amigos de longa data, aqueles que me ajudaram e me incentivaram mesmo à distância. A Giovanna Valentini, Rafael Corrêa e Bianca Ellwanger, muito obrigada por todo o amor e carinho e por sempre encontrarem um tempo para nos reunirmos. Agradeço também a minha colega de cursinho, apartamento e agora grande amiga, Bruna Franchini, por todo o afeto.

Por fim, agradeço a todos os colegas do Laboratório da Neurobiologia da Memória e do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, por todos os ensinamentos. Em especial, gostaria de agradecer ao professor Dr. Lucas de Oliveira Alvares, por ter me aceito em seu laboratório e por sua excelente orientação durante meus três anos de Iniciação Científica. Muito obrigada pela confiança e por todo o incentivo. A Dra. Paula Santana Lunardi, um agradecimento especial por ter me acolhido desde o primeiro dia no laboratório, me ensinando a parte operacional e teórica de quase todos os experimentos em que me envolvi. Muito obrigada por todas as explicações, por ter paciência em ouvir minhas dúvidas e esclarecê-las. Agradeço imensamente pela ajuda prática e estatística durante todos os experimentos desse trabalho. Ao doutorando Bruno Popik, muito obrigada por toda a ajuda sempre que foi preciso.

“Não é o crítico que importa; nem aquele que aponta onde foi que o homem tropeçou ou como o autor das façanhas poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está por inteiro na arena da vida, cujo rosto está manchado de poeira, suor e sangue; que luta bravamente; que erra, que decepciona, porque não há esforço sem erros e decepções; mas que, na verdade, se empenha em seus feitos; que conhece o entusiasmo, as grandes paixões; que se entrega a uma causa digna; que, na melhor das hipóteses, conhece no final o triunfo da grande conquista e que, na pior, se fracassar, ao menos fracassa ousando grandemente. ”

Trecho do discurso “Cidadania em uma República” (ou “O Homem na Arena”),
proferido por Theodore Roosevelt, em 23 de abril de 1910.

RESUMO

Estamos constantemente recebendo informações do ambiente, porém a grande maioria dessas experiências serão esquecidas ao longo do tempo. A remoção dessas memórias desnecessárias garante a funcionalidade do sistema mnemônico. Assim, o esquecimento pode ser considerado um dos processos mais importantes do nosso organismo. Entretanto, os mecanismos subjacentes ao esquecimento permanecem desconhecidos. Estudos recentes sugerem que o processo de esquecimento ocorra através da ativação de diversos mecanismos celulares e moleculares, sendo, portanto, um processo ativo. Diversas evidências demostram a participação do sistema endocanabinoide (SE) na modulação dos processos mnemônicos de aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação e extinção. Isso nos fez acreditar que esse sistema também possui um papel essencial no processo de esquecimento ativo. Portanto, neste trabalho, objetivamos avaliar se o SE está envolvido na manutenção/decaimento da memória. Para isso, ratos *Wistar* machos foram submetidos a dois paradigmas comportamentais que permitem investigar diferentes tipos de memórias: paradigma da localização de objetos, para avaliar uma memória espacial (não-aversiva); e protocolos de duas intensidades da esquiva inibitória *step-through*, para avaliação de uma memória aversiva forte (treino com 4 choques de 0,3mA) e outra fraca (2 choques de 0,3mA). Verificamos que o bloqueio crônico dos receptores CB1 (AM251, antagonista CB1 seletivo, i.p.) acelerou o esquecimento de uma memória aversiva forte. No entanto, a ativação crônica do SE (WIN 55,212-2, agonista CB1 não-seletivo, i.p.) não é necessária para a manutenção de uma memória aversiva fraca. Além disso, o bloqueio crônico dos receptores CB1 (SR141716, antagonista CB1 seletivo, i.p.) não produziu nenhum efeito significativo na manutenção/esquecimento de uma memória espacial. Juntos, nossos resultados demonstram que a modulação do SE sobre a manutenção/esquecimento das memórias é recrutada dependendo da força da memória. Esses achados sugerem uma função relevante do SE no processo de esquecimento ativo, o que pode ser utilizado como estratégia terapêutica para acelerar o esquecimento de memórias traumáticas e mal adaptativas de longo prazo.

Palavras-chave: Esquecimento. Sistema Endocanabinoide. CB1. Memória aversiva. Memória espacial.

ABSTRACT

We are constantly receiving information from the environment. However, the vast majority of these experiences will be forgotten over time. Removing these unnecessary memories ensure the functionality of the mnemonic system. Thus, forgetting can be considered one of the most important processes in our body. Nonetheless, the mechanisms underlying the memory decay remain unknown. Recent evidence suggests that forgetting is an active process, occurring through the activation of certain cellular and molecular mechanisms. Several studies show the participation of the endocannabinoid system (ECS) in the modulation of the mnemonic processes of acquisition, consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction. This has made us believe that this system also plays an essential role in the process of active forgetting. Therefore, in this work, we aimed to evaluate whether the ECS is involved in memory maintenance/decay. For this, male Wistar rats were submitted to two behavioral paradigms that allow us to investigate different types of memories: object location, to evaluate a spatial memory (non-aversive); and protocols of two intensities of step-through inhibitory avoidance, to evaluate a strong aversive memory (training with 4 shocks of 0.3mA) and a weak one (2 shocks of 0.3mA). We found that chronic blockade of CB1 receptors (AM251, selective CB1 antagonist, i.p.) accelerated the decay of a strong aversive memory. However, chronic activation of the ECS (WIN 55,212-2, CB1 agonist non-selective, i.p.) is not required for maintenance of a weak aversive memory. Furthermore, chronic blockade of CB1 receptors (SR141716, selective CB1 antagonist, i.p.) did not produce any significant effect on maintenance/forgetting of spatial memory. Together, our results demonstrate that ECS modulation over memory maintenance/forgetting is recruited depending on memory strength. These findings suggest a relevant function of ECS in the process of active forgetting, which can be used as a therapeutic strategy to accelerate the decay of traumatic and long-term maladaptive memories.

Keywords: Forgetting. Endocannabinoid system. CB1. Aversive memory. Spatial memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Divisão das memórias de longo prazo em implícitas e explícitas e suas subdivisões..... 16
Figura 2 – Taxonomia simplificada dos tipos de memórias segundo a natureza associativa ou não associativa com alguns exemplos de tarefas comportamentais..... 17
Figura 3 – Esquema representativo das fases em que a memória pode ser dividida..... 20
Figura 4 - Curva hipotética do esquecimento segundo Ebbinghaus..... 27
Figura 5 – Figura representativa dos mecanismos moleculares do esquecimento dependente de Rac1..... 30
Figura 6 – Figura representativa dos mecanismos moleculares do esquecimento dependente da endocitose dos receptores AMPA..... 32
Figura 7 – Figura representativa da sinalização do sistema endocanabinoide..... 36
Figura 8 – Figura representativa da interação entre os sistemas glicocorticoide e endocanabinoide..... 37

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-aracdonil-glicerol

ACEA: arachidonyl-2-cloroetilamida

AEA: anandamida

AMP: adenosina 3',5'-monofosfato

AMPA: ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CA1: corno de Amon sub-região 1

CA3: corno de Amon sub-região 3

CAC: condicionamento aversivo ao contexto

CaMKII: proteína cinase II dependente de Ca^{2+}/calmodulina

CaN: calcineurina

CB1: receptor canabinoide tipo-1

CB2: receptor canabinoide tipo-2

CCK: colecistocinina

CREB: proteína ligadora ao elemento responsivo a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

DGL: diacilglicerol lipase

DP: depotenciação

DSI: supressão da inibição induzida por despolarização

EC: estímulo condicionado

ECs: endocanabinoides

EI: estímulo incondicionado

E-LTP: do inglês *early-long term potentiation* (LTP precoce)

FAAH: ácido graxo amida hidrolase

GABA: ácido gama-aminobutírico

GD: giro dentado

GPCR: do inglês *G-protein-coupled-receptor* (receptor de membrana acoplado a proteína G)

HHA: hipotálamo-hipófise-adrenal

i.p.: intraperitoneal

I-LTD: inibição da LTD

I-mGluR: receptor metabotrópico glutamatérgico do tipo I

L-LTP: do inglês *late-long term potentiation* (LTP tardia)

LO: localização de objetos

LTD: do inglês *long term depression* (depressão de longa duração)

LTM: do inglês *long term memory* (memória de longa duração)

LTP: do inglês *long term potentiation* (potenciação de longa duração)

LVDCC: canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L

MAPK: do inglês *mitogen activated protein kinase*

MGL: monoacilglicerol lipase

mGluR: receptor de glutamato metabotrópico

NAPE-LPD: N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D

NMDA: N-metil-D-aspartato

PKA: proteína quinase dependente de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

PKC: proteína cinase C

PKMζ: proteína quinase C tipo zeta

PLCβ: proteína fosfolipase β

SE: sistema endocanabinoide

SNC: sistema nervoso central

STM: do inglês *short term memory* (memória de curta duração)

TEPT: transtorno do estresse pós-traumático

VGCC: canal de Ca^{2+} dependente de voltagem

WMT: do inglês *water maze test* (Labirinto Aquático de Morris)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 MEMÓRIA 12
1.1.1 Memórias de curta e de longa duração 13
1.1.2 Memórias declarativas e não-declarativas 15
1.1.3 Memórias associativas e não-associativas 16
1.1.4 Memórias aversivas e neutras 18
1.1.5 Fases da memória 20
1.1.6 Plasticidade sináptica 22
1.1.7 Esquecimento 25
1.2 ENDOCANABINOIDES 33
1.3 ENDOCANABINOIDES E MEMÓRIA 38
2 JUSTIFICATIVA 42
3 OBJETIVOS 43
3.1 OBJETIVO GERAL 43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 43
4 ARTIGO CIENTÍFICO 44
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 68
REFERÊNCIAS 70
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY* 87

1 INTRODUÇÃO

Observamos ao longo das últimas décadas um interesse crescente no estudo das bases neurais da aquisição, formação e evocação da memória, em vista de sua aplicabilidade clínica nas áreas de avaliação e reabilitação em psicologia, neurologia e psiquiatria (NADEL; HARDT, 2011). Hoje, dentre os múltiplos campos de estudo na área da neurobiologia da memória, um tópico que merece destaque refere-se à tentativa de caracterizar os fenômenos que levam ao esquecimento das memórias, tanto fisiológico, como patológico.

A partir dos estudos de localização e clonagem do receptor canabinoide tipo 1 (CB1) na década de 1990 (DEVANE *et al*., 1992; HERKENHAM *et al*., 1990; MATSUDA *et al*., 1990), o sistema canabinoide tem atraído grande interesse na pesquisa em neurobiologia e psicofarmacologia da memória, basicamente pela descoberta de que os receptores CB1 estão envolvidos na regulação de diferentes processos celulares e moleculares implicados na plasticidade sináptica no sistema nervoso central (SNC). Por esta razão, atualmente, a manipulação farmacológica do sistema canabinoide em diferentes regiões do SNC é considerada uma importante ferramenta no estudo dos mecanismos neurais subjacentes às diferentes fases da memória (KRUK-SLOMKA *et al*., 2017; VARVEL; LICHTMAN, 2006).

Entretanto, não há estudos na literatura sobre o envolvimento do sistema endocanabinoide no processo de esquecimento das memórias, assim como há pouquíssimo conhecimento de como o esquecimento ocorre. Portanto, esse será o estudo apresentado aqui, e a seguir, apresentaremos os principais fundamentos que o embasam.

1.1 MEMÓRIA

A memória pode ser sucintamente definida como o registro das informações adquiridas através das experiências, estando, assim, intimamente relacionada com a capacidade de aprender. Como as memórias (ou aprendizados) são formadas a partir da nossa percepção das experiências e não do evento em si, a capacidade mnemônica está relacionada com a formação e o desenvolvimento da identidade

própria de cada indivíduo. Ademais, a habilidade de memorização tem grande importância adaptativa às diferentes espécies, pois é a principal ferramenta que permite aos animais modificarem seus comportamentos para interagirem de forma mais eficiente e segura com o ambiente, tanto no presente, como no futuro. Portanto, não é à toa que a capacidade mnemônica é vista como o principal elemento da cognição humana e fica evidente a dimensão e a importância do entendimento deste processo (IZQUIERDO, 2011; KANDEL *et al*., 2014).

Em virtude dessa grande importância do processo mnemônico, diversos tipos fundamentalmente diferentes de memória podem ser formados, cada uma envolvendo diferentes regiões encefálicas, mecanismos e estratégias moleculares para o seu processamento (KANDEL *et al*., 2014). Por isso, uma classificação é importante e necessária, e a mais usual classifica as memórias de acordo com o tempo em que elas estão disponíveis para serem evocadas (curta ou longa duração), com o seu conteúdo (em declarativas ou não-declarativas) e com a sua natureza (associativas ou não-associativas). Elas ainda podem ser classificadas conforme o nível de envolvimento emocional, em memórias aversivas e neutras. As memórias também possuem distintos mecanismos para sua formação, manutenção e modificação, que são organizados em processos denominados fases da memória (IZQUIERDO, 2011; QUILLFELDT, 2006; SQUIRE, 1986).

1.1.1 Memórias de curta e de longa duração

Estamos constantemente sendo bombardeados de informações que são detectadas pelos nossos sentidos. Entretanto, nem todas essas informações serão armazenadas em nosso encéfalo, além de que dentre aquelas que forem retidas, algumas perdurarão mais do que as outras (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011). Assim, as memórias podem ser classificadas segundo a sua duração em memórias de trabalho, memórias de curta duração (STM, do inglês *short term memory*), memórias de longa duração (LTM, do inglês *long term memory*) e memórias remotas.

Acredita-se que a fase da consolidação da memória seja a responsável por selecionar aquelas informações ou experiências relevantes para se reter como memórias, funcionando como um filtro (MCGAUGH, 2000). Além disso, existem

alguns fatores que são essenciais para determinar o tempo de armazenamento das memórias (LALUMIERE; MCGAUGH; MCINTYRE, 2017; MCGAUGH, 2000), como: a importância atribuída às informações, o estado de alerta e a atividade endócrina. A liberação de hormônios relacionados com o estresse (JOËLS; FERNANDEZ; ROOZENDAAL, 2011; SCHWABE *et al*., 2012) e a ativação de certas estruturas encefálicas (como, por exemplo, algumas regiões da amígdala) (ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009), são exemplos de fatores que aumentam o tempo de armazenamento da memória.

A memória de trabalho (memória imediata ou ainda memória operacional) é um tipo de memória de curtíssima duração que tem a finalidade de gerenciar a realidade. A informação que está sendo processada é mantida durante alguns segundos, a fim de que se dê continuidade aos atos que estão sendo executados. Este tipo de memória não deixa traços e não produz registros duradouros, assim como não produz alterações bioquímicas importantes. Seu processamento depende basicamente da atividade elétrica dos neurônios do córtex pré-frontal. O exemplo clássico da memória de trabalho é quando memorizamos um número de telefone e o esquecemos logo após discá-lo (DIAMOND, 2013; IZQUIERDO, 2011).

Já as memórias de curta e de longa duração produzem alterações estruturais e bioquímicas em sinapses específicas nas estruturas encefálicas que correspondem àquela memória que está sendo formada. Por isso, essas memórias são mais duradouras que a memória de trabalho. Normalmente, a STM dura algumas horas, enquanto a LTM pode perdurar por dias, meses ou anos, sendo essas memórias o foco do presente estudo. Devido a essa diferença temporal, durante décadas buscou-se compreender se a LTM seria uma decorrência da STM ou se os dois fenômenos aconteciam paralelamente (NORRIS, 2017). Izquierdo e colaboradores (1998a, 1998b, 1999) demonstraram que estes dois tipos de memória compartilham estruturas nervosas, mas possuem mecanismos próprios e distintos, sendo assim, eles são processos paralelos e um não ocorre em decorrência do outro (MEDINA; SCHRÖDER; IZQUIERDO, 1999; VIANNA *et al*., 2000).

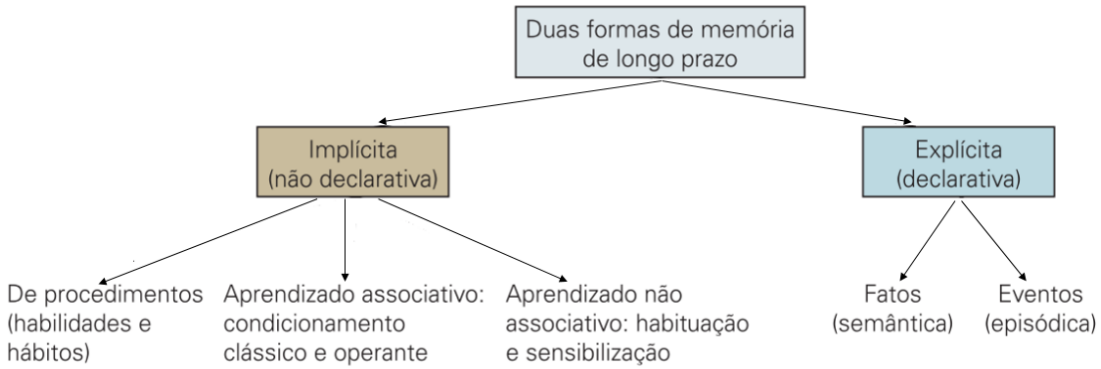
Há ainda as memórias remotas que podem perdurar por toda a nossa vida, como as memórias da infância. Esse tipo de memória está relacionado a um fator emocional e é muito resistente a manipulações e possíveis tratamentos. Muitas das memórias remotas são memórias de medo, pois foram adquiridas a partir de eventos traumáticos (BERGSTROM, 2016).

1.1.2 Memórias declarativas e não-declarativas

As memórias de longa duração podem ser divididas em declarativas e não-declarativas (Fig. 1). As memórias declarativas, também denominadas memórias explícitas, são aquelas relacionadas a fatos (memória semântica) ou eventos (memória episódica). As memórias declarativas semânticas correspondem a conceitos e conhecimentos gerais e não apresentam nenhuma relação com experiências vividas. Já as memórias declarativas episódicas estão relacionadas com eventos vividos pelos indivíduos e são todas autobiográficas. Ambas são evocadas conscientemente por isso, esse é o tipo de memória a que se refere a maior parte do corpo de conhecimento que se tem hoje na área da neurobiologia da memória. Essas memórias têm o hipocampo como estrutura central (KANDEL *et al*., 2014; SQUIRE, 1986; SQUIRE; DEDE, 2015). As memórias estudadas neste trabalho podem ser classificadas como memórias declarativas episódicas.

Já as memórias não-declarativas, também denominadas memórias implícitas ou procedurais, são aquelas relacionadas a habilidades motoras e sensoriais, hábitos, aprendizado emocional, bem como, formas de aprendizado reflexo. Sendo assim, este tipo de memória envolve um conhecimento de natureza reflexa, sem exigir reflexão. Exemplos de memória desse tipo são aprender a dirigir, tocar um instrumento ou praticar algum esporte. Em geral, estão relacionadas com movimentos necessários para realizar alguma ação, acessíveis através do desempenho, e é difícil descrever essas memórias, ou mesmo acessá-las conscientemente. Por isso, seus mecanismos celulares e moleculares são mais difíceis de serem acessados para fins de pesquisa. Apesar disso, sabe-se que seu processamento ocorre principalmente por regiões encefálicas como os núcleos da base e o cerebelo e que o registro desse tipo de memória é duradouro, pois resulta de um esforço ativo, acompanhado por repetições (SQUIRE, 1986; SQUIRE; DEDE, 2015).

Figura 1 - Divisão das memórias de longo prazo em implícitas e explícitas e suas subdivisões

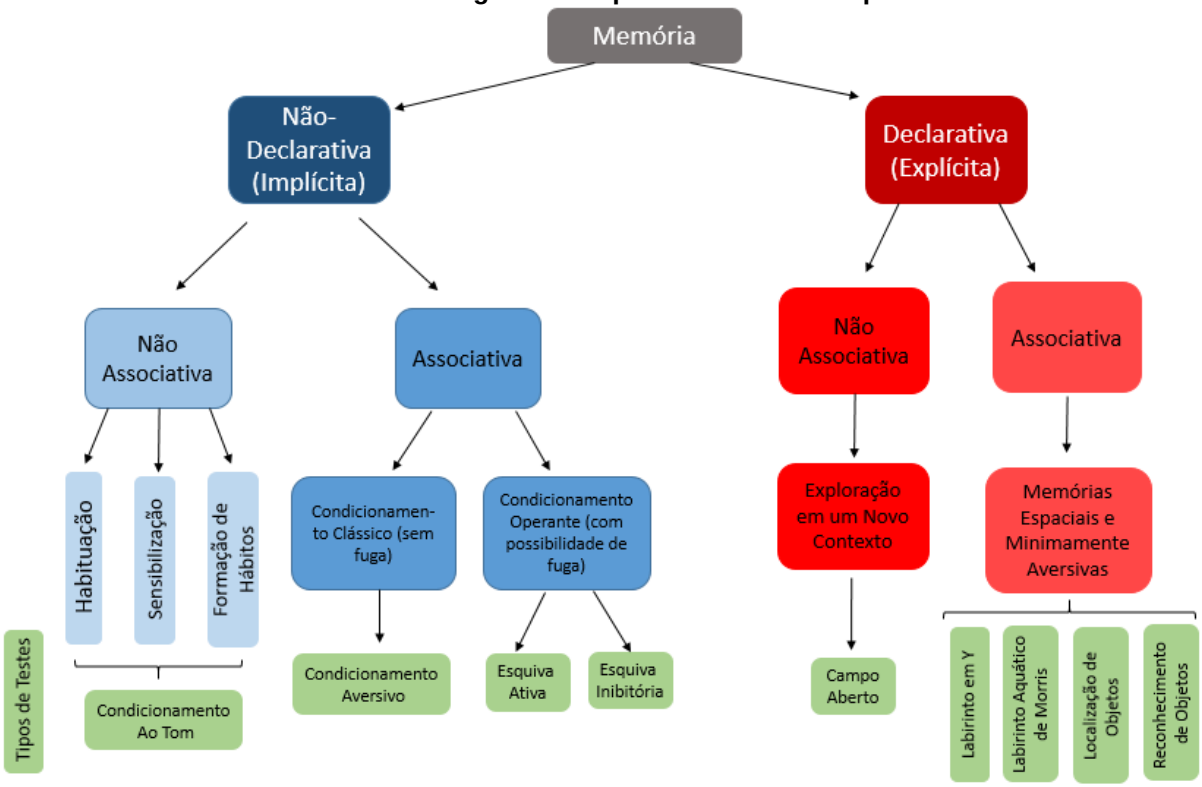


A memória de longa duração pode ser didaticamente dividida em: memória declarativa (também conhecida como memória explícita), que corresponde às memórias que estão prontamente acessíveis à nossa consciência e que podem ser evocadas através de palavras; e memória não declarativa (também conhecida como memória implícita), que correspondem às memórias que estão em nível subconsciente, não podendo ser evocadas por palavras, mas sim por ações. Fonte: Adaptado de KANDEL *et al*. (2014, p. 1261).

