

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA MARIA RAYMUNDI

EFEITOS DO Δ^9 -TETRAHIDROCANABINOL NA LABILIZAÇÃO E
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO: O ENVOLVIMENTO DE
RECEPTORES GLUN2B-NMDA DO HIPOCAMPO DORSAL

CURITIBA

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA MARIA RAYMUNDI

EFEITOS DO Δ^9 -TETRAHIDROCANABINOL NA LABILIZAÇÃO E
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO: O ENVOLVIMENTO DE
RECEPTORES GLUN2B-NMDA DO HIPOCAMPO DORSAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná como requisito
parcial à obtenção do título de doutora em
Farmacologia.

Orientadora: Dra. Cristina Aparecida Jark Stern

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Raymundi, Ana Maria.

Efeitos do 9-Tetrahydrocannabinol na labilização e reconsolidação da memória de medo: o envolvimento de receptores $glun2B-nmda$ do hipocampo dorsal. / Ana Maria Raymundi. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Cristina Aparecida Jark Stern.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Cannabis. 2. Medo. 3. Memória. 4. Canabinóides. I. Título. II. Stern, Cristina Aparecida Jark. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA MARIA RAYMUNDI** intitulada: **EFEITOS DO 9-TETRAHIDROCANABINOL NA LABILIZAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO: O ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES GLUN2B-NMDA DO HIPOCAMPO DORSAL**, sob orientação da Profa. Dra. CRISTINA APARECIDA JARK STERN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Novembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

05/12/2022 11:51:20.0

CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/12/2022 08:03:15.0

RAQUEL VECCHIO FORNARI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC)

Assinatura Eletrônica

29/11/2022 11:25:42.0

JANAÍNA MENEZES ZANOVELI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/12/2022 10:16:56.0

JOSUÉ HAUBRICH
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha orientadora Profa. Dra. Cristina A. J. Stern por todos esses anos de imenso aprendizado, por todo o apoio, confiança e parceria que foram fundamentais para, não apenas o desenvolvimento desse projeto, mas meu crescimento profissional.

Aos meus colegas de laboratório, os que já passaram e os estão presentes atualmente: Jeferson, Bruna, Nathalie, Mariana, Daiane, Thiago, Matheus, Letícia e Beatriz (espero não ter me esquecido de ninguém), obrigada por toda ajuda menor ou maior até aqui, pela convivência e por juntos termos construído um laboratório incrível, que tenho muito orgulho de fazer parte. Um agradecimento especial ao Jeferson e à Bruna, por todo o apoio nos inúmeros aspectos, por termos criado uma parceria que foi além do laboratório, mas também por que sem vocês seria muito difícil realizar os experimentos com tantos grupos e administrações no mesmo dia, vocês foram fundamentais para a excussão desse trabalho.

Ao prof. Dr. Aleksander R. Zampronio por possibilitar a realização dos experimentos de *Western Blotting* em seu laboratório e ao prof. Dr. Franscisco S. Guimarães da FMRP-USP pela colaboração.

Ao prof. Dr. Roberto Andreatini e ao prof. Dr. Aleksander R. Zampronio por terem avaliado meu projeto de qualificação de doutorado e contribuído com valiosas sugestões.

À prof. Dra. Raquel V. Fornari, ao Dr. Josué Haubrich, à prof. Dra. Janaína M. Zanoveli, por terem aceitado o convite para comporem minha banca de defesa, pela avaliação e contribuição com valiosas sugestões para a versão final da tese. Também ao prof. Dr. Bruno J. Martynhak e ao prof. Dr. Roberto Andreatini por aceitarem serem membros suplentes da minha banca.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR por contribuírem em minha formação como Doutora.

Aos funcionários do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pelo cuidado com os animais, especialmente durante o período da pandemia e da reforma no prédio da Farmacologia.

Aos técnicos do Departamento de Fisiologia: Fábio, Hely e Débora por me acompanharem nas inúmeras revelações de membranas e pela paciência em fazer o fotodocumentador funcionar mesmo às sextas-feiras à tarde.

À minha família, especialmente meus pais Ana Cláudia e Braz, por todo o apoio, confiança e amor, e por mesmo distantes serem fundamentais para a minha jornada. À minha irmã Ana Júlia por sempre estar na torcida por mim. À minha tia e madrinha Luzia, por sempre ter me apoiado em tudo, mas que infelizmente não está mais presente para me ver atingir mais essa conquista.

À Marina por todos esses anos, por sempre me ouvir, dar suporte e comemorar comigo cada conquista. A todos os meus amigos, sejam os que eu fiz durante essa jornada ou os estão comigo desde quando eu nem sonhava que chegaria até aqui, sejam os que moram perto ou distante, obrigada por todo apoio, torcida e companheirismo.

À ALBA-FKNE-YIBRO pelo *diversity grant* concedido para participação do FENS 2020 Virtual Forum. À IBRO pelo *travel grant* concedido para participação do Neuroscience 2021. À organização do CannaLatan-ISN School por terem me selecionado para participar do evento e à todas as pessoas que contribuíram financeiramente para que eu pudesse viajar até Madri.

Por fim, às agências de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e à AuraPharma pela doação do THC, os quais foram fundamentais para a execução desse projeto.

"Fisicamente, habitamos um espaço, mas, sentimentalmente, somos habitados por uma memória."

José Saramago - O Caderno

RESUMO

Memórias de medo, quando exacerbadas, podem contribuir para o desenvolvimento do transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Interferências na reconsolidação da memória tem sido considerada alternativas vantajosas para atenuação da memória de medo. Sugere-se que preparações de *Cannabis* possam interferir nesse processo, e assim serem um tratamento eficaz para o TEPT. No entanto, o processo de labilização da memória é uma condição crítica para que a reconsolidação induzida pela evocação ocorra. Esse processo envolve a ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e receptores glutamatérgicos GluN2B-NMDA. Em contrapartida, receptores glutamatérgicos GluN2A-NMDA são importantes para a reconsolidação. Um aumento da razão GluN2A/GluN2B na amígdala basolateral e na expressão de GluN2B em regiões como o córtex infra-límbico foi associado com a resistência à labilização e com a generalização da memória, respectivamente. No entanto, não se sabe como é a dinâmica dos receptores GluN2A/GluN2B-NMDA do hipocampo dorsal (HD) na labilização da memória de medo contextual. Além disso, é conhecido que o principal composto da *Cannabis*, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) em doses convencionais (0,1-10 mg/kg) exerce efeitos duais na memória, e o efeito benéfico de doses ultrabaixas (3-4 ordens de magnitude menor que as doses convencionais) tem sido relatado. Entretanto, seus efeitos na labilização da memória de medo não foram avaliados. Dessa forma, esse trabalho buscou investigar o efeito de uma dose convencional (0,3 mg/kg) e de uma dose ultrabaixa (0,002 mg/kg) de THC na labilização da memória de medo de ratos *Wistar* adultos submetidos ao condicionamento de medo ao contexto. O pré-tratamento com THC 0,002, mas não THC 0,3 mg/kg, i.p. antes da evocação prejudicou a reconsolidação de forma duradoura. Esse efeito dependeu da evocação da memória e da ativação de receptores CB1 do HD. Em contrapartida, o pré-tratamento com THC 0,3 aboliu o efeito de prejuízo na reconsolidação induzido pela infusão de anisomicina (ANI) no HD, sugerindo um prejuízo na labilização da memória. O tratamento com THC 0,3 antes da evocação, após 24 h, diminuiu a expressão de GluN2A-NMDA e a razão GluN2A/GluN2B no HD, assim como diminuiu a expressão de GluN2B-NMDA na amígdala. Além disso, a administração de ANI em animais pré-tratados com THC 0,3 induziu um aumento na expressão de congelamento na exposição a um contexto não-pareado. O antagonismo de GluN2B-NMDA no HD impediu o efeito da ANI na reconsolidação e aumentou a generalização do medo em animais que receberam ANI, mas foi capaz de restaurar o efeito da ANI na reconsolidação e reduzir a generalização do medo em animais pré-tratados com THC 0,3. Enquanto a inibição do UPS no HD preveniu o efeito da ANI e do THC 0,002 na reconsolidação da memória, o antagonismo de receptores GluN2A-NMDA ou a inibição do UPS não interferiu nos efeitos do THC 0,3. Os achados do presente trabalho indicam um efeito bidirecional do THC na labilização da memória de medo que é dependente do envolvimento dos receptores GluN2B-NMDA do HD na generalização da memória do medo.

