

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FABIANA SANTANA DOS SANTOS

**INTERAÇÃO DOS SISTEMAS ENDOCANABINÓIDE E COLINÉRGICO
MUSCARÍNICO NO PROCESSAMENTO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS NO
HIPOCAMPO DORSAL E CORTEX INFRALÍMBICO DE RATOS**

Porto Alegre

2016

FABIANA SANTANA DOS SANTOS

**INTERAÇÃO DOS SISTEMAS ENDOCANABINÓIDE E COLINÉRGICO
MUSCARÍNICO NO PROCESSAMENTO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS NO
HIPOCAMPO DORSAL E CORTEX INFRALÍMBICO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Neurociência.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Coorientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus pela minha família e pelas pessoas que Ele colocou em meu caminho. Muitas delas me ajudam, me inspiram e me encorajam a ser cada dia melhor.

O amor dos meus pais José Amaro e Nazaré, do meu irmão Fábio e da minha avó Emília me faz forte para sempre ir mais longe. Obrigada por tudo.

Ao meu querido Torben por estar ao meu lado, mesmo que distante.

Não posso esquecer os meus queridos pais de Porto Alegre, Darci e Rozoita, que muito me ajudaram durante esses 8 anos em Porto Alegre. E a inesquecível avó Irene. Muito obrigada a essa família que me acolheu de forma tão amorosa.

Agradeço a minha psicóloga Andrea Lompa, que muito me auxiliou a entender as minhas limitações e as diferentes formas de comportamento do outro.

Aos meus queridos amigos do LPBNC pela atenção, paciência e ensinamentos: Ana Paula Crestani, Fernanda Lotz, Flávia Booz, Josué Haubrich, Krislei Scienza, Querusche Zanona e D. Zelma. Em especial ao Lucas Alvares e ao Rodrigo Sierra que tanto me socorreram em todas as fases deste projeto.

Aos amigos do LNM: Lizeth Pedraza, Ricardo Marcelo Sachser, Mirelle Casagrande e Paula Lunardi.

Agradeço ao professor Jorge Quillfeldt que me aceitou em seu laboratório, pelos conselhos, ensinamentos e dicas durante este trabalho.

Ao professor Mathijs Feenstra e Cindy Pinha que me auxiliaram durante um ano que estive no Netherlands Institute for Neuroscience.

Aos seguranças da UFRGS por sempre me acompanharam até a parada de ônibus quando ficava até à noite trabalhando no laboratório.

Aos professores do PPG Neurociências.

Ao Programa Ciências sem Fronteiras que me possibilitou um crescimento profissional e pessoal inesquecível com o Doutorado Sanduíche.

Agradeço também ao CNPq pela bolsa.

RESUMO

Os sistemas endocanabinóide e colinérgico muscarínico têm um importante papel modulador sobre a atividade neural tanto excitatória, quanto inibitória no sistema nervoso central, participando de inúmeros processos, entre eles, os mecanismos de aprendizagem e memória. Partindo do fato de que os receptores canabinóides CB1 têm alta concentração em áreas relevantes para a memória, como o hipocampo (responsável pelo componente contextual), ou o córtex infralímbico (envolvido na manutenção da extinção), inicialmente investigamos os efeitos do potente agonista CB1, CP55,940 sobre a consolidação e a reconsolidação da memória: essa área cortical ainda não fora estudada nesta etapa do processamento de memórias, nem aquele fármaco havia sido adequadamente investigado. A seguir, visando compreender o possível sinergismo entre os sistemas endocanabinóide CB1 e colinérgico muscarínico M4 no processamento de memórias aversivas em ratos, estudamos os efeitos da infusão concomitante de concentrações subefetivas do agonista CB1 e da toxina muscarínica seletiva para M4 (MT3 - extraída da peçonha da serpente mamba verde africana), na área CA1 do hipocampo, sobre a consolidação da memória, verificando também seus efeitos sobre a plasticidade neural de ratos *Wistar* machos adultos.

Os resultados do presente trabalho mostraram uma clara modulação endocanabinóide, tanto da *consolidação* quanto da *reconsolidação* da memória, envolvendo igualmente receptores CB1 no hipocampo e no córtex infralímbico: o efeito amnésico duradouro foi diferente do obtido por nosso grupo usando a menos seletiva Anandamida em outra tarefa, aversiva inibitória (de Oliveira Alvares et al., 2008b): as diferenças farmacológicas e entre tarefas explicariam, em parte, esses achados contrastantes. Na segunda parte, onde estudamos o sinergismo apenas na *consolidação*, constatamos uma forte interação complementar dos subsistemas CB1 e M4 afetando a resposta comportamental, com efeito amnésico observado apenas na presença dos dois fármacos juntos (CP55,940+MT3, cada qual em concentração subefetiva). A infusão concomitante de ambos, nessas mesmas concentrações, também foi capaz de inibir a indução e a manutenção da potenciação de longa duração (LTP) na mesma região CA1 hipocampal, reforçando a hipótese de que a

semelhança farmacológica observada nos efeitos de cada subsistema, com agonistas ou antagonistas, em cada uma das diferentes fases da memória, sugere que cada subsistema atua como “sobressalente”, complementar ao outro.

ABSTRACT

The endocannabinoid and muscarinic cholinergic systems play a pivotal role in the modulation of neural activity, both excitatory and inhibitory, in the central nervous system, taking part in numerous processes, among which are mechanisms of learning and memory. Based on the fact that cannabinoid receptors CB1 have high concentration in areas relevant to memory, such as the hippocampus (responsible for the contextual component), or the infralimbic cortex (involved in the maintenance of extinction), we initially investigated the effects of the potent CB1 agonist CP55,940 on the consolidation and reconsolidation of memory: neither has this cortical area been studied in this phase of memory processing nor has this drug been adequately investigated. In order to understand the possible synergism between the endocannabinoid CB1 and the muscarinic cholinergic M4 systems in the processing of aversive memories in rats, we studied the effects of the concomitant infusion of subthreshold concentrations of the CB1 agonist and the selective muscarinic toxin for M4 (MT3 – extracted from the venom of the African green mamba snake), in the CA1 region of the hippocampus, on the consolidation of memory, also verifying their effects on the neural plasticity of adult male *Wistar* rats.

The results of the present study evidenced a clear endocannabinoid modulation, both in the *consolidation* and *reconsolidation* of memory, equally involving CB1 receptors in the hippocampus and infralimbic cortex: the long-lasting amestic effect differed from that obtained by our group using the less selective Anandamide in another behavioral experiment, the aversive inhibitory task ([de Oliveira Alvares et al., 2008b](#)): pharmacological differences and those between tasks would explain, in part, these contrasting results. In the second part, in which we studied the synergism only in *consolidation*, we found a strong complementary interaction between CB1 and M4 subsystems affecting the behavioral response, with an amestic effect only observed in the presence of both drugs together (CP55,940+MT3, each in a subthreshold concentration). The concomitant infusion of both, in these same concentrations, was also able to inhibit the induction and maintenance of long term potentiation (LTP) in the same CA1 region of the hippocampus, reinforcing the hypothesis that the pharmacological similarities

observed in the effects of each subsystem, using agonists or antagonists, in each of the different memory phases, suggest that each subsystem acts as a “spare”, complementary to each other.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo das fases da memória

Figura 2: Rede neural do hipocampo

Figura 3: Formação hipocampal do rato.

Figura 4: Plasticidade sináptica: potenciação de longa duração.

Figura 5: Mecanismo de ação do endocanabinóide sobre o receptor CB1

Figura 6: Mamba-verde-oriental

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

Acc: córtex cingulado anterior

AGm: área medial agranular

AMPA: α -amino-3-hydroxi-5-methyl-4-isoxazolepropionato

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

CA: corno de Amon

Ca²⁺: cálcio

CAC: condicionamento aversivo contextual

CaMKII: proteína quinase dependente decálcio/calmodulina II

CB1: receptor canabinóide tipo 1

CB2: receptor canabinóide tipo 2

CE: córtex entorrinal

CNQX: 6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona; CNQX

CPP: córtex parietal posterior

CS: estímulo condicionado

DAG lipase: diacilglicerol lipase

DAG: diacilglicerol

DG: giro dentado

EI: esquiva inibitória

FAAH: enzimas hidrolase ácida amina graxa

HPC: hipocampo

IL: infralímbico

K⁺: potássio

LEA: área lateral do entorrinal

LTP: potenciação de longa duração

M1: Receptor muscarínico tipo 1

M2: Receptor muscarínico tipo 2

M3: Receptor muscarínico tipo 3

M4: Receptor muscarínico tipo 4

MAG: monoacilglicerol

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

MEA: área medial do entorrinal

Mg²⁺: magnésio

mPFC: córtex pré-frontal medial

MT3: toxinas muscarínicas 3

NAPE-PLD: N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D

NMDA: N-metil D-Aspartato

PKA: proteína quinase A

PL: córtex pré-límbico

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

US: não condicionado

Sumário

1. Introdução	12
1.1 Memória e suas classificações	12
1.2. Modulação do Sistema endocanabinóide sobre as fases da memória	14
1.3. Anatomia e organização do hipocampo e do córtex medial pré-frontal.....	16
1.4. Rede neural do hipocampo	16
1.5. Papel do hipocampo na memória.....	19
1.6. Papel do infralímbico na memória.....	22
1.7. Plasticidade sináptica hipocampal.....	22
1.8. Sistema endocanabinóide e memória.....	25
1.9. Modulação muscarínica colinérgica M4 e memória.....	29
1.10. Interações entre os Sistemas Endocanabinóide e Colinérgico Muscarínico.....	34
2. Objetivos	38
2.1. Objetivo geral	38
2.1.1. Objetivo específico do capítulo 1	38
2.1.2. Objetivo específico do capítulo 2	38
3. Resultados	39
Capítulo I: Involvement of the infralimbic cortex and CA1 hippocampal area in reconsolidation of a contextual fear memory through CB1 receptors: effects of CP55,940.	39
Capítulo II: Synergetic interactions of CB1-mediated endocannabinoid and cholinergic muscarinic M4 modulations of the CA1 hippocampal circuitry upon memory consolidation”.....	46
4. Discussão.....	67
4.1. Participação dos receptores CB1 na reconsolidação de uma memória aversiva no córtex infralímbico e no hipocampo.	67
4.2. Efeito sinérgico entre os sistemas endocanabinóide e colinérgico muscarínico sobre o processo de consolidação da memória.	70
5. Conclusão	72
6. Bibliografia.....	73

1. Introdução

1.1 Memória e suas classificações

A memória geralmente é um termo utilizado para expressar uma informação que foi armazenada. Biologicamente, a memória é um processo cujas experiências comportamentais formam um "traço de memória" que serão armazenados difusamente no córtex cerebral ([Gouty-Colomer et al., 2015](#)). E ela pode ser classificada em diferentes formas de acordo com as suas características. De acordo com o tipo a memória pode ser classificada como declarativa e não declarativa.

A memória declarativa consiste na capacidade que um indivíduo possui em expressar um fato (memória semântica) ou um evento (memória episódica) ([Riedel et al., 2015](#)). Animais também têm esse tipo de memória, porém a nomeamos como explícita, pois eles não possuem a capacidade de linguagem para nos declarar um fato ou evento. Esse tipo de memória é frequentemente fácil de formar e de ser esquecida e, geralmente, é disponível para uma evocação consciente ([Agrest, 2001](#)).

A aprendizagem não-declarativa é a capacidade que um indivíduo possui de reter informações de várias habilidades mnemônicas diferentes que só podem ser expressos através de desempenho, os seja, não podem ser verbalizadas ([Squire & Zola, 1997](#); [Setlow, 1997](#)). Devido este fato, ela também pode ser chamada de memória de procedimento, como o seu próprio nome sugere, refere-se a informações relacionadas à aquisição de habilidades motoras ([Tulving, 1987](#)). Para que ocorra a formação de uma memória não-declarativa é necessário muitas repetição e prática, porém essa memória tem menor probabilidade de ser esquecida ([Cruz-Morales et al., 2008](#)).

Um grande número de pesquisas tem sugerido que estas duas formas de aprendizagem são mediadas por diferentes estruturas cerebrais. Evidência sugere que a aprendizagem declarativa é mediada pela formação hipocampal, as estruturas relacionadas ao lobo temporal medial e as estruturas diencefálicas, enquanto aprendizagem não-declarativa é mediada por uma variedade de outras estruturas cerebrais, tais como a formação hipocampal, estriado e circuitos fronto-basais

(Squire & Zola, 1997; Hitti & Siegelbaum, 2014; Skirrow et al., 2015; Badre et al., 2014; Ullman et al., 2005).

Além disso, a memória pode ser classificada de acordo com o tempo: curtíssima duração (ou de trabalho), curta duração (curto prazo) ou longa duração (longo prazo).

A memória de trabalho é um tipo de mecanismo que nos permite lembrar algo por um curtíssimo período de tempo para concluirmos uma informação (Miller, 1956; Tetzlaff et al., 2012). Por exemplo, ao ler um parágrafo é necessário manter a informação das primeiras palavras para entendermos o significado total de uma mensagem. Uma característica interessante da memória de trabalho é que ele tem uma capacidade limitada entre quatro e sete itens de armazenamento (Miller, 1956; Cowan, 2001). Estudos sugerem que regiões específicas do córtex frontal (dorsolateral e ventrolateral) são fundamentais para formação da memória de trabalho (Owen 1997; Cohen et al. 1997).

Em relação à escala de tempo a memória de curta duração pode armazenar itens por alguns minutos ou até dias. Esse tipo de memória é vulnerável a perturbações (Walker, 2003), porém ela pode ser consolidada e tornar uma memória de longa duração (Dudai, 2004). O hipocampo é uma das mais importantes estruturas cerebrais requeridas para a formação da memória de curta duração (Goonawardena et al., 2011), porém sabe-se que a amígdala também está envolvida influenciando emocionalmente nos processos de formação da memória. (McGaugh, 2000).

A memória de longo prazo tem uma escala de tempo que pode durar dias, meses, anos e até mesmo uma vida inteira. Para a formação deste tipo de memória é necessária uma plasticidade sináptica de rede cortical, principalmente o córtex pré-frontal, com estruturas hipocampais para o armazenamento das informações (Frankland & Bontempi 2005; Dudai, 2004).

1.2. Modulação do Sistema endocanabinóide sobre as fases da memória

A memória é o processo cujas experiências comportamentais formam um traço duradouro. Ou seja, é a capacidade que um indivíduo tem de armazenar as informações. Mas para que esse processo ocorra, é necessário um tempo para que o traço de memória se consolide em algumas regiões do encéfalo. As fases do processamento da memória são divididas em três etapas: aquisição, consolidação e evocação.

A aquisição das informações também é denominada aprendizado. A ativação do sistema endocanabinóide com a administração sistêmica dos agonistas dos receptores canabinóides (THC ou Win55212-2) antes do treino prejudica a aquisição da memória nas tarefas: labirinto aquático de Morris, condicionamento aversivo contextual e de reconhecimento de objetos em ratos (Da & Takahashi, 2002; Lichtman et al., 1995; Pamplona & Takahashi, 2006). Semelhante desempenho ocorre com a infusão do agonista indireto (AM404 - inibidor da recaptação de anandamida) no hipocampo prejudicando a aprendizagem na tarefa de condicionamento aversivo contextual (Lin et al., 2011).

A consolidação é o período em que as informações aprendidas podem ser armazenadas. Alguns estudos têm demonstrado que a administração sistêmica pós-treino de agonistas dos receptores canabinóides (HU-210 ou Win55212-2) prejudica a consolidação da memória nas tarefas de condicionamento aversivo contextual (Mackowiak, et al., 2009) e labirinto aquático de Morris (Yim, et al., 2008).

Existe uma discreta divergência no que se refere a infusão de agonistas canabinóide (anandamida ou Win55212-2) na área CA1 do hipocampo. A administração intra-hipocampal de WIN55212-2 (0,25-0,5 ug / rato ou 10 nmol/side) prejudicou a consolidação de memória nas tarefas de esquila inibitória (Jamali-Raeufy et al., 2011) e reconhecimento de objetos (Clarke et al., 2008). Outros estudos demonstraram um efeito facilitatório com infusão de anandamida (0,17 ng / lado) no hipocampo dorsal (De Oliveira Alvares, et al., 2008) e de WIN55212-2 na amígdala basolateral (50 ng / lado) (Campolongo et al., 2009) na tarefa de esquila inibitória.

A evocação é quando o indivíduo lembra o que foi memorizado. Estudos demonstram que a administração sistêmica ou local de agonistas dos receptores de

canabinóide (THC ou Win55212–2) pré-teste sempre prejudica a evocação da memória nas tarefas de reconhecimento de objeto (Campolongo et al., 2013), esquiva inibitória (Piri et al., 2011; Mishima et al., 2001) e condicionamento aversivo contextual (Atsak et al., 2012).

A memória consolidada pode sofrer extinção (reexposição de longa duração - envolve um novo aprendizado que inibe a memória original) ou reconsolidação (reexposição de curta duração - a memória pode ser labilizada tornando-se suscetível a mudanças). A ativação do sistema endocanabinóide com agonista Win 55,940 (i.p. ou CA1) facilita a extinção da memória nos testes de condicionamento aversivo contextual (Pamplona et al., 2006) e esquiva inibitória (Abush and Akirav, 2010) em ratos. De modo semelhante ocorreu com a infusão de AM404 intracerebroventricular na tarefa de condicionamento aversivo contextual (Bitencourt et al., 2008) no processo de extinção da memória.

Estudos relataram que o sistema endocanabinóide também está envolvido na reconsolidação da memória. Infusões do antagonista do receptor CB1 (AM251) no hipocampo dorsal de ratos facilitou a reconsolidação (de Oliveira Alvares et al., 2008b), enquanto microinfusões dos agonistas (Anandamida, WIN55,212-2 ou HU-21) no hipocampo dorsal (de Oliveira Alvares et al., 2008b) amígdala (Lin et al., 2006) ou córtex insular (Kobilo et al., 2007) prejudicaram a reconsolidação da memória de medo em ratos.

De acordo com o que foi declarado, percebe-se que existe uma clara influência do sistema endocanabinóide sobre as fases da memória e que eventos ambientais podem modular as respostas aos efeitos cognitivos dos canabinóides nos processos mnemônicos.

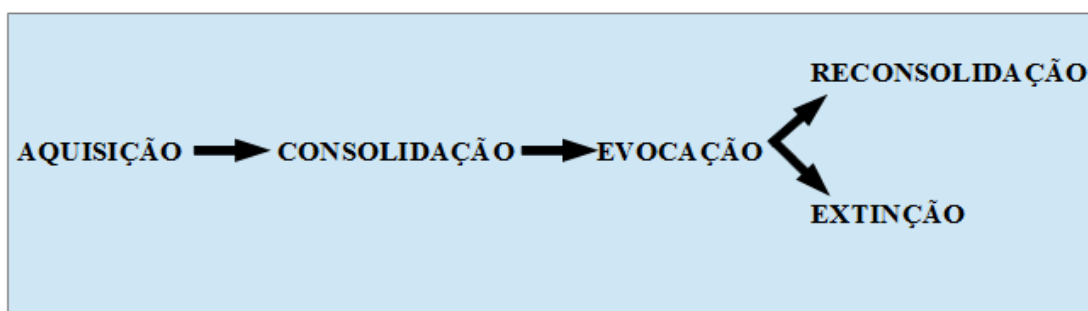


Figura 1: Esquema representativo das fases da memória

1.3. Anatomia e organização do hipocampo e do córtex medial pré-frontal

O hipocampo é um órgão situado dentro do lóbulo temporal do encéfalo e faz parte do sistema límbico, região que regula emoções (O'Keefe & Nadel, 1978; Nalloor et al., 2012). O hipocampo é associado principalmente com a navegação espacial e memória, em particular memória a longo prazo (Frankland & Bontempi, 2005; Bush et al., 2015).

A formação hipocampal do rato tem forma de “C” e está situado na parte caudal do encéfalo. Existem três sub-regiões distintas que são classificadas como: o giro denteado (DG), o hipocampo propriamente dito (que consiste em CA3, CA2 e CA1) e o subiculum. O córtex da formação hipocampal tem três camadas: molecular, polimorfa (hilo) e camada de células piramidais (Förster et al., 2006) (Figura 2). Devido à diferença na organização celular/conexão do giro denteado, este também apresenta uma classificação cortical particular: a camada ou estrato granular, o hilo e as fibras musgosas (fibras eferentes que estabelecem sinapses com células de CA3 e CA2) (Mongiat & Schinder, 2011; Scorza et al., 2005).

O córtex pré-frontal é uma estrutura envolvida na extinção do medo condicionado, estudos com lesões pré-frontais levaram a um déficit na extinção de memória aversiva (Morgan et al., 1993; Sotres-Bayon et al., 2006). Na parte ventral do córtex pré-frontal encontra-se o córtex infralímbico, que está envolvido no processamento da memória (Morgan e LeDoux 1995). Desde então, a acumulação de evidências sugeriu que a plasticidade do córtex infralímbico é importante neste tipo de processamento. Inibidores da síntese de proteínas (Santini et al., 2004), inibidores de MAPK (Hugues et al., 2004), bloqueadores dos receptores NMDA (Burgos-Robles et al., 2007) injetado localmente no córtex infralímbico prejudicaram a extinção da memória.

1.4. Rede neural do hipocampo

O hipocampo é uma estrutura localizada no lobo temporal que faz conexão direta e indireta com várias estruturas encefálicas, mantendo o funcionamento de uma rede de informações importantes para a sobrevivência do indivíduo.

As informações chegam no hipocampo através das fibras do córtex entorrinal

seguindo o seguinte circuito interno: córtex entorrinal, giro denteado, CA3, CA2, CA1, subiculum e retorna ao córtex entorrinal. Outro circuito com extensão maior é o circuito de Papez que segue a seguinte ordem: hipocampo, fórnix, corpos mamilares, núcleo anterior do tálamo, córtex cingulado, córtex temporal e hipocampo. Essas conexões permitem a formação da memória, aprendizagem, linguagem, navegação espacial comportamento motor e emocional ([Andersen et al., 2007](#)).

Porém, o hipocampo não se limita a estas conexões, existem outras aferências e eferências com amígdala, área septal, córtex orbitofrontal, córtex infralímbico e com áreas de associação envolvidos com processamento da memória e modulação emocional ([Andersen et al., 2007](#); [Rolls, 2015](#)).

Dentre todas essas redes neurais cabe ressaltar, neste trabalho, como ocorre a conexão entre o hipocampo e o córtex infralímbico. Sabe-se que o subiculum é uma das principais eferências hipocampal, feixes de fibras da parte proximal do subiculum, próximo a CA1, seguem para o córtex infralímbico. A lesão desta via leva a incapacidade de formação de novas memórias declarativas ([Figura 3](#)).

