

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

VANESSA RODRIGUES FERRER

**SISTEMA ENDOCANABINOIDE HIPOCAMPAL: EFEITO DO
AM404 SOBRE A RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DE
MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Orientador: Prof. Jorge Alberto Quillfeldt

Porto Alegre

2016

2016

VANESSA RODRIGUES FERRER

**SISTEMA ENDOCANABINOIDE HIPOCAMPAL: EFEITO DO
AM404 SOBRE A RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DE
MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de bacharel
em Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Cyntia Alencar Fin

Profa. Dra. Mirna Bainy Leal

Porto Alegre, novembro de 2016

RESUMO

Um traço de memória, ou engrama, é a representação de um evento ou experiência aprendida. Após a aprendizagem, as memórias são lábeis e sensíveis à interrupção; após a consolidação, as memórias são resistentes à ruptura. No entanto, a reativação de memórias anteriormente consolidadas retorna-as novamente a um estado lábel e, portanto, suscetível a perturbação, podendo ser reconsolidada ou extinta, dependendo das características dos estímulos. O sistema endocanabinoide, entre diversas outras funções, está envolvido na modulação da memória, principalmente de memórias aversivas. Aprendizagem e déficits de memória estão entre os efeitos comportamentais mais comumente relatados de canabinoides e acredita-se que esses efeitos estejam associados com o hipocampo, uma área altamente expressa com receptores canabinóides. Esse sistema possui um papel central na extinção, uma fase da memória que ocorre após a reativação e representa um grande valor adaptativo, porque impede de insistir na realização de comportamentos que já não se ligam mais com a realidade. Também há muitas evidências de que a ativação do sistema endocanabinoide modula a reconsolidação em várias áreas encefálicas. O AM404 é um inibidor do transporte e da recaptação da anandamida, ou seja, ele prolonga a ação dos endocanabinoides já liberados. Nesse trabalho foi analisado o efeito de infusão bilateral intra-hipocampal do fármaco AM404 (55ng/0,5µL lado) na tarefa de campo aberto e nas fases de reconsolidação e extinção da memória no condicionamento aversivo ao contexto com choque de 0,7mA.

Palavras chave: AM404, campo aberto, endocanabinoides, extinção, reconsolidação

1 INTRODUÇÃO

Entender como a informação é processada e armazenada no encéfalo é entender quem somos. Aprender consiste em uma mudança no comportamento resultante da experiência que permite que os indivíduos se adaptem às características do ambiente. A memória é a capacidade de aprender, armazenar e lembrar informações e fatos adquiridos através de experiências ouvidas ou vividas e é também definida como um processo de aquisição, consolidação e evocação de informações. As memórias podem ser classificadas de acordo com seus conteúdos (memória declarativa e memória não declarativa) e de acordo com o tempo que duram (memória de trabalho, memória de curta duração e memória de longa duração). Diferentes sistemas encefálicos, mecanismos e estratégias moleculares são recrutados para o processamento dos diferentes tipos de memória (Izquierdo, 2011; Squire & Kandel, 2003).

A aquisição, ou aprendizagem de novas informações, ocorre durante a experiência onde estamos expostos a estímulos e um registro destes dados são implementados no encéfalo por modificações nas conexões sinápticas entre redes neuronais (Lee, 2013; Tse *et al.*, 2007). As memórias são consideradas como lábeis, transitórias e sensíveis à ruptura, sendo expressas como memórias de curto prazo. Se esses traços transitórios passam por um processo de consolidação, as memórias se tornam resistentes, estabilizadas como traços de longa duração e expressas como memórias de longo prazo (McKenzie & Eichenbaum, 2011; Nader *et al.*, 2000b). A consolidação de memórias envolve a transcrição de genes e a tradução de proteínas, uma vez que os inibidores da transcrição ou da tradução podem induzir a amnésia se aplicada um pouco ou imediatamente após a aprendizagem (Suzuki *et al.*, 2004).

A evocação refere-se ao ato de lembrar, sendo o processo que demonstra se de fato existe um traço mnemônico, no qual o indivíduo tem acesso às informações previamente aprendidas e armazenadas. Se evocado, as memórias são reativadas, retornam a um estado lábil e, portanto, suscetível a interrupção, da mesma forma que as memórias iniciais de curto prazo. A reativação de memórias consolidadas retorna-as a um estado dependente de síntese proteica

e inicia dois processos opostos os quais dependem da duração da sessão de reativação: reconsolidação -requer uma breve sessão de reativação- e extinção -requer uma prolongada- (Nader *et al.*, 2000a, Myers & Davis, 2002, Nader, 2003).

