

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

RICARDO MARCELO SACHSER

**O RECEPTOR CANABINOIDE CB1 NO CÓRTEX RETROSPLENIAL
MODULA AS FASES DE CONSOLIDAÇÃO, RECONSOLIDAÇÃO E
EXTINÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL**

**LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA DA MEMÓRIA
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA**

**Porto Alegre/RS, Brasil
Novembro de 2015**

RICARDO MARCELO SACHSER

LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA DA MEMÓRIA

**O RECEPTOR CANABINOIDE CB1 NO CÓRTEX RETROSPLENIAL
MODULA AS FASES DE CONSOLIDAÇÃO, RECONSOLIDAÇÃO E
EXTINÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares.

Coorientador: Prof. Dr. Tadeu Mello e Souza.

Porto Alegre/RS, Brasil

Novembro de 2015

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, dedico este trabalho ao meu pai Aristeu Sachser. Mesmo ausente fisicamente, é presença diária como minha mais bela memória.

À minha mãe Izonha Gollmann, essencialmente por sua paixão pelo trabalho no campo da saúde, que estimulou desde muito cedo minha escolha pela Psicologia, e às minhas irmãs Fabíola e Luana, pelo suporte (emocional e financeiro) de sempre.

Pela amizade e orientação impecável, agradeço imensamente ao Prof. Lucas de Oliveira Alvares, primeiramente por ter me aceitado como seu aluno no Laboratório de Neurobiologia da Memória, como também por ter sempre acreditado no meu trabalho.

Agradeço ao Prof. Tadeu Mello e Souza, tanto por seus estudos no córtex cingulado que inspiraram este trabalho, como também pela amizade e confiança.

Sou eternamente grato ao Prof. Edwing Martin Holguin Wilson que foi, sem sombra de dúvidas, o grande responsável pela minha graduação. Muito obrigado por sua apaixonante disciplina de Neurociências que mudou minha vida profissional.

Também agradeço a amizade e companheirismo de todos os meus colegas de laboratório, aos orientandos do Prof. Jorge Quillfeldt (LPBNC), aos colegas do Departamento de Biofísica e, em especial, à Dona Zelma, por ser a mãe que é. Tive muita sorte de conviver com vocês, que foram capazes de transformar o ambiente de trabalho numa grande família!

Pelo apoio e confiança de vários anos, obrigado aos meus verdadeiros amigos de Cunha Porã/SC, Cascavel/PR (Galera SDK), Florianópolis/SC, Porto Alegre/RS e Pato Branco/PR, que acreditaram desde o início nesta minha grande conquista.

Por fim, agradeço a CAPES pela concessão da bolsa, à relatora desta dissertação (Prof. Rosane Gomez), aos docentes revisores desta banca e aos demais responsáveis pela excelência no ensino em Neurociências da UFRGS. É um orgulho estudar aqui!

Sem vocês, nada disso seria possível.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Definições gerais de memória	12
1.2	O córtex retrosplenial: conexões e funções	16
1.3	Visão geral do sistema endocanabinoide	18
1.4	Sistema endocanabinoide e memória emocional	21
2	OBJETIVOS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Animais	26
3.2	Procedimentos cirúrgicos e infusão dos fármacos	26
3.3	Paradigma pavloviano de condicionamento aversivo ao contexto (CAC)	28
3.4	Fármacos	29
3.5	Controle histológico do posicionamento das cânulas no RSC	29
3.6	Coleta dos dados e análise estatística	30
3.7	Considerações bioéticas relevantes	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Padronização dos procedimentos cirúrgicos e comportamentais: infusão de muscimol intra-RSC pré-teste no CAC	32
4.2	Papel do sistema canabinoide no RSC sobre a consolidação da memória	33
4.3	Papel do sistema canabinoide no RSC sobre a reconsolidação da memória	34
4.4	Papel do sistema canabinoide no RSC sobre a extinção da memória	35
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	43
7	REFERÊNCIAS	45
8	ANEXO: <i>The cannabinoid system in the retrosplenial cortex modulates fear memory consolidation, reconsolidation, and extinction</i>, artigo publicado na revista Learning & Memory.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases da memória	13
Figura 2. Ilustração das principais conexões do RSC no encéfalo humano	17
Figura 3. Em roedores, o RSC está conectado com diferentes estruturas límbicas e corticais	18
Figura 4. Principais tipos de sinalização mediada pelos endocanabinoides	20
Figura 5. Sistema de sinalização retrógrada mediada pelos receptores CB1 em terminais axonais inibitórios e excitatórios no hipocampo: o papel da plasticidade sináptica de curta e de longa duração	21
Figura 6. Interações entre os sistemas glicocorticoide e endocanabinoide modulam a transmissão noradrenérgica na amígdala basolateral durante a consolidação da memória aversiva de longa duração, em ratos	23
Figura 7. Ilustração do posicionamento das cânulas e representação da difusão dos fármacos no RSC	27
Figura 8. Papel do RSC sobre a evocação da memória aversiva de longa duração	32
Figura 9. O sistema canabinoide no RSC modula a consolidação da memória aversiva de longa duração	33
Figura 10. O sistema canabinoide no RSC modula a reconsolidação da memória aversiva de longa duração	34
Figura 11. O sistema canabinoide no RSC modula a extinção da memória aversiva de longa duração	36

LISTA DE ABREVIações

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

AEA: anandamida

AM251: antagonista seletivo do receptor CB1

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

CA1: região do hipocampo (de *Cornu Ammonis 1*)

Ca²⁺: íon cálcio

CAC: condicionamento aversivo ao contexto

CaMKII: proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II

CB1: receptor canabinoide do tipo CB1

CB2: receptor canabinoide do tipo CB2

CP55940: agonista CB1/CB2

CORT: corticosterona

DGL: enzima diacilglicerol lipase

GABA: ácido gama-aminobutírico

GluA2: subunidade do receptor AMPA

GluN2B: subunidade do receptor NMDA

Ifenprodil: antagonista da subunidade GluN2B do receptor NMDA

K⁺: íon potássio

LTD: *long-term depression* (ou, depressão de longa duração)

LTP: *long-term potentiation* (ou, potenciação de longa duração)

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

mGluR-I: receptor metabotrópico glutamatérgico do tipo I

Muscimol: agonista do receptor GABA_A

Nimodipina: bloqueador dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo L

NMDA: ácido N-metil D-aspartato.

PKA: proteína cinase dependente de AMPc

PKC: proteína cinase dependente de Ca²⁺

PLC β : proteína fosfolipase β

RSC: córtex retrosplenial

SNC: sistema nervoso central

TETP: transtorno de estresse pós-traumático

THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol

RESUMO

O receptor canabinoide CB1, altamente expresso em várias regiões do sistema límbico, possui um importante papel na regulação da plasticidade sináptica implicada nas diferentes fases da memória emocional. Em roedores, embora já estejam bem caracterizados os efeitos da manipulação farmacológica do receptor CB1 na amígdala, no hipocampo e no córtex pré-frontal medial sobre a modulação de memórias aversivas, sua função no córtex retrosplenial (RSC) permanece desconhecida. Neste trabalho, usando o paradigma pavloviano de condicionamento aversivo ao contexto em ratos, exploramos o papel do sistema canabinoide no RSC sobre as fases de consolidação, reconsolidação e extinção da memória. Demostramos que a infusão intra-RSC imediatamente pós-treino de AM251 (11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), um antagonista seletivo CB1, causa amnésia retrógrada no teste de retenção da memória conduzido 48 h após o condicionamento, enquanto que a infusão bilateral de CP55940, um agonista canabinoide CB1/CB2 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), facilita a consolidação da memória. No protocolo de reconsolidação (injeção intra-RSC após uma sessão de reativação de 4 min, conduzida 48 h depois do condicionamento) foram encontrados efeitos opostos no teste de retenção da memória realizado 24 h após a reativação: o bloqueio dos receptores CB1 facilita, enquanto que sua ativação prejudica o fenômeno de reconsolidação da memória. Além disso, quando o AM251 é injetado intra-RSC 20 min antes de uma reexposição prolongada (de 30 min), observamos que a consolidação da memória de extinção é prejudicada, enquanto que o CP55940 acelera a extinção e impede sua recuperação espontânea ao longo do tempo. Concluindo, nossos resultados apresentam novas evidências sobre a função do sistema canabinoide no RSC sobre a modulação das fases de consolidação, reconsolidação e extinção da memória emocional.

Palavras-chave: RSC. Receptor canabinoide CB1. Condicionamento aversivo ao contexto. Memória.

ABSTRACT

The CB1 cannabinoid receptor is highly expressed in many regions of the limbic system, having an important role in the regulation of synaptic plasticity implicated in different phases of emotional memory processing. In rodents, although are well characterized the effects of the pharmacological manipulations of the CB1 receptor in the amygdala, hippocampus, and medial prefrontal cortex upon the modulation of aversive memories, their function in the retrosplenial cortex (RSC) remains unknown. In this study, using pavlovian contextual fear conditioning in rats, we explored the role of the cannabinoid system in the RSC on memory consolidation, reconsolidation, and extinction. We showed that posttraining intra-RSC infusion of AM251 (11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a selective CB1 antagonist, causes retrograde amnesia during the test for memory retention conducted 48 h after learning, whereas the bilateral infusion of CP55940 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a CB1/CB2 agonist, enhanced fear memory consolidation. In the reconsolidation protocol (postreactivation intra-RSC infusions conducted 48 h after training) we found opposite effects in the test session performed 24 h after memory reactivation: blocking CB1 receptors enhanced, whereas the activation of cannabinoid receptors impaired memory reconsolidation. Furthermore, when AM251 was infused intra-RSC 20 min before a prolonged reexposure (30 min), memory extinction was impaired, whereas the infusion of CP55940 accelerates memory extinction and prevents spontaneous recovery, maintaining memory extinguished over time. In conclusion, these data shed new light about the function of the cannabinoid system in the RSC on the role of contextual-fear related memory consolidation, reconsolidation, and extinction.

Keywords: RSC. CB1 receptor. Contextual fear conditioning. Memory.

1. INTRODUÇÃO

Observamos ao longo das últimas décadas um interesse crescente no estudo das bases neurais da formação e da evocação da memória, em vista de sua aplicabilidade clínica nas áreas de psicologia, neurologia e psiquiatria. Importantes avanços provenientes do diálogo multidisciplinar em neurociência cognitiva contribuíram no campo de diagnóstico e tratamento das doenças neuropsiquiátricas, particularmente a partir do advento de sofisticadas técnicas de neuroimagem funcional, do desenvolvimento de psicofármacos de ação seletiva, bem como do uso de instrumentos padronizados de avaliação e reabilitação neuropsicológica.

A partir dos estudos de localização e clonagem do receptor CB1 na década de 1990 (Herkenham et al. 1990; Matsuda et al. 1990; Devane et al., 1992), o sistema canabinoide tem atraído grande interesse na pesquisa em neurobiologia e psicofarmacologia da memória, basicamente pela descoberta de que os receptores CB1 estão envolvidos na regulação de diferentes processos celulares e moleculares implicados na plasticidade sináptica no sistema nervoso central (SNC); por esta razão, atualmente, a manipulação farmacológica do sistema canabinoide em diferentes regiões do SNC é considerada uma importante ferramenta no estudo dos mecanismos neurais subjacentes às diferentes fases da memória (Ohno-Shosaku et al., 2001; Brenowitz et al., 2005; Berghuis et al., 2007; Battista et al., 2012; Castillo et al., 2012; Katona e Freund, 2012).

Por exemplo, no hipocampo (estrutura do lobo temporal medial implicada na modulação de memórias contexto-dependentes), a sinalização mediada pelos receptores CB1 desempenha um papel crucial sobre os fenômenos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória, em ratos (De Oliveira Alvares et al. 2005, 2006, 2008a, 2008b e 2010). Além do envolvimento hipocampal sobre a expressão da memória emocional, devemos também destacar que os receptores CB1 estão localizados em diferentes estruturas corticais e subcorticais (Herkenham et al. 1990), onde regulam diversas funções como comportamento alimentar, controle motor, êmese e nocicepção (Piomelli, 2003; Chevraleyre et al., 2006; Castillo et al., 2012; Mechoulam e Parker, 2013). Considerando que os principais efeitos exercidos pelo sistema

canabinoide na transmissão sináptica no SNC estejam intimamente relacionados à regulação da neurotransmissão (controlando a liberação de neurotransmissores como glutamato e GABA), é notável seu envolvimento no processamento da memória, particularmente por modular os mecanismos relacionados à potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) (Ohno-Shosaku et al., 2001; De Oliveira Alvares et al., 2005; Chevaleyre et al., 2006; Berghuis et al., 2007; Heifets e Castillo, 2009; Castillo et al., 2012; Katona e Freund, 2012; Mechoulam e Parker, 2013).

O córtex retrosplenial (RSC), por sua vez, anatomicamente posicionado nas margens do esplênio do corpo caloso de mamíferos, está conectado reciprocamente com múltiplas áreas corticais e subcorticais (Maddock, 1999; Vogt et al., 2000; Vann et al., 2009). Em humanos, devido sua posição estratégica no encéfalo, tem sido demonstrado que o RSC está implicado em importantes funções neuropsicológicas como planejamento, navegação e memória episódica; ademais, o RSC é considerado a estrutura cortical com maior nível de ativação mediante a evocação de memórias emocionalmente marcantes, conforme apontam exames de neuroimagem funcional (Maddock, 1999; Vogt., 2000; Vann et al., 2009; Sartory et al., 2013). De modo similar, em roedores, tem sido demonstrado que o RSC participa tanto do armazenamento quanto da evocação da informação espacial (Czajkowski et al. 2014) e aversiva (Mello e Souza et al., 1999; Souza et al., 2002; Cooper e Mizumori, 2001; Corcoran et al. 2011; Katche et al., 2013a e 2013b). Foi descrito, também, que o RSC e o hipocampo modulam as memórias contextuais (tanto espaciais quanto emocionais) através de mecanismos moleculares semelhantes (Cooper e Mizumori, 2001; Katche et al., 2013a; 2013b). Portanto, considerando que o hipocampo e o RSC possuem funções similares no processamento e armazenamento da informação contextual, perguntamo-nos: “Seria o papel exercido pelo sistema canabinoide do RSC similar ao hipocampal durante a modulação das diferentes fases da memória emocional?”.

Com relação aos mecanismos neurobiológicos subjacentes às diferentes fases da memória avaliada em tarefas aversivas em roedores, apesar dos efeitos da manipulação farmacológica do sistema canabinoide estar descrita no hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2005, 2006, 2008a, 2008b e 2010), na amígdala (Marsicano et al., 2002; Lin et al., 2006) e no córtex pré-frontal medial (Morena et al., 2014), sua

função no RSC permanece desconhecida. Esta dissertação de mestrado explora o papel do sistema RSC-CB1 sobre os fenômenos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória emocional, em ratos Wistar machos adultos. Nossos resultados foram publicados na revista *Learning & Memory*, redigidos no formato de *brief communication*, intitulado *The cannabinoid system in the retrosplenial cortex modulates fear memory consolidation, reconsolidation, and extinction*.

Apresentamos, a seguir, os principais fundamentos deste estudo.

1.1 Definições gerais de memória

Ao passo que diariamente adquirimos novas informações através dos nossos sentidos, continuamente evocamos registros do passado para planejarmos nossas ações no presente e no futuro. Entendemos esta capacidade mnemônica como o principal elemento da cognição humana e, sem dúvidas, suas características formam a base da individualidade. Ademais, a habilidade de memorização tem grande importância adaptativa às diferentes espécies, pois é a principal ferramenta que permite aos animais modificarem seus comportamentos para interagirem de maneira progressivamente mais eficiente e segura com o ambiente. Desta forma, definimos a memória como o registro de informações adquiridas através de experiências (Kandel, 2000; McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002).

De acordo como ilustrado na Figura 1, a memória compreende uma sequência de processos divididos e bem estabelecidos. Durante a *aquisição*, um período de exposição à experiência que dura de segundos a poucos minutos (e que não depende de síntese proteica e da reorganização permanente dos espinhos dendríticos), as informações provenientes do ambiente permanecem *online* na memória de trabalho, guiando, assim, o comportamento dirigido a uma meta (Izquierdo, 2002). É importante destacar que a grande maioria das informações contidas na memória de trabalho não são consolidadas enquanto registros de longa duração. Neste sentido, o esquecimento da memória de curta duração (induzido pela interferência de múltiplas informações que competem entre si no momento da aquisição) é vital para que apenas memórias

relevantes sejam realmente internalizadas enquanto experiências de longa duração (Hardt et al., 2013).