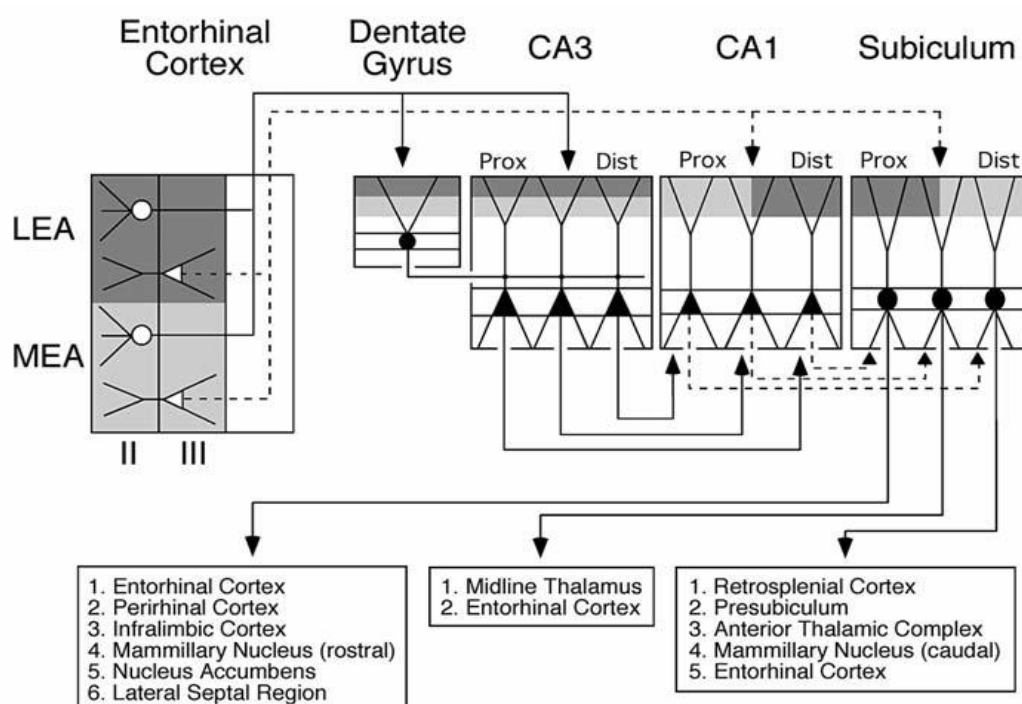


Figura 2: Rede neural do hipocampo. Resumo da organização transversal das conexões através da formação hipocampal. Esta figura destaca a possibilidade de que a informação é segregada através da formação do hipocampal fazendo conexão com várias estruturas encefálicas, inclusive o córtex infralímbico. LEA (área entorrinal lateral), MEA (área entorrinal medial). Fonte: Andersen, 2007, p. 108.

1.5. Papel do hipocampo na memória

Desde a década de 50 estudos apontam para a importância do hipocampo no processamento da memória (Milner & Penfield, 1956; Scoville & Milner, 1957; Penfield; Milner, 1958). Alguns fatores se tornaram históricos para que hoje pudéssemos denominar o hipocampo como peça chave neste quebra-cabeça. Primeiramente, a desenfreada intervenção clínica de lobotomia para indivíduos diagnosticados com disfunção cerebral mínima (agressividade, hiperatividade, distúrbio de aprendizagem, instabilidade de humor). Felizmente, essa intervenção quase não é mais utilizada devido as sequelas emocionais que provocam nos indivíduos (Freeman & Watts, 1939; Halstead et al., 1946; Hutton, 1947).

Outro caso que ajudou a ciência e entender muito a respeito da memória foi do paciente HM, Henry Gustav Molaison. Aos 9 anos de idade, ele foi diagnosticado com traumatismo craniano após uma queda da bicicleta. Em consequência deste fato, teve crises epiléticas que foram se agravando com a idade. Aos 27 anos, HM passou por um procedimento cirúrgico para remoção bilateral do hipocampo na tentativa de aliviar as constantes crises epiléticas. A cirurgia foi um sucesso, o objetivo principal foi alcançado, porém HM ficou com incapacidade de formação de novas memórias declarativas (Milner & Penfield, 1956).

Atualmente, existem cerca de 27.000 estudos científicos correlacionando memória e hipocampo. Hoje, sabe-se que esta estrutura está intrinsecamente relacionada com todas as fases de memória (Izquierdo & Medina, 1993; Lee & Kesner, 2004; Suzuki et al., 2004). Desde a década de 90 nosso laboratório estuda o papel do hipocampo na memória e aprendizado. Quillfeldt et al. (1996), verificou o efeito da microinfusão bilateral de CNQX no hipocampo e amígdala, no córtex entorrinal (CE) e no córtex parietal posterior (CPP) de ratos na tarefa de esQUIVA inibitória em diferentes tempos (1, 31 e 60 dias após o treino). O CNQX alterou a evocação da memória quando administrado no HPC e A um dia após o treino, quando administrado no CE 1 ou 31 dias após o treino, e quando administrado no CPP 1, 31, ou 60 dias após o treino. Os resultados sugerem que o HPC e amígdala estão envolvidos na expressão da memória alguns dias após a aquisição. O CE está envolvido na expressão de memória para até 31, porém inferior a 60 dias após a aquisição. O CPP e que está envolvido na expressão de memória pelo menos até 2

meses após a aquisição.

Outro estudo interessante realizado na mesma tarefa revela que o hipocampo e amígdala, córtex entorrinal e o córtex parietal atuam ativamente na consolidação e na evocação de memórias aversivas. No que diz respeito ao hipocampo e amígdala, a infusão bilateral de antagonista NMDA (AP5) ou agonista GABA A (muscimol) causou amnésia retrógrada. Além disso, a administração pré-teste de CNQX (um dia após o treino) no hipocampo e amígdala bloqueou temporariamente a evocação da memória (Izquierdo et al., 1997).

Outro estudo revela uma clara influência dos canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L no hipocampo dorsal. Infusão bilateral de 280 ng de nifedipina (antagonista de canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L) em CA1 imediatamente após o treino na esQUIVA inibitória provocou um efeito facilitatório na consolidação da memória de ratos (Quevedo et al., 1998). Além disso, verificamos que diferentes processos mnemônicos (atualização, precisão e fortalecimento da memória) mediados pela reconsolidação de uma memória de medo também dependem da ativação dos canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L no hipocampo dorsal (De Oliveira Alvares et al., 2013).

Cabe ressaltar que alterações colinérgicas através de lesão com ácido ibotênico no núcleo basal magnocelular causam alterações dos astrócitos encontrados no hipocampo de ratos provocando déficit cognitivo em ratos Wistar (Swarowsky et al., 2008; Melo e Souza, et al. 2000).

De acordo com o que foi declarado, percebe-se uma clara influência modulatória do hipocampo na aquisição, evocação, reativação e formação da memória declarativa. Por isso, nosso interesse em investigar a ação sinérgica dos sistemas endocanabinóide e colinérgico muscarínico no processamento da memória de aversiva na área CA1 do hipocampo dorsal.

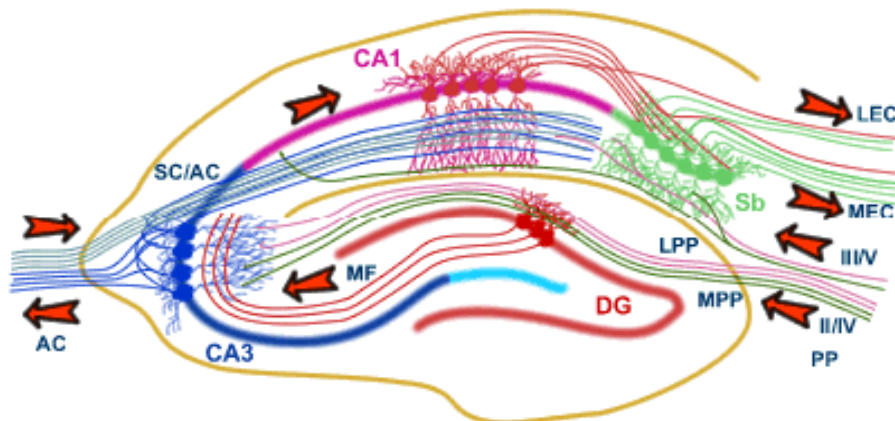


Figura 3: Formação hipocampal do rato. Circuito básico da conexão hipocampal onde a entrada (input) de informação ocorre através do córtex entorrinal (EC) estabelecendo conexão com o giro denteado (DG) e neurónios piramidais de CA3 através da via perfurante (PP). Os neurónios CA3 também recebem aferências do DG através das fibras musgosas (MF). Eles enviam axónios às células piramidais CA1 através da colateral Schaffer (SC), bem como às células CA1 no hipocampo contralateral pela via associativa comissural (AC). Os neurónios de CA1 também recebem informações da via Perfurante e enviam (output) axónios para o Subiculum (Sb). Esses neurónios, por sua vez, formam um circuito hipocampal ao fazerem sinapse com o córtex entorrinal ou seguem para áreas de associação do neocortex. LEC: córtex entorrinal lateral, MEC: córtex entorrinal medial

1.6. Papel do infralímbico na memória

Estudos indicam que o córtex pré-frontal contribui para o funcionamento de processos cognitivos que são necessários para a programação de sequências complexas de comportamento (Fuster, 2000; Miller 2000; Brown & Bowman, 2002). Em especial o córtex infralímbico que faz parte de um circuito neural que medeia os processos de consolidação e extinção da memória de medo (Quirk et al., 2006; Quirk & Mueller, 2008).

Laurent et al. (2009) usando uma abordagem optogenética, com a ativação de neurônios no IL (canal rodopsina) durante o condicionamento ao tom em diferentes fases (extinção ou teste/evocação), verificaram que ativando neurônios do IL durante a extinção ocorreu uma redução da expressão de medo fortalecendo a extinção da memória no dia seguinte. Isso sugere que a atividade IL durante a extinção da memória provavelmente facilita o armazenamento da extinção em outras estruturas.

Além disso, o córtex infralímbico provavelmente está relacionado com o processamento da memória de trabalho (Granon et al., 1994; Ragozzino & Kesner, 1998; Aultman & Moghaddam, 2001). Lesão neurotóxica no córtex pre-límbico e infralímbico não altera a aquisição da memória, a discriminação visuoespacial no labirinto em Y e a discriminação condicionada entre tom e luz. Porém, quando se exige mais discriminação no condicionamento entre tom e luz os animais com lesão apresentam dificuldade na memória de trabalho. Isso sugere que o PL-IL provavelmente estão envolvidos no planejamento das futuras respostas comportamentais com base em informação previamente adquiridos (Delatour B & Gisquet-Verrier, 1999). Cabe ressaltar que essa modulação do processamento da memória no córtex pré-frontal ocorre principalmente por uma grande influência modulatória do sistema dopaminérgico (Williams & Goldman-Rakic, 1995) e do sistema colinérgico (Dunnett et al., 1990).

1.7. Plasticidade sináptica hipocampal

Plasticidade é um processo dinâmico que se refere à capacidade que o sistema nervoso possui em mudar e se adaptar a novas mudanças ambientais. Após a aprendizagem de uma memória declarativa, ocorrem modificações nas atividades

sinápticas acarretando uma potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo. O aumento sustentado da força sináptica provocada por uma estimulação de alta frequência nas fibras aferentes excitatórias hipocámpais permite a propagação LTP.

As informações chegam ao hipocampo através do córtex entorrinal, pela via perfurante, que faz sinapse com o giro denteado. Os axônios das células granulares do giro denteado formam as fibras musgosas que fazem sinapse com CA3. Em seguida, as células piramidais de CA3 se ramificam e formam feixes de axônios, chamado colateral de Schaffer, que seguem para CA1. Além disso, feixes das células piramidais de CA3 podem deixar o hipocampo através do fórnix (Izquierdo, 2002). Estímulos elétricos na colateral de Schaffer podem provocar uma LTP podendo durar muitas horas, semanas e, acredita-se que até por toda a vida, assim como as memórias declarativas (Miller & Mayford, 1999).

A maioria das sinapses excitatórias cerebrais é glutamatérgica. Existem vários tipos de receptores de glutamato, tais como: AMPA, Cainato, NMDA e metabotrópicos (Genoux & Montgomery, 2007). Após a liberação de glutamato na fenda sináptica, principalmente os receptores do tipo AMPA são ativados, permitindo a entrada de íons Na^+ , acarretando uma despolarização no neurônio pós-sináptico. A despolarização promove a saída do íon Mg^{+2} dos canais ionotrópicos dos receptores NMDA, que permite a passagem do Ca^{+2} e mais Na^+ (Burnashev, 1992). O aumento de Ca^{+2} no meio intracelular ativa várias enzimas, tais como: a proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase dependente de Ca^{+2} -calmodulina do tipo 2 (CaMKII). Essas proteínas cinases fosforilam uma série de proteínas; por exemplo, elas podem ativar os receptores AMPA e estimular a inserção desses receptores na membrana pós-sináptica. Esse mecanismo é fundamental para que ocorra a LTP, um tipo de plasticidade que pode contribuir para a formação de memórias declarativas (Shifman et al., 2006). Além disso, a proteína cinase A, a qual depende da ativação da adenilato ciclase que catalisa a conversão de ATP em AMPc, fosforila a proteína CREB encontrada no núcleo da célula, que ativa vários loci gênicos e induz a síntese de RNAm de uma série de proteínas que são usadas posteriormente para constituir novos receptores, o que também contribui para a efetividade da LTP (Wang et al., 2006). (Figura 4).

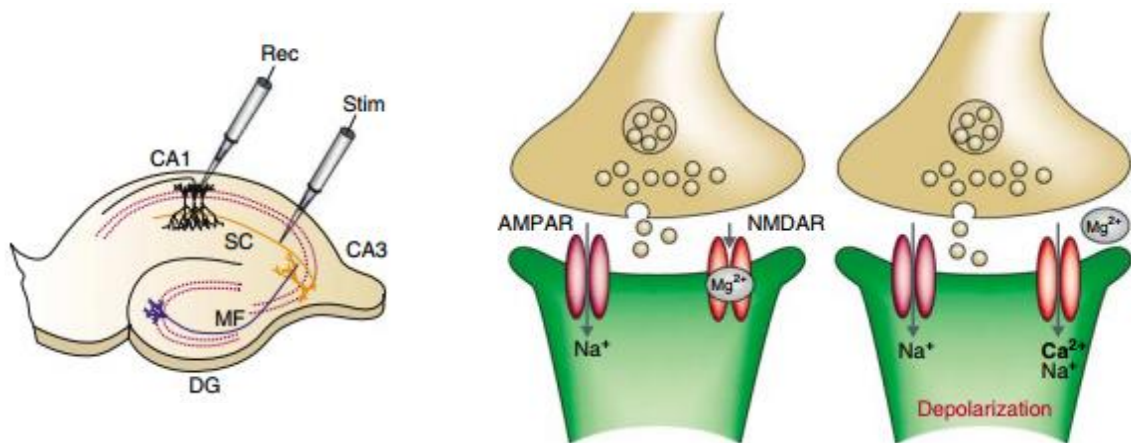


Figura 4: Plasticidade sináptica, potenciação de longa duração: (A) diagrama esquemático demonstrando as regiões CA1, CA3 e giro dentado (DG). (SC = colateral de Schaffer, MF= fibra musgosa) e os posicionamentos dos eletrodos para estudar a plasticidade sináptica hipocampal (Stim= eletrodo de estimulação, Rec=eletrodo de registro). (B) Modelo de transmissão sináptica nas sinapses excitatórias, onde o glutamato libertado sinápticamente liga-se tanto o NMDA como os AMPARs. O Na^+ flui através do canal do AMPAR, mas não através do canal do NMDAR por causa do bloqueio do Mg^{2+} . A despolarização da célula pós-sináptica abre os canal NMDA permitindo o influxo de Na^+ e Ca^{2+} . O aumento resultante de Ca^{2+} pós-sináptica é necessário para desencadear os eventos subsequentes que conduzem à plasticidade sináptica, bem como LTP. (Citri, A & Malenka, RC, 2008).

1.8. Sistema endocanabinóide e memória

O sistema endocanabinóide é um sistema de sinalização endógena que atua em várias funções do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), por exemplo, na emoção, controle alimentar, nas funções motoras, entre outros (Ameri, 1999). Os receptores CB1 e CB2 são do tipo metabotrópicos encontrados no SNC (Howlett et al., 2002), sendo que o mais abundante é o receptor CB1, e estão acoplados a uma proteína Gi/o. Quando o neuromodulador se liga neste receptor, ativa-se a Proteína G. Esta inibe a atividade da adenilato-ciclase e, conseqüentemente, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem ficam fechados. Além disso, a proteína G pode ativar a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), que atua sobre os canais de K^+ permitindo sua abertura para o fluxo de íons (McAllister et al., 2002). (Figura 5)

Os endocanabinóides são pequenas moléculas lipídicas derivadas de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, principalmente do ácido araquidônico. A anandamida e 2-AG são sintetizados a partir de fosfolipídios de membrana em neurônios pós-sinápticos, sendo o aumento de cálcio intracelular o fator desencadeante, da ação das enzimas N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) e diacilglicerol lipase (DAG lipase).

A hidrolização da anandamida ocorre através das enzimas ácido graxo amida hidrolase (FAAH) e do 2-AG pela monoacilglicerol lipase (MAG Lipase). Os endocanabinóides agem localmente e são produzidos sob demanda (Di Marzo et al., 1998). Em preparações de hipocampo, mostrou-se que os canabinóides, atuando através dos receptores CB1, inibem a liberação de glutamato (Shen et al., 1996), acetilcolina (Gifford et al., 1997) e noradrenalina (Schlicker et al., 1997).

Considerando-se a circuitaria local da região-alvo, a área CA1 do hipocampo dorsal, acredita-se que após o treino do CAC ocorra um aumento da síntese de endocanabinóides na membrana pós-sináptica dos neurônios piramidais (Wilson & Nicoll, 2002) que, por sua vez, atuando como mensageiros retrógrados se ligariam a receptores CB1 nos terminais pré-sinápticos, seja de neurônios GABAérgicos, seja de glutamatérgicos (Katona et al., 2000; Kawamura et al., 2006). Os receptores CB1 localizados nos axônios terminais da colateral de Schaffer no hipocampo inibem a liberação de glutamato em neurônios piramidais CA1 (Hoffman et al., 2010), e esta

talvez seja a causa do efeito amnésico, tanto na consolidação, quanto na evocação da memória.

Trabalhos anteriores em nosso laboratório investigaram o papel dos receptores canabinóides CB1 no hipocampo dorsal de ratos, na formação e evocação de memórias aversivas e não-aversivas, bloqueando uma possível ação fisiológica dos endocanabinóides (De Oliveira Alvares et al, 2005, 2008 a, b), incluindo-se a demonstração de que a mesma concentração de AM251 que foi amnésica, foi capaz de bloquear a indução de potenciação de longa duração no hipocampo dorsal (De Oliveira Alvares et al, 2006).

Na tabela 1, aparecem alguns resultados incluindo os dados da controversa anandamida. Note-se que a infusão de anandamida exógena (De Oliveira Alvares et al, 2008a) não produz efeitos “exatamente opostos” aos do antagonista AM251, particularmente no momento da evocação da memória, mas é perfeitamente complementar nas demais fases: consolidação, reconsolidação e extinção. Isso se deve provavelmente à inespecificidade desse ligante para com os receptores CB1, uma vez que também se liga a vários outros alvos causando efeitos os mais diversos.

A anandamida liga-se aos receptores NMDA (Hampson et al., 1998), Muscarínicos – inclusive M4 (Zygmunt et al., 1999; Christopoulos & Wilson, 2001; Lau & Vaughan, 2008), baunilhóides / TRPV1 (Di Marzo et al., 2001; Ross et al., 2001), e é possível que também atue como um bloqueador neurotrófico (Sancho et al., 2003) e/ou modulador do transporte da glicina (Pearlman et al, 2003). Tal inespecificidade poderia explicar a ausência de efeito na evocação, porém como esta etapa possui mecanismos endógenos diferenciados (Szapiro et al., 2002), isso ainda precisa ser melhor investigado. A anandamida também não teve efeitos sobre memórias menos aversivas como a da habituação ao campo aberto (De Oliveira Alvares et al, 2008 a, b). O conjunto de estudos que realizamos diferencia-se dos de outros autores principalmente pelo fato de os fármacos terem sido infundidos intrahipocampalmente: a quase totalidade dos estudos anteriores foi realizada com tratamentos sistêmicos e, quando estudados intracerebralmente, empregou-se um antagonista menos seletivo que o AM251 ($K_i = 7.49$ nM; Gatley et al., 1996), o SR141716A ($K_i = 11.5$ nM), que, na verdade, é um agonista inverso (Landsman et al., 1997).

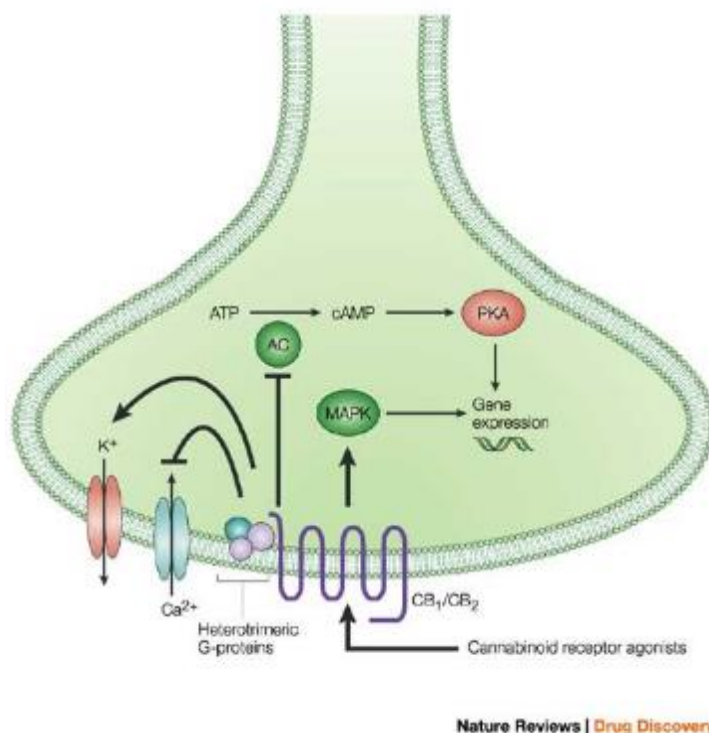


Figura 5: Mecanismo de ação do endocanabinóide sobre o receptor CB1: ativação do receptor canabinóide por agonistas ativa proteínas heterotriméricas Gi/o acarretando à inibição da adenilato ciclase (AC) que inativa a Proteína quinase A (PKA), ou a proteína quinase activada por mitogénio (MAPK) causando o fechamento dos canais de Ca²⁺.

Durante a evocação o traço de memória é labilizado, podendo encaminhar-se para dois destinos diferentes (e antagônicos) conforme o tempo de exposição: exposições curtas (de 3 a 5 min) levam à reconsolidação do traço, com eventuais modificações do mesmo, enquanto que exposições mais prolongadas (de 25 a 40 min) levam à extinção do traço; ambos processos envolvem síntese proteica de novo (Bustos et al., 2009; Debiec et al., 2002; Pedreira and Maldonado, 2003; Boccia et al., 2004, 2007; Suzuki et al., 2004; Tronson and Taylor, 2007). Ou seja, a evocação da memória não é um processo passivo, mas recruta diversas cascatas bioquímicas para “decidir” o rumo dessa memória recém-evocada. O envolvimento dos endocanabinóides com a extinção da memória, especialmente das aversivas, é bem conhecido (Varvel et al., 2005; Suzuki et al., 2004; Marsicano et al., 2002). Já sobre a reconsolidação, sabemos menos, e os resultados, em geral de estudos sistêmicos, chegam a ser contraditórios (Suzuki et al., 2004; Kobilov et al., 2007; Lin et al., 2006). De Oliveira Alvares et al (2008a) encontraram sobre a reativação da memória, que AM251 facilitou (e anandamida bloqueou) a reconsolidação, mas AM251 bloqueou (e anandamida facilitou) a extinção da memória do Condicionamento Aversivo Contextual (De Oliveira Alvares et al, 2008a).