A reconsolidação é um mecanismo de atualização conduzido para incorporar novas informações a uma memória já consolidada (Tronson & Taylor, 2007, Suzuki *et al.*, 2004), reestabilizando a memória reativada e tornando-a novamente insensível a interferências. É um processo de alto valor adaptativo no estabelecimento de estratégias comportamentais (Lee, 2013; de Oliveira Alvares *et al.*, 2013) sendo dependente da interação de diversas regiões encefálicas e também limitada por uma série de fronteiras de ativação, tais como nível de diferença entre o evento de aquisição da memória e uma posterior reativação da mesma informação, tempo de reativação e idade da memória (Exton *et al.*, 2015).

A extinção é desencadeada por uma exposição prolongada a estímulos de evocação e expressa, do ponto de vista comportamental, como um desaparecimento gradual da resposta previamente adquirida. No entanto, não se trata de um apagamento ativo, mas sim de um novo aprendizado que compete e suprime temporariamente a memória formada durante a associação original (Bouton, 2004; Myers & Davis, 2002; Rescorla & Heth, 1975). De forma semelhante à consolidação e reconsolidação, a extinção também depende da síntese proteica *de novo*, mas possui mecanismos temporais e bioquímicos diferentes (Suzuki *et al.*, 2004) com evidências crescentes de que algumas vias celulares são especificamente envolvidas em extinção, mas não na aquisição ou consolidação de memórias do medo (Morgan *et al.*, 1993; Quirk *et al.*, 2000). Num sentido mais amplo, a extinção da memória pode refletir flexibilidade comportamental e adaptação às mudanças ambientais (Kamprath *et al.*, 2006).

O condicionamento ao medo Pavloviano é um procedimento comportamental no qual uma pista (estímulo condicionado, EC) vem induzir uma resposta ao medo quando é repetidamente emparelhado com um estímulo nocivo, muitas vezes um choque no pé (estímulo incondicionado, EI). O condicionamento ao medo não é apenas uma medida sensível de medo ou ansiedade antecipatória, mas também é um paradigma comportamental principal

para o estudo dos mecanismos neurais através dos quais a memória emocional é formada e armazenada ou extintas, se os animais são expostos apenas à pista sem emparelhamento com um choque (Rescorla, 2001).

A descoberta do principal constituinte psicoativo da maconha, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) por Gaoni & Mechoulam em 1964, levou à identificação do sistema endocanabinoide no final do século XX e dos seus alvos moleculares, CB1 (Matsuda *et al.*, 1990) e CB2 (Munro *et al.*, 1993). Os componentes do sistema endocanabinoide (SEC), consistindo de receptores canabinoides, os respectivos ligantes endógenos e maquinaria enzimática para a síntese, degradação e transporte dos endocanabinoides, são abundantemente expressos em todas as principais regiões do encéfalo que estão envolvidas na aprendizagem e memória, incluindo o hipocampo, amígdala, córtex cerebral, estriado e cerebelo (Freund *et al.*, 2003; Mackie, 2005; Marsicano & Lutz, 1999). O SEC é um sistema fundamental na fisiologia básica e em aspectos comportamentais, modulando diversas funções fisiológicas como a dor, controle do apetite, motricidade e cognição e está envolvido em condições fisiopatológicas, sendo um alvo terapêutico na busca de novos tratamentos de muitas doenças mentais, incluindo transtornos de ansiedade, estresse pós-traumático, depressão e dependência de drogas (Porter & Felder, 2001).

Os receptores canabinoides tipo 1 (CB1) constituem o receptor acoplado à proteína G mais abundante no Sistema Nervoso Central (SNC) humano, estando presente em áreas associadas ao controle motor, resposta emocional, aprendizagem e memória, comportamentos orientados por objetivos, homeostase energética e funções cognitivas superiores, entre outras (Breivogel & Sim-Selley, 2009; Kano *et al.*, 2009). Nos órgãos e tecidos periféricos os receptores CB1 são expressos em baixa densidade, enquanto no SNC localizam-se em terminais pré-sinápticos, mas também foram detectados na pós-sinapse e glia (Svizenska *et al.* 2008; Lovinger, 2008). O potencial valor terapêutico da modulação canabinoide é ressaltado pela expressão densa do receptor CB1 em regiões conhecidas como importantes para a ansiedade e aprendizagem emocional, incluindo a amígdala, o hipocampo e todo o sistema de recompensa de dopamina mesolímbico (Katona *et al.*, 1999, 2000, 2001,

Freund *et al.*, 2003, Van der Stelt & Di Marzo, 2003). O receptor canabinoide tipo 2 (CB2) está principalmente envolvido em respostas imunitárias (Klein, 2005).