Figura 1. Fases da memória. Descrição no texto. Baseado em Izquierdo (2002).

A *consolidação*, por sua vez, é um processo que depende da síntese de novas proteínas e da subsequente reorganização macromolecular dos espinhos dendríticos em neurônios excitatórios nas diferentes regiões do SNC – correspondentes a tipos específicos de memória (Kandel, 2000; McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002); aqui, entende-se que após a aquisição, a memória passa de um período instável (ou lábil, que é suscetível à modificações/interferências) para um estado de estabilização, quando ocorre o real armazenamento (ou internalização) da experiência. Assim sendo, quando um tipo específico de memória é consolidado (diferente da memória de curta duração), seu conteúdo pode ser evocado ao longo do tempo (Kandel, 2000; McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002).

Durante a fase de *evocação* de uma memória consolidada, dois processos antagônicos podem ser desencadeados, fenômenos conhecidos por *reconsolidação* (Nader et al., 2000) e *extinção* (Pavlov, 1927; Quirk e Mueller, 2008). Por exemplo, se a informação é relevante, a memória pode ser reconsolidada para persistir ao longo do tempo; caso contrário, seu conteúdo tenderá a ser extinto. Portanto, compreende-se que a evocação da memória não é um processo passivo, pois durante a evocação diferentes cascatas bioquímicas podem ser ativadas a fim de “resolver” o rumo da memória evocada. É importante mencionar que o sentido biológico da reconsolidação da memória é manter e/ou acrescentar novas informações à memória original (atualizando-a) (Nader et al., 2000; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015), enquanto o papel da extinção é de formar uma nova associação com significado oposto da memória original (Quirk e Muller, 2008).

Os processos celulares e moleculares envolvidos na consolidação da memória de longa duração estão bem estabelecidos, particularmente na região CA1 do hipocampo dorsal (Izquierdo, 2006; Kandel et al., 2014). Por exemplo, além da característica influência hormonal sobre o processo de consolidação da informação emocional, como a síntese e liberação de glicocorticoides (McGaugh, 2000), podemos resumir as bases biológicas da consolidação da seguinte forma: o influxo de Ca^{2+} pós-sináptico através da ativação dos receptores NMDA e dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, seguido da ativação de diferentes proteínas cinases e de fatores de transcrição gênica, regulam o tráfego e a manutenção dos receptores AMPA – que estão implicados na estabilização do traço da memória (Izquierdo, 2006; Kandel et al., 2014). A exocitose e a estabilização dos receptores AMPA na densidade pós-sináptica dos neurônios glutamatérgicos é resultante da sinalização mediada pelo Ca^{2+} e da ativação de proteínas cinases (como CaMKII, PKC e PKA) (Kandel et al., 2014), sendo a estabilização destes receptores (especialmente da sua subunidade GluA2) o principal fator responsável pela manutenção da memória ao longo do tempo (Migues et al., 2010; Kandel et al., 2014). É válido destacar que, além do hipocampo, o RSC também está envolvido na consolidação da memória contexto-dependente, tanto de conteúdo espacial (Czajkowski et al. 2014) quanto aversivo (Mello e Souza et al., 2002; Katche et al., 2013a e 2013b). Ademais, a administração intra-hipocampal pós-treino de AM251, um antagonista seletivo do receptor CB1, causa amnésia retrógrada na tarefa de esquivas inibitória em ratos, indicando que o receptor CB1 participa da modulação da consolidação da memória de longa duração (De Oliveira Alvares et al., 2005).

O fenômeno da reconsolidação da memória emocional está bem descrito na amígdala basolateral (Nader et al., 2000) e no hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2013; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015). A reconsolidação é precedida pela labilização (ou desestabilização) do traço da memória e não ocorre se esta for bloqueada, por exemplo, com ifenprodil (antagonista seletivo da subunidade GluN2B do receptor NMDA) (Ben Mamou et al., 2006; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015) ou nimodipina, um bloqueador seletivo dos canais de cálcio dependentes de voltagem

do tipo L (LVDC) (Suzuki et al., 2008; De Oliveira Alvares et al., 2013; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015), dados que sugerem que a sinalização mediada pelo Ca^{2+} possui um papel fundamental na desestabilização (labilização) e reestabilização (reconsolidação) da memória. O mesmo efeito de bloqueio da labilização da memória aversiva é encontrado quando o receptor CB1 é inativado (Suzuki et al., 2008) e, além disso, dados do nosso grupo demonstraram que o sistema canabinoide hipocampal está implicado na reconsolidação da memória adquirida na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) (De Oliveira Alvares et al., 2008). Neste cenário, embora Corcoran e colaboradores tenham demonstrado um papel crucial do RSC sobre a evocação de memória aversivas recentes e remotas (Corcoran et al., 2011), o papel do RSC especificamente sobre a reconsolidação da memória permanece desconhecido.

A *extinção* da memória aversiva contexto-dependente também requer a ativação do hipocampo e da amígdala, embora a principal estrutura envolvida na memória de extinção seja o córtex pré-frontal medial – que exerce função inibitória sobre a atividade da amígdala, suprimindo temporariamente a resposta condicionada de medo (Izquierdo, 2002; Milad e Quirk, 2002). Recentemente, dois trabalhos demonstraram que o RSC está associado com a memória de extinção, em ratos (Corcoran et al. 2013; Kwapis et al. 2014). Além disso, sabemos que a sinalização mediada pelo sistema canabinoide desempenha um papel crucial na modulação da extinção (Marsicano et al. 2002; Chhatwal et al. 2005; Pamplona et al. 2006; Lutz, 2007; De Oliveira Alvares et al. 2008a e 2008b), entretanto, o papel deste sistema no RSC permanece indefinido.

Utilizando o paradigma pavloviano de medo condicionado em roedores, conforme observado acima, importantes evidências sugerem que o sistema canabinoide é recrutado durante os processos de consolidação (De Oliveira Alvares et al., 2005, 2006 e 2010; Campolongo et al., 2009; Morena et al., 2014), reconsolidação (Lin et al., 2006; De Oliveira Alvares et al., 2008a e 2008) e extinção da memória (Marsicano et al., 2002; Chhatwal et al., 2005; Pamplona et al., 2006; Lutz, 2007; De Oliveira Alvares et al., 2008a e 2008b). Estes efeitos devem-se essencialmente a ativação dos receptores do tipo CB1 no hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2005, 2006 e 2010), na amígdala (Marsicano et al., 2002; Lin et al., 2006; Campolongo et al., 2009) e no córtex pré-frontal medial (Morena et al., 2014). No entanto, a sinalização mediada pelo sistema RSC-CB1

e, em particular, seu papel sobre a memória emocional, permanecem desconhecidos. Neste trabalho, objetivou-se investigar o potencial efeito da manipulação farmacológica do sistema canabinoide no RSC sobre a modulação das diferentes fases da memória emocional.

1.2 O córtex retrosplenial: conexões e funções

O RSC humano é conhecido por integrar diferentes estímulos sensoriais através de robustas conexões recíprocas com a região anterior do tálamo e estruturas corticais e subcorticais que desempenham um papel central na modulação da memória (Maddock, 1999; Vogt et al., 2000; Vann et al., 2009) (Figura 2).

Similar ao hipocampo, o RSC em humanos está envolvido no processamento da memória episódica, participando fundamentalmente tanto no armazenamento quanto na evocação da informação autobiográfica (Maddock, 1999; Vann et al., 2009). Neste panorama, estudos de ressonância magnética funcional demonstraram que o RSC é a estrutura encefálica que expressa maior nível de ativação durante a evocação de memórias emocionalmente marcantes (Maddock, 1999; Sartory et al., 2013). Tão logo, o RSC tem sido apontado como uma das principais estruturas encefálicas relacionadas à fisiopatologia do transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) (Sartory et al., 2013).

Pacientes com lesões no RSC comumente apresentam déficits nas funções de navegação, planejamento e memória (Vann et al., 2009), prejuízos similares aos encontrados em pacientes com lesões de estruturas do lobo temporal medial (Frankland e Bontempi, 2005). Estas lesões são, com frequência, decorrentes de acidentes vasculares encefálicos ou devido ao desenvolvimento de neoplasias no córtex cingulado posterior ou em regiões adjacentes, incluindo áreas parieto-occipitais e temporo-occipitais mediais (Vogt et al., 2000; Vann et al., 2009). Ainda, observou-se que o hipometabolismo do RSC está intimamente relacionado com os estágios iniciais da doença de Alzheimer (Minoshima, 1997).

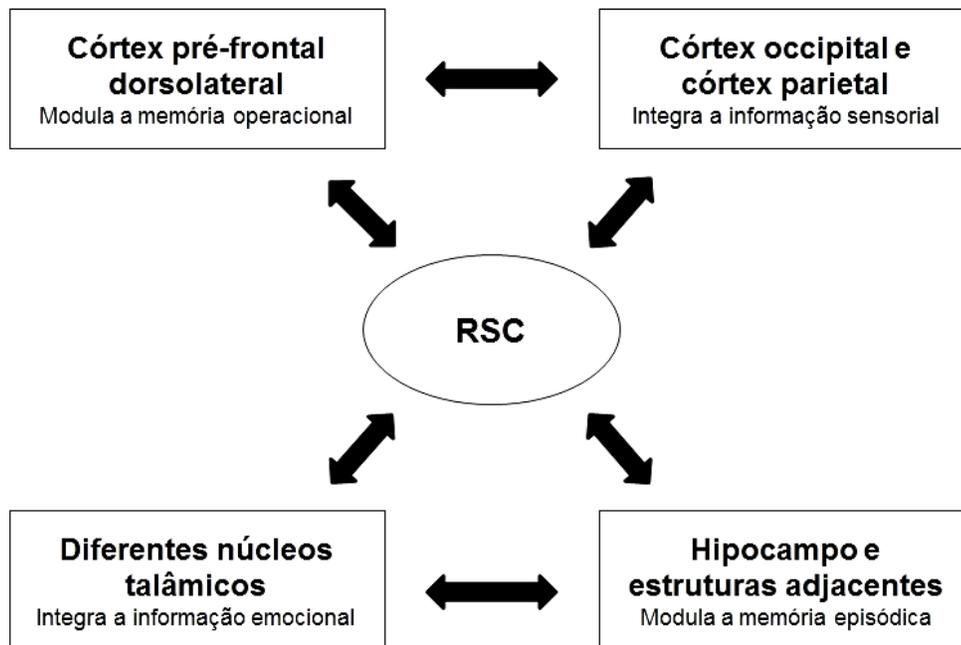


Figura 2. Ilustração das principais conexões do RSC no encéfalo humano. Por estar anatomicamente posicionado na região posterior do córtex cingulado, assim como no rato e em outros mamíferos, o RSC possui conexões recíprocas com diferentes estruturas do córtex cerebral, do tálamo e da formação hipocampal. Estas conexões justificam seu papel na modulação de diferentes funções mentais superiores. Baseado em Vann e colaboradores (2009).

Em roedores, o RSC também é considerado como uma importante área associativa que processa diferentes sinais entre a formação hipocampal, áreas talâmicas e o córtex pré-frontal; desta forma, regula a informação sensorial proveniente do neocórtex visual, auditivo e motor (Vann et al., 2009). Por estes motivos, vários estudos indicam que o RSC possui um papel elementar na modulação da memória, tanto de conteúdo espacial quanto emocional (Maddock 1999; Mello e Souza et al. 1999; Souza et al. 2002; Vogt et al. 2002; Vann et al. 2009; Corcoran et al. 2011; Katche et al. 2013a and 2013b; Czajkowski et al. 2014; Kwapis et al., 2014).

A Figura 3 apresenta as principais conexões das diferentes sub-regiões do RSC (granular e disgranular), em roedores (Vann et al., 2009). Neste trabalho, para estudarmos os efeitos da manipulação farmacológica do sistema canabinoide no RSC, especificamente do seu papel modulatório durante as diferentes fases da memória emocional, os fármacos AM251 (antagonista CB1) e CP55940 (agonista canabinoide CB1/CB2) foram injetados bilateralmente em ambas as regiões (granular e disgranular).

O posicionamento das cânulas e a representação da difusão das drogas no parênquima encefálico estão ilustrados na Figura 7, na sessão de materiais e métodos.

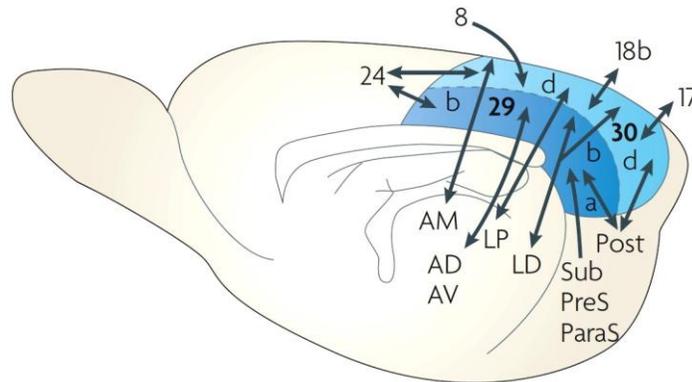


Figura 3. Em roedores, o RSC está conectado com diferentes estruturas límbicas e corticais. O RSC subdivide-se em duas camadas: *granular* (representado pelas regiões *a* e *b*) e *disgranular* (em *d*). O RSC granular corresponde à área 29 de Brodmann, áreas 8, 17, 18 e 24 de Brodmann) e áreas da formação hipocampal. *Legenda:* AD, núcleo anterior dorsal do tálamo; AM, núcleo anterior medial do tálamo; AV, núcleo anterior ventral do tálamo; LD, núcleo lateral dorsal do tálamo; LP, núcleo lateral posterior do tálamo; Sub, subículo (Post, PreS e ParaS: sub-regiões do subículo). Adaptado de Vann e colaboradores (2009).

1.3 Visão geral do sistema endocanabinoide

Nosso conhecimento acerca dos processos celulares e moleculares envolvidos na plasticidade sináptica do SNC evoluiu consideravelmente a partir da descoberta do sistema endocanabinoide. Estes achados devem-se particularmente (1) a identificação do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (Mechoulam e Gaoni, 1964), o principal componente psicoativo da planta *cannabis sativa* (popularmente conhecida como maconha), (2) a identificação e clonagem do receptor canabinoide CB1 e (3) a caracterização dos ligantes endógenos anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Herkenham et al. 1990; Matsuda et al. 1990; Devane et al., 1992; Piomelli, 2003; Battista et al., 2012; Castillo et al., 2012).

Particularmente nos últimos 15 anos, um grande número de publicações tem demonstrado que o sistema endocanabinoide é um importante regulador da plasticidade sináptica no SNC, estando implicado na modulação de diversas funções que incluem controle motor, comportamento alimentar, dor, aprendizagem e memória

(Piomelli, 2003; Castillo et al., 2012; Katona e Freund, 2013; Mechoulam e Parker, 2013). Portanto, tem sido postulado que disfunções da sinalização mediada por este sistema estejam implicadas na fisiopatologia de diferentes doenças neuropsiquiátricas, como esquizofrenia e transtornos da ansiedade e do humor (para uma revisão, ver Battista et al., 2012; Castillo et al., 2012; Mechoulam e Parker, 2013).

Além de estarem expressos no RSC (Moldrich e Wenger, 2000), os receptores canabinoides estão amplamente distribuídos em diversas áreas como hipocampo, córtex cerebral, núcleos da base e cerebelo (Herkenham et al., 1990). Estes receptores são conhecidos como uma das classes mais abundantes de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas $G_{i/o}$, pelos quais se destacam os receptores CB1 (que exercem suas funções predominantemente no SNC) e os receptores CB2 (com funções intimamente associadas ao sistema imunológico em tecidos periféricos) (Piomelli, 2003; Chevalleyre et al., 2006; Battista et al., 2012; Castillo et al., 2012).

Tem sido demonstrado que uma das principais funções dos receptores canabinoides é de inibir a liberação de neurotransmissores, essencialmente em sinapses GABAérgicas (Katona et al., 1999) e glutamatérgicas (Katona et al., 2006). Embora também tenha sido descrita a participação deste sistema na regulação da gliotransmissão glutamatérgica pelos astrócitos (Navarrete et al., 2008), o mecanismo de ação mais estudado mediado pelos endocanabinoides é o de sinalização retrógrada (Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson e Nicoll, 2002; Castillo et al., 2012; Mechoulam e Parker, 2013). A Figura 4 ilustra os principais mecanismos de sinalização mediada pelos endocanabinoides. Basicamente, por estarem acoplados a proteínas $G_{i/o}$, tem sido demonstrado que estes receptores exercem seus efeitos principalmente a partir da inibição da enzima adenilato ciclase com conseqüente diminuição de AMPc (para uma revisão dos mecanismos de transdução de sinal, ver Piomelli, 2003).