Palavras-chaves: *Cannabis*, condicionamento de medo ao contexto, generalização, receptor CB1

ABSTRACT

Fear memories, when exacerbated, can contribute to the development of post-traumatic stress disorder (PTSD). Interferences in memory reconsolidation have been considered advantageous alternatives to attenuate fear memories. It is suggested that *Cannabis* preparations may interfere with this process, and thus be an effective treatment for PTSD. However, the memory labilization process is a critical condition for retrieval-induced reconsolidation. This process involves activating the ubiquitin-proteasome system (UPS), cannabinoid type 1 (CB1) receptors, and glutamatergic GluN2B-NMDA receptors. In contrast, glutamatergic GluN2A-NMDA receptors are important for reconsolidation. An increase in the GluN2A/GluN2B ratio in the basolateral amygdala and in GluN2B expression in regions such as the infralimbic cortex were associated with resistance to labilization, and with memory generalization, respectively. However, it is unknown how the dynamics of GluN2A/GluN2B-NMDA receptors in the dorsal hippocampus (DH) contribute to contextual fear memory labilization. Furthermore, the main compound of *Cannabis*, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) in conventional doses (0.1-10 mg/kg) is known to exert dual effects on memory, and the beneficial effect of ultra-low doses (3-4 orders of magnitude lower than conventional doses) has been reported. However, its effects on fear memory labilization are undetermined. Thus, the present work sought to investigate the effect of a conventional dose (0.3 mg/kg) and an ultra-low dose (0.002 mg/kg) of THC on fear memory labilization in adult Wistar rats submitted to contextual fear conditioning. The pretreatment with THC 0.002, but not THC 0.3 mg/kg, i.p. before memory retrieval disrupted reconsolidation in a long-lasting way. This effect depended on memory retrieval and activation of CB1 receptors of the DH. On the other hand, the pretreatment with THC 0.3 abolished the impairing effect on reconsolidation induced by anisomycin (ANI) infusion in the DH, suggesting an impairment in memory labilization. The treatment with THC 0.3 before retrieval, 24 h later, decreased GluN2A-NMDA expression and the GluN2A/GluN2B ratio in the DH and decreased GluN2B-NMDA expression in the amygdala. Furthermore, the administration of ANI in animals pretreated with THC 0.3 induced an increase in freezing expression when exposed to an unpaired context. GluN2B-NMDA antagonism in the DH prevented the effect of ANI on reconsolidation and increased fear generalization in animals that received ANI, but it restored the effect of ANI on reconsolidation and reduced fear generalization, in animals pre-treated with THC 0.3. While inhibiting the UPS in the DH prevented the effect of ANI and THC 0.002 on memory reconsolidation, the antagonism of GluN2A-NMDA receptors or UPS inhibition did not interfere with the effects of THC 0.3. The findings of the present work indicate a bidirectional effect of THC on fear memory labilization that is dependent on the involvement of DH GluN2B-NMDA receptors in fear memory generalization.

Keywords: *Cannabis*, contextual fear conditioning, generalization, CB1 receptor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos subjacentes à LTP	22
Figura 2 - A consolidação da memória como uma janela de vulnerabilidade.....	23
Figura 3 - Representação do circuito tri-sináptico do hipocampo dorsal (HD) de roedores.....	25
Figura 4 - Ilustração esquemática da formação e modificação da memória através da reconsolidação.....	27
Figura 5 - Condicionamento de medo ao contexto.....	28
Figura 6 - Os neurocircuitos envolvidos com a expressão e supressão das respostas de medo no condicionamento de medo ao contexto.....	30
Figura 7 - Diversidade e propriedades dos receptores NMDA.....	37
Figura 8 - A ativação de receptores CB1 em terminais pré-sinápticos.....	41
Figura 9 - Representação do sistema endocanabinóide em neurônios e células da glia.....	42
Figura 10 - Imagem representativa do sítio de injeção no HD.....	49
Figura 11 - Protocolo de condicionamento de medo ao contexto adotado.....	51
Figura 12 - Esquema representativo das regiões coletadas para a análise de expressão de proteínas por <i>Western Blotting</i>	53
Figura 13 - Efeitos do THC na labilização e reconsolidação da memória de medo quando administrado antes da evocação.....	58
Figura 14 - Efeito do THC 0,002 quando foi feita a omissão da evocação.....	59
Figura 15 - Efeitos do antagonismo dos receptores CB1 do HD nos efeitos do THC 0,002.....	60
Figura 16 - Efeitos do THC na reconsolidação da memória de medo quando administrado depois da evocação.....	61
Figura 17 - Efeitos do tratamento com THC na expressão de GluN2B e GluN2A no HD.....	64
Figura 18 - Efeitos do tratamento com THC na expressão de GluN2B e GluN2A após o Teste A1 na AMG e no CPFm.....	66
Figura 19 - Efeitos do antagonismo dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD.....	68
Figura 20 - Efeitos do antagonismo dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD nos efeitos do THC 0,002.....	69

Figura 21 - Efeitos do antagonismo de receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD nos efeitos do THC 0,3.....	71
Figura 22 - Efeito do THC 0,3-IFE-ANI quando a evocação foi omitida.....	72
Figura 23 - Efeitos da inibição do UPS do HD na labilização/reconsolidação da memória.....	73
Figura 24 - Efeitos da inibição do UPS do HD no efeito do THC 0,002 na labilização/reconsolidação da memória.....	74
Figura 25 - Efeitos da inibição do UPS do HD no efeito do THC 0,3 na labilização/reconsolidação da memória.....	75
Figura 26 - Representação hipotética dos efeitos do THC na transmissão do HD...	92

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - O efeito agudo do THC em comportamentos tipo-ansiedade e locomotores no LCE.....62
- Tabela 2** - Efeito do tratamento com THC 24 h após a administração na locomoção no campo aberto.....63
- Tabela 3** - Síntese dos principais resultados obtidos nos experimentos comportamentais.....93
- Tabela 4** - Síntese dos principais resultados obtidos nas análises moleculares.....93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%EBA	- Porcentagem de entradas nos braços abertos
%TBA	- Porcentagem de tempo nos braços abertos
°C	- Graus celsius
2-AG	- 2-Araquidonoil-glicerol
ACC	- Córtex cingulado anterior
ACCd	- Córtex cingulado anterior dorsal
ACEA	- Araquidonil-2'-cloroetilamida
AM251	- N-(Piperidina-1-il)-5-(4-iodofenila)-1-(2,4-diclorofenila)-4- metil-1-H-pirazol-3-carboxamida
AMG	- Amígdala
AMPA	- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANI	- Anisomicina
ANOVA	- Análise de variância
AP	- Antero-posterior
Arc	- Do inglês " <i>activity-regulated cytoskeletal protein</i> "
BDNF	- Do inglês " <i>brain-derived neurotrophic factor</i> "
BLA	- Amígdala basolateral, do inglês " <i>basolateral amygdala</i> "
BSA	- Albumina sérica bovina, do inglês " <i>bovine serum protein</i> "
Ca²⁺	- Cálcio
CaMKII	- Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II
CB1	- Receptor canabinoide do tipo 1
CB2	- Receptor canabinoide do tipo 2
CBD	- Canabidiol
CeM	- Núcleo centro-medial da amígdala
cm	- Centímetro
COX-2	- Ciclo-oxigenase 2

CPF	- Córtex pré-frontal
CPFm	- Córtex pré-frontal medial
CPFvm	- Córtex pré-frontal ventro-medial
CREB	- Elemento de ligação em resposta ao AMPc, do inglês " <i>cAMP response element-binding</i> "
DTT	- Dithiothreitol
DV	- Dorso-ventral
EBF	- Entradas nos braços fechados
EC	- Estímulo condicionado
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EI	- Estímulo incondicionado
EPM	- Erro padrão da média
ERK	- Quinase regulada por sinal extracelular
FAAH	- Do inglês " <i>fatty acid amide hydrolase</i> "
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
GD	- Giro denteado
G_{i/o}	- Proteína G inibitória
G_{q/11}	- Proteína G estimulatória do tipo q ou 11
h	- Horas
HCl	- Ácido clorídrico
HD	- Hipocampo dorsal
i.p.	- Intraperitoneal
IFE	- Ifenprodil
IL	- Infra-límbico
K⁺	- Potássio
Kg	- Kilograma
LCE	- Labirinto em cruz elevado
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTP	- Potenciação de longa duração, do inglês " <i>long term potentiation</i> "

mA	- Miliamper
MAGL	- Monoacilglicerol lipase
MAP	- Proteínas ativadas por mitógenos
mg	- Miligrama
min	- Minuto
ml	- Mililitro
ML	- Médio-lateral
mm	- Milímetro
mTOR	- Do inglês " <i>mammalian-target of rapamycin</i> "
NaCl	- Cloreto de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NMDA	- N-metil-D-aspartato
PAG	- Substância cinzenta periaquedutal
PBS	- Tampão fosfato-salina
PEAQX	- NVP-AAM077 ou ácido [(((1S)-1-(4-Bromofenil)etil)amino] (1,2,3,4-tetrahidro-2,3-dioxo-5-quinoxalil)metil] fosfônico
PKA	- Proteína quinase A
PL	- Pré-límbico
PPARγ	- Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo do tipo gamma
PTZ	- Pentilenotetrazol
rpm	- Rotações por minuto
s	- Segundos
SDS-PAGE	- Gel de poliacrilamida para eletroforese, do inglês " <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> "
TBS-T	- Tampão tris-salina com tween 20
TEPT	- Transtorno de estresse pós-traumático
THC	- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
UPS	- Sistema ubiquitina-proteassoma
VEI	- Veículo

- β lac** - Clasto-lactacistina β -lactona
- η^2** - Eta quadrado
- μ L** - Microlitro
- μ m** - Micrômetro

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1. A formação das memórias de longa duração.....	20
1.2. Modificando o que foi aprendido: a reconsolidação da memória.....	25
1.3. Memórias aversivas e o transtorno do estresse pós-traumático.....	27
1.4. A labilização da memória como uma condição limitante para a reconsolidação	33
1.5. O THC e o sistema endocanabinoide.....	39
2. Hipótese.....	45
3. Objetivo geral.....	46
3.1. Objetivos específicos.....	46
4. Material e Métodos.....	47
4.1. Animais.....	47
4.2. Drogas.....	47
4.3. Cirurgia estereotáxica e microinfusão de drogas	48
4.4. Condicionamento de medo ao contexto	50
4.5 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	51
4.6 Teste do campo aberto	52
4.7. Análise de expressão de proteínas por <i>Western Blotting</i>	53
4.8. Análise estatística.....	54
4.9. Desenho experimental.....	57
5. Resultados.....	57
5.1. Experimento 1. O efeito da administração de THC antes da evocação da memória na labilização e reconsolidação da memória do medo.....	57
5.2 Experimento 2. A dependência da evocação da memória no efeito da dose ultra- baixa de THC na reconsolidação da memória	58
5.3. Experimento 3. A influência dos receptores CB1 no efeito da dose ultrabaixa de THC na reconsolidação da memória.....	59