Os dois principais ligantes endógenos para os receptores CB1 e CB2 são a etanolamina N-araquidonoil (anandamida, AEA) a qual atua como um agonista parcial dos receptores CB1 e CB2 (Pertwee, 2010) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG) que é agonista completo desses receptores (Stella *et al.*, 1997). Ao contrário de neurotransmissores clássicos, endocanabinoides não são armazenados em vesículas pré-sinápticas, são sintetizados no neurônio pós-sináptico a partir de moléculas precursoras da membrana lipídica de uma forma dependente de atividade (Kano *et al.*, 2009). Uma vez sintetizados e difundidos através da membrana pós-sináptica para a fenda sináptica, eles funcionam como mensageiros retrógrados para ligarem-se aos receptores de canabinoides expressos em terminais pré-sinápticos. Embora o papel pré-sináptico da sinalização dos endocanabinoides esteja bem estabelecido, eles também podem atuar pós-sinápticamente através da ativação do receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1) e via ativação de astrócitos (Castillo *et al.*, 2012).

Aprendizagem e déficits de memória estão entre os efeitos comportamentais mais comumente relatados dos canabinoides (Lichtman *et al.*, 1995; Pamplona & Takahashi, 2006). Acredita-se que esses efeitos estejam associados ao hipocampo, uma área altamente expressa com receptores canabinoides, visto que a administração sistêmica de agonistas induz déficits em várias tarefas dependentes do hipocampo, tais como o labirinto radial e labirinto aquático de Morris (Lichtman *et al.*, 1995; Ferrari *et al.*, 1999; Varvel *et al.*, 2005). Por outro lado, estudos usando antagonistas de receptores CB1 ou camundongos deficientes em CB1 geralmente demonstram maior desempenho em tarefas de memórias dependentes do hipocampo como o labirinto radial (Lichtman, 2000) e reconhecimento social (Terranova *et al.*, 1996).

Um número crescente de estudos demonstraram que o sistema endocanabinoide é crítico para a codificação da memória emocional e há um forte consenso na literatura sobre a extinção da memória de que o sistema endocanabinoide é um modulador-chave neste fenômeno. A interrupção da sinalização CB1 prejudica a extinção de diferentes memórias aversivas e/ou espaciais (Marsicano *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004; Varvel *et al.*, 2005;

Pamplona *et al.*, 2006). No entanto, esses efeitos sobre a extinção parecem ser seletivos a memórias aversivas (Lutz, 2007), não afetando as memórias menos aversivas (Hölter *et al.* 2005; de Oliveira Alvares *et al.* 2006; Pamplona & Takahashi 2006; Niyuhire *et al.*, 2007) ou produzidas por estímulos gratificantes (Harloe *et al.*, 2008, Manwell *et al.*, 2009). Por outro lado, a estimulação da sinalização endocanabinoide facilita a extinção do medo (Chhatwal *et al.*, 2005; Pamplona *et al.*, 2006, 2008; Suzuki *et al.*, 2004). Já a reconsolidação da memória aversiva pode ser interrompida pelo tratamento pós-reativação com antagonistas CB1 (Bucherelli *et al.*, 2006), que suporta um papel para endocanabinoides na reconsolidação da memória (Lin *et al.*, 2006, Kobilko *et al.*, 2007, Suzuki *et al.*, 2008).

De Oliveira Alvares (2008a) observou que há ação oposta dos receptores CB1, através de estudos com o antagonista AM251, na reconsolidação e extinção de memórias e seus resultados sugerem um possível papel do sistema endocanabinoide hipocampal como um mecanismo de troca, decidindo quais processos ocorrerão: manutenção da memória original (reconsolidação) ou estimulação de um novo aprendizado (extinção).

O AM404 (N-(4-Hydroxyphenyl)-arachidonylamide) é um fármaco que age sobre o transportador de anandamida, sendo assim, interfere apenas na recaptção da molécula endogenamente liberada. Desta forma, esta é uma abordagem farmacológica alternativa a agonistas/antagonistas do receptor CB1 que permite o estudo do papel do ligante endógeno e não do receptor como mediador dos processos fisiológicos estudados. Alguns dos efeitos *in vivo* de AM404 parecem envolver níveis de anandamida aumentadas e, por conseguinte, a ativação indireta de receptores de canabinoides CB1 (Beltramo *et al.*, 2000; Bortolato *et al.*, 2006; Freund, *et al.*, 2003). Chhatwal *et al.* (2005) observou que o uso de um agonista direto CB1, o WIN 55,212-2 pareceu não afetar a extinção, então ele estudou o efeito de aplicações sistêmicas de AM404 antes do treino de extinção e seus resultados mostraram que o tratamento com o fármaco facilitou a extinção. Já Bitencourt *et al.* (2008) investigou os efeitos de injeção intra-cerebro-ventricular do AM404 e do fitocanabinoide, Canabidiol, na extinção do medo condicionado ao contexto em ratos e observou que houve facilitação

da extinção, com efeitos persistentes. Estudos do efeito do AM404 na reconsolidação de memórias aversivas, no entanto, não foram realizados.

