

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

Bruna dos Santos

**PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS ENDOCANABINOIDE E ENDOVANILOIDE NO  
PROCESSO DE ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA E FLEXIBILIZAÇÃO  
COMPORTAMENTAL**

Porto Alegre

2019

Bruna dos Santos

**PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS ENDOCANABINOIDE E ENDOVANILOIDE NO  
PROCESSO DE ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA E FLEXIBILIZAÇÃO  
COMPORTAMENTAL**

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.

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares  
Coorientadora: Dra. Paula Santana Lunardi

Porto Alegre

2019

#### CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Bruna  
PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS ENDOCANABINOIDE E  
ENDOVANILOIDE NO PROCESSO DE ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA E  
FLEXIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL / Bruna dos Santos. --  
2019.

60 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. Reconsolidação. 3. Sistema  
endocanabinoide. 4. Sistema endovaniloide. 5.  
Hipocampo. I. de Oliveira Alvares, Lucas, orient. II.  
Santana Lunardi, Paula, coorient. III. Título.

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

Bruna dos Santos

**PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS ENDOCANABINOIDE E ENDOVANILOIDE NO  
PROCESSO DE ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA E FLEXIBILIZAÇÃO  
COMPORTAMENTAL**

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**

---

Denise Maria Zancan - UFRGS

---

Natividade de Sá Couto Pereira - UFRGS

---

Lucas de Oliveira Alvares - UFRGS (orientador)

---

Paula Santana Lunardi - UFRGS (coorientadora)

## RESUMO

A reconsolidação é um processo essencial para a sobrevivência das espécies, permitindo que os traços de memória sejam mais atualizados e possibilitando a adaptação dos animais ao ambiente e às novas experiências, sendo utilizado até mesmo como técnica em terapias psicológicas. Este trabalho trata sobre a participação do sistema endocanabinoide e do sistema endovaniloide na reconsolidação de memórias aversivas e espaciais e na flexibilização comportamental. A ativação de receptores canabinoides CB1 tem um papel essencial em promover a desestabilização do traço mnemônico, por este motivo, hipotetizamos que, quando uma memória é reativada, há um aumento na liberação de endocanabinoides (eCBs), o que possibilita a reconsolidação. Além disso, os eCBs podem interagir com outros sistemas neuronais, como o sistema vaniloide (receptores TRPV1, por exemplo). Primeiramente, utilizamos o protocolo de choque imediato, que permite incorporar novas informações e atualizar uma memória neutra a uma memória contextual aversiva. Encontramos que a infusão de AM251, um antagonista CB1, ou Capsazepina, um antagonista TRPV1, no hipocampo 20 minutos antes do treino, prejudicou a atualização da memória. Depois, avaliamos a flexibilização comportamental através do aprendizado reverso no labirinto aquático de Morris. Demonstramos que os receptores CB1, mas não os TRPV1, são necessários para a modificação da memória espacial. Juntos, nossos resultados demonstram que a atividade dos receptores CB1 é crucial para a modificação das memórias, independentemente do tipo de memória, e que algumas memórias podem ter mecanismos específicos.

Palavras-chave: Reconsolidação. Hipocampo. Sistema endocanabinoide. Sistema endovaniloide. Atualização da memória. Flexibilização comportamental. CB1. TRPV1.

## ABSTRACT

Reconsolidation is an essential process for species survival, allowing memory traces to be updated and animals to adapt to environment and new experiences. Reconsolidation is used as a technique in psychological therapies. This work is about the endocannabinoid and endovanilloid participation on reconsolidation of aversive and spatial memory and behavioral flexibilization. The activation of the cannabinoid receptors CB1 has a crucial role in promoting memory destabilization, therefore, we hypothesized that, when memory is reactivated, there is an increase in the release of endocannabinoids (eCBs), which allow this memory to be updated. Moreover, eCBs could interact with other neuronal system, such as vanilloid system (TRPV1 receptors, for example). First, we used immediate shock paradigm that allows incorporating new information - from a neutral contextual representation to a contextual fear memory. We found that infusion of either CB1 antagonist AM251 or capsazepine (TRPV1 antagonist) in the hippocampus, 20 min before training, prevented memory updating. Next, we also accessed memory flexibility by evaluating the reversal learning in Morris water-maze task. We demonstrated that CB1 receptors, but not TRPV1 receptors, are necessary for spatial memory modification. Together, our results demonstrated that CB1 activity is crucial for memory modification and it is independent of memory type. Therefore, these results suggested specific mechanisms for different types of memory.

Keywords: Reconsolidation. Hippocampus. Endocannabinoid system. Endovanilloid system. Memory updating. Behavioral flexibility. CB1. TRPV1.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Lucas de Oliveira Alvares e à minha coorientadora Paula Santana Lunardi pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional e também pela confiança investida na realização deste projeto.

À minha amiga Laura Willers de Souza, que esteve comigo desde o primeiro dia da Biomedicina, pela parceria na realização do projeto, mesmo quando tudo parecia dar errado.

À minha terapeuta Marcelly Filipetto por me ajudar a manter a saúde mental durante toda a graduação.

Aos meus pais que, mesmo de longe, apoiaram e incentivaram todas as minhas decisões e me forneceram a base para atingir meus objetivos pessoais e profissionais.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO COMPREENSIVA</b>	<b>8</b>
1.1	APRENDIZADO E MEMÓRIA	8
1.2	TIPOS DE MEMÓRIA E REGIÕES ENVOLVIDAS	9
1.3	RECONSOLIDAÇÃO E ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA	10
1.4	SISTEMA ENDOCANABINOIDE	12
1.5	SISTEMA ENDOVANILOIDE	14
1.6	RELAÇÃO ENTRE SISTEMA ENDOCANABINOIDE E ENDOVANILOIDE	15
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>4</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>40</b>
	<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY</b>	<b>50</b>



## 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

A seguir, será realizada uma revisão sistemática de assuntos relevantes para o entendimento deste trabalho de conclusão de curso.

### 1.1 APRENDIZADO E MEMÓRIA

Memória é o registro de informações adquiridas através de experiências. A capacidade de aprender e reter informações é uma habilidade essencial aos animais, pois permite a adaptação a diferentes ambientes e situações para que a interação seja mais eficiente e segura com estes, promovendo a sobrevivência das espécies (PAUSE et al., 2013). Também é importante para o desenvolvimento de personalidade e interações sociais, impactando, além disso, na execução de comportamentos direcionados, na resolução de problemas e em distúrbios cognitivos, aditivos, de humor, ansiedade e também de desenvolvimento (ALBERINI; LEDOUX, 2013).

Pode-se dividir a memória em um conjunto de processos ou fases, cada uma dependendo de mecanismos distintos que suportam diferentes demandas cognitivas. Sendo assim, o conceito “memória” compreende os processos de (1) aquisição, correspondente ao momento do aprendizado da experiência; (2) consolidação, período em que o traço da memória está se tornando cada vez mais estável, porém ainda suscetível a modificações; (3) evocação, quando esta memória é reativada ou “lembrada”. Durante a fase de evocação, a memória pode ser somente evocada (sem sofrer qualquer modificação) ou pode tornar-se novamente lábil, ou seja, suscetível a modificações e, assim, diferentes processos podem ocorrer: pode ser reconsolidada (fortificada, enfraquecida ou modificada) ou extinta (DUDAI, 2004; NADER; HARDT, 2009; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000).

O papel da reconsolidação é atualizar o traço original da memória, seja adicionando novas informações a essa memória previamente consolidada ou simplesmente fortalecendo-a ou enfraquecendo-a conforme a necessidade (DE OLIVEIRA ALVARES, 2013; LEE, 2009, 2010; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000). Já o papel da extinção é formar uma nova memória com significado distinto que inibirá a memória original, sendo inclusive mais fraca que esta, ou seja, a memória original pode voltar com o tempo (RESCORLA, 2001; SUZUKI, 2004).

Então, o que determina, durante o momento da evocação, se uma memória será reconsolidada ou extinta, já que são processos tão distintos? Ambos iniciam quando há uma

divergência ou uma “novidade” entre a memória original e a situação atual – no caso de uma memória aversiva, isto ocorre quando o animal é reexposto a um estímulo condicionado (EC, um contexto e/ou um som) na ausência do estímulo incondicionado (EI, um choque), por exemplo (FERNÁNDEZ; BOCCIA; PEDREIRA, 2016; PEDREIRA, PÉREZ-CUESTA, MALDONADO, 2004).

Um dos fatores importantes para a diferenciação entre estas duas fases da memória é o tempo de exposição ao EC (ou a quantidade de apresentações do EC) na ausência do EI – sendo que tempos curtos (poucos minutos) favorecem a reconsolidação e tempos maiores (30 minutos, por exemplo) favorecem a extinção (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; MERLO et al., 2014; PEDREIRA; MALDONADO, 2003; SUZUKI, 2004).

Assim como a consolidação, ambas as fases necessitam de síntese proteica para posterior estabilização e também a ativação de receptores NMDA. Entretanto, certos mecanismos moleculares envolvidos em cada uma delas são distintos, como ativação hipocampal de NF $\kappa$ B para reconsolidação e NFAT (fator nuclear induzido de células T ativadas) para extinção (DE LA FUENTE; FREUDENTHAL; ROMANO, 2011; MONFILS et al., 2009; SUZUKI, 2004).

Há também diferenças anatômicas, visto que a extinção de uma memória envolve mais o córtex pré-frontal medial, especialmente o infra-límbico, e a amígdala (principalmente a região basolateral), enquanto a reconsolidação envolve áreas como o hipocampo, a amígdala e a região pré-límbica do córtex pré-frontal medial, no caso de uma memória aversiva, por exemplo (BALDI; BUCHERELLI, 2015; DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; MAMIYA et al., 2009; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000; QUIRK et al., 2000).

## 1.2 TIPOS DE MEMÓRIA E REGIÕES ENVOLVIDAS

As memórias de medo são os tipos mais estudados, visto que são facilmente aprendidas e retidas, muitas vezes pela vida toda. Portanto, os modelos experimentais usados para o estudo de memórias aversivas permitem compreender processos envolvendo memória e aprendizado. Para estudar esse tipo de memória, um importante procedimento utilizado é o descoberto por Pavlov em 1932, que consiste em parear um estímulo inicialmente neutro (como um contexto, um som ou odor), chamado de condicionado, com um aversivo (como um choque ou um gosto ruim), chamado de incondicionado (BALDI; BUCHERELLI, 2015).

Assim, na próxima re-exposição ao EC, o animal irá expressar medo que pode ser medido, no caso dos ratos, através do comportamento de *freezing* ou congelamento, que consiste em total imobilidade, exceto pelos movimentos da respiração. Foi visto que o bloqueio da região basolateral da amígdala (BLA) através de bloqueadores de canais de sódio dependentes de voltagem imediatamente após a reativação prejudica a resposta de medo no condicionamento de medo ao contexto (BALDI; MARIOTTINI; BUCHERELLI, 2008), ao som (SACCHETTI; SACCO; STRATA, 2007) e na esquivas inibitória (PRADO-ALCALÀ et al., 2006). O mesmo ocorre para o hipocampo, importante para a memória contextual, exceto no caso do condicionamento ao tom (AMARAL et al., 2007; PRADO-ALCALÀ et al., 2006).