5.4. Experimento 4. O efeito da administração de THC imediatamente após a evocação na reconsolidação da memória do medo.....	60
5.5. Experimento 5. Avaliação do efeito agudo do tratamento com THC em comportamentos tipo-ansiedade e locomotores no LCE.....	62
5.6. Experimento 6. Avaliação do efeito do tratamento com THC após 24 h na locomoção no campo aberto.....	62
5.7. Experimento 7. O efeito do tratamento com THC na expressão das subunidades GluN2A e GluN2B no HD.....	63
5.8. Experimento 8. O efeito do tratamento com THC na expressão das subunidades GluN2A e GluN2B na AMG e no CPFm.....	65
5.9. Experimento 9. Avaliação da participação dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA do HD na labilização e reconsolidação da memória.....	67
5.10. Experimento 10. Influência dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA do HD no efeito da dose ultrabaixa de THC na reconsolidação da memória.....	68
5.11. Experimento 11. A influência dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA do HD no efeito da dose convencional de THC na reconsolidação da memória.....	69
5.12 Experimento 12. A dependência da evocação da memória no efeito do THC 0,3-IFE-ANI na reconsolidação da memória.....	71
5.13. Experimento 13. A influência do UPS do HD na labilização e reconsolidação da memória.....	72
5.14. Experimento 14. Influência do UPS do HD no efeito do THC 0,002 na reconsolidação da memória.....	73
5.15. Experimento 15. Influência do UPS do HD no efeito do THC 0,3 na reconsolidação da memória.....	74
6. Discussão.....	76
6.1. O efeito do THC na labilização e na reconsolidação da memória de medo.....	76
6.2. O efeito do THC na expressão das subunidades GluN2A e GluN2B.....	82
6.3. O efeito do THC quanto ao antagonismo dos receptores GluN2A- e GluN2B-NMDA e inibição do UPS.....	85
6.4. Considerações Finais.....	93

7. Conclusões.....94

Referências.....96

1. Introdução

As memórias podem ser definidas pela capacidade dos animais, incluindo os seres humanos, de registrar experiências e modificar seu comportamento de acordo com a natureza dessas experiências (MCGAUGH, 1966). Sabe-se que eventos associados às emoções, sejam elas positivas ou negativas, formam memórias mais detalhadas e duradouras (DUDAI, 2004). Assim, apesar dos processos de memória serem críticos para diversas funções dos indivíduos e contribuírem para a modulação de suas personalidades e interações sociais, quando associadas a situações aversivas/traumáticas, as memórias podem impactar diretamente a saúde mental, e estar implicadas no desenvolvimento e manutenção de transtornos cognitivos e psiquiátricos (ALBERINI; LEDOUX, 2013). Dessa forma, se torna de grande importância o entendimento de como as memórias, em especial as de medo, são formadas, evocadas e atualizadas.

1.1. A formação das memórias de longa duração

Há mais de cem anos tem sido demonstrado que memórias de longa duração não são imediatamente formadas e armazenadas. Müller e Pilzecker (1900) foram pioneiros em sugerir, em estudos com seres humanos, que os processos subjacentes às novas memórias inicialmente permanecem em um estado instável e se consolidam com o tempo. Essa proposição da consolidação da memória veio a ser confirmada décadas depois em roedores (DUNCAN, 1949; GERARD, 1955), e foi descrito que essa etapa ocorre dentro de um período de 6 horas (FLEXNER; FLEXNER; ROBERTS, 1967).

Atualmente, sabe-se que quando uma experiência é vivenciada pela primeira vez, dá-se início ao processo de aquisição da memória (DUDAI, 2002). Assim, enquanto a memória de curta duração tem a capacidade de reter uma versão temporária e até mesmo limitada dessa informação, que fica disponível para uso (IZQUIERDO et al., 1999; GOLD, 2022; CASCELLA; AL KHALILI, 2022), a memória de longa duração seria uma versão duradoura com uma capacidade maior de retenção, em que o traço de memória adquirido é estabilizado (DUDAI, 2004; CASCELLA; AL KHALILI, 2022).

Acredita-se que as memórias sejam representadas no cérebro como mudanças físicas duradouras em conjuntos de neurônios, denominados como traço de memória ou engrama (JOSSELYN, 2010, JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015; TONEGAWA et al., 2015). Quando se trata de um estímulo relevante, um grupo específico de neurônios são ativados durante a aquisição da memória e sofrem alterações plásticas que irão sustentar o armazenamento dessas informações a longo prazo (MCGAUGH, 2000). A hipótese de que mecanismos sinápticos e celulares sustentam a formação das memórias foi proposta por Hebb (1949) e hoje sabe-se que a potenciação de longa duração (LTP, do inglês "*long term potentiation*") pode ser um desses mecanismos. Esse processo leva à modificação sináptica persistente, aumentando a resposta frente a um estímulo (BLISS; LØMO, 1973; BLISS; COLLINGRIDGE, 1993).

A indução da LTP ocorre principalmente pela ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil D-aspartato (NMDA) após uma estimulação de alta frequência (BLISS; LØMO, 1973; BLISS; COLLINGRIDGE, 1993), levando ao aumento do Ca^{2+} intracelular, e a consequente ativação de cascatas de sinalização. A partir disso ocorre a fosforilação de quinases - como a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII), a ativação de fatores de transcrição - como o CREB - e a síntese de proteínas, como de genes de expressão imediata - um deles da *activity-regulated cytoskeleton--associated protein* (Arc), capaz de modular o citoesqueleto, levando às mudanças de plasticidade nas espinhas dendríticas. A fosforilação e o tráfego de receptores inseridos na sinapse - como os glutamatérgicos do tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) - também são modulados, aumentando a densidade desses receptores, levando às alterações na excitabilidade neuronal e, no geral, aumentando a eficiência sináptica (SHEPHERD; BEAR, 2011; RUMPEL et al., 2005; Figura 1).

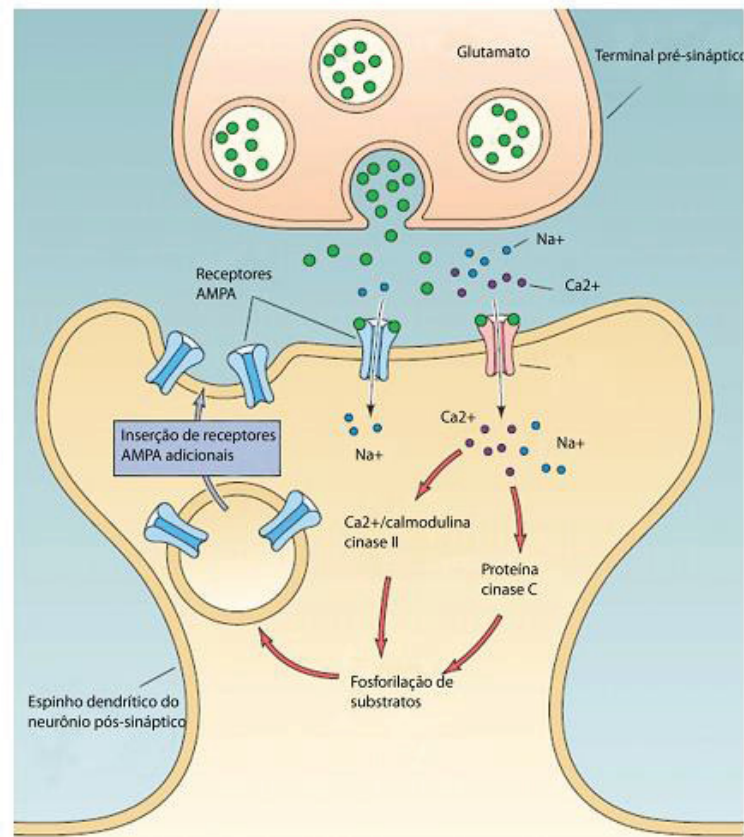


Figura 1. Mecanismos subjacentes à LTP. Durante a transmissão glutamatérgica, o canal de NMDA se abre somente após a despolarização suficiente da célula. Os íons Ca^{2+} que entram na célula ativam proteínas quinases que podem atuar inserindo novos receptores AMPA no espinho pós-sináptico, aumentando assim, a sensibilidade ao glutamato e a eficiência sináptica. FONTE: RUGGIERO et al., 2011.

A partir desses mecanismos, uma memória passa de um estado lábil e instável para um estado estável (Figura 2) e sabe-se que durante esse período, a memória fica em uma janela de vulnerabilidade, em que tanto agentes endógenos, como hormônios, ou exógenos, como inibidores de síntese proteica e de diversos sistemas de neurotransmissão, são capazes de interferir nesse processo e modular a consolidação de uma memória (MCGAUGH, 1983; 2000).



Figura 2. A consolidação da memória como uma janela de vulnerabilidade. A fase inicial da consolidação, marcada em vermelho, indica que logo após a aquisição ela se encontra em um estado lábil e com o passar do tempo, esse traço de memória vai se estabilizando e se tornando menos suscetível a interferências. FONTE: Adaptado de Phelps e Hofmann (2019).