A maioria dos efeitos dos canabinoides no encéfalo ocorrem através da ativação dos receptores CB1 e visto que os endocanabinoides parecem modular várias fases de formação de memória e a maior parte dos estudos foram realizados utilizando infusões sistêmicas (por exemplo, Suzuki *et al.*, 2004 e Chhatwal *et al.*, 2005) ou em regiões diferentes (como Lin *et al.*, 2006 e Bitencourt *et al.*, 2008) e uma vez que os receptores CB1 estão presentes em diferentes estruturas encefálicas (envolvidas em diferentes funções fisiológicas), estes relatos são pouco conclusivos em termos de substrato anatômico.

Justifica-se, então, o presente estudo que pretende explorar os efeitos do AM404 administrado diretamente no hipocampo dorsal, pois possibilitará um melhor entendimento da neurobiologia de memórias aversivas nas fases de reconsolidação e extinção da memória com relação ao sistema endocanabinoide hipocampal. Além disso, o sistema canabinoide endógeno pode representar um alvo terapêutico para o tratamento de transtornos associados com a retenção inapropriada de memórias aversivas ou respostas inadequadas para situações aversivas, logo o envolvimento de canabinoides na extinção e reconsolidação tem potenciais implicações clínicas, visto que numerosas semelhanças ligam a expressão de medo e ansiedade em humanos que sofrem de fobias, transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), e outros transtornos de ansiedade com a expressão do medo condicionado em animais, sendo, talvez, a mais importante dessas semelhanças a persistência de lembranças de medo tanto em humanos como em modelos animais.

2 OBJETIVOS

Investigar os efeitos do AM404, inibidor competitivo e seletivo do transportador de anandamida, administrado no hipocampo dorsal sobre o controle motor e ansiedade na tarefa de campo aberto e sobre a reconsolidação e extinção de memórias aversivas na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto com choque de 0,7 mA.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos (2 a 3 meses de idade), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos no ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC), no Departamento de Biofísica desta mesma Universidade, sob condições constantes de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade constante) e iluminação, sendo um ciclo de 12 horas claro (7h às 19h) e 12 horas escuro. Foram acondicionados 5 animais por gaiola, caixas de plástico cobertas com grades metálicas e maravalha espalhada pelo assoalho, os quais receberam ração padronizada e água *ad libitum*.

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de Cetamina, que é um anestésico dissociativo e Xilazina, que é um sedativo, miorrelaxante e analgésico nas doses de 70 mg/kg e 6 mg/kg, respectivamente. Cada animal anestesiado foi submetido à tricotomia na região dorsal da cabeça e cuidadosamente colocado em um aparelho estereotáxico (Fabricação: David Kopf, modelo 1404) e a superfície do crânio foi exposta por incisão com bisturi. Após a retirada do perióstio, uma craniotomia bilateral foi realizada com uma

broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas anteroposterior (AP) e látero-lateral (LL) do hipocampo dorsal.

Uma cânula de aço inoxidável, presa à torre móvel do estereotáxico foi introduzida através de cada um dos orifícios feitos na calota craniana e baixada até a dura-máter. A partir disto, define-se a coordenada dorsoventral (DV) de referência e em seguida posiciona-se a cânula a 1mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal. As cânulas foram fixadas com acrílico dentário, que quando seco forma um capacete e para garantir a sustentação deste capacete, um parafuso foi fixado no osso parietal. As coordenadas foram definidas e adaptadas a partir do atlas de Paxinos & Watson (1998): coordenada a partir do Bregma: AP – 0,40cm, LL \pm 0,30cm; e coordenada a partir da Dura-máter: DV – 0,16cm.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em uma câmara de recuperação e aquecidos com uma lâmpada vermelha até estarem totalmente acordados da anestesia. O antibiótico Tilosina (10 mg/kg) foi administrado por via intramuscular enquanto o animal estiver sob efeito da anestesia, bem como o anti-inflamatório e analgésico Meloxicam (2 mg/kg) por via subcutânea, 15 minutos antes, 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico. Os animais foram submetidos à tarefa comportamental entre 5 e 7 dias após a cirurgia.

3.3 Campo Aberto

Para garantir que os resultados nos experimentos de reconsolidação e extinção da memória não sejam um efeito do fármaco sobre os níveis de ansiedade e locomoção, visto que canabinoides são conhecidos por influenciar a percepção da dor, emotividade e locomoção (Pertwee, 2001; Rodriguez de Fonseca *et al.*, 1998), foi realizada a tarefa de campo aberto.

Para esse experimento de controle motor e ansiedade, o animal foi colocado no centro de uma caixa de madeira de 60cmx60cm vazia, dividida em 36 quadrantes e foi deixado que ele a explore livremente durante 5 minutos. Foi registrado o tempo que o animal permanece na periferia ou no centro da caixa e

a quantidade de vezes que ele troca de quadrante. A arena do campo aberto foi limpa com álcool 70% a cada troca de animal.

3.4 Condicionamento Aversivo ao Contexto

A tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto foi realizada em uma caixa de acrílico com iluminação direta e uma base formada por barras (com 1 cm de distância entre cada barra) de aço inoxidável, dispostas paralelamente e conectadas a um gerador de choque elétrico.