Outro tipo de memória bastante estudado é a memória espacial, especialmente o paradigma de Labirinto Aquático de Morris devido à sua relativa simplicidade. Neste protocolo, o animal precisa se localizar através das pistas presentes dentro ou fora de uma piscina a fim de encontrar uma plataforma submersa e ficar fora da água. Mede-se o aprendizado do animal nesta tarefa através da latência para encontrar a plataforma. A importância do hipocampo na memória espacial já é muito bem estabelecida, desde roedores até humanos, visto que possui células específicas que se localizam no espaço e no tempo, criando uma memória contextual complexa (BURGESS; MAGUIRE; O'KEEFE, 2002; D'HOOGHE; DE DEYN, 2001).

### 1.3 RECONSOLIDAÇÃO E ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA

Diferente do que se acreditava (MCGAUGH, 2000), os traços mnemônicos são extremamente dinâmicos, visto que mesmo a evocação – ou simplesmente a “lembrança” – pode levar a processos complexos como a reconsolidação. É essencial que as memórias possam ser reconsolidadas e modificadas quando evocadas, pois isto permite que estas se mantenham relevantes para guiar comportamentos futuros (LEE, 2009), cumprindo sua função de auxiliar os animais a se adequar ao mundo à sua volta e às novas experiências (o que chamamos, neste trabalho, de flexibilização comportamental). A reconsolidação da memória tem sido demonstrada em diferentes paradigmas experimentais, tratamentos e espécies (ANOKHIN; TIUNOVA; ROSE, 2002; NADER; EINARSSON, 2010; WALKER et al., 2003).

A reconsolidação também é especialmente importante por permitir a modificação de memórias mal adaptativas, tais como traumas e fobias (BECKERS; KINDT, 2017). Seus princípios vem sendo recentemente utilizados em terapias psicológicas, especialmente em casos de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), em conjunto com outras estratégias

terapêuticas (ELSEY; VAN AST; KINDT, 2018). Isso é possível pois, no momento da desestabilização que precede a reconsolidação, a memória torna-se novamente sensível a, por exemplo, agentes amnésicos e/ou interferências externas. Por este motivo, a reconsolidação é considerada mais eficaz do que a extinção, pois ela modifica a memória original e a extinção cria uma nova memória que decai com o tempo (BESNARD; CABOCHE; LAROCHE, 2012; BRUNET et al., 2008; GAMACHE; PITMAN; NADER, 2012; HAUBRICH et al., 2015; LEE, 2009).

Visto que nem sempre as memórias são reconsolidadas após sua evocação (WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009), foram propostas algumas condições limitantes intrínsecas para que este processo ocorra, denominadas, em inglês, de “boundary conditions” (BESNARD; CABOCHE; LAROCHE, 2012; NADER; HARDT, 2009). Como dito anteriormente, a diferença no tempo de reativação e a necessidade de uma novidade são fatores que favorecem a reconsolidação; entretanto, a força e a idade de uma memória podem ser fatores limitantes. Quanto mais remoto ou forte o traço da memória (treinos com maior número de choques ou maior intensidade, por exemplo), mais difícil será para que estas sofram reconsolidação, e, por isso, necessitam de um maior tempo de reexposição para serem desestabilizadas. Este pode ser um mecanismo de proteção cerebral contra a modificação de memórias consideradas muito relevantes, como memórias muito fortes ou de eventos longínquos (BESNARD; CABOCHE; LAROCHE, 2012; SUZUKI, 2004).

Após superadas estas condições, para que uma memória seja modificada, um conjunto de processos celulares e moleculares são ativados. O primeiro passo para a reconsolidação é a transformação do traço mnemônico de um estado estável a um estado instável ou lábil, sujeito a modificações, o que é conhecido como desestabilização (NADER; SCHAPE; LE DOUX, 2000; SARA, 2000; SUZUKI et al., 2004, 2008). Neste momento, a memória fica suscetível a drogas, como agentes amnésicos (MAMIYA et al., 2009; MAMOU; GAMACHE; NADER, 2006; NADER; SCHAPE; LE DOUX, 2000), por exemplo, inibidores de síntese proteica, e também choques eletroconvulsivos (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968) e outras interferências, como outros aprendizados.

Os mecanismos envolvidos com a desestabilização da memória incluem a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDAR-GluN2B (MAMOU; GAMACHE; NADER, 2006; WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009), ativação de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem tipo-L (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2013; SUZUKI et al., 2008), endocitose dos receptores AMPA sinápticos (RAO-RUIZ et al., 2011), ativação da calcineurina (FUKUSHIMA et al., 2014), e com destaque para o sistema endocanabinoide

através da ativação dos receptores canabinóides tipo-1 (CB1) (LEE; FLAVELL, 2014; SUZUKI et al., 2008).

É importante destacar que, embora o termo “reconsolidação” possa ser confundido com uma “segunda consolidação”, ela envolve alguns mecanismos diferentes da consolidação, como a expressão do gene imediato *zif268* (LEE; EVERITT; THOMAS, 2004) e a ativação noradrenérgica no condicionamento ao tom (DEBIEC; LEDOUX, 2004), entre outros.

#### 1.4 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O sistema endocanabinoide (SE) é dividido, segundo a literatura, em: 1) receptores metabotrópicos (entre eles, CB1 e CB2), 2) ligantes canabinoides endógenos, como a anandamida (AEA) e o 2-aracdonil-glicerol (2-AG) e 3) enzimas de síntese (NAPE-PLD para AEA e DAGL para 2-AG) e degradação (FAAH para AEA e MAGL para 2-AG) de endocanabinoides (DI MARZO, 2006; LU; MACKIE, 2016; PIOMELLI, 2003).

Os receptores CB1 e CB2 são acoplados à proteína G inibitória, ou seja, a ativação deles inibe a adenilil ciclase e alguns canais de cálcio dependentes de voltagem e também ativa diversas MAP kinases, exercendo diversos papéis na fisiologia celular, como na função sináptica, motilidade celular, transcrição gênica, entre outros (HOWLETT et al., 2002; LU; MACKIE, 2016). Os CB2 são mais conhecidos por terem função na imunidade devido à sua localização mais periférica e, dentro do sistema nervoso central, mais específica à micróglia e tecidos vasculares, sendo ativados principalmente em condições de inflamação (RAMIREZ et al., 2012), por este motivo, no ramo da memória os receptores CB1 são os mais estudados.

O SE é atípico em relação a outros sistemas de neurotransmissão, visto que seus ligantes funcionam como mensageiros retrógrados inibitórios, ou seja, após a despolarização sináptica, os endocanabinoides (ECs) são produzidos e liberados do terminal pós-sináptico de forma a interagirem com a porção pré-sináptica, onde encontram-se os receptores CB1, por exemplo, e desta forma regulam diversas formas de plasticidade sináptica, como a inibição da liberação de neurotransmissores (DI MARZO; BIFULCO; DE PETROCELLIS, 2004; KREITZER; REGEHR, 2001; WILSON & NICOLL, 2001).

Existem três formas de plasticidade sináptica conhecidas até o momento a respeito da sinalização retrógrada dos endocanabinoides: 1) supressão da inibição/excitação induzida por despolarização (nas siglas em inglês, respectivamente, DSI e DSE), 2) supressão da inibição/excitação induzida sinápticamente, também chamada de depressão de curta duração

induzida por ECs (nas siglas em inglês, respectivamente, SSI e SSE) e 3) depressão de longa duração (LTD) mediada por ECs (LU; MACKIE, 2016).

A DSI/DSE ocorre em diversos neurônios, sendo uma supressão transitória de um *input* excitatório ou inibitório após uma forte despolarização (OHNO-SHOSAKU et al., 2002). A depressão de curta duração ocorre após a ativação de algum receptor metabotrópico, como mGluR1, que ativa a fosfolipase C, levando à formação de 2-AG que agirá em CB1, inibindo a transmissão sináptica (HASHIMOTODANI et al., 2005). Já a LTD gerada pelos ECs pode ser homo (na mesma sinapse sendo estimulada) ou heterosináptica (em sinapses adjacentes à estimulada) – a homosináptica é normalmente evocada por uma estimulação de baixa frequência persistente, não suficiente para gerar despolarização, enquanto a heterosináptica ocorre quando determinado traço é ativado, fazendo com que os neurônios ao redor diminuam a sua ativação para reduzir o “ruído” (CHÁVEZ; CHIU; CASTILLO, 2010; CHEVALEYRE; CASTILLO, 2003; KELLOGG; MACKIE; STRAIKER, 2009).

Outra peculiaridade dos ECs é que, diferente de outros neurotransmissores que, em geral, são produzidos e mantidos em vesículas sinápticas, os endocanabinoides são produzidos sob demanda. Isto ocorre após um aumento de cálcio intracelular pela despolarização sináptica ou pela mobilização dos estoques internos. Essa síntese é realizada a partir da hidrólise de um precursor fosfolipídico da membrana plasmática – sendo diferentes precursores para AEA e 2-AG –, e, assim, os endocanabinoides são imediatamente liberados (CASTILLO et al., 2012; DI MARZO, 2006; DI MARZO et al., 1994).

Os receptores CB1 são amplamente expressos em regiões como o hipocampo, cerebelo, córtex, núcleos basais, amígdala e estriado (HERKENHAM et al., 1990). A atividade, quantidade de receptores e o padrão de distribuição de CB1 são muito específicos dependendo do tipo celular, do tipo de sinapse e até mesmo do microdomínio, tendo, portanto, uma ação finamente regulada (GORZKIEWICZ; SZEMRAJ, 2018). Como dito anteriormente, a localização é preferencialmente pré-sináptica, sendo encontrados em sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas (KATONA et al., 1999; KAWAMURA et al., 2006), mas cerca de 20 vezes mais expressos em interneurônios GABAérgicos do hipocampo (DAVIES; PERTWEE; RIEDEL, 2002; KREITZER, 2005; ZHU, 2006).

CB1 são os receptores metabotrópicos mais abundantes do SNC e estão intimamente relacionados com processos cognitivos e emocionais, já que estão localizados em estruturas como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (DAVIES; PERTWEE; RIEDEL, 2002; HERKENHAM et al., 1990). Diversos estudos estabelecem as relações entre o SE e algumas fases da memória – por exemplo, durante a consolidação, evocação e extinção da memória, há

uma grande liberação de ECs, os quais se ligam aos receptores CB1 e, assim, funcionam como moduladores sinápticos (ATSAK et al., 2015; BUSQUETS-GARCIA et al., 2016; KRUK-SLOMKA; BIALA, 2016; MORENA; CAMPOLONGO, 2014; WILSON; NICOLL, 2002).