Evidências sugerem que uma pequena porção de neurônios dentro de uma região retém determinada memória (VAZDARJANOVA et al, 2006; REIJMERS et al, 2007), sendo o hipocampo uma das principais regiões capazes de integrar informações, principalmente ao se tratar de memórias episódicas (aquelas relacionadas a eventos pessoais vivenciados e os contextos em que ocorreram; CASCELLA; AL KHALILI, 2022), incluindo as memórias de medo contextuais (CHAWLA et al., 2005; LEUTGEB et al., 2007; HERNÁNDEZ-RABAZA et al., 2008, MCGAUGH, 2015). Em roedores, o hipocampo é subdividido anatômica e funcionalmente ao longo de seu eixo dorsoventral, e a parte dorsal - homóloga à porção posterior do hipocampo em humanos - seria mais relacionada a esses processos de memória, enquanto a porção ventral - homóloga ao hipocampo anterior em humanos - seria mais relacionada aos processos emocionais (FANSELOW; DONG, 2010).

Essa importância do hipocampo vem sendo fundamentada desde as observações realizadas no paciente H.M., que teve ressecção bilateral do lobo temporal medial, incluindo o hipocampo. Scoville e Milner (1957) relataram que embora tivessem obtido sucesso quanto ao controle da epilepsia do paciente, um importante comprometimento na memória - que incluía não apenas o prejuízo em

consolidar novas memórias episódicas, mas também uma amnésia retrógrada em relação às memórias recentemente adquiridas - era observado. No entanto, outras habilidades perceptivas e cognitivas se mostraram inalteradas no H.M. e além disso, observou-se que memórias operacionais e de procedimentos (motores) se mantinham intactas, além das memórias anteriores ao ano antes da cirurgia. Assim, esse caso contribuiu não apenas para se estabelecer o princípio fundamental de que a memória é uma função cerebral distinta de outras, mas também que o cérebro possui vários sistemas de memória que suportam o aprendizado de diferentes tarefas, e que recrutam diferentes regiões cerebrais.

O hipocampo é uma estrutura bem conhecida com diferenças sub-regionais e diversas populações de células (LOTHMANN et al., 2020). Sua organização funcional em um circuito tri-sináptico, permite sua eficiência em receber e gerenciar as informações (NEVES; COOKE; BLISS, 2008; Figura 3). O córtex entorrinal, pela via perforante, transmite informações sensoriais pelas suas projeções às células granulares do giro denteado (GD), uma sub-região capaz de gerar padrões únicos para eventos distintos, um mecanismo denominado separação de padrões (*pattern separation*). Do GD partem as fibras musgosas que enviam informações para as células piramidais da CA3 - sub-região importante para a complementação de padrões (*pattern completion*) - que por sua vez, as retransmitem para a CA1, sub-região especializada no processamento dos componentes espaço-temporais da memória, com alta densidade de “células de local” (*place cells*) capazes de codificar essas informações e formar um mapa cognitivo (O’KEEFE; NADEL, 1978; O’REILLY; MCCLELLAND, 1994; TREVES et al., 2008).

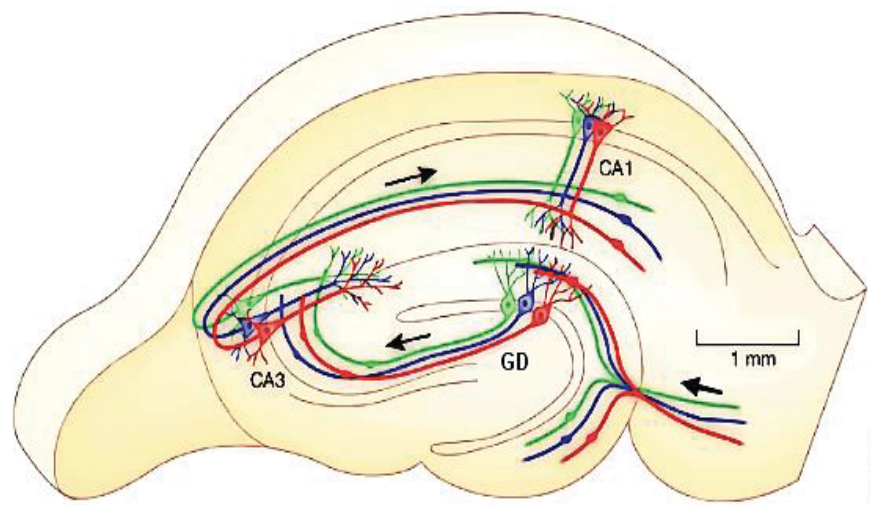


Figura 3. Representação do circuito tri-sináptico do hipocampo dorsal (HD) de roedores. As setas indicam a direção da informação que chega através do córtex entorrinal, pela via perforante, para o giro denteado (GD). Do GD a informação é transmitida para a CA3, que por sua vez, a retransmite para a CA1. FONTE: Adaptado de Moser (2011).

Além da consolidação, o hipocampo dorsal (HD) é importante também para a evocação das memórias recentes (KITAMURA et al., 2017). Assim, após as seis horas iniciais referentes à janela temporal da consolidação, a memória de longa duração pode ser evocada, permitindo que essa informação adquirida seja utilizada (GIACHERO et al., 2013). Dessa forma, a evocação da memória pode desencadear dois processos: a expressão - que é possível observar nos roedores pelo seu comportamento (TULVING, 1983) - e a reativação ou desestabilização dos circuitos sinápticos formados na consolidação, desencadeando a labilização dessa memória. Hoje sabe-se que, dependendo da duração da evocação, diferentes processos podem ser desencadeados: enquanto evocações longas ou repetidas podem levar ao processo de extinção da memória - que seria um novo aprendizado que compete com o original - evocações curtas podem permitir que a memória original seja atualizada por meio do processo de reconsolidação (ALBERINI, 2011).

1.2. Modificando o que foi aprendido: a reconsolidação da memória

Por muito tempo acreditou-se que uma memória, após ser consolidada, não poderia mais ser alterada, sendo linear o processo pelo qual uma memória de longa duração é formada e mantida. No entanto, a ideia de que uma memória consolidada

poderia ser modificada surgiu em alguns trabalhos em meados de 1960 e 1970 (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968; LEWIS; BREGMAN; MAHAN, 1972; MACTUTUS; RICCIO; FERREK, 1979). Foi observado que a apresentação de um choque eletroconvulsivo após uma sessão de evocação realizada 24 horas (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968) ou sete dias após a aquisição (LEWIS; BREGMAN; MAHAN, 1972), era capaz de prejudicar aquela memória previamente adquirida em ratos. Um efeito semelhante foi observado com a indução de hipotermia, tanto moderada como severa, após uma reativação realizada 24 horas após a aquisição, porém apenas a hipotermia severa foi capaz de prejudicar a consolidação da memória (MACTUTUS; RICCIO; FERREK, 1979). Embora esses trabalhos não mostrassem um mecanismo através do qual isso ocorria, era demonstrado que essa interferência em uma memória já consolidada ocorria apenas após a evocação dessa memória (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968; LEWIS; BREGMAN; MAHAN, 1972; MACTUTUS; RICCIO; FERREK, 1979).

Essa ideia ficou um tanto esquecida, até ser retomada em 1997 por Przybylski e Sara que mostraram que o antagonismo dos receptores NMDA após a evocação de uma memória espacial foi capaz de prejudicar essa memória em ratos extensivamente treinados. Em seguida, Nader, Schafe e Le Doux (2000) mostraram que a inibição da síntese proteica no núcleo basolateral da amígdala (BLA) de ratos, após a evocação, prejudicou a memória de medo de maneira duradoura. Dessa forma, esses trabalhos trouxeram consigo uma quebra de paradigma, propondo que após a evocação, a memória entra em um novo processo de labilidade e conseqüentemente induz um novo processo de estabilização.

Essa nova etapa foi denominada reconsolidação da memória, e embora o nome possa sugerir, não é uma continuidade da consolidação, mesmo que dependa de mecanismos compartilhados, como a ativação de receptores NMDA e da síntese proteica (PRZYBYLSKI; SARA, 1997; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000). Propõe-se, então, que a reconsolidação tenha uma função dinâmica (FORCATO; FERNANDEZ; PEDREIRA, 2014) e adaptativa, permitindo a atualização e precisão do traço de memória (TRONSON; TAYLOR, 2007; HARDT; EINARSSON; NADER, 2010), assim como o enfraquecimento ou fortalecimento das informações contidas (LEE, 2010; Figura 4). Conseqüentemente, foi proposto que memórias aversivas poderiam ser “apagadas” (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2006) ou atualizadas

para um estado menos aversivo (COGAN et al., 2019; STERN et al., 2012) se algum agente farmacológico conseguisse interferir seletivamente com esse processo. Além disso, estudos também propõem que interferências não farmacológicas, como estímulos apetitivos (alimentos palatáveis) ou distrativos (um sopro de ar suave direcionado ao torso do animal) durante a evocação da memória, também são capazes de atualizar a memória de medo para um estado menos aversivo (HAUBRICH et al., 2014; CRESTANI et al., 2015). Assim, essas interferências na reconsolidação da memória de medo abrem uma nova alternativa para o tratamento de transtornos associados a esse tipo de memória.



Figura 4. Ilustração esquemática da formação e modificação da memória através da reconsolidação. Após a aquisição, as novas memórias ficam em um estado instável/lábil até serem consolidadas. A reativação da memória retorna as memórias consolidadas de um estado estável para um estado instável novamente. Assim, as memórias existentes podem ser prejudicadas, fortalecidas ou atualizadas pela inclusão de novas informações durante a reconsolidação. FONTE: Adaptado de Sandrini, Cohen e Censor (2015).