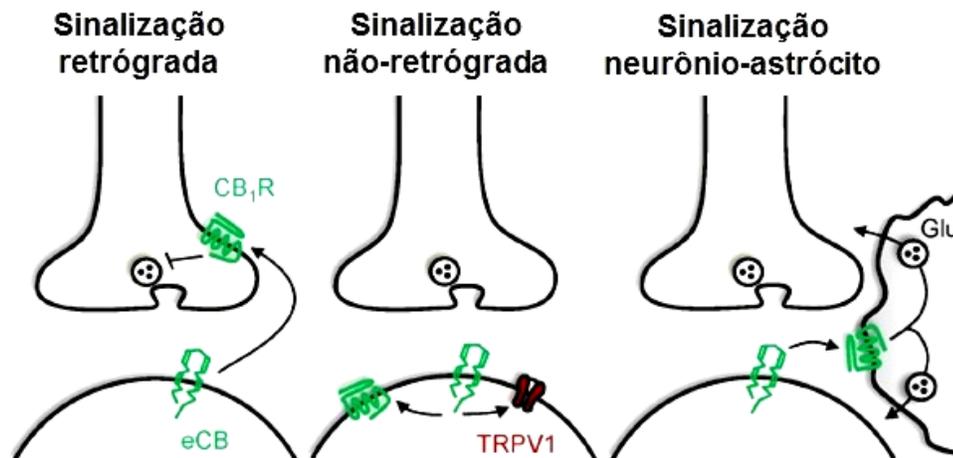


Figura 4. Principais tipos de sinalização mediada pelos endocanabinoides. Na sinalização retrógrada (painel esquerdo), os endocanabinoides (dos quais se destacam o 2-AG e a AEA) são sintetizados no neurônio pós-sináptico e mobilizados ao neurônio pré-sináptico, onde ativam os receptores CB1 acoplados a uma proteína G inibitória, suprimindo a transmissão sináptica. No painel central é ilustrado um tipo de sinalização não-retrógrada, quando 2-AG e AEA ativam receptores CB1 e TRPV1 em neurônios pós-sinápticos. No caso da sinalização envolvendo a transmissão neuro-glial, os endocanabinoides liberados da célula pós-sináptica estimulam receptores CB1 localizados nos astrócitos para regularem a gliotransmissão glutamatérgica (painel direito). Baseado em Castillo e colaboradores (2012).

Especificamente no caso da sinalização retrógrada (Figura 5), temos o seguinte cenário: após a síntese de endocanabinoides no neurônio pós-sináptico mediante a ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem ou de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, o 2-AG e a AEA ativam os receptores CB1 localizados nos terminais pré-sinápticos inibitórios e excitatórios, onde (1) diminuem a condutância de Ca^{2+} intracelular, regulando a atividade dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, (2) aumentam a condutância de K^{+} intracelular e (3) estimulam a proteína cinase MAPK (Ameri, 1999; Wilson e Nicoll, 2002; Piomelli, 2003; Castillo et al., 2012). Juntos, estes efeitos resumem o papel fisiológico do sistema canabinoide, essencialmente a partir da supressão (de curta ou de longa duração) da transmissão sináptica. Por estas características, tem sido postulado que este sistema modula os dois principais correlatos eletrofisiológicos da memória: a potenciação de longa duração (do inglês, LTP) e a depressão de longa duração (LTD) (Marsicano et al., 2002; De Oliveira Alvares et al., 2006; Castillo et al., 2012; Mechoulam e Parker, 2013).

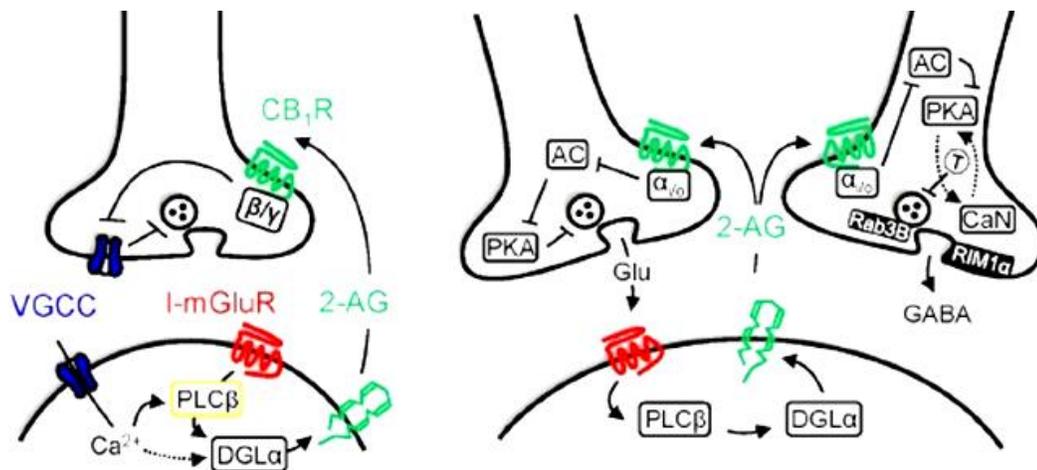


Figura 5. Mecanismos moleculares envolvidos na plasticidade sináptica de curta e de longa duração mediada pelo sistema endocanabinoide. Painel esquerdo: modelo proposto de plasticidade sináptica de curta duração. O influxo de Ca^{2+} pós-sináptico pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem promovem a síntese de endocanabinoides pela ativação da enzima diacilglicerol lipase (DGL), através de um mecanismo ainda desconhecido; a síntese de endocanabinoides também pode ocorrer pela ativação de receptores metabotrópicos glutamatergicos do tipo I (I-mGluR), que ativam a proteína fosfolipase β (PLC β). No painel direito está representado o papel dos endocanabinoides sobre a modulação da plasticidade sináptica de longa duração, com ênfase na sinalização GABAérgica e glutamatergica. Baseado em Castillo e colaboradores (2012).

1.4 Sistema endocanabinoide e memória emocional

Como mencionado anteriormente, por seus efeitos sobre a neurotransmissão excitatória e inibitória, predominantemente a partir de um mecanismo de sinalização retrógrada, sabemos que o sistema canabinoide desempenha um papel essencial na plasticidade sináptica de curta e de longa duração no SNC, influenciando, assim, na modulação da memória (Ohno-Shosaku et al., 2001; Marsicano et al., 2002; Wilson e Nicoll, 2002; Piomelli, 2003; Castillo et al., 2012; Katona e Freund, 2013; Mechoulam e Parker, 2013) (Figura 5).

Além dos efeitos sobre os processos de LTP e LTD, é imprescindível destacarmos que a síntese de endocanabinoides e a ativação dos receptores CB1 são recrutadas mediante situações de estresse, sugerindo uma íntima relação entre os sistemas canabinoide e glicocorticoide na modulação da memória emocional (Hill e McEwen, 2009; Hill et al., 2010) (Figura 6). Fundamentalmente, estes sistemas regulam os componentes autonômicos associados à experiência emocional através da síntese

de noradrenalina e glicocorticoides pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), conhecido por facilitar a consolidação do traço mnemônico durante situações de estresse (Hill e McEwen, 2009; Campolongo et al., 2009; De Oliveira Alvares et al., 2010; Hill et al., 2010). A Figura 6 ilustra as interações destes sistemas na transmissão noradrenérgica na amígdala durante a formação da memória aversiva. Pressupõe-se, aqui, que este mecanismo seja similar em outras estruturas encefálicas, uma vez que o estresse desencadeia a síntese de endocanabinoides no SNC (Hohmann et al., 2005).

Utilizando diferentes paradigmas para a avaliação da memória emocional (como o condicionamento aversivo ao contexto, a esQUIVA inibitória e o condicionamento aversivo ao som), estudos realizados em roedores tem demonstrado um importante papel da sinalização mediada pelos receptores CB1 sobre a consolidação (De Oliveira Alvares et al., 2005 e 2006; Campolongo et al., 2009), reconsolidação (Lin et al., 2006; De Oliveira Alvares et al., 2008; Ratano et al., 2014) e extinção da memória (Marsicano et al. 2002; Chhatwal et al. 2005; Pamplona et al. 2006; Lutz 2007; De Oliveira Alvares et al. 2008b). Tão logo, a partir destes e outros avanços, o sistema endocanabinoide tem sido considerado como um novo alvo para o desenvolvimento de psicofármacos utilizados na prática clínica para o tratamento de psicopatologias como depressão maior e transtornos relacionados à ansiedade e ao estresse, como é o caso do TEPT (Piomelli, 2003; Battista et al., 2012; Castillo et al., 2012; Mechoulam e Parker, 2013).

Embora estes efeitos estejam bem descritos em estruturas como amígdala basolateral (Marsicano et al., 2002; Lin et al., 2006; Campolongo et al., 2009), hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2005, 2006 e 2010) e córtex pré-frontal medial (Morena et al., 2014), a participação deste sistema no RSC permanece totalmente desconhecida.

Nas sessões seguintes serão apresentados os objetivos deste trabalho e os principais resultados obtidos nos protocolos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória de CAC, em ratos, mediante a manipulação farmacológica do sistema canabinoide intra-RSC (com AM251 e CP55940) em diferentes tempos: pós-treino, pré-reativação, pós-reativação e pré-teste.

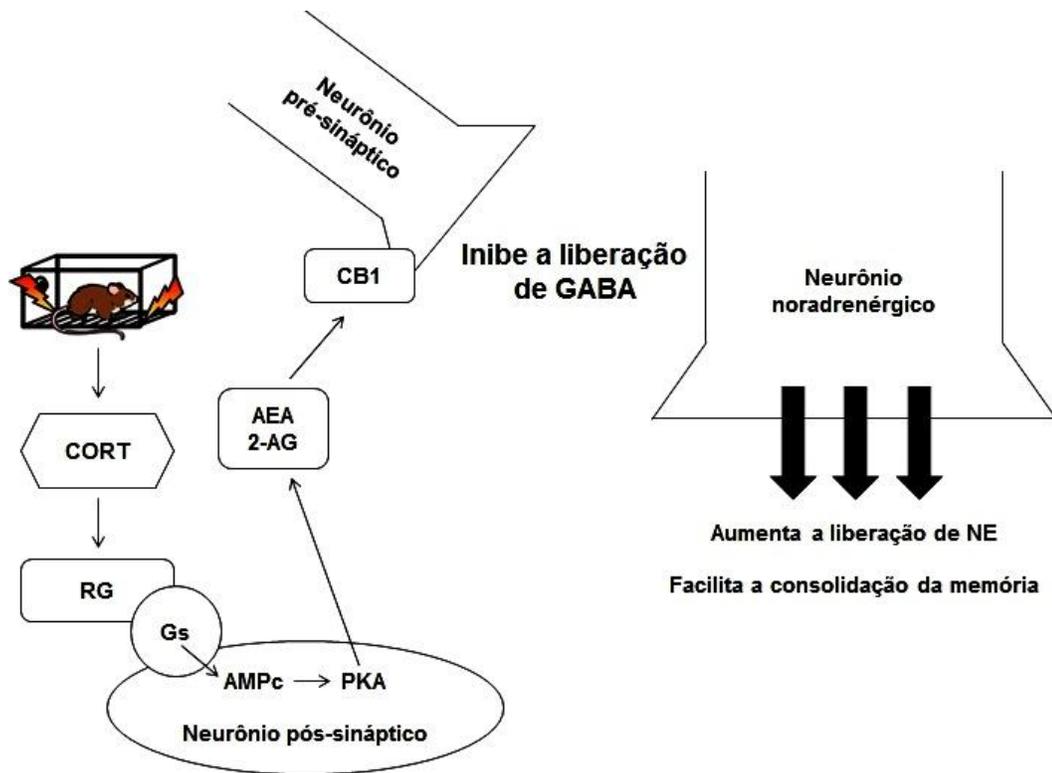


Figura 6. Interações entre os sistemas glicocorticoide e endocanabinoide modulam a transmissão noradrenérgica na amígdala basolateral durante a consolidação da memória aversiva de longa duração, em ratos. Situações de estresse ativam o eixo HHA e a liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea ativam receptores glicocorticoides na amígdala. A síntese de endocanabinoides pela ativação da PKA produzidos na célula pós-sináptica ativam os receptores CB1 nos terminais axonais pré-sinápticos, que inibem a atividade GABAérgica. A inibição de GABA aumenta a transmissão noradrenérgica e facilita a consolidação da memória. CORT: corticoesterona; RG: receptor glicocorticoide; Gs: proteína G que estimula a formação de AMPc; AEA: anandamida; 2-AG: 2-araquinoilglicerol; NE: noradrenalina. Baseado em Hill e McEwen (2009).

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o envolvimento do receptor canabinoide do tipo CB1 no córtex retrosplenial sobre a modulação das fases de consolidação, reconsolidação e extinção da memória emocional associada ao contexto, em ratos Wistar machos adultos.

2.1 Objetivos específicos

- 1) *Protocolo de padronização cirúrgica*: investigar os efeitos da inativação temporária do RSC sobre a evocação da memória de longa duração adquirida na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (CAC), a partir da infusão bilateral intra-RSC de muscimol (agonista do receptor GABA_A) ou veículo 20 min antes da sessão de teste conduzida 48 h após o aprendizado; um segundo teste, realizado no dia seguinte sem o efeito da droga, deve caracterizar o prejuízo transitório sobre a evocação da memória.
- 2) *Protocolo de consolidação da memória*: avaliar os efeitos da administração bilateral intra-RSC de AM251 (antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB1), CP55940 (agonista dos receptores canabinoides CB1/CB2) ou veículo imediatamente após o treino no CAC, sendo o teste de retenção da memória realizado 48 h após o condicionamento.
- 3) *Protocolo de reconsolidação da memória*: avaliar os efeitos da administração bilateral intra-RSC de AM251, CP55940 ou veículo imediatamente após uma sessão de reativação curta (de 4 min) no CAC, sendo o teste de retenção da memória de longa duração conduzido 24 h após da reativação.
- 4) *Protocolo de consolidação da memória de extinção*: avaliar os efeitos da administração bilateral intra-RSC de AM251, CP55940 ou veículo infundidos 20 min antes de uma reativação longa (de 30 min) no CAC conduzida 48 h após o

treino, sendo o teste dividido em duas sessões: teste 1, realizado 24 h após a sessão de extinção (avaliação da consolidação da memória de extinção) e teste 2, conduzido 14 dias após o teste 1 (avaliação da recuperação espontânea da memória original).

- 5) *Protocolo de reinstalação da memória de extinção*: avaliar os efeitos da administração intra-RSC de CP55940 ou veículo infundidos 20 min antes da sessão de extinção no CAC, sendo os animais expostos a um contexto novo no dia seguinte (choque não pareado no contexto B) e testados 24 h depois no CAC para avaliarmos se a memória original é recuperada (reinstalada).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos e bioéticos adotados no presente trabalho seguem as diretrizes preconizadas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), pela *International Brain Research Organization* (IBRO), pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), bem como também baseados nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados 115 ratos Wistar machos (idade de 2 a 3 meses, pesando entre 300 e 350 g) fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do CEUA e do ICBS da UFRGS.

Estes animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biofísica (Instituto de Biociências, Laboratório de Neurobiologia da Memória), acondicionados em caixas plásticas (dimensões de 65 x 25 x 15 cm) cobertas com grades metálicas e forradas com maravalha (4 a 5 animais por caixa); o ambiente do biotério é climatizado (23°C) e com umidade constante e ciclo de iluminação controlado (12 h claro/12 h escuro, com luzes acesas das 07 às 19h). Água e alimento foram fornecidos *ad libitum*.