Como dito anteriormente, um dos mecanismos de desestabilização de um traço mnemônico é através da ativação de receptores CB1, pois estudos demonstram que o bloqueio destes receptores no hipocampo impede a desestabilização de uma memória aversiva, tornando-a, portanto, insensível a modificações (SUZUKI et al., 2008). Também já foi demonstrado que o uso de um agonista CB1 imediatamente após a reativação de uma memória aversiva gera uma desestabilização do traço mnemônico muito maior, resultando em efeitos amnésicos (LEE; FLAVELL, 2014).

## 1.5 SISTEMA ENDOVANILOIDE

O sistema endovaniloide é composto por uma enorme família de canais iônicos não-seletivos permeáveis a cálcio (chamados TRP, do inglês “transient receptor potential cation channel”) presentes em neurônios sensoriais periféricos (CATERINA et al., 1997). Existem cerca de 28 TRPs em mamíferos, sendo a subfamília dos “vaniloides” (TRPVs) a mais estudada, especialmente os receptores TRPV1, devido ao potencial anti-inflamatório e antinociceptivo (CATERINA; JULIUS, 2001; MARTINS; TAVARES; MORGADO, 2014).

A ativação deste sistema está relacionada com a sensação de dor a estímulos nocivos, como altas temperaturas, baixo pH e alguns ligantes lipídicos, podendo ser também ativado por compostos como a capsaicina, presente na pimenta (responsável pela sensação de calor presente em comidas apimentadas) e utilizada como agonista em estudos (CATERINA et al., 1997; CATERINA; JULIUS, 2001; JANCSÓ; JANCSÓ-GÁBOR; SZOLCSÁNYI, 1967; SZALLASI; BLUMBERG, 1999).

Mais recentemente, estes receptores foram também encontrados no SNC de camundongos, ratos e também em humanos, como em neurônios dopaminérgicos da substância nigra e em neurônios piramidais do hipocampo, além da amígdala, hipotálamo, habenula e córtex, onde aparentemente regulam a função sináptica (CRISTINO et al., 2006, 2008; PUENTE et al., 2011; ROBERTS; DAVIS; BENHAM, 2004; TÓTH et al., 2005).

Muitos estudos atualmente têm demonstrado a importância desse sistema no SNC, em funções fisiologicamente relevantes. Já foi visto, por exemplo, que o bloqueio de TRPV1 promove um efeito ansiolítico (MICALE et al., 2009; SANTOS; STERN; BERTOGLIO,

2008). Além disso, esse sistema participa no aprendizado e plasticidade de memórias aversivas (MARSCH et al., 2007), no desenvolvimento visual no colículo superior, sugerindo atuação na poda sináptica (MAIONE et al., 2009), e também em situações estressantes, promovendo memória espacial melhorada (EDWARDS, 2014; LI et al., 2008).

Especificamente no hipocampo, os receptores TRPV1 estão localizados nos neurônios piramidais de CA1 e CA3 (nas sinapses excitatórias com os interneurônios) e em maior número nos interneurônios inibitórios, principalmente na região dos espinhos dendríticos e no soma (CRISTINO et al., 2006; GIBSON et al., 2008; TÓTH et al., 2005). Quando a localização é pré-sináptica, normalmente a ativação de TRPV1 aumenta a liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (JENNINGS et al., 2003; MARINELLI et al., 2003), com algumas exceções (GIBSON et al., 2008; MAIONE et al., 2009). Já TRPV1 pós-sináptico normalmente ativa vias de sinalização sensíveis ao cálcio, mediando a plasticidade sináptica (CHÁVEZ; CHIU; CASTILLO, 2010).

Alguns estudos eletrofisiológicos sugerem a atuação dos receptores vanilóides na potenciação de longa duração (LTP) (MARSCH et al., 2007) através da inibição indireta da liberação de GABA até as células piramidais de CA1 – que é dependente da ativação de mGluR1 e calcineurina (GIBSON et al., 2008). Outros demonstram a atuação na depressão de longa duração (LTD) via endocitose de AMPA após ativação com capsaicina, o que foi também confirmado em um modelo de *knockout* para TRPV1. Dependendo da região hipocampal, a LTD através do sistema endovaniloide pode ser diferente, visto que em CA1 a ativação pré-sináptica requer mGluR1 e 12-HPETE (um endovaniloide derivado do ácido araquidônico) pós-sinápticos, enquanto no giro denteado requer mGluR5 e anandamida (BENNION et al., 2011; CHÁVEZ; CHIU; CASTILLO, 2010).

## 1.6 RELAÇÃO ENTRE SISTEMA ENDOCANABINOIDE E ENDOVANILOIDE

A similaridade química entre a anandamida (AEA), um endocanabinoide, e o olvanil, um potente ligante endovaniloide, trouxe à tona a possibilidade de interação entre estes dois sistemas. A primeira evidência da relação entre AEA e capsaicina foi vista quando agonistas TRPV1 inibiram a recaptção de anandamida (DE PETROCELLIS et al., 2000). Desde então, novos estudos mostraram que a ação da anandamida em outros canais TRP pode gerar diferentes respostas, e que, depois da ativação de CB1, a ativação de receptores vanilóides é uma das principais funções biológicas da anandamida (DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2012). Além



disso, a anandamida parece ser agonista parcial de CB1, mas agonista total de TRPV1 (SMART et al., 2000; ZYGMUNT et al., 1999).

Com estes estudos, também foi visto que a sinalização do SE também poderia ser não-retrógrada, porque, nestes casos, a anandamida age como um mensageiro intracelular (VAN DER STELT; DI MARZO, 2005). Mas o que acontece quando a anandamida ativa TRPV1? Ela hiperpolariza neurônios através de: 1) redução da síntese de 2-AG através da inibição da enzima DAGL, contrabalanceando com a inibição retrógrada de GABA no estriado (MACCARRONE et al., 2008; MUSELLA et al., 2010); ou 2) estimulando a endocitose pós-sináptica de AMPA, prejudicando a sinalização glutamatérgica e induzindo LTD (DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2012; GRUETER; BRASNJO; MALENKA, 2010).

A afinidade da anandamida por TRPV1 é parecida ou levemente menor do que a da capsaicina (DE PETROCELLIS et al., 2001; TÓTH et al., 2003), entretanto, sua eficácia, em geral, parece ser menor, visto que precisa estar em concentrações cerca de 10 vezes maiores do que as necessárias para a ativação de CB1, embora esta característica dependa também do tecido, do sistema e da espécie em questão (ROSS, 2003).

Atualmente, já se tem evidências que o 2-AG também pode ativar TRPV1, embora a concentrações bem maiores (PETROSINO et al., 2016; ZYGMUNT et al., 2013). Devido a isso, hoje em dia pode-se denominar os receptores TRPV1 como “receptores canabinoides ionotrópicos”, enquanto os CB1 e CB2 são metabotrópicos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se da influência do sistema endocanabinoide em diversas fases da memória, como consolidação, reativação, extinção e na desestabilização do traço, entretanto, o papel deste sistema na atualização de uma memória mediada pela reconsolidação ainda é pouco conhecido. Embora muitos estudos demonstrem uma interação entre endocanabinoides e receptores endovaniloides, a relação entre estes dois sistemas na reconsolidação e o possível efeito na flexibilização comportamental ainda não foram investigados. Desta forma, hipotetizamos que os dois sistemas atuam em conjunto para a desestabilização necessária à reconsolidação do traço mnemônico e, desta forma, permitem a atualização do traço com novas informações, consequentemente levando a uma mudança comportamental. A relevância deste trabalho é, portanto, melhorar a compreensão da atuação e interação entre dois sistemas complexos de neuromodulação e demonstrar quais os potenciais efeitos comportamentais. Além disso, este trabalho gerará conhecimento que poderá ter relevância clínica futuramente, visto que a reconsolidação da memória e fármacos canabinoides já são ferramentas pesquisadas e algumas até utilizadas no tratamento de transtornos de ansiedade, traumas e fobias.

### 3 OBJETIVOS

Abaixo, seguem os objetivos geral e específicos a respeito deste trabalho.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do sistema endocanabinoide e do sistema endovaniloide na reconsolidação de uma memória espacial e de uma memória aversiva.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a participação de receptores CB1 e TRPV1 na reconsolidação de uma memória aversiva no protocolo de choque imediato durante condicionamento aversivo ao contexto (CAC) através de tratamento intra-hipocampal com antagonista CB1 (AM251) na concentração de 11 ng/ $\mu$ L e antagonista TRPV1 (Capsazepina) na concentração de 20  $\mu$ M.
2. Investigar a participação de receptores CB1 e TRPV1 na reconsolidação de uma memória espacial no protocolo de aprendizado reverso no Labirinto Aquático de Morris através de tratamento intra-hipocampal com antagonista CB1 (AM251) na concentração de 11 ng/ $\mu$ L e antagonista TRPV1 (Capsazepina) na concentração de 20  $\mu$ M.

#### **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.

**O papel dos sistemas endocanabinóide e endovaniloide na atualização da memória e flexibilização comportamental**

Bruna dos Santos<sup>1</sup>, Laura Willers de Souza<sup>1</sup>, Paula Santana Lunardi<sup>1</sup>, Bruno Popik<sup>1</sup>, Lucas de Oliveira Alvares<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\*Autor correspondente:

Lucas de Oliveira Alvares

Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, sala 210, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Brasil.

E-mail: [lucas.alvares@ufrgs.br](mailto:lucas.alvares@ufrgs.br)

## **Resumo**

Memórias são extremamente dinâmicas e, mesmo após a consolidação, podem ser modificadas quando reativadas. Assim, a reativação pode levar a memória a um estado lábil, seguido de um novo processo de estabilização denominado reconsolidação. Através da reconsolidação, é possível fortificar, enfraquecer ou até mesmo atualizar o conteúdo da memória com novas informações. A ativação de receptores canabinoides CB1 tem um papel essencial em promover a desestabilização do traço mnemônico; por este motivo, hipotetizamos que, quando uma memória é reativada, há um aumento na liberação de endocanabinoides (eCBs), o que possibilita a atualização. Além disso, os eCBs podem interagir com outros sistemas neuronais, como o sistema vaniloide (receptores TRPV1, por exemplo). Neste trabalho, o objetivo foi avaliar se os receptores CB1 e TRPV1 participam nos processos de atualização da memória e flexibilização comportamental utilizando os protocolos de choque imediato e aprendizado reverso, respectivamente. Encontramos que a infusão de AM251, um antagonista CB1, e capsazepina, um antagonista TRPV1, no hipocampo 20 minutos antes do treino, prejudicou a atualização da memória no choque imediato. Demonstramos também que os receptores CB1, mas não os TRPV1, são necessários para a modificação da memória espacial através do protocolo de aprendizado reverso. Juntos, nossos resultados sugerem que a atividade dos receptores CB1 é crucial para a modificação das memórias, independentemente do tipo, e que algumas memórias podem ter mecanismos específicos, visto que o sistema endovaniloide pode agir em conjunto para regular memórias aversivas.