1.3 Memórias aversivas e o transtorno do estresse pós-traumático

O medo é uma resposta adaptativa e está associado aos comportamentos que ocorrem devido à exposição a estímulos claramente ameaçadores (BLANCHARD et al., 2008). Por mais que o medo tenha componentes associativos e não associativos, a sua capacidade de ser condicionado a estímulos que representam ameaças é um mecanismo existente em diversas espécies animais (BLANCHARD et al., 2008). Assim, o aprendizado associativo aversivo, por ser bastante relacionado aos mecanismos adaptativos de sobrevivência, é uma das formas de aprendizagem e memória mais estudada (FANSELOW, 1994; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

Em modelos animais, o aprendizado do medo geralmente é estudado pelo condicionamento clássico (Pavloviano) entre um contexto ou uma pista (luz, som ou

odor) - sendo esse o estímulo condicionado (EC) - e um estímulo aversivo, geralmente choques nas patas - sendo esse o estímulo incondicionado (EI). A posterior exposição apenas ao EC leva a expressão do comportamento de medo (Figura 5), sendo o mais comum o congelamento, definido como a total ausência de movimentos do corpo e da cabeça exceto aqueles associados à respiração (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969), e assim esse comportamento é utilizado como parâmetro de retenção da memória. Desde o estudo de Pavlov (1927) esse modelo de condicionamento tem sido amplamente utilizado devido à sua facilidade em relacionar as etapas de formação das memórias às etapas utilizadas nos protocolos (BOUTON; MOODY, 2004), além de representar situações semelhantes em humanos, nas quais estímulos inicialmente neutros se tornam ameaçadores por meio do pareamento com outros (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

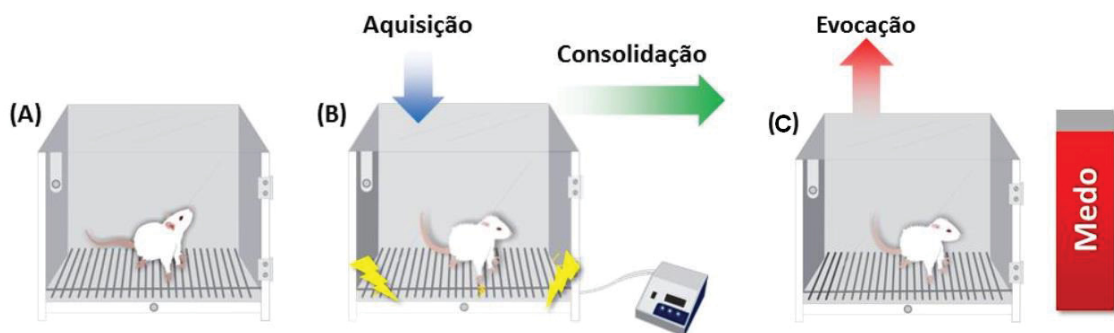


Figura 5. Condicionamento de medo ao contexto. **A)** Apresentação ao estímulo condicionado (EC) até então neutro, denominada etapa de familiarização ao contexto. **B)** Associação do EC com o estímulo incondicionado (EI) aversivo - choque nas patas - em que a memória aversiva é adquirida e consolidada nas horas seguintes. **C)** Ao retornar ao contexto previamente pareado com os choques, a memória aversiva é evocada, levando à expressão de comportamentos de medo. FONTE: GAZARINI, 2015.

Durante esse tipo de aprendizado, principalmente ao se tratar de uma memória de medo contextual, o hipocampo tem um papel fundamental. Sua integridade se mostra essencial para que as memórias contextuais sejam adquiridas e consolidadas (FANSELOW, 2000). No entanto, outras regiões cerebrais também são engajadas, sendo uma delas o córtex pré-frontal medial (CPFm), em especial o pré-límbico (PL), em que, devido às suas conexões com o HD, auxilia na diferenciação de pistas divergentes e na representação global de um contexto (HYMAN et al., 2013), desempenhando um papel fundamental na codificação e evocação da memória

(MAREN et al., 2013; ZHANG, FUKUSHIMA; KIDA, 2011; EINARSSON; NADER, 2012).

Evidências também apontam para os núcleos da amígdala (AMG), em especial a BLA, como sendo críticos para a consolidação e o armazenamento de memórias aversivas associativas em paralelo ao HD (IZQUIERDO et al., 1992; 1993; BENETTI et al., 2015; CAMP; JOHNSON, 2015). As subregiões CA1 e CA3 projetam-se para a AMG diretamente ou através do córtex entorrinal, assim como projeções diretas ou indiretas (via córtex entorrinal) também são enviadas da BLA e da amígdala lateral para o HD (VAN HOESEN, 1985; SAUNDERS; ROSENE, 1988; FASTENRATH et al., 2014). Essa interação do HD com a AMG integra informações sensoriais de regiões corticais após um evento aversivo e, em conjunto, as projeções do CPFm para a AMG são capazes de modular a sua atividade, processando a reação adequada às ameaças ambientais (MAREN et al., 2013). Projeções do PL para a BLA, conseqüentemente levam à ativação do núcleo centro-medial da amígdala (CeM), e assim à expressão do medo, já que o CeM é o núcleo de saída da AMG, que se projeta para o hipotálamo lateral e para a substância cinzenta periaquedutal (PAG), regiões que coordenam as respostas simpáticas do medo e a expressão de comportamentos como o congelamento, respectivamente (LEDOUX et al., 1988; CARRIVE et al., 1997; SOYA; SAKURAI, 2020). Em contrapartida, as projeções do córtex infra-límbico (IL), outra porção do CPFm, ativam as células intercalares da amígdala, que são interneurônios GABAérgicos que inibem o CeM e, conseqüentemente, a expressão do medo (LUCHKINA; BOLSHAKOV, 2019; CAREAGA; GIRARDI; SUCHEKI, 2016). A participação de outras regiões cerebrais também tem sua importância em maior ou menor grau na modulação do aprendizado do medo. Por exemplo, a atividade da própria PAG é necessária para a consolidação de memórias de medo contextuais (ABOUFATIMA et al., 1999), enquanto a estimulação de projeções vindas do núcleo leito da estria terminal para a PAG prejudica a consolidação dessas memórias (LINGG et al., 2020). Outras evidências apontam que a inibição de projeções do núcleo accumbens para o HD e CPFm também é capaz de prejudicar a aquisição da memória de medo (YANG; LIANG, 2014).

Embora um complexo envolvimento de diversas regiões cerebrais module as respostas de medo, a integridade das conexões entre o HD, a BLA e o PL é essencial para a formação e expressão de uma memória aversiva contextual (TAN et al., 2010;

2011; Figura 6). No entanto, em alguns casos, o desbalanço no processamento das informações durante a aquisição da memória aversiva, principalmente pela intensidade do EI, pode induzir uma superconsolidação dessa memória, que é caracterizada por uma exacerbação das respostas de medo, e até mesmo pela sua generalização (FANSELOW; PONNUSAMY, 2008; NESTLER; HYMAN, 2010). Nesse caso, a memória aversiva passa a ser não adaptativa e, em seres humanos, está intimamente relacionada com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT; BREWIN, 2014; REUL; NUTT, 2008).

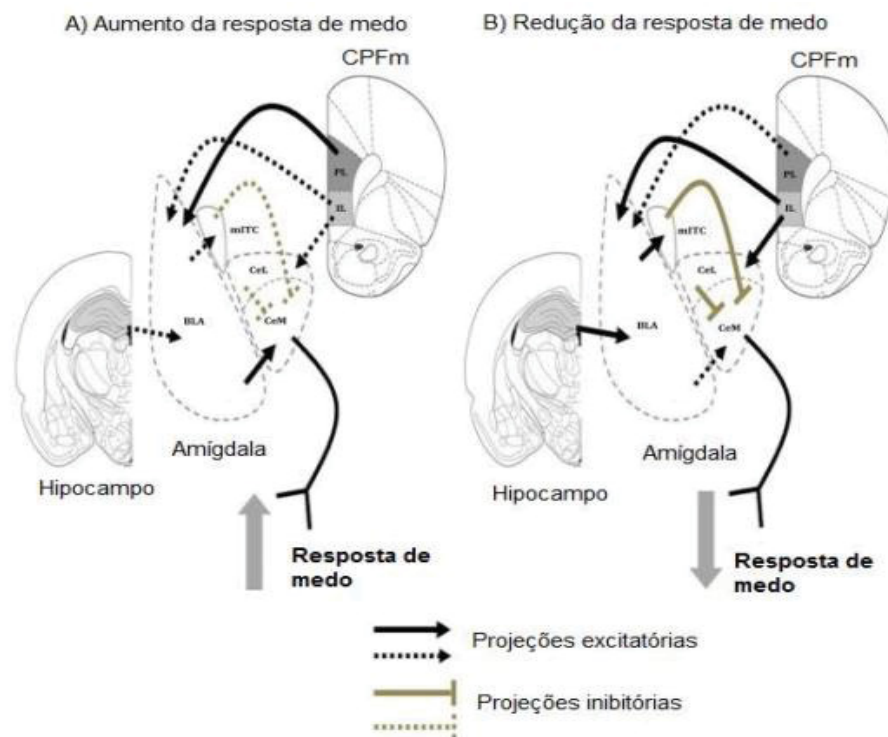


Figura 6. Os neurocircuitos envolvidos com a expressão e supressão das respostas de medo no condicionamento de medo ao contexto. **A)** Interações envolvidas na expressão da memória de medo, em que projeções glutamatérgicas do córtex pré-límbico (PL) para a amígdala basolateral (BLA) ativam o núcleo centro-medial da amígdala (CeM), estimulando as respostas de medo. **B)** Interações envolvidas na supressão do medo, em que projeções glutamatérgicas do córtex infralímbico (IL) e do hipocampo levam à ativação das células intercalares da amígdala (mITC) que são interneurônios GABAérgicos e inibem o CeM, reduzindo a expressão do medo. FONTE: Adaptado de CAREAGA; GIRARDI; SUCHEKI (2016).