3.2 Procedimentos cirúrgicos e infusão dos fármacos

Aspectos gerais da craniotomia: os animais foram individualmente anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p) contendo cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, respectivamente); na ausência da resposta de reflexo oculomotor e de dor, os animais receberam uma injeção intramuscular do antibiótico tilosina (0.3 mg/kg), que previne infecções durante a operação e no período de recuperação após a cirurgia. Estes

animais foram então gentilmente posicionados no aparelho estereotáxico (modelo 1404, fabricação David Kopf), sendo o topo do crânio exposto a partir de incisão aproximada de 1,5 cm com bisturi nº 20/21, seguido de craniotomia bilateral com uso de broca odontológica. Na região póstero-lateral do osso parietal esquerdo, um parafuso foi colocado para aumentar a fixação do capacete (feito de acrílico dentário diluído em solvente). A cirurgia para implantação bilateral de cânulas de aço inoxidável na região posterior do RSC segue de acordo com as coordenadas obtidas a partir do bregma: AP (anteroposterior) – 5.80 mm; ML (médio-lateral) – 0.60 mm; DV (dorsoventral) – 1.20 mm (ver Figura 5). Após a secagem do acrílico dentário, a torre do estereotáxico móvel é delicadamente removida e imediatamente depois é colocado em cada cânula um fio metálico (do mesmo tamanho, 0.8 mm) para evitar a obstrução pelo refluxo de sangue e líquido cefalorraquidiano. Este metucioso processo, com duração total aproximada de 30 min, resulta no livre acesso para a injeção de substâncias no parênquima encefálico dos animais (para detalhes destes procedimentos, ver Mello e Souza et al., 1999; Souza et al., 2002). A Figura 7 ilustra o posicionamento das cânulas (painel esquerdo) e a representação da difusão dos fármacos no parênquima encefálico (painel direito).



Figura 7. Ilustração do posicionamento das cânulas e representação da difusão dos fármacos no RSC. Respectivamente, – 5.20 e – 5.80 mm são medidas obtidas a partir do bregma no plano anteroposterior, correspondente à difusão das drogas. A região mais escura, no painel inferior direito, de – 5.80 mm, representa o local exato das infusões, sendo que neste protocolo as drogas difundiram-se no eixo anteroposterior, sem afetar estruturas adjacentes da formação hipocampal, verificadas individualmente na histologia. Adaptado de Paxinos e Watson (1997).

Aspectos gerais da recuperação pós-cirúrgica: foi determinado um período mínimo de 7 dias de recuperação pós-cirúrgica antes da realização dos procedimentos comportamentais, de acordo com estudos preliminares do nosso grupo.

Aspectos gerais da infusão dos fármacos: os animais foram aleatoriamente divididos em diferentes grupos, de acordo com o experimento, sendo as drogas infundidas intra-RSC através de agulhas *mizzy* (uma para cada cânula) conectadas a um tubo de polietileno PE10 ligado a uma microseringa Hamilton de 10 μ l; o tamanho da agulha *mizzy* é de 1 mm superior às cânulas (0,9 mm). A injeção é feita através de uma bomba de infusão com motor de passo e fluxo de 20 μ l/h (isto é, 0,5 μ l/90 s). Completada a infusão bilateral, aguardou-se 1 min antes de remover a microseringa para garantir a absorção/difusão das drogas no tecido, minimizando seu refluxo.

3.3 Paradigma pavloviano de condicionamento aversivo ao contexto (CAC)

Um teste mundialmente conhecido para a avaliação da memória em roedores é o paradigma de CAC, classicamente reconhecido como hipocampo-dependente. Esta tarefa é realizada em uma caixa de condicionamento de dimensões 25 x 25 x 25 cm, cuja parede frontal é de acrílico, pelo qual podemos observar as respostas comportamentais do animal, como *freezing* (ou seja, uma resposta de congelamento, avaliada visualmente e registrada de minuto a minuto com o uso de um cronômetro, que foi utilizada como índice de memória). Seu assoalho é composto por uma grade de barras de bronze de 1 mm de diâmetro, distantes 1 cm uma da outra; através desta grade são aplicadas correntes elétricas de diferentes intensidades que variam de 0,1 a 1 mA. Neste trabalho utilizamos uma corrente de 0,5 mA, que é considerado um choque de intensidade média.

De acordo com o condicionamento clássico pavloviano, quando um estímulo condicionado (EC) – *que inicialmente não produz uma resposta comportamental significativa* – é associado com um estímulo incondicionado (EI), como um choque de 0,5 mA, o animal passa a produzir uma *resposta condicionada* na presença do EC. Este fenômeno é conhecido por indicar o aprendizado de um comportamento novo (Pavlov,

1997). Se o EC for apresentado sem o EI por um curto período de tempo (p. ex.: durante uma reativação curta, de 4 min, conduzida 48 h após o condicionamento), o traço da memória original pode ser atualizado, no fenômeno conhecido por reconsolidação da memória (Nader et al., 2000). Todavia, se o EC for repetidamente apresentado sem o EI (p. ex.: durante uma sessão de reativação longa, de 30 min, conduzida 48 h após o treino), a tendência é que o animal crie uma nova associação (isto é, uma nova memória) que inibe o traço original. Entende-se esta associação de EC sem EI como um processo que diminui a resposta comportamental condicionada, fenômeno conhecido por *extinção*, cuja função é inibir temporariamente a resposta condicionada sem induzir, no entanto, seu esquecimento (Pavlov, 1927; Izquierdo, 2002; Quirck e Mueller, 2008).

Cada protocolo experimental para a avaliação de diferentes fases da memória (consolidação, reconsolidação e extinção) é descrito com detalhes na sessão de resultados.

3.4 Fármacos

Para a infusão bilateral intra-RSC em diferentes protocolos (pós-treino, pré-reativação ou pós-reativação) foram utilizados os seguintes fármacos: (1) AM251, um antagonista seletivo dos receptores CB1 (Tocris, 11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), (2) CP55940, um agonista dos receptores CB1/CB2 (Tocris, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou seu respectivo veículo (3) PBS contendo DMSO 8% (0,5 μl). Vale destacar que no início deste trabalho, para padronizarmos esta cirurgia no nosso laboratório, utilizamos o agonista de curta duração do receptor GABA_A muscimol (Sigma, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) como ferramenta farmacológica para inativarmos temporariamente o RSC em um protocolo de evocação da memória. O volume total de todos os fármacos foi determinado em 0,5 μl /hemisfério.

3.5 Controle histológico da posição das cânulas no RSC

Ao término das sessões de CAC, independente do protocolo experimental, os animais foram individualmente sacrificados mediante anestesia geral (solução contendo 50 mg/kg de tiopental e 10 mg/kg de lidocaína), seguido de infusão bilateral de azul de metileno (procedimento com duração de aproximadamente 5 min). Após a marcação com azul de metileno, os capacetes foram cuidadosamente removidos (evitando lesões teciduais) e os encéfalos então dissecados e diluídos em solução de formaldeído 4% por 72 h. As lâminas foram preparadas a partir de cortes de 50 μ m de espessura utilizando o vibrátomo para a análise microscópica que verifica a posição exata das cânulas. Nas análises estatísticas foram considerados apenas os animais canulados na região de interesse (Figura 7). Os critérios de exclusão foram lesões de corpo caloso ou hipocampo.

3.6 Coleta dos dados e análise estatística

A resposta de congelamento (do inglês, *freezing*), caracterizada pela imobilidade total do animal (exceto dos músculos envolvidos na respiração), foi avaliada de minuto a minuto e usada como índice de memória, expresso em porcentagem. Os dados foram analisados através do teste *t* para amostras independentes, pela ANOVA de uma via ou ANOVA de vias repetidas, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (NK) quando necessário (confiabilidade de 95% para um $P < 0,05$).

3.7 Considerações bioéticas relevantes

De acordo com a Lei nº 11.794/2008, cumprindo o que predica a diretriz legal brasileira, todos os procedimentos experimentais com animais vivos devem envolver o mínimo de desconforto durante os procedimentos experimentais. Como mencionando anteriormente, tais procedimentos foram realizados estritamente de acordo com as recomendações da SBCAL, SBNeC, IBRO, bem como em acordo com as diretrizes do CEUA-UFRGS.

Grau de severidade dos procedimentos adotados: o grau de severidade dos procedimentos invasivos (cirurgia estereotáxica e infusão dos fármacos) e dos protocolos comportamentais (manipulação individual, treino, reativação e teste) foram ambos classificados como *moderado*.

Sacrifício dos animais: todos os animais foram anestesiados com uma injeção i.p de tiopental (50 mg/kg) e lidocaína (10 mg/kg) antes de serem decapitados por guilhotinamento – um procedimento rápido, realizado em uma sala diferente daquela em que os experimentos foram conduzidos e também longe do ratário.

Descarte de carcaças e de outros materiais biológicos: após a retirada do encéfalo, as carcaças dos animais guilhotinados foram armazenados em sacos plásticos brancos, identificados para este fim, devidamente acondicionados em freezer específico para depósito de materiais biológicos. Sua coleta, semanal, foi realizada através de um serviço especializado contratado pela UFRGS mediante licença sob edital (empresa: ABORGAMA). O descarte de materiais utilizados nas cirurgias foi isolado e armazenado em sacos individuais e depositados em caixas de papel identificadas para este fim.

4. RESULTADOS

4.1 Padronização dos procedimentos cirúrgicos e comportamentais: infusão de muscimol intra-RSC pré-teste no CAC

Para padronizarmos a cirurgia do RSC no nosso laboratório, 19 animais foram treinados na tarefa de CAC e infundidos intra-RSC com muscimol ($n = 9$) ou veículo ($n = 10$) 20 min antes do teste 1 conduzido 48 h após o aprendizado (Figura 8A). Conforme demonstrado na figura 8B, o muscimol transitoriamente causa amnésia retrógrada (teste 1), sem efeito significativo no teste 2 conduzido no dia seguinte ($P = 0,04$ e $0,35$, teste t não pareado, respectivamente). Concluindo, demonstramos que o RSC está envolvido na evocação da memória, conforme postulado por Corcoran et al. (2011).

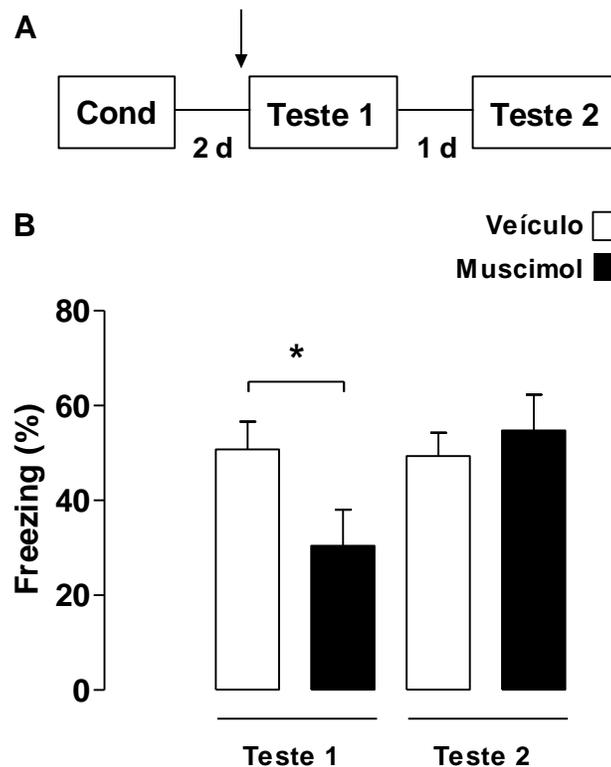


Figura 8. Papel do RSC sobre a evocação da memória aversiva de longa duração. (A) Desenho experimental. **(B)** Efeitos da inibição transitória do RSC sobre a evocação da memória através da administração bilateral de muscimol (agonista de curta duração dos receptores $GABA_A$) ou veículo 20 min antes do teste 1 conduzido 48 h após o condicionamento (painel esquerdo). No painel direito é representado o percentual de freezing durante o teste 2 conduzido no dia seguinte, sem o efeito da droga. Dados expressos como $SEM \pm$. * $P < 0.05$, $n = 9-10$ /grupo.

4.2 Papel do sistema canabinoide no RSC na consolidação da memória

Para estudarmos o envolvimento dos receptores canabinoides no RSC sobre o fenômeno de consolidação da memória aversiva de longa duração, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos e injetados bilateralmente intra-RSC com AM251, CP55940 ou veículo imediatamente após o treino no paradigma de CAC (Figura 9A).

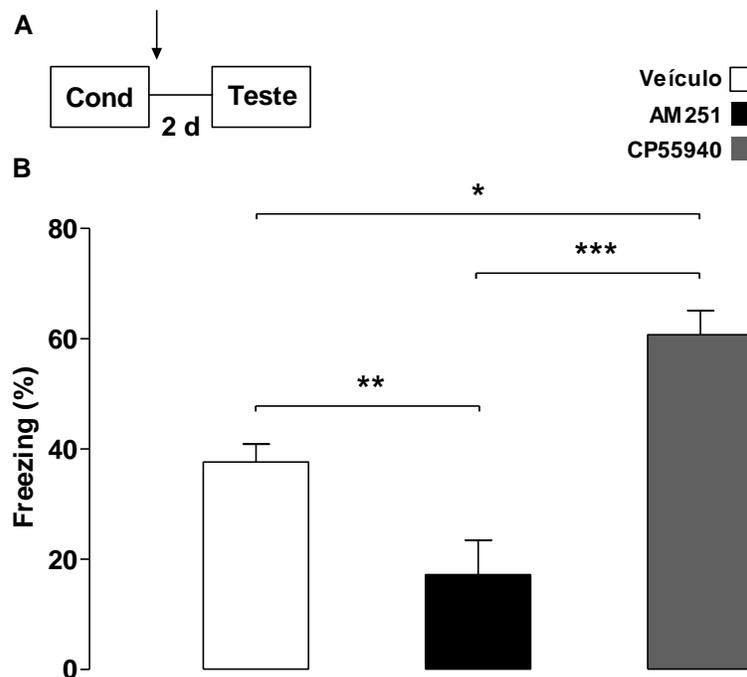


Figura 9. O sistema canabinoide no RSC modula a consolidação da memória aversiva de longa duração. (A) Desenho experimental. (B) Efeitos da infusão imediatamente pós-treino de AM251 ($n = 8$), CP55940 ($n = 4$) ou veículo ($n = 7$) sobre a consolidação da memória aversiva de longa duração. É representado o percentual de freezing durante o teste de retenção da memória conduzido 48 h após o treino. Dados expressos como SEM \pm . * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Neste protocolo, o comportamento de freezing (indicador da retenção da memória) foi avaliado 2 dias após o treino na sessão de teste na ausência do efeito do fármaco. Como mostrado na figura 9B, há uma diferença significativa entre os grupos, detectado pela ANOVA de uma via ($F(2,16) = 14,54$; $P = 0,0003$). O grupo tratado com CP55940 apresenta uma resposta de freezing elevada em relação aos controles

(indicando uma resposta de facilitação da consolidação da memória), enquanto que o grupo tratado com AM251 apresenta uma diminuição desta resposta, interpretada aqui como amnésia retrógrada ($P = 0,0098$ e $0,0196$, respectivamente, teste *post-hoc* NK).

Concluindo, estes dados demonstram pela primeira vez que o sistema canabinoide no RSC modula a consolidação da memória de longa duração.

4.3 Papel do sistema canabinoide no RSC sobre a reconsolidação da memória

Nesta etapa do trabalho, investigamos o papel do sistema RSC-CB1 sobre o fenômeno de reconsolidação da memória aversiva (este protocolo pode ser visualizado na Figura 10A).