O treino consiste em colocar o animal na caixa por 4 minutos. A partir do terceiro minuto, foram dados dois choques de 0,7 mA com 2 segundos de duração e intervalo de 30 segundos entre cada choque. Ao completar 4 minutos, o animal é retirado da caixa.

Para o experimento de reconsolidação da memória, 24h após o treino, o animal foi exposto somente ao contexto (ausência de choque) por 4 minutos para reativação da memória e imediatamente após isso foi administrado o fármaco ou o veículo. O teste foi realizado 24 horas após essa reativação, onde o animal foi reexposto ao contexto por 4 minutos e o tempo de congelamento (*freezing*), que consiste na ausência de movimentos visíveis exceto os da respiração, foi medido com um cronômetro. A variável experimental relevante para esta tarefa é o tempo de congelamento, que é tomado como índice de medo, em relação ao tempo total do teste.

Para o experimento de extinção, 24h após o treino, o animal foi exposto somente ao contexto (ausência de choque) por 30 minutos e imediatamente ao término da exposição foi administrado o fármaco ou veículo. 24h depois foi feito o teste onde o animal foi reexposto ao contexto por 4 minutos e o tempo de congelamento foi medido com um cronômetro.

3.5 Diluição e administração dos fármacos

O AM404 (Tocris) é um seletivo e competitivo inibidor do transportador de anandamida e agonista dos receptores TRPV1, que foi administrado na concentração 55ng/0,5 µL por hemisfério. O fármaco foi dissolvido em uma solução veículo de 8% de dimetilsulfóxido (DMSO) em 0,1M de tampão fosfato salino (TFS). Os animais dos grupos controles receberam um volume de 0,5 µL por hemisfério da solução veículo. As concentrações e o volume foram selecionados com base em estudos anteriores (Tan *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2016).

Para a administração intra-CA1 do fármaco ou veículo, os animais foram gentilmente imobilizados e uma agulha odontológica (de calibre menor que o da cânula) conectada por um tubo P10 de polietileno a uma microseringa Hamilton, contendo o fármaco ou o veículo foi inserida dentro da cânula implantada 1 mm acima do hipocampo. A agulha odontológica possui 1 mm a mais que a cânula, sendo assim, a inserção total da agulha odontológica na cânula indica que a mesma penetrou o hipocampo. A microseringa é acionada automaticamente por uma bomba de infusão que realiza a infusão de 0,5 µL por um período de 90 segundos. O procedimento foi realizado simultaneamente em ambos os hemisférios.

3.6 Controle do posicionamento das cânulas

Após a realização das tarefas comportamentais, os animais foram sacrificados por guilhotinamento e seus encéfalos foram dissecados e colocados em solução de paraformaldeído 10% por no mínimo 72 horas. Após este período, os encéfalos foram seccionados em um vibrátomo e as lesões causadas pelas cânulas no tecido encefálico foram verificadas através de uma lupa acoplada ao vibrátomo. Somente foram considerados para a análise estatística os animais que apresentarem posicionamento correto das cânulas.

3.7 Considerações Bioéticas

Este trabalho foi parte do projeto Nº 27663, intitulado “Plasticidade do sistema endocanabinoide hipocampal e amigdalóide na consolidação e evocação de memórias aversivas: ensaios comportamentais e imunistoquímicos” previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS). Os experimentos foram realizados de acordo com o que predica a diretriz legal brasileira Lei Nº 11.794/2008, envolvendo o mínimo de desconforto ou sofrimento dos animais experimentais e além disso, realizados estritamente de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e da International Brain Research Organization (IBRO). Um adendo ao projeto foi encaminhado à CEUA/UFRGS e os experimentos foram realizados somente após a aprovação por esta comissão.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados mediante uma análise estatística paramétrica e expressos como média e erro padrão nos experimentos de campo aberto e reconsolidação. Foi utilizado o teste t de Student para amostras independente, comparando o número de troca entre quadrantes e a média do tempo gasto no centro no experimento do campo aberto entre os dois grupos. Para a análise da reconsolidação foi comparado a média do tempo gasto em congelamento entre os dois grupos na sessão de reativação e de teste com um teste t para amostras independentes. Para a extinção foi feita uma análise não paramétrica com análise Mann-Whitney. A significância foi estabelecida como $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

Embargado até 09/12/2017.

5 DISCUSSÃO

Embargado até 09/12/2017.