1.1.3 Memórias associativas e não-associativas

As memórias associativas e não-associativas são derivadas de aprendizados: no aprendizado não-associativo, os indivíduos aprendem acerca das propriedades de um único estímulo, e no aprendizado associativo, aprendem a relação entre dois estímulos ou entre um estímulo e um comportamento, gerando uma resposta condicionada (KANDEL *et al*., 2014). Podemos estudar essas memórias submetendo modelos animais a diversas metodologias, como a habituação e sensitização, exemplos de aprendizagem não-associativa, e o condicionamento Pavloviano clássico e o condicionamento operante, exemplos de aprendizagem associativa (Fig. 2).

Figura 2 - Taxonomia simplificada dos tipos de memórias segundo a natureza associativa ou não associativa com alguns exemplos de tarefas comportamentais



As memórias declarativas podem ser divididas em associativas e não-associativas. A memória associativa engloba as associações entre dois estímulos (condicionamento clássico) ou entre uma resposta e um estímulo (condicionamento operante). Já a memória não-associativa está presente em dois processos importantes da aprendizagem: a habituação, em que um estímulo repetido deixa de produzir uma resposta, e a sensibilização, na qual a apresentação prévia de um estímulo faz com que outra apresentação subsequente acarrete uma resposta mais exagerada. A habituação e a sensibilização são consideradas consequência da formação de memórias não-associativas porque nelas um único estímulo faz parte do processo de aprendizagem. Fonte: Adaptado de QUILLFELDT (2006, p. 2).

Na habituação o indivíduo é exposto repetidamente a determinado estímulo como, por exemplo, um ruído. Com o passar do tempo o indivíduo tende a enfraquecer a resposta ao estímulo ou não responder mais a este. Na sensitização, o indivíduo é exposto a um estímulo aversivo, apresentando uma resposta alterada quando exposto a outro estímulo, devido à aversividade do primeiro (KANDEL *et al*., 2014).

O condicionamento clássico consiste na associação entre um estímulo inicialmente neutro (Estímulo Condicionado — EC), como um contexto ou um tom, com um estímulo que naturalmente produz uma resposta comportamental, autonômica e endócrina (Estímulo Incondicionado — EI), como um choque ou um alimento. A partir da força emocional ou da repetição dessa associação, a apresentação do EC se torna suficiente para desencadear as respostas biológicas

que antes surgiam somente com a apresentação do EI, como o comportamento de congelamento, maior taxa de batimentos cardíacos e liberação de hormônios. Essas respostas que agora se tornaram condicionadas são utilizadas para avaliar se houve ou não o aprendizado e a formação e retenção da memória (FENDT; FANSELOW, 1999; GEWIRTZ; DAVIS, 2000; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; NIJSEN *et al*., 1998; YOUNG; LEATON, 1994).

Já no condicionamento operante, o aprendizado se dá pela associação entre um comportamento emitido e um estímulo, que pode ser uma recompensa ou uma punição. Por exemplo, se um animal pressiona uma barra e recebe alimento, ele aumenta a expressão do comportamento de apertá-la. Ao passo que, se um animal é colocado em um ambiente claro, e ao passar para um contexto escuro (considerado mais seguro por ele), recebe um choque, ele irá demorar mais para ir para o ambiente escuro novamente. Dessa forma, nesse tipo de aprendizado é avaliado o aumento ou a diminuição da exibição do comportamento (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; QUILLFELDT, 2006).

1.1.4 Memórias aversivas e neutras

As memórias associativas ainda podem ser classificadas conforme a valência emocional envolvida com o aprendizado. Assim, se há um componente emocional negativo associado com a experiência, será formada uma memória aversiva e se não há um componente emocional envolvido será formada uma memória neutra.

As memórias aversivas, também chamadas de memórias de medo, podem ser formadas, por exemplo, pelo condicionamento clássico e operante explicados anteriormente. Essas memórias costumam ser fortes e persistentes, pois é de grande relevância para a sobrevivência do organismo lembrar de experiências associadas a elementos negativos, preparando-o para evitar uma futura condição nociva. Apesar de importantes para nossa adaptação e proteção, em certos casos as memórias de medo são mal adaptativas e estão envolvidas no desencadeamento de transtornos de ansiedade, como o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; LEDOUX, 2000). Essas experiências que envolvem uma valência emocional negativa, normalmente são situações de estresse, as quais recrutam a participação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

(HHA) e do sistema glicocorticoide para a sua retenção (JOHANSEN *et al*., 2011; LONERGAN *et al*., 2013; SANDERSON, 2006; WOLF *et al*., 2016).

A amígdala e o córtex pré-frontal medial podem ser considerados as principais estruturas encefálicas relacionadas com as memórias aversivas. A amígdala é essencial para a aquisição e expressão de medo (DUVARCI; PARE, 2014; LEDOUX, 2000; QUIRK; REPA; LEDOUX, 1995). Já o córtex pré-frontal medial é considerado um modulador da memória de medo, diminuindo ou aumentando a expressão de medo (MORGAN; LEDOUX, 1995; PRESTON; EICHENBAUM, 2013). Porém, o hipocampo, apesar de não receber projeções diretas relacionadas a estímulos aversivos, também participa do processamento de memórias aversivas através da comunicação com a amígdala (GOOSENS, 2011).

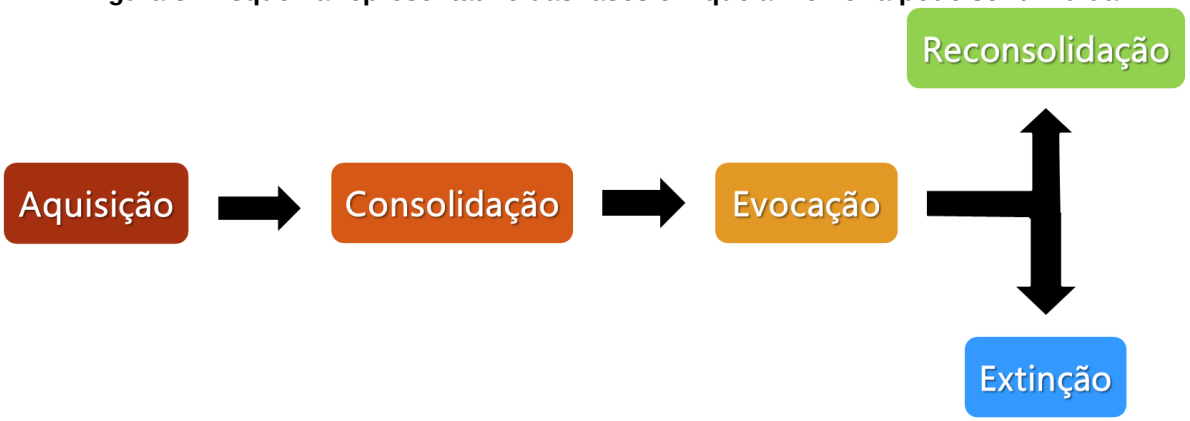
Justamente pela falta do componente emocional, as memórias neutras não costumam ser tão fortes como as memórias aversivas e, até por isso, vão sendo esquecidas com o simples passar do tempo (CHRISTIANSON, 1992). Exemplos dessas memórias são as que proporcionam localização própria e de objetos no espaço com o uso de pistas externas ao organismo. Diversas tarefas foram desenvolvidas para avaliar a memória espacial e de referência de roedores, dentre as quais está a de localização de objetos (LO). A tarefa de LO é baseada na tendência natural dos roedores explorarem mais as novidades do ambiente, como elementos em posições diferentes, do que aqueles presentes no mesmo local. Assim, a preferência por um objeto cuja localização foi alterada reflete a memória acerca do ambiente. Visto que não há estímulos que reforcem a exploração, é formada uma memória neutra (DIX; AGGLETON, 1999; ENNACEUR; DELACOUR, 1988; VOGEL-CIERNIA; WOOD, 2014).

O hipocampo é a principal estrutura encefálica responsável pela formação de memórias declarativas com um componente espacial e contextual (MUMBY *et al*., 2002). Essa estrutura possui algumas populações neuronais com padrões de ativação que permitem uma organização espacial e temporal de eventos, sendo ativadas conforme a localização do animal ou em tempos definidos. Acredita-se que isso permita a codificação de objetos e eventos em determinados locais, com distinção de uma sequência temporal (BELLMUND *et al*., 2018; TAKAHASHI, 2018). As informações espaciais ou contextuais também podem chegar à amígdala através de projeções do hipocampo para essa estrutura (ARDESHIRI; HOSSEINMARDI; AKBARI, 2019; MALIN; MCGAUGH, 2006; WAHLSTROM *et al*., 2018).

1.1.5 Fases da memória

A memória não é um processo único, sendo dividida em fases distintas e bem estabelecidas, cada uma com suas próprias características (Fig. 3). Resumidamente, após o aprendizado (aquisição), a informação é lentamente estabilizada e armazenada (consolidação) ficando disponível para futuramente ser lembrada (evocação) (IZQUIERDO, 2011). Com a evocação, a memória é desestabilizada, podendo desencadear duas fases responsáveis por modular a memória original, a reconsolidação e a extinção (NADER; HARDT, 2009). E, por último, há a fase do esquecimento, responsável por remover grande parte das memórias indesejadas e desnecessárias, garantindo, assim, a funcionalidade geral dos processos mnemônicos (HARDT; NADER; NADEL, 2013).

Figura 3 - Esquema representativo das fases em que a memória pode ser dividida



Pode-se contextualizar a memória como a capacidade de codificar, consolidar e acessar as informações disponíveis no sistema nervoso central. Assim, a memória pode ser dividida nas seguintes etapas: (1) aquisição, um período que dura de segundos a poucos minutos (de exposição à experiência); (2) consolidação, período suscetível a modulações, mas que permite a fixação do traço mnemônico; e (3) evocação, capacidade de acessar a memória armazenada. A evocação pode levar a dois outros processos, a reconsolidação e a extinção (IZQUIERDO, 2011). A fase do esquecimento não é retratada, pois não se sabe exatamente em que momento esse fenômeno pode ocorrer (HARDT; NADER; NADEL, 2013). Fonte: elaborada pelo autor.

A aquisição refere-se ao período de tempo entre a percepção de estímulos provenientes de uma experiência e o momento em que esses estímulos são codificados (IZQUIERDO, 2011). Esse processo dura de segundos a poucos minutos e resulta na codificação das informações adquiridas em redes neurais, gerando uma representação interna da experiência, chamada de engrama. A

aquisição é também chamada de treino, referindo-se ao momento da pesquisa experimental em que os animais devem aprender uma tarefa para, a partir desse aprendizado, formar uma memória (DUDAI, 2004).

Assim que adquirida, a representação da memória está em um estado instável, suscetível a modificações. Porém, através do processo de consolidação, o traço vai sendo estabilizado ao longo do tempo e se torna mais resistente a interferências, sendo realmente armazenado (DUDAI, 2004). O tempo transcorrido entre a aquisição e a estabilização de uma memória é conhecido como "Janela de Consolidação" que tem uma duração de cerca de 6h (CASAGRANDE *et al*., 2018; MCGAUGH, 1966, 2015). Durante este período o traço mnemônico pode ser estabilizado ou enfraquecido, sendo que qualquer evento que prejudique o processo de estabilização afetará a sua persistência (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; MCGAUGH; PETRINOVICH, 1965). Eventos celulares e moleculares, como cascatas de sinalização intracelular, modulações da expressão gênica e síntese proteica levam à formação de novas sinapses e à reestruturação e ao fortalecimento das sinapses preexistentes dos neurônios que codificam o traço da memória. Todo esse processo ocorre principalmente no hipocampo, mas também em outras estruturas encefálicas como a amígdala, e são os mecanismos subjacentes ao processo de consolidação (DUDAI, 2004; IZQUIERDO *et al*., 2006; KANDEL, 2001, 2014). Os componentes efetores da formação do traço de memória são neurônios glutamatérgicos e interneurônios inibitórios GABAérgicos e o ajuste fino destas sinapses é realizado pela ativação de outros sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores, como o sistema endocanabinoide, sistema colinérgico e sistema glicocorticoide que agem como moduladores destes circuitos (IZQUIERDO *et al*., 2006; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011).

Após o processo de retenção, poderemos evocar as memórias, processo que diz respeito ao retorno espontâneo ou voluntário das informações armazenadas (IZQUIERDO, 2011). Assim, a evocação refere-se ao ato de lembrar, sendo o processo que demonstra se de fato um traço mnemônico foi formado e armazenado. Experimentalmente, esse processo, também chamado de reativação, é induzido através da apresentação de dicas da memória, ou seja, quando um EC (por exemplo, contexto ou tom) é apresentado na ausência do EI (por exemplo, um choque). Dependendo do tempo de reexposição ao EC (dentre outros fatores) dois processos antagônicos podem ser desencadeados (SUZUKI *et al*., 2004): a

reconsolidação (LEE; EVERITT; THOMAS, 2004; NADER; HARDT, 2009) ou a extinção (BOUTON, 2004; CAMMAROTA *et al*., 2005).

Através de breves reexposições ao EC a memória pode passar de um estado estável (portanto, insensível a alterações) para um estado instável ou lábil (TRONSON; TAYLOR, 2007). Esse processo é chamado de desestabilização da memória (LEE; FLAVELL, 2014; SUZUKI *et al*., 2008). Após ser desestabilizada, a memória poderá ser fortalecida, enfraquecida, modificada ou mantida através do processo de reconsolidação (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2013; LEE, 2009). Com isso a memória é reestabilizada tornando-se novamente insensível a interferências.

Já a extinção é desencadeada por uma longa reexposição ao EC na ausência do EI, de forma a permitir o aprendizado de que ambos os estímulos não estão mais associados. Com isso ocorre a formação de uma nova memória com significado distinto da memória original e que a inibe transitoriamente, entretanto, sem apagá-la (BOUTON, 2004; CAMMAROTA *et al*., 2005; FURINI; MYSKIW; IZQUIERDO, 2014). Em razão disso, a extinção falha em suprimir respostas de medo permanentemente (VERVLIET; CRASKE; HERMANS, 2013). Isso ocorre, pois a memória de extinção, ao contrário de memórias aversivas, tende a perder sua intensidade com o passar do tempo. Com isso a memória de medo volta a se expressar, fenômeno chamado de recuperação espontânea (RESCORLA, 2004). Além do enfraquecimento relacionado a passagem do tempo, fatores espaciais e sensoriais também são capazes de induzir o retorno da expressão do medo e refletem a natureza frágil da memória de extinção (EFFTING; KINDT, 2007; WESTBROOK *et al*., 2002).

1.1.6 Plasticidade sináptica

A partir do momento da aquisição da memória (momento do treino ou do aprendizado), as informações que estão sendo recebidas estimulam processos de plasticidade a nível das sinapses, que têm duração de minutos a algumas horas. Essa plasticidade sináptica se refere às mudanças pré e/ou pós-sinápticas que influenciam a comunicação neuronal, causando aumento ou diminuição na resposta ao estímulo original. Assim, quando ocorre um aumento da resposta pós-sináptica ao mesmo estímulo, está acontecendo uma potenciação de longa duração (do inglês *Long Term Potentiation* — LTP), enquanto uma diminuição da resposta corresponde

ao fenômeno da depressão de longa duração (do inglês *Long Term Depression* — LTD). Essas duas formas de plasticidade sináptica estão intimamente relacionadas com a formação, persistência e manutenção da memória (NABAVI *et al*., 2014; STEVENS, 1998; WHITLOCK *et al*., 2006).

A LTP é um fenômeno que permite o fortalecimento de sinapses, resultando em um aumento na comunicação entre neurônios. Seus mecanismos moleculares convergem com os mecanismos de formação da memória, sendo, por isso, considerada o correlato eletrofisiológico da memória e a base celular das memórias de longa duração (KANDEL, 2001; WHITLOCK *et al*., 2006). Apesar de se expressar em diferentes regiões encefálicas, a LTP no hipocampo é a mais conhecida e estudada por sua relação direta com a consolidação (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO; MEDINA, 1995; WHITLOCK *et al*., 2006). Como já dito anteriormente, a consolidação da memória no hipocampo é mediada principalmente por sinapses excitatórias glutamatérgicas, mais especificamente localizadas entre as regiões hipocampais CA3 e CA1 (corno de Amon sub-região 1 e 3) (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; LÜSCHER; MALENKA, 2012). Essas conexões constituem a via colateral de *Schaffer* (SZIRMAI; BUZSÁKI; KAMONDI, 2012).

Sendo assim, a partir de um estímulo que cause a despolarização de neurônios pré-sinápticos da via colateral de *Schaffer*, ocorrerá a liberação de glutamato na fenda sináptica e os receptores AMPA do neurônio pós-sináptico serão ativados causando uma corrente despolarizante pelo influxo de Na^+. A despolarização inicial da célula pós-sináptica promove a remoção do íon Mg^{2+} dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) que permite o influxo de Ca^{2+} e Na^+. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} — o fator-chave para a ocorrência da LTP — ativa diversas enzimas, tais como, a proteína quinase dependente de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) (PKA), a proteína cinase C (PKC) e a proteína cinase II dependente de Ca^{2+}/calmodulina (CaMKII). A ativação das proteínas cinases pode levar a fosforilação de diversas outras proteínas, como dos receptores ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônicos (AMPA), aumentando a condutância desses receptores e estimulando a inserção destes à densidade pós-sináptica. Com isso, ocorre um aumento da responsividade ao glutamato — ou seja, uma potencialização da célula pós-sináptica

(LÜSCHER; MALENKA, 2012; MALENKA; BEAR, 2004) — e modificações morfológicas no espinho dendrítico (BOSCH *et al*., 2014; KASAI *et al*., 2010).

Dependendo do estímulo, processos moleculares diferentes podem ser induzidos, levando a expressão de duas formas de LTP: a LTP transitória, que pode decair até o estado basal em poucas horas (conhecida como fase precoce da LTP ou E-LTP) e que está relacionada com a memória de curto prazo; ou a LTP persistente, que pode durar várias horas ou dias (LTP tardia ou L-LTP), um análogo celular da memória de longo prazo (BOSCH *et al*., 2014). Com a E-LTP os eventos iniciais, explicados no parágrafo anterior, induzem um remodelamento do citoesqueleto dos espinhos dendríticos, o tráfego de AMPAR para a densidade pós-sináptica e a síntese de proteínas. Porém, esses processos envolvem apenas alterações nas proteínas preexistentes. Já com a indução de uma L-LTP duradoura, os eventos iniciais induzem a ativação de fatores de transcrição (como o CREB — proteína ligadora ao elemento responsivo a AMPc), levando tanto a tradução local quanto a transcrição de genes nucleares (SACHSER *et al*., 2017). Ocorre inclusive a síntese de novos AMPARs que serão incorporados às sinapses (LÜSCHER; MALENKA, 2012; MALENKA; BEAR, 2004; NAYAK *et al*., 1998), cuja estabilização na densidade pós-sináptica (especialmente da sua subunidade GluA2) é considerado o principal fator responsável pela manutenção da memória ao longo do tempo (MIGUES *et al*., 2010). Além disso, logo após a aquisição da memória ou a indução da LTP, uma enzima chamada proteína quinase C tipo zeta (PKMζ) é traduzida e transportada para o espinho dendrítico. Essa enzima é essencial para a estabilização do GluA2-AMPAR na densidade pós-sináptica, sendo assim, essencial para a manutenção da memória (MIGUES *et al*., 2010; PASTALKOVA *et al*., 2006; YAO *et al*., 2008).

Logo, a LTP promove alterações funcionais e estruturais nas sinapses, tais como aumento da sensibilidade pós-sináptica a glutamato, elevação no número e superfície de espinhos dendríticos e modificação da morfologia dos espinhos (LÜSCHER; MALENKA, 2012). Tipicamente, a LTP é dependente da ativação de NMDARs. No entanto, em algumas sinapses ela é induzida sem o envolvimento desses receptores. Outras formas de LTP podem envolver a ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VGCCs) (NICHOLSON; KULLMANN, 2017; WEON; KIM; YOUN, 2017), receptores de glutamato permeáveis a cálcio (PARK *et al*., 2016)

ou receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) (HEGEMANN; ABRAHAM, 2019).

Já com a LTD ocorre um enfraquecimento da conexão sináptica. Como a LTP, a LTD também pode depender da ativação de NMDARs ou não (MALENKA; BEAR, 2004). Baseando-se no hipocampo, a LTD dependente de NMDARs se dá com a entrada de Ca^{2+} em baixa quantidade. Com o influxo modesto de Ca^{2+}, são ativadas fosfatases, como a calcineurina e a proteína fosfatase 1, que dentre outras coisas, desfosforilam GluA1, levando a endocitose de AMPARs da membrana (BEATTIE *et al*., 2000; LEE *et al*., 1998; LÜSCHER; MALENKA, 2012; MALENKA; BEAR, 2004). Isso acaba por diminuir o tamanho dos espinhos dendríticos, enfraquecendo a sinapse (NÄGERL *et al*., 2004; WANG; YANG; ZHOU, 2007; ZHOU; HOMMA; POO, 2004). A LTD é extremamente importante para contrabalancear a LTP, pois caso o aumento na força sináptica não fosse interrompido, as sinapses atingiriam um teto de eficiência, que inibiria a codificação de informação (PURVES *et al*., 2008).

Além da LTD, há outra forma de plasticidade, conhecida como depotenciação (DP), que também contrabalança a LTP. Assim, a depotenciação faz com que as sinapses que foram recentemente potencializadas, voltem a seu estado basal. A LTD e a DP são muito parecidas, podendo, inclusive, serem induzidas por protocolos eletrofisiológicos muito parecidos. Porém, a diferença básica entre as duas, é que a LTD causa um enfraquecimento da sinapse abaixo do basal, enquanto a DP reverte a potencialização causada pela LTP, até níveis basais. Molecularmente esses dois tipos de plasticidade também são muito parecidos. Há algumas evidências que sugerem sutis diferenças moleculares entre eles, porém, no fim os dois acabam levando a internalização dos receptores AMPA e ao enfraquecimento da sinapse (SANDERSON, 2012). A LTD e/ou a DP podem ser consideradas as bases moleculares subjacentes ao esquecimento ativo (HARDT; NADER; NADEL, 2013; RICHARDS; FRANKLAND, 2017; SACHSER *et al*., 2016, 2017).