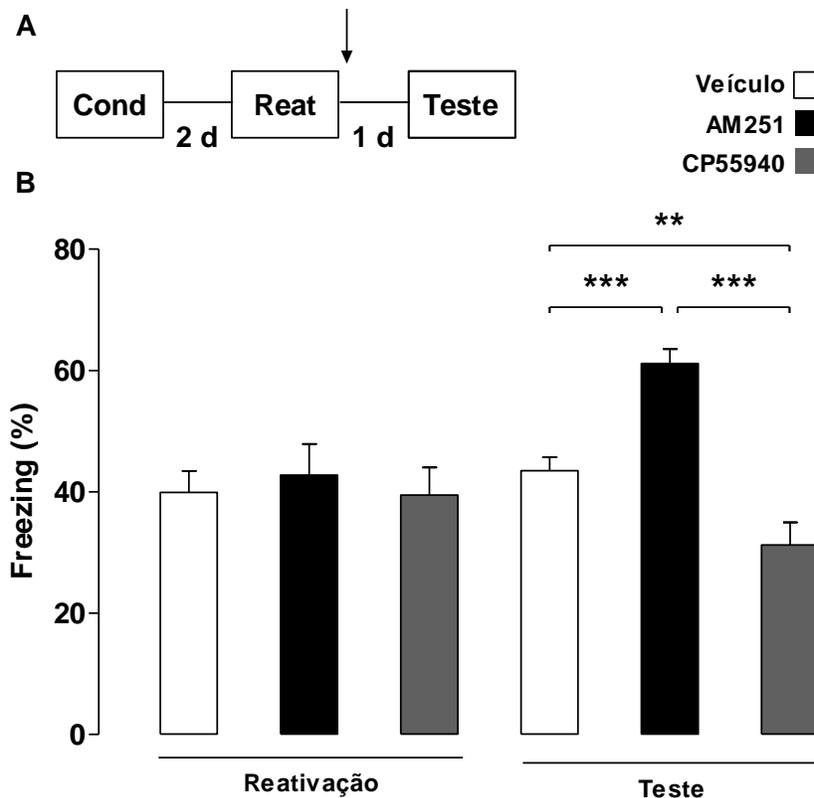


Figura 10. O sistema canabinoide no RSC modula a reconsolidação da memória aversiva de longa duração. (A) Desenho experimental. (B) Efeitos da infusão imediatamente após a reativação de AM251 ($n = 10$), CP55940 ($n = 10$) ou veículo ($n = 16$) sobre a reconsolidação da memória aversiva de longa duração. No painel esquerdo é representado o percentual de freezing durante a sessão de reativação, enquanto que no painel direito representa o percentual de freezing no teste de retenção da memória conduzido 24 h após a reativação. Dados expressos como SEM \pm . ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Para este fim, assim como no protocolo de consolidação, os animais foram treinados no CAC e brevemente reexpostos ao contexto original 48 h após o condicionamento para que a memória de longa duração fosse reativada (ou seja, desestabilizada). Imediatamente após a sessão de reativação, 36 ratos foram aleatoriamente divididos em três grupos e infundidos bilateralmente intra-RSC com AM251, CP55940 ou veículo. A Figura 10B (painel direito) apresenta o percentual de freezing de todos os grupos na sessão de teste realizada 24 h após a reativação. Conforme detectado pela ANOVA de uma via, há uma diferença significativa entre os grupos na sessão de teste ($F(2,29) = 17,61$; $P < 0,0001$), mas não na sessão de reativação ($F(2,29) = 0,89$; $P = 0,4205$). Comparado ao grupo controle, o percentual de freezing do grupo tratado com AM251 é maior, e o de CP55940 menor ($P = 0,0001$ e $0,0080$, respectivamente; teste *post-hoc* de NK), indicando um efeito de facilitação e de prejuízo sobre a reconsolidação da memória, respectivamente.

Juntos, estes resultados demonstraram que os receptores canabinoides CB1 inibem a reconsolidação da memória emocional no RSC.

4.4 Papel do sistema canabinoide no RSC sobre a extinção da memória

Para explorarmos a participação do sistema RSC-CB1 sobre a extinção da memória, os animais foram treinados na tarefa de CAC e infundidos intra-RSC com AM251, CP55940 ou veículo 20 min antes da sessão de extinção (que consiste na reexposição de 30 min) (Figura 11A). Os percentuais de freezing nas sessões de teste de retenção da memória estão apresentados na figura 11B. Durante a sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas detectou diferenças significativas entre os primeiros e os últimos 4 min da sessão (fator "tempo", $F(1,24) = 134,00$, $P < 0,0001$, fator "tratamento", $F(2,24) = 8,01$; $P = 0,0022$; e interação "tempo x tratamento" $F(2,24) = 4,37$, $P = 0,0242$). Análises posteriores revelaram que os animais tratados com CP55940 expressaram níveis baixos de freezing nos dois períodos combinados quando comparado aos grupos controle e AM251 (teste *post-hoc* NK, $P < 0,001$), além de um baixo nível de freezing isoladamente no início da sessão. Coletivamente, estes dados

indicam que (1) o CP55940 no RSC prejudica a expressão da memória de extinção (ou, alternativamente, facilita a extinção de curta duração) e que (2) todos os grupos extinguem a memória de CAC ao final da sessão ($P < 0.01$, teste de comparações múltiplas de NK).

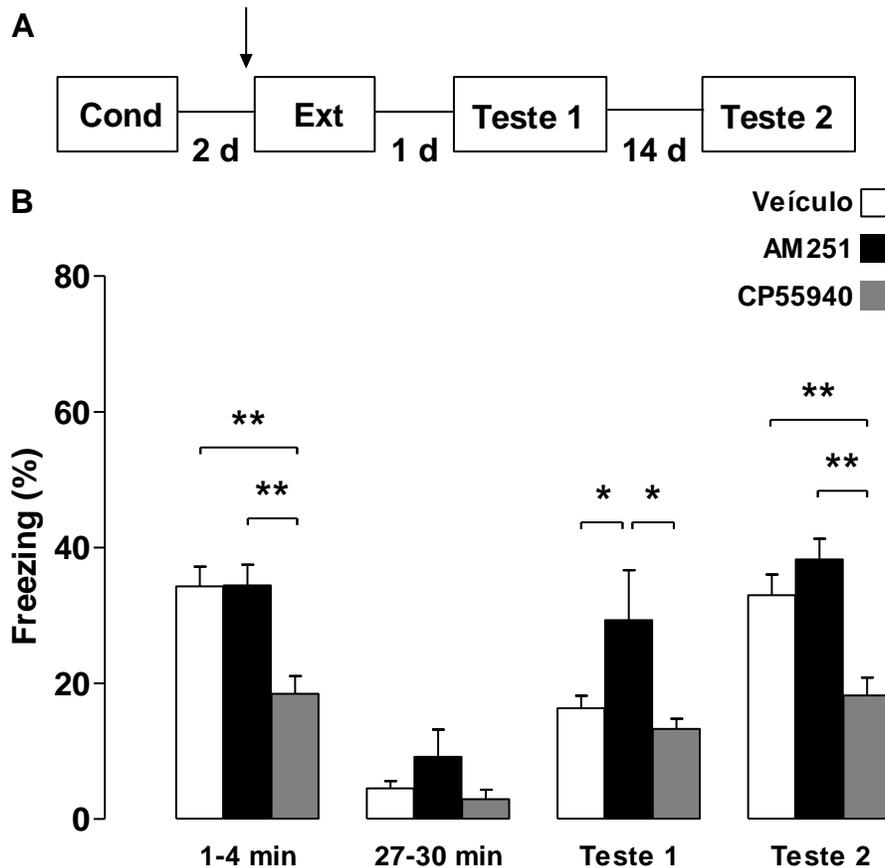


Figura 11a. O sistema canabinoide no RSC modula a memória de extinção de longa duração. (A) Desenho experimental. **(B)** Efeitos da infusão intra-RSC de AM251 ($n = 8$), CP55940 ($n = 8$) ou veículo ($n = 11$) 20 min antes da sessão de extinção. É representado o percentual de freezing durante a sessão de extinção (primeiros e últimos 4 min), além do desempenho nos testes 1 e 2, conduzidos 1 e 14 dias após a sessão de extinção, respectivamente. Dados expressos como SEM \pm . * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

No teste 1, sem o efeito da droga, conduzido 24 h após a sessão de extinção (para avaliarmos a consolidação da memória de extinção), a ANOVA de uma via indicou diferença significativa entre os grupos ($F(2,24) = 4,38$; $P = 0,0239$). O grupo tratado com AM251 apresentou altos níveis de freezing comparado aos grupos controle e CP55940 ($P < 0,05$, teste *post-hoc* NK), indicando que o bloqueio dos receptores CB1 no RSC prejudica a consolidação da memória de extinção. Por sua vez, no teste 2,

conduzido 14 dias depois da sessão de extinção (usado para avaliarmos a recuperação espontânea da memória original), novamente foram observados diferenças entre os grupos ($F(2,19) = 12,03$; $P = 0,0004$, ANOVA de uma via). Neste caso, o grupo tratado com CP55940 manteve a resposta baixa de freezing apresentada no teste 1 comparado com os grupos AM251 e veículo ($P < 0,01$, teste *post-hoc* NK). Estes achados indicam que o agonista canabinoide previne a recuperação espontânea, mantendo a resposta extinta ao longo do tempo.

Neste protocolo de extinção, uma explicação plausível para a ausência de recuperação espontânea no grupo tratado com CP55940 é que este agonista pode estar exercendo seus efeitos sobre o processo de reconsolidação, e não sobre a extinção, uma vez que os efeitos da manipulação farmacológica durante a janela de reconsolidação podem ser mais duradouros – se comparados aos efeitos da memória de extinção, que tipicamente pode ser recuperada/reinstalada ao longo do tempo. Assim sendo, para descartarmos esta hipótese, um novo experimento de extinção foi conduzido (Figura 11C-D): 14 animais foram condicionados no CAC, divididos aleatoriamente em dois grupos e infundidos intra-RSC com CP55940 ou veículo 20 min antes da sessão de extinção. Um dia depois, os animais foram submetidos a um protocolo de reinstalação da memória, caracterizado por um choque de 0,5 mA não pareado ao contexto original (para detalhes deste protocolo, ver Haubrich et al., 2015). No dia seguinte, os animais foram testados.

Assim como no protocolo anterior, nos primeiros 4 min da sessão de extinção foram observados diferenças entre os grupos, conforme indicado pela ANOVA de medidas repetidas (fator “tratamento”, $F(1,11) = 6,306$; $P = 0,028$; fator “tempo”, $F(1,11) = 36,11$, $P < 0,0001$; interação “tempo x tratamento”, $F(1,11) = 4,89$, $P = 0,049$), a saber: em relação ao controle, o grupo tratado com CP55940 apresentou baixos níveis de freezing nos dois períodos combinados ($P = 0,02$, teste NK), assim como no início da sessão ($P = 0,021$). Não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao percentual de freezing entre os grupos durante os testes 1 e 2 ($t(11) = 1,466$; $P = 0,17$ e $t(11) = 1,85$; $P = 0,09$, respectivamente; teste *t* para medidas independentes) (Figura 11CD).

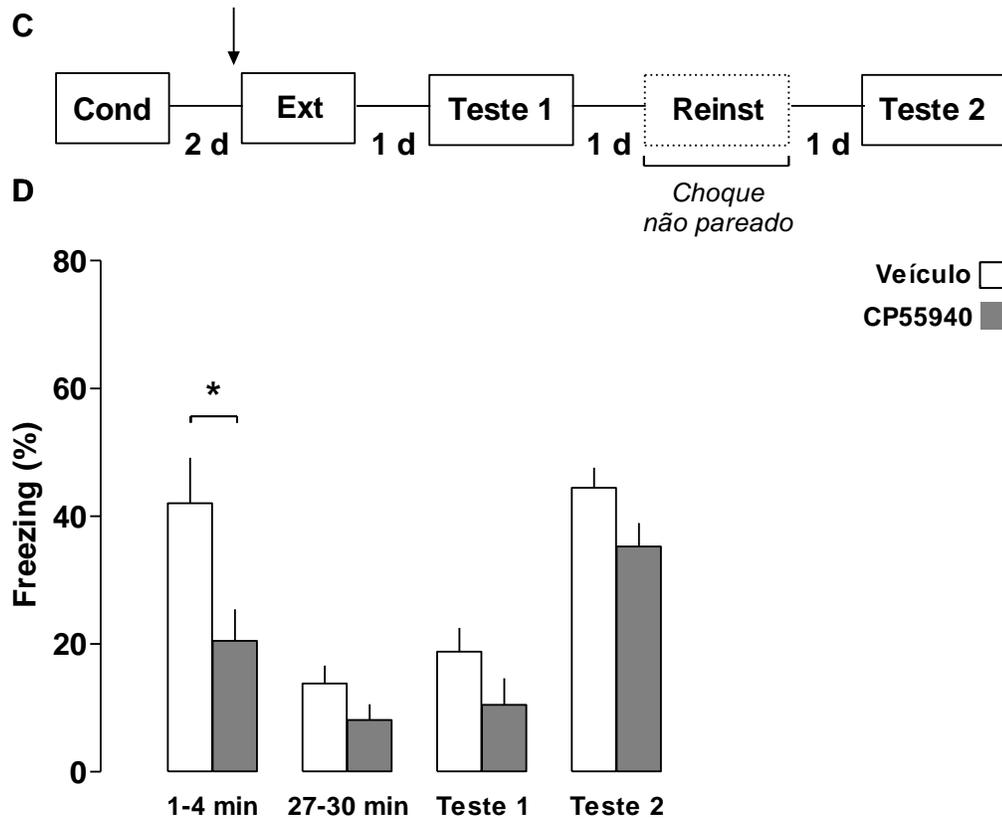


Figura 11b. O sistema canabinoide no córtex retrosplenial modula a memória de extinção. (C) Desenho experimental. **(D)** Efeitos da infusão intra-RSC de CP55940 ($n = 7$) ou veículo ($n = 7$) 20 min antes da sessão de extinção. É representado o percentual de freezing durante a sessão de extinção (primeiros e últimos 4 min), além do desempenho no teste 1 (que avalia a consolidação da memória de extinção) e no teste 2 (após o protocolo de reinstalação). Dados expressos como SEM \pm . * $P < 0.05$.

Assim sendo, podemos concluir que a recuperação espontânea da memória após o protocolo de reinstalação indica que os efeitos do CP55940 durante uma reexposição prolongada são mediados pela extinção, e não pela reconsolidação.

Coletivamente, nossos resultados demonstraram pela primeira vez que a sinalização mediada pelos receptores canabinoides no RSC possuem um importante papel na modulação da memória de extinção no CAC, da mesma forma como ocorre no hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2008a e 2008b).

5. DISCUSSÃO

Devido ao seu posicionamento estratégico no encéfalo de mamíferos, possuindo robustas conexões recíprocas com diferentes áreas corticais e subcorticais, o RSC está intimamente associado aos fenômenos de memória (para uma revisão, ver Vann et al., 2009). Sendo considerado um dos principais sistemas de receptores acoplados a proteínas G no SNC (modulando, assim, os mecanismos implicados na plasticidade sináptica de curta e de longa duração), a sinalização mediada pelos endocanabinoides tem sido extensivamente estudada no campo da memória (para uma revisão, ver Castillo et al., 2012; Mechoulam e Parker, 2013). Apesar dos efeitos da manipulação farmacológica da sinalização endocanabinoide estarem bem estabelecidos em regiões como hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2005), amígdala (Marsicano et al., 2002; Lin et al., 2006; Campolongo et al., 2009) e córtex pré-frontal medial (Morena et al., 2014), neste trabalho investigamos pela primeira vez o papel do sistema RSC-CB1 sobre a modulação dos fenômenos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória emocional, em ratos.

Um dos principais achados demonstrando a participação do sistema canabinoide na modulação da memória é a observação de que o receptor CB1 está implicado na regulação da LTP no hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2006). Neste caso específico, a infusão intra-hipocampal de AM251 bloqueia a indução da LTP e, de modo similar aos nossos resultados encontrados na consolidação, causa amnésia retrógrada em tarefas aversivas (esquiva inibitória e CAC) quando injetado imediatamente após o treino (De Oliveira Alvares et al., 2006 e 2010).

De fato, a consolidação tanto da informação aversiva (Mello e Souza et al., 1999; Katche et al., 2013a e 2013b) quanto espacial (Czajkowski et al., 2014) também requer a atividade do RSC. Neste panorama, nossos resultados sugerem que a ativação dos receptores canabinoides no RSC facilita a consolidação da memória de CAC, uma vez que o grupo tratado imediatamente após o treino com o agonista CP55940 apresentou altos níveis de freezing no teste de retenção da memória conduzido 48 h após o aprendizado. Em contrapartida, o grupo infundido bilateralmente intra-RSC com AM251 apresentou baixos níveis de freezing durante o teste, o que interpretamos como

amnésia retrógrada (Figura 9B). É importante destacar que os mesmos resultados foram encontrados no hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2005 e 2006). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na interação destes circuitos precisam ser estabelecidos no futuro.

Durante a reconsolidação, tem sido proposto que as memórias consolidadas podem retornar a um estado lábil (porém transitório), que é sensível a modificações e permite com que o traço de memória possa ser alterado – adicionando, assim, novas informações ao seu conteúdo original (Nader et al., 2000; De Oliveira Alvares et al., 2013; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015). Mediante a evocação, uma vez que as memórias entram novamente num estado lábil (de desestabilização), elas necessitam de um processo de reestabilização (dependente de síntese proteica) para que as mudanças promovidas nesta “janela de atualização” possam persistir ao longo do tempo (Nader et al., 2000; De Oliveira Alvares et al., 2013; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015). Até o momento, embora um único trabalho tenha caracterizado a participação do RSC sobre a evocação de memórias aversivas recentes e remotas (processo que requer a ativação de diferentes subunidades do receptor NMDA) (Corcoran et al., 2011), permanece desconhecido o papel do RSC em protocolos clássicos de reconsolidação (usualmente realizados através de injeções sistêmicas ou infusão local de fármacos que bloqueiam ou ativam diferentes fatores envolvidos na desestabilização da memória).