## **Palavras-chave**

Reconsolidação. Atualização da memória. Flexibilização comportamental. Hipocampo. CB1. TRPV1.

## 1 Introdução

Antigamente, acreditava-se que uma memória, após consolidada, mantinha-se fixa e inalterada e que a evocação do traço era simplesmente um processo passivo (MCGAUGH, 2000). Alguns estudos, ainda na década de 60, mostraram que a performance poderia ser prejudicada na presença de um agente amnésico após a reativação de uma memória (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968; SCHNEIDER; SHERMAN, 1968). Assim, atualmente a reativação é considerada um processo ativo com o poder de modificar a estabilidade ou o conteúdo do traço através do processo de reconsolidação (HAUBRICH; NADER, 2016).

A reconsolidação é um fenômeno que já foi encontrado em diferentes protocolos experimentais, tipos de memória (memórias aversivas e espaciais, por exemplo) e também em diferentes espécies (de invertebrados a humanos) (ANOKHIN; TIUNOVA; ROSE, 2002; NADER; EINARSSON, 2010; WALKER et al., 2003). O papel da reconsolidação é atualizar o traço original da memória através da incorporação de novas informações ou através do fortalecimento ou enfraquecimento do traço conforme a sua relevância (DE OLIVEIRA ALVARES, 2013; LEE, 2009, 2010; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000).

A reconsolidação, portanto, oferece a oportunidade de modificar um traço já consolidado a fim de mantê-lo atualizado e relevante para guiar comportamentos futuros, cumprindo a função de auxiliar na adequação dos animais ao mundo e às novas experiências (o que chamamos, neste trabalho, de flexibilização comportamental) (DE OLIVEIRA ALVARES, 2013; LEE, 2009, 2010). Além disso, é especialmente importante clinicamente por permitir a modificação de memórias mal adaptativas, tais como traumas e fobias (BECKERS; KINDT, 2017), em terapias psicológicas em conjunto com outras ferramentas (ELSEY; VAN AST; KINDT, 2018).

Alguns processos podem facilitar com que a reconsolidação ocorra, como, por exemplo, uma novidade no momento da reativação (FERNÁNDEZ; BOCCIA; PEDREIRA, 2016; PEDREIRA, PÉREZ-CUESTA, MALDONADO, 2004), tempo curto de reativação (em comparação com o tempo necessário para extinção) (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; MERLO et al., 2014; PEDREIRA; MALDONADO, 2003; SUZUKI, 2004) e agentes farmacológicos (GRÄFF et al., 2014).

Entretanto, outras características podem impedir ou dificultar o processo de reconsolidação, chamadas de condições limitantes intrínsecas ou, em inglês, “boundary conditions”. Entre elas, estão a idade da memória (quanto mais remota, mais difícil de ser desestabilizada) (HAUBRICH et al., 2015; SUZUKI, 2004), a força da memória (quanto mais

forte, mais difícil de ser desestabilizada) (SUZUKI, 2004; WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009), reativações muito curtas ou muito fracas (com poucas características similares à memória original, por exemplo) (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009), reativações muito longas (levando à extinção) (MAMIYA et al., 2009; SUZUKI, 2004) e novos aprendizados (que gerarão novas memórias) (LEE, 2010).

Para que uma memória seja reconsolidada, o primeiro passo é a desestabilização do traço, ou seja, o traço passa a ser instável e sujeito a modificações e interferências, como drogas inibidoras de síntese proteica (MAMIYA et al., 2009; MAMOU; GAMACHE; NADER, 2006; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000), choques eletroconvulsivos (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968) e novos aprendizados (NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000; SARA, 2000; SUZUKI et al., 2004, 2008). Dentre os mecanismos moleculares necessários para a desestabilização da memória, está a ativação do sistema endocanabinoide, especialmente os receptores CB1 (SUZUKI et al., 2004).

Os receptores CB1 são amplamente expressos em regiões como o hipocampo e a amígdala, importantes para memórias espaciais e aversivas (HERKENHAM et al., 1990), sendo cerca de 20 vezes mais expressos em neurônios GABAérgicos do que em glutamatérgicos (DAVIES; PERTWEE; RIEDEL, 2002; KAWAMURA, 2006; KREITZER, 2005; ZHU, 2006). Os ligantes canabinoides funcionam como mensageiros retrógrados inibitórios, ou seja, após a despolarização sináptica, são produzidos e liberados do terminal pós-sináptico, interagem com a porção pré-sináptica (CB1, por exemplo), e, desta forma, regulam diversas formas de plasticidade sináptica, como a inibição da liberação de neurotransmissores (DI MARZO; BIFULCO; DE PETROCELLIS, 2004; KREITZER; REGEHR, 2001; WILSON & NICOLL, 2001)

Estudos demonstram que o bloqueio de receptores CB1 no hipocampo impede a desestabilização de uma memória aversiva, tornando-a, portanto, insensível a modificações (SUZUKI et al., 2008). Também já foi demonstrado que o uso de um agonista CB1 imediatamente após a reativação de uma memória aversiva gera a desestabilização do traço, resultando em efeitos amnésicos (LEE; FLAVELL, 2014).

Mais recentemente, estudos descobriram que ligantes endocanabinoides, como anandamida e 2-AG, podem ativar o sistema endovaniloide através de receptores TRPV1 (DE PETROCELLIS et al., 2000; PETROSINO et al., 2016) e que, após a ativação de CB1, a ativação de receptores TRPV1 é uma das principais funções biológicas da anandamida (DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2012). No hipocampo, os receptores TRPV1 estão localizados nos neurônios piramidais de CA1 e CA3 (nas sinapses excitatórias com os interneurônios) e em



maior número nos interneurônios inibitórios, (CRISTINO et al., 2006; GIBSON et al., 2008; TÓTH et al., 2005), onde regulam a plasticidade sináptica e estão envolvidos em memórias aversivas e espaciais (EDWARDS, 2014; LI et al., 2008; MARSCH et al., 2007).

Desta forma, hipotetizamos que os receptores CB1 e TRPV1 atuam na desestabilização necessária à reconsolidação do traço mnemônico e, desta forma, permitem a atualização do traço com novas informações, levando a uma mudança comportamental. Utilizamos, para isso, os protocolos de choque imediato no condicionamento aversivo ao contexto, no qual uma memória inicialmente neutra será atualizada a uma memória aversiva, e o aprendizado reverso no labirinto aquático de Morris, no qual a memória da localização da plataforma será atualizada.

## **2 Materiais e métodos**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos de 2 a 3 meses fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Eles foram mantidos no biotério do Departamento de Biofísica (Instituto de Biociências, Laboratório de Neurobiologia da Memória) em caixas de policarbonato cobertas com grades metálicas e forradas com maravalha (sendo 4 ratos em cada uma), com água e ração *ad libitum*. As condições do ambiente são temperatura de  $20^{\circ}\text{C}\pm 2$ , umidade constante e ciclo claro/escuro de 12h. Todos os animais ficam um período de adaptação de duas semanas para habituação ao biotério e às novas caixas-moradia, além de serem manipulados pelo experimentador por até três dias antes dos experimentos iniciarem.

### **2.2 Cirurgia estereotáxica e histologias**

Os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com Ketamina e Xilazina (75 e 10 mg/kg, respectivamente). A injeção subcutânea do analgésico Meloxicam (1 mg/kg) foi realizada antes da cirurgia, bem como pelos próximos três dias, para amenizar o sofrimento do animal. Após anestesiados, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico e foi realizada a craniotomia para a inserção de cânulas (0,9mm) bilateralmente na região CA1 do hipocampo. A craniotomia segue as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson de 1986: AP (ântero-posterior) = -0.40mm; LL (látero-lateral) =  $\pm 0.30\text{mm}$ ; DV (dorso-ventral) = -0.16mm. As cânulas foram fixadas no crânio com acrílico dentário diluído em solvente e um parafuso e, através deste acesso, os fármacos foram administrados. Antes do início do estudo, os animais passaram por um período de 5 a 7 dias de recuperação pós-cirúrgica. A localização das cânulas,

bem como onde se deram as infusões, foi feita através de cortes coronais de 100  $\mu\text{m}$ , realizados em um vibrátomo. Somente animais com a correta localização das cânulas foram utilizados para a análise estatística dos experimentos.

### 2.3 Tratamentos farmacológicos

Os animais foram divididos em três diferentes grupos: (1) DMSO 8% (veículo, grupo controle), (2) AM251, antagonista seletivo de receptores CB1, na concentração de 11 ng/ $\mu\text{L}$  ou (3) Capsazepina, antagonista seletivo de receptores TRPV1, na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . As infusões foram realizadas através de agulhas *mizzys* conectadas a mangueiras de polietileno ligadas a microsseringas Hamilton de 10 $\mu\text{L}$ , através de um sistema propulsor automático e fluxo de 0,5 $\mu\text{L}$ /90 segundos. Após as infusões bilaterais, aguardou-se um minuto antes de remover as *mizzys* para garantir a completa difusão da droga no tecido, evitando refluxo.

### 2.4 Choque Imediato

Esta tarefa foi realizada em uma caixa automatizada de 25x25x25 cm, contendo um contexto listrado e um assoalho metálico. Durante dois dias, os animais foram manipulados pelo experimentador na mesma sala onde é feito o procedimento, levados até a caixa e logo em seguida postos de volta na caixa-moradia. Este procedimento é feito para que os animais não associem o choque imediato com o contato com a mão do experimentador. No primeiro dia de protocolo, os animais foram, então, pré-expostos à caixa de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) por 0 (sem pré-exposição), 15, 30 ou 180 segundos. No dia seguinte, foram reexpostos por 8 segundos, treinados com dois choques de 0,5mA (com duração de dois segundos), ficaram na caixa por mais 5 segundos e após isso foram levados diretamente para suas caixas-moradia. Dois dias depois, os animais foram testados por quatro minutos no contexto, e o congelamento (ou *freezing*, comportamento que corresponde à total imobilidade do animal, exceto pelos movimentos respiratórios, indicando medo) foi contabilizado minuto a minuto. Com este protocolo, determinou-se o ponto de 180 segundos como o mais adequado. No próximo experimento, os animais foram manipulados farmacologicamente 20 minutos antes da sessão de treino para verificar a participação do SE na reconsolidação da memória. Este protocolo foi baseado em Lee, 2010b, adaptado e padronizado em nosso laboratório.

### 2.5 Aprendizado Reverso

O Labirinto Aquático de Morris consiste em um tanque parcialmente cheio de água a uma temperatura de 21°C $\pm$ 2 e dividido em quatro quadrantes. Uma plataforma submersa foi

colocada no meio de um dos quadrantes, a qual o animal deveria encontrar baseando-se em dicas visuais presentes na parede do tanque. Para o protocolo de aprendizado reverso, a tarefa durou sete dias consecutivos. Nos cinco primeiros dias (treinos), a plataforma permaneceu no mesmo quadrante (alvo) e os animais foram largados randomicamente de diferentes pontos cardeais a cada *trial* (sendo um total de 6 *trials* por dia). Os animais possuíam 60 segundos para encontrar a plataforma; caso isso não acontecesse, eles eram gentilmente conduzidos a ela pelo experimentador e permaneciam por 20 segundos. No sexto dia (aprendizado reverso), a plataforma foi deslocada ao quadrante oposto e os animais retreinados com 10 *trials* consecutivos para avaliação da flexibilização comportamental. Os animais foram manipulados farmacologicamente 20 minutos antes da sessão de aprendizado reverso para avaliação da participação do SE. Este protocolo foi baseado em Pamplona e Takahashi, 2006, adaptado e padronizado em nosso laboratório.