Já realizamos alguns estudos preliminares em eletrofisiologia *ex vivo* (em fatias de hipocampo) onde pudemos verificar o bloqueio da indução da potenciação de longa duração (LTP) em CA1 (com estímulo tetânico na via perfurante) com a infusão de AM251 (De Oliveira Alvares et al., 2006): a LTP tem uma longa história como candidato a (ou modelo de) mecanismo de formação de memória (Izquierdo & Medina, 1993; Lamprecht & LeDoux, 2004), especialmente no hipocampo, uma estrutura sabidamente essencial para a formação da memória: os endocanabinóides são um dentre vários sistemas endógenos que modulam este tipo de evento plástico.

Recentemente Sachser et al. (2015) estudaram a influência dos receptores CB1 no processamento da memória emocional no córtex retrosplenial (CRS). Para isso, animais foram treinados no CAC e receberam microinfusão de AM251 (11 ug/ul) ou CP55,940 (5 ug/ul) no CRS pós-treino, pós-reconsolidação e pré-extinção. Verificaram que o sistema endocanabinóide atua no processamento da consolidação, reconsolidação e extinção da memória no CRS e esta modulação é semelhante ao que ocorre no hipocampo através dos receptores CB1, sugerindo que pode haver uma função moduladora geral do sistema endocanabinóide no

processamento da memória emocional em outras áreas corticais.

Compreender o papel dos receptores CB1 de diferentes estruturas no processamento de memória e suas bases biológicas é muito importante pois além de se tratar de um sistema proeminente e difundido de receptores no SNC, pouco se sabe acerca de suas funções em cada estrutura, em particular o que fazem na mediação dos efeitos cognitivos da *Cannabis*.

1.9. Modulação muscarínica colinérgica M4 e memória

Embora se conheçam 5 genes que codificam os receptores muscarínicos, respectivamente denominados m1, m2, m3, m4 e m5, somente dispomos de agentes farmacológicos capazes de distinguir três subtipos, M1, M2 e M3, e estes, além de serem pouco seletivos, não são de emprego fácil em estudos funcionais que visem elucidar os papéis específicos de cada subtipo ([Jerusalinsky et al., 1998](#)). Os anticorpos subtipo-específicos existentes, por sua vez, ligam-se geralmente a regiões intracelulares dos receptores, o que, embora permita um estudo qualitativo de distribuição de receptores em fatias permeabilizadas de tecido, não viabiliza estudos funcionais ([Jerusalinsky et al., 1998](#)). Toxinas de origem natural têm se mostrado muito úteis na descoberta de novas drogas e fármacos, mas também podem ser úteis em etapas mais precoces do estudo de novas drogas, ajudando a identificar alvos terapêuticos em potencial, quase sempre devido a sua vocação de alta especificidade / seletividade por subtipos particulares de receptores e canais iônicos. Quando combinada com sua alta potência (e, por vezes, a uma ação virtualmente “irreversível”, duradoura), toxinas seletivas podem ser decisivas em estudos funcionais onde se investiga os papéis fisiológicos ou patofisiológicos deste ou daquele receptor ou canal iônico ([Jerusalinsky et al., 1998; 2000](#)).

As chamadas *toxinas muscarínicas* foram encontradas nas mambas verdes (*Dendroaspis angusticeps* – Figura 6), serpentes africanas cujo veneno apresentava componentes colinomiméticos ([Harvey & Karlsson, 1980](#)). Dentre as primeiras toxinas isoladas daquelas serpentes estavam as *fasciculinas*, potentes inibidores da acetilcolinesterase ([Rodríguez-Ithurralde et al., 1983](#)) e as *dendrotoxinas* ([Harvey & Karlsson, 1984](#)). [Quillfeldt et al., \(1990,1991\)](#), estudaram os efeitos comportamentais da *fasciculina-2* administrada no hipocampo, amígdala e septo de ratos ([Quillfeldt et](#)

al., 1990 e 1991). Duas frações proteicas isoladas em 1988 (Adem et al.), denominadas MT1 e MT2 (de “muscarinic toxins”), deslocavam a ligação do antagonista muscarínico 3H-QNB em córtex cerebral de ratos; contudo, como a diminuição do “binding” de QNB era somente parcial (cerca de 50%), tanto na presença de MT1, quanto na de MT2, supôs-se que as mesmas talvez se ligassem apenas a alguns subtipos do receptor muscarínico (Jerusalinsky et al., 1992). Em seguida, Jerusalinsky et al., (1989) isolaram estas proteínas com propriedades muscarínicas, mais tarde identificadas como sendo exatamente a MT1 e a MT2.

Enquanto isso, Karlsson (1991) e seus colegas na Suécia continuaram isolando diferentes proteínas de peso molecular semelhante (ao redor de 7 KDa) e de ação muscarínica (Jolkkonen et al., 1995; Jerusalinsky et al., 1997). Algumas foram sequenciadas, como é o caso da MT1, da MT2 e da MT3 ou m4-toxina (Max et al., 1993 a,b; Liang et al., 1996), da MT4 (Vandermeers et al., 1995) e também da MT7, uma isotoxina da m1-toxina de Potter (Max et al., 1993a, Potter et al., 1996). Todas estas toxinas são relativamente semelhantes quanto à posição de seus oito resíduos cisteína, o que implica - em princípio - em um padrão similar de distribuição de pontes dissulfeto e, portanto, estruturas tridimensionais similares. A primeira estrutura completamente determinada foi a da MT2, mediante o emprego de ressonância magnética nuclear e modelagem molecular (Ségalas et al., 1995), mostrando ser pertencente ao grupo das toxinas de “três-dedos” (*three-fingered toxins*) com três alças ricas em β -estruturas unidas a um núcleo globular com quatro pontes dissulfeto (*ibidem*). Dos 13 aminoácidos comuns às α -neurotoxinas curaremiméticas extraídas do mesmo veneno - postuladas como sendo o “sítio” que se liga ao receptor nicotínico -, somente dois estão presentes na sequência da MT1 ou da MT2 (Ducancel et al., 1991; Karlsson et al., 1991). A MT1 e a MT2 são incomuns quanto ao fato de ambos serem agonistas dos receptores M1 e também por atuarem - possivelmente como antagonistas - sobre os receptores M4 (Jerusalinsky & Harvey, 1994; Kornisiuk et al., 1995a, b): MT1 tem mais ou menos a mesma afinidade por ambos receptores, enquanto que MT2 é quatro vezes mais seletiva para M1 que para M4; ambos bloqueiam os receptores M4, mas MT2 só o faz em altas concentrações.

Comparadas com outros agentes colinérgicos conhecidos, estas toxinas exibem as maiores especificidades em termos de ação farmacológica: a m1-toxina

(ou MT7) bloqueia seletivamente os receptores M1, enquanto que a m4-toxina (ou MT3) bloqueia os receptores M4. A MT3 é, até hoje, o mais seletivo antagonista disponível para bloquear especificamente receptores M4, sendo 214 vezes mais seletivo para M4 que para M1 e quase nenhuma afinidade pelos demais subtipos (Olianas et al., 1997). A MT3 (ou m4-toxina) tem sido proposta como um antagonista de receptores muscarínicos centrais porque antagoniza a ação inibitória da acetilcolina sobre a adenil ciclase previamente estimulada por forskolina ou por dopamina (Olianas et al., 1997).

Estudos de distribuição de receptores foram feitos com emprego do antagonista muscarínico 3HNMS como “repórter” da ligação de MT2 e MT3, permitindo mapear os sítios de receptores M1 e M4 (Jerusalinsky et al., 1989, 1992, Kornisiuk et al., 1995a,b). Consistentemente com as evidências comportamentais, confirmou-se, por exemplo, a presença de receptores M4 em áreas do cérebro associadas com aprendizagem e memória (Harvey et al., 1998). No córtex cerebral todos os subtipos de receptores são expressados, com destaque para M1 (Cortés & Palacios, 1986; Frey & Howland, 1992), enquanto que em tronco cerebral, pobre em receptores muscarínicos, predomina M2 (Frey & Howland, 1992). Na formação hipocampal de ratos predominam M1 e M4 (Yasuda et al., 1993; Wall et al., 1991) e o estriado mostrou-se a região mais rica em M4 (Boulai et al., 1996). Os experimentos com MT3 sugerem níveis de receptores M4 que, em geral, estão de acordo com as distribuições supramencionadas obtidas com outros métodos (Jerusalinsky et al., 1998). Concentrações similares de receptores M4 são encontradas no córtex frontal e em CA3 do hipocampo, seguida por concentrações intermédias em CA1 e Giro Denteado (Jerusalinsky et al., 1998). Assim, embora tanto M1 quanto M4 estejam muito bem representados na área hipocampal, há diferenças claras entre as sub-regiões.

A memória pode ser facilitada ou bloqueada por diversos tipos de tratamentos, particularmente pela administração de agentes farmacológicos após o treino. O envolvimento do sistema colinérgico na modulação da memória já é um tema clássico (Russell, 1982; Bartus et al., 1987; Izquierdo, 1989). Drogas que prolongam a ação da acetilcolina mediante a inibição da enzima acetilcolinesterase, por exemplo, podem melhorar a memória, mas podem, também, enfraquecer memórias fortes devido ao excesso do neurotransmissor (Ellis & Kesner, 1981). Na doença de

Alzheimer observa-se grande extensão de perda celular no núcleo basal de Meynert, origem das principais aferências colinérgicas ao córtex e à amígdala (Whitehouse et al., 1986). A ativação de mecanismos colinérgicos muscarínicos parece melhorar a memória: baixas doses de inibidores da colinesterase como a fisostigmina (Stratton & Petrinovich, 1963; Introini-Collison & McGaugh, 1988) e agonistas muscarínicos (Introini-Collison & Baratti, 1992) facilitam a memória, enquanto antagonistas muscarínicos geralmente induzem amnésia (Introini-Collison & Baratti, 1992; Whishaw et al., 1985). Tais efeitos foram observados em diferentes tarefas comportamentais como a esQUIVA INIBITÓRIA (Introini-Collison & McGaugh, 1988), esQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS (Flood et al., 1981), aprendizado espacial (Decker & Gallagher, 1987) ou reforço alimentar (Stratton & Petrinovich, 1963). A participação do sistema colinérgico das regiões septal, hipocampal e basal-amígdalar são vitais na modulação de memórias em formação (McGaugh, 1988).

Estudos comportamentais em ratos com infusão de MT1, MT2 e MT3 (por exemplo, Jerusalinsky et al., 1993, 1995) verificaram-se que a MT2 se comporta de forma semelhante ao agonista muscarínico oxotremorina quando injetado no hipocampo dorsal de ratos após o treino, causando uma *facilitação da memória* para a tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA, efeito este reversível com a administração concomitante de escopolamina, o que atesta sua especificidade colinérgica (Jerusalinsky et al., 1995). Assim, quando injetada no hipocampo dorsal de ratos, a MT3 foi amnésica, prejudicando o desempenho dos animais, sugerindo que a participação dos receptores M4 locais é essencial na consolidação (Jerusalinsky et al., 1998; Ferreira et al., 2003) e na evocação (Diehl et al., 2007) de memórias aversivas. Resultados preliminares com a infusão dessas toxinas na amígdala (dados não publicados da dissertação de Gaieski, 2000), sugerem a ausência de efeito da MT1 e MT2, e um pronunciado efeito facilitatório da MT3, contrariando o obtido no hipocampo e sugerindo diferenças entre a circuitaria-alvo na amígdala e no hipocampo que merecem um estudo mais cuidadoso. A MT3 não teve qualquer efeito sobre a memória da Habituação ao campo aberto, tarefa pouco aversiva, nem na consolidação, nem na evocação da memória (Ferreira et al., 2001; Diehl et al., 2007).

Assim, o papel dos receptores M4 na memória começa a ser desvendado e é promissor: Mulugeta (2003) demonstrou-se que os receptores M4 são perdidos em

pacientes com Alzheimer. Mais recentemente, demonstramos que a inibição muscarínica da adenilato ciclase estimulada por foskolina, no hipocampo e no estriado, deve-se principalmente à mediação pelos receptores M4 (Sánchez et al., 2009a), além de termos mostrado um papel importante dos receptores M4 no controle da plasticidade sináptica que ocorre nas sinapses das colaterais de Schaffer que chegam em CA1 (Sánchez et al., 2009b).



Figura 6: Mamba-verde-oriental (*Dendroaspis angusticeps*) é uma serpente arborícola, nativa do sudeste de África que produz a toxina MT3.

1.10. Interações entre os Sistemas Endocanabinóide e Colinérgico Muscarínico

A modulação endocanabinóide hipocampal empregando, entre outros fármacos, o antagonista CB1 bastante seletivo, AM251 (de Oliveira Alvares et al., 2005, 2006, 2008 a,b), e a modulação colinérgica muscarínica empregando agonista seletivo M4, MT3 (Ferreira et al., 2003, Christopoulos & Wilson, 2001) nos revelou uma grande surpresa quando ambos os sistemas parecem ter em comum (ver tabela 1, abaixo).

Fármaco / Sistema	Condicionamento Aversivo ao Contexto		Hab. ao Campo Aberto
	Antagonista CB1 (AM251 bloqueia tônus endocanabinóide)	Antagonista M4 (MT3 bloqueia tônus colinérgico endógeno)	AM251 ou MT3
pós-treino (fase de consolidação)	↓*	↓*	⊘
Pré-teste (fase de evocação)	↑*	↑*	⊘
pós-reativação (de 3min) (fase de reconsolidação)	↑	↑**	-
pós-reativação (de 20min) (fase de extinção)	↓	↓**	-

(*) mesmos resultados também na tarefa de Esquiva Inibitória; (**) Dados sendo publicados (Diehl et al., 2009)

OBS.: ↓ = efeito amnésico; ↑ = efeito facilitatório; ⊘ = sem efeito

Tabela 1

A literatura sugere diversos pontos de conexão entre ambos subsistemas modulatórios, a começar pela descoberta da associação entre a modulação muscarínica M2/M4 e a sinalização endocanabinóide (Lau & Vaughan, 2008; Liu *et al.*, 2009). A anandamida, o primeiro ligante endógeno descoberto para os receptores CB1, é conhecida por sua inespecificidade (Zygmunt *et al.*, 1999), e parece inclusive ligar-se diretamente aos próprios receptores muscarínicos, com predileção pelo subtipo M4 (Christopoulos e Wilson, 2001; Lagalwar *et al.*, 1999). Do ponto de vista neuropsicofisiológico, seria muito interessante demonstrar a existência de uma efetiva intercomplementariedade funcional entre esses dois sistemas modulatórios. Neste trabalho nos aprofundamos a estudar possíveis interações entre ambos subsistemas modulatórios, bem como tentar compreender melhor sua natureza fisiológica e sua posição citoarquitetônica. Até o momento, nossos resultados nestas duas linhas temáticas que desenvolvemos em neurofarmacologia comportamental da memória apontam para o seguinte cenário:

- considerando-se que memórias aversivas (EI e CAC) são moduláveis pelos receptores muscarínicos colinérgicos M4 no hipocampo dorsal de ratos (Diehl *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2003; Jerusalinsky *et al.*, 1998);
- considerando-se que o mesmo se dá por ação de endocanabinóides, posto que fármacos seletivos para os receptores CB1 afetam diferentes fases do processamento da memória (de Oliveira Alvares *et al.*, 2005, 2008a,b);
- considerando-se que – em que pese serem neurotransmissores muito diferentes quanto a sua natureza química, origem e liberação - ambos receptores, M4 e CB1 são metabotrópicos, inibitórios, e predominantemente (mas nem sempre) localizados em regiões pré-sinápticas, operando normalmente para inibir a liberação dos neurotransmissores da sinapse que controlam (Jerusalinsky *et al.*, 1995; Ameri, 1999; Van der Zee & Luiten, 1999; Wilson & Nicoll, 2002; Marsicano *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2009a,b);
- considerando-se que, em ambos os casos os fármacos seletivos foram efetivos em diferentes tarefas aversivas (EI e CAC), mas mostraram-se incapazes de afetar

memórias de caráter menos aversivo, como da habituação ao campo aberto (Diehl et al, 2007, Ferreira et al., 2003 e de Oliveira Alvares et al., 2005, 2008a);

- e, por fim, considerando-se que as diferentes fases do processamento da memória são afetadas de forma muito parecida por estes dois sistemas (de Oliveira Alvares et al., 2008 a,b; Diehl et al, 2007; Ferreira et al., 2003), como na tabela abaixo:

Fármaco / Sistema	Condicionamento Aversivo ao Contexto	
	Antagonista CB1 (AM251 bloqueia tônus endocanabinóide)	Agonista CB1 (Anandamida exógena)
pós-treino (fase de <i>consolidação</i>)	↓	↑
Pré-teste (fase de <i>evocação</i>)	↑	⊘
pós-reativação (de 3min) (fase de <i>reconsolidação</i>)	↑	↓
pós-reativação (de 20min) (fase de <i>extinção</i>)	↓	↑

OBS.: ↓ = efeito amnésico; ↑ = efeito facilitatório; ⊘ = sem efeito

Tabela 2

Dado exposto, percebe-se que *ambos subsistemas* – o endocanabinóide/CB1 e o colinérgico/M4 – *podem ter um papel similar*, pelo menos no hipocampo dorsal de ratos e no contexto cognitivo de processamento de memórias aversivas. Isso levanta uma série de questões específicas, todas testáveis empiricamente, se há um efeito sinérgico entre esses dois sistemas. Além disso, será que esses sistemas são afetados por propriedades plásticas nas células do CA1 do hipocampo dorsal (pulsos pareados, LTP) com a coadministração de MT3 e CP55,940.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

A partir de resultados anteriores, este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da microinfusão do agonista do receptor CB1 - CP55,940 - no hipocampo dorsal ou no córtex infralímbico sobre processamento da memória aversiva. Além disso, verificar o efeito sinérgico entre os sistemas endocanabinoide CB e colinérgico muscarínico M4 na consolidação de memória aversiva buscando confirmar as modulações entre ambos no hipocampo dorsal de ratos.

2.1.1. Objetivo específico do capítulo 1

1. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal **pós-treino** de diferentes concentrações de CP55,940 na tarefa de CAC - Condicionamento Aversivo ao Contexto (curva dose-resposta);
2. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal **pós-treino** de concentração efetiva de CP55,940 concomitante a uma concentração sem efeito próprio de AM251 na tarefa de CAC;
3. Verificar os efeitos da administração no córtex infralímbico do agonista CP55,940 sobre a reconsolidação da memória no modelo de condicionamento aversivo contextual
4. Verificar os efeitos da administração intrahipocampal do agonista CP55,940 sobre a reconsolidação da memória no modelo de condicionamento aversivo contextual

2.1.2. Objetivo específico do capítulo 2

1. Verificar o efeito da infusão concomitante das concentrações sem efeito próprio de CP55,940 e MT3 na tarefa de CAC;
2. Estudar os efeitos de fármacos canabinóides e colinérgico muscarínico sobre a indução e manutenção da Potenciação de longa duração *in vivo*.

3. Resultados

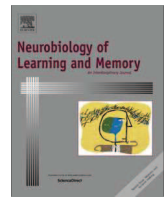
Capítulo I

Artigo: "Involvement of the infralimbic cortex and CA1 hippocampal area in reconsolidation of a contextual fear memory through CB1 receptors: effects of CP55,940."



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme

Rapid Communication

Involvement of the infralimbic cortex and CA1 hippocampal area in reconsolidation of a contextual fear memory through CB1 receptors: Effects of CP55,940



Fabiana Santana^{a,c}, Rodrigo O. Sierra^{a,c}, Josué Haubrich^{a,c}, Ana Paula Crestani^{a,c},
 Johanna Marcela Duran^{a,c}, Lindsey de Freitas Cassini^{a,c}, Lucas de Oliveira Alvares^{b,c}, Jorge A. Quillfeldt^{a,c,*}

^a Psychobiology and Neurocomputing Lab, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Neurobiology of Memory Lab, Biophysics Department, Biosciences Institute, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^c Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2015

Revised 9 November 2015

Accepted 28 November 2015

Available online 10 December 2015

Keywords:

Infralimbic cortex

Hippocampus CA1 area

Memory reconsolidation

Contextual fear conditioning

CP55,940

ABSTRACT

The endocannabinoid system (ECS) has a pivotal role in different cognitive functions such as learning and memory. Recent evidence confirm the involvement of the hippocampal CB1 receptors in the modulation of both memory extinction and reconsolidation processes in different brain areas, but few studies focused on the infralimbic cortex, another important cognitive area. Here, we infused the cannabinoid agonist CP55,940 either into the infralimbic cortex (IL) or the CA1 area of the dorsal hippocampus (HPC) of adult male Wistar rats immediately after a short (3 min) reactivation session, known to labilize a previously consolidated memory trace in order to allow its reconsolidation with some modification. In both structures, the treatment was able to disrupt reconsolidation in a relatively long lasting way, reducing the freezing response. To our notice, this is the first demonstration of ECS involvement in reconsolidation in the Infralimbic Cortex. Despite poorly discriminative between CB1 and CB2 receptors, CP55,940 is a potent agent, and these results suggest that a similar CB1-dependent circuitry is at work both in HPC and in the IL during memory reconsolidation.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Converging evidence from several studies does not cease to provide consistent support to a pivotal role for the endocannabinoid system (ECS) in different cognitive processes, with emphasis in learning and memory (e.g., Basavarajappa, Nagre, Xie, & Subbanna, 2014; Quillfeldt & de Oliveira Alvares, 2015, chap. 3; Ratano, Everitt, & Milton, 2014). CB1 receptors are widely expressed throughout the brain, with significant levels expressed in areas such as the dorsal hippocampus, the basolateral amygdala and the prefrontal cortex, all involved in learning and memory processes (Herkenham et al., 1990; Marsicano & Kuner, 2008). Endogenous cannabinoids such as anandamide (AEA) or 2-AG, synthesized on demand, act as retrograde modulators of GABA and Glutamate transmission, inhibiting their release inhibit

neurotransmitter release by a retrograde action (Katona & Freund, 2012; Kortleven, Fasano, Thibault, Lacaille, & Trudeau, 2011; Szabó et al., 2014).

A considerable amount of evidence indicates that previously consolidated memories can become labile/unstable after retrieval under certain “boundary” conditions: a reactivation session consisting of a short-lasting re-exposition to the training context, in the absence of the unconditioned stimulus, allows for the memory trace to become susceptible again to pharmacological and behavioral disruption, undergoing a subsequent re-stabilization process known as reconsolidation (Duvarci & Nader, 2004). However, when this reactivation session is prolonged beyond a certain critical period, a different process takes place, with the creation of a new trace where the conditioned response has a decreased expression – a process called extinction (Bouton, Westbrook, Corcoran, & Maren, 2006; De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, Molina, & Quillfeldt, 2008; Myers & Davis, 2007; Pedreira & Maldonado, 2003).

Previous findings from our lab show that the administration of the agonist/endogenous CB1 ligand AEA into the hippocampus impaired memory reconsolidation, while the selective CB1

* Corresponding author at: Psychobiology and Neurocomputing Lab, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 216, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail address: quillfe@ufrgs.br (J.A. Quillfeldt).

antagonist AM251 enhanced it (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, Molina, et al., 2008). Both drugs were also effective upon extinction – when infused after a longer, 25 min re-exposure session – however, with remarkable “opposite” effects: AEA facilitated and AM251 impaired extinction (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, Molina, et al., 2008).