O TEPT, segundo o DSM V (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais; *American Psychiatric Association*, 2013), é uma doença psiquiátrica associada ao trauma e à estressores, sendo caracterizada por um aumento do estado de alerta e esquiva de pistas associadas ao evento traumático, além da expressão de uma resposta de medo inapropriada após tal evento. A incidência do transtorno está

associada à exposição a um evento traumático extremo, como o estupro, combate ou acidentes que ameacem a vida. Um estudo mostrou que, mesmo após 40 anos, 11% dos veteranos da guerra do Vietnã ainda apresentavam sintomas do TEPT e prejuízos funcionais (MARMAR et al., 2015). Entre civis, o abuso na infância e o estupro são os maiores causadores do TEPT (YEHUDA et al., 2015), e no caso de mulheres que sofrem abuso sexual, cerca de 50% desenvolvem o transtorno (CREAMER; BURGESS; MCFARLANE, 2001). Ainda, um aumento dos casos tem sido relatado devido à pandemia da Covid-19, em que um a cada seis profissionais de saúde trabalhando na linha de frente apresentaram TEPT e até 17% dos pacientes que precisaram de internação ou intubação também desenvolveram essa doença (DUCHANE et al., 2020; MUNSTER et al., 2020; SUN et al., 2021).

A base para a manifestação dos sinais e sintomas está na memória aversiva relacionada a esse evento, capaz de sofrer evocações espontâneas (BREWIN, 2018; EHLERS; HACKMANN; MICHAEL, 2004; YEHUDA et al., 2015; MICHPOULOS et al., 2015). Assim as conseqüentes lembranças angustiantes, recorrentes e involuntárias do evento traumático levando à pensamentos intrusivos, pesadelos, *flashbacks*, reações fisiológicas e hipervigilância, que são decorrentes da expressão de respostas de ansiedade/medo mesmo em situações que não oferecem risco, são alguns dos principais critérios diagnósticos (DSM-V, 2013).

Quando indivíduos expressam respostas exacerbadas de ansiedade e medo não somente frente à pistas associadas ao evento traumático, mas também em situações não relacionadas ou que não oferecem risco, caracteriza-se a generalização da memória de medo (JOVANOVIC et al., 2012; NORRHOLM et al., 2014). A generalização é uma perda de especificidade da memória e está relacionada com a intensidade com que a memória do evento traumático é consolidada, ou seja, com a superconsolidação da memória de medo (EHLERS; HACKMANN; MICHAEL, 2004).

O conjunto de sintomas do TEPT está relacionado às alterações na neurocircuitaria que envolve o hipocampo, o CPFm e a AMG. Estudos apontam que existe uma hiperatividade da AMG e do córtex cingulado anterior dorsal (ACCd) - região homóloga ao córtex PL em roedores - enquanto o córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) - homólogo ao IL em roedores - encontra-se hipoativo, assim como é observado um hipocampo menor e hipofuncional (HUGHES; SHIN, 2011;

MARKOWITZ; FANSELOW, 2020; DIAMOND; ZOLADZ, 2016; RAUCH; SHIN; PHELPS, 2006; SHIN; RAUCH; PITMAN, 2006; JOSHI et al., 2020). Essas alterações favorecem a expressão do medo, assim como a generalização, além de contribuir para o prejuízo na extinção da memória aversiva (CAREAGA; GIRARDI; SUCHECKI, 2016; HORN; CHARNEY; FEDER, 2016). Além disso, alguns sistemas de neurotransmissão se encontram alterados, como um aumento da transmissão noradrenérgica, e uma diminuição de glicocorticoides e endocanabinoides (BAILEY et al., 2013; HILL et al., 2013; GAZARINI et al., 2022).

A farmacoterapia aprovada para o uso no TEPT se resume em inibidores seletivos da recaptação de serotonina, que podem melhorar em parte os sintomas dos pacientes, mas têm pouco ou nenhum efeito sobre a memória traumática em si (STEIN; IPSER; SEEDAT, 2006). Na prática, menos de 50% dos pacientes apresentam melhora e menos de 30% apresentam remissão completa com o seu uso (BERGER et al., 2008; LOEFFLER et al., 2018). A psicoterapia de exposição prolongada, que é baseada na exposição às pistas associadas ao trauma com a finalidade de que uma memória de extinção seja formada, também tem suas limitações, já que o componente emocional da memória aversiva faz com que ela retorne a ser evocada com o tempo, pelos mecanismos de recuperação espontânea, renovação ou reinstalação do medo (LATTAL; ABEL, 2004). Uma consequência alarmante da ineficácia dos tratamentos e piora dos sintomas é o aumento do risco de suicídio (POMPILI et al., 2013), o que torna imprescindível a busca por tratamentos que sejam mais eficazes.

Uma alternativa de tratamento para o TEPT que tem sido explorada são as preparações de *Cannabis*. A maioria dos estudos com pacientes apontam uma melhora dos sintomas, incluindo relaxamento, melhora do sono e diminuição de pesadelos, além da atenuação da hiperexcitação e ansiedade (BETTHAUSER; PILZ; VOLLMER, 2015; BONN-MILLER et al., 2007; BREMNER et al., 1996; SZNITMAN et al., 2022). Embora ainda não se saiba exatamente por quais mecanismos esses efeitos são mediados, sugere-se que o tratamento com *Cannabis* ou seus compostos pode alterar diretamente a memória traumática, por interferências na reconsolidação (ZAIZAR et al., 2022; BOLSONI et al., 2022).

Com o advento dos estudos pré-clínicos sugerindo que interferências na reconsolidação poderiam ser promissoras para o tratamento do TEPT (PITMAN, 2011), protocolos de reconsolidação em humanos têm sido padronizados e validados, e estudos mostram que interferências nesse processo são eficazes em reduzir as respostas de medo (BESNARD; CABOCHE; LAROCHE, 2012; KINDT; SOETER; VERVLIIET, 2009; ELSEY; KINDT, 2017; KINDT, 2018; SCHILLER et al., 2010; BRUNET et al., 2008). No entanto, devido à intensidade da memória traumática, além da sua idade ao se buscar o tratamento, sugere-se que as memórias relacionadas ao TEPT possam ser mais resistentes ao efeito de fármacos amnésicos. Estudos apontam que fármacos utilizados em modelos pré-clínicos têm baixa eficácia quando testados em pacientes (WOOD et al., 2015; RAUT et al., 2022). Embora com o avanço da padronização de protocolos de reconsolidação em humanos (JONES et al., 2022), alguns estudos começam a mostrar o efeito benéfico de alguns fármacos, como o propranolol (BRUNET et al., 2018; MALLET et al., 2022; ROULLET et al., 2022) e o canabidiol (CBD; BOLSONI et al., 2022), em pacientes, no entanto ainda se debate muito sobre as condições necessárias para que a reconsolidação ocorra, sugerindo-se que as memórias traumáticas do TEPT seriam resistentes à labilização, e a consequente intervenção na reconsolidação.

1.4 A labilização da memória como uma condição limitante para a reconsolidação

Conforme as intervenções na reconsolidação da memória foram ganhando espaço em diversos estudos (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2006; GAZARINI et al., 2013; STERN et al., 2012; DANELUZ et al., 2022), começou-se a perceber que esse processo depende de algumas condições para que ele ocorra, sendo essas denominadas “*boundary conditions*” ou condições limitantes (WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009; ZHANG et al., 2018).

Para que uma interferência seja feita durante a reconsolidação, é necessário primeiramente que a memória labilize. Embora tanto a labilização quanto a reconsolidação dependam da evocação da memória, diferentemente das interferências na reconsolidação que levam a modificações diretas no comportamento do animal, as interferências na labilização são observadas pela prevenção ou

facilitação do efeito de alguma intervenção na reconsolidação, sendo assim uma etapa que antecede a reconsolidação da memória e assim uma “*boundary condition*” (ZHANG et al., 2018).

Estudos sugerem que pelo menos três características são fundamentais para determinar o quanto um traço de memória estaria suscetível a se desestabilizar: a duração da evocação, a intensidade da memória e a sua idade (ZHANG et al., 2018). Embora se saiba que a reconsolidação da memória depende da evocação, quando muito curtas (1-2 minutos em roedores) não são suficientes para desencadear a labilização, enquanto evocações intermediárias (7-10 min) entram na fase do limbo, em que são insensíveis às interferências (CASSINI et al., 2017; FRANZEN; GIACHERO; BERTOGLIO, 2019). Ainda, evocações mais longas induzem o processo de extinção (FRANZEN; GIACHERO; BERTOGLIO, 2019, SOHN et al., 2020), que também suprime a reconsolidação da memória.