7 REFERÊNCIAS

- Akirav, I.; Abush, H. Cannabinoids Modulate Hippocampal Memory and Plasticity. *Hippocampus*, 20(10), 1126–1138. 2010.
- Beltramo, M.; de Fonseca, F. R.; Navarro, M.; Calignano, A.; Gorriti, M. A.; Grammatikopoulos, G.; Sadile, A. G.; Giuffrida, A.; Piomelli, D. Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci*. May 1;20(9):3401-7. 2000.
- Beltramo, M.; Stella, N.; Calignano, A.; Lin, S. Y.; Makriyannis, A.; Piomelli, D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277: 1094–1097. 1997.
- Bitencourt, R. M.; Pamplona, F. A.; Takahashi, R. N. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *European Neuropsychopharmacology*, 18(12),849–859. 2008.
- Bortolato, M.; Campolongo, P.; Mangieri, R. A.; Scattoni, M. L.; Frau, R.; Trezza, V.; La Rana, G.; Russo, R.; Calignano, A.; Gessa, G. L.; Cuomo, V.; Piomelli, D. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* 31, 2652–2659. 2006.
- Bouton, M. E. Context and behavioral processes in extinction. *Learning & Memory*, 11, 485–494. 2004.
- Bouton, M. E. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychological Bulletin*, 114, 80–99. 1993.
- Breivogel, C. S.; Childers, S. R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 5:417–431. 1998.
- Breivogel, C. S.; Sim-Selley, L. J. Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *Int Rev Psychiatry*. 21(2):113-21. 2009.
- Bucherelli, C.; Baldi, E.; Mariottini, C.; Passani, M. B.; Blandina, P. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learn Mem*. Jul-Aug;13(4):426-30. 2006.
- Campolongo, P.; Ratano, P.; Manduca, A.; Scattoni, M. L.; Palmery, M.; Trezza, V.; Cuomo V. The endocannabinoid transport inhibitor AM404 differentially modulates recognition memory in rats depending on environmental aversiveness. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 11. 2012.
- Castillo, P. E.; Younts, T. J.; Chávez, A. E.; Hashimoto, Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 2012 Oct 4; 76(1): 70–81. 2012.
- Chhatwal, J. P.; Davis, M.; Maguschak, K. A.; Ressler, K. J. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 30(3), 516–524. 2005.
- Clarke, J. R.; Rossato, J. I.; Monteiro, S.; Bevilacqua, L. R.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2), 374–381. 2008.
- Coutts, A. A.; Anavi-Goffer, S.; Ross, R. A.; MacEwan, D. J.; Mackie, K.; Pertwee, R. G.; Irving, A. J. Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci* 21: 2425–2433. 2001.
- Cravatt, B. F.; Demarest, K.; Patricelli, M. P.; Bracey, M. H.; Giang, D. K.; Martin, B. R.; Lichtman, A. H. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9371–9376. 2001.

- De Oliveira Alvares, L.; de Oliveira, L. F.; Camboim, C.; Diehl, F.; Genro, B. P.; Lanzotti, V. B.; Quillfeldt, J. A. Amnesic 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.* Mar;83(2):119-24. 2005.
- De Oliveira Alvares, L.; Crestani, A. P.; Cassini, L. F.; Haubrich, J.; Santana, F.; Quillfeldt, J. A. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, 244(April), 42–8. 2013.
- De Oliveira Alvares, L.; Genro, B. P.; Diehl, F.; Quillfeldt, J. A. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 1–9. 2008b.
- De Oliveira Alvares, L.; Genro, B. P.; Vaz Breda, R.; Pedroso, M. F.; Da Costa, J. C.; Quillfeldt, J. A. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res* 1075: 60–67. 2006.
- De Oliveira Alvares, L.; Genro, B.; Diehl, F.; Molina, V. A.; Quillfeldt, J. A. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience*, 154(4), 1648–1655. 2008a.
- Drews, E.; Schneider, M.; Koch, M. Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* Jan;80(1):145-50. 2005.
- Exton-McGuinness, M. T. J.; Lee, J. L. C., Reichelt, A. C. Updating memories—The role of prediction errors in memory reconsolidation. *Behavioural Brain Research*, 278, 375–384. 2015.
- Ferrari, F.; Ottani, A.; Vivoli, R.; Giuliani, D. Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. *Pharmacol Biochem Behav.* Nov;64(3):555-61. 1999.
- Freund, T. F.; Katona, I.; Piomelli, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017–1066. 2003.
- Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 1646–1647. 1964.
- Giang, D. K.; Cravatt, B. F. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2238–2242. 1997.
- Giuffrida, A.; Beltramo, M.; Piomelli, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* Jul;298(1):7-14. 2001.
- Harloe, J.P.; Thorpe, A. J.; Lichtman, A. H. Differential endocannabinoid regulation of extinction in appetitive and aversive Barnes maze tasks. *Learn Mem.* Oct 28;15(11):806-9. 2008.
- Hölter, S. M.; Kallnik, M.; Wurst, W.; Marsicano, G.; Lutz, B.; Wotjak, C. T. Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively motivated learning task. *Eur J Pharmacol* 510: 69–74. 2005.
- Hsieh, C.; Brown, S.; Derleth, C.; Mackie, K. Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* 73: 493–501. 1999.
- Izquierdo I. Memória. Porto Alegre: Artmed. 2011.
- Jarrahan, A.; Manna, S.; Edgmond, W. S.; Campbell, W. B.; Hillard, C. J. Structure-activity relationships among N-arachidonyl ethanolamine (Anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J Neurochem* 74: 2597–2606. 2000.
- Kamprath, K.; Marsicano, G.; Tang, J.; Monory, K.; Bisogno, T.; Di Marzo, V.; Lutz, B.; Wotjak, C. T. Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *Journal of Neuroscience*, 26, 6677–6686. 2006.
- Kano, M.; Ohno-Shosaku, T.; Hashimoto-dani, Y.; Uchigashima, M.; Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* 89(1):309-80. 2009.