## **2.6 Análise estatística**

Os resultados foram analisados utilizando ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey ou Sidak para comparações entre grupos. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **2.7 Aspectos éticos**

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Memória do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e respeitaram os preceitos éticos e de biossegurança. Este projeto está aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob o número 33313.

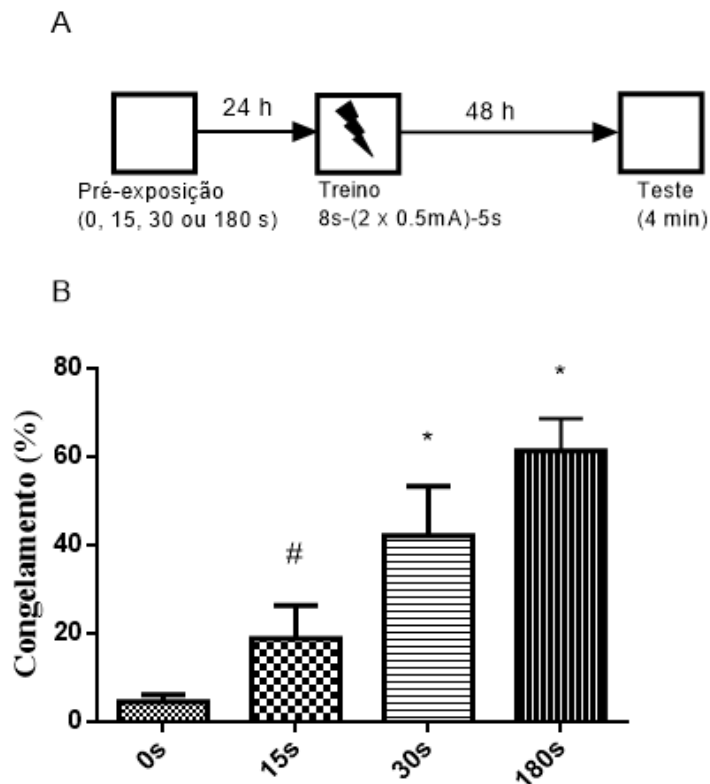
## **3 Resultados**

### **3.1 Padronização do protocolo de choque imediato**

Primeiramente, realizamos uma padronização do protocolo de choque imediato, já que ainda não havia sido realizado em nosso laboratório. Para isso, utilizamos 30 ratos, sendo divididos em quatro grupos conforme o tempo de pré-exposição no contexto: 0 segundos (sem pré-exposição), 15 segundos, 30 segundos e 180 segundos. Estes grupos foram pensados com

o intuito de avaliar qual a influência do tempo de pré-exposição no comportamento de medo no momento do teste.

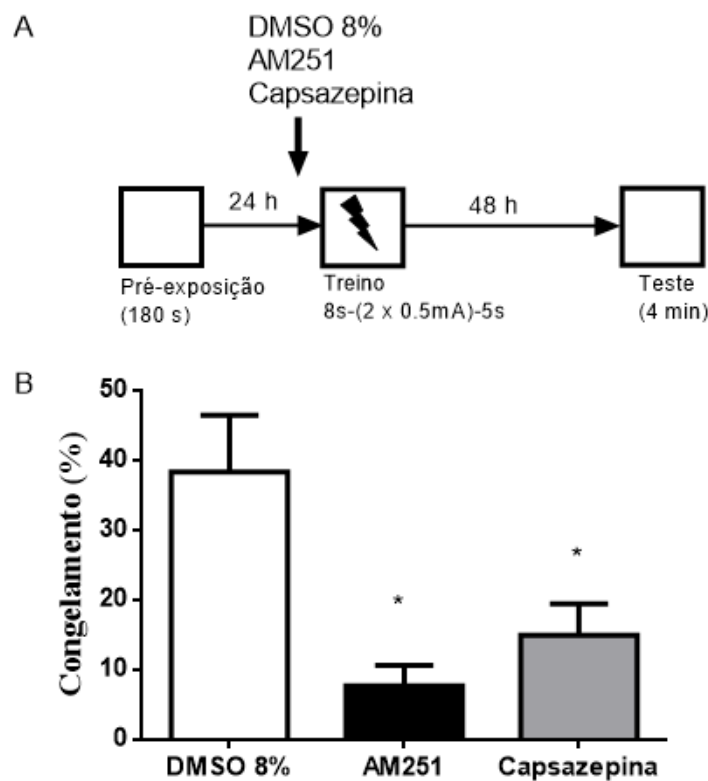
Com isso, conseguimos uma curva crescente, sendo que o grupo que não havia sido pré-exposto (zero segundos) não apresentou comportamento de congelamento (*freezing*) no momento do teste, pois não conseguiu conectar a informação contextual (no caso, inexistente) com a informação do choque. O grupo 15 segundos apresentou maior comportamento de medo comparado com 0 segundos, mas o pouco tempo no contexto não foi o suficiente para que a memória pudesse ser forte o bastante para se manter e ser atualizada no momento do treino. Já nos grupos 30 e 180 segundos a atualização aconteceu, sendo mais robusta no grupo que teve o maior tempo de pré-exposição (FIG 1).



**Figura 1.** Curva de padronização do protocolo de choque imediato no condicionamento aversivo ao contexto. (A) Protocolo experimental da tarefa. (B) ANOVA de uma via seguida de análise de Tukey mostrou diferenças significativas entre os tempos de pré-exposição ( $F(3, 26) = 12,02$   $P < 0,0001$ ). Dados são as médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=7-8$ ). \*  $p < 0,05$  comparado com 0s e #  $p < 0,05$  comparado com 180s.

### 3.2 CB1 e TRPV1 hipocampais participam da atualização da memória no protocolo de choque imediato

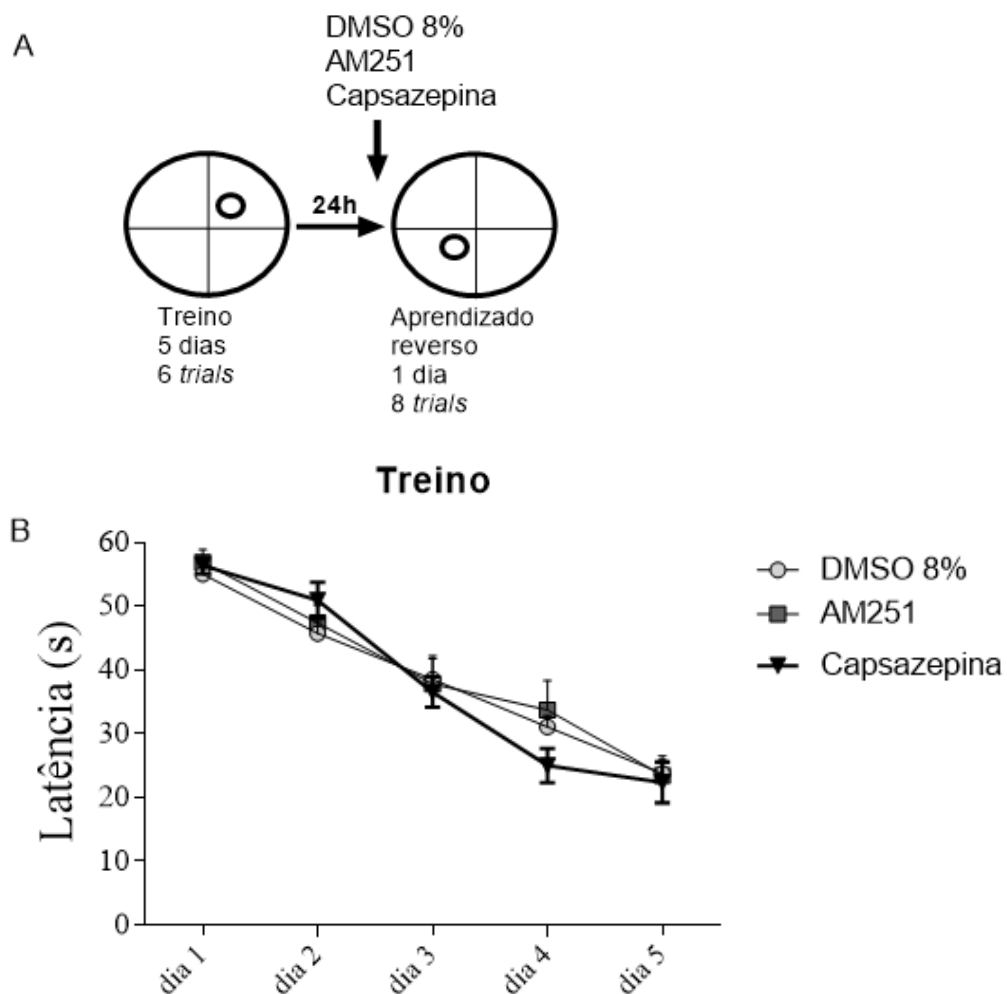
Com o resultado anterior, escolhemos o ponto de 180 segundos, por apresentar o resultado mais robusto. Hipotetizamos que, como a memória é normalmente atualizada em animais controle com esta pré-exposição longa, ao bloquear os receptores CB1 seria possível prejudicar o processo de atualização, e o mesmo aconteceria ao bloquear os receptores TRPV1. Encontramos que a infusão de antagonistas de CB1 (AM251) e de TRPV1 (Capsazepina) intra-hipocampal 20 minutos antes da reativação da memória aversiva prejudicou a reconsolidação, visto que os animais expressaram níveis menores de comportamento de medo (*freezing* ou congelamento) no momento do teste comparados com o grupo controle ( $F(2, 42) = 7,534$ ;  $P = 0,0016$ , ANOVA de uma via seguida de análise de Tukey) (FIG 2).