No nosso protocolo de reconsolidação no CAC encontramos efeitos opostos aos resultados obtidos na consolidação. Neste caso, o grupo tratado com AM251 intra-RSC imediatamente após a reativação apresentou níveis elevados de freezing em relação aos controles no teste 24 h após a reativação, enquanto que o grupo CP55940 teve esta resposta diminuída (Figura 10B). Assim sendo, podemos concluir que o receptor CB1 inibe a reconsolidação da memória emocional no RSC. É interessante destacarmos que quando o AM251 é infundido no hipocampo observa-se o mesmo padrão da resposta de freezing (De Oliveira Alvares et al., 2008a). Além do mais, quando o agonista CB1/CB2 WIN é injetado na amígdala basolateral (Lin et al., 2006), observa-se prejuízo na reconsolidação da memória – efeito similar aos nossos resultados obtidos com o CP55940. Coletivamente, estes dados indicam que o sistema

endocanabinoide exerce suas funções com padrões similares em diferentes estruturas encefálicas durante a reconsolidação. No nível celular, um possível mecanismo de ação do receptor CB1 sobre a reconsolidação é a plasticidade sináptica mediada pelo GABA, como recentemente observado na amígdala (Ratano et al., 2014).

Sobre a extinção, resumidamente, podemos defini-la como um novo aprendizado que inibe a resposta de medo condicionada (Pavlov 1927; Izquierdo, 2002; Milad e Quirck, 2002; Quirck and Mueller 2008). No entanto, ao longo do tempo, como o processo de extinção não promove o esquecimento, a memória original pode ser reinstalada ou recuperada espontaneamente (Bouton et al., 2006). Atualmente está bem estabelecido que a sinalização mediada pelos endocanabinoides possui um papel central na modulação da memória de extinção (Marsicano et al. 2002; Chhatwal et al. 2005; Pamplona et al. 2006; Lutz 2007; De Oliveira Alvares et al. 2008b). Por exemplo, a administração sistêmica do antagonista CB1 SR147778 prejudica a consolidação da memória de extinção, enquanto que o agonista CB1/CB2 WIN possui efeito oposto, de facilitação da extinção (Pamplona et al., 2006), corroborando com os dados encontrados por Marsicano e colaboradores, especificamente na amígdala (Marsicano et al., 2002). O antagonista CB1 AM251, quando injetado no hipocampo, também bloqueia a consolidação da memória de extinção (De Oliveira Alvares et al., 2008a e 2008b), o mesmo efeito encontrado no nosso protocolo.

Recentemente dois estudos demonstraram o envolvimento do RSC sobre a extinção da memória aversiva (Corcoran et al. 2013; Kwapis et al. 2014). Aqui, através da infusão intra-RSC pré-reativação de AM251 e CP55940, demonstramos que a sinalização mediada pelo sistema canabinoide no RSC está implicada na regulação da memória de extinção. Especificamente, quando a ativação dos receptores CB1 foi bloqueada com AM251, observamos que a consolidação da memória de extinção é prejudicada, enquanto que o grupo tratado com CP55940 teve efeito oposto, prevenindo, inclusive, a recuperação espontânea da memória ao longo do tempo. Juntos, estes achados demonstram pela primeira vez que o sistema RSC-CB1 está implicado na modulação da memória de extinção.

Conforme estudo utilizando neuroimagem funcional em pacientes diagnosticados com transtorno de estresse pós-traumático, foi observado que o RSC é robustamente

ativado mediante a evocação de memórias relacionadas ao trauma (Sartory et al., 2013), sugerindo que o RSC possui um papel importante na fisiopatologia da doença.

Sob uma perspectiva geral, este trabalho se propôs a investigar o papel do sistema RSC-CB1 sobre a modulação dos processos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória emocional, apresentando novas evidências para o estudo pré-clínico da fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos relacionados à formação e a retenção de memórias mal adaptativas. Ainda, corroborando com a literatura, propomos que o sistema endocanabinoide exerce seus efeitos fisiológicos de maneira similar em diferentes estruturas do encéfalo.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados no presente trabalho, podemos concluir que:

Sobre a consolidação da memória

- A ativação dos receptores canabinoides no RSC tem efeito de facilitação sobre a consolidação da memória de CAC. O bloqueio seletivo dos receptores CB1 após o treino causa amnésia retrógrada no teste de retenção da memória conduzido 48 h após o aprendizado. Por outro lado, o grupo tratado com o agonista CP55940 expressa altos níveis de freezing em relação a ambos os grupos na sessão de teste, indicando um efeito de facilitação.
- Deste modo, concluímos que a ativação dos receptores canabinoides no RSC, assim como ocorre no hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2005, 2006 e 2010) e na amígdala (Campolongo et al., 2009), desempenham um importante papel na modulação da consolidação da memória emocional de longa duração.

Sobre a reconsolidação da memória

- O bloqueio dos receptores CB1 no RSC imediatamente após uma sessão curta de reativação aumenta a expressão de freezing durante o teste conduzido no dia seguinte, indicando um efeito oposto encontrado no processo de consolidação. Em contrapartida, o tratamento com CP55940 prejudicou a reconsolidação da memória, enquanto que durante a consolidação seu efeito foi de facilitação.
- Deste modo, seguindo o mesmo padrão funcional exercido pelos endocannabinoides na amígdala (Lin et al., 2006) e no hipocampo (De Oliveira Alvares et al., 2008a e 2008b), sugerimos que os receptores CB1 no RSC inibem a reconsolidação da memória emocional.

Sobre a extinção da memória

- Existem semelhanças entre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas fases de consolidação e extinção da memória (para uma revisão destes mecanismos, ver Frankland e Bontempo, 2005). Nossos resultados corroboram com esta perspectiva: no protocolo de consolidação, o AM251 teve efeito amnésico na sessão de teste e, aqui, bloqueou a consolidação da memória de extinção. Por outro lado, o CP55940 facilitou a formação da memória e acelerou a consolidação da memória de extinção.
- Considerando, ainda, que a memória de extinção é tipicamente sensível à recuperação espontânea (Bouton et al., 2006) (e, de fato, o medo não é esquecido após a extinção), demonstramos que a ativação dos receptores canabínicos no RSC foi capaz de manter a resposta de medo extinguida ao longo do tempo, prevenindo sua recuperação espontânea – efeito bloqueado pelo AM251.
- É importante destacar que o efeito de manutenção da resposta baixa de freezing no teste de recuperação espontânea poderia estar sendo mediado por um processo de reconsolidação. Para descartarmos esta possibilidade, um protocolo de reinstalação da memória foi utilizado, que consiste de um choque não pareado (contexto B), sendo o teste no contexto original no dia seguinte, e não 14 dias após a sessão de extinção (Haubrich et al., 2015). Através deste protocolo, observamos que a memória é reinstalada 24 h após o choque no contexto B, indicando que o CP55940 exerce seus efeitos sobre a extinção, e não sobre a reconsolidação da memória.
- Conclui-se, assim, que o sistema canabinoide modula a extinção da memória no RSC.

Conclusão geral

Caracterizamos o papel da sinalização mediada pelo sistema canabinoide no córtex retrosplenial sobre a modulação das fases de consolidação, reconsolidação e extinção da memória de medo contexto-dependente.

7. REFERÊNCIAS

- Ameri A. 1999. **The effects of cannabinoids on the brain.** *Prog Neurobiol* **58**:315–348.
- Battista N, Tommaso MD, Bari M, Maccarrone M. 2012. **The endocannabinoid system: an overview.** *Front Behav Neurosci* **6**:1-7.
- Ben Mamou C, Gamache K, Nader K. 2006. **NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories.** *Nat Neurosci* **9**:1237-9.
- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross R, Mulder J. 2007. **Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity.** *Science* **316**:1212-16.
- Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S. 2006. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* **60**:352–360.
- Brenowitz SD, Regehr WG. 2005. **Associative short-term synaptic plasticity mediated by endocannabinoids.** *Neuron* **45**:419–431.
- Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Hauer D, Schelling G, McGaugh JL, Cuomo V. 2009. **Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:4888–4893.
- Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. 2012. **Endocannabinoid signaling and synaptic function.** *Neuron* **76**:70-81.
- Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. 2006. **Endocannabinoid mediated synaptic plasticity in the CNS.** *Annu Rev Neurosci* **29**:37–76.

Chhatwal JP, Davis M, Maguschak KA, Ressler KJ. 2005. **Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear.** *Neuropsychopharmacology* **30**:516-24.

Cooper BG, Mizumori SJ. 2001. **Temporary inactivation of the retrosplenial cortex causes a transient reorganization of spatial coding in the hippocampus.** *J Neurosci* **21**:3986-4001.

Corcoran KA, Donnan MD, Tronson NC, Guzman YF, Gao C, Jovasevic V, Guedea AL, Radulovic J. 2011. **NMDA receptors in retrosplenial cortex are necessary for retrieval of recent and remote context fear memory.** *J Neurosci* **31**:11655–9.

Corcoran KA, Leaderbrand K, Radulovic J. 2013. **Extinction of remotely acquired fear depends on an inhibitory NR2B/PKA pathway in the retrosplenial cortex.** *J Neurosci* **33**:19492-8.

Crestani AP, Zacouteguy Boss F, Haubrich J, Ordoñez Sierra R, Santana F, Molina JM, Cassini LF, De Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2015. **Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation.** *Sci Rep* **4**:1-9.

Czajkowski R, Jayaprakash B, Wiltgen B, Rogerson T, Guzman-Karlsson MC, Barth AL, Trachtenberg JT, Silva AJ. 2014. **Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:8661–8666.

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**:119-24.

De Oliveira Alvares L, Pasqualini-Genro B, 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 Research* **1075**:60-7.

De Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA. 2008a. **Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction.** *Neuroscience* **154**:1648-55.

De Oliveira Alvares L, Pasqualini-Genro P, Diehl F, Quillfeldt JA. 2008b. **Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms.** *Neurobiol Learn Mem* **90**:1-9.

De Oliveira Alvares L, Engelke DS, 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**:202-9.

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.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. 1992. **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** *Science* **258**:1946-49.

Frankland PW, Bontempi B. 2005. **The organization of recent and remote memories.** *Nat Rev Neurosci* **6**:119-30.

Hardt O, Nader K, Nadel L (2013). **Decay happens: the role of active forgetting in memory.** *Trends Cogn Sci* **17**:111-20.

Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, de Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2015. **Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information.** *Neuropsychopharmacology* **40**:315-26.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. 1990. **Cannabinoid receptor localization in brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:1932–1936.

Hill MN, McEwen BS. 2009. **Endocannabinoids: the silent partner of glucocorticoids in the synapse.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:4579-4580.

Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker JG, Wotjak CT, Bains JS. 2010. **Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output.** *J Neurosci* **30**:14980-6.

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. 2005. **An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia.** *Nature* **435**:1108–1112.

Kandel ER. 2001. **The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses.** *Science* **294**:1030-38.

Katche C, Dorman G, Gonzalez C, Kramar CP, Slipczuk L, Rossato JI, Cammarota M, Medina JH. 2013a. **On the role of retrosplenial cortex in long-lasting memory storage.** *Hippocampus* **23**:295-302.

Katche C, Dorman G, Slipczuk L, Cammarota M, Medina JH. 2013b. **Functional integrity of the retrosplenial cortex is essential for rapid consolidation and recall of fear memory.** *Learn Mem* **20**:170-3.

Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. 1999. **Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axonal terminals of specific hippocampal interneurons.** *J Neurosci* **19**:4544–58.

Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. 2006. **Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses.** *J Neurosci* **26**:5628–37.

Katona I, Freund TF. 2012. **Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain.** *Annu Rev Neurosci* **35**:529–558.

Kwapis JL, Jarome TJ, Lee JL, Gilmartin MR, Helmstetter FJ. 2014. **Extinguishing trace fear engages the retrosplenial cortex rather than the amygdala.** *Neurobiol Learn Mem* **113**:41-54.

Izquierdo I. **Memória.** Artmed, 2002.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. 2006. **Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation.** *Trends Neurosci* **29**:496-505.

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**:316-21.

Lutz B. 2007. **The endocannabinoid system and extinction learning.** *Mol Neurobiol* **36**:92–101.

Maddock RJ. 1999. **The retrosplenial cortex and emotion: New insights from functional neuroimaging of the human brain.** *Trends Neurosci* **22**:310-316.

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 memories.** *Nature* **418**:530-534.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. 1990. **Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.** *Nature* **346**:561-64.

McGaugh JL. 2000. **Memory—a century of consolidation.** *Science* **287**:248-51.

Mechoulam R, Gaoni Y. 1965. **A total synthesis of DL-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish.** *J Am Chem Soc* **87**:3273-5.

Mechoulam R, Parker LA. 2013. **The endocannabinoid and the brain.** *Annu Rev Psychol* **64**:21-47.

Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, Wang YT, Nader K. 2010. **PKM ζ maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking.** *Nat Neurosci* **13**: 630-34.

Milad MR, Quirk GJ. 2002. **Neurons in medial prefrontal signal memory for fear extinction.** *Nature* **420**:70-4.

Mello e Souza T, Roesler R, Madruga M, de-Paris F, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH, Izquierdo I. 1999. **Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats.** *Neurobiol Learn Mem* **72**:118-27.

Minoshima S. 1997. **Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease.** *Ann Neurol* **42**:85-94.

Moldrich G, Wenger T. 2000. **Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study.** *Peptides* **21**:1735-42.

Morena M, Roozendaal B, Trezza V, Ratano P, Peloso A, Hauer D, Atsak P, Trabace L, Cuomo V, McGaugh JL, Schelling G, Campolongo P. 2014. **Endogenous cannabinoid release within prefrontal-limbic pathway affects memory consolidation of emotional training.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:18333-8.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000. **Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval.** *Nature* **406**:722-6.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. 2001. **Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals.** *Neuron* **29**:729–738.

Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN. 2006. **The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats.** *Psychopharmacology* **188**:641-9.

Pavlov IP. 1927. **Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.** London: Oxford University Press.

Piomelli D. 2003. **The molecular logic of endocannabinoid signaling.** *Nat Rev Neurosci* **4**:873–884.

Quirk GJ, Mueller D. 2008. **Neural mechanisms of extinction learning and retrieval.** *Neuropsychopharmacology* **33**:56–72.

Ratano P, Everitt BJ, Milton AL. 2014. **The CB1 receptor antagonist AM251 impairs reconsolidation of pavlovian fear memory in the rat basolateral amygdala.** *Neuropsychopharmacology* **39**:2529-37.

Sartory G, Cwik J, Knuppertz H, Schürholt B, Lebens M, Seitz RJ, Schulze R. 2013. **In search of the trauma memory: a meta-analysis of functional neuroimaging studies of symptom provocation in posttraumatic stress disorder (PTSD).** *Plos One* **8**:1-11.

Souza MM, Mello e Souza T, Vinadé ER, Rodrigues C, Choi HK, Dedavid e Silva TL, Medina JH, Izquierdo I. 2002. **Effects of posttraining treatments in the posterior cingulate cortex on short- and long-term memory for inhibitory avoidance in rats.** *Neurobiol Learn Mem* **77**:202-10.

Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. 2008. **Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories.** *Learn Mem* **15**:426-33.

Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA. 2009. **What does the retrosplenial cortex do?** *Nature* **10**:792-802.

Vogt BA, Absher JR, Bush G. 2000. **Human retrosplenial cortex: where is it and it is involved in emotion?** *Trens Neurosci* **23**:195-97.

Wilson RI, Nicoll RA. 2001. **Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses.** *Nature* **410**:588–592.

8. ANEXO

O trabalho a seguir, redigido no formato de *brief communication*, foi publicado na revista Learning & Memory.

THE CANNABINOID SYSTEM IN THE RETROSPLENIAL CORTEX MODULATES FEAR MEMORY CONSOLIDATION, RECONSOLIDATION, AND EXTINCTION

Cannabinoids in the RSC modulates emotional memory

Ricardo Marcelo Sachser^{1,4}, Ana Paula Crestani^{2,4}, Jorge Alberto Quillfeldt^{2,4}, Tadeu Mello e Souza^{3,4}, and Lucas de Oliveira Alvares^{1,4,5}

¹Laboratório de Neurobiologia da Memória and ²Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências; ³Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ⁴Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁵Corresponding author: Dr Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 216A, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br

Abstract

Despite that the cannabinoid receptor type 1 (CB1R) plays a pivotal role in emotional memory processing in different regions of the brain, their function in the retrosplenial cortex (RSC) remains unknown. Here, using contextual fear conditioning in rats, we showed that a posttraining intra-RSC infusion of the CB1R antagonist AM251 impaired, and the agonist CP55940 improved, long-term memory consolidation. Additionally, a postreactivation infusion of AM251 enhanced memory reconsolidation, while CP55940 had the opposite effect. Finally, AM251 blocked extinction, whereas CP55940 facilitated it and maintained memory extinguished over time. Altogether, our data strongly suggest that the cannabinoid system of the RSC modulates emotional memory.