Além disso, com o passar do tempo, as memórias que inicialmente são mais dependentes do hipocampo (KIM; FANSELOW, 1992; VARELA et al., 2016) passam a ser mais dependentes de regiões corticais como o córtex cingulado anterior (ACC; KITAMURA et al., 2017) - processo conhecido como consolidação sistêmica - o que contribui para sua maior estabilidade e resistência à labilização (FRANKLAND et al., 2004; WILTGEN; SILVA, 2007; WINOCUR et al., 2010). Adicionalmente, tem se observado que protocolos de condicionamento de medo de alta intensidade, ou aqueles que mimetizam características fisiológicas do TEPT - seja pelo aumento da transmissão noradrenérgica pela administração prévia de ioimbina (antagonista dos receptores α 2-adrenérgicos) ou pela submissão dos animais a um estresse prévio ao condicionamento - levam à superconsolidação da memória de medo, que se torna mais resistente à interferências (WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009; BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2015). Já foi observado nesses protocolos que a superconsolidação induz um aumento na generalização da memória, e fármacos que eram capazes de prejudicar a reconsolidação acabam sendo ineficazes (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2015). No entanto, a administração de D-cicloserina (agonista parcial de receptores NMDA) antes da sessão de reativação permitiu novamente que interferências fossem feitas na reconsolidação, levando à atenuação tanto do medo condicionado como da generalização (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2015). Assim, é possível observar uma relação entre a resistência à labilização

e a generalização, em que memórias generalizadas são menos suscetíveis a interferências, o que se assemelha ao que acontece no TEPT.

Com o tempo, passou-se a compreender que alguns mecanismos estão associados com a indução da labilização, enquanto outros favoreceram a resistência a esse processo. Quando a evocação da memória é capaz de levar à reativação dos circuitos sinápticos, ocorre a ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), responsável pela degradação de proteínas previamente sintetizadas (LEE et al., 2008; JAROME et al., 2015). Esse é um mecanismo celular que controla a renovação de proteínas, no qual as proteínas poliubiquitinadas são degradadas pelo complexo proteassômico de múltiplas subunidades (EHLERS, 2003; CIECHANOVER, 2005), sendo assim importante na remodelação das sinapses que codificam a memória, mediando a remoção de proteínas existentes e, posteriormente, possibilitando a incorporação de novas (EHLERS, 2003). Assim, após a reativação de uma memória de medo é observado um aumento nas proteínas poliubiquitinadas (JAROME et al., 2015; ESPEJO et al., 2021). Além disso, em memórias de medo contextuais, a inibição do UPS no HD antes ou após a evocação é capaz de prevenir o efeito de interferências na reconsolidação induzidos pela inibição da síntese proteica ou pelo antagonismo de receptores NMDA (LEE et al., 2008; LEE, 2008; SOL FUSTIÑANA et al., 2014). Dessa forma, sugere-se que a ativação do UPS seja o mecanismo intracelular que leva à labilização da memória.

Além disso, devido à grande importância da sinalização glutamatérgica no processamento das memórias, uma série de trabalhos tem mostrado a participação de receptores de glutamato contendo diferentes subunidades na labilização e na reconsolidação da memória. Por exemplo, a administração na BLA, previamente à evocação da memória, de um peptídeo que impede a internalização de receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 - o que torna esses receptores impermeáveis ao Ca^{2+} - previne interferências na reconsolidação da memória de medo ao som (HONG et al., 2013). No entanto, um grupo maior de evidências aponta que os receptores NMDA contendo as subunidades GluN2A (GluN2A-NMDA) ou GluN2B (GluN2B-NMDA) atuam diferentemente na reconsolidação e na labilização, respectivamente (ZHANG et al., 2018).

Os receptores NMDA são heterotetrâmeros que incluem onipresentemente duas subunidades GluN1 e uma combinação de duas subunidades GluN2 ou GluN3 (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013), que são subdivididas de A a D nas GluN2, ou A e B nas GluN3. Em roedores, as subunidades GluN2B são amplamente expressas no cérebro embrionário (MONYER et al., 1994; ISHII et al., 1993). Em adultos, sua expressão permanece alta, no entanto, a expressão de GluN2A começa no nascimento, aumenta progressivamente e torna-se a mais abundante em todo o sistema nervoso central (SHENG et al., 1994). Enquanto isso, a expressão geral de GluN2C e GluN2D é baixa em regiões como o córtex e hipocampo no cérebro adulto (MONYER et al., 1994).

Essas subunidades conferem diferentes propriedades ao receptor NMDA (Figura 7) e, conseqüentemente, na plasticidade sináptica (VIEIRA et al., 2020). Os receptores GluN2A-NMDA são predominantemente ativados quando há uma estimulação tetânica de alta frequência indutora de LTP (PHILPOT; CHO; BEAR, 2007). No entanto, o *knocking down* da expressão de GluN2B em fatias de hipocampo também impede a indução de LTP (FOSTER et al., 2010), apesar de sugerir-se que os receptores GluN2B-NMDA fornecem mais um efeito modulador na direção e magnitude da indução de plasticidade. Já foi observado que uma rápida mudança (em minutos) de receptores GluN2B-NMDA para GluN2A-NMDA ocorre durante um protocolo de indução de LTP em fatias de hipocampo de animais jovens (BELLONE; NICOLL, 2007), o que sugere que enquanto os receptores GluN2B-NMDA seriam importantes para a indução da LTP, os GluN2A-NMDA seriam importantes para a sua manutenção. Isso pode se dar principalmente porque, em comparação com as subunidades GluN2A, as GluN2B apresentam uma afinidade maior para a ligação do glutamato, mas uma probabilidade de abertura mais baixa, e uma cinética de desativação mais longa (ERREGER et al., 2005). Além disso, desempenham um papel maior na sinalização do Ca^{2+} do receptor NMDA (SOBCZYK; SCHEUSS; SVOBODA, 2005), e interagem mais fortemente com a CaMKII (BARRIA; MALINOW, 2005). De fato, a cadeia C-terminal dos GluN2B se liga à CaMKII, que é capaz de se autofosforilar e com isso ativar o UPS (BARRIA; MALINOW, 2005; BINGOL et al., 2010). Um estudo mostrou inclusive que a inibição da CaMKII no HD após a evocação de uma memória espacial no labirinto aquático de Morris, também previne o efeito da inibição da síntese proteica na reconsolidação da memória (DA SILVA et al., 2013).

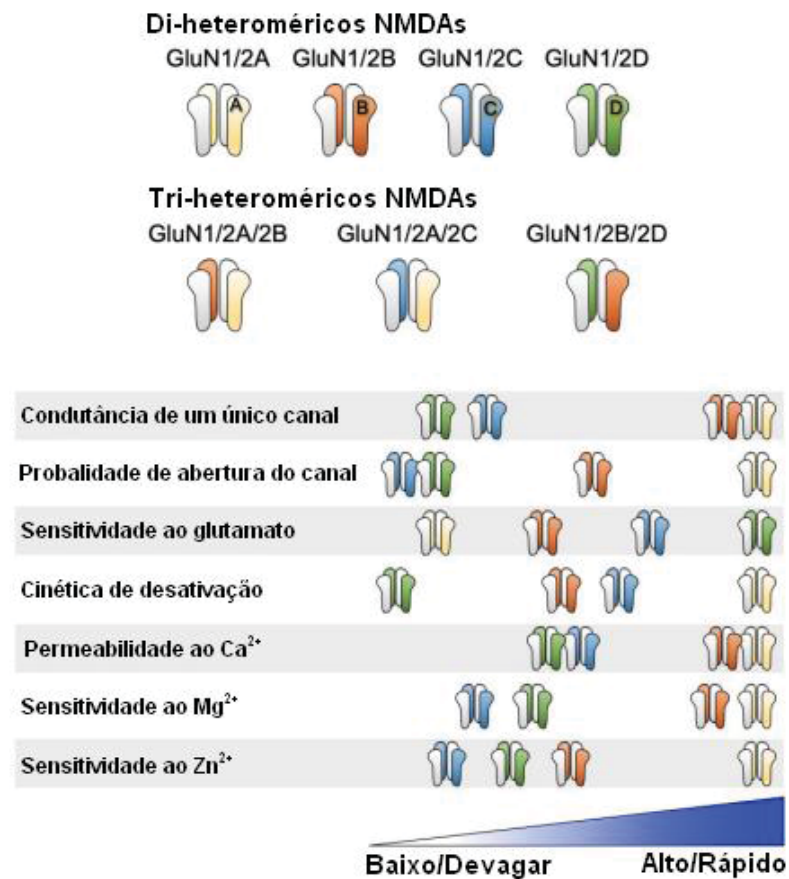


Figura 7. Diversidade e propriedades dos receptores NMDA. Conjuntos representativos de receptores NMDA di- ou tri-heteroméricos contendo as subunidades GluN2 conhecidas e diagrama esquemático que descreve as diferenças relativas nas propriedades dos subtipos de NMDAR contendo GluN2 di-heteroméricos. Quanto mais para a esquerda, mais baixa é a condutância, sensibilidade ao glutamato, Mg²⁺ ou Zn²⁺, probabilidade de abertura do canal ou permeabilidade ao cálcio, e mais devagar é a cinética de desativação. Da mesma forma, quanto mais para a direita mais alta ou rápida é a propriedade do receptor em relação a esses mesmos parâmetros. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2020).

Em relação aos receptores NMDA, a administração do antagonista GluN2A-NMDA antes da evocação, na BLA, prejudica a reconsolidação da memória do medo ao som (MILTON et al., 2013), assim como o antagonismo desses receptores no HD antes do condicionamento prejudica a aquisição de uma memória de medo contextual (GAO et al., 2010; LIU et al., 2020). Enquanto isso, o antagonismo de GluN2B-NMDA antes da evocação, na BLA, prejudica a labilização, prevenindo o efeito da inibição da síntese proteica na reconsolidação da memória (BEN MAMOU; GAMACHE; NADER, 2006; MILTON et al., 2013). Em relação às memórias de medo contextuais, o mesmo efeito foi observado quando a administração desses antagonistas foi feita no núcleo reuniens do tálamo (TROYNER; BERTOGLIO, 2020; 2021). No HD, o antagonismo de receptores GluN2B-NMDA antes da evocação também preveniu o efeito prejudicial

na reconsolidação da memória de medo contextual induzido por uma recompensa apetitiva (HAUBRICH et al., 2015) ou por um estímulo distrativo (CRESTANI et al., 2015).