Effects are not usually that clear when the endogenous ligand anandamide is the drug of choice, since it is difficult to estimate endogenous levels and predict the consequences of the unavoidable fact that they will *pool* with the exogenously administered quantity (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008). Despite AM251 having a clearcut effect – amnesic upon memory consolidation and facilitatory upon retrieval – AEA was facilitatory upon consolidation and had no effect upon retrieval (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008). This may be due, at least in part, to the fact that anandamide also acts as a TRPV1 endogenous ligand (Ross, 2003). Indeed, a detailed study from our lab revealed some involvement of the endovanilloid system in memory modulation, but only when strong aversive stimulus (shock) is present: TRPV1 antagonist capsazepine was able to impair memory consolidation, while the agonist capsaicin did not affect any of two different aversive tasks (Genro, de Oliveira Alvares, & Quillfeldt, 2012).

Recent reports have suggested that endocannabinoid CB1 receptors in the infralimbic cortex (IL), located in the ventromedial region of the prefrontal cortex, may have an important role in the extinction of fear memories: the infusion of the CB1 agonist WIN55212-2 (Lin, Mao, Su, & Gean, 2009), or the CB1 antagonist cannabidiol (Do Monte, Souza, Bitencourt, Kroon, & Takahashi, 2013) into the IL was shown to facilitate fear memory extinction in rats: despite being a poorly selective indirect CB1 antagonist, cannabidiol is known to potentiate the effects of agonists, and in this work, its effect was blocked by rimonabant, suggesting a CB1-mediated action.

From a therapeutic point of view, extinction has been employed to suppress maladaptive memories, but not without its limitations: the progressive decay of emotional response obtained usually do not last and fear response is (spontaneously) recovered over time (Liu et al., 2014; Revillo, Paglini, & Arias, 2014; Schiller et al., 2008). Since memory reconsolidation seems able to modify the original memory trace and different reports suggest that pharmacological and behavioral inhibition of the reconsolidation process prevent the re-expression of the previously consolidated emotional memories, reconsolidation seems quite promising in clinical terms (Schiller et al., 2010; Yang, Huang, & Hsu, 2011). The endocannabinoid system has also been proposed as a promising therapeutic target for drugs devised to decrease the impact of maladaptive memories such as those verified in PTSD – post-traumatic stress disorder (De Carvalho, Pamplona, Cruz, & Takahashi, 2014; Ratano et al., 2014), despite – to this point – clinical trials having been mostly inconclusive (Bucherelli, Baldi, Mariottini, Passani, & Blandina, 2006; Gazarini, Stern, Piornedo, Takahashi, & Bertoglio, 2014; Lee & Flavell, 2014).

The aim of this study was to verify the effect of the cannabinoid agonist CP55,940, when infused either into the IL cortex, or into the CA1 area of the dorsal HPC after a reactivation session of a contextual fear conditioning.

2. Materials and methods

One hundred twenty-one Wistar rats (270–320 g) from our breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages, four to five per cage, under a 12 h light/dark cycle and at a constant temperature of 24 ± 1 °C, with water and food *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance to our federal legislation

(Law 11794/2008) and local guidelines for animal care, and the project, approved by the University Ethics Committee (CEUA/UFRGS Project # 17862).

Rats were deeply anesthetized by an i.p. injection of ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively) and bilaterally implanted with 27-gauge guide cannulae aimed 1 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (AP: -4.0 mm, LL: ± 3.0 mm, DV: 1.6 mm) or IL (AP: $+3.2$ mm, LL: ± 0.6 mm, DV: 4.0 mm) from bregma (Paxinos & Watson, 1998). After a 1 week recovery from surgery, animals were submitted to the behavioral procedures. Following the behavioral experiments, subjects were sacrificed and their brains dissected and preserved in 10% formaldehyde to verify the correct position of the cannula. Only the 106 animals with the correct cannula placement (see Fig. 3) were considered in the statistical analysis.

The potent, non-selective cannabinoid receptor agonist CP55,940, was dissolved in phosphate buffered saline (PBS, isotonic) with 8% dimethylsulfoxide to a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (a safe hydrophobic vehicle regularly used in our and other labs – see, e.g., De Oliveira Alvares et al., 2005, 2006; De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008; De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, Molina, et al., 2008). At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into the guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond the guide cannula end, and aimed either to the pyramidal cell layer either of the infralimbic cortex, or – form comparative reasons – the CA1 area of the dorsal hippocampus. In all experiments, a 0.5 μL volume was bilaterally infused in each structure at a slow rate (20 $\mu\text{L}/\text{h}$), and the needle removed after waiting for an additional 30 s.

The conditioning chamber consisted of an (indirectly) illuminated Plexiglas box ($20 \times 23 \times 22$ cm), with a metallic grid floor of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart. In the training session of the Contextual Fear Conditioning (CFC), rats were left to habituate for 3 min to the conditioning chamber before receiving two 2-s, 0.7-mA footshocks separated by a 30-s interval (the US or unconditioned stimulus) and kept in the conditioning environment for an additional minute before returning to their homecages.

In experiment I subjects were intrahippocampally infused with CP55,940 immediately after training, in three different concentrations (1, 5 and 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in order to verify the effective concentration able to disrupt memory *Consolidation* (Fig. 1A). In experiment II we evaluated if the observed effect was mediated by CB1 receptors verifying if CP55,940 effect could be reversed by a concomitant, subthreshold concentration of the CB antagonist AM251 (Fig. 1B). Since the effective concentration for intrahippocampally infused AM251 was found to be 5.5 ng/side or 20 μM , dissolved in 0.5 μL volume of vehicle (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008; De Oliveira Alvares et al., 2005, 2006), with 2 mM being proven ineffective: that is why we employ 0.2 μM of AM251 to revert the CP55,940 effect, a concentration well below the minimum effective value. In experiments III and IV subjects were infused with the effective CP55,940 concentration right after a 180 s context re-exposure (reactivation session) 48 h after training, in order to observe *Reconsolidation* effects in two successive tests, one 48 h after reactivation, and the other, 7 days later: these *Reconsolidation* effects were verified for two different brain structures, the CA1 area of the dorsal Hippocampus (Fig. 2A), or the Infralimbic cortex (Fig. 2B). In all tests, animals have their freezing behavior recorded for 4 min in the same conditioning context without the US.

Since data from all experimental groups was proven to be both homoscedastic and normally distributed (Kolmogorov–Smirnov test with Lilliefors' correction, $P > 0.05$), results were analyzed either with One-way ANOVA followed by a Tukey HSD *post hoc* test (if needed) – experiments I and II has four independent groups

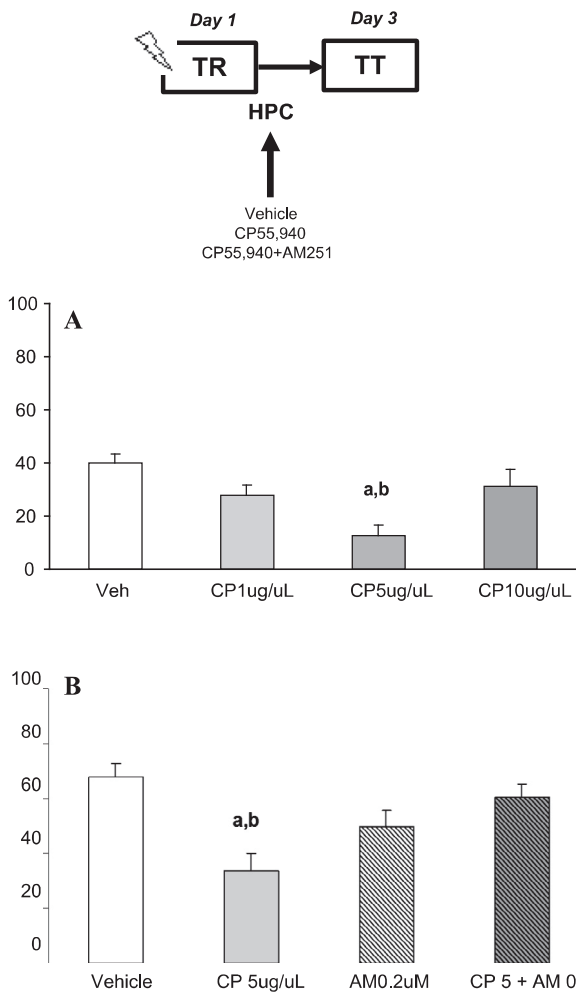


Fig. 1. Concentration–response curve and CB1-dependence of CP55,940 behavioral effects when infused into the dorsal HPC after CFC training: disruption of Memory Consolidation. Experimental design is shown in the top of each panel. Data presented as Mean \pm SEM of percent freezing time. (A) Animals infused with CP55,940 immediately after CFC training with different concentrations: only the 5 μ g/ μ L group exhibited a significantly lower freezing level in the test (48 h later) compared to its control and the 10 μ g/ μ L groups ($N = 8, 8, 8$ and 8). One-Way ANOVA with Tukey HSD *post hoc* test, $P < 0.05$; (B) CP55,940 effect is reverted by concomitant infusion of subthreshold concentration of AM251: the CP 5 μ g/ μ L group exhibited a significantly lower freezing level in the test (48 h later) compared to its control and the CP5 + AM0.2 groups ($N = 8, 8, 8$ and 6). One-Way ANOVA with Tukey HSD *post hoc* test, $P < 0.05$ (see text for more details).

each (Fig. 1A and B), or with (2-way) ANOVA for Repeated Measures – experiments III and IV show data for 3 sessions of 2 different groups (Fig. 2A and B). Significance level was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. CP55,940 infused into the HPC disrupts memory consolidation though a CB1 mediated mechanism

Three different concentrations of CP55,940 or its vehicle (DMSO 8% in buffered saline) were infused into the CA1 area of the dorsal hippocampus (HPC) immediately after the training session of a Contextual Fear Conditioning. One-Way ANOVA revealed that only the 5 μ g/ μ L concentration has had a significant effect ($F(3,28) = 6.344, P = 0.002$, Fig. 1A, $N = 8, 8, 8$ and 8 , respectively); *post hoc* analysis with Tukey's HSD test has shown that this concentration differs significantly both from the Vehicle ($P = 0.001$) and the

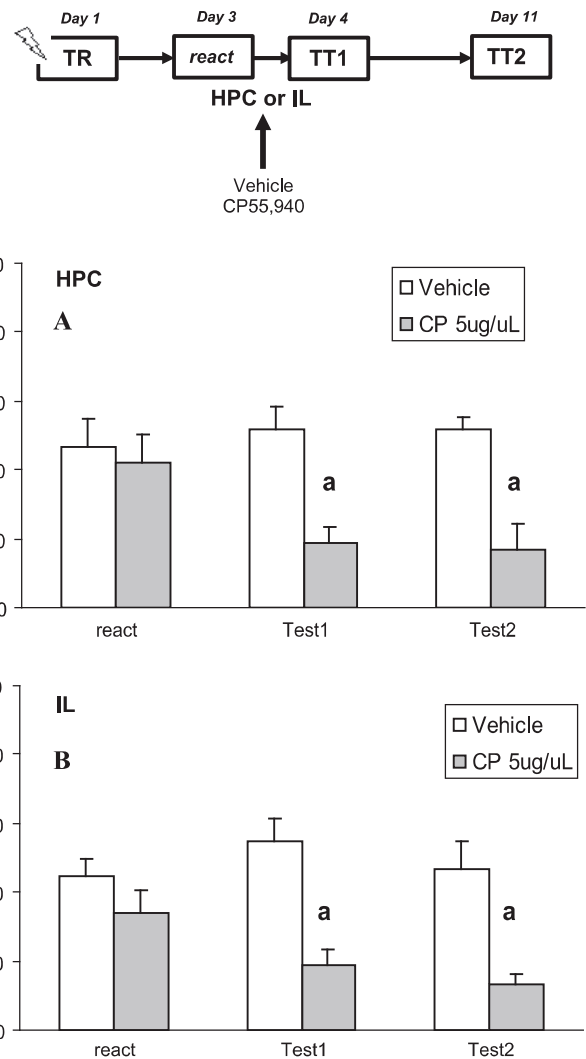


Fig. 2. Effect of CP55,940 infused into the dorsal Hippocampus (HPC) or the Intralimbic Cortex (IL), right after FC context reactivation: disruption of Memory Reconsolidation. Experimental design is shown in the top panel. Data presented as Mean \pm SEM of percent freezing time. Animals infused with 5 μ g/ μ L of CP55,940 either into (A) the HPC ($N = 6$ and 8) or (B) the IL cortex ($N = 8$ and 8), immediately after a 180 s re-exposition to the conditioning context (a reactivation/reconsolidation session) express significantly lower freezing levels observable both in the 3rd (Test 1) and 8th days (Test 2) after reactivation. ANOVA for Repeated Measures showed significant effect for Groups and Sessions and Groups \times Sessions Interaction, $P < 0.05$ (see text for more details).

CP10 μ g/ μ L ($P = 0.033$, Tukey *post hoc* test) groups. In order to confirm that the poorly selective CP55,940 was indeed acting through CB1 receptors, we infused it concomitantly to a subthreshold (non-effective) concentration of AM251: One way ANOVA revealed significant effect of the drug alone at the 5 μ g/ μ L concentration ($F(3,26) = 7.094, P = 0.001$), differing significantly from the vehicle ($P = 0.001$), and the CP5 + AM0.2 ($P = 0.033$, Tukey *post hoc* test) groups, all the other groups being equal (Fig. 1B, $N = 8, 8, 8$ and 6 , respectively). The area targeted was the pyramidal layer of CA1 region of the dorsal hippocampus, bilaterally infused with drug or its vehicle (see Fig. 3A).

3.2. Memory reconsolidation is disrupted by CP55,940 infused into the HPC after reactivation

CP55,940 or its vehicle (DMSO 8% in PBS) were infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately after the 180 s reactivation session: Two-Way ANOVA for Repeated Measures

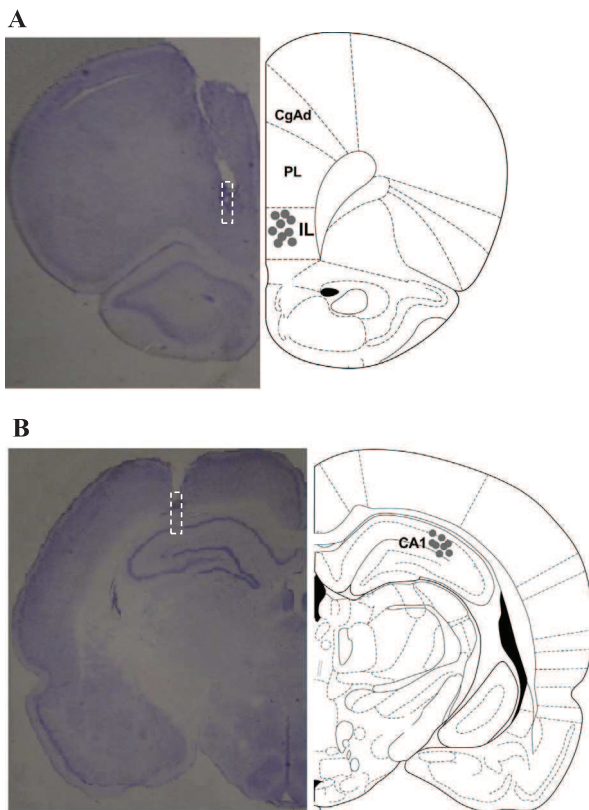


Fig. 3. Cannula placements in (A) dorsal hippocampus or (B) Infralimbic Cortex: Nissl staining of a coronal section showing the cannula lesion: drawing shows the targeted points inside these brain structures, since the inserted mizzy needle protrudes 1 mm below the tip of the cannula (adapted from Paxinos & Watson, 1998). Only animals with the correct cannula placement were considered in the statistical analysis.

revealed a significant effect of Groups, $F(1,12) = 8.819$, $P = 0.012$ and – most important – of Session \times Group Interactions, $F(2,24) = 6.736$, $P = 0.005$, but not of Sessions ($F(2,24) = 2.971$, $P = 0.070$), meaning that these groups do not behave the same way along the successive sessions, with a long lasting amnesic effect of CP55,940 observable both in the first and the second test sessions, remaining persistent up to the 11th day after training (Fig. 2A, $N = 6$ and 8). Targeted area was the same of the preliminary experiments above (see Fig. 3A).

3.3. Reconsolidation is also disrupted by the post-reactivation infusion of CP55,940 into the IL

CP55,940 or its vehicle were also infused into the pyramidal layer of the Infralimbic cortex immediately after the 180 s reactivation session: Two-Way ANOVA for Repeated Measures has shown a significant effect of Groups, $F(1,14) = 15.458$, $P = 0.002$, and, also very important, of Session \times Group Interactions, $F(2,28) = 5.691$, $P = 0.008$, however without Sessions effect, ($F(2,28) = 2.843$, $P = 0.075$), meaning that the CP55,940-treated group displays a relatively long lasting amnesic effect, observable from 1 to 8 days after re-exposure/reactivation (Fig. 2B, $N = 8$ and 8). The area bilaterally infused was the pyramidal layer of the Infralimbic area of the ventromedial prefrontal cortex (see Fig. 3B).

4. Discussion

Our results show a similar involvement, either of the infralimbic cortex or the CA1 region of the dorsal hippocampus, in the

processing of memory reconsolidation of an aversive task mediated by CB1 receptors. The potent, yet poorly selective (between CB1 and CB2 receptors) cannabinoid agonist CP55,940 was locally infused in each of these brain areas. The effective concentration of $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, suggested by previous works (Auclair, Otani, Soubrie, & Crepel, 2000; Bialuk, Dobosz, Potrzebowski, & Winnicka, 2014), was carefully confirmed here, both for effectiveness (Fig. 1A) and CB1-dependence (Fig. 1B).

The fact that our agonist CP55,940 did not cause the facilitatory effect we have previously described for anandamide (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, Molina, et al., 2008) came as a surprise. Indeed, the post-reactivation infusion of CP55,940 was more reminiscent of systemic than intracerebral infusion studies – two different contexts usually characterized by exactly opposite effects (Ameri, 1999; De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, Quillfeldt, 2008; Quillfeldt & de Oliveira Alvares, 2015; Wilson & Nicoll, 2002). Trying to replicate the facilitation of consolidation observed with AEA, we investigated a broader concentration–response curve than the one displayed in Fig. 1A (data not shown), to no avail.

This inconsistency can be attributed to two aspects. First, the behavioral tasks used were different: AEA was assayed in the Step-Down Inhibitory Avoidance for consolidation, while CP55,940 was studied in CFC. Second, and more important, the pharmacological differences between both substances – anandamide and CP55,940 in terms of affinity, efficacy, potency and, especially, selectivity. While anandamide is just a partial agonist of CB1 and does not bind to CB2, the most prominent endocannabinoid 2-AG is a full agonist for both receptors (Di Marzo & De Petrocellis, 2012; Sugiura et al., 1997). CP55,940, that is much more potent than Δ^9 -THC (Rinaldi-Carmona et al., 1996), has a pharmacological profile similar to 2-AG's, with a K_i of 0.6–5.0 and 0.7–2.6 nM for CB1 and CB2, respectively (Thomas, Gilliam, Burch, Roche, & Seltzman, 1998), and also act as a GPR55 antagonist (Kapur et al., 2009). Thus, both agonists, AEA and CP55,940 are poorly selective in different ways. The facilitatory effect we have described of AEA (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008) may be explained by the endovanilloid modulation: we found that of TRPV1 antagonist capsazepine blocks consolidation, but agonist capsaicin was ineffective of two aversive tasks (Genro et al., 2012), which is consistent with the idea of AEA acting through TRPV1.

That was not the case here. Despite the effective reversion of CP55,940 effect by concomitant, subthreshold AM251 supporting a CB1 mediation (Fig. 1B), the possible involvement of CB2, or even the less well-known GPR55 receptors, may still not be fully discarded as putative explanations for the “opposite” effect verified. For instance, there is some recent challenge to the classic notion that central neurons do not express CB2 receptors (Brusco, Tagliaferro, Saez, & Onaivi, 2008): this could open new, interesting avenues of investigation.

Finally, the absence of effect of an agonist in the highest concentration probed normally comes as pharmacological good news, because it confers reliability to the experiment in terms of specificity: the higher the concentration, the more probable it is to bind to other, non-specific targets, where the effect could go from opposite to neutral/compensating. In the case of AEA, also ineffective at the higher concentrations (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008), there is the additional burden represented by the fact that the exogenously infused substance “pools” with the identical, endogenously released molecules, producing a virtually unknown “final concentration” (Quillfeldt & de Oliveira Alvares, 2015). Being an artificial ligand, CP55,940 probably does not behave the same way.

Despite the chosen concentration of $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ being based on a post-acquisition paradigm – concerning only consolidation – it was also shown to be effective upon the reconsolidation phase,

both when infused into the HPC (Fig. 2A) or the IL cortex (Fig. 2B), an effect that remained stable for at least 8 more days.

As mentioned above, post-reactivation treatments can affect either extinction or its “counterpart”, reconsolidation, depending on the re-exposure time without the US (Bustos, Maldonado, & Molina, 2009); despite involving a disruptive effect analogous to that resulting from a real extinction procedure, we know we are here dealing with reconsolidation, not extinction because exposure time was too short (180 s) and unable to produce a new memory as takes place in a extinction (Bouton, 2004).

Despite the effect upon consolidation (Fig. 1A and B) differ from previous AEA findings (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008), the reconsolidation disruption was exactly the same effect observed for AEA in the same reconsolidation, in this same behavioral task (De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, Molina, et al., 2008). Thus, at least for the updating of a previously acquired trace, cannabinoid agonists seem to consistently converge to a disruptive action upon reconsolidation. Also, the fact that the very same concentrations of CP55,940 has produced nearly identical effects when infused into such different brain areas, the neocortical IL and the archicortical HPC (compare Fig. 2A and B), suggests that the local circuitry and/or mechanisms involved may be share some similarities.

The infralimbic region of the prefrontal cortex (IL) has been characterized as a complex relay station acting upon cognitive behavior regulating memory acquisition (Fincham & Anderson, 2006; Gilmartin & Helmstetter, 2010), consolidation (Laurent & Westbrook, 2009) and extinction (Izquierdo, Wellman, & Holmes, 2006; Milad & Quirk, 2002; Thompson et al., 2010), both through neurotransmitter modulation (Mueller, Porter, & Quirk, 2008) and ample connections with other relevant brain areas (Barker, Taylor, & Chandler, 2014). Chang and Maren (2010), e.g., has shown that focal lesions in the IL impaired the retention of extinction in Sprague–Dawley rats. Similarly, there is ample evidence on the involvement of IL in memory extinction from studies applying electrical stimulation during the extinction of FC, usually reducing fear expression and facilitating the consolidation of extinction (Maroun, Kavushansky, Holmes, Wellman, & Motanis, 2012; Milad, Vidal-Gonzalez, & Quirk, 2004; Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez, Rauch, & Quirk, 2006).

It was recently shown that $\Delta 9$ -THC alone or co-administered with cannabidiol, was able to persistently disrupt the reconsolidation of a contextual fear memory up to 22 days (Stern et al., 2015). Similar results has been obtained with WIN55,212, another potent agonist, infused into a different cortical area, the Insular Cortex, during reconsolidation of conditioning taste aversion (Kobilo, Hazvi, & Dudai, 2007), and into the amygdala, during reconsolidation of fear-potentiated startle (Lin, Mao, & Gean, 2006). Here, we presented the first demonstration of the involvement of the Infralimbic Cortex in memory reconsolidation through a CB1-mediated mechanism.