1.1.7 Esquecimento

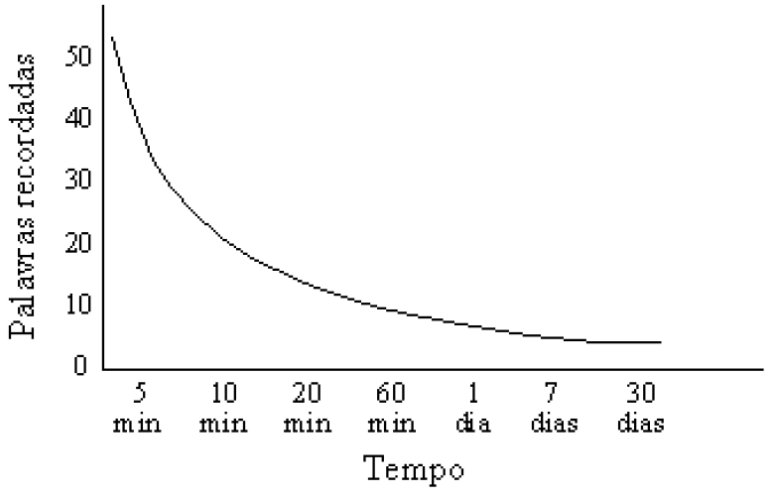
O esquecimento pode ser definido como o fenômeno pelo qual informações armazenadas deixam de estar disponíveis para serem utilizadas. Como a maioria

das memórias formadas durante o dia são irrelevantes, o processo de esquecimento irá garantir que grande parte dessas memórias indesejadas e desnecessárias sejam removidas, não sobrecarregando o sistema mnemônico e garantindo, assim, a sua funcionalidade. Além disso, o processo de esquecimento nos permite fazer generalizações e abstrações, essenciais para a nossa adaptação ao ambiente em constante mudança. Por esse motivo é amplamente aceito entre os psicólogos cognitivos e neurobiólogos que o esquecimento é tão importante quanto a memorização (DAVIS; ZHONG, 2017; HARDT; NADER; NADEL, 2013; PERGHER; STEIN, 2003; RICHARDS; FRANKLAND, 2017). Ademais, o esquecimento ganha destaque na patologia de muitas doenças neurológicas, em especial na doença de Alzheimer. No entanto, pouco se sabe sobre como uma memória é esquecida tanto em condições fisiológicas como patológicas.

Há muitos anos os psicólogos experimentais estudam o processo de esquecimento. Assim, várias teorias já foram desenvolvidas para explicar a perda da memória ao longo do tempo. Dentro da área da psicologia pode-se dividir essas teorias naquelas que consideram o esquecimento como uma perda definitiva do traço físico da memória e nas que consideram haver uma incapacidade/dificuldade de evocação. A principal representante do primeiro grupo é a Teoria da Deterioração, enquanto a Teoria da Falha de Evocação se enquadra no segundo grupo. Já a Teoria da Interferência pode ser enquadrada em ambos os grupos, dependendo da definição considerada (PERGHER; STEIN, 2003; WIXTED, 2004).

A investigação do processo de esquecimento inicia a partir dos estudos pioneiros de Ebbinghaus, no final do século XIX. Uma das contribuições mais conhecidas de Ebbinghaus é a curva de esquecimento (Fig. 4), onde ele demonstrou que a maior parte do esquecimento ocorre nos primeiros momentos logo após a aprendizagem. Embora Ebbinghaus tenha replicado sua curva em diversos experimentos que utilizavam metodologias diferentes, muitos estudos demonstraram que essa curva do esquecimento não ocorria da mesma forma para todos os tipos de informações (BAHRICK; BAHRICK; WITTLINGER, 1975; FLEISHMAN; PARKER JR., 1962). Assim, as propostas teóricas desenvolvidas por Ebbinghaus tiveram pouca aplicabilidade, mas seus experimentos forneceram as bases para a formulação de outras teorias, como a Teoria da Deterioração (BADDELEY, 1990; PERGHER; STEIN, 2003).

Figura 4 - Curva hipotética do esquecimento segundo Ebbinghaus



Há um rápido declínio da memória logo após a primeira recordação perfeita de uma lista de palavras (ou sílabas sem sentido), com uma posterior diminuição da taxa de esquecimento até o ponto em que determinadas informações não são mais esquecidas. Curva não desenhada em escala. Fonte: PERGHER; STEIN (2003, p. 133).

A Teoria da Deterioração postula que, com a passagem do tempo, as memórias enfraquecem, desaparecendo gradualmente até serem apagadas por completo, havendo, portanto, uma perda do traço mnemônico. Assim, segundo essa teoria, aquelas memórias que são frequentemente evocadas, porque são mais úteis ou mesmo mais fortes (emocionalmente, por exemplo), serão mais dificilmente esquecidas do que aquelas que raramente são lembradas (HARDT; NADER; NADEL, 2013; PERGHER; STEIN, 2003; WIXTED, 2004). A explicação seria que “cada nova repetição criará novas ligações entre a memória e o presente contexto, como também irá fortalecer associações já existentes” (SCHWARTZ; REISBERG, 1991, p. 530). Isso facilitará o acesso às informações na rede mnemônica, possibilitando uma evocação mais eficiente e por fim fortalecerá essa memória. Esta é uma forma simples, mas apropriada e adaptativa, de selecionar quais informações serão retidas ou esquecidas. Assim sendo, a primeira explicação para o processo de esquecimento de informações é: use-as ou perca-as (PERGHER; STEIN, 2003). Embora a Teoria da Deterioração pareça ser razoável, em função de sua simplicidade e aparente coerência, existem muitos achados que mostram que a passagem do tempo e o “uso ou desuso” da memória não são os únicos determinantes do esquecimento (BADDELEY, 1990; JENKINS; DALLENBACH, 1924; MCGEOCH; MCDONALD, 1931).

Um outro modelo explicativo do esquecimento também se baseia no “uso e desuso” das memórias. Porém, essa teoria defende que o desuso das memórias as

tornariam mais difíceis de serem acessadas, o que configuraria o esquecimento. Há dois testes experimentais que servem de suporte à Teoria da Falha de Evocação, o efeito de reminiscência e a apresentação de dicas (PERGHER; STEIN, 2003). O efeito de reminiscência pode ser caracterizado como uma maior lembrança de determinada memória quanto mais vezes se tenta recordar essa memória (BALLARD, 1913). E a apresentação de dicas faz com que uma memória que não podia ser lembrada anteriormente através de uma recordação geral, seja rapidamente evocada (TULVING; PSOTKA, 1971). Esses dois testes indicam que o esquecimento não é devido à perda do traço físico da memória, mas sim a uma dificuldade de acessá-lo.

O fenômeno da dependência de estado também pode ser enquadrado na Teoria da Falha de Evocação. Esse fenômeno ocorre quando a memória somente pode ser evocada mediante a recriação das condições específicas presentes no momento da aquisição. Essas condições podem ser internas, como um tônus hormonal e neuro-humoral, e externas, como a presença de algum odor, sabor ou a visualização de algo. Assim, as memórias submetidas à dependência de estado ficam inacessíveis à evocação se essas condições internas e externas não estão presentes, como se tivessem sido esquecidas (IZQUIERDO, 1984).

Já a Teoria da Interferência, formulada, em 1894, por Muller e Schumann, postula que esquecemos as informações em virtude da influência de algumas memórias sobre outras. Eles foram os pioneiros em demonstrar experimentalmente que a aprendizagem de uma informação nova pode interferir em uma aprendizagem anterior, o que ficou conhecido como interferência retroativa, assim como uma aprendizagem anterior pode interferir na aquisição de uma nova informação, fenômeno conhecido como interferência proativa (PERGHER; STEIN, 2003; WIXTED, 2004). Acredita-se que o esquecimento devido a essas interferências ocorra devido a uma perturbação na estabilização dos traços enquanto eles estão sendo adquiridos, consolidados ou evocados (momento em que a memória está instável/lábil). Assim, devido a essa perturbação, a memória não é estabilizada corretamente, o que acaba induzindo o seu esquecimento (nesse caso, a deterioração do traço mnemônico) (DAVIS; ZHONG, 2017; HARDT; NADER; NADEL, 2013). Existe outro tipo de interferência, chamada de competição de resposta e defendia por J. A. McGeoch. Ele propõe que como estamos continuamente armazenando memórias similares, na hora de recordar uma dessas

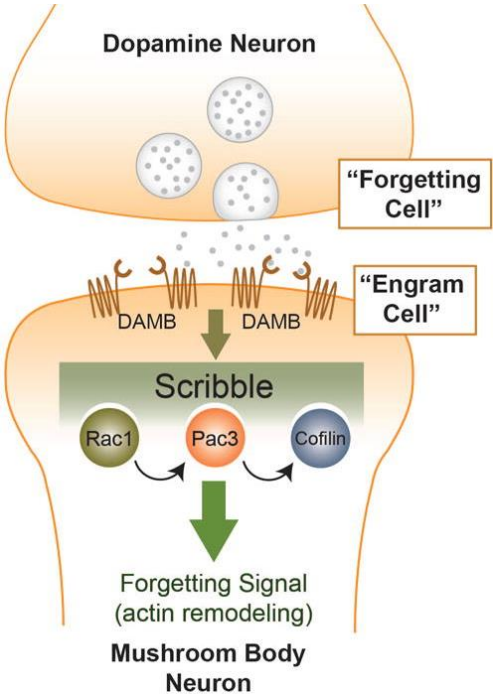
memórias, ocorrerá uma competição para serem evocadas. No fim, somente uma memória é evocada, levando ao fortalecimento dessa memória e ao enfraquecimento das demais — ou seja, as demais se tornariam mais difíceis de serem acessadas (DAVIS; ZHONG, 2017; MCGEOCH, 1942).

Todas essas teorias descritas até aqui podem ser definidas como um esquecimento passivo, pois elas descrevem o processo de esquecimento como decorrente de uma falha na evocação, devido a perturbações durante os processos mnemônicos ou devido ao desuso. Nenhumas dessas teorias considera o cérebro como tendo a capacidade de recrutar mecanismos celulares e moleculares para levar ao esquecimento. Assim, somente há poucos anos com o advento dos neurobiólogos às pesquisas sobre esquecimento, começou-se a entender o processo de esquecimento como um mecanismo neuronal, celular e molecular bem organizado, que remove sistematicamente aquelas memórias que deixaram de ser relevantes (ou suprime a sua acessibilidade), sendo, portanto, um processo ativo (DAVIS; ZHONG, 2017; HARDT; NADER; NADEL, 2013; RICHARDS; FRANKLAND, 2017). Considera-se que o processo de esquecimento ativo pode levar tanto a uma dificuldade de evocação da memória, como a degradação do traço mnemônico. Pensa-se que o que deve ocorrer é uma degradação transitória das sinapses de um engrama, assim primeiramente esse engrama se torna inacessível (pela deterioração de sinapses que armazenam informações essenciais para evocar essa memória, por exemplo, sobre o contexto) e mais tarde ele se deteriorará por completo (HARDT; NADER; NADEL, 2013). Atualmente já foram identificadas duas cascatas celulares e moleculares que embasam a existência do esquecimento ativo: o esquecimento dependente de Rac1 e o dependente da endocitose dos receptores AMPA (DAVIS; ZHONG, 2017).

O esquecimento dependente de Rac1, foi demonstrado principalmente em *Drosophila melanogaster* (BERRY *et al*., 2012; CERVANTES-SANDOVAL *et al*., 2016; DONG *et al*., 2016; SHUAI *et al*., 2010, 2011), e as evidências sugerem que esse processo inicia a partir da sinalização mediada por neurônios dopaminérgicos (chamados por alguns como “células do esquecimento”). Assim, após a liberação de dopamina essa irá se ligar aos receptores dopaminérgicos (DAMB) localizados na membrana pós-sináptica de neurônios essenciais para a formação e manutenção da memória (no caso da *Drosophila*, *mushroom body neurons* — MBn) (BERRY *et al*., 2012; SHUAI *et al*., 2011). Esse sinal será comunicado para um complexo de

sinalização composto pela Rac1, Pac3 e cofilina, unido através de uma proteína de suporte (em inglês, *scaffold)* chamada Scribble, e ativação dessa via de sinalização irá levar ao esquecimento ativo através do remodelamento do citoesqueleto de actina (todo esse processo está ilustrado na figura 5, abaixo) (CERVANTES-SANDOVAL *et al*., 2016; DAVIS; ZHONG, 2017; SHUAI *et al*., 2010).

Figura 5 – Figura representativa dos mecanismos moleculares do esquecimento dependente de Rac1

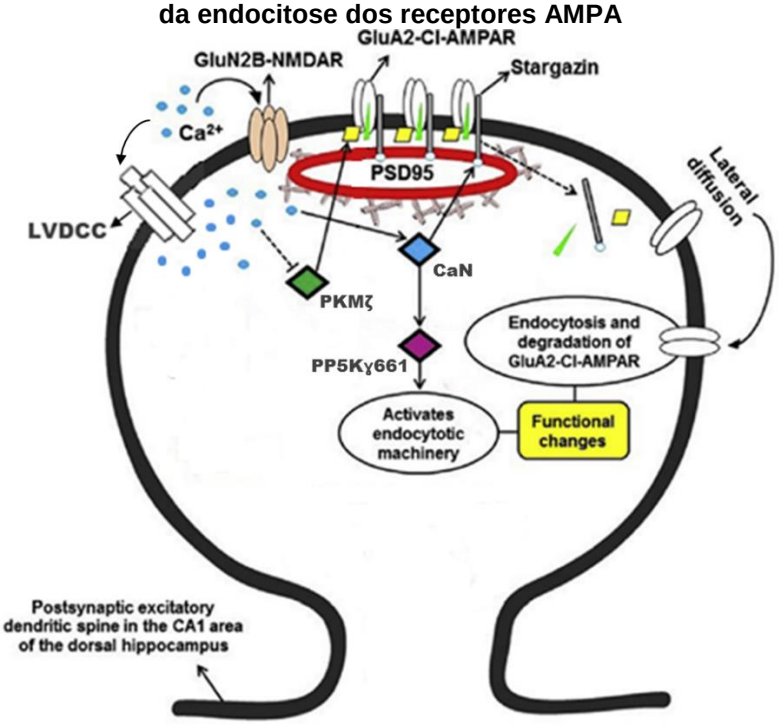


O sinal dos neurônios dopaminérgicos (chamados de "células do esquecimento") é recebido pelo receptor DAMB expresso nos *mushroom body neurons* (chamados de "células do engrama"). Este sinal é comunicado para um complexo proteico formado pela Rac1, Pac3 e cofilina e unido pela proteína de suporte chamada de Scribble. A ativação dessa via de sinalização induzirá a remodelação dos filamentos de actina do neurônio, levando ao esquecimento ativo. Fonte: adaptado de DAVIS; ZHONG (2017, p. 496).

Também já foi relatado o envolvimento da Rac1 no esquecimento ativo em vertebrados (GAO *et al*., 2015; HAYASHI-TAKAGI *et al*., 2015; JIANG *et al*., 2016; LIU *et al*., 2016, 2018; OH *et al*., 2010). Os estudos mais recentes verificaram que a expressão de um transgene carregando uma forma constitutivamente ativa de Rac1 no hipocampo de camundongos acelerou o decaimento da memória de reconhecimento de objetos e de reconhecimento social. Inversamente, a expressão de um mutante dominante negativo da Rac1 prolongou significativamente a manutenção das memórias (LIU *et al*., 2016, 2018). A inibição da Rac1 também bloqueia completamente o esquecimento induzido por interferência (LIU *et al*., 2016) e impede o decaimento acelerado da LTP (LIU *et al*., 2018).

Os estudos que defendem o esquecimento como dependente da endocitose dos receptores AMPA apontam que esse processo inicia a partir da indução de uma LTD ou DP, levando ao decaimento da LTP mediado por processos ativos, ao invés de um decaimento passivo dos processos necessários para a manutenção da LTP, como se acreditava até pouco tempo (HARDT; NADER; NADEL, 2013; RICHARDS; FRANKLAND, 2017; SACHSER *et al*., 2016, 2017). Esses estudos verificaram que o esquecimento (ou o decaimento da LTP) ocorre pela sinalização pós-sináptica mediada pelo influxo modesto de Ca^{2+} pelos receptores NMDA ou pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (LVDCC) (HARDT; NADER; NADEL, 2013; HARDT; NADER; WANG, 2014; SACHSER *et al*., 2016, 2017; VILLARREAL *et al*., 2002). De fato, Hardt e colaboradores (2013) sugerem que a liberação espontânea de glutamato (por exemplo, durante o sono) seria suficiente para ativar especificamente os NMDAR que contém a subunidade GluN2B (GluN2B-NMDAR), deixando uma pequena quantidade de Ca^{2+} entrar na célula. Para este tipo de canalização de cálcio, o íon magnésio não precisa ser removido dos receptores NMDA, portanto, não precisa ocorrer a despolarização da célula, não sendo necessários potenciais de ação. Este influxo modesto de cálcio leva principalmente a ativação da fosfatase calcineurina (CaN), que desestabiliza o AMPAR da membrana, favorecendo sua endocitose (DONG *et al*., 2015; MIGUES *et al*., 2016; SACHSER *et al*., 2016). Além disso, a indução da LTD ou DP leva à degradação da PKMζ, o que também está envolvido na diminuição da quantidade de GluA2-AMPARs pós-sinápticos (DONG *et al*., 2015). Com isso, ocorre o enfraquecimento da sinapse, e assim, o decaimento da LTP (todo esse processo está ilustrado na figura 6). Há evidências mostrando que esse processo de esquecimento também é recrutado nos casos de esquecimento patológico. Esse processo é induzido, por exemplo, pelos aglomerados de beta-amiloide característicos da doença de Alzheimer (HSIEH *et al*., 2006; SHANKAR *et al*., 2007; SNYDER *et al*., 2005).

Figura 6 – Figura representativa dos mecanismos moleculares do esquecimento dependente da endocitose dos receptores AMPA



O esquecimento dependente da endocitose dos receptores AMPA pode ser iniciado pelo influxo de Ca^{2+} através do receptor GluN2B-NMDA (assim como através do LVDCC), o que ativa diversas cascatas moleculares nos neurônios pós-sinápticos. Um dos principais alvos é a CaN. Esta fosfatase pode induzir a desfosforilação da stargazina, uma proteína que auxilia a fixação do AMPAR na densidade pós-sináptica através da sua ligação com a principal proteína da densidade pós-sináptica, a PSD95. Após a desfoforilação da stargazina ocorre a remoção do GluA2-AMPAR. A CaN também pode promover a desfosforilação do PP5Kγ661, que também resulta na endocitose de AMPAR. Outro mecanismo envolvido no esquecimento ativo envolve a PKMζ. A PKMζ mantém o GluA2-AMPAR estável na densidade pós-sináptica através da sua interação com o fator sensível à N-etilmaleimida (NSF, losango amarelo). O baixo influxo de Ca^{2+} pós-sináptico pode levar a baixa regulação da PKMζ, desestabilizando os AMPARs da PSD. Outro possível alvo envolvido no decaimento da L-LTP dependente de Ca^{2+} é o BRAG2 (em verde fraco), que também participa da remoção sináptica de GluA2-AMPAR. Fonte: adaptado de SACHSER *et al*. (2017, p. 99).

A neurogênese também é enquadrada como um tipo de esquecimento ativo. No cérebro de mamíferos adultos, a neurogênese persiste em pelo menos duas regiões: na zona subventricular situada nas paredes dos ventrículos laterais, sendo que as novas células migram para o bulbo olfatório; e na zona subgranular, parte do giro dentado (GD) do hipocampo, onde os novos neurônios se integram aos circuitos hipocampais, alterando a conectividade (SONG *et al*., 2012). Durante esse processo de integração, os novos neurônios competem com as células granulares existentes pela formação de sinapses, muitas vezes substituindo as conexões sinápticas estabelecidas tanto no GD quanto na área CA3 do hipocampo. Além dessa remodelação estrutural direta, a integração de novos neurônios no hipocampo pode modificar indiretamente a força das conexões sinápticas estabelecidas. Neurônios imaturos são mais excitáveis do que os maduros. Portanto, a adição de novos

neurônios a um circuito GD-CA3 estabelecido pode levar a um aumento geral na excitação do circuito. Essas alterações são contrabalançadas, por exemplo, pela diminuição da excitabilidade intrínseca dos neurônios GD/CA3 existentes (por exemplo, diminuindo as correntes de sódio e/ou regulando positivamente as correntes de potássio ativadas por cálcio e de inativação rápida) ou através de mudanças estruturais e moleculares na sinapse (por exemplo, perda/endocitose de receptores GluA2-AMPA pós-sinápticos), o que pode levar ao enfraquecimento de algumas sinapses e consequentemente ao esquecimento dessa memória. No caso da neurogênese considera-se que esse enfraquecimento de algumas sinapses do engrama leva a uma dificuldade de evocação da memória e não diretamente a sua degradação — a qual ocorreria com o tempo, já que o processo de neurogênese ocorre continuamente no hipocampo. Nessa perspectiva, a neurogênese pode ser vista como um processo de esquecimento contínuo que afeta todas as memórias dependentes do hipocampo, independentemente do conteúdo (AKERS *et al*., 2014; EPP *et al*., 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013).

Considerando todas essas teorias sobre o esquecimento, o que parece mais provável é que ocorra uma integração entre elas, inclusive entre as teorias do esquecimento ativo e passivo. De fato, ainda não existem evidências que permitam rejeitar as teorias de deterioração, de falha na evocação e de interferência (PERGHER; STEIN, 2003). Assim, acreditamos que esses fenômenos provavelmente induzem o recrutamento das cascatas bioquímicas do processo de esquecimento ativo, para no fim levar ao decaimento das memórias (como proposto também por Zhang e colaboradores (2018)). Portanto, neste trabalho defendemos que o esquecimento natural/fisiológico ocorra através do recrutamento de mecanismos neuronais, celulares e moleculares intrínsecos ao cérebro. Defendemos especificamente o esquecimento como dependente da endocitose dos receptores AMPA e/ou dependente da Rac1.