- Katona, I.; Rancz, E. A.; Acsady, L.; Ledent, C.; Mackie, K.; Hajos, N.; Freund, T. F. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci* 21: 9506–9518. 2001.
- Katona, I.; Sperlagh, B.; Magloczky, Z.; Santha, E.; Kofalvi, A.; Czirjak, S.; Mackie, K.; Vizi, E. S.; Freund, T. F. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100: 797–804. 2000.
- Katona, I.; Sperlagh, B.; Sik, A.; Kofalvi, A.; Vizi, E. S.; Mackie, K.; Freund, T. F. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19: 4544–4558. 1999.
- Klein, T. W. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol* 5:400–411. 2005.
- Kobilov, T.; Hazvi, S.; Dudai, Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *Eur J Neurosci*. Jun;25(11):3417-21. 2007.
- Lee, J. L. C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Europe PMC Funders Group*, 32(8), 413–420. 2013.
- Lichtman, A. H. SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. *Eur J Pharmacol*. Sep 15;404(1-2):175-9. 2000.
- Lichtman, A. H.; Dimen, K. R.; Martin, B. R. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 119, 282–290. 2005.
- Lin, H. C.; Mao, S. C.; Gean, P. W. Effects of intra-amygdala infusion of CB1 receptor agonists on the reconsolidation of fear-potentiated startle. *Learn Mem*. May-Jun;13(3):316-21. 2006.
- Liu, J.; Zhao, L.; Xue, Y.; Shi, J.; Suo, L.; Luo, Y.; Chai, B.; Yang, C.; Fang, Q.; Zhang, Y.; Bao, Y.; Pickens, C. L.; Lu, L. An unconditioned stimulus retrieval extinction procedure to prevent the return of fear memory. *Biol Psychiatry*. Dec 1;76(11):895-901. 2014.
- Lovinger, D. M. Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. (184):435-77. 2008.
- Lutz, B. The endocannabinoid system and extinction learning. *Molecular Neurobiology*, 36, 92–101. 2007.
- Mackie, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 168:299–325. 2005.
- Manwell, L. A.; Satvat, E.; Lang, S. T.; Allen, C. P.; Leri, F.; Parker, L. A. FAAH inhibitor, URB-597, promotes extinction and CB(1) antagonist, SR141716, inhibits extinction of conditioned aversion produced by naloxone-precipitated morphine withdrawal, but not extinction of conditioned preference produced by morphine in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. Nov;94(1):154-62. 2009.
- Marsicano, G.; Lutz, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11:4213–4225. 1999.
- Marsicano, G.; Wotjak, C. T.; Azad, S. C.; Bisogno, T.; Rammes, G.; Cascio, M. G.; Hermann, H.; Tang, J.; Hofmann, C.; Zieglgänsberger, W.; Di Marzo, V.; Lutz, B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418(6897), 530–534. 2002.
- Mato, S.; Chevalleyre, V.; Robbe, D.; Pazos, A.; Castillo, P. E.; Manzoni, O. J. A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 7: 585–586. 2004.
- Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, n. 6284, p. 561-564. 1990.
- McKenzie, S.; Eichenbaum, H. Consolidation and reconsolidation: Two lives of memories? *Neuron*, 71, 224–233. 2011.