Memory consolidation is a time-dependent process through which newly acquired information is stored, being even able to become strengthened or weakened (Izquierdo et al. 1998; McGaugh 2000; Kandel 2001). During reconsolidation, memories may return to a transitory labile state sensitive to modifications (Nader et al. 2000; Haubrich et al. 2015), and it happens when the animal is reexposed briefly to the training environment. If this exposure takes longer in the absence of the unconditioned stimulus, extinction takes place, resulting in a new learning that is temporarily effective in inhibiting the conditioned response (Pavlov 1927; Quirck and Mueller 2008).

Endocannabinoids are retrograde messengers that control ion channel activity and neurotransmitter release (Katona et al. 1999; Ohno-Shosaku et al. 2001; Wilson and Nicoll 2001; Piomelli 2003; Katona et al. 2006), being critical to modulate both long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) (Wilson and Nicoll 2001; Brenowitz and Regehr 2005; Chevaleyre et al 2006 and 2007; Berghuis et al. 2007; Heifets and Castillo 2009; Katona and Freund 2012). In addition, CB1R-mediated signaling in both basolateral amygdala and dorsal hippocampus directly interact with glucocorticoid receptors, indicating that these interactions are necessary for arousing-related experiences (Campolongo et al. 2009; Hill and McEwen 2009; Hill et al. 2010; De Oliveira Alvares et al. 2010).

The human posterior cingulate cortex (PCC) is involved in emotion processing (Maddock 1999), prospective thinking, and in memorizing spatial and autobiographical information (Vann et al. 2009). The PCC has no counterpart to Brodmann areas (BA) 23

and 31 in the rat brain. Therefore, in the rat, the entire region is called the retrosplenial cortex (RSC), which is, in humans, designated only to the most caudal, not the neocortical, part of PCC (BA 29 and 30) (Maddock 1999). The rat RSC is a very integrative area, since (a) it intermediates many signals between the hippocampal formation, thalamic regions, and the prefrontal cortex, (b) receiving information from neocortical visual, auditory, and motor areas (Hedberg and Stanton 1995; Maddock 1999; Vann et al. 2009). For these reasons, it is not surprising that it is involved in emotional and spatial memory processing in both humans and rodents (Maddock 1999; Mello e Souza et al. 1999; Souza et al. 2002; Vogt et al. 2002; Vann et al. 2009; Corcoran et al. 2011; Katche et al. 2013a and 2013b; Czajkowski et al. 2014).

The resulting effects of local or systemic pharmacological manipulations of CB1R in different fear-related tasks in rodents is well described in the hippocampus (De Oliveira Alvares et al. 2005), basolateral amygdala (Marsicano et al. 2002; Lin et al. 2006; Campolongo et al. 2009), and prefrontal cortex (Morena et al. 2014), three brain structures associated with the modulation of long-term memories. Also, previous findings from our group have shown that, at cellular and behavioral levels, blocking CB1R with the selective antagonist AM251 (a) inhibits the induction of hippocampal LTP, and (b) cause retrograde amnesia if applied immediately posttraining in different pavlovian paradigms (De Oliveira Alvares et al. 2005, 2006, 2008a and 2008b).

Despite the fact that in the last decades many important contributions have provided a comprehensive understanding about the specific functions of endocannabinoids on memory-related plasticity throughout the brain, the role of the cannabinoid system in the rodent RSC on memory paradigms was unknown. In the present study, we explored whether memory consolidation, reconsolidation, and extinction were dependent on cannabinoid-mediated signaling in the RSC.

Male Wistar rats (3-month-old, 300-350 g) acquired from Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul were implanted bilaterally with guide cannulae aimed 1 mm above the RSC (AP – 5.8 mm, ML \pm 0.6 mm, and DV –1.2 mm taken from dura, Fig. 1A), the same as reported previously by Mello e Souza (1999). Animals were infused intra-RSC with the cannabinoid agonist CP55940 (5 μ g/ μ L), the selective antagonist of CB1R AM251 (11 μ g/ μ L),

or their vehicles (PBS containing DMSO 8%) at different time points, depending on the experiment. The drug concentrations were chosen accordingly to previous results (De Oliveira Alvares et al. 2005) and unpublished data from our group. All drugs were infused at a slow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{h}$ with the dose adjusted at 0.5 $\mu\text{L}/\text{side}$. The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (25x25x25 cm) with a metallic grid floor of parallel 1 cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart. During training sessions, rats were carefully placed in the chamber for 3 min and received 2 mild foot shocks (0.5 mA, 2 sec) separated by a 30 sec interval; after that, they remained for an additional 30 sec before placed back into their home cages. For training, reactivation, and test sessions, we used a 4-min reexposure, except during the extinction protocol, where a 30-min reexposure was used. After each rat, the chamber was cleaned with a paper soaked with 70% ethanol solution. Freezing scores (the absence of movement except for respiration) was measured by a trained researcher blind to experimental conditions. Data were analyzed by independent *t*-test, one-way or repeated-measure ANOVA, followed by Newman-Keuls' (NK) *post-hoc* test whenever necessary. $P < 0.05$ indicates statistical significance. Verification of cannula placement was made from coronal sections of the RSC using a vibratome and standard histological techniques (details in Mello e Souza et al. 1999). Only rats with correct cannulae placement were considered in the final statistical analysis.

The RSC is divided into two parts, granular and dysgranular, which are different in their inputs and outputs (Wyss and Sripanidkulchai 1984; Vann et al. 2009). In previous studies, the coordinates were slightly more ventral, infusions into which were more restricted to the granular cortex (Mello e Souza et al. 1999; Souza et al. 2002). In the present study, both parts were reached by our infusions, but not neighboring regions, such as the hippocampal formation (Fig. 1A). Therefore, we can analyze our results by considering the interaction of the RSC as a whole with other brain structures. It is well known that the RSC interacts with the hippocampal formation through robust reciprocal connections with the subiculum, presubiculum, and parasubiculum (Vann et al. 2009). The RSC also projects to the entorhinal cortex (Wyss and Van Groen 1992), another region functionally linked to the hippocampus. Previous results have already shown its involvement in emotional (Mello e Souza et al. 1999; Souza et al. 2002;

Corcoran et al. 2011; Katche et al. 2013a and 2013b) and spatial memory modulation (Czajkowski et al. 2014). This is the first study to show that cannabinoid receptors in the RSC may modulate aversive memory. It is very difficult to not link this result to the fact that the RSC strongly interacts with the hippocampal formation and several other memory-related structures (Hedberg and Stanton 1995; Maddock 1999; Vann et al. 2009). In fact, the RSC has a strategic position intermediating signals between the hippocampal formation and neocortex (Cooper and Mizumori 2001; Vann et al. 2009). Nonetheless, further studies are necessary to clarify how these interactions are affected by the procedures carried out in the present study. It is worth to point out that there are CB1R in the RSC (Moldrich and Wenger 2000; Tsou et al. 1998).

In order to explore the involvement of CB1R activity in the RSC on contextual fear long-term consolidation, rats were randomly assigned to three groups and, immediately post-training, infused intra-RSC with AM251, CP55940, or its vehicle. Freezing behavior was assessed 2 days later during a drug-free 4-min test session. As shown in Fig. 1B, there was a significant difference between groups as revealed by one-way ANOVA ($F(2,16) = 14.54$; $P = 0.0003$). CP55940- and AM251-treated animals showed higher and lower freezing levels than controls, respectively (NK test, $P = 0.0098$ and 0.0196 , respectively). These results strongly suggest that the activation of the cannabinoid receptors in the RSC strengthens consolidation of contextual fear memory.

Memory consolidation is a time-dependent process through which newly acquired information is stored (Izquierdo et al. 1998; McGaugh 2000; Kandel 2001). RSC activity is strongly related to the consolidation and maintenance of spatial (Czajkowski et al. 2014) and aversive memories (Mello e Souza et al. 1999; Souza et al. 2002; Corcoran et al. 2011; Katche et al. 2013a). Our results strongly suggest that the cannabinoid receptor activation in the RSC improves contextual fear memory consolidation, since the agonist CP55940 increased freezing levels while the antagonist AM251 was amnesic. The same responses are found when cannabinoid drugs are infused into the hippocampus (De Oliveira Alvares et al. 2005 and 2006). Therefore, both systems have a similar modulatory role in memory consolidation. However, the mechanisms underlying this modulation in both structures remain to be elucidated.

Next, we investigate the role of the cannabinoid system of the RSC on memory reconsolidation (Fig. 2). To do this, rats were briefly reexposed to the original context 2 days later to reactivate the established long-term memory, and immediately postreactivation, each subject was bilaterally infused with CP55940, AM251, or its vehicle. A drug-free 4-min test for memory retention was carried out 24 h after reactivation.

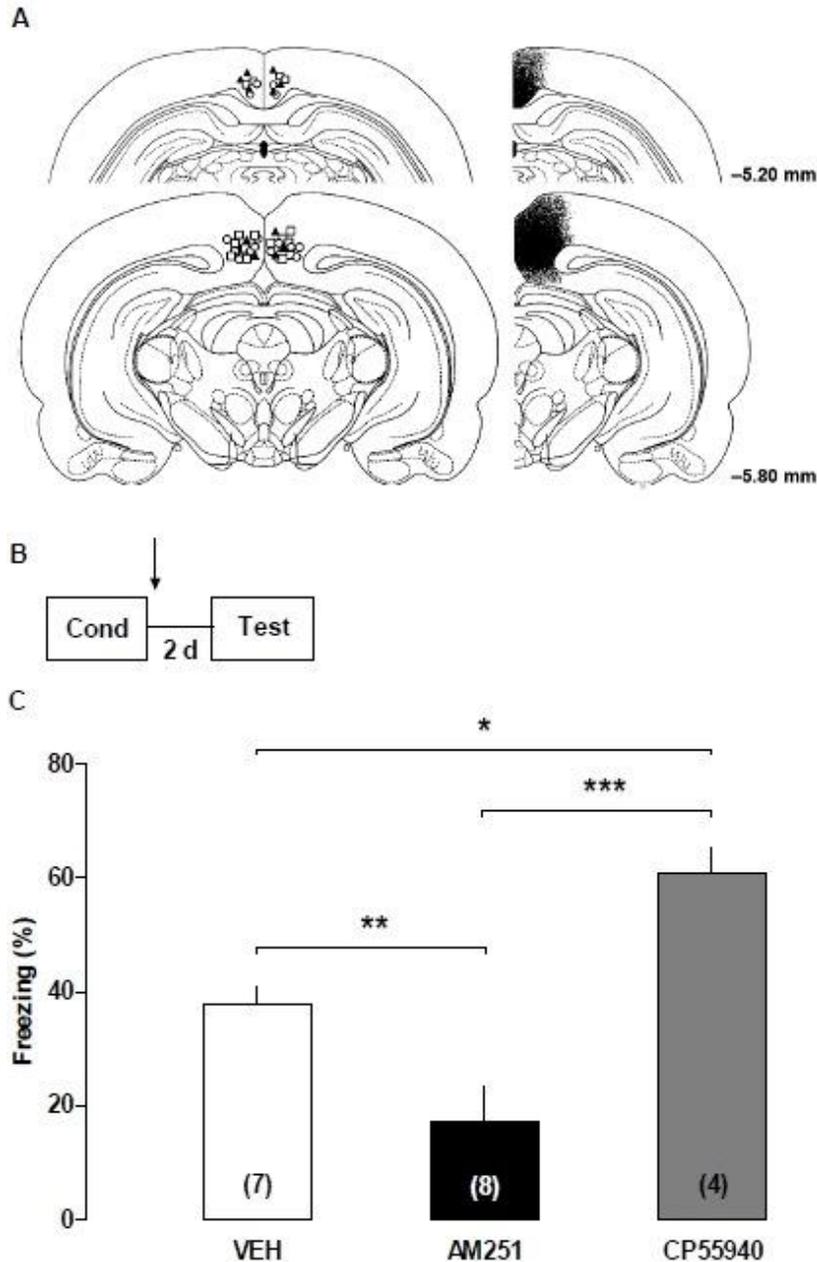


Figure 1. Contextual fear long-term memory consolidation requires cannabinoid activation in the RSC. (A) Illustration of the cannulae placement and drug diffusion in the retrosplenial cortex. **(B)** Experimental design. **(C)** Effects of posttraining intra-RSC infusions of AM251, CP55940 or their vehicle

on percentage of freezing time during a test session performed 2 days after conditioning, indicating that contextual fear long-term memory consolidation is mediated through cannabinoid receptors in the RSC. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Arrow indicates infusion time.

There was a between-group difference in the test session (one-way ANOVA, $F(2,29) = 17.61$; $P < 0.0001$), but not in the reactivation session (one-way ANOVA, $F(2,29) = 0.89$; $P = 0.4205$). Testing freezing levels were higher in the AM251-treated animals and lower in the CP55940-treated group relative to controls ($P = 0.0001$ and 0.0080 , respectively; NK *post hoc* test), indicating a facilitatory and a disruptive effect on reconsolidation, respectively. Altogether, these results show that CB1Rs negatively modulate contextual fear memory reconsolidation.

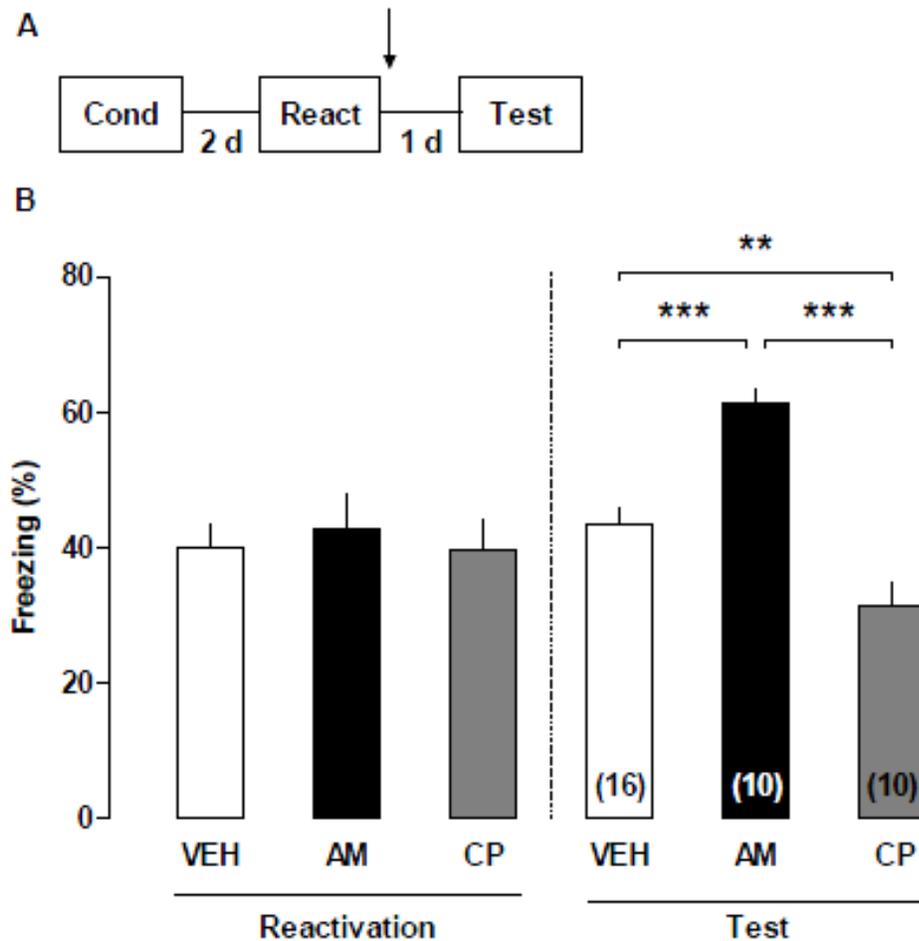


Figure 2. CB1R-dependent signaling modulates contextual fear memory reconsolidation in the RSC. (A) Experimental design. (B) Effects of postreactivation intra-RSC infusions of AM251, CP55940 or their vehicle on the percentage of freezing time evaluated 1 day later (right panel). Left panel shows the

percent of freezing time during the reactivation session. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Arrow indicates infusion time.