1.2 ENDOCANABINOIDES

O Sistema Endocanabinoide (SE) possui um vasto papel funcional, modulando diversas funções fisiológicas como a dor, controle do apetite, motricidade e cognição. Como qualquer outro sistema de neurotransmissão já previamente

identificado, o SE é composto por ligantes endógenos, maquinaria celular responsável pela síntese e degradação desses ligantes, receptores específicos e transportadores (PIOMELLI, 2003; VAUGHAN; CHRISTIE, 2005).

Os receptores canabinoides tipo-1 e 2 (CB1 e CB2) são os receptores canabinoides mais bem caracterizados e identificados. Eles pertencem à superfamília dos receptores de membrana acoplados a proteína $G_{i/o}$ (*G-Protein-Coupled-Receptor,* GPCR). A ativação desses receptores, tipicamente, inibe a adenilato ciclase com consequente redução dos níveis de AMPc, induz o fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem, abertura dos canais de potássio e estimulação de proteínas quinases, como a MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases).* A consequência dessa cascata de sinalização é a inibição da liberação de neurotransmissores do terminal sináptico (AMERI, 1999; CASTILLO *et al*., 2012; VAUGHAN; CHRISTIE, 2005).

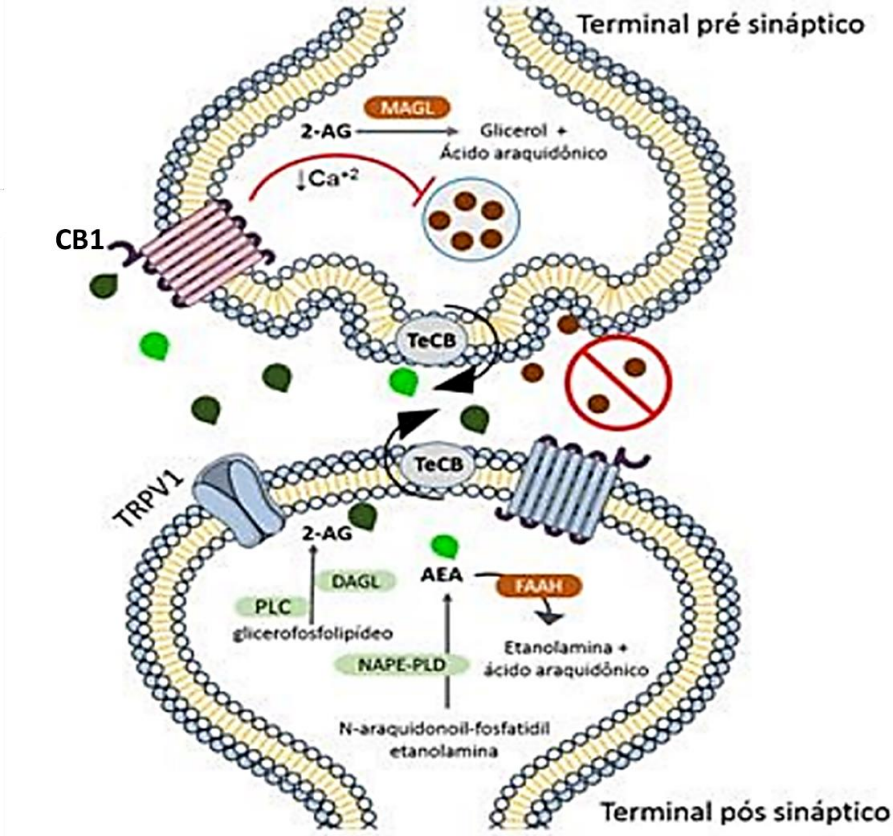
Os receptores CB1 são os GPCR mais abundantes do SNC, tendo densa distribuição em áreas encefálicas intimamente relacionadas com processos cognitivos e emocionais, tais como, córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (HERKENHAM *et al*., 1990; VAUGHAN; CHRISTIE, 2005). Eles podem estar presentes tanto em neurônios quanto astrócitos (HAN *et al*., 2012; NAVARRETE; ARAQUE, 2008) e também são encontradas em regiões periféricas, embora em níveis mais baixos (VAUGHAN; CHRISTIE, 2005). A expressão de CB1 é majoritária em terminais axonais pré-sinápticos, entretanto, estes receptores também podem ser encontrados em dendritos ou no corpo celular de neurônios (LETERRIER *et al*., 2006; NYÍRI *et al*., 2005). No hipocampo, estes receptores são expressos principalmente em interneurônios GABAérgicos que co-liberam colecistocinina (CCK) (KATONA *et al*., 1999). Todavia, os receptores CB1 também estão presentes em terminais axonais de neurônios piramidais glutamatérgicos, mas em uma concentração 20 vezes menor que em interneurônios GABAérgicos (KAWAMURA *et al*., 2006). Por outro lado, os receptores CB2 são expressos predominantemente em células do sistema imunológico, tanto periférico como no SNC, no qual podem estar presentes na micróglia ou em tecidos vasculares (RAMIREZ *et al*., 2012). Assim, esses receptores estão mais envolvidos em condições de inflamação, sendo os receptores CB1 mais importantes para funções cognitivas, como a memória.

Os ligantes endógenos dos receptores canabinoides são conhecidos como endocanabinoides (ECs). Estes compostos são pequenas moléculas lipídicas

derivadas de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, principalmente do ácido araquidônico, e os mais conhecidos e estudados são a anandamida (AEA) e o 2-aracdonil-glicerol (2-AG). A síntese destas moléculas ocorre por demanda a partir de fosfolipídios de membrana, que são hidrolisados por fosfolipases. A despolarização do neurônio pós-sináptico induz ao influxo de Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, ativando a diacilglicerol lipase (DGL), que promove a síntese de 2-AG, e a N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-LPD), que sintetiza a AEA. O 2-AG também pode ser sintetizado pela ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do tipo I (I-mGluR), que ativam a proteína fosfolipase β (PLCβ). Desta forma, diferentemente dos neurotransmissores clássicos, os ECs não são armazenados em vesículas sinápticas. Eles são sintetizados pelo neurônio pós-sináptico e liberados por difusão através da membrana para estimular os receptores CB1 presentes nos terminais pré-sinápticos, agindo como “mensageiros retrógrados” (CASTILLO *et al*., 2012; VAUGHAN; CHRISTIE, 2005; WANG; UEDA, 2009).

Assim, resumidamente, a sinalização endocanabinoide segue os seguintes passos (Fig. 7): a partir de um estímulo, o terminal pós-sináptico é despolarizado induzindo a síntese de ECs; estes se difundirão pela membrana pós-sináptica e irão interagir com os receptores CB1 na porção pré-sináptica, levando a inibição da liberação de neurotransmissores do terminal pré-sináptico (OHNO-SHOSAKU; MAEJIMA; KANO, 2001; WILSON; NICOLL, 2001). Como esses receptores localizam-se principalmente na porção pré-sináptica dos terminais axônicos GABAérgicos, a sua ativação levará a inibição da liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) (KATONA *et al*., 1999; VAUGHAN; CHRISTIE, 2005). Ou seja, ocorrerá a “inibição da inibição”, levando a facilitação de qualquer evento subsequente de plasticidade glutamatérgica. Com isso, eventos importantes de plasticidade sináptica podem ocorrer, como a supressão da inibição induzida por despolarização (DSI) (WILSON; NICOLL, 2001) e a regulação da excitabilidade neuronal pela inibição da LTD (I-LTD) (CHEVALEYRE; CASTILLO, 2003; KREITZER, 2005). Dessa forma, como o SE possui o controle da atividade neuronal e da liberação de neurotransmissores e assim, um papel regulatório em diversas formas de plasticidade sináptica, ele está fortemente envolvido na modulação da memória e no controle das emoções (PIOMELLI, 2003; VAUGHAN; CHRISTIE, 2005).

Figura 7 – Figura representativa da sinalização do sistema endocanabinoide



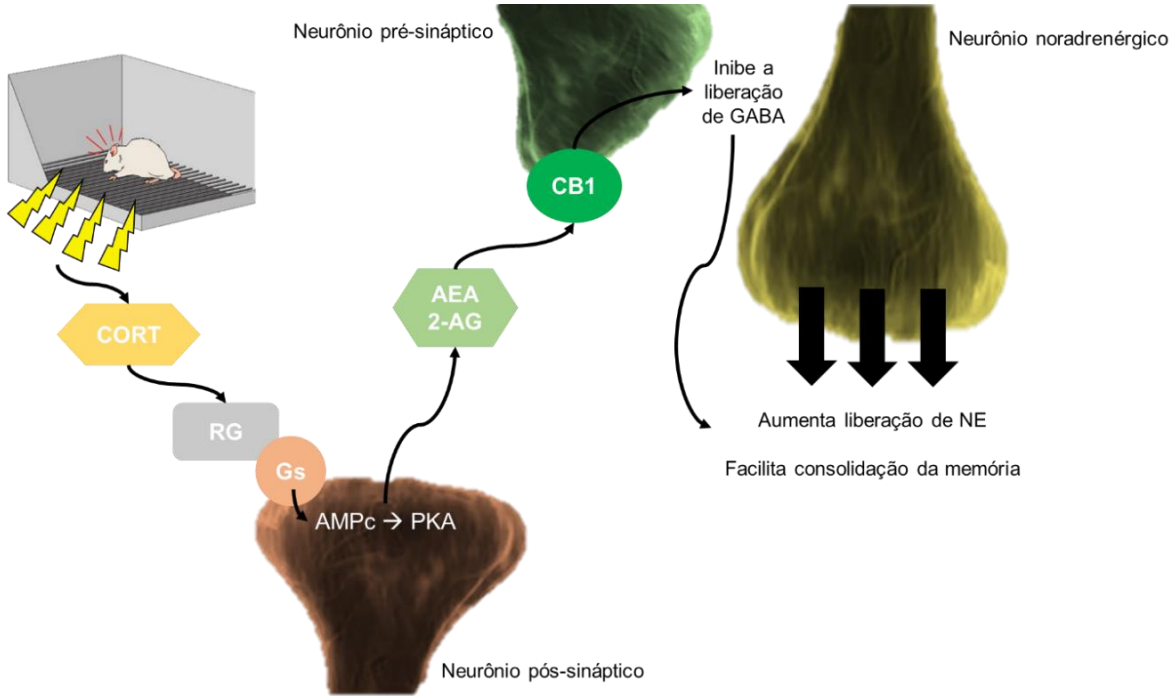
Os ECs, como o 2-AG e a AEA, são sintetizados nos neurônios pós-sinápticos e se difundem, pela fenda sináptica, onde agem sobre os receptores canabinoides nos neurônios pré-sinápticos. Conforme demonstrado, o 2-AG é sintetizado em neurônios pós-sinápticos através das enzimas fosfolipase C (PLC) e diacilglicerol lipase (DAGL), as quais se localizam principalmente na membrana plasmática, sendo catabolizado pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL), localizada em neurônios pré-sinápticos. A biossíntese da AEA também ocorre em neurônios pós-sinápticos, principalmente pela ação da enzima N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-LPD), e o seu catabolismo ocorre através da amidohidrolase de ácidos graxos (FAAH, sigla em inglês), que se localiza principalmente em neurônios pré-sinápticos. Os transportadores de membrana dos ECs (TeCB) localizados em neurônios pré e pós-sinápticos facilitam a recaptação dos ECs. A ativação dos receptores canabinoides causa uma redução da excitabilidade do neurônio pré-sináptico, através da despolarização, com consequente redução da liberação de neurotransmissores. TRPV1: do inglês, *transient receptor potential vanilloid 1*. Fonte: adaptado de CARVALHO *et al*. (2017, p. 57).

A remoção dos ECs da fenda sináptica ocorre através de transportadores específicos presentes em neurônios e astrócitos (Fig.5). Após ser recaptada para o interior da célula, a AEA é hidrolisada pela enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH) em ácido araquidônico e etalonamina. Já o 2-AG é hidrolisado principalmente pela monoacilglicerol lipase (MGL) em ácido araquidônico e glicerol, mas também pela FAAH (PIOMELLI, 2003; VAUGHAN; CHRISTIE, 2005).

É importante destacar também que a síntese de ECs e a ativação dos receptores CB1 são recrutadas mediante situações de estresse, sugerindo uma íntima relação entre os sistemas canabinoide e glicocorticoide na modulação da

memória emocional (HILL *et al*., 2010; HOHMANN *et al*., 2005). Fundamentalmente, estes sistemas regulam os componentes autonômicos associados à experiência emocional através da síntese de noradrenalina e glicocorticoides pela ativação do eixo HHA, conhecido por facilitar a consolidação do traço mnemônico durante situações de estresse (HILL *et al*., 2010; RIEBE; WOTJAK, 2011). Por exemplo, situações de estresse, como um choque, ativam o eixo HHA levando a liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea que ativam receptores glicocorticoides presentes em neurônios pós-sinápticos. Isso acaba induzindo a síntese de ECs, que inibem a liberação de GABA de um interneurônio inibitório relacionado a um neurônio noradrenérgico. Ocorrerá, assim, um aumento da transmissão noradrenérgica e facilitação da consolidação da memória (Fig. 8) (HILL; MCEWEN, 2009).

Figura 8 – Figura representativa da interação entre os sistemas glicocorticoide e endocanabinoide



A corticosterona (CORT) liga-se a um receptor de glicocorticoide (RG) que ativa a via Gs-AMPc/PKA induzindo a síntese de ECs. Os ECs se difundem pela sinapse, e se ligam aos receptores CB1 nos terminais GABAérgicos, inibindo a liberação de GABA. Essa inibição da liberação de GABA desinibe a liberação de norepinefrina (NE) e aumenta a ativação dos receptores β-adrenérgicos pós-sinápticos, aumentando a consolidação de memórias emocionalmente aversivas. Gs: proteína G excitatória; AEA: anandamida; 2-AG: 2-araquinodoilglicerol. Fonte: Baseado em HILL; MCEWEN (2009, p. 4579).

1.3 ENDOCANABINOIDES E MEMÓRIA

Desde a descoberta de que os receptores CB1 estão envolvidos na regulação de diferentes processos celulares e moleculares implicados na plasticidade sináptica no SNC, o sistema canabinoide tem atraído grande interesse na pesquisa em neurobiologia e psicofarmacologia da memória. Assim, existe uma grande diversidade de estudos sobre o papel que o SE desempenha nas diferentes fases da memória (para uma revisão, ver KRUK-SLOMKA; BIALA, 2016; QUILLFELDT; DE OLIVEIRA ALVARES, 2015; e VARVEL; LICHTMAN, 2006). Todavia, esses estudos apresentam dados conflitantes e difíceis de interpretar (MORENA; CAMPOLONGO, 2014).

Há um consenso geral de que a ativação do SE exerce um efeito inibitório sobre a aquisição da memória, como afirmam Morena e Campolongo (2014). Pamplona e Takahashi (2006) demostraram que a administração intraperitoneal (i.p.) do agonista CB1, WIN55,212-2 (2,5 e 5,0 mg/kg), prejudicou a aquisição da memória de medo contextual no Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC). Da mesma forma, a administração subcutânea crônica de WIN55,212-2 (2mg/kg por dia, por 21 dias) teve efeito inibitório sobre a aquisição na tarefa de Labirinto Aquático de Morris (em inglês, *Water Maze Test*, WMT) (MARCHALANT *et al*., 2008). Takahashi e colaboradores (2005) também demonstraram que a administração i.p. de 1,0 mg/kg de rimonabanto (um antagonista seletivo de CB1) produziu uma melhora na aquisição e consolidação da memória na tarefa do labirinto em T elevado. Esse estudo demonstrou inclusive que nem doses mais baixas (0,5 mg/kg) nem superiores (2,0 mg/kg) foram capazes de melhorar a aquisição. Entretanto, um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a administração intra-CA1 de anandamida e do antagonista CB1, AM251, não influenciou na aquisição da memória na tarefa da esquiva inibitória *step-down* (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2008a).

Por outro lado, os dados presentes na literatura sobre o envolvimento da sinalização endocanabinoide na consolidação da memória são conflitantes. Diversos estudos demonstraram que agonistas do receptor CB1 (administrados sistemicamente ou intra-CA1) inibiram a consolidação da memória em tarefas dependentes do hipocampo (JAMALI-RAEUFY *et al*., 2011; MAĆKOWIAK *et al*., 2009; YIM *et al*., 2008; ZARRINDAST; NAVAEIAN; NASEHI, 2011). Kruk-Slomka e

Biala (2016) demonstraram que a administração i.p. do antagonista CB1, AM251 (1 e 3 mg/kg), facilitou tanto a aquisição quanto a consolidação da memória no paradigma da esquiva inibitória *step-through* em camundongos. A administração i.p. de rimonabanto na tarefa do labirinto radial, teve o mesmo efeito (WOLFF; LEANDER, 2003). Entretanto, trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram que a infusão intra-CA1 de anandamida facilitou a consolidação na esquiva inibitória *step-down* (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2008a), enquanto que o antagonista AM251, a inibiu tanto na esquiva inibitória *step-down* (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2005, 2008a), quanto no CAC (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2010). Campolongo e colaboradores (2009) demostraram uma facilitação da consolidação com a infusão de WIN55,212-2 na amígdala basolateral, e um prejuízo com a infusão de AM251, na tarefa da esquiva inibitória *step-down*.

O nível de aversividade da tarefa comportamental é um fator crítico para tornar a modulação da memória sensível a fármacos canabinoides (HÖLTER *et al*., 2005; NIYUHIRE *et al*., 2007; PAMPLONA; TAKAHASHI, 2006). E como já comentado, a ativação do sistema endocanabinoide e do sistema glicocorticoide exerce efeito facilitatório sobre a consolidação da memória (CAMPOLONGO *et al*., 2009; HILL *et al*., 2010; HILL; MCEWEN, 2009). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a infusão intra-CA1 de anandamida e AM251 influenciaram na consolidação da memória na esquiva inibitória *step-down* e no CAC enquanto que sobre a habituação ao Campo Aberto não promoveram efeitos (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2005, 2006, 2008a). Também foi demonstrado que a ação do SE depende da intensidade do choque na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Som (KAMPRATH *et al*., 2009). De acordo com estes achados, um trabalho realizado por nosso grupo demonstrou que o SE hipocampal é recrutado somente em um protocolo com choque forte (0,7 mA) e não com choque fraco (0,3 mA) no CAC. Além disso, foi evidenciado que uma fonte de estresse adicional ou administração sistêmica de dexametasona, um glicocorticoide sintético, antes do protocolo com choque fraco é suficiente para recrutar a modulação endocanabinoide hipocampal, sugerindo que a ativação do sistema glicocorticoide é uma etapa necessária para recrutar a modulação endocanabinoide sobre a consolidação da memória (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2010).

Estudos sobre o papel do SE sugerem que a ativação deste sistema antes da evocação modula negativamente esta etapa mnemônica (ATSAK *et al*., 2012; DE

OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2008a; PIRI; ZARRINDAST, 2011). Já o bloqueio dos receptores CB1 imediatamente após a reativação, ou seja, durante a evocação, torna a memória insensível a inibidores da reconsolidação. Isso demonstra que a ativação desses receptores é necessária para a desestabilização da memória que precede a reconsolidação (LEE; FLAVELL, 2014; SUZUKI *et al*., 2008). Além disso, foi demonstrado que o uso do agonista CB1, ACEA (Arachidonyl-2-cloroetilamida), no hipocampo permitiu a desestabilização da memória, sem efeito deletério na reconsolidação (LEE; FLAVELL, 2014). Por outro lado, a ativação deste sistema após a evocação, modula negativamente a reconsolidação da memória (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2008b; LIN; MAO; GEAN, 2006; SACHSER *et al*., 2015; SANTANA *et al*., 2016). Enquanto que a ativação do SE em diferentes estruturas encefálicas exerce efeito facilitatório sobre a extinção da memória (DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2008b; DO MONTE *et al*., 2013; MARSICANO *et al*., 2002; SACHSER *et al*., 2015) e estes efeitos parecem ser específicos para a extinção de memórias aversivas (HÖLTER *et al*., 2005; NIYUHIRE *et al*., 2007).

Os dados sobre o papel do SE na modulação da plasticidade sináptica de longa duração no hipocampo também são bastante controversos e inconclusivos. Alguns estudos indicam que a ativação dos receptores CB1 em fatias do hipocampo inibe a indução da LTP (COLLINS DAWN R.; PERTWEE ROGER G.; DAVIES STEPHEN N., 1995; TERRANOVA *et al*., 1995) e da LTD (MISNER; SULLIVAN, 1999). Por outro lado, já foi demonstrado também que o bloqueio de CB1 pode tanto facilitar, quanto inibir a LTP (BOHME *et al*., 1999; DE OLIVEIRA ALVARES *et al*., 2006). Além disso, o WIN55,212-2, o AM404 e o AM251 administrados sistemicamente inibiram a LTP na via de projeção colateral de Schaffer e o AM404 (inibidor da recaptação de anandamida) facilitou a LTD (ABUSH; AKIRAV, 2010).

Dessa forma, considerando a diversidade de dados sobre o papel do SE nos processos mnemônicos, não é adequado categorizar a modulação realizada por este sistema simplesmente como inibitória ou facilitatória. Possivelmente a discrepância entre os dados referentes à modulação endocanabinoide seja devido as diferentes condições experimentais, principalmente a forma de administração, os fármacos utilizados e as tarefas comportamentais realizadas (MORENA; CAMPOLONGO, 2014; QUILLFELDT; DE OLIVEIRA ALVARES, 2015).

Quanto ao papel do SE no processo de esquecimento, para o nosso conhecimento, não há nenhum estudo na literatura que aborde esse assunto. Há

somente um estudo de 2015, realizado por Njoo e colaboradores, que trouxe à tona uma possível interação entre o SE e a via de sinalização da Rac1. Eles observaram que tanto agonistas quanto antagonistas de CB1 alteram a atividade de Rac1 nos espinhos dendríticos de neurônios corticais excitatórios, levando, em última instância, a uma alteração na dinâmica de actina. Neste caso, o uso de agonistas CB1 diminuiu e o uso de um agonista inverso aumentou a atividade de Rac1. Como explicado anteriormente, a ativação da via de sinalização da Rac1 está intimamente envolvida com o esquecimento. Assim, nós acreditamos que essa interação entre o SE e a Rac1, observado por este estudo, pode ser um mecanismo subjacente ao processo de esquecimento.