Taken together, these findings converge consistently in that, in all these mutually interconnected brain areas, the ECS operates modulating negatively the cognitive process known as reconsolidation (see Quillfeldt & de Oliveira Alvares, 2015), and even an artificial agonist such as CP55,940 was able to disrupt the aversive memory trace when infused during its labile phase.

Funding and disclosure

This research was supported by fellowships and grants from the CAPES (MEC), CNPq (MCT), PROPESQ (UFRGS), FINEP (“Rede Instituto Brasileiro de Neurociências,” IBN-Net, No. 01.06.0842-00) and FAPERGS (Processo 14.0425-4, Edital 012/2013). The authors report having no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

We acknowledge Fernanda Lotz for her contributions and thank Mrs. Zelma Regina Vasconcelos de Almeida for always resourceful and kind technical assistance.

References

- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58, 315–348.
- Auclair, N., Otani, S., Soubrie, P., & Crepel, F. (2000). Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 83(6), 3287–3293.
- Barker, J. M., Taylor, J. R., & Chandler, L. J. (2014). A unifying model of the role of the infralimbic cortex in extinction and habits. *Learning and Memory*, 21(9), 441–448.
- Basavarajappa, B. S., Nagre, N. N., Xie, S., & Subbanna, S. (2014). Elevation of endogenous anandamide impairs LTP, learning, and memory through CB1 receptor signaling in mice. *Hippocampus*, 24(7), 808–818.
- Bialuk, I., Dobosz, K., Potrzebowski, B., & Winnicka, M. M. (2014). CP55,940 attenuates spatial memory retrieval in mice. *Pharmacological Reports*, 66(6), 931–936.
- Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning and Memory*, 11(5), 485–494.
- Bouton, M. E., Westbrook, F. R., Corcoran, K. A., & Maren, S. (2006). Contextual and temporal modulation of extinction: Behavioral and biological mechanisms. *Biological Psychiatry*, 60(4), 352–360.
- Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T., & Onaivi, E. S. (2008). Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse (New York, N. Y.)*, 62(12), 944–949.
- Bucherelli, C., Baldi, E., Mariottini, C., Passani, M. B., & Blandina, P. (2006). Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learning and Memory*, 13(4), 426–430.
- Bustos, S. G., Maldonado, H., & Molina, V. A. (2009). Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: Decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 446–457.
- Chang, C. H., & Maren, S. (2010). Strain difference in the effect of infralimbic cortex lesions on fear extinction in rats. *Behavioral Neuroscience*, 124(3), 391–397.
- De Carvalho, C. R., Pamplona, F. A., Cruz, J. S., & Takahashi, R. N. (2014). Endocannabinoids underlie reconsolidation of hedonic memories in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(7), 1417–1425.
- De Oliveira Alvares, L., De Oliveira, L. F., Cambioim, C., Diehl, F., Genro, B. P., Lanzotti, V. B., et al. (2005). Amnesic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83(2), 119–124.
- De Oliveira Alvares, L., Genro, B. P., Pasqualini, Diehl, F., Molina, V. A., & Quillfeldt, J. A. (2008). Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience*, 154(4), 1648–1655.
- De Oliveira Alvares, L., Genro, B. P., Diehl, F., & Quillfeldt, J. A. (2008). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 1–9.
- De Oliveira Alvares, L., Genro, B. P., Vaz Breda, R., Pedroso, M. F., Da Costa, J. C., & Quillfeldt, J. A. (2006). AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Research*, 1075(1), 60–67.
- Di Marzo, V., & De Petrocellis, L. (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1607), 3216–3228.
- Do Monte, F. H., Souza, R. R., Bitencourt, R. M., Kroon, J. A., & Takahashi, R. N. (2013). Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. *Behavioural Brain Research*, 250, 23–27.
- Duvarci, S., & Nader, K. (2004). Characterization of fear memory reconsolidation. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9269–9275.
- Fincham, J. M., & Anderson, J. R. (2006). Distinct roles of the anterior cingulate and prefrontal cortex in the acquisition and performance of a cognitive skill. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34), 12941–12946.
- Gazarini, L., Stern, C. A., Piornedo, R. R., Takahashi, R. N., & Bertoglio, L. J. (2014). PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(1).
- Genro, B. P., de Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2012). Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(4), 355–360.
- Gilmartin, M. R., & Helmstetter, F. J. (2010). Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learning and Memory*, 17(6), 289–296.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., et al. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5), 1932–1936.
- Izquierdo, A., Wellman, C. L., & Holmes, A. (2006). Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *Journal of Neuroscience*, 26(21), 5733–5738.

- Kapur, A., Zhao, P., Sharir, H., Bai, Y., Caron, M. G., Barak, L. S., et al. (2009). Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29817–29827.
- Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 529–558.
- Kobilo, T., Hazvi, S., & Dudai, Y. (2007). Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, 25(11), 3417–3421.
- Kortleven, C., Fasano, C., Thibault, D., Lacaille, J. C., & Trudeau, L. E. (2011). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits long-term potentiation of glutamatergic synapses onto ventral tegmental area dopamine neurons in mice. *European Journal of Neuroscience*, 33(10), 1751–1760.
- Laurent, V., & Westbrook, R. F. (2009). Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learning and Memory*, 16(9), 520–529.
- Lee, J. L., & Flavell, C. R. (2014). Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 144.
- Lin, H. C., Mao, S. C., & Gean, P. W. (2006). Effects of intra-amygdala infusion of CB1 receptor agonists on the reconsolidation of fear-potentiated startle. *Learning and Memory*, 13(3), 316–321.
- Lin, H. C., Mao, S. C., Su, C. L., & Gean, P. W. (2009). The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory. *Cerebral Cortex*, 19(1), 165–175.
- Liu, J., Zhao, L., Xue, Y., Shi, J., Suo, L., Luo, Y., ... Lu, L. (2014). An unconditioned stimulus retrieval extinction procedure to prevent the return of fear memory. *Biological Psychiatry*, 76(11), 895–901.
- Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C., & Motanis, H. (2012). Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PLoS ONE*, 7(5), e35853.
- Marsicano, G., & Kuner, R. (2008). Anatomical distribution of receptors, ligands and enzymes in the brain and in the spinal cord. *Circuitries and neurochemistry. In Cannabinoids and the brain*. New York: Springer.
- Milad, M. R., & Quirk, G. J. (2002). Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, 420(6911), 70–74.
- Milad, M. R., Vidal-Gonzalez, I., & Quirk, G. J. (2004). Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behavioral Neuroscience*, 118, 389–394.
- Mueller, D., Porter, J. T., & Quirk, G. J. (2008). Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *Journal of Neuroscience*, 28(2), 369–375.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12(2), 120–150.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.). New York: Academic Press.
- Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38(6), 863–869.
- Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2015). The hippocampal endocannabinoid system in different memory phases: Unveiling the CA1 Circuitry. In P. Campolongo & L. Fattore (Eds.), *Cannabinoids and modulation of emotion, memory, and motivation*. New York: Springer.
- Ratano, P., Everitt, B. J., & Milton, A. L. (2014). The CB1 receptor antagonist AM251 impairs reconsolidation of pavlovian fear memory in the rat basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 39(11), 2529–2537.
- Revillo, D. A., Paglini, M. G., & Arias, C. (2014). Spontaneous recovery from extinction in the infant rat. *Behavioural Brain Research*, 274, 149–157.
- Rinaldi-Carmona, M., Pialot, F., Congy, C., Redon, E., Barth, F., Bachy, A., ... le Fur, G. (1996). Characterization and distribution of binding sites for [³H]-SR 141716A, a selective brain (CB1) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sciences*, 58(15), 1239–1247.
- Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 140(5), 790–801.
- Schiller, D., Cain, C. K., Curley, N. G., Schwartz, J. S., Stern, S. A., Ledoux, J. E., et al. (2008). Evidence for recovery of fear following immediate extinction in rats and humans. *Learning and Memory*, 15(6), 394–402.
- Schiller, D., Monfils, M. H., Raio, C. M., Johnson, D. C., Ledoux, J. E., & Phelps, E. A. (2010). Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature*, 463(7277), 49–53.
- Stern, C. A., Gazarini, L., Vanvossen, A. C., Zuardi, A. W., Galve-Roperh, I., Guimaraes, F. S., ... Bertoglio, L. J. (2015). Δ9-Tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption. *European Neuropsychopharmacology*, 25(6), 958–965.
- Sugiura, T., Kodaka, T., Kondo, S., Nakane, S., Kondo, H., Waku, K., ... Yamamoto, I. (1997). Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca₂₊ transient in NG108-15 cells. *Journal of Biochemistry*, 122, 890–895.
- Szabó, G. G., Lenkey, N., Holderith, N., András, T., Nusser, Z., & Hájós, N. (2014). Presynaptic calcium channel inhibition underlies CB1 cannabinoid receptor-mediated suppression of GABA release. *Journal of Neuroscience*, 34(23), 7958–7963.
- Thomas, B. F., Gilliam, A. F., Burch, D. F., Roche, M. J., & Seltzman, H. H. (1998). Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(1), 285–292.
- Thompson, B. M., Baratta, M. V., Biedenkapp, J. C., Rudy, J. W., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2010). Activation of the infralimbic cortex in a fear context enhances extinction learning. *Learning and Memory*, 17(11), 591–599.
- Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S. L., & Quirk, G. J. (2006). Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning and Memory*, 13, 728–733.
- Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296(5568), 678–682.
- Yang, C. H., Huang, C. C., & Hsu, K. S. (2011). Generalization of fear inhibition by disrupting hippocampal protein synthesis-dependent reconsolidation process. *Neuropsychopharmacology*, 36(10), 1992–2008.

3. Resultados

Capítulo II

Artigo: "Synergetic interactions of CB1-mediated endocannabinoid and cholinergic muscarinic M4 modulations of the CA1 hippocampal circuitry upon memory consolidation".

Title: Synergetic interactions of CB1-mediated endocannabinoid and cholinergic muscarinic M4 modulations of the CA1 hippocampal circuitry upon memory consolidation

Classification: Biological Sciences

Keywords: Hippocampus, memory consolidation, cholinergic muscarinic system, endocannabinoid system.

Author names: Fabiana Santana^{1,3}, Rodrigo O. Sierra^{1,3}, Josue Haubrich^{1,3}, Querusche Klippel Zanona^{1,3}, Ana Paula Crestani^{1,3}, , Lucas de Oliveira Alvares², and Jorge A. Quillfeldt¹

Author affiliations: ¹Psychobiology and Neurocomputing Lab, ²Neurobiology of Memory Lab, Biophysics Department, Biosciences Institute, and ³Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, and Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Jorge A. Quillfeldt, Psychobiology and Neurocomputing Lab, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. (UFRGS), Av. Bento Goncalves 9500, Predio 43422, Sala 216, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: quillfe@ufrgs.br

Abstract

Introduction

That the multiplicity of neurotransmitter and neuromodulators interact reciprocally is not new nor unexpected, but every specific functional case demands to be proven separately in order to strenghten its case. Since it was shown that the non-selective

endocannabinoid ligand anandamide could bind to muscarinic receptors ([Lagalwar et al, 1999](#)), with particular affinity for the M4 subtype ([Christopoulos e Wilson, 2001](#)), evidence started to accumulate pointing to different interactions between both modulatory subsystems.

Both CB1 and M2/M4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors are metabotropic in nature, signalling via the Gi-protein to inhibit adenylate cyclase ([Azad, 2004](#); [Sánchez, 2009b](#)), that reduces cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production ([Serpa et al, 2015](#), [Guo et al, 2010](#)), resulting in the inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ channels and the activation of K⁺ channels ([McAllister et al, 2002](#), [Shapiro et al, 2001](#)). The co-presence of such identical functional subsystems (that produce the exact same cell response – essentially the inhibition of neurotransmitter release) raises the possibility that they actually share responsibilities in a complementary fashion, e.g., by being one the backup system for the other.

Evidence in the literature seems to support this hypothesis. Thus, the activation of muscarinic receptors could increase the production of endocannabinoids in the brain ([Ohno-Shosaku et al., 2003](#); [Fukudome et al., 2004](#)), and that M1-induced inhibition of GABAergic transmission is mediated by endocannabinoids in the periaqueductal gray matter ([Lau & Vaughan, 2008](#)). Both the genetic deletion in CB1-knockout mice or the administration of the CB1 antagonist SR141716 had increased the sensitivity to the non-selective muscarinic agonist alkaloid pilocarpine in inducing seizures, despite CB1 agonist CP 55,940 being ineffective ([Kow et al., 2014](#)). Another study evaluated the sequential activation of M3 receptors and cannabinoid CB1 receptors to obtain synergistic contractile effects of the bovine ciliary muscle via the activation of Rho-kinase and protein kinase C, with carbachol enhancing the effects of anandamide ([Romano & Lograno, 2013](#)).

In terms of plasticity, it was shown that hippocampal activation of CB1 receptors impairs the late phase of long-term potentiation (late-LTP) by altering the protein translation machinery through a cholinergic pathway ([Navakkode, 2014](#)). Synaptic or pharmacological postsynaptic activation of M1/M3 receptors converts postsynaptic Hebbian LTP to presynaptic anti-Hebbian LTD in neurons of the dorsal cochlear

nucleus, which promotes endocannabinoid signaling via a Ca²⁺-assisted / Gq-coupled pathway leading to activation of PLC (Zhao & Tzounopoulos, 2011). Rat pallidal synapses short-term plasticity shows evidence of GABAergic modulation inducible by M1 agonist, and blocked by atropine, pirenzepine, or mamba toxin-7, resulting in a reduced amplitude of inhibitory postsynaptic currents (IPSCs); conversely, evoked IPSCs exhibited short-term depression modulated by muscarine via the activation of presynaptic cannabinoid CB1 receptors (Hernández-Martínez et al., 2015). Cholinergic interneurons are key modulators of stimulation-induced endocannabinoid signaling in the striatum, including the lasting disinhibition induced by long-term depression at excitatory striatal synapses via CB1Rs. (Adermark, 2011).

Beyond the neurochemistry and plasticity-related events, could higher brain functions be also influenced by these interactions? In our lab we have been investigating the involvement of both subsystems in learning and memory over the years. The main cholinergic tool has been muscarinic toxin MT3, extracted from green mamba, which has more than 200-fold higher affinity for M4 than for M1 receptors (K_i=1.2 and 250nM, respectively; Jerusalinsky et al, 1998), to this day the most selective M4 antagonist available. The endocannabinoid system has been assessed mostly through the very selective CB1 inverse-agonist AM251 (De Oliveira Alvares et al, 2005, 2006, 2008a, b). For several reasons, but specially drug-specificity concerns, agonists have been less successfully explored for both modulatory subsystems.

Departing from the confirmation of the presence of M4 receptors in brain areas involved with learning and memory, specially the hippocampus (Wall et al., 1991; Yasuda et al., 1993; Harvey et al., 1998) and the striatum - the richest area (Boulai et al., 1996), we have shown, in collaboration with colleagues in Buenos Aires and Montevideo, that the density of M4 receptors in the hippocampus was consistent with previous studies employing different methods: M1 and M4 have similar densities in the whole region, while the distribution among subareas differ, with higher concentrations of M4 in the Frontal Cortex and CA3, and intermediate values in CA1 and Dentate Gyrus (Jerusalinsky et al., 1998). Then, we have shown that M4 receptors would be the main subtype responsible for muscarinic inhibition of forskolin-stimulated cyclic AMP production, both in hippocampus and striatum

([Sánchez et al., 2009a](#)), and also that, in the hippocampal Schaffer collaterals-CA1 synapses, basal transmission was decreased and LTP induction prevented by a MT3 concentration that would bind mainly to M4 receptors ([Sánchez et al., 2009b](#)).

Thus, when infused into the CA1 area of the dorsal hippocampus or rats, MT3 was amnesic post-training, disrupting the consolidation of the step-down Inhibitory Avoidance (IA), an aversive task ([Jerusalinsky et al., 1998](#); [Ferreira et al, 2003](#)) but facilitatory pre-test, i.e., favouring a better performance in memory retrieval ([Diehl et al. 2007](#)). Noticeably, this selective M4 antagonist did not affect either the consolidation or the retrieval of Open Field Habituation (OF), a non-aversive task ([Ferreira et al, 2003](#); [Diehl et al. 2007](#)). These findings are consistent, e.g, with demonstrations of the selective compromise of M4 receptors in Alzheimer's disease ([Mulugeta et al., 2003](#)).

More recently, when we started to investigate the role of endocannabinoid modulation through CB1 receptors in the same CA1 area we found a very similar set of results upon another aversive task, context fear conditioning (CFC). Thus, the selective antagonist / inverse agonist AM251 was amnesic post-training, disrupting the consolidation of CFC, but not of the OF ([De Oliveira Alvares et al, 2005](#)), employing the very same AM251 concentration shown to block the induction of long-term potentiation in an *in vivo* electrophysiological register ([De Oliveira Alvares et al, 2006](#)). When infused pre-test, however the effect upon retrieval was facilitatory ([De Oliveira Alvares et al, 2008a](#)). The agonist anandamide, on the other hand, was facilitatory post-training but caused no pre-test effect (*ibidem*), but another, more selective and potent agonist, CP55,940 was basically amnesic post-training ([Santana et al., 2016](#)), probably reflecting differences in affinity between both substances. In further studies, opposite effects of AM251 (in the same concentration infused in the same structure) in two different post-reactivation phases - memory reconsolidation (facilitatory) and extinction (amnesic) ([De Oliveira Alvares et al, 2008b](#)).

In order to evaluate the putative synergetic action of endocannabinoid and cholinergic muscarinic modulations in this hippocampal subregion upon the consolidation of an aversive memory (CFC), we evaluated the effects of concomitantly infusing a subeffective concentration of both the CB1 agonist CP

55,940 and the M4 antagonist MT3 to check if their subthreshold actions compound somehow to attain effectivity. Complementarily, we investigated the *in vivo* electrophysiology after infusion of these same drugs, separately or concomitantly, in order to understand their effect upon CA1 synaptic plasticity underlying memory consolidation.

2. Material and Methods

Behavioral procedure

Animals. Male Wistar rats, age 2-3 months, weighing 250-350g from our breeding colony (CREAL/UFRGS) were used. Animals were housed in plastic cages, four to five in a cage per cage, under a 12 h light/dark cycle and at constant temperature of 24±1°C, with water and food ad libitum. All experiments were conducted in accordance with local animal care guidelines (Brazilian Federal Law 11,794/2008) and approved by the Ethics in the Use of Experimental Animals Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA, Project UFRGS #17,862).

Conditioning chamber (context). The conditioning chamber (context training) consisted of an illuminated Plexiglas box (20x25x22cm, with a grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart) with constant fan background sound (white noise). The novel context was a rectangular box with dimensions similar to the conditioning one, with a smooth floor, one wall painted with black-and-white vertical stripes, and without background white noise.

Contextual Fear Conditioning (CFC): training session. In the training session, rats were placed in the conditioning chamber to habituate for 3 min before receiving two 2-s, 0.7-mA footshocks separated by a 30-s interval (unconditioned stimulus); they were kept in the conditioning environment for an additional minute before returning to their homecages.

Memory consolidation: after subjects were exposed in the Contextual Fear Conditioning they were infused immediately after training. For the experiments

investigating the effects of intrahippocampal of CP 55.940, MT3 and CP 55.940+MT3 upon memory consolidation.

Test session. Test consisted of measuring freezing response of the animals to a 4 min exposition to the same training context.

Stereotaxic surgery and cannulae placement. Animals were anesthetized with a ketamine and xylazine association (75 and 10 mg/kg, respectively) infused intraperitoneally. A 22-gauge guide cannula was implanted bilaterally at AP= - 4.0 mm, LL= 73.0 mm, DV= -1.6 mm from Bregma, positioned just 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (according to [Paxinos & Watson, 1998](#)). After a recovery from the surgery of at least 5 days, behavioral procedures were performed. After that, all animals were sacrificed, their brains dissected and fixed on 10% formaldehyde in order to verify the cannulae placement under low magnification. Animals with inaccurate cannulae placements were excluded from the statistical analysis ([Figure 1a](#)).

Drugs. CP 55,940 ([Tocris Cookson Inc., Ellisville, MO, USA](#)) a potent non-selective cannabinoid receptor agonist CB1, CB2 and GPR55 was dissolved in sterile isotonic saline with 8% dimethyl sulfoxide at a concentration of 5µg/µl.

The Muscarinic Toxin 3 (MT3) an M4 antagonist was diluted as appropriate in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) at a concentration of 1µM. The MT3 have provided new pharmacological tools to investigate the muscarinic effect on memory.

Intrahippocampal infusion. At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fit into guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond the guide cannula end and aimed at the pyramidal cell layer of CA1 of the dorsal hippocampus or in the infralimbic cortex. A volume of 0.5 µl (CP,55940) or (MT3) was bilaterally infused at a slow rate (20 µL/h) and the needle was removed only after waiting another additional 30 sec.

Statistical analysis. Since data was found to be normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction) and analyzed with One-way ANOVA followed by a post hoc Tukey. After confirming the homocedasticity (Levene test) and normality of the data distribution (Kolmogorov-Smirnov test), experiments were

analyzed with t-test. Significance was set at $P < 0.05$.

Electrophysiological procedure *in vivo*. Adult male Wister rats were anaesthetized with urethane (1.5 mg/kg) and placed in a stereotaxic frame. Concentric bipolar stimulating electrodes were positioned in the Schaffer collateral (coordinates: -4.0 mm posterior to bregma, -3.0 mm lateral). The final dorsoventral position (3.0 mm below the surface of the cortex) was adjusted to produce a proper Schaffer Collateral response. Glass micropipettes were filled with 0.3 mol/L sodium chloride and were lowered into contra lateral CA1 area (coordinates: -4.0 mm posterior to bregma, -2.5 mm lateral to the midline). The final dorsoventral position (2.5 mm below the surface of the cortex) was adjusted to produce a maximal potential field response (**Figure 1b**).

The stimulus intensity was set to give 50% of the amplitude of the field potential evoked responses. Field potentials were evoked by paired pulses stimuli at a rate of 0.1Hz and recorded for at least 10 min after establishment of stable baseline responses. The high-frequency stimulation (HFS) protocol applied consisted of one series of 10 trains with a 2s interval between trains each composed of 20 pulses at 100 Hz. After, the paired pulses evoked field potentials that were recorded for 2 h in order to verify LTP occurrence and possible facilitation changes.

The baseline recording was obtained for each animal until achieving a stable result for at least 30 minutes before LTP induction. Data acquisition was performed using WinLTP software and the stimulation protocol was generated by the simulator itself (Grass simulator acho q S48). A stimulating current was applied to the Schaffer collateral region of the hippocampus to obtain an input/output relationship curve. Using this curve, we determined the size of the stimulating current that resulted in half of the maximal output response. Furthermore a baseline recording was obtained for each animal until achieving a stable result for at least 30 minutes before LTP induction.

3. Results

3.1. Modulation of memory consolidation happens only when the cholinergic muscarinic and endocannabinoid systems are working together.

The subthreshold doses of CP55,940 (0,1ug/ul), MT3 (1ug/ul) and both concomitantly were administered 15 min before test session revealing in the One-way ANOVA a significant difference among groups ($F_{3, 29} = 3.501$, $p = 0.028$). Tukey post-hoc test showed that animals had a significant impaired hippocampal memory consolidation by infusion of CP+MT3 ($p = 0.034$) (**Figure 2**).