During reconsolidation, memories can return to a transitory labile state that is sensitive to modifications (Nader et al. 2000; Haubrich et al. 2015). Since we found that AM251 increased freezing levels while the CP55940 was amnesic when administered immediately after memory reactivation, we suggest that RSC-CB1Rs inhibit contextual fear memory reconsolidation. Indeed, when administered into the hippocampus, AM251 also enhances the freezing response in this paradigm (De Oliveira Alvares et al. 2008b). Additionally, when infused into the amygdala, the cannabinoid receptor agonist WIN blocks fear memory reconsolidation (Lin et al. 2006), the same effect found here using CP55940. All of these results indicate that endocannabinoids exert their actions with similar patterns in different brain regions. One possible mechanism is that CB1Rs act on the inhibitory neurotransmission, as observed in the amygdala (Ratano et al. 2014). However, the mechanisms underlying the effects of the cannabinoid receptors in the RSC on memory reconsolidation remain to be clarified in further studies. It is possible that the memory effects reported here are mediated by CB1R localized on both inhibitory interneurons and glutamatergic axon terminals. Nevertheless, we cannot dissect the role of CB1R in different neuronal populations with our pharmacological tools. It is also important to mention that these opposite effects on memory consolidation and reconsolidation also occur when glucocorticoid receptors are activated (Wang et al. 2008; De Oliveira Alvares et al. 2010). Interestingly, stress triggers an increase of endocannabinoids in the central nervous system (Hohmann et al. 2005), and this might happen in the RSC during memory consolidation and reconsolidation.

In order to evaluate the involvement of the cannabinoid system upon memory extinction, fear-conditioned rats were bilaterally infused intra-RSC 20 min before the extinction session. Freezing levels during extinction session and retention tests are shown in Fig. 3. In the first and last 4-min of the 30-min extinction session, there were differences indicated by repeated-measure ANOVA (main group effect, $F(2,24) = 8.01$; $P = 0.0022$; main time effect, $F(1,24) = 134.00$, $P < 0.0001$; 2-way interaction, $F(2,24) = 4.37$, $P = 0.0242$). CP55940-treated group showed lower freezing levels than controls and AM251-treated animals in both periods combined (NK *post hoc* test, $P < 0.01$), as

well as in the beginning of the session alone (NK *post hoc* test, $P < 0.001$). This indicates that (a) CP55940 impairs memory expression (alternatively, it might also indicate that CP55940 increases short-term extinction or acute fear adaptation), and (b) all groups showed lower freezing levels in the end of the session ($P < 0.01$, NK *post hoc* test), indicating that extinction occurred in all groups.

In the first drug-free test session carried out 24 h after the extinction training, there was a between-group difference (one-way ANOVA $F(2,24) = 4.38$; $P = 0.0239$). AM251-treated group showed higher freezing levels than controls and CP55940-treated animals ($P < 0.05$, NK *post hoc* test), indicating that AM251 impairs extinction. In the second test that was carried out 2 weeks later and was used to assess spontaneous recovery, there was also a between-group difference (one-way ANOVA, $F(2,19) = 12.03$; $P < 0.0004$). CP55940-treated animals maintained the lower freezing levels presented in the first test compared to controls and AM251-treated animals ($P < 0.01$, NK *post hoc* test). This indicates that the agonist CP55940 prevents spontaneous recovery (i.e., maintaining memory extinguished over time).

One could argue that the absence of spontaneous recovery in the CP55940 may indicate that it impaired reconsolidation rather than extinction. To rule out this possibility, another cohort of animals was fear-conditioned and exposed to a 30-min extinction session. Then, animals were bilaterally infused intra-RSC with either CP55940 or vehicle 20 min before the extinction session. One day later, they were subjected to reinstatement (a single 0.5 mA foot shock in a different environment, according to Haubrich et al. 2015). In the following day, they were tested (Fig. 3D).

The extinction of a CS-US association is a form of new learning that inhibits conditioned fear responses (Pavlov 1927; Quirck and Mueller 2008). However, extinction may fail to permanently suppress fear memory due to reinstatement, spontaneous recovery, and rapid reacquisition (Bouton et al. 2006). It is well-established that CB1Rs play a pivotal role in memory extinction, at least in the amygdala and the hippocampus (Marsicano et al. 2002; Chhatwal et al. 2005; Pamplona et al. 2006; Lutz 2007; De Oliveira Alvares et al. 2008b). Recently two important studies showed the involvement of the RSC in memory extinction (Corcoran et al. 2013; Kwapis et al. 2014). Here, we have shown that the cannabinoid system of the RSC is strongly engaged in this process.

When the CB1R-mediated activity was blocked, consolidation of extinction was impaired, since the AM251-treated group showed higher freezing levels when tested 24 h later, but showed similar freezing levels during extinction session. Fourteen days later, when spontaneous recovery was evaluated, CP55940-treated group prevented this response by maintaining memory extinguished. Therefore, the consolidation of extinction requires cannabinoid receptor activation in the RSC.

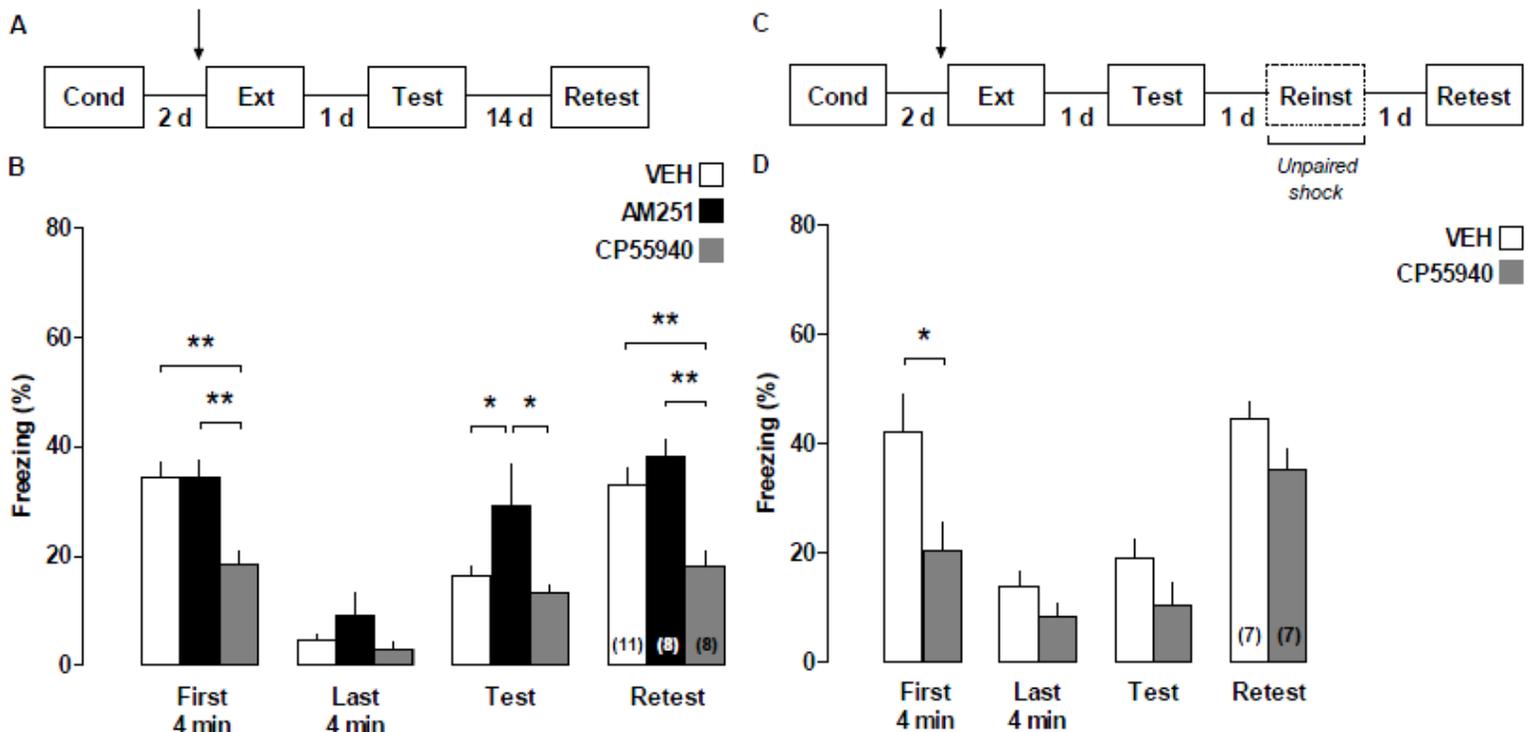


Figure 3. Involvement of the cannabinoid system in the RSC during contextual fear memory extinction. (A and C) Different behavioral procedures were used to assess memory extinction. (B) Fear-conditioned rats were bilaterally infused into the RSC with cannabinoid drugs 20 min before extinction training. Tests 1 and 2 were carried out 1 and 14 days later, respectively. CP55940 increased extinction and maintained fear response extinguished over time, whereas AM251 impaired memory extinction. (D) Fear reinstatement was observed in rats infused intra-RSC with CP55940 or their vehicle 20 min before extinction training. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Arrow indicates infusion time.

In humans, trauma-related stimuli cause a higher activation of the RSC in patients diagnosed with posttraumatic stress disorder (PTSD) than in controls (Sartory et al. 2013). Therefore, based on our results, the requirement of the CB1R-dependent activity in the RSC during emotional memory processing may be taken into account when searching putative treatments for PTSD or other incapacitating psychopathologies in which aversive memories are maladaptive.

In summary, the present study shows for the first time that the cannabinoid system in the RSC modulates contextual fear memory consolidation, reconsolidation, and extinction. This modulation is the same of that promoted by hippocampal CB1Rs, suggesting that there may be a general modulatory function of the endocannabinoid system in emotional memory processing.

Acknowledgements

We acknowledge CAPES (Ministério da Educação, República Federativa do Brasil) for the financial support. We also thank Mrs Zelma Regina de Almeida for her kind technical assistance, and Josué Haubrich for their helpful comments and suggestions.

References

- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross R, Mulder J. 2007. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* **316**:1212-16.
- Brenowitz SD, Regehr WG. 2005. Associative short-term synaptic plasticity mediated by endocannabinoids. *Neuron* **45**:419–431.
- Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S. 2006. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* **60**:352–360.
- Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Hauer D, Schelling G, McGaugh JL, Cuomo V. 2009. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:4888–4893.
- Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. 2006. Endocannabinoid mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* **29**:37–76.

Chevalerey V, Heifets BD, Kaeser PS, Südhof TC, Castillo PE. 2007. Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron* **54**:801–812.

Chhatwal JP, Davis M, Maguschak KA, Ressler KJ. 2005. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* **30**:516-24.

Cooper BG, Mizumori SJ. 2001. Temporary inactivation of the retrosplenial cortex causes a transient reorganization of spatial coding in the hippocampus. *J Neurosci* **21**:3986-4001.

Corcoran KA, Donnan MD, Tronson NC, Guzman YF, Gao C, Jovasevic V, Guedea AL, Radulovic J. 2011. NMDA receptors in retrosplenial cortex are necessary for retrieval of recent and remote context fear memory. *J Neurosci* **31**:11655–9.

Corcoran KA, Leaderbrand K, Radulovic J. 2013. Extinction of remotely acquired fear depends on an inhibitory NR2B/PKA pathway in the retrosplenial cortex. *J Neurosci* **33**:19492-8.

Czajkowski R, Jayaprakash B, Wiltgen B, Rogerson T, Guzman-Karlsson MC, Barth AL, Trachtenberg JT, Silva AJ. 2014. Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:8661–8666.

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**:119-24.

De Oliveira Alvares L, Pasqualini-Genro B, 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 Research* **1075**:60-7.

De Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA. 2008. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* **154**:1648-55.

De Oliveira Alvares L, Pasqualini-Genro P, Diehl F, Quillfeldt JA. 2008. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* **90**:1-9.

De Oliveira Alvares L, Engelke DS, 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**:202-9.

Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, de Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2015. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology* **40**:315-26.

Hedberg TG, Stanton PK. 1995. Long-term potentiation and depression of synaptic transmission in rat posterior cingulate cortex. *Brain Research* **670**:181–196.

Heifets BD, Castillo PE. 2009. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **71**:283–306.

Hill MN, McEwen BS. 2009. Endocannabinoids: the silent partner of glucocorticoids in the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:4579-4580.

Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker JG, Wotjak CT, Bains JS. 2010. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci* **30**:14980-6.

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. 2005. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* **435**:1108–1112.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. 1998. Mechanisms for memory types differ. *Nature* **393**:635-636

Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**:1030-38.

Katche C, Dorman G, Gonzalez C, Kramar CP, Slipczuk L, Rossato JI, Cammarota M e Medina JH. 2013a. On the role of retrosplenial cortex in long-lasting memory storage. *Hippocampus* **23**:295-302.

Katche C, Dorman G, Slipczuk L, Cammarota M, Medina JH. 2013b. Functional integrity of the retrosplenial cortex is essential for rapid consolidation and recall of fear memory. *Learn Mem* **20**:170-3.

Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axonal terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* **19**:4544–58.

Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. 2006. . *J Neurosci* **26**:5628–37.

Katona I, Freund TF. 2012. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* **35**:529–558.

Kubota Y, Gabriel M. 1995. Studies of the limbic comparator: Limbic circuit training-induced unit activity and avoidance behavior in rabbits with anterior dorsal thalamic lesions. *Behav Neurosci* **109**:258–277.

Kwapis JL, Jarome TJ, Lee JL, Gilmartin MR, Helmstetter FJ. 2014. Extinguishing trace fear engages the retrosplenial cortex rather than the amygdala. *Neurobiol Learn Mem* **113**:41-54.

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**:316-21.

Lutz B. 2007. The endocannabinoid system and extinction learning. *Mol Neurobiol* **36**:92–101.

Maddock RJ. 1999. The retrosplenial cortex and emotion: New insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci* **22**:310-316.

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 memories. *Nature* **418**:530-534.

McGaugh JL. 2000. Memory—a century of consolidation. *Science* **287**:248-51.

Mello e Souza T, Roesler R, Madruga M, de-Paris F, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH, Izquierdo I. 1999. Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem* **72**:118-27.

Moldrich G, Wenger T. 2000. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* **21**:1735-42.

Morena M, Roozendaal B, Trezza V, Ratano P, Peloso A, Hauer D, Atsak P, Trabace L, Cuomo V, McGaugh JL, Schelling G, Campolongo P. 2014. Endogenous cannabinoid release within prefrontal-limbic pathway affects memory consolidation of emotional training. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:18333-8.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**:722-6.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* **29**:729–738.

Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN. 2006. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology* **188**:641-9.

Pavlov IP. 1927. *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. London: Oxford University Press.

Paxinos G, Watson C. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.

Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci* **4**:873–884.

Quirk GJ, Mueller D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* **33**:56–72.

Ratano P, Everitt BJ, Milton AL. The CB1 receptor antagonist AM251 impairs reconsolidation of pavlovian fear memory in the rat basolateral amygdala. 2014. *Neuropsychopharmacology* **39**:2529-37.

Sartory G, Cwik J, Knuppertz H, Schürholt B, Lebens M, Seitz RJ, Schulze R. 2013. In search of the trauma memory: a meta-analysis of functional neuroimaging studies of symptom provocation in posttraumatic stress disorder (PTSD). *Plos One* **8**:1-11.

Souza MM, Mello e Souza T, Vinadé ER, Rodrigues C, Choi HK, Dedavid e Silva TL, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Effects of posttraining treatments in the posterior cingulate cortex on short- and long-term memory for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem* **77**:202-10.

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* **83**:393-411.

Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA. 2009. What does the retrosplenial cortex do? *Nature* **10**:792-802.

Vogt BA, Absher JR, Bush G. 2000. Human retrosplenial cortex: where is it and it is involved in emotion? *Trens Neurosci* **23**:195-97.

Wang XY, Zhao M, Ghitza UE, Li YQ, Lu L. 2008. Stress impairs reconsolidation of drug memory via glucocorticoid receptors in the basolateral amygdala. *J Neurosci* **28**:5602-10.

Wilson RI, Nicoll RA. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. *Nature* **410**:588–592.

Wyss JM, Sripanidkulchai K. 1984. The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulated cortex of the rat. *Brain Res* **293**:1-15.

Wyss JM, Van Groen T. 1992. Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. *Hippocampus* **2**:1-11.