Dessa forma, considerando que (1) o SE participa de algum modo em cada um dos processos mnemônicos; e (2) que o esquecimento seja um processo ativo, ocorrendo através da ativação de diversos processos celulares e moleculares, acreditamos que o SE também exerça um papel fundamental no esquecimento das memórias. Hipotetizamos ainda, que esse sistema seja um dos mecanismos cuja modulação seja necessária para induzir ou impedir o processo de esquecimento ativo. Portanto, nos propomos neste trabalho, a investigar o papel do SE no esquecimento fisiológico através de ferramentais farmacológicas e comportamentais.

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, muito tem se estudado acerca dos mecanismos de aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação e extinção da memória. Porém, pouco se sabe sobre uma das fases mnemônicas mais essenciais do nosso organismo, o esquecimento. Recentemente, diversos estudos clínicos e pré-clínicos têm mostrado o importante papel do sistema endocanabinoide nas diferentes fases mnemônicas. Tais estudos sugerem que a modulação desse sistema pode ter um importante papel também no processo de esquecimento.

Assim, esse projeto visa investigar um dos possíveis mecanismos biológicos responsáveis pelo esquecimento da memória, o sistema endocanabinoide. Além disso, será gerado conhecimento que poderá ser aplicado para desenvolver estratégias terapêuticas destinadas a prevenir o comprometimento da memória induzido pela idade ou por processos patológicos, ou para acelerar o esquecimento de memórias traumáticas e mal adaptativas de longo prazo, como aquelas classicamente observadas em condições psiquiátricas, como transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e dependência de drogas.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral e os objetivos específicos desse trabalho são descritos abaixo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em ratos *Wistar* machos adultos através de ferramentas farmacológicas, o papel do sistema endocanabinoide, especificamente dos receptores CB1, no processo de esquecimento fisiológico de memórias espaciais e aversivas de longa duração.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(1) Traçar uma curva de esquecimento natural na tarefa de localização de objetos (LO).

(2) Investigar o efeito do bloqueio crônico dos receptores CB1 — administração sistêmica dos antagonistas seletivos AM251 e SR141716 (rimonabanto) — na manutenção e/ou esquecimento de memórias espaciais (tarefa de LO) e aversivas (esquiva inibitória *step-through)*;

(3) Verificar o efeito da ativação crônica dos receptores CB1 — administração sistêmica do agonista não-seletivo WIN 55,212-2 — na manutenção e/ou esquecimento de uma memória aversiva fraca (esquiva inibitória *step-through)*.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Esse trabalho foi escrito em formato de artigo científico, seguindo as normas para submissão da revista *Neurobiology of Learning and Memory*. Tais normas estão presentes no Anexo A**.**

Participação do Sistema Endocanabinoide no Processo de Esquecimento

Laura Willers de Souza[1], Bruna dos Santos[1], Paula Santana Lunardi[1], Bruno Popik[1], Lucas de Oliveira Alvares[1]*.

[1]Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

*Autor correspondente: Lucas de Oliveira Alvares - Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, sala 216, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Brasil. E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br

Lista de abreviaturas:

AMPA: ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
CAC: condicionamento aversivo ao contexto
CB1: receptor canabinoide tipo 1
ECs: endocanabinóides
GABA: ácido gama-aminobutírico
GCs: glicocorticoides
GPCR: receptor de membrana acoplado a proteína G
i.p.: intraperitoneal
LO: localização de objetos
LTD: depressão de longa duração
LTP: potenciação de longa duração
LVDCC: canal de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L
MAPK: do inglês, *mitogen activated protein kinase*
mGCR: receptor glicocorticoide acoplado a proteína G
NMDAR: receptor N-metil D-aspartato
PKMζ: proteína quinase C tipo zeta
SE: sistema endocanabinoide
SNC: sistema nervoso central
TEPT: transtorno de estresse pós-traumático
TRPV1: do inglês, *transient receptor potential vanilloid 1*

RESUMO

Embora as bases biológicas do esquecimento permaneçam desconhecidas, estudos recentes apoiam a hipótese de que esse processo ocorra através da ativação de diversos mecanismos celulares e moleculares, sendo, portanto, um processo ativo. Há uma gama enorme de estudos acerca da modulação do sistema endocanabinoide (SE) sobre as fases da memória. Isso nos leva a crer que esse sistema deva possuir um papel essencial também na modulação do esquecimento/manutenção das memórias. Assim, neste trabalho, objetivamos avaliar se o SE está envolvido na manutenção/decaimento de uma memória espacial e memórias aversivas de duas intensidades (forte e fraca). Verificamos que o bloqueio crônico dos receptores canabinoide tipo 1 (CB1) (AM251, antagonista CB1 seletivo, i.p.) acelerou o esquecimento de uma memória aversiva forte formada com o paradigma da esquiva inibitória *step-through*. No entanto, a ativação crônica do SE (WIN 55,212-2, agonista CB1 não-seletivo, i.p.) não é necessária para a manutenção de uma memória aversiva fraca. Além disso, demonstramos que o bloqueio crônico dos receptores CB1 (SR141716, antagonista CB1 seletivo, i.p.) não produziu nenhum efeito significativo na manutenção/esquecimento de uma memória espacial formada através da tarefa de localização de objetos. Juntos, nossos resultados demonstram que a modulação do SE sobre a manutenção/esquecimento das memórias pode ser recrutada dependendo da força da memória e, dessa forma, sugerem uma função relevante do SE no processo de esquecimento ativo.

Palavras-chave: Esquecimento. Sistema Endocanabinoide. CB1. Memória aversiva. Memória espacial.

1 INTRODUÇÃO

Os receptores canabinoides tipo-1 (CB1) são os receptores acoplados a proteína $G_{i/o}$ (GPCR) mais abundantes do sistema nervoso central (SNC), tendo densa distribuição em áreas encefálicas intimamente relacionadas com processos cognitivos e emocionais, tais como, córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (Herkenham et al., 1990; Vaughan & Christie, 2005). A expressão desses receptores é majoritária em terminais axonais pré-sinápticos e a sua ativação, tipicamente, inibe a adenilato ciclase com consequente fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem, abertura dos canais de potássio e estimulação de proteínas quinases, como a MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), o que por fim leva a inibição da liberação de neurotransmissores do terminal pré-sináptico (Ameri, 1999; Castillo, Younts, Chávez, & Hashimotodani, 2012; Vaughan & Christie, 2005).

Nas sinapses, a sinalização endocanabinoide funciona de modo retrógrado e dependente de demanda, ou seja, após a despolarização sináptica, os endocanabinoides (ECs) são sintetizados pelo neurônio pós-sináptico e liberados por difusão através da membrana para estimular os receptores CB1 presentes nos terminais pré-sinápticos, agindo como “mensageiros retrógrados” (Ohno-Shosaku, Maejima, & Kano, 2001; Piomelli, 2003; Wilson & Nicoll, 2001). Como esses receptores localizam-se principalmente na porção pré-sináptica dos terminais axônicos GABAérgicos, os ECs atuam, normalmente, inibindo a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) (Katona et al., 1999), conduzindo a uma facilitação de qualquer evento subsequente de plasticidade glutamatérgica. Além disso, o controle da inibição da liberação de neurotransmissores dá ao sistema endocanabinoide (SE) um papel regulatório essencial em diversas formas de plasticidade sináptica, como a LTP (potenciação de longa duração) e a LTD (depressão de longa duração) (Chevaleyre & Castillo, 2003; Chevaleyre, Takahashi, & Castillo, 2006; Collins Dawn R., Pertwee Roger G., & Davies Stephen N., 1995; de Oliveira Alvares et al., 2006; Terranova, Michaud, Le Fur, & Soubrié, 1995; Wilson & Nicoll, 2001), estando, consequentemente, envolvido na modulação da memória e no controle das emoções (Piomelli, 2003; Vaughan & Christie, 2005).

Efetivamente diversos estudos demonstraram o envolvimento do SE na modulação das diferentes etapas da memória (aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação e extinção) (para uma revisão, ver Kruk-Slomka & Biala, 2016; Quillfeldt & de Oliveira Alvares, 2015; e Varvel & Lichtman, 2006). Todavia, para o

nosso conhecimento, não há estudos na literatura sobre o envolvimento do sistema endocanabinoide em um dos processos mnemônicos mais importantes, o esquecimento.

Acredita-se que o processo de esquecimento possua o papel de remover aquelas memórias indesejadas e desnecessárias formadas durante o dia, garantindo que o sistema mnemônico não se sobrecarregue e, assim, assegurando a sua funcionalidade. Por esse motivo o esquecimento é considerado um dos atributos cognitivos mais fundamentais do encéfalo (Davis & Zhong, 2017; Hardt, Nader, & Nadel, 2013; Pergher & Stein, 2003; Richards & Frankland, 2017). Além disso, esse processo ganha destaque na patologia de muitas doenças neurológicas, em especial na doença de Alzheimer (Hsieh et al., 2006; Knobloch & Mansuy, 2008; Shankar et al., 2007). No entanto, os estudos que descrevem os mecanismos moleculares subjacentes ao esquecimento ainda são escassos e muito pouco explorados.

No sentido biológico e fisiológico, o processo de esquecimento refere-se à ausência de expressão de uma memória previamente adquirida, resultado do decaimento da LTP (Hardt et al., 2013; Hardt, Nader, & Wang, 2014; Sachser, Haubrich, Lunardi, & de Oliveira Alvares, 2017). Durante muitos anos acreditou-se que o esquecimento era decorrente de uma degradação progressiva e passiva do traço mnemônico com a simples passagem do tempo ou que esse processo ocorria devido a interferências de novos aprendizados principalmente durante as fases de consolidação e evocação das memórias ou ainda que fosse somente uma falha de evocação (Davis & Zhong, 2017; Hardt et al., 2013; Pergher & Stein, 2003; Richards & Frankland, 2017; Wixted, 2004). No entanto, evidências acumuladas nos últimos anos apoiam a hipótese de que o processo de esquecimento ocorra através da ativação de diversos processos celulares e moleculares, sendo, portanto, um processo ativo (Dong et al., 2015; Hardt et al., 2014; Migues et al., 2016; Sachser et al., 2017, 2016; Villarreal, Do, Haddad, & Derrick, 2002). Até o momento já foram identificadas duas cascatas celulares e moleculares que embasam a existência do esquecimento ativo: o esquecimento dependente da endocitose dos receptores AMPA e o dependente de Rac1 (Davis & Zhong, 2017).

A literatura demonstra que o esquecimento dependente da endocitose dos receptores AMPA ocorre pela sinalização pós-sináptica mediada pelo influxo modesto de Ca^{2+} pelos receptores N-metil D-aspartato (NMDAR) que contém a subunidade GluN2B ou pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L

(LVDCC) (Hardt et al., 2013, 2014; Sachser et al., 2017, 2016; Villarreal et al., 2002). Isso leva a ativação da fosfatase calcineurina e a degradação da proteína quinase C tipo zeta (PKMζ), o que desestabiliza os GluA2-AMPARs (receptores ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônicos contendo a subunidade GluA2) da membrana, favorecendo sua endocitose (Dong et al., 2015; Migues et al., 2016; Sachser et al., 2016). Com isso, ocorre o enfraquecimento da sinapse, e assim, o decaimento da LTP, levando ao esquecimento ativo.

De forma resumida, o esquecimento dependente de Rac1 parece ocorrer devido à remodelação dos filamentos de actina do neurônio, o que ocorre através da ativação da via de sinalização da Rac1. Foi visto, em *Drosophila melanogaster*, que o sinal de neurônios dopaminérgicos recebido pelos neurônios essenciais para a formação e manutenção da memória (no caso da *Drosophila*, *mushroom body neurons*), induz a ativação de um complexo proteico formado pela Rac1, Pac3 e cofilina, o que por fim leva ao remodelamento do citoesqueleto de actina e ao esquecimento ativo (Cervantes-Sandoval, Chakraborty, MacMullen, & Davis, 2016; Davis & Zhong, 2017; Shuai et al., 2010). De fato, em vertebrados, foi visto que a ativação gênica da Rac1 acelera o decaimento das memórias, enquanto que a sua inibição impede o decaimento (Gao et al., 2015; Jiang et al., 2016; Liu et al., 2016; Liu, Lv, Wang, & Zhong, 2018; Oh et al., 2010).

Assim, considerando que (1) o SE participa de algum modo em cada um dos processos mnemônicos; e (2) que o esquecimento seja um processo ativo, ocorrendo através da ativação de diversos processos celulares e moleculares, acreditamos que o SE também exerça um papel fundamental no esquecimento das memórias. Hipotetizamos ainda, que esse sistema seja um dos mecanismos cuja modulação seja necessária para induzir ou impedir o processo de esquecimento ativo. Portanto, nos propomos a investigar o papel do SE no esquecimento fisiológico através de ferramentas farmacológicas e comportamentais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com idade aproximada de 60 a 90 dias, pesando entre 250 e 350 g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de

Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e foram mantidos no biotério do Departamento de Biofísica da UFRGS (Instituto de Biociências, Laboratório de Neurobiologia da Memória). Foram acondicionados de 4 a 5 animais por caixa de policarbonato cobertas com grades metálicas e forradas com maravalha, com água e comida *ad libitum,* em um ambiente com temperatura controlada (20ºC ±2), umidade constante e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7h às 19h). Todos os experimentos foram conduzidos durante o ciclo claro. Os animais tiveram duas semanas para se habituarem ao biotério e às novas caixas-moradia, além de terem sido manipulados durante dois dias na sala experimental para se habituarem ao experimentador e a sala, antes que os experimentos iniciassem. É importante destacar que para cada procedimento comportamental e administração farmacológica utilizamos grupos diferentes e independentes de animais. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia nacional (Lei Federal 11.794/2008) de cuidados com animais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da universidade e possui o número 33313.

2.2 FÁRMACOS

AM251: antagonista seletivo do receptor CB1 (Tocris), na dose de 1 mg/mL/kg em solução DMSO 8% (Merck), administrado intraperitonialmente (i.p.) durante seis dias consecutivos (uma injeção por dia) (Kruk-Slomka & Biala, 2016).

SR141716 (Rimonabanto): antagonista seletivo do receptor CB1 (Carbosynth), na dose de 1 mg/mL/kg em solução DMSO 8% (Merck), administrado i.p. durante quatro ou seis dias consecutivos (uma injeção por dia) (Takahashi, Pamplona, & Fernandes, 2005).

WIN 55,212-2: agonista não-seletivo do receptor CB1 (Carbosynth), na dose de 0,25 mg/mL/kg em DMSO 8% (Merck), administrado i.p. durante quatro dias consecutivos (uma injeção por dia) (Pamplona & Takahashi, 2006).

Os grupos controle receberam injeções de DMSO 8% (Merck), preparado em PBS 0,15M, no mesmo volume, pela mesma via de administração e durante o mesmo tempo do que os grupos droga.

Em todos os experimentos o tratamento farmacológico foi iniciado 24h após o treino da tarefa comportamental (momento em que a memória já está

completamente consolidada). Os testes foram realizados 30h após a última administração das drogas.

2.3 PROTOCOLO DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS

O processo de esquecimento de memórias espaciais foi avaliado através da tarefa de localização de objetos (LO). Para esta tarefa, utilizamos uma caixa preta de madeira (dimensões: 60 × 60 × 60 cm) com dicas visuais em preto e branco diferentes em cada uma de suas paredes. A sala experimental era iluminada somente por uma lâmpada que fornecia uma iluminação constante de 40 lux, posicionada acima da caixa experimental de modo a não produzir sombras. Durante todo o protocolo havia um ruído de fundo para abafar sons externos. Após a retirada de cada animal da caixa experimental ela era cuidadosamente limpa com álcool 70%.

Este protocolo consistiu em 3 diferentes fases: (1) 2 dias consecutivos de exposição à caixa por 10 min, para habituação dos animais na ausência dos objetos; (2) 3 sessões de treino de 5 min, com intervalos de 5 min, realizados em um mesmo dia; nessas sessões os animais foram expostos a dois objetos idênticos (dois saleiros de vidro com tampas verdes) posicionados lado-a-lado, mas em cantos opostos da caixa; e (3) sessão de teste de 5 min (realizada um, três, cinco e sete dias após o treino), na qual um dos objetos foi deslocado para uma posição diferente da anterior.

A memória da tarefa de LO é expressa quando os animais permanecem por mais tempo explorando o objeto que teve sua posição alterada. Foi considerado como exploração dos objetos quando o animal cheirou ou tocou o objeto com as patas dianteiras ou com o nariz e vibrissas. O tempo de exploração foi computado para cada objeto e expresso como uma porcentagem do tempo total (índice de exploração) de ambos os objetos, calculado como: $t_{novo} \times 100/(t_{familiar} + t_{novo})$, onde t_{novo} é o tempo de exploração do objeto reposicionado e $t_{familiar}$ é o tempo de exploração do objeto que não teve sua posição alterada. Protocolo baseado na metodologia de Sachser et al., 2016.

2.4 PROTOCOLO DE ESQUIVA INIBITÓRIA *STEP-THROUGH*

O processo de esquecimento de memórias aversivas foi avaliado através da tarefa da esquiva inibitória *step-through*. Esta tarefa foi realizada em uma caixa

automatizada composta por dois contextos interligados por uma porta: um contexto listrado e iluminado (somente com a luz de uma webcam fixada acima do contexto), e outro escuro, sendo os dois com dimensões de 33 × 22 × 22 cm, e contendo um assoalho de barras metálicas.

Este protocolo é composto apenas pelas sessões de treino e teste. A sessão de treino consistiu em colocar o animal no compartimento iluminado com a porta aberta e cronometrar o tempo até ele entrar no compartimento escuro, medida chamada de latência. Quando ele adentra no compartimento escuro (com as quatro patas) fecha-se a porta e o animal recebe choques nas patas (protocolo forte — 4 choques com intensidade de 0,3mA e duração de 1s/choque, com intervalo de 5s entre cada choque; protocolo fraco — 2 choques com intensidade de 0,3mA e duração de 1s/choque, com intervalo de 5s entre cada choque), sendo retirado imediatamente depois. Cinco ou sete dias após o treino foi realizado o teste no qual os animais foram colocados no compartimento iluminado com a porta aberta e a latência para entrar no contexto escuro foi cronometrada. O tempo máximo analisado foi de 10 min. Após a retirada de cada animal da caixa experimental ela era cuidadosamente limpa com álcool 70%. Protocolo baseado na metodologia de Dong et al., 2015.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos em média ± EP, quando normalmente distribuídos (teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, $p>0,05$) e foram analisados com teste t de Student (dependente e independente) ou *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey´s para teste de comparações múltiplas, quando apropriado.

Para os dados que não seguem uma distribuição normal (teste de normalidade D'Agostino & Pearson, $p<0,05$), os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Mann-Whitney, para teste-t não pareado, ou teste de Wilcoxon, para teste-t pareado.

Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. O número de animais por grupo está indicado nas legendas das figuras.

3 RESULTADOS

3.1 O SE NÃO ESTÁ ENVOLVIDO NA MANUTENÇÃO E NEM NO ESQUECIMENTO DE MEMÓRIAS ESPACIAIS

Para avaliar o papel do SE, especificamente dos receptores CB1, no decaimento de memórias espaciais ao longo do tempo, utilizamos a tarefa de localização de objetos (LO). Primeiro, realizamos uma curva de esquecimento para verificarmos o momento em que os animais começam a esquecer a memória espacial formada com esse protocolo. Para isso testamos os animais vários dias (1, 3, 5 e 7 dias) após a aquisição da memória espacial (Figura 1A) e calculamos o índice de exploração como indicativo da manutenção da memória (Figura 1B). Descobrimos que até cinco dias após o aprendizado, os animais expressavam uma preferência significativa pelo objeto deslocado (1 dia, $t_{(7)}$=5,797, p=0,0007; 3 dias, $t_{(8)}$=4,749, p=0,0014; 5 dias, $t_{(7)}$=3,263, p=0,0138, teste *One-sample* comparada a uma hipótese conhecida de 50%). No entanto, os animais testados sete dias após o treino não mostraram preferência pelo objeto reposicionado ($t_{(6)}$=2,241, p=0,0663, teste *One-sample*), indicando que a memória espacial foi esquecida. Esses resultados não foram devido a uma maior exploração da caixa do que dos objetos, assim como também não são devido a uma diferença de exploração entre os grupos, já que o tempo total gasto explorando os objetos não foi diferente entre os grupos (Figura 1C, F (3, 40) =2,21, p=0,10, *one-way* ANOVA). Assim, neste estudo, a memória espacial formada com o protocolo de LO é mantida até cinco dias após treino, sendo que em sete dias ela já foi esquecida.

Em seguida administramos o fármaco SR141716 (Rimonabanto) — injeções sistêmicas crônicas — um antagonista seletivo do receptor CB1, para verificarmos qual a possível ação do SE na manutenção/esquecimento da memória espacial. Nossos resultados demonstraram que a inibição crônica do receptor CB1 durante quatro dias não teve efeito sobre a manutenção da memória espacial (Figuras 1D-E, teste de 5 dias, veículo DMSO 8% $t_{(9)}$=3,841, p=0,0040; e SR141716 $t_{(9)}$=4,889, p=0,0009; teste *One-sample* comparada a uma hipótese conhecida de 50%), assim como a inibição desses receptores durante seis dias também não teve efeito sobre o esquecimento dessa memória (Figuras 1G-H, teste de 7 dias, veículo DMSO 8% $t_{(9)}$=0,4837, p=0,6401; e SR141716 $t_{(9)}$=0,05275, p=0,9591; teste *One-sample* comparada a uma hipótese conhecida de 50%). O tempo total gasto explorando os objetos não foi diferente entre os grupos, como revelado pelo teste t de Student entre DMSO 8% e SR141716 (Figura 1F, $t_{(18)}$=0,4663, p=0,6466, teste de 5 dias;

Figura 1I, $t_{(18)}$=1,131, p=0,2728, teste de 7 dias; teste t de Student). Portanto, esses resultados sugerem que a manutenção e o esquecimento de uma memória espacial não dependem da modulação do SE.