3.2. Effects of CP 55,940 and MT3 on the induction and maintenance of long-term potentiation in vivo

Next, we addressed if this modulation of synaptic plasticity is also evident in the integer brain in an experimental design more similar to the behavior tasks, since drug infusion was punctual (**Figure 1b**). The CP 55,940 0,1ug/ul and MT3 1ug/ul also did not influence baseline of field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) normalized amplitude (**Figure 3a**). so it does not change basal excitability of field responses. One-way ANOVA a significant difference among groups ($F_{3, 12} = 4.825$, $p = 0.029$). Tukey post-hoc test showed that animals had a significant impaired of hippocampal *long-term potentiation* by infusion of CP+MT3 ($p = 0.025$) (**Figure 2**).

4. Discussion

In this report rats were injected bilaterally into the hippocampus with subthreshold doses of MT3+CP55,940 after training, which was performed 2 days after acquisition, and froze significantly less than those injected with only vehicle, CP55,940 or MT3 subthreshold doses (**Figure 2**). Then, we organized our experimental designs in order to understand more about the synergetic effect between cholinergic muscarinic and endocannabinoid systems on the cognitive process. With effective subthreshold doses of CP55,940 and MT3 we proceeded to investigate the effects upon memory

consolidation. The putative contribution of CB1 and M4 receptors impaired retention of fear memory causing an amnesic effect. Likewise, the same effect was observed with the infusion of the same concentration of the cocktail into the CA1 area before LTP protocol, showing that it can disrupt induction of this important plastic event (**Figures 3a-c**).

In the introduction we reviewed some previous converging evidence suggesting a synergistic action of M4 and CB1 modulatory subsystems, but recently, an optogenetic study of cholinergic activation with theta-frequency inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) in the hippocampal slices of mice, showed that IPSC rhythms generated by endogenous muscarinic acetylcholine receptors to be sensitive to CB1 receptor agonists (Nagode et al, 2011), indicating that endocannabinoid and muscarinic modulatory effects may indeed involve similar mechanisms of action.

CA1 subarea of the hippocampal formation has been our main target for years mostly because it has a well-defined local circuitry responsible for the major hippocampal output to the neocortex, via the Entorhinal and the Subiculum (Amaral and Lavenex, 2007, Buhl and Whittington, 2007), Since the hippocampus contributes mostly to the formation / consolidation of new memories (Akirav, 2011; Lopez-Fernandez et al, 2007) and this trace is established engaging several cortical areas (Sommer et al, 2005; Tronel et al, 2002) that will later assume the more lasting responsibility in terms of retrieval – “Systems Consolidation”, the output section of the formation is a more than logical option. Hippocampal pyramidal neurons, granule cells and interneurons were shown to be immunopositive for M1 and M4 receptors, with a weak M2 staining (Rouse and Levey, 1997), with the metabotropic M2/M4 receptors being preferentially coupled to the pertussis toxin-sensitive Gi/o proteins (Caulfield and Birdsall, 1998), i.e., these muscarinic receptors operate mainly inhibiting cells (Kornisiuk et al., 1995; Jerusalinsky et al., 1997; Taylor & Brown, 1999).

Another particularly relevant aspect of M4 receptors is that they are commonly expressed as heteroreceptors at the pre-synaptic terminals of either inhibitory or excitatory neurons (Rouse and Levey, 1997, Rouse et al., 1999). Similarly, CB1 receptors are present mainly upon presynaptic terminals of the CCK-expressing

subclass of GABAergic/inhibitory interneurons and – with a ~20-times smaller density – also upon glutamatergic/excitatory “main” neurons (Kawamura et al. 2006; Xu & Chen, 2014), and effectively act as neuromodulators inhibiting the release of glutamate and GABA (Elphick and Egertová, 2001). The presynaptic cell location of CB1 receptors in CA1 area GABAergic interneurons allowed a consistent interpretation of the observed behavioral effects found with selective drugs in memory consolidation and retrieval at least (Quillfeldt and De Oliveira Alvares, 2015).

Considering that the exact same pharmacological profile was observed in relation to M4 muscarinic receptors, and the present findings converge supporting a co-expression / complementary function of both modulatory subsystems, possibly in the same cells - something that remains to be proven - we propose the same circuitry to explain the M4 behavioral findings (Jerusalinsky et al., 1998; Ferreira et al, 2001, Diehl et al. 2007) - (Figure 4). Since the next logical step would be to assess the possibility of both modulatory subsystems actually acting as mutual spare systems, one in relation to the other, we believe the present results contribute positively to this hypothesis.

Taken together, our results strongly suggest the necessary participation of both CB1 and M4 receptors in the dorsal hippocampus as positive modulation of memory consolidation on the **Contextual Fear Conditioning** task and in the participation of synaptic plasticity at the synapses in the rat.

5. Bibliography

- Adermark Louise (2011) Modulation of endocannabinoid-mediated long-lasting disinhibition of striatal output by cholinergic interneurons; *Neuropharmacology*; 61 1314e1320
- Amaral D. and Lavenex P, 2007. ‘Hippocampal neuroanatomy’ IN: Andersen C., Morris R., Amaral D., Bliss T., O’Keefe, J. (eds.) *The Hippocampus Book*. Oxford: Oxford University Press, chapter 3, pp.37-114.
- Akirav I (2011) The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. *Front Behav Neurosci*. 5:34.

- Atsak, P., Hauer, D., Campolongo, P., Schelling, G., McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2012). Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3504–3509.
- Azad SC, Monory K, Marsicano G, Cravatt BF, Lutz B, Zieglgänsberger W, Rammes G. (2004) Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J Neurosci*. 24(44):9953-61.
- Bucherelli, C., Baldi, E., Mariottini, C., Passani, M. B., & Blandina, P. (2006). Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learning & Memory*, 13(4), 426–430.
- Buhl E. and Whittington M, 2007. 'Local Circuits' IN: Andersen C., Morris R., Amaral D., Bliss T., O'Keefe, J. (eds.) *The Hippocampus Book*. Oxford: Oxford University Press, chapter 8, pp. 297-315.
- Campolongo, P., Morena, M., Scaccianoce, S., Trezza, V., Chiarotti, F., Schelling, G., et al. (2013). Novelty-induced emotional arousal modulates cannabinoid effects on recognition memory and adrenocortical activity. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1276–1286
- Campolongo, P., Roozendaal, B., Trezza, V., Hauer, D., Schelling, G., McGaugh, J. L., et al. (2009). Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4888–4893
- Caulfield MP and Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279–290
- Christopoulos A, Wilson K. (2001) Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res*. 915(1):70-8.
- De Oliveira Alvares L, de Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanziotti VB, Quillfeldt JA (2005). Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 83(2): 119-24.
- De Oliveira Alvares L, Genro BP, Breda RV, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA

- (2006) AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res* 1075:60-67.
- De Oliveira Alvares L, Genro BP, Diehl F, Camboim C, Quillfeldt JA (2008a). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* 90:1–9.
- De Oliveira Alvares L, Genro BP, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA (2008b). Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* 154:1648–1655.
- Diehl F, Cassini LF, Engelke DS, Sheffer-Teixeira R, Haubrich J, de Oliveira Alvares L, Cerveñansky C, Kornisiuk E, Jerusalinky D, Quillfeldt JA (2009). Plasticity of M4 receptors during consolidation and after different reactivation protocols for the Fear Conditioning memory. (*in preparation*)
- Diehl F, Fürstenau de Oliveira L, Sánchez G, Camboim C, de Oliveira Alvares L, Lanziotti VB, Cerveñansky C, Kornisiuk E, Jerusalinky D, Quillfeldt JA (2007). Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. *Behav Brain Res* 177(2):227–31.
- Elphick MR, Egertová M, 2001. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 356 (1407): 381–408.
- Ferreira AR, Fürstenau L, Blanco C, Kornisiuk E, Sánchez G, Daroit D, Castro e Silva M, Cerveñansky C, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. (2003) Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(2):411-5.
- Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, et al. (2004) Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 19: 2682–2692.
- González JC1, Albiñana E, Baldelli P, García AG, Hernández-Guijo JM, 2011. Presynaptic muscarinic receptor subtypes involved in the enhancement of spontaneous GABAergic postsynaptic currents in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 33(1):69-81.
- Guo ML, Mao LM, Wang JQ. (2010) Modulation of M4 muscarinic acetylcholine

- receptors by interacting proteins. *Neurosci Bull.* 26(6):469-73.
- Hernández-González O, Tapia D, Galarraga E, Vargas J (2015) Muscarinic presynaptic modulation in GABAergic pallidal synapses of the rat. *J Neurophysiol*; 113: 796–807
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Alonso M, Verde ER, Cerveñansky C, Harvey A. (1998) Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport.* 9(7):1407-11.
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res* 1997;22:507–15.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, et al. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 2006; 26(11):2991–3001.
- Kornisiuk E, Jerusalinsky D, Cervenansky C, Harvey AL. Binding of muscarinic toxins MTx1 and MTx2 from the venom of the green mambac *Dendroaspis angusticeps* to cloned human muscarinic cholinceptors. *Toxicon* 1995;33:11–8 [Corrigendum: *Toxicon* 1995; 33:1111].
- Kow RL, Jiang K, Naydenov AV, Le JH, Stella N, Nathanson NM. (2014) Modulation of pilocarpine-induced seizures by cannabinoid receptor 1. *PLoS One.*; 9(4):e95922.
- Lau BK, Vaughan CW. (2008) Muscarinic modulation of synaptic transmission via endocannabinoid signalling in the rat midbrain periaqueductal gray. *Mol Pharmacol.* 74(5):1392-8
- Lopez-Fernandez MA, Montaron MF, Varea E, Rougon G, Venero C, Abrous DN, Sandi C. (2007) Upregulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the dorsal hippocampus after contextual fear conditioning is involved in long-term memory formation. *J Neurosci.* 27(17):4552-61.
- Mishima, K., Egashira, N., Hirosawa, N., Fujii, M., Matsumoto, Y., Iwasaki, K., et al. (2001). Characteristics of learning and memory impairment induced by D9-tetrahydrocannabinol in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 87, 297–308.
- Moshfegh, A., Babaei, P., Oryan, S., Soltani, B., & Zarrindast, M. R. (2011). Involvement of dorsal hippocampal alpha1-adrenergic receptors in the effect of

- WIN55,212-2 on memory retrieval in inhibitory avoidance task. *Neuroscience Letters*, 489(2), 69–73.
- Nagode DA, Tang AH, Karson MA, Klugmann M, Alger BE. (2011) Optogenetic release of ACh induces rhythmic bursts of perisomatic IPSCs in hippocampus. *PLoS One*. 6(11):e27691.
- Navakkode S, Korte M. (2014) Pharmacological activation of CB1 receptor modulates long term potentiation by interfering with protein synthesis. *Neuropharmacology*. 79:525-33.
- Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, et al. (2003) Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 18: 109–116.
- Piri, M., & Zarrindast, M. R. (2011). Modulation of WIN55,212-2 state-dependent memory by alpha2-adrenergic receptors of the dorsal hippocampus. *Archives of Iranian Medicine*, 14(6), 389–395.
- Romano MR, Lograno MD (2013) Signaling cross-talk between cannabinoid and muscarinic systems activates Rho-kinase and increases the contractile responses of the bovine ciliary muscle. *Eur J Pharmacol.*; 702(1-3):174-9.
- Rouse ST, Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol* 1997;380:382–94.
- Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI. Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sci* 1999;64:501–9.
- Sánchez G, Alvares Lde O, Oberholzer MV, Genro B, Quillfeldt J, da Costa JC, Cerveñansky C, Jerusalinsky D, Kornisiuk E. (2009a) M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *J Neurosci Res*. 87(3):691-700
- Sánchez G, Colettis N, Vázquez P, Cerveñansky C, Aguirre A, Quillfeldt JA, Jerusalinsky D, Kornisiuk E. (2009b) Muscarinic inhibition of hippocampal and striatal adenylyl cyclase is mainly due to the M(4) receptor. *Neurochem Res*.34(8):1363-71.
- Santiago MP, Potter LT, 2001. Biotinylated m4-toxin demonstrates more M4

- muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. *Brain Res* 894(1):12-20.
- Serpa A, Correia S, Ribeiro JA, Sebastião AM, Cascalheira JF. (2015) The combined inhibitory effect of the adenosine A1 and cannabinoid CB1 receptors on cAMP accumulation in the hippocampus is additive and independent of A1 receptor desensitization. *Biomed Res Int.* 2015:872684.
- Shapiro MS, Gomeza J, Hamilton SE, Hille B, Loose MD, Nathanson NM, Roche JP, Wess J. (2001) Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca²⁺ and K⁺ channel activity in sympathetic neurons. *Life Sci.* 68(22-23):2481-7.
- Sommer T, Rose M, Weiller C, Büchel C. (2005) Contributions of occipital, parietal and parahippocampal cortex to encoding of object-location associations. *Neuropsychologia.* 2005;43(5):732-43.
- Taylor P, Brown JH. Acetylcholine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Alberts RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects.* 6th ed. New York: Raven Press; 1999. p. 231–60.
- Tronel S, Sara SJ. (2002) Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn Mem.* 9(3):105-11.
- Xu J-Y, Chen C. Endocannabinoids in Synaptic Plasticity and Neuroprotection. *Neuroscientist* 2014.
- Zhang HM1, Chen SR, Matsui M, Gautam D, Wess J, Pan HL, 2006. Opposing functions of spinal M2, M3, and M4 receptor subtypes in regulation of GABAergic inputs to dorsal horn neurons revealed by muscarinic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol.* 69(3):1048-55.
- Zhao Y., Tzounopoulos T. (2011) Physiological Activation of Cholinergic Inputs Controls Associative Synaptic Plasticity via Modulation of Endocannabinoid Signaling. *The Journal of Neuroscience;* 31(9):3158 –3168
- Lagalwar S, Bordayo EZ, Hoffmann KL, Fawcett JR, Frey WH 2nd (1999). Anandamides inhibit binding to the muscarinic acetylcholine receptor. *J Mol Neurosci* 13(1-2):55-61.

- McAllister SD, Glass M. (2002) CB1 and CB2 receptor mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*; 66:161-171.
- Wall, S.; Yasuda, R.; Hory, F.; Flagg, S.; Martin, B.; Ginns, E. & Wolfe, B. (1991). *Mol Pharmacol* 39: 643-9. Whishaw et al. (1985). *Beh. Brain Res.* 17:103-15.
- Yasuda, R.; Ciesla, W.; Flores, L.; Wall, S.; Li, M.; Satkus, S.; Weisstein, J.; Spagnola, B. & Wolfe, B. (1993). *Mol Pharmacol* 43: 149-57.
- Harvey, A.; Bradley, K.N.; Cochran, S.A.; Rowan, E.G.; Pratt, J.A.; Quillfeldt, J.A. & Jerusalinsky, D. (1998). *Toxicon* 36(11): 1635-40.
- Boulai, S.; Sood, V.; Rayeq, M.; Cohen, V.; Zeeberg, B. & Reba, R. (1996). *Neuroimage* 3: 35-9.
- Mulugeta E, Karlsson E, Islam A, Kalaria R, Mangat H, Winblad B, Adem A. (2003) Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res.*; 960(1-2):259-62.
- Paxinos G., Watson C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Quillfeldt J A and de Oliveira Alvares L. 2015. The Hippocampal Endocannabinoid System in Different Memory Phases: Unveiling the CA1 Circuitry. Chapter 3 IN: P. Campolongo, L. Fattore (eds.). *Cannabinoids and Modulation of Emotion, Memory, and Motivation*. Springer, New York.

FIGURE LEGENDS

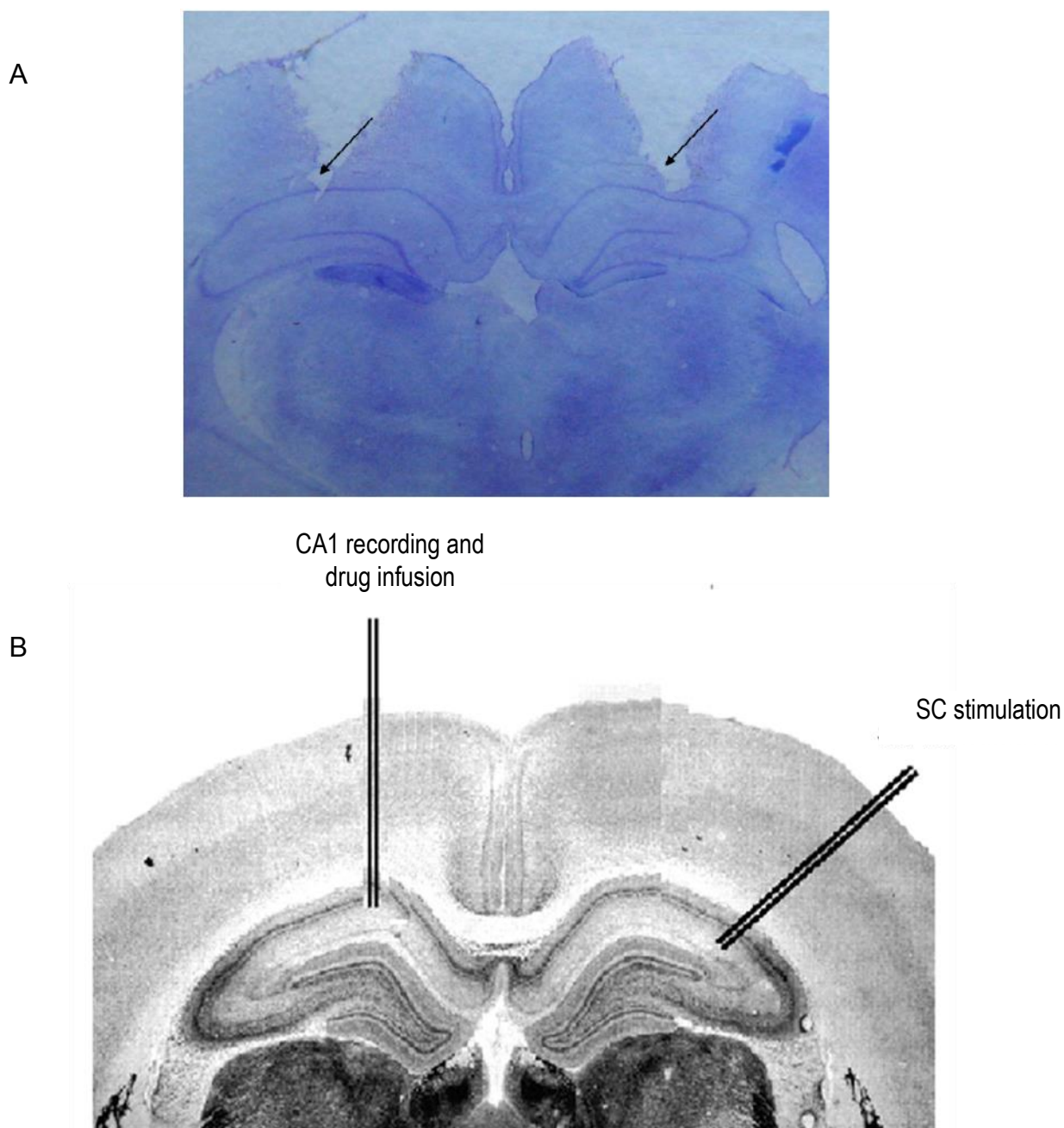


Figure 1: Cannula (A) and electrodes (B) placements: Nissl staining of a coronal section showing the cannula lesion and the electrodes (adapted from Paxinos & Watson, 1998). Only animals with the correct cannula and electrodes placement were considered in the statistical analysis.

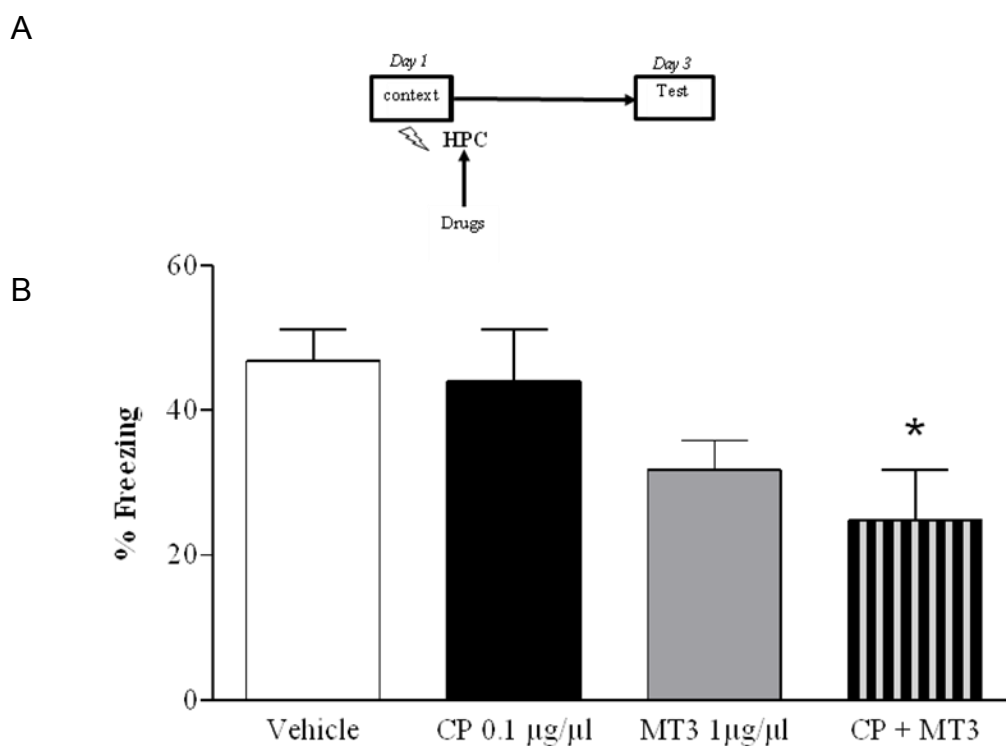
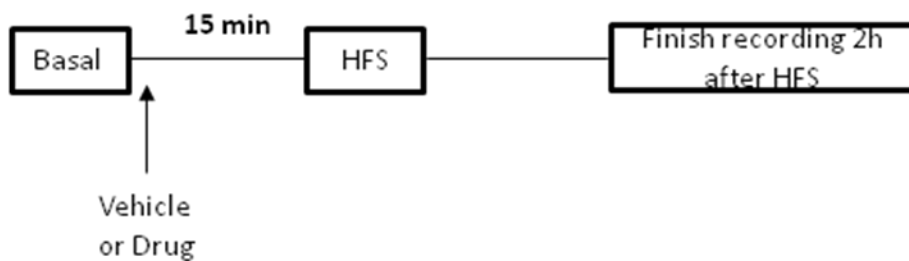
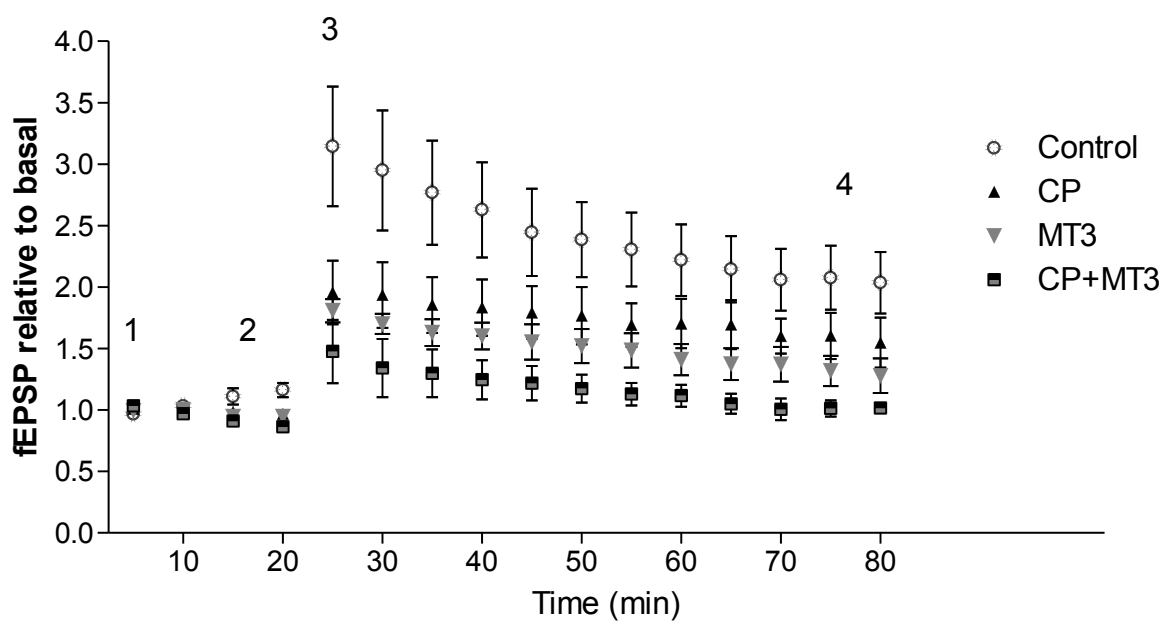


Figure 2: Experimental design is shown in the top of panel. Data presented as Mean \pm SEM of percent freezing time. (B) Animals infused with CP55,940, MT3 or CP55,940+ MT3 immediately after CFC training: only the CP55,940+ MT3 group exhibited a significantly lower freezing level in the test (48 h later) compared to its control (N = 7, 7, 7 and 12). One-Way ANOVA with Tukey HSD post hoc test, $P < 0.05$.