- Morgan, M. A.; Romanski, L. M.; LeDoux, J. E. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.* 163, 109–113. 1993.
- Munro, S.; Thomas, K.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, n. 6441, p. 61-65. 1993.
- Myers, K. M.; Davis, M. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36: 567–584. 2002.
- Myers, K. M.; Davis, M. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry*. Feb;12(2):120-50. 2007.
- Nader, K. Memory traces unbound. *Trends Neuroscience*. 26: 65–72. 2003.
- Nader, K.; Schafe, G. E.; LeDoux, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406, 722–726. 2000a.
- Nader, K.; Schafe, G. E.; LeDoux, J. E. The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews Neuroscience*, 1, 216–219. 2000b.
- Niyuhire, F.; Varvel, S. A.; Thorpe, A. J.; Stokes, R. J.; Wiley, J. L.; Lichtman, A. H. The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. *Psychopharmacology* 191: 223–231. 2007.
- O'Sullivan, S. E. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 152: 576–582. 2007.
- Pamplona, F. A.; Bitencourt, R. M.; Takahashi, R. N. Short- and long-term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. *Neurobiol Learn Mem*. Jul;90(1):290-3. 2008.
- Pamplona, F. A.; Prediger, R. D.; Pandolfo, P.; Takahashi, R. N. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berlin)*, 188(4), 641–649. 2006.
- Pamplona, F. A.; Takahashi, R. N. WIN 55212–2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett* 397: 88–92. 2006.
- Paxinos, G.; Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press. 1998.
- Pertwee, R. G. Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* 63, 569–611. 2001.
- Pertwee, R. G. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Current Medicinal Chemistry*, 17(14), 1360–1381. 2010.
- Porter, A. C.; Felder, C. C. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90: 45–60. 2001.
- Quirk, G. J.; Russo, G. K.; Barron, J. L.; Lebron, K. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *J. Neurosci.* 20, 6225–6231. 2000.
- Rescorla, R. A. Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 27, 115–124. 2001.
- Rescorla, R. A.; Heth, C. D. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 1, 88–96. 1975.
- Ressler, K. J.; Rothbaum, B. O.; Tannenbaum, L.; Anderson, P.; Graap, K.; Zimand, E.; Hodges, L.; Davis, M. Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: Use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. *Arch Gen Psychiatry* 61:1136–1144. 2004.
- Revilla, D. A.; Paglini, M. G.; Arias, C. Spontaneous recovery from extinction in the infant rat. *Behav Brain Res*. Nov 1;274:149-57. 2014.
- Rodriguez de Fonseca, F.; Del Arco, I.; Martin-Calderon, J. L.; Gorriti, M. A.; Navarro, M. Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol. Dis.* 5, 483–501. 1998.

- Sachser, R. M.; Crestani, A. P.; Quillfeldt, J. A.; Mello e Souza, T.; de Oliveira Alvares, L. The cannabinoid system in the retrosplenial cortex modulates fear memory consolidation, reconsolidation, and extinction. *Learn Mem.* Nov 16;22(12):584-8. 2015.
- Santana, F.; Sierra, R. O.; Haubrich, J.; Crestani, A. P.; Duran, J. M.; de Freitas Cassini, L.; de Oliveira Alvares, L.; Quillfeldt, J. A. Involvement of the infralimbic cortex and CA1 hippocampal area in reconsolidation of a contextual fear memory through CB1 receptors: Effects of CP55,940. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 127, p. 42-47, 2016.
- Schiller, D.; Cain, C. K.; Curley, N. G.; Schwartz, J. S.; Stern, S. A.; Ledoux, J. E.; Phelps, E. A. Evidence for recovery of fear following immediate extinction in rats and humans. *Learn Mem.* May 28;15(6):394-402. 2008.
- Smart, D.; Jerman, J. C. Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol SciApr*;21(4):134. 2000.
- Squire L.; Kandel, E. *Memória*. Porto Alegre: Artmed. 2003.
- Starowicz, K.; Nigam, S.; Di Marzo, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114(1):13–33. 2007.
- Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), 773–778. 1997.
- Suzuki, A.; Josselyn, S.A.; Frankland, P.W.; Masushige, S.; Silva, A.J.; Kida, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787–4795. 2004.
- Suzuki, A.; Mukawa, T.; Tsukagoshi, A.; Frankland, P. W.; Kida, S. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learning & Memory*, 15, 426–433. 2008.
- Svizenska, I.; Dubovy, P.; Sulcova, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures: a short review. *Pharmacol Biochem Behav.* 90(4):501-11. 2008.
- Tan, H.; Lauzon, N. M.; Bishop, S. F.; Chi, N.; Bechard, M.; Laviolette, S. R. Cannabinoid Transmission in the Basolateral Amygdala Modulates Fear Memory Formation via Functional Inputs to the Prelimbic Cortex. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 14, p. 5300-5312, 2011.
- Terranova, J. P.; Storme, J. J.; Lafon, N.; Péfio, A.; Rinaldi-Carmona, M.; Le Fur, G.; Soubrié, P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology (Berl)*. Jul;126(2):165-72. 1996.
- Tronson, N.C.; Taylor, J.R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 262-275. 2007.
- Tse, D.; Langston, R. F.; Kakeyama, M.; Bethus, I.; Spooner, P. A.; Wood, E. R.; Witter, M. P.; Morris, R. G. Schemas and memory consolidation. *Science*, 316, 76–82. 2007.
- Tsou, K.; Brown, S.; Sanudo-Pena, M. C.; Mackie, K.; Walker, J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393–411. 1998.
- Van der Stelt, M.; Di Marzo, V. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* 480: 133–150. 2003.
- Varvel, S. A.; Anum, E. A.; Lichtman, A. H. Disruption of CB(1) receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)*., 179, 863–872. 2005.