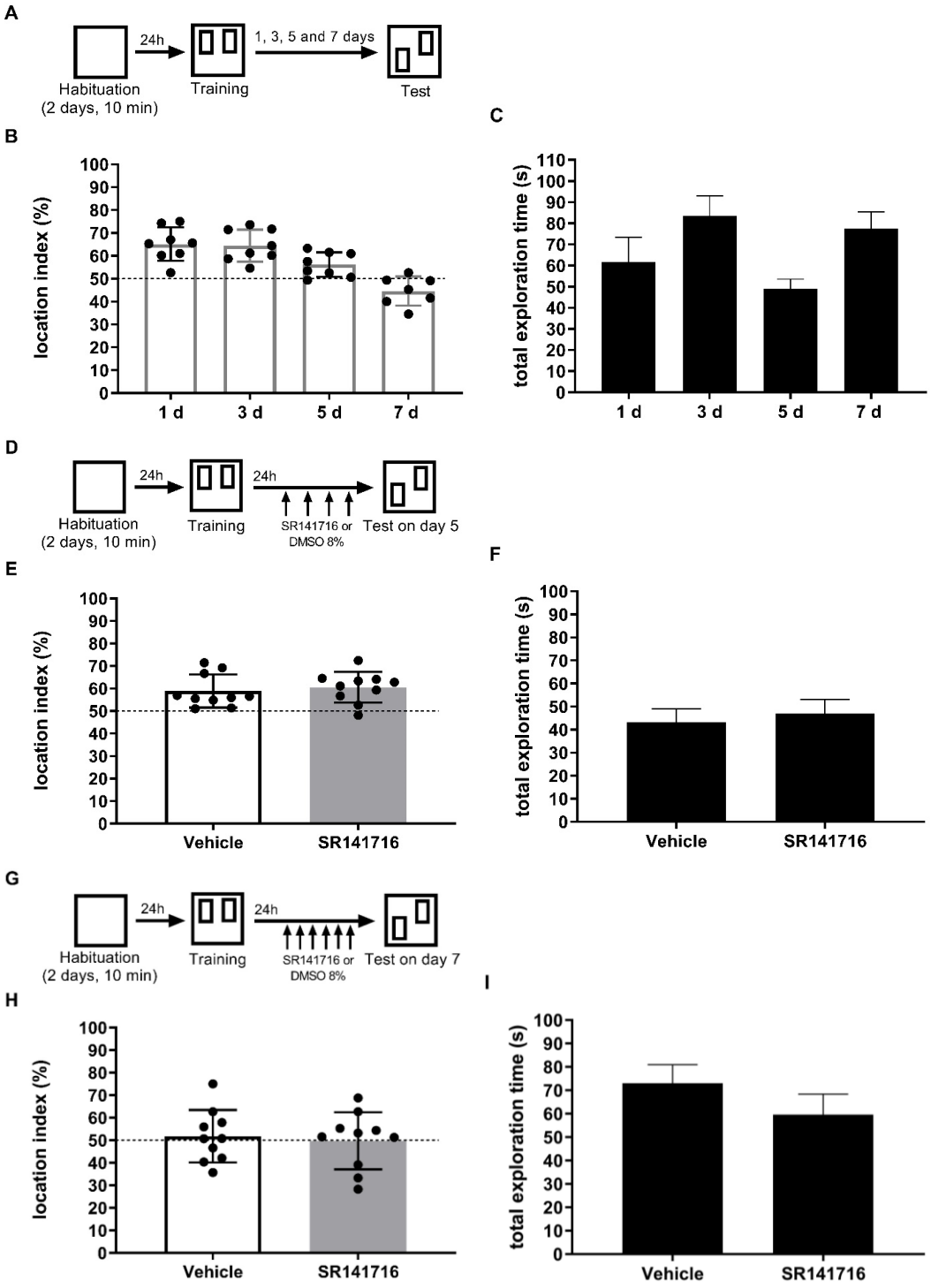


Figura 1. O SE não é necessário para a manutenção ou o esquecimento da memória espacial. (A) Desenho experimental da tarefa do LO. (B) Índice de exploração realizado nos dias 1, 3, 5 ou 7 após o aprendizado. Os animais mantêm a memória até o dia 5, pois passam mais tempo explorando o objeto que foi deslocado. (C) O tempo total gasto explorando os objetos não diferiu entre os grupos. (D, E) Índice de exploração do grupo controle (DMSO 8%) e do grupo tratado com injeções sistêmicas crônicas do antagonista CB1 (SR141716, 1 mg/mL/Kg) durante 4 dias após o aprendizado. (G, H) Índice de exploração do grupo controle (DMSO 8%) e do grupo tratado com injeções sistêmicas crônicas do antagonista CB1 (SR141716, 1 mg/mL/Kg) durante 6 dias após o aprendizado. Em ambos os momentos, o bloqueio dos receptores CB1 não alterou a retenção da memória. (C, F e I) O tempo total gasto explorando os objetos não diferiu entre os grupos. Os dados são média ± EP (n=9-8).

3.2 O BLOQUEIO DOS RECEPTORES CB1 INDUZ O ESQUECIMENTO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA FORTE

Como já demonstrado por outros estudos, a modulação do SE costuma ser recrutada somente para o processamento mnemônico de experiências emocionais, o que envolve também o recrutamento do sistema glicocorticoide (de Oliveira Alvares et al., 2010; Hölter et al., 2005; Niyuhire et al., 2007; Pamplona & Takahashi, 2006). Os nossos dados anteriores parecem ir de encontro com a literatura, já que a modulação do SE não foi recrutada para a manutenção/esquecimento da memória espacial. Assim, nos perguntamos: (1) qual a participação do SE no esquecimento/manutenção de memórias aversivas; e (2) se existe um recrutamento diferenciado do SE para o esquecimento/manutenção de memórias aversivas fortes e fracas.

Para responder essas questões, primeiramente realizamos um protocolo de treino forte no paradigma da esquiva inibitória *step-through* (Figura 2A). Neste protocolo, os animais não tratados retêm a memória por 7 dias (Figura 2B, p=0,0059 para o grupo DMSO 8% quando comparamos latências de treino *versus* teste, através do teste de Wilcoxon), confirmando a formação de uma memória forte e duradoura com esse treino. Após o bloqueio crônico do receptor CB1 (AM251, 1mg/mL/kg, i.p. durante 6 dias) observamos uma redução significativa na latência para entrar no contexto aversivo, indicando que a memória havia sido esquecida (Figuras 2A-C; p=0,3594, para AM251 quando comparamos treino *versus* teste, através do teste de Wilcoxon; p=0,017 quando comparamos o grupo controle *versus* tratado, pelo teste de Mann-Whitney). Dessa forma, os dados sugerem que a manutenção de uma memória aversiva forte e duradoura depende da ativação dos receptores CB1.

Para responder a segunda questão, realizamos um protocolo de treino fraco no paradigma da esquiva inibitória *step-through* (Figura 2D). Neste protocolo, os animais não tratados já esqueceram a memória em 5 dias (Figura 2E, p=0,5703 para o grupo DMSO 8% quando comparamos latências de treino *versus* teste, através do teste de Wilcoxon), confirmando que com esse treino é formada uma memória mais fraca (p=0,0205, test-t pareado do treino *versus* teste de 2d, através do teste de Wilcoxon), esquecida mais rapidamente. Como no experimento anterior vimos que o bloqueio dos receptores CB1 induziu o esquecimento de uma memória aversiva

forte, levantamos a hipótese de que a ativação desses receptores poderia impedir o decaimento da memória. Assim, administramos WIN 55,212-2, um agonista não-seletivo dos receptores CB1, i.p. durante quatro dias consecutivos até o teste no quinto dia (Figura 2D), para verificarmos se essa memória seria mantida. Porém, o teste de Wilcoxon não revelou diferenças significativas entre a latência do treino *versus* teste (Figura 2E-F; p=0,1719 para WIN 55,212-2, através do teste de Wilcoxon; p=0,5320 através do teste de Mann-Whitney), sugerindo que o SE não está envolvido no esquecimento de memórias aversivas fracas.

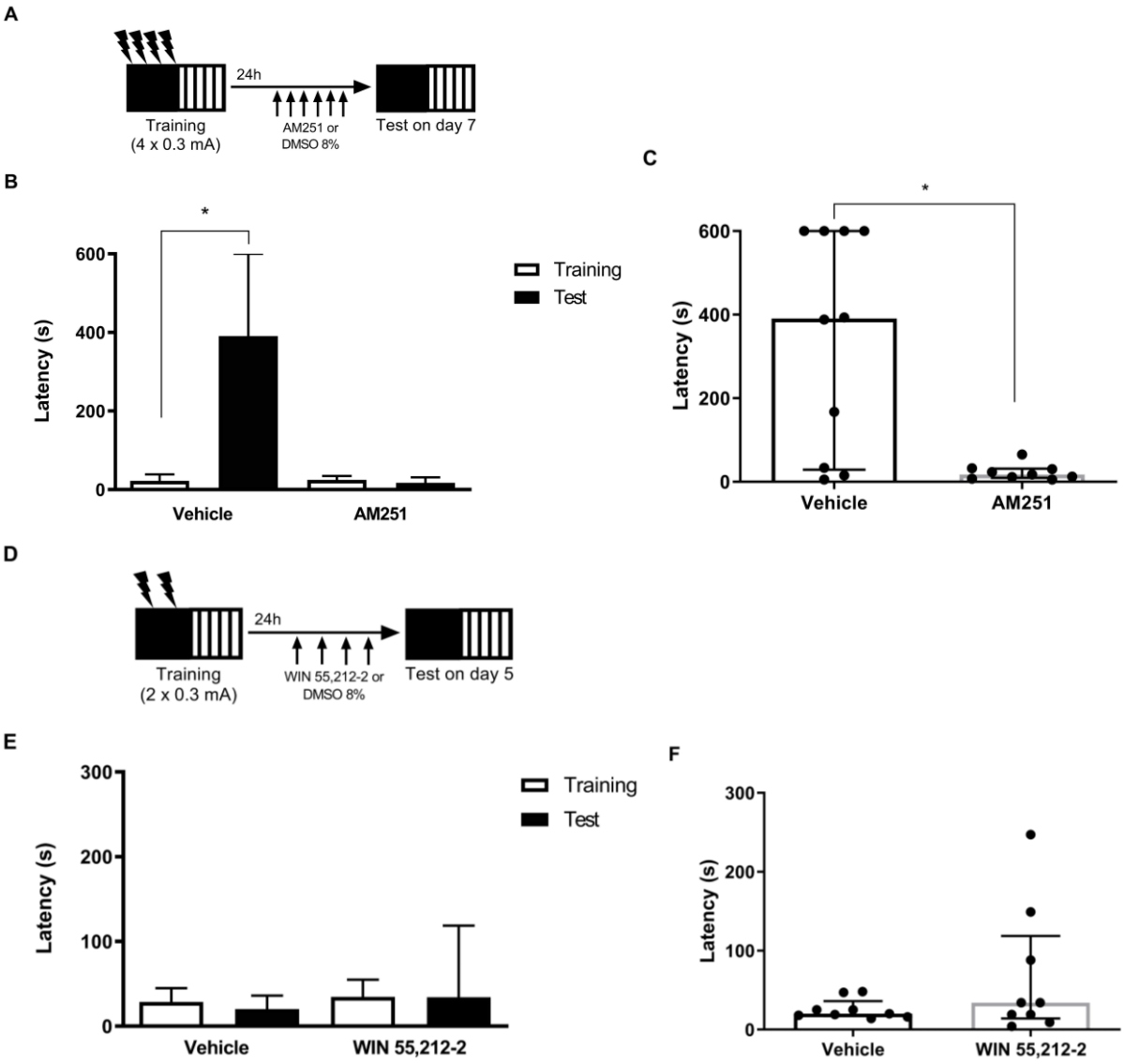


Figura 2. A ativação dos receptores CB1 é necessária para a manutenção de memórias aversivas fortes, mas não é suficiente para impedir o esquecimento de memórias aversivas fracas. (A) Desenho experimental do protocolo forte (4 choques de 0,3mA) da esquiva inibitória *step-through*. (B) Teste de Wilcoxon p=0,0059, para DMSO 8%; teste de Wilcoxon p=0,3594, para AM251. (C) Teste de Mann-Whitney p=0,017. (B-C) O grupo controle retém a memória por 7d e injeções crônicas do antagonista do receptor CB1, AM251 (1 mg/mL/kg i.p.), aceleram o decaimento da memória. (D) Desenho experimental do protocolo fraco (2 choques de 0,3mA) da esquiva inibitória *step-through*. (E) Teste de Wilcoxon p=0,5703, para DMS0 8%; teste de Wilcoxon p=0,1719, para WIN 55,212-2. (F) Teste de Mann-Whitney p=0,5320. (E-F) O grupo controle retém a memória por 5d e injeções crônicas de um agonista CB1, WIN 55,212-2 (0,25 mg/mL/kg i.p.), não foram suficientes para impedir o decaimento da memória. Os dados são expressos em medianas com intervalo interquartil (n=9-8).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo examinou o papel do SE no processo de esquecimento de memórias espaciais e aversivas. Em suma, verificamos que a modulação do SE é

somente recrutada em tarefas que envolvem um forte componente emocional, já que as drogas canabinoides produziram efeito somente no protocolo forte da esquiva inibitória (Figura 2A-C). Nesse caso o bloqueio crônico dos receptores CB1 induziu o esquecimento da memória aversiva forte e duradoura formada com esse paradigma, sugerindo que a ativação dos receptores CB1 é essencial para a manutenção dessa memória ao longo do tempo.

Nossos dados corroboram a literatura, pois diversos estudos já demonstraram que a modulação do SE é recrutada somente em situações de estresse. Sabe-se que o nível de envolvimento emocional causado pela aversividade da tarefa e condições experimentais promove a ativação de neuromoduladores do estresse, que é necessária para recrutar o sistema endocanabinoide (Atsak et al., 2015; de Oliveira Alvares et al., 2010; Hill et al., 2010; Hohmann et al., 2005; Morena & Campolongo, 2014). De fato, já foi visto que os glicocorticoides (GCs) são liberados do córtex adrenal em resposta a um estímulo estressante, atravessam livremente a barreira hematoencefálica (Joëls, 2008; McGaugh & Roozendaal, 2002) e atuam sobre receptores glicocorticoides acoplados a proteína G (mGCR, rápidos, não genômicos, ligados à membrana) localizados na membrana pós-sináptica de neurônios (Di, Malcher-Lopes, Halmos, & Tasker, 2003; Di, Malcher-Lopes, Marcheselli, Bazan, & Tasker, 2005; Tasker, Di, & Malcher-Lopes, 2006). Essa ativação induz a síntese de ECs (Di et al., 2005; Hohmann et al., 2005), que irão, então, se difundir até a membrana pré-sináptica de neurônios próximos e interagir com os receptores CB1 (Di et al., 2003), possivelmente inibindo a liberação de GABA (Katona et al., 1999; Wilson & Nicoll, 2002) e facilitando qualquer evento subsequente de plasticidade glutamatérgica (Chevaleyre & Castillo, 2003; Hill & McEwen, 2009; Wilson & Nicoll, 2001). Nós acreditamos que esse seja o mecanismo recrutado na formação da memória aversiva com o protocolo forte da esquiva deste estudo (Figura 2A). Esse mecanismo possivelmente também é recrutado em todos os momentos em que essa memória é evocada (por exemplo, durante o sono), levando a manutenção dos mecanismos moleculares essenciais para manter essa memória ao longo do tempo (síntese de PKMζ e novos GluA2-AMPAR, e sua estabilização na densidade pós-sináptica), no nosso caso, durante sete dias (Figura 2B). No entanto, a partir do momento em que os receptores CB1 são bloqueados cronicamente, a inibição mediada pelo GABA acabaria induzindo o decaimento da

LTP nos neurônios responsáveis por sustentar essa memória, resultando no seu esquecimento ativo (Figura 2C).

Acreditamos ainda que esse esquecimento ativo pode ser tanto o mediado pela endocitose dos receptores AMPA, como o induzido pela Rac1. Interessantemente, um estudo de 2015, realizado por Njoo e colaboradores, verificou que a inibição dos receptores CB1 leva a ativação da cascata de sinalização mediada pela Rac1. Assim, seria muito interessante verificar se o esquecimento obtido em nosso estudo é dependente da ativação da Rac1, já que uma interação entre o SE e essa via de sinalização já foi demonstrada.

A relação entre o sistema GC e endocanabinoide também explica o porquê da administração dos fármacos canabinoides não ter resultado em nenhum efeito significativo na tarefa de localização de objetos (tarefa considerada neutra, sem envolvimento emocional) (Figura 1E-H) e no protocolo fraco da esquiva inibitória (Figura 2D-G). Como essas tarefas possuem uma aversividade e um envolvimento emocional menor do que o treino forte da esquiva, o sistema glicocorticoide foi pouco, ou não foi recrutado e assim uma quantidade pequena de ECs foi sintetizada e liberada dos neurônios (Hill & McEwen, 2009; Hill et al., 2010; Morena & Campolongo, 2014). Esses dados vão de encontro também com o fato do recrutamento endocanabinoide depender do nível de aversividade da tarefa (protocolo forte *versus* fraco da esquiva) e da natureza do estímulo (estímulo aversivo *versus* espacial/neutro). Alguns estudos obtiveram resultados bastantes parecidos com os nossos, visto que a modulação endocanabinoide influenciou na consolidação da memória na esquiva inibitória *step-down* e no condicionamento aversivo ao contexto (CAC), enquanto que sobre a habituação ao campo aberto (de Oliveira Alvares et al., 2005; de Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008; de Oliveira Alvares et al., 2006), sobre a extinção em tarefas de aprendizagem associativa com estímulos apetitivos (Hölter et al., 2005) ou na tarefa de reconhecimento de objetos (Campolongo et al., 2012), não promoveram efeitos. Também foi demonstrado que a ação do SE depende da intensidade do choque utilizado no CAC (de Oliveira Alvares et al., 2010) e no condicionamento aversivo ao tom (Kamprath et al., 2009).

A via de administração sistêmica seria outra explicação para essa falta de efeito dos fármacos. Como há uma enorme quantidade de receptores CB1 espalhados por todo o SNC (Herkenham et al., 1990; Vaughan & Christie, 2005), a

administração sistêmica acaba fazendo com que as drogas ajam sobre diferentes estruturas, que muitas vezes respondem diferentemente a modulação canabinoide. Assim, as ações em uma região podem ser contrabalanceadas por ações noutra(s) área(s), não resultando em efeitos significativos. Uma alternativa para contornar esse problema seria a microinjeção dos fármacos em estruturas específicas relacionadas com a função mental a ser estudada, no nosso caso, no hipocampo. Porém, em nosso laboratório, microinjeções crônicas acabam acarretando danos na estrutura encefálica (gliose, por exemplo), comprometendo os resultados. Além disso, a escolha pela via de administração sistêmica também ocorreu para não submeter os animais a tantos procedimentos invasivos (cirurgia e microinjeções diárias), tornando o modelo mais fiel à realidade.

O fato da administração sistêmica crônica de SR141716 não produzir nenhum efeito sobre a manutenção/esquecimento da memória espacial do LO (Figura 1E-H), também pode ser explicado pela íntima relação entre o SE e endovaniloide. Desde a descoberta de que a anandamida pode ter atividade sobre o receptor TRPV1 (do inglês, *transient receptor potential vanilloid 1*), além de CB1 (Smart et al., 2000; Szallasi & Di Marzo, 2000; Zygmunt et al., 1999), um crescente número de evidências vem sugerindo que o SE e o sistema endovaniloide desenvolvem um papel modulatório sinérgico (Di Marzo & De Petrocellis, 2012; Ross, 2003). Estudos imunoistoquímicos mostraram que o receptor CB1 e o receptor TRPV1 estão colocalizados por uma extensa área do hipocampo (Cristino et al., 2006; Tóth et al., 2005) e recentemente um trabalho demonstrou que estes sistemas possuem uma relação funcional e compartilham certas vias de sinalização no hipocampo durante a plasticidade sináptica (Tahmasebi et al., 2015). Assim, pode ter acontecido uma compensação do sistema endovaniloide quando bloqueamos cronicamente os receptores CB1 na tarefa de LO. De fato, a anandamida possui uma seletividade maior pelo receptor TRPV1 do que pelo CB1 em alguns tecidos (Ross, 2003; Smart et al., 2000). Mas, não acreditamos que esse tenha sido o caso, já que: (1) assim como para o SE, o sistema endovaniloide também é recrutado preferencialmente em situações de estresse (Genro, de Oliveira Alvares, & Quillfeldt, 2012; Marsch et al., 2007); e (2) foram observados efeitos do AM251 sobre a manutenção da memória aversiva forte (Figura 2C), ou seja, nesse caso não ocorreu uma compensação pelo sistema endovaniloide. Dessa forma, a hipótese da relação entre o SE e GC se aplica melhor aos dados.

Pode-se pensar também que a falta de efeitos da administração sistêmica crônica de WIN 55,212-2 sobre o esquecimento da memória aversiva fraca (Figura 1E-F), seja devido à baixa dose utilizada. Porém, deve-se lembrar que administramos a droga cronicamente. Assim, com o tempo, haveria níveis relevantes desse fármaco agindo sobre o SE. Dessa forma, tentamos mimetizar a pouca liberação de ECs que ocorre em situações de baixa aversividade. Além disso, como esse fármaco é um agonista não seletivo, doses mais altas facilitariam a sua ligação ao receptor CB2, ao invés de CB1 (por qual ele tem mais afinidade) (Felder et al., 1995; Pamplona & Takahashi, 2006).

Em resumo, nossos resultados sugerem que a modulação do SE sobre a manutenção/esquecimento das memórias é recrutada em situações particulares, como diante de um aprendizado com um certo nível de aversão ou envolvimento emocional. Sob uma perspectiva geral, propomos a inibição crônica dos receptores CB1, como um possível mecanismo de indução do esquecimento ativo das memórias aversivas. Esse novo mecanismo poderia ser utilizado como uma nova estratégia terapêutica para acelerar o esquecimento de memórias traumáticas e mal adaptativas de longo prazo, como aquelas classicamente observadas em condições psiquiátricas, como transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e dependência de drogas. Por fim, para nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração de que o SE está envolvido na manutenção/esquecimento das memórias.

Conflito de interesse: os autores declaram não haver qualquer interesse financeiro pessoal ou qualquer conflito de interesse.

Agradecimentos: Esta pesquisa foi apoiada por bolsas da CAPES e CNPq (MEC). Nós agradecemos a Isabel Cristina Marques Scarello pela gentil assistência técnica e carinho.