A



B

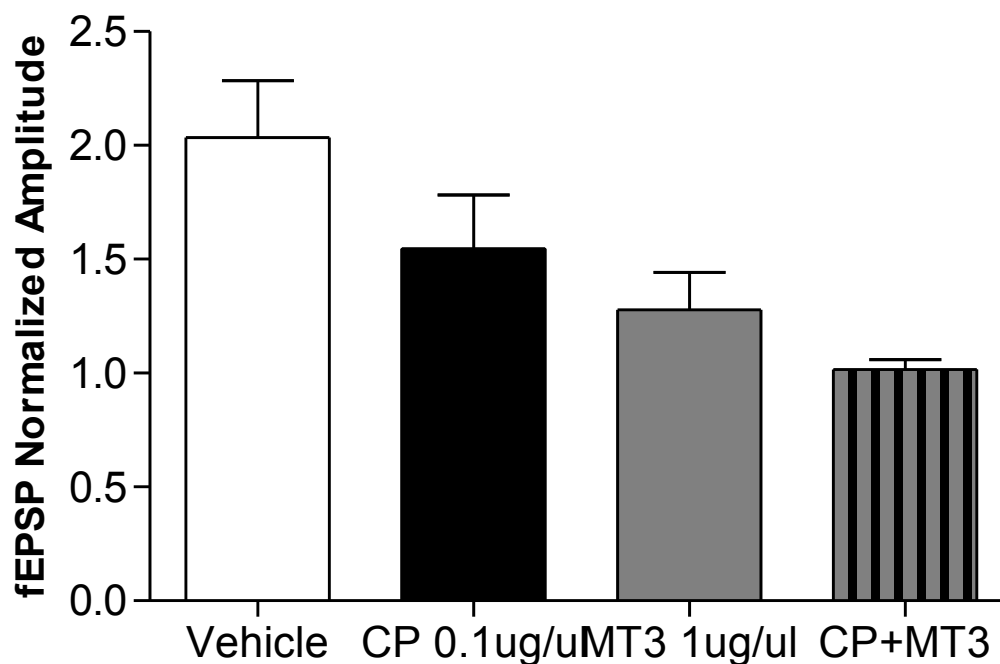


Figure3: Hippocampal LTP decay in vivo is regulated by sinergetic effect of CB1 and M4. Corresponding representative traces of anesthetized rats infused with vehicle, CP 55,940, MT3 and CP 55,940+MT3 15 min before LTP induction. The plot presents CA1-evoked synaptic potentials recorded for 80 min (A) with the % of change of normalized amplitude in three distinct intervals (1 = baseline response; 2 = treatment (10-20 min); 3= after HFS and 4 = 55-60 min after HFS) (n = 3 - 4 per group). (B) The concomitant infusion of CP55,940+MT3 exhibited a significantly lower amplitude compared to its control group (N = 4, 3, 3 and 3). One-Way ANOVA with Tukey HSD post hoc test, $P < 0.05$.

4. Discussão

4.1. Participação dos receptores CB1 na reconsolidação de uma memória aversiva no córtex infralímbico e no hipocampo.

No artigo 1 observamos que existe um forte envolvimento dos receptores CB1 no córtex infralímbico e no hipocampo durante o processo de reconsolidação da memória de medo condicionado contextual.

A infusão bilateral do potente agonista CB1, CP55940, no córtex infralímbico e no hipocampo dorsal imediatamente após a sessão de reativação da memória de 3 min. Prejudica a reconsolidação de memória (Fig. 2). Cabe ressaltar que este efeito foi mantido em testes subsequentes de 8 dias após a infusão de CP55940, evitando recuperação espontânea.

Para validarmos o protocolo e a concentração mais efetiva em nosso laboratório, realizamos uma curva dose-resposta que nos confere a melhor concentração de 5µg/µl (Fig1A). Além disso, utilizamos a subdose (dose sem efeito) do antagonista seletivo do receptor CB1, AM251, para reverter o efeito de CP55,940, descartando o envolvimento de outros receptores (CB2, GPR55) no processo de reconsolidação de memória aversiva.

O córtex infralímbico está localizado no córtex pré-frontal (IL) e tem sido caracterizado como um complexo de retransmissão de informações que modula o comportamento cognitivo (Fincham & Anderson, 2006; Gilmartin & Helmstetter, 2010), consolidação da memória (Laurent & Westbrook, 2009) e a extinção da memória (Thompson et al., 2010; Izquierdo et al., 2006; Milad & Quirk, 2002), através de modulação de neurotransmissores (Mueller, 2008) e amplas conexões com outras áreas do cérebro (Barker et al., 2014). Chang et al. (2010), demonstraram que lesões focais no IL prejudica a retenção de extinção em ratos Sprague-Dawley. Da mesma forma, há amplas evidências sobre o envolvimento de IL em extinção de memória a partir de estudos que aplicam a estimulação elétrica durante a extinção do medo condicionado, provocando a redução da expressão de medo (Milad et al., 2004; Vidal-Gonzalez et al., 2006).

Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que o agonista CB1, anandamida, apresenta um efeito facilitatório sobre a consolidação da memória. O

fato de que o agonista CP55,940 não causou o efeito facilitatório que descrevemos anteriormente para a anandamida (De Oliveira Alvares et al., 2008b). Na verdade, a infusão pós-reativação da CP55,940 seria mais uma comprovação de resultados obtidos do que um estudos de perfusão intracerebrais - por exemplo, avaliar diferentes efeitos com infusão de CP55,940 (Ameri, 1999; Wilson & Nicoll, 2002; Oliveira Alvares De et al., 2008a;. Quillfeldt e De Oliveira Alvares, 2015, Morena & Campolongo, 2014). Em consequência deste fato, tentamos replicar a facilitação da consolidação observada com AEA através de uma curva de concentração-resposta mais ampla do que foi mostrada no artigo (dados não mostrados), porém sem sucesso.

Acreditamos que a diferença entre nossos resultados, mesmo que usando um agonista do receptor CB1, pode ser atribuída por dois fatores: primeiramente, as tarefas comportamentais usadas eram diferentes, no experimento com anandamida o treino sobre a consolidação da memória e foi realizado na esquiva inibitória (EI), enquanto CP55,940 foi realizado no CAC. Outro fator, que acreditamos ser mais relevante, é devido às diferenças entre ambas as substâncias farmacológicas - anandamida e CP55,940 - em termos de afinidade, eficácia, potência e, especialmente, a seletividade. Enquanto anandamida é apenas um agonista parcial dos receptores CB1 e não se liga ao CB2, o mais proeminente do endocanabinóide 2-AG é um agonista completo para ambos os receptores (Sugiura et al., 1997;. Di Marzo & De Petrocellis, 2012). CP55,940, que é muito mais potente do que Δ^9 -THC (Rinaldi-Carmona et al, 1996), tem um perfil farmacológico semelhante ao do 2-AG, com um K_i de 0,6 - 5,0 e 0,7 - 2.6 nM para CB1 e CB2, respectivamente (Thomas et al., 1998), e também atuam como um antagonista de GPR55 (Kapur et al, 2009). Assim, ambos os agonistas, AEA e CP55,940 são seletivos de maneiras diferentes.

O efeito facilitador encontrado em nosso laboratório com AEA (De Oliveira Alvares et al., 2008a) pode ser explicado pela modulação de endocanabinóide sobre os receptores baunilhóides. Genro e colaboradores (2012) demonstraram que o antagonista TRPV1, capsazepina, prejudica a consolidação da memória nas duas tarefas (EI e CAC), o que é consistente com a ideia de AEA agindo através TRPV1 (Genro et al., 2012).

Com uma concentração eficaz de CP55,940 em mãos iniciamos a investigar efeitos sobre reconsolidação da memória no IL e HPC. Após a reativação (3 min.

reexposição ao contexto sem choque) a infusão desta droga no IL prejudicou a reconsolidação da memória, porém o efeito resistiu a recuperação espontânea por pelo menos 8 dias após o treinamento (Figura 2-A). O mesmo efeito foi observado com a infusão de a mesma droga e concentração no hipocampo CA1 (Figura 3).

Recentemente, foi demonstrado que $\Delta 9$ -THC sozinho ou co-administrado com o canabidiol, foi capaz de prejudicar a reconsolidação de uma memória aversiva até 22 dias (Stern et al., 2015). Resultados semelhantes foram obtidos com WIN55,212, outro agonista CB1, infundido em uma área cortical diferente, o no córtex insular, durante a reconsolidação de uma memória aversiva (Kobilo et al., 2007), e na amígdala, durante a reconsolidação do sobressalto potenciado pelo medo (Lin et al., 2006). Com este trabalho somos os primeiros a demonstrar o envolvimento do córtex infralímbico na reconsolidação de memória através de um mecanismo mediado por receptores CB1.

Todos os achados convergem de forma consistente no que nestas áreas cerebrais interligadas (IL e HPC) o sistema endocanabinóide atua modulando negativamente este processo cognitivo (reconsolidação), e até mesmo de uma forma artificial, através do agonista exógeno como CP55,940 foi capaz de inibir o traço de memória aversiva quando infundido durante a sua fase lábil (Quillfeldt e De Oliveira Alvares, 2015).

4.2. Efeito sinérgico entre os sistemas endocanabinóide e colinérgico muscarínico sobre o processo de consolidação da memória.

No segundo manuscrito, observamos um claro efeito sinérgico entre os sistemas colinérgico muscarínico e canabinóides empregando a MT3 e o CP55,940 no processamento da memória. Para isso, os ratos foram injetados bilateralmente no hipocampo dorsal, com uma concentração sem efeito próprio de MT3 + CP55,940 após o treino. Dois dias após a aquisição da memória o teste revelou um efeito amnésico sobre a consolidação da memória (Figura 2). Contribuindo com esse resultado, o mesmo efeito foi observado com a infusão das mesmas concentrações em CA1 utilizando o protocolo eletrofisiológico de LTP (Figura 3).

Vários estudos indicam que o sistema colinérgico muscarínico e sistema canabinóide apresentam muitas semelhanças nos processamentos fisiológicos da memória a aprendizagem. Verificamos que os receptores M4 e CB1 são abundantemente expressos em regiões encefálicas associados a memória e aprendizagem, tais como, hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal (Buckley et al., 1988; Levey et al., 1995; Wang, et al., 2014). Além disso, observa as seguintes semelhanças, (1) os dois sistemas são metabotrópicos, (2) as vias de sinalização são através da proteína Gi (3) que inibem a adenilato ciclase (4) modulando negativamente a liberação de neurotransmissores (Azad, 2004; Sánchez, 2009b, Serpa et al., 2015, Guo et al., 2010, McAllister et al., 2002, Shapiro et al., 2001).

Através de uma curva dose-resposta do CP55,940 (dados não mostrados), utilizamos a concentração sem efeito de 0,1µg/µl microinjetada depois do teste o qual não provocou nenhum efeito sobre a consolidação da memória no CAC. O mesmo se deu no caso da MT3, através de pesquisa bibliográfica encontramos a melhor concentração sem efeito de 1µg/µl sobre a consolidação da memória no CAC (Ferreira et al., 2003).

Nossos resultados demonstram que a administração das subdoses de MT3 e a CP55,940 foram capazes de causar um efeito amnésico na consolidação no CAC quando administrada imediatamente após o treino. Esse resultado nos dá suporte à ideia de que existe um claro efeito sinérgico entre ambos os sistemas sobre o medo condicionado.

O efeito amnésico da CP55,940 e MT3 concomitantes sobre o processo de consolidação da memória deve-se principalmente à sua ação inibitória sobre a

modulação pós-sináptica. Provavelmente, a MT3 durante a consolidação atue sobre os interneurônios GABAérgicos do hipocampo, onde a toxina inibiria a atividade do receptor M4, que, por sua vez, modularia negativamente a liberação do neurotransmissor inibitório GABA. Isto produziria, então, o efeito amnésico (Jerusalinsky et al., 1995; Ferreira et al., 2003). O processo similar pode ocorrer com o sistema endocanabinóide CB1, onde o CP55,940 também promove uma ação inibitória sobre a modulação pós-sináptica influenciando no processamento da memória

Os resultados do presente trabalho mostraram uma clara modulação endocanabinóide, tanto da *consolidação* quanto da *reconsolidação* da memória, envolvendo igualmente receptores CB1 no hipocampo e no córtex infralímbico: o efeito amnésico duradouro observado foi diferente do obtido por nosso grupo usando a menos seletiva Anandamida em outra tarefa, a aversiva inibitória (de Oliveira Alvares et al., 2008b): as diferenças farmacológicas e entre tarefas explicariam, em parte, esses achados contrastantes. Na segunda parte, onde estudamos o sinergismo apenas na *consolidação*, constatamos uma forte interação complementar dos subsistemas CB1 e M4 afetando a resposta comportamental com efeito amnésico observado apenas na presença dos dois fármacos juntos (CP55,940+MT3, cada qual em concentração subefetiva). A infusão concomitante de ambos, nessas mesmas concentrações, também foi capaz de inibir a indução e a manutenção da potenciação de longa duração (LTP) na mesma região CA1 hipocampal, reforçando a hipótese de que a semelhança farmacológica observada nos efeitos de cada subsistema, com agonistas ou antagonistas, em cada uma das diferentes fases da memória, sugere que cada subsistema atua complementar ao outro.

5. Conclusão

7.1 A administração intra-hipocampal pós-treino do Condicionamento aversivo ao contexto do potente agonista canabinóide, CP55,940, teve um efeito amnésico sobre a consolidação da tarefa somente na concentração de 5 ug/ul, demonstrando um papel inibitório desse sistema sobre o processo de consolidação da memória no hipocampo dorsal.

7.2 A administração da CP55,940 e AM251 (concentração sem efeito próprio) reverteu o efeito amnésico, o que parece ser mediado pelos receptores CB1.

7.3 A administração bilateral da CP55,940 no hipocampo dorsal, imediatamente após a reativação da memória de curta duração (3 min.), inibe a reconsolidação da memória na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto em ratos Wistar.

7.4 A administração bilateral da CP55,940 no córtex infralímbico, imediatamente após a reativação da memória de curta duração (3 min), inibe a reconsolidação da memória na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto em ratos Wistar.

7.5 A administração concomitante bilateral da CP55,940 e MT3, agonista sintético CB1 e antagonista M4 no hipocampo, imediatamente após o treino, inibe a consolidação da memória na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto em ratos Wistar.

7.6 A mesma concentração da CP55,940 e MT3 (em dose sub efetiva) foi capaz de inibir a indução e manutenção da potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo de rato, sugerindo um mecanismo de ação celular comum.

6. Bibliografia

- Abush, H., & Akirav, I. (2010). Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus*, 20(10), 1126–1138
- Adem, A.; Asblom, A.; Johansson, G.; Mbugua, P.M. and Karlsson, E. (1988). *Biochimica et Biophysica Acta* 968: 340-5, 1988.
- Agrest M (2001) Classification of memory systems: a revision. *Vertex* 12: 261-267.
- Ameri, A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* 58: 315–348.
- Andersen P; Morris, R; Amaral, D; Bliss, T; O'Keefe, J (2007) *The hippocampus Book* (p. 78-108)
- Aultman JM, Moghaddam B. (2001) Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology*;153:353–64.
- Badre D, Lebrecht S, Pagliaccio D, Long NM, Scimeca JM. (2014) Ventral striatum and the evaluation of memory retrieval strategies. *J Cogn Neurosci.* 26(9):1928-48.
- Barker JM, Taylor JR, Chandler LJ. 2014. A unifying model of the role of the infralimbic cortex in extinction and habits. *Learn Mem.* 15;21(9):441-8.
- Bartus et al. (1987). In: *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, Meltzer, H., ed., Raven Press, N.Y., pp. 219-32.
- Bitencourt, R. M., Pamplona, F. A., & Takahashi, R. N. (2008). Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *European Neuropsychopharmacology*, 18(12), 849–859.
- Boccia, M. M., Acosta, G. B., Blake, M. G., & Baratti, C. M. (2004). Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in

- mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience*, 124, 735-741
- Boccia, M., Freudenthal, R., Blake, M., de, I. F., V, Acosta, G., Baratti, C. et al. (2007). Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J.Neurosci.*, 27, 13436-13445.
- Boulay, S.; Sood, V.; Rayeq, M.; Cohen, V.; Zeeberg, B. & Reba, R. (1996). *Neuroimage* 3: 35-9.
- Brown, V.J.; Bowman E.M. (2002) Rodent models of prefrontal cortical function *Trends Neurosci.*, pp. 340–343
- Buckley NJ, Bonner TI, Brann MR. (1988) Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci.*;8(12):4646-52.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Santini E, Quirk GJ (2007) Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*. 2007 Mar 15; 53(6):871-80
- Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Gunther W, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257: 1415-1419.
- Bush D, Barry C, Manson D, Burgess N. (2015) Using Grid Cells for Navigation. *Neuron.*; 87(3):507-20.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA (2009) Disruptive Effect of Midazolam on Fear Memory Reconsolidation: Decisive Influence of Reactivation Time Span and Memory Age. *Neuropsychopharmacology* 34:446-457.
- Chang CH, Maren S. 2010. Strain difference in the effect of infralimbic cortex lesions on fear extinction in rats. *Behav Neurosci.*; 124(3):391-7.
- Christopoulos A, Wilson K. (2001) Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* 915(1):70-8.
- Chudasama Y, Doobay VM, Liu Y. (2012) Hippocampal-prefrontal cortical circuit

mediates inhibitory response control in the rat. *J Neurosci.* 8;32(32):10915-24.

Citri A, Malenka RC. (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology.*; 33(1):18-41.

Clarke, J. R., Rossato, J. I., Monteiro, S., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2008). Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2), 374–381.

Cohen JD, Perlstein WM, Braver TS, Nystrom LE, Noll DC, Jonides J, Smith EE (1997) Temporal dynamics of brain activation during a working memory task. *Nature* 386(6625):604–608

Cortés, R. & Palacios, J. (1986). *Brain Research* 362: 227-38

Cowan N (2001) The magical number 4 in short-term memory: a reconsideration of mental storage capacity. *Behav Brain Sci* 4:87–185

CP55,940, on electrically evoked transmitter release from rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 324: 187-192.

Cruz-Morales SE, García-Saldívar NL, González-López MR, Castillo-Roberto G, Monroy J, Domínguez R. (2008) Acute restriction impairs memory in the elevated T-maze (ETM) and modifies serotonergic activity in the dorsolateral striatum. *Behav Brain Res.* 195(1):187-91.

Da, S., & Takahashi, R. N. (2002). SR 141716A prevents delta 9 tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26(2), 321–325.

De Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. (2013) Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience.*; 244:42-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.

- De Oliveira Alvares L, Engelke S, Diehl F, Scheffer-Teixeira R, Haubrich J, de Freitas Cassini L, Molina VA, Quillfeldt JA. (2010). Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learn Mem* 17(4):202–9.
- De Oliveira Alvares L, Genro BP, Diehl F, Quillfeldt JA. (2008a). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* 90(1):1–9.
- De Oliveira Alvares L., Pasqualini,G.B., Diehl,F., Molina,V.A., and Quillfeldt,J.A. (2008b). Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* 154, 1648-1655.
- Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36(3):527-38. *Science*, 22, 346–349.
- Decker, & Gallagher, M. (1987). *Brain Research* 417: 59-69.
- Delatour B, Gisquet-Verrier P.(1999) Lesions of the prelimbic–infralimbic cortices in rats do not disrupt selection processes but induce delaydependent deficits: evidence for a role in working memory? *Behav Neurosci* 1999;113:941–55.
- Di Marzo V, De Petrocellis L (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1607):3216-28.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L.(1998) Endocannabinoid: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*; 21:521-528.
- Diehl F, Fürstenau de Oliveira L, Sánchez G, Camboim C, de Oliveira Alvares L, Lanziotti VB, Cerveñansky C, Kornisiuk E, Jerusalinky D, Quillfeldt JÁ (2007). Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. *Behav Brain Res* 177(2):227-31
- Do Monte FH, Souza RR, Bitencourt RM, Kroon JA, Takahashi RN (2013). Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors.

Behav Brain Res 250:23-7.

Ducancel, F.; Rowan, E.; Cassar, E.; harvey, A.; Ménez, A. & Boulain, J. (1991).
Toxicon 29: 516-20.

Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?
Annu Rev Psychol 55:51–86

Dudai Y (2009) Predicting not to predict too much: how the cellular machinery of
memory anticipates the uncertain future. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.;
364(1521):1255-62

Dudai Y (2012) The restless engram: consolidations never end. Annu Rev Neurosci.;
35:227-47.

Dunnett SB, Wareham AT, Torres EM. (1990) Cholinergic blockade in prefrontal
cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats. Neuroreport;
1:61–4.

Ellis & Kesner (1981). Physiol Behav. 27: 203-9.

Ferreira AR, Fürstenau L, Blanco C, Kornisiuk E, Sánchez G, Daroit D, Castro e Silva
M, Cerveñansky C, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. (2003) Role of hippocampal
M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat.
Pharmacol Biochem Behav.; 74(2):411-5.

Fincham JM, Anderson JR.. 2006. Distinct roles of the anterior cingulate and
prefrontal cortex in the acquisition and performance of a cognitive skill. Proc
Natl Acad Sci U S A. 103(34):12941-6.

Förster E, Zhao S, Frotscher M. (2006) Laminating the hippocampus. Nat Rev
Neurosci.; 7(4):259-67.

Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories.
Nat Rev Neurosci 6(2):119–130

Freeman W, Watts JW. (1939) An Interpretation of the Functions of the Frontal Lobe:
Based upon Observations in Forty-Eight Cases of Prefrontal Lobotomy. Yale

J Biol Med.; 11(5):527-39

Frey, K. & Howland, M. (1992). J Pharmacol Exp Ther 263: 1391-400

Frotscher M, Heimrich B, Deller T. (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific. Trends Neurosci.; 20(5):218-23.

Fuster J.M. (2000) Executive frontal functions Exp Brain Res, pp. 66–70

Gaieski, F.S. (2000) Efeitos da Administração Intra-amígdala de Toxinas Muscarínicas Extraídas do Veneno de mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*) sobre a Memória de Ratas - Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, ICBS / UFRGS. Dados não publicados

Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A (1996). 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. Eur J Pharmacol, 307: 331-338.

Genoux D, Montgomery JM (2007) Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. Clin Exp Pharmacol Physiol 34: 1058-1063.

Genro BP, de Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA (2012). Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure. Neurobiol Learn Mem. 97(4):355-60.

Gifford, AN, Samiian, L, Gatley, SJ, Ashby, CR (1997). Examination of the effect of the cannabinoid receptor agonist,

Gilmartin MR, Helmstetter FJ. 2010. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. Learn Mem. 17(6):289-96.

Goonawardena AV, Sesay J, Sexton CA, Riedel G, Hampson RE. (2011) Pharmacological elevation of anandamide impairs short-term memory by altering the neurophysiology in the hippocampus. Neuropharmacology. 61(5-6):1016-25.

Gouty-Colomer LA, Hosseini B, Marcelo IM, Schreiber J, Slump DE, Yamaguchi S,

- Houweling AR, Jaarsma D, Elgersma Y, Kushner SA. (2015) Arc expression identifies the lateral amygdala fear memory trace. *Mol Psychiatry*.
- Granon S, Vidal C, Thinus-Blanc C, Changeux J-P, Poucet B. (1994) Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions. *Behav Neurosci*;108:883–91.
- Halstead WC, CARMICHAEL HT, BUCY PC. (1946) Prefrontal lobotomy; a preliminary appraisal of the behavioral results. *Am J Psychiatry*.; 103(2):217-28.
- Hampson RE, Deadwyler SA (1998). Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol Dis* 5(6 Pt B): 474-82
- Harvey, A. & Karlsson, E. (1980). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 312: 1-6.
- Harvey, A. & Karlsson, E. (1984). *Trends Pharmacol Sci* 5: 71-2.
- Harvey, A.; Bradley, K.N.; Cochran, S.A.; Rowan, E.G.; Pratt, J.A.; Quillfeldt, J.A. & Jerusalinsky, D. (1998). *Toxicol* 36(11): 1635-40.
- Hitti FL, Siegelbaum SA. (2014) The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*. 508(7494):88-92.
- Hoffman AF, Laaris N, Kawamura M, Masino SA, Lupica CR, Control of cannabinoid (2010) CB1 receptor function on glutamate axon terminals by endogenous adenosine acting at A1 receptors. *J Neurosci*.. 13;30(2):545-55.
- Howlett,A.C.; Barth,F.; Bonner,T.I.; Cabral,G.; Casellas,P.; Devane,W.A.; Felder,C.C.; Herkenham,M.; Mackie,K.; Martin,B.R.; Mechoulam,R.; Pertwee,R.G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 54(2):161-202.
- Hugues S, Deschaux O, Garcia R (2004) Postextinction infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into the medial prefrontal cortex impairs memory of the extinction of conditioned fear. *Learn Mem*.; 11(5):540-3.
- Hutton E L (1947) Contra-Indications for Leucotomy: Whom not to Leucotomize. *The*

British Journal of Psychiatry, 93 (391) 333-341

Introini-Collison IB, McGaugh JL. (1988) Modulation of memory by post-training epinephrine: involvement of cholinergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl.)*; 94(3):379-85.

Introini-Collison, I.B. & Baratti, C.M. (1992). *Behav Neural Biol* 57: 248-55

Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A (2006). Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci* 26(21):5733-8.

Izquierdo I, Medina JH. (1993) Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz J Med Biol Res.*; 26(6):573-89

Izquierdo I, Quilfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH. (1997) Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci.*; 9(4):786-93.

Izquierdo, I (2002) *Memória*. Editora Artmed. Porto Alegre. 95p.

Izquierdo, I. (1989). *TIPS*, 10:175-7.

Jerusalinsky, D. & Harvey, A. (1994). *Trends Pharmacol Sci* 15: 424-30

Jerusalinsky, D.; Cerveñansky, C.; De Robertis, E. & Dajas, F. (1989). *J Neurochem* 52 (suppl): S92B.

Jerusalinsky, D.; Cerveñansky, C.; Peña, C.; Raskovsky, S. & Dajas, F. (1992). *Neurochem Intl* 20: 237-46.

Jerusalinsky, D.; Cerveñansky, C.; Walz, R.; Bianchin, M. & Izquierdo, I. (1993). *Eur J Pharmacol* 240: 103-5.

Jerusalinsky, D.; Harvey, A.; Karlsson, E. & Potter, L. (1997). *Life Sciences* 60: 1161-2.

- Jerusalinsky, D.; Kornisiuk, E.; Alfaro, P.; Quillfeldt, J.A.; Alonso, M.; Rial verde, E.; Cerveñansky, C. & Harvey, A. (1998). *NeuroReport*, 9: 1407-11.
- Jerusalinsky, D.; Kornisiuk, E.; Bernabeu, R.; Izquierdo, I. & Cerveñansky, C. (1995). *Toxicon* 33: 389-97.
- Jolkkonen, M.; Adem, A.; Hellman, U.; Wernstedt, C. & Karlsson, E. (1995). *Toxicon* 33: 399-410.
- Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME (2009). Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *The Journal of Biol Chem* 284 (43): 29817–27.
- Karlsson, E.; Risinger, C.; Jolkkonen, M.; Wernstedt, C. & Adem, A. (1991). *Toxicon* 29: 521-6
- Katona I, Sperlagh B, Maglócsky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF (2000). GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neurosci* 4: 797-804.
- Kawamura, Y.; Fukaya, M.; ; Maejima, T.; Yoshida, T.; Miura, E.; Watanabe, M.; Ohno-Shosaku, T.; Kano, M. (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*. 15;26(11):2991-3001.
- Kobilov T, Hazvi S, Dudai Y (2007). Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *Eur J Neurosci* 25(11): 3417-21.
- Kornisiuk, E.; Cerveñansky, C.; Alfaro, P.; Bassarsky, M.; Harvey, A. & Jerusalinsky, D. (1995a). *Comunicaciones Bioólicas* 13: 123-33. Kornisiuk, E.; Jerusalinsky, D.; Cerveñansky, C. & Harvey, A. (1995b). *Toxicon* 33: 11-8.
- Kornisiuk, E.; Jerusalinsky, D.; Cerveñansky, C. & Harvey, A. (1995b). *Toxicon* 33: 11-8
- Lagalwar S, Bordenave EZ, Hoffmann KL, Fawcett JR, Frey WH 2nd (1999). Anandamides inhibit binding to the muscarinic acetylcholine receptor. *J Mol Neurosci* 13(1-2):55-61.

- Lamprecht, R.; LeDoux, J. (2004). Structural Plasticity and Memory. *Nature Reviews*. 5, 45-54.
- Landsman RS, Burkey TH, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. (1997) SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol.*; 334(1):R1-2.
- Lasztóczy B, Klausberger T2. (2014) Layer-specific GABAergic control of distinct gamma oscillations in the CA1 hippocampus. *Neuron.*; 81(5):1126-39
- Lau BK, Vaughan CW (2008). Muscarinic modulation of synaptic transmission via endocannabinoid signalling in the rat midbrain periaqueductal gray. *Mol Pharmacol* 74(5):1392-8
- Laurent V, Westbrook RF. 2009. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learn Mem.* 16(9):520-9.
- Lee I, Kesner RP. (2004) Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus.*; 14(3):301-10.
- Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ. (1995) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci.* 1995 May;15(5 Pt 2):4077-92.
- Liang, J.; carsi-Gabrenas, J.; Krajewski, J.; McCafferty, J.; Purkerson, S.; Santiago, M.; Strauss, W.; valentine, H. & Potter, L. (1996). *Toxicon* 34: 1257-67.
- Lichtman, A. H., Dimen, K. R., & Martin, B. R. (1995). Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berlin)*, 119(3), 282–290.
- Lin HC, Mao SC, Gean PW (2006). Effects of intra-amygdala infusion of CB1 receptor agonists on the reconsolidation of fear-potentiated startle. *Learn Mem* 13(3):316-21.

- Lin HC, Mao SC, Su CL, Gean PW (2009). The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory. *Cereb Cortex* 19(1):165-75.
- Lin, Q. S., Yang, Q., Liu, D. D., Sun, Z., Dang, H., Liang, J., et al. (2011). Hippocampal endocannabinoids play an important role in induction of long-term potentiation and regulation of contextual fear memory formation. *Brain Research Bulletin*, 86(3–4), 139–145.
- Lin, Q. S., Yang, Q., Liu, D. D., Sun, Z., Dang, H., Liang, J., et al. (2011). Hippocampal endocannabinoids play an important role in induction of long-term potentiation and regulation of contextual fear memory formation. *Brain Research Bulletin*, 86(3–4), 139–145.
- Liu J, Rasul I, Sun Y, Wu G, Li L, Premont RT, Suo WZ (2009). GRK5 deficiency leads to reduced hippocampal acetylcholine level via impaired presynaptic M2/M4 autoreceptor desensitization. *J Biol Chem* 284(29):19564-71
- Mackowiak, M., Chocyk, A., Dudys, D., & Wedzony, K. (2009). Activation of CB1 cannabinoid receptors impairs memory consolidation and hippocampal polysialylated neural cell adhesion molecule expression in contextual fear conditioning. *Neuroscience*, 158(4), 1708–1716.
- Maren, S., & Quirk, G. J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nature Reviews*
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memory. *Nature* 418,:530-34
- Max SI, Liang JS, Potter LT. (1993) Purification and properties of m1-toxin, a specific antagonist of m1 muscarinic receptors. *J Neurosci.*; 13(10):4293-300.
- Max SI, Liang JS, Valentine HH, Potter LT. (1993) Use of m1-toxin as a selective antagonist of m1 muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.*; 267(1):480-5
- McAllister SD, Glass M. (2002) CB1 and CB2 receptor mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*; 66:161-

171.

- McGaugh JL (2000) Memory—a century of consolidation. *Science* 287(5451):248–251
- McGaugh, J. (1988). In: Solomon, P.R., Goethals, G.R., Kelley, C.N., Stephens, P.R. Perspectives on memory research. New York, Springer-Verlag. p. 33-64.
- McGaugh, J.L., Roosendaal, B. E Ahill, L. (1999). Modulation of memory storage by stress hormones and the amigdaloid complex. In: Gazzaniga, M.S. (ed). *The New Cognitive Neuroscience*, Cambridge, Bradford, 1081-1098.
- Mello e Souza T, Rohden A, Meinhardt M, Gonçalves CA, Quillfeldt JA. (2000) S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav.*, 15;71(1-2):29-33
- Milad MR, Quirk GJ. 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, 7: 70–4.
- Milad MR, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ. 2004. Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behav Neurosci*, 118: 389–94.
- Miller E.K. (2000) The prefrontal cortex and cognitive control. *Nat Rev Neurosci*, pp. 59–65
- Miller GA (1956) The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. *Psychol Rev* 63(2):81–97
- Milner B, Penfield W. (1956)The effect of hippocampal lesions on recent memory. *Trans Am Neurol Assoc.* 1955-1956; (80th Meeting):42-8.
- Mongiat LA, Schinder AF. (2011) Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *Eur J Neurosci.*; 33(6):1055-61.
- Morena, M; Campolongo, P (2014) The endocannabinoid system: An emotional buffer in the modulation of memory function. *Neurobiology of Learning and*

Memory 112: 30–43

- Morgan MA, LeDoux JE (1995) Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behav Neurosci.* 1995 Aug; 109(4):681-8
- Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE (1993) Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett.* 163(1):109-13.
- Mueller D, Porter JT, Quirk GJ. 2008. Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *J Neurosci.* 2008; 28(2):369-75.
- Mulugeta E, Karlsson E, Islam A, Kalaria R, Mangat H, Winblad B, Adem A. (2003) Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res.*; 960(1-2):259-62.
- Nader K (2003) Memory traces unbound. *Trends Neurosci.*; 26(2):65-72.
- Nalloor R, Bunting KM, Vazdarjanova A. (2012) Encoding of emotion-paired spatial stimuli in the rodent hippocampus. *Front Behav Neurosci*; 6:27.
- Nestor PJ, Graham KS, Bozeat S, Simons JS, Hodges JR. (2002) Memory consolidation and the hippocampus: further evidence from studies of autobiographical memory in semantic dementia and frontal variant frontotemporal dementia. *Neuropsychologia.*; 40(6):633-54.
- Neuroscience*, 5(11), 844–852.
- O'Keefe, J and Nadel, L, *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Clarendon, Oxford, 1978, 464 pp.
- Olianas, M.; Adem, A.; Karlsson, E. & Onali, P. (1997). *Life Sciences* 60: 1206.
- Owen AM (1997) The functional organization of working memory processes within human lateral frontal cortex : the contribution of functional neuroimaging.

Neuroscience 9(7):1329–1339

- Pamplona, F. A., & Takahashi, R. N. (2006). WIN 55212–2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neuroscience Letters*, 397(1–2), 88–92.
- Pearlman RJ, Aubrey KR, Vandenberg RJ (2003) Arachidonic acid and anandamide have opposite modulatory actions at the glycine transporter, GLYT1a. *J Neurochem.* 84(3):592-601
- Pedreira ME, Maldonado H. 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38(6):863-869.
- Penfield W; Milner B (1958) Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Arch Neurol Psychiatry*; 79(5):475-97.
- Phillips RG, LeDoux JE. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.*; 106(2):274-85.
- Potter, L.; Krajewski, J. & Dickerson, I. (1996). *Life Sciences* 60: 1205
- Quevedo J, Vianna M, Daroit D, Born AG, Kuyven CR, Roesler R, Quillfeldt JA. (1998) L-type voltage-dependent calcium channel blocker nifedipine enhances memory retention when infused into the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem.*; 69(3):320-5.
- Quillfeldt J A and de Oliveira Alvares L. 2015. The Hippocampal Endocannabinoid System in Different Memory Phases: Unveiling the CA1 Circuitry. Chapter 3 IN: P. Campolongo, L. Fattore (eds.). *Cannabinoids and Modulation of Emotion, Memory, and Motivation*. Springer, New York.
- Quillfeldt J, Bolioli B, Dalmaz C, Rascovsky S, Huang CH, Dias M, Ferreira MB, Schneider F, Izquierdo I, Medina JH (1991) Biochemical and behavioral effects of intraseptal microinjection of fasciculin, an irreversible acetylcholinesterase inhibitor. *Braz J Med Biol Res.*; 24(5):499-507.
- Quillfeldt J, Raskovsky S, Dalmaz C, Dias M, Huang C, Netto CA, Schneider F,

- Izquierdo I, Medina JH, Silveira R, et al. (1990) Bilateral injection of fasciculin into the amygdala of rats: effects on two avoidance tasks, acetylcholinesterase activity, and cholinergic muscarinic receptors. *Pharmacol Biochem Behav.*; 37(3):439-44.
- Quillfeldt JA, Zanatta MS, Schmitz PK, Quevedo J, Schaeffer E, Lima JB, Medina JH, Izquierdo I (1996) Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiol Learn Mem.*; 66(2):97-101.
- Quirk GJ, Garcia R, González-Lima F (2006) Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry* 60:337–343
- Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56–72.
- Ragozzino ME, Kesner RP.(1998) The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and prelimbic/infralimbic cortices on spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem*;69:241–57
- Riedel WJ, Blokland A (2015) Declarative memory. *Handb Exp Pharmacol.* 228:215-36.
- Rinaldi-Carmona, M.; Pialot, F.; Congy, C.; Redon, E.; Barth, F.; Bachy, A.; Brelière, J. C.; Soubrié, P.; le Fur, G. (1996). Characterization and distribution of binding sites for [3H]-SR 141716A, a selective brain (CB1) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sciences* 58 (15): 1239–1247.
- Rodriguez-Ithurralde, D.; Silveira, R.; Barbeito, L.; Dajas, F. (1983). *Neurochem Int* 5: 267-74.
- Rolls ET (2015) Diluted connectivity in pattern association networks facilitates the recall of information from the hippocampus to the neocortex. *Prog Brain Res.*; 219:21-43.
- Roosendaal B (2002) Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem.*; 78(3):578-95.

- Russell, R. (1982). *Ann.Rev.Pharm.Tox.* 22:435-63.
- Sánchez G, Colettis N, Vázquez P, Cerveñansky C, Aguirre A, Quillfeldt JA, Jerusalinsky D, Kornisiuk E (2009a). Muscarinic inhibition of hippocampal and striatal adenylyl cyclase is mainly due to the M(4) receptor. *Neurochem Res* 34(8):1363-71.
- Sánchez G, de Oliveira Alvares L, Oberholzer MV, Genro B, Quillfeldt J, da Costa JC, Cerveñansky C, Jerusalinsky D, Kornisiuk E (2009b). M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *J Neurosci Res* 15;87(3):691-700
- Sancho et al (2003) Anandamide inhibits nuclear factor- κ B activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Mol.Pharmacol.* 63 429.
- Santini E, Ge H, Ren K, Peña de Ortiz S, Quirk GJ (2004) Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2004 Jun 23; 24(25):5704-10.
- Schlicker, E, Timm, J, Zentner, J, Gothert, M (1997). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 583-9.
- Scorza, Fulvio Alexandre et al. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* [online]. 2005, vol.63, n.2a, pp. 283-288. ISSN 1678-4227. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2005000200015>.
- Scoville WB, Milner B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*; 20(1):11-21.
- Ségallas, I.; Thai, R.; Ménez, R. & Vita, C. (1995). *FEBS Letters* 371: 171-5.
- Setlow B. (1997) The nucleus accumbens and learning and memory. *J Neurosci Res.* 49(5):515-21.
- Shen, M, Piser, TM, Seybold, VS, Thayer, SA (1996). Cannabinoid receptor agonists

inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16: 4322-34.

Shifman JM, Choi MH, Mihalas S, Mayo SL, Kennedy MB (2006) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is activated by calmodulin with two bound calciums. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13968-13973.

Skirrow C, Cross JH, Harrison S, Cormack F, Harkness W, Coleman R, Meierotto E, Gaiottino J, Vargha-Khadem F, Baldeweg (2015) Temporal lobe surgery in childhood and neuroanatomical predictors of long-term declarative memory outcome. *Brain*. 138(Pt 1):80-93.

Sotres-Bayon F, Quirk GJ. (2010) Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol*. 20(2):231-5.

Squire LR, Zola SM (1997) Amnesia, memory and brain systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 1663-1673.

Stern CA, Gazarini L, Vanvossen AC, Zuardi AW, Galve-Roperh I, Guimaraes FS, Takahashi RN, Bertoglio LJ. 2015. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption. *Eur Neuropsychopharmacol*. 25(6):958-65.

Stratton LO, Petrinovich L. (1963) Post-Trial Injections Of An Anti-Cholinesterase Drug And Maze Learning In Two Strains Of Rats. *Psychopharmacologia*.; 5:47-54.

Sugiura, T., Kodaka, T., Kondo, S., Nakane, S., Kondo, H., Waku, K., Ishima, Y., Watanabe, K., Yamamoto, I. (1997) Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108–15 cells. *J. Biochem* 122: 890–895.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci*.; 24(20):4787-95.

Swarowsky A, Rodrigues L, Biasibetti R, Leite MC, de Oliveira LF, de Almeida LM,

- Gottfried C, Quillfeldt JA, Achaval M, Gonçalves CA. (2008) Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res.*; 190(2):206-11
- Szapiro, G., Galante, J.M., Barros, D.M., Stein, M., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Izquierdo, I., Medina, J.H. (2002) Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical research.* 27, 1491 - 1498.
- Tetzlaff C, Kolodziejcki C, Markelic I, Wörgötter F. (2012) Time scales of memory, learning, and plasticity. *Biol Cybern.* 106(11-12):715-26.
- Thomas BF, Gilliam AF, Burch DF, Roche MJ, Seltzman HH (1998). Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 285(1):285-92.
- Thompson BM, Baratta MV, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF. 2010. Activation of the infralimbic cortex in a fear context enhances extinction learning. *Learn Mem*;17(11):591-9.
- Tronson, N. C. & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat.Rev.Neurosci.*, 8, 262-275.
- Tulving E. (1987) Multiple memory systems and consciousness. *Hum Neurobiol.* 6(2):67-80.
- Ullman M.T., Pierpont E.I. Specific language impairment is not specific to language: The procedural deficit hypothesis. *Cortex.* 2005;41(3):399–433
- Van der Zee EA, Luiten PG (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 58(5):409-71
- Vandermeers, A.; Vandermeers-Piret, M.; Rathe, J.; Warelbröek, M.; Oras, A. & Karlsson, E. (1995). *Toxicon* 33: 1171-9
- Varvel SA, Anum EA, Lichtman AH. (2005) Disruption of CB(1) receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 179(4):863-72.

- Vazdarjanova A, McGaugh JL. (1999) Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *J Neurosci.*; 19(15):6615-22.
- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ. 2006. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem*, 13: 728–33.
- Walker M, Brakefield T, Hobson J, Stickgold R (2003) Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. *Nature* 425:616–620
- Wall, S.; Yasuda, R.; Hory, F.; Flagg, S.; Martin, B.; Ginns, E. & Wolfe, B. (1991). *Mol Pharmacol* 39: 643-9. Whishaw et al. (1985). *Beh. Brain Res.* 17:103-15.
- Wang H, Hu Y, Tsien JZ (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 79: 123-135.
- Wang Q, Wei X, Gao H, Li J, Liao J, Liu X, Qin B, Yu Y, Deng C, Tang B, Huang XF. (2014) Simvastatin reverses the downregulation of M1/4 receptor binding in 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats: the association with improvements in long-term memory. *Neuroscience*. 2014; 267:57-66.
- Whishaw IQ (1985) Cholinergic receptor blockade in the rat impairs locale but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool. *Behav Neurosci.*; 99(5):979-1005.
- Whitehouse PJ, Au KS. (1986) Cholinergic receptors in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*; 10(3-5):665-76.
- WIKIPÉDIA, SISTEMA LÍMBICO. a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Sistema_l%C3%ADmbico&oldid=42646112>. Acesso em: 21 jan. 2016.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS. (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature.*; 376(6541):572-5.
- Wilson RI, Nicoll RA. 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*.

296(5568):678-82.

Yasuda, R.; Ciesla, W.; Flores, L.; Wall, S.; Li, M.; Satkus, S.; Weisstein, J.; Spagnola, B. & Wolfe, B. (1993). *Mol Pharmacol* 43: 149-57.

Yim, T. T., Hong, N. S., Ejaredar, M., McKenna, J. E., & McDonald, R. J. (2008). Posttraining CB1 cannabinoid receptor agonist activation disrupts long-term consolidation of spatial memories in the hippocampus. *Neuroscience*, 151(4), 929–936.

Zanatta MS, Quillfeldt JH, Schaeffer E, Schmitz PK, Quevedo J, Medina JH, Izquierdo I (1997) Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. *Braz J Med Biol Res.*; 30(2):235-40.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørsgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400(6743):452-7.