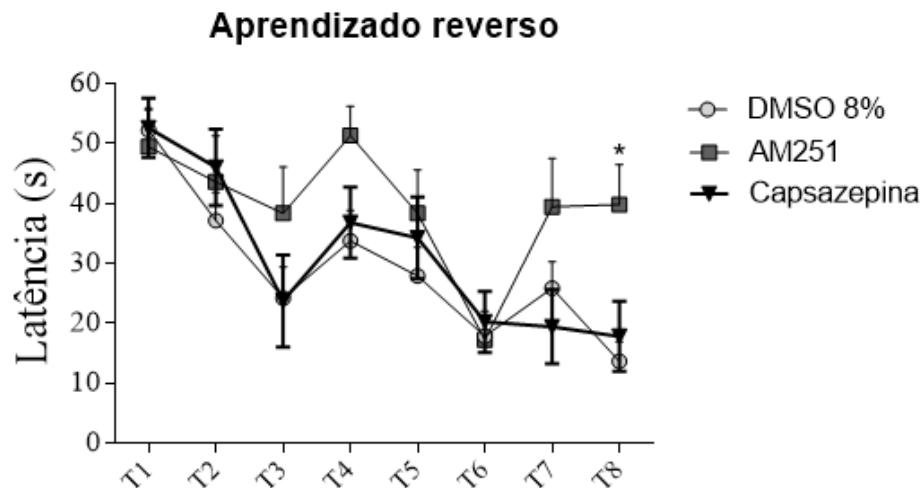


**Figura 2.** Os sistemas endocanabinóide e endovaniloide participam da atualização da memória mediada pela reconsolidação no protocolo de choque imediato. Os animais receberam AM251 e Capsazepina no hipocampo 20 minutos antes do treino. (A) Protocolo experimental de choque imediato no condicionamento aversivo ao contexto. (B) ANOVA de uma via seguida de análise de Tukey ( $F(2, 42) = 7,534$ ;  $P = 0,0016$ ). Dados são a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 15$ ). \*  $p < 0,05$  comparado com o veículo.

### 3.2 Flexibilização comportamental no protocolo de aprendizado reverso é dependente da atividade de CB1

Decidimos investigar se esses dois sistemas estão envolvidos também na atualização de uma memória espacial através do protocolo de aprendizado reverso no labirinto aquático de Morris. Hipotetizamos que, ao bloquear os sistemas endocanabinóide e endovaniloide, haveria um prejuízo na atualização da memória e, conseqüentemente, na flexibilização comportamental. Assim, os animais, no momento do aprendizado reverso, não conseguiriam aprender tão bem a nova localização. Neste experimento, apenas os receptores CB1 foram recrutados para a flexibilização. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tratamento ( $F(2, 33) = 3,462, P=0,0432$ ) e do tempo ( $F(7, 231) = 12,9, P<0,0001$ ), mas não interação ( $F(14, 231) = 1,271, P=0,2264$ ). A análise de Sidak de múltiplas comparações mostrou que os animais tratados com AM251 intra-hipocampal 20 minutos antes do aprendizado reverso demoraram mais tempo para encontrar a posição da plataforma durante o último *trial* comparado com o veículo (T8,  $p<0,05$ ) (FIG 3).





**Figura 3.** O bloqueio de CB1, mas não de TRPV1, prejudicou a atualização da memória espacial. AM251 e Capsazepina foram infundidos no hipocampo 20 minutos antes do aprendizado reverso. (A) Protocolo experimental de aprendizado reverso no labirinto aquático de Morris. (B) Curva de aprendizado durante os 5 dias de treino. ANOVA de medidas repetidas não mostrou efeito de interação ( $F(8, 84) = 1,354$ ;  $P=0,2289$ ), mas sim de tempo ( $F(4, 84) = 117,2$ ;  $P<0,0001$ ), ou seja, todos os animais aprenderam a tarefa. (C) Aprendizado reverso. ANOVA de medidas repetidas não mostrou efeito de interação ( $F(14, 231) = 1,271$ ,  $P=0,2264$ ), mas sim de tempo ( $F(7, 231) = 12,9$ ,  $P<0,0001$ ) e de tratamento ( $F(2, 33) = 3,462$ ,  $P=0,0432$ ). A análise de comparações múltiplas de Sidak revelou uma diferença significativa entre AM251 e veículo no último *trial* ( $P<0,05$ ). Os dados são as médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

#### 4 Discussão

O primeiro experimento consistiu em uma padronização do protocolo de choque imediato no condicionamento aversivo ao contexto, visto que este experimento ainda não havia sido realizado em nosso laboratório. O objetivo deste experimento foi verificar se o protocolo funcionava e qual seria o melhor ponto da curva para trabalhar a reconsolidação, ou seja, em qual tempo de pré-exposição os animais apresentavam, após o treino, um comportamento de medo mais robusto, para bloquearmos CB1 e TRPV1 neste ponto da curva no próximo experimento.

Hipotetizamos que, quanto maior o tempo de pré-exposição, mais forte seria a memória contextual neutra e, conseqüentemente, duraria mais tempo. Assim, esta memória poderia ser reativada com detalhes no momento do treino e atualizada com a informação do choque,

tornando-se uma memória contextual aversiva. Conforme o previsto, obtivemos uma curva crescente de congelamento conforme maior o tempo de pré-exposição e escolhemos o ponto de 180 segundos para o experimento subsequente, por apresentar a maior porcentagem de comportamento de medo comparado com os outros grupos (cerca de 70%) (FIG 1).

Suzuki e colaboradores (2008) mostraram que, quando os animais passavam por uma sessão de reativação e, logo em seguida, eram tratados com um inibidor de síntese proteica (anisomicina), havia um prejuízo na memória, ou seja, a síntese proteica é necessária para a reestabilização da memória de medo após a reativação. Além disso, eles mostraram que, ao bloquear os receptores CB1 sistemicamente ou diretamente no hipocampo após a reativação, impedindo a desestabilização desta memória aversiva, o efeito da anisomicina era bloqueado. Desta forma, sugere-se que a ativação de receptores CB1 é um fator importante para a desestabilização do traço após a reativação, para que depois esta memória seja reconsolidada.

Outro estudo, mais tarde, demonstrou que a co-infusão de um agonista canabinoide e um inibidor de IKK (Ikappa B kinase) ou de receptor NMDA no hipocampo dorsal imediatamente após a reativação de uma memória aversiva resultou em prejuízo no comportamento de medo testado 24 horas e que durou até sete dias após. A possível explicação para isso é que o agonista potencializou a desestabilização do traço e, portanto, necessitou de NMDA e IKK, processo que foi bloqueado pelos inibidores citados anteriormente. Além disso, a infusão do agonista canabinoide resultou em um aumento da proteína Zif268, conhecida por fazer parte do processo de reconsolidação (LEE; FLAVELL, 2014).

As pesquisas envolvendo o sistema endovaniloide e memória ainda são bastante escassas e, até o momento, até onde temos conhecimento, nenhum estudo mostrou a participação deste sistema especificamente na desestabilização ou na reconsolidação da memória. Estes receptores têm localização muito similar à dos receptores CB1, ou seja, presentes nos neurônios excitatórios, mas em maior número nos interneurônios GABAérgicos hipocampais (CRISTINO et al., 2006; GIBSON et al., 2008; TÓTH et al., 2005). Visto que a relação entre o sistema endovaniloide e endocanabinoide parece bem próxima, principalmente através da atuação da anandamida em canais TRPV1 (sendo considerada a função biológica mais importante dela, após ativação de CB1) (DE PETROCELLIS et al., 2000; DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2012), hipotetizamos que estes dois sistemas atuam, possivelmente em conjunto, na desestabilização da memória.

Como previsto, o bloqueio de receptores CB1 e TRPV1 antes da reativação da memória contextual neutra prejudicou a desestabilização desta memória e, por este motivo, não foi possível atualizá-la com a informação aversiva. Desta forma, os animais do grupo AM251 e



Capsazepina apresentaram baixíssima porcentagem de comportamento de medo no momento do teste (cerca de 10 e 20%, respectivamente) comparado com o grupo controle (cerca de 45%) (FIG 2). A média de congelamento mais baixa do grupo controle neste experimento em comparação com a padronização é explicada, neste caso, devido às infusões antes do momento da reativação, o que pode acabar se tornando mais aversivo ao animal do que o choque em si.

Da mesma forma que para a memória aversiva, foi observado que memórias espaciais reativadas podem ser reconsolidadas, e este processo também é dependente de síntese proteica no hipocampo (MORRIS et al., 2006; ROSSATO et al., 2006). Outro estudo demonstrou que a desestabilização da memória espacial também requer a ativação de CB1, ou seja, memórias aversivas e espaciais passam pela desestabilização e reconsolidação por processos similares dependentes de hipocampo, sugerindo, portanto, que há vias moleculares em comum regulando a estabilidade destes traços nessa região (KIM; MOKI; KIDA, 2011).

Para avaliar se nossos resultados com o bloqueio de CB1 e TRPV1 poderiam ser generalizados para outra tarefa dependente de hipocampo, escolhemos o protocolo de aprendizado reverso no labirinto aquático de Morris, uma tarefa bastante simples e que demonstra a flexibilização comportamental através da troca da localização da plataforma. A tarefa consistiu em cinco dias de treino com seis *trials* cada e todos os animais, ao final do dia 5, haviam aprendido a localização da plataforma alvo (FIG 3B). No sexto dia, conhecido como aprendizado reverso, a plataforma foi trocada para a localização oposta na piscina. Neste dia, o tratamento intra-hipocampal com AM251, mas não com Capsazepina, prejudicou a performance, visto que os animais do grupo AM251 demoraram mais, nos últimos *trials* (especialmente 7 e 8), para encontrar a plataforma na nova localização, demonstrando uma dificuldade na flexibilização comportamental devido ao bloqueio de receptores CB1 (FIG 3C).

Neste protocolo, os receptores TRPV1 não foram recrutados para a desestabilização e flexibilização comportamental, visto que o bloqueio deles não causou efeito na performance comparado com o grupo controle. É possível, portanto, que a ativação de receptores TRPV1 dependa da existência de algum componente aversivo na memória a ser reativada, visto que o protocolo realizado no labirinto aquático de Morris não tem valência emocional aversiva. Alguns estudos mostraram que o estresse torna as memórias mais frágeis durante o processo de reativação (MURCHISON et al., 2004), sendo que no hipocampo ele facilita a LTD (XU; ANWYL; ROWAN, 1997) e prejudica a LTP (FOY et al., 1987). Outro estudo mostrou que a ativação de receptores TRPV1, facilitando a LTP, pode ser um alvo potencial para a proteção de memórias dependentes de hipocampo, especialmente as espaciais, em situações de estresse (LI et al., 2008). Este estudo corrobora a teoria de que mecanismos competitivos entre o

hipocampo e a amígdala pode causar também uma competição pela reativação de memórias emocionais e espaciais, sendo que a ativação de TRPV1 causa efeitos contrários na plasticidade sináptica nestas duas áreas (DIAMOND et al., 2005).

## **5 Conclusão**

O principal objetivo deste estudo foi investigar o papel dos sistemas endocanabinóide e endovaniloide na atualização mediada pela reconsolidação da memória e na flexibilização comportamental. Corroborando estudos anteriores, demonstramos que o sistema endocanabinoide, especialmente os receptores CB1, está envolvido com a desestabilização das memórias tanto aversivas quanto espaciais, possibilitando a reconsolidação e a atualização, incorporando novas informações a um traço previamente consolidado. Demonstramos também, pela primeira vez, o papel do sistema endovaniloide, especialmente os receptores TRPV1, na atualização da memória através do protocolo de choque imediato no condicionamento aversivo ao contexto, entretanto, aparentemente este sistema apenas é recrutado quando há um componente aversivo no ambiente.