REFERÊNCIAS

Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, *58*(4), 315–348. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00087-2

Atsak, P., Hauer, D., Campolongo, P., Schelling, G., Fornari, R. V., & Roozendaal, B. (2015). Endocannabinoid signaling within the basolateral amygdala integrates multiple stress hormone effects on memory consolidation. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *40*(6), 1485–1494. https://doi.org/10.1038/npp.2014.334

Campolongo, P., Ratano, P., Manduca, A., Scattoni, M. L., Palmery, M., Trezza, V., & Cuomo, V. (2012). The endocannabinoid transport inhibitor AM404 differentially modulates recognition memory in rats depending on environmental aversiveness. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *6*, 11–11. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00011

Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., & Hashimotodani, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, *76*(1), 70–81. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020

Cervantes-Sandoval, I., Chakraborty, M., MacMullen, C., & Davis, R. L. (2016). Scribble Scaffolds a Signalosome for Active Forgetting. *Neuron*, *90*(6), 1230–1242. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.010

Chevaleyre, V., & Castillo, P. E. (2003). Heterosynaptic LTD of Hippocampal GABAergic Synapses: A Novel Role of Endocannabinoids in Regulating Excitability. *Neuron*, *38*(3), 461–472. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00235-6

Chevaleyre, V., Takahashi, K. A., & Castillo, P. E. (2006). ENDOCANNABINOID-MEDIATED SYNAPTIC PLASTICITY IN THE CNS. *Annual Review of Neuroscience*, *29*(1), 37–76. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112834

Collins Dawn R., Pertwee Roger G., & Davies Stephen N. (1995). Prevention by the cannabinoid antagonist, SR141716A, of cannabinoid-mediated blockade of long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *British Journal of Pharmacology*, *115*(6), 869–870. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15889.x

Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., & Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, *139*(4), 1405–1415. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.074

Davis, R. L., & Zhong, Y. (2017). The Biology of Forgetting-A Perspective. *Neuron*, *95*(3), 490–503. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.039

de Oliveira Alvares, L., de Oliveira, L. F., Camboim, C., Diehl, F., Genro, B. P., Lanziotti, V. B., & Quillfeldt, J. A. (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), 119–124. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.10.002

de Oliveira Alvares, L., Engelke, D. S., Diehl, F., Scheffer-Teixeira, R., Haubrich, J., de Freitas Cassini, L., … Quillfeldt, J. A. (2010). Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learning & Memory*, *17*(4), 202–209. https://doi.org/10.1101/lm.1721010

de Oliveira Alvares, L., Genro, B. P., Diehl, F., & Quillfeldt, J. A. (2008). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory*, *90*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.01.009

de Oliveira Alvares, L., Pasqualini Genro, B., Vaz Breda, R., Pedroso, M. F., Costa Da Costa, J., & Quillfeldt, J. A. (2006). AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Research*, *1075*(1), 60–67. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.101

Di Marzo, V., & De Petrocellis, L. (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *367*(1607), 3216–3228. https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0382

Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. Cs., & Tasker, J. G. (2003). Nongenomic Glucocorticoid Inhibition via Endocannabinoid Release in the Hypothalamus: A Fast Feedback Mechanism. *The Journal of Neuroscience*, *23*(12), 4850. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-04850.2003

Di, S., Malcher-Lopes, R., Marcheselli, V. L., Bazan, N. G., & Tasker, J. G. (2005). Rapid Glucocorticoid-Mediated Endocannabinoid Release and Opposing Regulation of Glutamate and γ-Aminobutyric Acid Inputs to Hypothalamic Magnocellular Neurons. *Endocrinology*, *146*(10), 4292–4301. https://doi.org/10.1210/en.2005-0610

Dong, Z., Han, H., Li, H., Bai, Y., Wang, W., Tu, M., … Wang, Y. T. (2015). Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(1), 234–247. https://doi.org/10.1172/JCI77888

Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., … Mitchell, R. L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology*, *48*(3), 443.

Gao, Q., Yao, W., Wang, J., Yang, T., Liu, C., Tao, Y., … Ma, L. (2015). Post-training activation of Rac1 in the basolateral amygdala is required for the formation of both short-term and long-term auditory fear memory. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*, 65–65. https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00065

Genro, B. P., de Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2012). Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure. *Neurobiology of Learning and Memory*, *97*(4), 355–360. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.01.002

Hardt, O., Nader, K., & Nadel, L. (2013). Decay happens: the role of active forgetting in memory. *Trends in Cognitive Sciences*, *17*(3), 111–120. https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.01.001

Hardt, O., Nader, K., & Wang, Y.-T. (2014). GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis and the decay of early and late long-term potentiation: possible mechanisms for forgetting of short- and long-term memories. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1633), 20130141. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0141

Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(5), 1932–1936.

Hill, M. N., & McEwen, B. S. (2009). Endocannabinoids: The silent partner of glucocorticoids in the synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(12), 4579. https://doi.org/10.1073/pnas.0901519106

Hill, M. N., Patel, S., Campolongo, P., Tasker, J. G., Wotjak, C. T., & Bains, J. S. (2010). Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(45), 14980–14986. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4283-10.2010

Hohmann, A. G., Suplita, R. L., Bolton, N. M., Neely, M. H., Fegley, D., Mangieri, R., … Piomelli, D. (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, *435*(7045), 1108–1112. https://doi.org/10.1038/nature03658

Hölter, S. M., Kallnik, M., Wurst, W., Marsicano, G., Lutz, B., & Wotjak, C. T. (2005). Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. *European Journal of Pharmacology*, *510*(1–2), 69–74. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.01.008

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., & Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*, *52*(5), 831–843. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.035

Jiang, L., Mao, R., Zhou, Q., Yang, Y., Cao, J., Ding, Y., … Xu, L. (2016). Inhibition of Rac1 Activity in the Hippocampus Impairs the Forgetting of Contextual Fear Memory. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1247–1253. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9093-6

Joëls, M. (2008). Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Stress Hormone Actions in Brain, in Health and Disease*, *583*(2), 312–321. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.064

Kamprath, K., Plendl, W., Marsicano, G., Deussing, J. M., Wurst, W., Lutz, B., & Wotjak, C. T. (2009). Endocannabinoids mediate acute fear adaptation via glutamatergic neurons independently of corticotropin-releasing hormone signaling. *Genes, Brain, and Behavior*, *8*(2), 203–211. https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00463.x

Katona, I., Sperlágh, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., & Freund, T. F. (1999). Presynaptically Located CB1 Cannabinoid Receptors Regulate GABA Release from Axon Terminals of Specific Hippocampal Interneurons. *Journal of Neuroscience*, *19*(11), 4544–4558. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04544.1999

Knobloch, M., & Mansuy, I. M. (2008). Dendritic Spine Loss and Synaptic Alterations in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, *37*(1), 73–82. https://doi.org/10.1007/s12035-008-8018-z

Kruk-Slomka, M., & Biala, G. (2016). CB1 receptors in the formation of the different phases of memory-related processes in the inhibitory avoidance test in mice. *Behavioural Brain Research*, *301*, 84–95. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.023

Liu, Y., Du, S., Lv, L., Lei, B., Shi, W., Tang, Y., … Zhong, Y. (2016). Hippocampal Activation of Rac1 Regulates the Forgetting of Object Recognition Memory. *Current Biology*, *26*(17), 2351–2357. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.056

Liu, Y., Lv, L., Wang, L., & Zhong, Y. (2018). Social Isolation Induces Rac1-Dependent Forgetting of Social Memory. *Cell Reports*, *25*(2), 288-295.e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.033

Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kössl, M., Holsboer, F., … Wotjak, C. T. (2007). Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice. *The Journal of Neuroscience*, *27*(4), 832. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3303-06.2007

McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, *12*(2), 205–210. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00306-9

Migues, P. V., Liu, L., Archbold, G. E. B., Einarsson, E. O., Wong, J., Bonasia, K., … Hardt, O. (2016). Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. *Journal of Neuroscience*, *36*(12), 3481–3494. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3333-15.2016

Morena, M., & Campolongo, P. (2014). The endocannabinoid system: An emotional buffer in the modulation of memory function. *Stress and the Regulation of Memory: From Basic Mechanisms to Clinical Implications*, *112*, 30–43. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.12.010

Niyuhire, F., Varvel, S. A., Thorpe, A. J., Stokes, R. J., Wiley, J. L., & Lichtman, A. H. (2007). The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are

task-specific. *Psychopharmacology*, *191*(2), 223–231. https://doi.org/10.1007/s00213-006-0650-6

Njoo, C., Agarwal, N., Lutz, B., & Kuner, R. (2015). The Cannabinoid Receptor CB1 Interacts with the WAVE1 Complex and Plays a Role in Actin Dynamics and Structural Plasticity in Neurons. *PLoS Biology*, *13*(10), e1002286–e1002286. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002286

Oh, D., Han, S., Seo, J., Lee, J.-R., Choi, J., Groffen, J., … Kim, E. (2010). Regulation of Synaptic Rac1 Activity, Long-Term Potentiation Maintenance, and Learning and Memory by BCR and ABR Rac GTPase-Activating Proteins. *The Journal of Neuroscience*, *30*(42), 14134. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1711-10.2010

Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., & Kano, M. (2001). Endogenous Cannabinoids Mediate Retrograde Signals from Depolarized Postsynaptic Neurons to Presynaptic Terminals. *Neuron*, *29*(3), 729–738. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00247-1

Pamplona, F. A., & Takahashi, R. N. (2006). WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neuroscience Letters*, *397*(1), 88–92. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.026

Pergher, G. K., & Stein, L. M. (2003). Compreendendo o esquecimento: teorias clássicas e seus fundamentos experimentais. *Psicologia USP*, *14*, 129–155.

Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*, 873.

Quillfeldt, J., & Alvares, L. (2015). *The Hippocampal Endocannabinoid System in Different Memory Phases: Unveiling the CA1 Circuitry*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2294-9_3

Richards, B. A., & Frankland, P. W. (2017). The Persistence and Transience of Memory. *Neuron*, *94*(6), 1071–1084. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.037

Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology*, *140*(5), 790–801. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705467

Sachser, R. M., Haubrich, J., Lunardi, P. S., & de Oliveira Alvares, L. (2017). Forgetting of what was once learned: Exploring the role of postsynaptic ionotropic glutamate receptors on memory formation, maintenance, and decay. *Ionotropic Glutamate Receptors*, *112*, 94–103. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.015

Sachser, R. M., Santana, F., Crestani, A. P., Lunardi, P., Pedraza, L. K., Quillfeldt, J. A., … de Oliveira Alvares, L. (2016). Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage-dependent Ca2+ channels, and calcineurin. *Scientific Reports*, *6*(February), 22771. https://doi.org/10.1038/srep22771

Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., & Sabatini, B. L. (2007). Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid-β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Neuroscience*, *27*(11), 2866. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007

Shuai, Y., Lu, B., Hu, Y., Wang, L., Sun, K., & Zhong, Y. (2010). Forgetting Is Regulated through Rac Activity in Drosophila. *Cell*, *140*(4), 579–589. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.044

Smart, D., Gunthorpe, M. J., Jerman, J. C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A. I., … Davis, J. B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *British Journal of Pharmacology*, *129*(2), 227–230. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703050

Szallasi, A., & Di Marzo, V. (2000). New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends in Neurosciences*, *23*(10), 491–497. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01630-1

Tahmasebi, L., Komaki, A., Karamian, R., Shahidi, S., Sarihi, A., Salehi, I., & Nikkhah, A. (2015). The interactive role of cannabinoid and vanilloid systems in hippocampal synaptic plasticity in rats. *European Journal of Pharmacology*, *757*, 68–73. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.063

Takahashi, R. N., Pamplona, F. A., & Fernandes, M. S. (2005). The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neuroscience Letters*, *380*(3), 270–275. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.049

Tasker, J. G., Di, S., & Malcher-Lopes, R. (2006). Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*, *147*(12), 5549–5556. https://doi.org/10.1210/en.2006-0981

Terranova, J.-P., Michaud, J.-C., Le Fur, G., & Soubrié, P. (1995). Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *352*(5), 576–579. https://doi.org/10.1007/BF00169393

Tóth, A., Boczán, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., … Blumberg, P. M. (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Molecular Brain Research*, *135*(1), 162–168. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.003

Varvel, S., & Lichtman, A. (2006). *Role of the endocannabinoid system in learning and memory*. https://doi.org/10.1007/3-7643-7358-X_6

Vaughan, C. W., & Christie, M. J. (2005). Retrograde Signalling by Endocannabinoids. In R. G. Pertwee (Ed.), *Cannabinoids* (pp. 367–383). https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_12

Villarreal, D. M., Do, V., Haddad, E., & Derrick, B. E. (2002). NMDA receptor antagonists sustain LTP and spatial memory: active processes mediate LTP decay. *Nature Neuroscience*, *5*(1), 48–52. https://doi.org/10.1038/nn776

Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, *410*, 588.

Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Science*, *296*(5568), 678. https://doi.org/10.1126/science.1063545

Wixted, J. T. (2004). The Psychology and Neuroscience of Forgetting. *Annual Review of Psychology*, *55*(1), 235–269. https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.141555

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sørgård, M., Di Marzo, V., … Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, *400*(6743), 452–457. https://doi.org/10.1038/22761

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho demonstramos que a modulação do SE sobre a manutenção/esquecimento das memórias é recrutada dependendo do nível de aversividade ou envolvimento emocional relacionado a tarefa. Esses dados vão de encontro com diversos dados da literatura que demostram que o sistema glicocorticoide está envolvido na síntese e liberação dos ECs. Em suma, apresentamos um novo mecanismo que pode estar envolvido no processo de esquecimento ativo, além de um novo papel da modulação do SE: a indução do processo de esquecimento ativo através da inibição crônica dos receptores CB1. Propomos ainda que esse mecanismo possa ser utilizado como uma nova estratégia terapêutica para acelerar o esquecimento de memórias traumáticas e mal adaptativas de longo prazo.

Como, para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que se propôs a avaliar o papel do SE na manutenção ou esquecimento das memórias, possuímos diversas perspectivas para esse trabalho. Seria interessante administrar um agonista CB1 no protocolo de localização de objetos, assim como, no protocolo forte da esquiva inibitória (nesse caso, antes seria necessário descobrir o momento em que essa memória é esquecida fisiologicamente). Também seria importante administrar um antagonista CB1 no protocolo fraco da esquiva inibitória. Com isso, veríamos os efeitos da modulação completa do SE nesses tipos de memórias e nossos resultados teriam maior consistência.

Pode-se investigar também se nos casos em que o SE não mostrou efeitos sobre a manutenção/esquecimento, não há uma participação do sistema endovaniloide, já que estudos vem mostrando uma íntima relação entre esses sistemas. Também seria interessante verificar se a administração de glicocorticoides exógenos teria alguma influência sobre a modulação do SE no protocolo fraco da esquiva.

Por fim, a fim de complementar o trabalho e conferir maior consistência aos achados comportamentais, pode-se empregar a técnica de *western blot*, para tentar rastrear as possíveis mudanças celulares e moleculares provocadas pela modulação canabinoide. O *western blot* das frações sinápticas do hipocampo após o esquecimento induzido pelo AM251, permitiria quantificar os receptores GluA2-AMPA, a proteína quinase PKMζ, a fosfatase calcineurina e a proteína Rac1, por

exemplo, esclarecendo se o bloqueio dos receptores CB1 levou ao esquecimento da memória aversiva através dos mecanismos já conhecidos subjacentes ao esquecimento ativo. Seguindo essa linha, também poderíamos bloquear os receptores GluN2B-NMDA ao mesmo tempo que bloqueamos CB1, para vermos se essa memória seria esquecida ou não, nessas condições. Dependendo desses resultados, seria possível verificar também qual cascata bioquímica está envolvida no esquecimento ativo induzido pelo SE.

REFERÊNCIAS

ABUSH, Hila; AKIRAV, Irit. Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. **Hippocampus**, v. 20, n. 10, p. 1126–1138, 2010.

AKERS, Katherine G. *et al*. Hippocampal Neurogenesis Regulates Forgetting During Adulthood and Infancy. **Science**, v. 344, n. 6184, p. 598, 2014.

AMERI, Angela. The effects of cannabinoids on the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 4, p. 315–348, 1999.

ARDESHIRI, Motahareh Rouhi; HOSSEINMARDI, Narges; AKBARI, Esmaeil. The basolateral amygdala orexin 1 and 2 receptors' involvement in modulating spatial reference memory. **Brain Research**, v. 1704, p. 16–25, 2019.

ATSAK, Piray *et al*. 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**, v. 109, n. 9, p. 3504–3509, 2012.

BADDELEY, Alan D. **Human memory: Theory and practice.** Needham Heights, MA, US: Allyn & Bacon, 1990.

BAHRICK, H. P.; BAHRICK, P. O.; WITTLINGER, R. P. Fifty years of memory for names and faces: A cross-sectional approach. **Journal of Experimental Psychology: General**, v. 104, n. 1, p. 54–75, 1975.

BEATTIE, Eric C. *et al*. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1291–1300, 2000.

BELLMUND, Jacob L. S. *et al*. Navigating cognition: Spatial codes for human thinking. **Science**, v. 362, n. 6415, 2018.

BERGSTROM, Hadley C. The neurocircuitry of remote cued fear memory. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 71, p. 409–417, 2016.

BERRY, Jacob A. *et al*. Dopamine is required for learning and forgetting in Drosophila. **Neuron**, v. 74, n. 3, p. 530–542, 2012.

BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

BOHME, G. A. *et al*. Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. **Neuroscience**, v. 95, n. 1, p. 5–7, 1999.

BOSCH, Miquel *et al*. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. **Neuron**, v. 82, n. 2, p. 444–459, 2014.

BOUTON, Mark E. Context and behavioral processes in extinction. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 11, n. 5, p. 485–494, 2004.

CAMMAROTA, Martin *et al*. Retrieval and the extinction of memory. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 25, n. 3–4, p. 465–474, 2005.

CAMPOLONGO, Patrizia *et al*. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4888, 2009.

CARVALHO, Cristiane *et al*. **Canabinoides e Epilepsia: potencial terapêutico do canabidiol**. Vittlle, v. 29, n. 1, 2017.

CASAGRANDE, Mirelle A. *et al*. Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 150, p. 42–47, 2018.

CASTILLO, Pablo E. *et al*. Endocannabinoid signaling and synaptic function. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 70–81, 2012.

CERVANTES-SANDOVAL, Isaac *et al*. Scribble Scaffolds a Signalosome for Active Forgetting. **Neuron**, v. 90, n. 6, p. 1230–1242, 2016.

CHEVALEYRE, Vivien; CASTILLO, Pablo E. Heterosynaptic LTD of Hippocampal GABAergic Synapses: A Novel Role of Endocannabinoids in Regulating Excitability. **Neuron**, v. 38, n. 3, p. 461–472, 2003.

CHRISTIANSON, Sven-Åke. Emotional stress and eyewitness memory: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 112, n. 2, p. 284–309, 1992.

COLLINS DAWN R.; PERTWEE ROGER G.; DAVIES STEPHEN N. Prevention by the cannabinoid antagonist, SR141716A, of cannabinoid-mediated blockade of

long-term potentiation in the rat hippocampal slice. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 6, p. 869–870, 1995.

DAVIS, Ronald L.; ZHONG, Yi. The Biology of Forgetting-A Perspective. **Neuron**, v. 95, n. 3, p. 490–503, 2017.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al*. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. **Brain Research**, v. 1075, n. 1, p. 60–67, 2006.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al*. 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**, v. 83, n. 2, p. 119–124, 2005.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al*. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 1, p. 1–9, 2008. a.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al*. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1648–1655, 2008. b.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al*. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neuroscience**, v. 244, p. 42–8, 2013.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al*. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. **Learning & Memory**, v. 17, n. 4, p. 202–209, 2010.

DEVANE, WA *et al*. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946, 1992.

DIAMOND, Adele. Executive functions. **Annual review of psychology**, v. 64, p. 135–168, 2013.

DIX, Sophie L.; AGGLETON, John P. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. **Behavioural Brain Research**, v. 99, n. 2, p. 191–200, 1999.

DO MONTE, Fabricio H. *et al*. Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 250, p. 23–27, 2013.

DONG, Tao *et al*. Inability to activate Rac1-dependent forgetting contributes to behavioral inflexibility in mutants of multiple autism-risk genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 27, p. 7644, 2016.

DONG, Zhifang *et al*. Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p. 234–247, 2015.

DUDAI, Yadin. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? **Annual Review of Psychology**, v. 55, n. 1, p. 51–86, 2004.

DUVARCI, Sevil; PARE, Denis. Amygdala microcircuits controlling learned fear. **Neuron**, v. 82, n. 5, p. 966–980, 2014.

EFFTING, Marieke; KINDT, Merel. Contextual control of human fear associations in a renewal paradigm. **Behaviour Research and Therapy**, v. 45, n. 9, p. 2002–2018, 2007.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.

EPP, Jonathan R. *et al*. Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference. **Nature Communications**, v. 7, p. 10838, 2016.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 743–760, 1999.

FINK, George. **Stress: physiology, biochemistry and pathology**. 3th ed. London: Elsevier, 2019.

FLEISHMAN, Edwin A.; PARKER JR., James F. Factors in the retention and relearning of perceptual-motor skill. **Journal of Experimental Psychology**, v. 64, n. 3, p. 215–226, 1962.

FRANKLAND, Paul W.; KÖHLER, Stefan; JOSSELYN, Sheena A. Hippocampal neurogenesis and forgetting. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 9, p. 497–503, 2013.

FURINI, Cristiane; MYSKIW, Jociane; IZQUIERDO, Ivan. The learning of fear extinction. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 670–683, 2014.

GAO, Qinqin *et al*. Post-training activation of Rac1 in the basolateral amygdala is required for the formation of both short-term and long-term auditory fear memory. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 8, p. 65–65, 2015.

GEWIRTZ, Jonathan C.; DAVIS, Michael. Using Pavlovian Higher-Order Conditioning Paradigms to Investigate the Neural Substrates of Emotional Learning and Memory. **Learning & Memory**, v. 7, n. 5, p. 257–266, 2000.

GOOSENS, Ki Ann. Hippocampal regulation of aversive memories. **Current opinion in neurobiology**, v. 21, n. 3, p. 460–466, 2011.

HAN, Jing *et al*. Acute Cannabinoids Impair Working Memory through Astroglial CB1 Receptor Modulation of Hippocampal LTD. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 1039–1050, 2012.

HARDT, Oliver; NADER, Karim; NADEL, Lynn. Decay happens: the role of active forgetting in memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 17, n. 3, p. 111–120, 2013.

HARDT, Oliver; NADER, Karim; WANG, Yu-Tian. GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis and the decay of early and late long-term potentiation: possible mechanisms for forgetting of short- and long-term memories. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1633, p. 20130141, 2014.