**Agradecimentos:** Esse trabalho foi apoiado pelo Programa de Pós-Doutorado Júnior do CNPq. Agradecemos também à nossa técnica bioterista Isabel Cristina por todo o apoio e dedicação.

## Referências

- ANOKHIN, K. V.; TIUNOVA, A. A.; ROSE, S. P. R. Reminder effects  $\pm$  reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], p. 7, 2002.
- BECKERS, T.; KINDT, M. Memory Reconsolidation Interference as an Emerging Treatment for Emotional Disorders: Strengths, Limitations, Challenges, and Opportunities. **Annual Review of Clinical Psychology**, [s. l.], v. 13, p. 99–121, 2017.
- BUSTOS, S. G.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Disruptive Effect of Midazolam on Fear Memory Reconsolidation: Decisive Influence of Reactivation Time Span and Memory Age. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 446–457, 2009.
- CRISTINO, L. et al. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 139, n. 4, p. 1405–1415, 2006.
- DAVIES, S. N.; PERTWEE, R. G.; RIEDEL, G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 993–1007, 2002.
- DE OLIVEIRA ALVARES. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neuroscience**, [s.l.], v. 8, 2013.
- DE PETROCELLIS, L. et al. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 483, n. 1, p. 52–56, 2000.
- DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus. **Neuron**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 527–538, 2002.
- DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews. Drug Discovery**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 771–784, 2004.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 367, n. 1607, p. 3216–3228, 2012.

DIAMOND, D. M. et al. Competitive interactions between endogenous LTD and LTP in the hippocampus underlie the storage of emotional memories and stress-induced amnesia. **Hippocampus**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 1006–1025, 2005.

EDWARDS, J. G. TRPV1 in the Central Nervous System: Synaptic Plasticity, Function, and Pharmacological Implications. In: ABDEL-SALAM, O. M. E. (Ed.). **Capsaicin as a Therapeutic Molecule**. Basel: Springer Basel, 2014. p. 77–104.

ELSEY, J. W. B.; VAN AST, V. A.; KINDT, M. Human memory reconsolidation: A guiding framework and critical review of the evidence. **Psychological Bulletin**, [s. l.], v. 144, n. 8, p. 797–848, 2018.

FERNÁNDEZ, R. S.; BOCCIA, M. M.; PEDREIRA, M. E. The fate of memory: Reconsolidation and the case of Prediction Error. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 68, p. 423–441, 2016.

FOY, M. R. et al. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. **Behavioral and Neural Biology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 138–149, 1987.

GIBSON, H. E. et al. TRPV1 Channels Mediate Long-Term Depression at Synapses on Hippocampal Interneurons. **Neuron**, [s. l.], v. 57, n. 5, p. 746–759, 2008.

GRÄFF, J. et al. Epigenetic Priming of Memory Updating during Reconsolidation to Attenuate Remote Fear Memories. **Cell**, [s. l.], v. 156, n. 1, p. 261–276, 2014.

HAUBRICH, J. et al. Reconsolidation Allows Fear Memory to Be Updated to a Less Aversive Level through the Incorporation of Appetitive Information. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 315–326, 2015.

HAUBRICH, J.; NADER, K. Memory Reconsolidation. In: CLARK, R. E.; MARTIN, S. J. (Eds.). **Behavioral Neuroscience of Learning and Memory**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 37p. 151–176.

- HERKENHAM, M. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 1932–1936, 1990.
- KAWAMURA, Y. The CB1 Cannabinoid Receptor Is the Major Cannabinoid Receptor at Excitatory Presynaptic Sites in the Hippocampus and Cerebellum. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 2991–3001, 2006.
- KIM, R.; MOKI, R.; KIDA, S. Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. **Molecular Brain**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 9, 2011.
- KREITZER, A. C. Neurotransmission: Emerging Roles of Endocannabinoids. **Current Biology**, [s. l.], v. 15, n. 14, p. R549–R551, 2005.
- KREITZER, A. C.; REGEHR, W. G. Retrograde Inhibition of Presynaptic Calcium Influx by Endogenous Cannabinoids at Excitatory Synapses onto Purkinje Cells. **Neuron**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 717–727, 2001.
- LEE. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Cell**, [s.l.], v. 32, n. 8, p. 413-420, 2009.
- LEE, J. L. C. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 4, p. 168, 2010.
- LEE, J. L. C.; FLAVELL, C. R. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 8, 2014.
- LI, H.-B. et al. Antistress Effect of TRPV1 Channel on Synaptic Plasticity and Spatial Memory. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 286–292, 2008.
- MAMIYA, N. et al. Brain Region-Specific Gene Expression Activation Required for Reconsolidation and Extinction of Contextual Fear Memory. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 402–413, 2009.
- MAMOU, C. B.; GAMACHE, K.; NADER, K. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1237–1239, 2006.

MARSCH, R. et al. Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice.

**Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 832–839, 2007.

MCGAUGH, J. L. Memory - a Century of Consolidation. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MERLO, E. et al. Reconsolidation and Extinction Are Dissociable and Mutually Exclusive Processes: Behavioral and Molecular Evidence. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 2422–2431, 2014.

MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. Retrograde Amnesia Produced by Electroconvulsive Shock after Reactivation of a Consolidated Memory Trace. **Science**, [s. l.], v. 160, n. 3827, p. 554–555, 1968.

MORRIS, R. G. M. et al. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. **Neuron**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 479–489, 2006.

MURCHISON, C. F. et al. A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. **Cell**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 131–143, 2004.

NADER, K.; EINARSSON, E. Ö. Memory reconsolidation: an update. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1191, n. 1, p. 27–41, 2010.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6797, p. 722–726, 2000.

PEDREIRA, M. E. Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 579–585, 2004.

PEDREIRA, M. E.; MALDONADO, H. Protein Synthesis Subverts Reconsolidation or Extinction Depending on Reminder Duration. **Neuron**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 863–869, 2003.

PETROSINO, S. et al. The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels: Novel

palmitoylethanolamide ‘entourage effects’. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 173, n. 7, p. 1154–1162, 2016.

ROSSATO, J. I. et al. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 431–440, 2006.

SARA, S. J. Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 73–84, 2000.

SCHNEIDER, A. M.; SHERMAN, W. Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. **Science**, [s. l.], v. 159, n. 3811, p. 219–221, 1968.

SUZUKI, A. Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 20, p. 4787–4795, 2004.

SUZUKI, A. et al. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 426–433, 2008.

TÓTH, A. et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Molecular Brain Research**, [s. l.], v. 135, n. 1, p. 162–168, 2005.

WALKER, M. P. et al. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. **Nature**, [s. l.], v. 425, n. 6958, p. 616–620, 2003.

WANG, S.-H.; DE OLIVEIRA ALVARES, L.; NADER, K. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 905–912, 2009.

WILSON & NICOLL. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 410, p. 588–592, 2001.

XU, L.; ANWYL, R.; ROWAN, M. J. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. **Nature**, [s. l.], v. 387, n. 6632, p. 497–500, 1997.

ZHU, P. J. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Plasticity in the Brain. **Critical Reviews in Neurobiology**, [s. l.], v. 18, n. 1–2, 2006.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, demonstramos como os sistemas endocanabinoide e endovaniloide estão envolvidos no processo de atualização da memória mediada pela reconsolidação e na flexibilização comportamental. Corroborando estudos anteriores, demonstramos que o sistema endocanabinoide, especialmente os receptores CB1, está envolvido com a desestabilização das memórias tanto aversivas quanto espaciais, possibilitando a reconsolidação e a atualização, incorporando novas informações a um traço previamente consolidado.

Demonstramos também, pela primeira vez, o papel do sistema endovaniloide, especialmente os receptores TRPV1, na atualização da memória através do protocolo de choque imediato no condicionamento aversivo ao contexto. Entretanto, encontramos que o bloqueio de TRPV1 não gerou prejuízo na flexibilização comportamental no protocolo de aprendizado reverso no labirinto aquático de Morris, o que indica o recrutamento de diferentes vias dependendo do tipo de memória ou da valência emocional de cada memória. Ou seja, aparentemente, a ativação de TRPV1 no hipocampo só acontece quando há um componente estressor no ambiente, como um choque.

As perspectivas do trabalho envolvem verificar se a ativação dos sistemas através do uso de agonistas podem resultar em uma facilitação ou fortalecimento da atualização e da flexibilização comportamental. Além disso, investigar melhor o recrutamento do sistema endovaniloide em diferentes tipos de memória e protocolos experimentais, visto que as pesquisas envolvendo este sistema em específico e a memória são escassas. Em última instância, avaliar como a modulação destes dois sistemas de neurotransmissão tão complexos e ainda pouco estudados poderiam influenciar clinicamente, principalmente no tratamento de traumas e fobias.



## REFERÊNCIAS

- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. R746–R750, 2013.
- AMARAL, O. et al. Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 180, n. 2, p. 113–118, 2007.
- ANOKHIN, K. V.; TIUNOVA, A. A.; ROSE, S. P. R. Reminder effects  $\pm$  reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], p. 7, 2002.
- ATSAK, P. et al. Endocannabinoid Signaling within the Basolateral Amygdala Integrates Multiple Stress Hormone Effects on Memory Consolidation. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 1485–1494, 2015.
- BALDI, E.; BUCHERELLI, C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 53, p. 160–190, 2015.
- BALDI, E.; MARIOTTINI, C.; BUCHERELLI, C. Differential roles of the basolateral amygdala and nucleus basalis magnocellularis during post-reactivation contextual fear conditioning reconsolidation in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 604–609, 2008.
- BECKERS, T.; KINDT, M. Memory Reconsolidation Interference as an Emerging Treatment for Emotional Disorders: Strengths, Limitations, Challenges, and Opportunities. **Annual Review of Clinical Psychology**, [s. l.], v. 13, p. 99–121, 2017.
- BENNION, D. et al. Transient receptor potential vanilloid 1 agonists modulate hippocampal CA1 LTP via the GABAergic system. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 730–738, 2011.
- BESNARD, A.; CABOCHE, J.; LAROCHE, S. Reconsolidation of memory: A decade of debate. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 61–80, 2012.

- BRUNET, A. et al. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. **Journal of Psychiatric Research**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 503–506, 2008.
- BUSQUETS GARCIA, A. et al. Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. **F1000Research**, [s. l.], v. 5, p. 990, 2016.
- CASTILLO, P. E. et al. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. **Neuron**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 70–81, 2012.
- CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, [s. l.], v. 389, n. 6653, p. 816–824, 1997.
- CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 487–517, 2001.
- CHÁVEZ, A. E.; CHIU, C. Q.; CASTILLO, P. E. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1511–1518, 2010.
- CHEVALEYRE, V.; CASTILLO, P. E. Heterosynaptic LTD of Hippocampal GABAergic Synapses: A Novel Role of Endocannabinoids in Regulating Excitability. **Neuron**, v. 38, p. 461–472, 2003.
- CRISTINO, L. et al. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 139, n. 4, p. 1405–1415, 2006.
- CRISTINO, L. et al. Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 151, n. 4, p. 955–968, 2008.
- DAVIES, S. N.; PERTWEE, R. G.; RIEDEL, G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 993–1007, 2002.
- DE LA FUENTE, V.; FREUDENTHAL, R.; ROMANO, A. Reconsolidation or Extinction: Transcription Factor Switch in the Determination of Memory Course after Retrieval. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 31, n. 15, p. 5562–5573, 2011.