HAYASHI-TAKAGI, Akiko *et al*. Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. **Nature**, v. 525, p. 333, 2015.

HEGEMANN, Regina U.; ABRAHAM, Wickliffe C. Electrophysiological Investigation of Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Metaplasticity in the Hippocampus. In: BURGER, Corinna; VELARDO, Margaret Jo (Eds.). **Glutamate Receptors: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2019. p. 79–91.

HERKENHAM, M. *et al*. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 5, p. 1932–6, 1990.

HILL, Matthew N. *et al*. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 45, p. 14980–14986, 2010.

HILL, Matthew N.; MCEWEN, Bruce S. Endocannabinoids: The silent partner of glucocorticoids in the synapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4579, 2009.

HOHMANN, Andrea G. *et al*. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1108–1112, 2005.

HÖLTER, Sabine M. *et al*. Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. **European journal of pharmacology**, v. 510, n. 1–2, p. 69–74, 2005.

HSIEH, Helen *et al*. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. **Neuron**, v. 52, n. 5, p. 831–843, 2006.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural pharmacology**, v. 11, n. 7–8, p. 517–34, 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Correlation between the Pharmacology of Long-Term Potentiation and the Pharmacology of Memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 63, n. 1, p. 19–32, 1995.

IZQUIERDO, Ivan *et al*. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496–505, 2006.

IZQUIERDO, Ivan *et al*. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behavioural pharmacology**, v. 9, n. 5–6, p. 421–427, 1998. a.

IZQUIERDO, Ivan *et al*. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 1998. b.

IZQUIERDO, Ivan *et al*. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p. 353-364, Sept. 2000.

IZQUIERDO, Ivan. **Memória**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, Ivan; FURINI, Cristiane R. G.; MYSKIW, Jociane C. Fear Memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.

JAMALI-RAEUFY, Nida *et al*. Cross state-dependency of learning between WIN55, 212-2 and scopolamine in rat dorsal hippocampus. **Neuroscience letters**, v. 491, n. 3, p. 227–231, 2011.

JENKINS, J. G.; DALLENBACH, K. M. Obliviscence During Sleep and Waking. **The American Journal of Psychology**, v. 35, p. 605–612, 1924.

JIANG, Lizhu *et al*. Inhibition of Rac1 Activity in the Hippocampus Impairs the Forgetting of Contextual Fear Memory. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 1247–1253, 2016.

JOËLS, Marian; FERNANDEZ, Guillen; ROOZENDAAL, Benno. Stress and emotional memory: a matter of timing. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, n. 6, p. 280–288, 2011.

JOHANSEN, Joshua P. *et al*. Molecular mechanisms of fear learning and memory. **Cell**, v. 147, n. 3, p. 509–524, 2011.

KAMPRATH, K. *et al*. Endocannabinoids mediate acute fear adaptation via glutamatergic neurons independently of corticotropin-releasing hormone signaling. **Genes, brain, and behavior**, v. 8, n. 2, p. 203–211, 2009.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2001.

KANDEL, Eric R. *et al*. **Principles of neural science.** 5th ed. New York: Mc-Graw-Hill, 2013.

KASAI, Haruo *et al*. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 3, p. 121–129, 2010.

KATONA, István *et al*. Presynaptically Located CB1 Cannabinoid Receptors Regulate GABA Release from Axon Terminals of Specific Hippocampal Interneurons. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 4544–4558, 1999.

KAWAMURA, Yoshinobu *et al*. The CB1 Cannabinoid Receptor Is the Major Cannabinoid Receptor at Excitatory Presynaptic Sites in the Hippocampus and Cerebellum. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 11, p. 2991, 2006.

KREITZER, Anatol C. Neurotransmission: Emerging Roles of Endocannabinoids. **Current Biology**, v. 15, n. 14, p. R549–R551, 2005.

KRUK-SLOMKA, Marta *et al*. Endocannabinoid System: The Direct and Indirect Involvement in the Memory and Learning Processes-a Short Review. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 8332–8347, 2017.

KRUK-SLOMKA, Marta; BIALA, Grażyna. CB1 receptors in the formation of the different phases of memory-related processes in the inhibitory avoidance test in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 84–95, 2016.

LALUMIERE, Ryan T.; MCGAUGH, James L.; MCINTYRE, Christa K. Emotional Modulation of Learning and Memory: Pharmacological Implications. **Pharmacological reviews**, v. 69, n. 3, p. 236–255, 2017.

LEDOUX, Joseph E. Emotion Circuits in the Brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155–184, 2000.

LEE, Hey-Kyoung *et al*. NMDA Induces Long-Term Synaptic Depression and Dephosphorylation of the GluR1 Subunit of AMPA Receptors in Hippocampus. **Neuron**, v. 21, n. 5, p. 1151–1162, 1998.

LEE, Jonathan L. C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 413–20, 2009.

LEE, Jonathan L. C.; EVERITT, Barry J.; THOMAS, Kerrie L. Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 839, 2004.

LEE, Jonathan L. C.; FLAVELL, Charlotte R. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 144, 2014.

LETERRIER, Christophe *et al*. Constitutive Activation Drives Compartment-Selective Endocytosis and Axonal Targeting of Type 1 Cannabinoid Receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 12, p. 3141, 2006.

LIN, Hui-Ching; MAO, Sheng-Chun; GEAN, Po-Wu. Effects of intra-amygdala infusion of CB1 receptor agonists on the reconsolidation of fear-potentiated startle. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 13, n. 3, p. 316–321, 2006.

LIU, Yunlong *et al*. Hippocampal Activation of Rac1 Regulates the Forgetting of Object Recognition Memory. **Current Biology**, v. 26, n. 17, p. 2351–2357, 2016.

LIU, Yunlong *et al*. Social Isolation Induces Rac1-Dependent Forgetting of Social Memory. **Cell Reports**, v. 25, n. 2, p. 288- 295.e3, 2018.

LONERGAN, Michelle H. *et al*. Propranolol's effects on the consolidation and reconsolidation of long-term emotional memory in healthy participants: a meta-analysis. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 38, n. 4, p. 222–231, 2013.

LÜSCHER, Christian; MALENKA, Robert C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 6, 2012.

MAĆKOWIAK, M. *et al*. Activation of CB1 cannabinoid receptors impairs memory consolidation and hippocampal polysialylated neural cell adhesion molecule expression in contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 158, n. 4, p. 1708–1716, 2009.

MALENKA, Robert C.; BEAR, Mark F. LTP and LTD: An Embarrassment of Riches. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 5–21, 2004.

MALIN, Emily L.; MCGAUGH, James L. Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 6, p. 1959–1963, 2006.

MARCHALANT, Yannick *et al*. Cannabinoid receptor stimulation is anti-inflammatory and improves memory in old rats. **Neurobiology of aging**, v. 29, n. 12, p. 1894–1901, 2008.

MARSICANO, Giovanni *et al*. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature**, v. 418, p. 530, 2002.

MATSUDA, Lisa A. *et al*. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.

MCGAUGH, James L. Consolidating Memories. **Annual Review of Psychology**, v. 66, n. 1, p. 1–24, 2015.

MCGAUGH, James L. Memory--a Century of Consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248, 2000.

MCGAUGH, James L. Time-Dependent Processes in Memory Storage. **Science**, v. 153, n. 3742, p. 1351, 1966.

MCGAUGH, James L.; PETRINOVICH, Lewis F. Effects of Drugs on Learning and Memory. In: PFEIFFER, Carl C.; SMYTHIES, John R. (Eds.). **International Review of Neurobiology**. Academic Press, 1965. v. 8. p. 139–196.

MCGEOCH, J. A. **The psychology of human learning.** Oxford, England: Longmans, Green, 1942.

MCGEOCH, John A.; MCDONALD, William T. Meaningful Relation and Retroactive Inhibition. **The American Journal of Psychology**, v. 43, n. 4, p. 579–588, 1931.

MEDINA, Jorge H.; SCHRÖDER, Nadja; IZQUIERDO, Iván. Two different properties of short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 119–121, 1999.

MIGUES, Paola Virginia *et al*. Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 12, p. 3481–3494, 2016.

MIGUES, Paola Virginia *et al*. PKMζ maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 630, 2010.

MISNER, Dinah L.; SULLIVAN, Jane M. Mechanism of Cannabinoid Effects on Long-Term Potentiation and Depression in Hippocampal CA1 Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 16, p. 6795, 1999.

MORENA, Maria; CAMPOLONGO, Patrizia. The endocannabinoid system: An emotional buffer in the modulation of memory function. **Stress and the regulation of memory: From basic mechanisms to clinical implications**, v. 112, p. 30–43, 2014.

MORGAN, Maria A.; LEDOUX, Joseph E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 109, n. 4, p. 681–688, 1995.

MUMBY, Dave G. *et al*. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 9, n. 2, p. 49–57, 2002.

MUNRO, Sean; THOMAS, Kerrie L.; ABU-SHAAR, Muna. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

NABAVI, Sadegh *et al*. Engineering a memory with LTD and LTP. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 348–352, 2014.

NADEL, Lynn; HARDT, Oliver. Update on memory systems and processes. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 251–273, 2011.

NADER, Karim; HARDT, Oliver. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 224, 2009.

NÄGERL, U. Valentin *et al*. Bidirectional Activity-Dependent Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons. **Neuron**, v. 44, n. 5, p. 759–767, 2004.

NAVARRETE, Marta; ARAQUE, Alfonso. Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. **Neuron**, v. 57, n. 6, p. 883–893, 2008.

NAYAK, Asha *et al*. Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. **Nature**, v. 394, n. 6694, p. 680–683, 1998.

NICHOLSON, Elizabeth; KULLMANN, Dimitri M. T-type calcium channels contribute to NMDA receptor independent synaptic plasticity in hippocampal regular-spiking oriens-alveus interneurons. **The Journal of physiology**, v. 595, n. 11, p. 3449–3458, 2017.

NIJSEN, Marjoleen J. M. A. *et al*. Conditioned fear-induced tachycardia in the rat; vagal involvement. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, n. 2, p. 211–222, 1998.

NIYUHIRE, Floride *et al*. The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. **Psychopharmacology**, v. 191, n. 2, p. 223–231, 2007.

NJOO, Christian *et al*. The Cannabinoid Receptor CB1 Interacts with the WAVE1 Complex and Plays a Role in Actin Dynamics and Structural Plasticity in Neurons. **PLoS biology**, v. 13, n. 10, 2015.

NORRIS, Dennis. Short-term memory and long-term memory are still different. **Psychological Bulletin**, v. 143, n. 9, p. 992–1009, 2017.

NYÍRI, G. *et al*. CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. **Quantitative Neuroanatomy: from molecules to systems**, v. 136, n. 3, p. 811–822, 2005.

OH, Daeyoung *et al*. Regulation of Synaptic Rac1 Activity, Long-Term Potentiation Maintenance, and Learning and Memory by BCR and ABR Rac GTPase-Activating Proteins. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 42, p. 14134, 2010.

OHNO-SHOSAKU, Takako; MAEJIMA, Takashi; KANO, Masanobu. Endogenous Cannabinoids Mediate Retrograde Signals from Depolarized Postsynaptic Neurons to Presynaptic Terminals. **Neuron**, v. 29, n. 3, p. 729–738, 2001.

PAMPLONA, Fabrício Alano; TAKAHASHI, Reinaldo Naoto. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. **Neuroscience Letters**, v. 397, n. 1, p. 88–92, 2006.

PARK, Pojeong *et al*. Calcium-Permeable AMPA Receptors Mediate the Induction of the Protein Kinase A-Dependent Component of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 622–631, 2016.

PASTALKOVA, Eva *et al*. Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1141–1144, 2006.

PERGHER, Giovanni Kuckartz; STEIN, Lilian Milnitsky. Compreendendo o esquecimento: teorias clássicas e seus fundamentos experimentais. **Psicologia USP**, v. 14, p. 129–155, 2003.

PIOMELLI, Daniele. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, p. 873, 2003.

PIRI, Morteza; ZARRINDAST, Mohammad-Reza. Modulation of WIN55,212-2 state-dependent memory by alpha2-adrenergic receptors of the dorsal hippocampus. **Archives of Iranian medicine**, v. 14, n. 6, p. 389–395, 2011.

PRESTON, Alison R.; EICHENBAUM, Howard. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. **Current biology: CB**, v. 23, n. 17, p. R764–R773, 2013.

PURVES, Dale *et al*. **Neuroscience**. 4th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 2008.

QUILLFELDT, Jorge. **Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats**. In: Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research, v. 21, 2006.

QUILLFELDT, Jorge; DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas. **The Hippocampal Endocannabinoid System in Different Memory Phases:** Unveiling the CA1 Circuitry. In: Campolongo P., Fattore L. (eds) Cannabinoid Modulation of Emotion, Memory, and Motivation. Springer, New York, NY, 2015. p. 45-71.

QUIRK, Gregory J.; REPA, J. Christopher; LEDOUX, Joseph E. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: Parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v. 15, n. 5, p. 1029–1039, 1995.

RAMIREZ, Servio H. *et al*. Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 12, p. 4004–4016, 2012.

RESCORLA, Robert A. Spontaneous recovery. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 11, n. 5, p. 501–509, 2004.

RICHARDS, Blake A.; FRANKLAND, Paul W. The Persistence and Transience of Memory. **Neuron**, v. 94, n. 6, p. 1071–1084, 2017.

RIEBE, Caitlin J.; WOTJAK, Carsten T. Endocannabinoids and stress. **Stress**, v. 14, n. 4, p. 384–397, 2011.

ROOZENDAAL, Benno; MCEWEN, Bruce S.; CHATTARJI, Sumantra. Stress, memory and the amygdala. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 423, 2009.

ROOZENDAAL, Benno; MCGAUGH, James L. Memory modulation. **Behavioral neuroscience**, v. 125, n. 6, p. 797–824, 2011.

SACHSER, Ricardo Marcelo *et al*. Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage-dependent Ca2+ channels, and calcineurin. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 22771, 2016.

SACHSER, Ricardo Marcelo *et al*. Forgetting of what was once learned: Exploring the role of postsynaptic ionotropic glutamate receptors on memory formation, maintenance, and decay. **Ionotropic Glutamate Receptors**, v. 112, p. 94–103, 2017.

SACHSER, Ricardo Marcelo *et al*. The cannabinoid system in the retrosplenial cortex modulates fear memory consolidation, reconsolidation, and extinction. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 22, n. 12, p. 584–588, 2015.

SANDERSON, Christiane. **Counselling Adult Survivors of Child Sexual Abuse**. 3th ed. London: Jessica Kingsley Publishers, 2006.

SANDERSON, Thomas M. Molecular mechanisms involved in depotentiation and their relevance to schizophrenia. **Chonnam medical journal**, v. 48, n. 1, p. 1–6, 2012.

SANTANA, Fabiana *et al*. Involvement of the infralimbic cortex and CA1 hippocampal area in reconsolidation of a contextual fear memory through CB1 receptors: Effects of CP55,940. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 127, p. 42–47, 2016.

SCHWABE, Lars *et al*. Stress effects on memory: An update and integration. **Memory Formation**, v. 36, n. 7, p. 1740–1749, 2012.

SCHWARTZ, Barry; REISBERG, Daniel. **Learning and memory.** New York, NY, US: W W Norton & Co, 1991.

SHANKAR, Ganesh M. *et al*. Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid-β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2866, 2007.

SHUAI, Yichun *et al*. Distinct molecular underpinnings of Drosophila olfactory trace conditioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20201, 2011.

SHUAI, Yichun *et al*. Forgetting Is Regulated through Rac Activity in Drosophila. **Cell**, v. 140, n. 4, p. 579–589, 2010.

SNYDER, Eric M. *et al*. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-β. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 1051–1058, 2005.

SONG, Juan *et al*. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. **Developmental neurobiology**, v. 72, n. 7, p. 1032–1043, 2012.

SQUIRE, L. R. Mechanisms of memory. **Science (New York, N.Y.)**, v. 232, n. 4758, p. 1612–1619, 1986.

SQUIRE, L. R.; DEDE, Adam J. O. Conscious and unconscious memory systems. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 3, 2015.

STEVENS, Charles F. A Million Dollar Question: Does LTP = Memory? **Neuron**, v. 20, n. 1, p. 1–2, 1998.

SUZUKI, Akinobu *et al*. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 426–433, 2008.

SUZUKI, Akinobu *et al*. Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 20, p. 4787, 2004.

SZIRMAI, Imre; BUZSÁKI, György; KAMONDI, Anita. 120 years of hippocampal Schaffer collaterals. **Hippocampus**, v. 22, n. 7, p. 1508–1516, 2012.

TAKAHASHI, Reinaldo Naoto; PAMPLONA, Fabrício Alano; FERNANDES, Marcelo Soares. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. **Neuroscience Letters**, v. 380, n. 3, p. 270–275, 2005.

TAKAHASHI, Susumu. The Hippocampal Ensemble Code for Spatial Navigation and Episodic Memory. In: **Advances in Neurobiology**. 2018. p. 49–70.

TERRANOVA, Jean-Paul *et al*. Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 352, n. 5, p. 576–579, 1995.

TRONSON, Natalie C.; TAYLOR, Jane R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 262, 2007.

TULVING, Endel; PSOTKA, Joseph. Retroactive inhibition in free recall: Inaccessibility of information available in the memory store. **Journal of Experimental Psychology**, v. 87, n. 1, p. 1–8, 1971.

VARVEL, Stephen; LICHTMAN, Aron. Role of the endocannabinoid system in learning and memory. In: Mechoulam R. (eds) Cannabinoids as Therapeutics. Milestones in Drug Therapy MDT. Birkhäuser Basel. 2005. p. 111–140.

VAUGHAN, C. W.; CHRISTIE, M. J. Retrograde Signalling by Endocannabinoids. In: PERTWEE, Roger G. (Ed.). **Cannabinoids**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 367–383.

VERVLIET, Bram; CRASKE, Michelle G.; HERMANS, Dirk. Fear Extinction and Relapse: State of the Art. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 9, n. 1, p. 215–248, 2013.

VIANNA, M. R. *et al*. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 72, n. 3, p. 353–364, 2000.

VILLARREAL, Desiree M. *et al*. NMDA receptor antagonists sustain LTP and spatial memory: active processes mediate LTP decay. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 48–52, 2002.

VOGEL-CIERNIA, Annie; WOOD, Marcelo A. Examining object location and object recognition memory in mice. **Current protocols in neuroscience**, v. 69, p. 8.31.1-8.31.17, 2014.

WAHLSTROM, Krista L. *et al*. Basolateral Amygdala Inputs to the Medial Entorhinal Cortex Selectively Modulate the Consolidation of Spatial and Contextual Learning. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 38, n. 11, p. 2698–2712, 2018.

WANG, Jun; UEDA, Natsuo. Biology of endocannabinoid synthesis system. **New Intercellular Lipid Mediators and Their Receptors**, v. 89, n. 3, p. 112–119, 2009.

WANG, Xiao-bin; YANG, Yunlei; ZHOU, Qiang. Independent Expression of Synaptic and Morphological Plasticity Associated with Long-Term Depression. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 45, p. 12419, 2007.

WEON, Haein; KIM, Tae Wan; YOUN, Dong-ho. Postsynaptic N-type or P/Q-type calcium channels mediate long-term potentiation by group I metabotropic glutamate receptors in the trigeminal oralis. **Life Sciences**, v. 188, p. 110–117, 2017.

WESTBROOK, R. Frederick *et al*. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus: Two roles for context. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 28, n. 1, p. 97–110, 2002.

WHITLOCK, Jonathan R. *et al*. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1093, 2006.

WILSON, Rachel I.; NICOLL, Roger A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 588–592, 2001.

WIXTED, John T. The Psychology and Neuroscience of Forgetting. **Annual Review of Psychology**, v. 55, n. 1, p. 235–269, 2004.

WOLF, O. T. *et al*. Stress and Memory: A Selective Review on Recent Developments in the Understanding of Stress Hormone Effects on Memory and Their Clinical Relevance. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 8, 2016.

WOLFF, Mary C.; LEANDER, J. David. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. **European Journal of Pharmacology**, v. 477, n. 3, p. 213–217, 2003.

YAO, Yudong *et al*. PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 31, p. 7820–7827, 2008.

YIM, T. T. *et al*. Post-training CB1 cannabinoid receptor agonist activation disrupts long-term consolidation of spatial memories in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p. 929–936, 2008.

YOUNG, Brian J.; LEATON, Robert N. Fear potentiation of acoustic startle stimulus-evoked heart rate changes in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, n. 6, p. 1065–1079, 1994.

ZARRINDAST, Mohammad Reza; NAVAEIAN, Majid; NASEHI, Mohammad. Influence of three-day morphine-treatment upon impairment of memory consolidation induced by cannabinoid infused into the dorsal hippocampus in rats. **Neuroscience Research**, v. 69, n. 1, p. 51–59, 2011.

ZHANG, Xuchen *et al*. Active Protection: Learning-Activated Raf/MAPK Activity Protects Labile Memory from Rac1-Independent Forgetting. **Neuron**, v. 98, n. 1, p. 142- 155.e4, 2018.

ZHOU, Qiang; HOMMA, Koichi J.; POO, Mu-ming. Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. **Neuron**, v. 44, n. 5, p. 749–757, 2004.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY*

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.
If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software
Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.
To avoid unnecessary errors, you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections
Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction
State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods
Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental
Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation
A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results
Results should be clear and concise.

Discussion
This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions
The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices
If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly, for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information
• ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
• ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
• ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights
Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Abstract
A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand-alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.
Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords
Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations
Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements
Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources
List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:
Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].
It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.
If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:
This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units
Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes
Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points
• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
• Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
• Number the illustrations according to their sequence in the text.
• Use a logical naming convention for your artwork files.
• Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
• For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
• Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.
A detailed guide on electronic artwork is available.
You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats
Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.
Please do not:
• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
• Supply files that are too low in resolution.
• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork
Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions
Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables
Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text
Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list, they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references
As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references
This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue
Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software
Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins

from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:
http://open.mendeley.com/use-citation-style/neurobiology-of-learning-and-memory
When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting
There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself, they should be arranged according to the following examples:

Reference style
Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.
List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:
Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications, 163*, 51–59. https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372.

Reference to a journal publication with an article number:
Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, *19*, e00205. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205.

Reference to a book:
Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style.* (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:
Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:
Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/ Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:
[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1.

Reference to a conference paper or poster presentation:
Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Journal abbreviations source
Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video
Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions, please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization
Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files, as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database-linking page.

For supported data repositories, a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.