DE OLIVEIRA ALVARES. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neuroscience**, [s.l.], v. 8, 2013.

DE PETROCELLIS, L. et al. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 483, n. 1, p. 52–56, 2000.

DE PETROCELLIS, L. et al. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase: VR1-mediated effects of anandamide. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 77, n. 6, p. 1660–1663, 2001.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 267–272, 2004.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus. **Neuron**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 527–538, 2002.

DI MARZO, V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. In: **Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. v. 160p. 1–24.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews. Drug Discovery**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 771–784, 2004.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 367, n. 1607, p. 3216–3228, 2012.

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

EDWARDS, J. G. TRPV1 in the Central Nervous System: Synaptic Plasticity, Function, and Pharmacological Implications. In: ABDEL-SALAM, O. M. E. (Ed.). **Capsaicin as a Therapeutic Molecule**. Basel: Springer Basel, 2014. p. 77–104.

ELSEY, J. W. B.; VAN AST, V. A.; KINDT, M. Human memory reconsolidation: A guiding framework and critical review of the evidence. **Psychological Bulletin**, [s. l.], v. 144, n. 8, p. 797–848, 2018.

FERNÁNDEZ, R. S.; BOCCIA, M. M.; PEDREIRA, M. E. The fate of memory: Reconsolidation and the case of Prediction Error. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 68, p. 423–441, 2016.

FUKUSHIMA, H. et al. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. **eLife**, [s. l.], v. 3, 2014.

GAMACHE, K.; PITMAN, R. K.; NADER, K. Preclinical Evaluation of Reconsolidation Blockade by Clonidine as a Potential Novel Treatment for Posttraumatic Stress Disorder. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 13, p. 2789–2796, 2012.

GIBSON, H. E. et al. TRPV1 Channels Mediate Long-Term Depression at Synapses on Hippocampal Interneurons. **Neuron**, [s. l.], v. 57, n. 5, p. 746–759, 2008.

GORZKIEWICZ, A.; SZEMRAJ, J. Brain endocannabinoid signaling exhibits remarkable complexity. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 142, p. 33–46, 2018.

GRUETER, B. A.; BRASNJO, G.; MALENKA, R. C. Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1519–1525, 2010.

HASHIMOTODANI, Y. et al. Phospholipase C $\beta$  Serves as a Coincidence Detector through Its Ca<sup>2+</sup> Dependency for Triggering Retrograde Endocannabinoid Signal. **Neuron**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 257–268, 2005.

HAUBRICH, J. et al. Reconsolidation Allows Fear Memory to Be Updated to a Less Aversive Level through the Incorporation of Appetitive Information. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 315–326, 2015.

HERKENHAM, M. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 1932–1936, 1990.

HOWLETT, A. C. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 161–202, 2002.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GÁBOR, A.; SZOLCSÁNYI, J. DIRECT EVIDENCE FOR NEUROGENIC INFLAMMATION AND ITS PREVENTION BY DENERVATION AND BY PRETREATMENT WITH CAPSAICIN. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 138–151, 1967.

JENNINGS, E. A. et al. The actions of anandamide on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 548, n. 1, p. 121–129, 2003.

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

KAWAMURA, Y. The CB1 Cannabinoid Receptor Is the Major Cannabinoid Receptor at Excitatory Presynaptic Sites in the Hippocampus and Cerebellum. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 2991–3001, 2006.

KELLOGG, R.; MACKIE, K.; STRAIKER, A. Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptor-Dependent Long-Term Depression in Autaptic Excitatory Neurons. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 1160–1171, 2009.

KREITZER, A. C. Neurotransmission: Emerging Roles of Endocannabinoids. **Current Biology**, [s. l.], v. 15, n. 14, p. R549–R551, 2005.

KREITZER, A. C.; REGEHR, W. G. Retrograde Inhibition of Presynaptic Calcium Influx by Endogenous Cannabinoids at Excitatory Synapses onto Purkinje Cells. **Neuron**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 717–727, 2001.

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

LEE. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Cell**, [s.l.], v. 32, n. 8, p. 413-420, 2009.

LEE, J. L. C. Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. **Science**, [s. l.], v. 304, n. 5672, p. 839–843, 2004.

LEE, J. L. C. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 4, p. 168, 2010.

LEE, J. L. C.; FLAVELL, C. R. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 8, 2014.

LI, H.-B. et al. Antistress Effect of TRPV1 Channel on Synaptic Plasticity and Spatial Memory. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 286–292, 2008.

LU, H.-C.; MACKIE, K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. **Biological psychiatry**, [s. l.], v. 79, n. 7, p. 516–525, 2016.

MACCARRONE, M. et al. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 152–159, 2008.

MAIONE, S. et al. TRPV1 channels control synaptic plasticity in the developing superior colliculus: TRPV1 in the developing colliculus. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 587, n. 11, p. 2521–2535, 2009.

MAMIYA, N. et al. Brain Region-Specific Gene Expression Activation Required for Reconsolidation and Extinction of Contextual Fear Memory. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 402–413, 2009.

MAMOU, C. B.; GAMACHE, K.; NADER, K. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1237–1239, 2006.

MARINELLI, S. et al. Presynaptic Facilitation of Glutamatergic Synapses to Dopaminergic Neurons of the Rat Substantia Nigra by Endogenous Stimulation of Vanilloid Receptors. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 3136–3144, 2003.

MARSCH, R. et al. Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 832–839, 2007.

MARTINS, D.; TAVARES, I.; MORGADO, C. “Hotheaded”: The role OF TRPV1 in brain functions. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 85, p. 151–157, 2014.

MCGAUGH, J. L. Memory--a Century of Consolidation. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

- MERLO, E. et al. Reconsolidation and Extinction Are Dissociable and Mutually Exclusive Processes: Behavioral and Molecular Evidence. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 2422–2431, 2014.
- MICALE, V. et al. Anxiolytic Effects in Mice of a Dual Blocker of Fatty Acid Amide Hydrolase and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channels. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 593–606, 2009.
- MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. Retrograde Amnesia Produced by Electroconvulsive Shock after Reactivation of a Consolidated Memory Trace. **Science**, [s. l.], v. 160, n. 3827, p. 554–555, 1968.
- MONFILS, M.-H. et al. Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. **Science**, [s. l.], v. 324, n. 5929, p. 951–955, 2009.
- MORENA, M.; CAMPOLONGO, P. The endocannabinoid system: An emotional buffer in the modulation of memory function. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 112, p. 30–43, 2014.
- MUSELLA, A. et al. Transient receptor potential vanilloid 1 channels control acetylcholine/2-arachidonoylglycerol coupling in the striatum. **Neuroscience**, [s. l.], v. 167, n. 3, p. 864–871, 2010.
- NADER, K.; EINARSSON, E. Ö. Memory reconsolidation: an update. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1191, n. 1, p. 27–41, 2010.
- NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 224–234, 2009.
- NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6797, p. 722–726, 2000.
- OHNO-SHOSAKU, T. et al. Presynaptic Cannabinoid Sensitivity Is a Major Determinant of Depolarization-Induced Retrograde Suppression at Hippocampal Synapses. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 3864–3872, 2002.
- PAUSE, B. M. et al. Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 7, 2013.

PEDREIRA, M. E. Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 579–585, 2004.

PEDREIRA, M. E.; MALDONADO, H. Protein Synthesis Subverses Reconsolidation or Extinction Depending on Reminder Duration. **Neuron**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 863–869, 2003.

PETROSINO, S. et al. The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels: Novel palmitoylethanolamide ‘entourage effects’. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 173, n. 7, p. 1154–1162, 2016.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 873–884, 2003.

PRADOALCALA, R. et al. Amygdala or hippocampus inactivation after retrieval induces temporary memory deficit. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 144–149, 2006.

PUENTE, N. et al. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1542–1547, 2011.

QUIRK, G. J. et al. The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 16, p. 6225–6231, 2000.

RAMIREZ, S. H. et al. Activation of Cannabinoid Receptor 2 Attenuates Leukocyte-Endothelial Cell Interactions and Blood-Brain Barrier Dysfunction under Inflammatory Conditions. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 4004–4016, 2012.

RAO-RUIZ, P. et al. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1302–1308, 2011.

RESCORLA, R. A. Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 115–124, 2001.

ROBERTS, J. C.; DAVIS, J. B.; BENHAM, C. D. [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. **Brain Research**, [s. l.], v. 995, n. 2, p. 176–183, 2004.



ROSS, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 140, n. 5, p. 790–801, 2003.

SACCHETTI, B.; SACCO, T.; STRATA, P. Reversible inactivation of amygdala and cerebellum but not perirhinal cortex impairs reactivated fear memories: Brain structures and long-term fear memory. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 2875–2884, 2007.

SANTOS, C. J. P. A.; STERN, C. A. J.; BERTOGLIO, L. J. Attenuation of anxiety-related behaviour after the antagonism of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the rat ventral hippocampus: **Behavioural Pharmacology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 357–360, 2008.

SARA, S. J. Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 73–84, 2000.

SMART, D. et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 227–230, 2000.

STELT, M. Van der; MARZO, V. D. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [s. l.], v. 77, n. 1–4, p. 111–122, 2005.

SUZUKI, A. Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 20, p. 4787–4795, 2004.

SUZUKI, A. et al. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 426–433, 2008.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. [s. l.], p. 53, [s.d.].

TÓTH, A. et al. Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. **Life Sciences**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 487–498, 2003.

TÓTH, A. et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Molecular Brain Research**, [s. l.], v. 135, n. 1, p. 162–168, 2005.

WALKER, M. P. et al. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. **Nature**, [s. l.], v. 425, n. 6958, p. 616–620, 2003.

WANG, S.-H.; DE OLIVEIRA ALVARES, L.; NADER, K. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 905–912, 2009.

WILSON & NICOLL. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 410, p. 588-592, 2001.

WILSON, R. I. Endocannabinoid Signaling in the Brain. **Science**, [s. l.], v. 296, n. 5568, p. 678–682, 2002.

ZHU, P. J. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Plasticity in the Brain. **Critical Reviews in Neurobiology**, [s. l.], v. 18, n. 1–2, 2006.

ZYGMUNT, P. M. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, [s. l.], v. 400, n. 6743, p. 452–457, 1999.

ZYGMUNT, P. M. et al. Monoacylglycerols Activate TRPV1 – A Link between Phospholipase C and TRPV1. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 12, 2013.

## **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 lay-out 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](#).