Curiosamente, além de interferências farmacológicas, estudos têm demonstrado que mudanças na expressão de GluN2A, GluN2B ou na razão GluN2A/GluN2B estão relacionados com alterações na plasticidade sináptica, com a estabilidade da memória e conseqüentemente com a labilização (ZHANG et al., 2018). Na BLA, um aumento na razão GluN2A/GluN2B ou uma diminuição da expressão de GluN2B têm sido associados à resistência à labilização da memória (WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009; HOLEHONNUR et al., 2016). No entanto, em outras regiões cerebrais, essa dinâmica parece diferir um pouco. Por exemplo, o aumento da expressão de GluN2B no IL e no núcleo accumbens foi associado à generalização da memória do medo ao som (ASIM et al., 2020; 2022). Sendo a generalização uma característica geralmente associada com a resistência à labilização (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2015). Em relação ao HD, uma baixa razão GluN2A/GluN2B está relacionada à maior expressão de congelamento (GOULART et al., 2021), enquanto a superexpressão de GluN2A é conhecida por reduzir a magnitude da LTP (BARRIA; MALINOW, 2005). Portanto, parece que os receptores GluN2B-NMDA desempenham um papel duplo na labilização e generalização da memória do medo, dependendo da região cerebral.

Assim, a labilização da memória parece depender de uma série de mecanismos, e a participação de outros receptores também já foi descrita em memórias dependentes do HD. Por exemplo, o bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependente do tipo L ou o antagonismo de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) do HD após a evocação de uma memória de medo contextual (SUZUKI et al., 2008) ou de uma memória espacial no labirinto aquático de Morris (KIM; MOKI; KIDA, 2011) também preveniram o efeito da inibição da síntese proteica na reconsolidação. Confirmando que a ativação de receptores CB1 são importantes para a labilização, a administração de um agonista desses receptores, o araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA) antes ou após a evocação é capaz de facilitar a labilização da memória de medo contextual (LEE; FLAVELL, 2014).

Levando em conta essa participação do receptor CB1 na labilização da memória, e que preparações de *Cannabis* têm sido exploradas como tratamento para o TEPT (BONN-MILLER et al., 2007), se torna relevante explorar se compostos presentes na planta como o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), que são capazes de ativar esses receptores, interferem com a labilização da memória.

1.5 O THC e o sistema endocanabinoide

Embora relatos sobre os efeitos relacionados ao uso da *Cannabis sp.* sejam milenares, sendo os primeiros registros na farmacopeia Chinesa, há aproximadamente 2.000 A.C. anos (LI, 1973), foi apenas em meados de 1960 que o principal composto responsável por esses efeitos, o THC, foi caracterizado (GAONI; MECHOULAM, 1964). A partir disso, outras mais de 60 moléculas presentes na planta foram caracterizadas, como o CBD, segundo composto canabinoide presente em maior quantidade (MECHOULAM et al., 1970).

O THC tem como principal alvo no sistema nervoso central o receptor CB1, atuando como agonista parcial do mesmo, embora também ative receptores canabinoides do tipo 2 (CB2). O receptor CB1 foi o primeiro descrito e é o receptor acoplado à proteína G mais expresso no sistema nervoso central, sendo amplamente distribuído em várias regiões do cérebro, incluindo o hipocampo (HERKENHAM et al., 1991). Este receptor é tipicamente localizado em terminais axônicos e sua ativação é mediada por sinalização retrógrada por endocanabinoides (CASTILLO et al., 2012). No entanto, muito menos se sabe sobre a sinalização do receptor CB2, encontrado em menor quantidade no sistema nervoso central (LI; KIM, 2015).

No HD, os receptores CB1 e CB2 são amplamente distribuídos ao longo das camadas CA1, CA3 e giro dentado (ONAIVI et al., 2006; BRUSCO et al., 2008), sendo os receptores CB1 expressos principalmente pré-sinápticamente, em maior parte em interneurônios GABAérgicos (CASTILLO et al., 2012), mas também em neurônios glutamatérgicos e células gliais, principalmente em astrócitos (MONORY et al., 2015). Os receptores CB1 também são encontrados em diferentes compartimentos celulares, como endossomos e mitocôndrias, o que aumenta o seu repertório fisiológico de ações. Já o receptor CB2 é encontrado principalmente na

micróglia e em neurônios piramidais excitatórios (ONAIVI et al., 2006; LI; KIM, 2015), principalmente na pós-sinapse, embora também possam ser observados em dendritos, mas não nos terminais axônicos (BRUSCO et al., 2008).

Em neurônios e na micróglia, os receptores CB1 e CB2 são acoplados à proteína $G_{i/o}$, e a ativação de ambos reduz a atividade da adenilato ciclase, reduzindo assim os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Além disso, a subunidade $\beta\gamma$ pode inibir canais de cálcio voltagem-dependentes dos tipos N e P/Q, e modular determinados tipos de canais de K^+ , sendo a consequência funcional a redução da liberação de neurotransmissores por hiperpolarização (HOWLETT et al., 2002). A diminuição da concentração intracelular de AMPc pela ativação desses receptores, apesar de consequentemente diminuir a ativação da proteína quinase A (PKA; BOSIER et al., 2010), resulta também na indução de vias intracelulares como a fosforilação proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP), por exemplo, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a mTOR (*mammalian-target of rapamycin*; WIDMER; HANEMANN; ZAJICEK, 2008; MARCU et al., 2010; HOWLETT, 2005) que por consequência, ativa fatores de transcrição como o CREB e induzindo a expressão gênica (DESPREZ, 2015; Figura 8). Em micróglia, a ativação de receptores CB2 diminui a liberação de citocinas, no entanto, em astrócitos, os receptores CB1 são acoplados a uma proteína $G_{q/11}$, o que induz a excitabilidade e a liberação de glutamato (GOMEZ-GONZALO et al., 2015; LIGRESTI; DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2016; Figura 9).

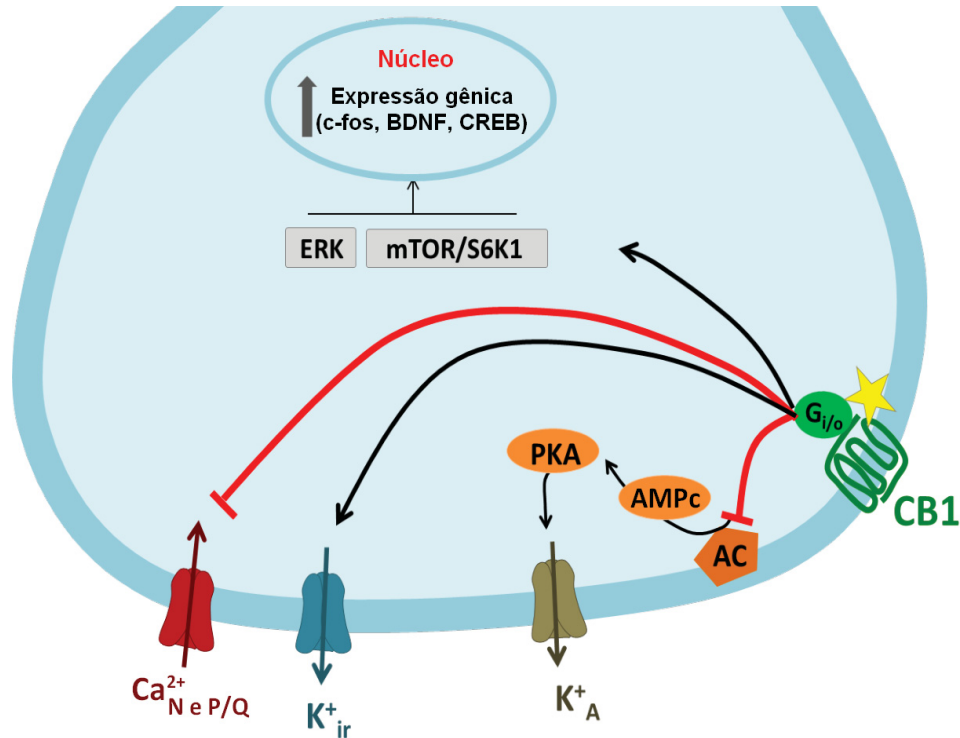


Figura 8. A ativação de receptores CB1 em terminais pré-sinápticos. Quando o THC ou outros agonistas canabinoides se ligam ao receptor CB1, ocorre a inibição da adenilato ciclase, diminuindo os níveis de AMPc e a consequente diminuição da atividade da proteína quinase A (PKA). Além disso, a ativação do receptor pode inibir canais de Ca^{2+} dos tipos N e P/Q, além de modular canais de K^+ , levando à hiperpolarização do neurônio. FONTE: Adaptado de Desprez (2015).

Endogenamente os receptores canabinoides são ativados principalmente pela anandamida – como foi cunhado o primeiro endocanabinoide a ser caracterizado, a araquidonoil etanolamina (DEVANE et al., 1992) e pelo 2-araquidonoil glicerol (2-AG) – o segundo a ser identificado (MECHOULAM et al., 1995). Esses compostos são liberados sob demanda em situações de estresse, e assim controlam a liberação de neurotransmissores promovendo alterações na plasticidade neural (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). No entanto seus efeitos têm curta duração, devido à sua rápida remoção da fenda sináptica e hidrólise no interior dos neurônios pela ação da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) e pela monoacilglicerol lipase (MAGL; MCKINNEY; CRAVATT, 2005; Figura 9).

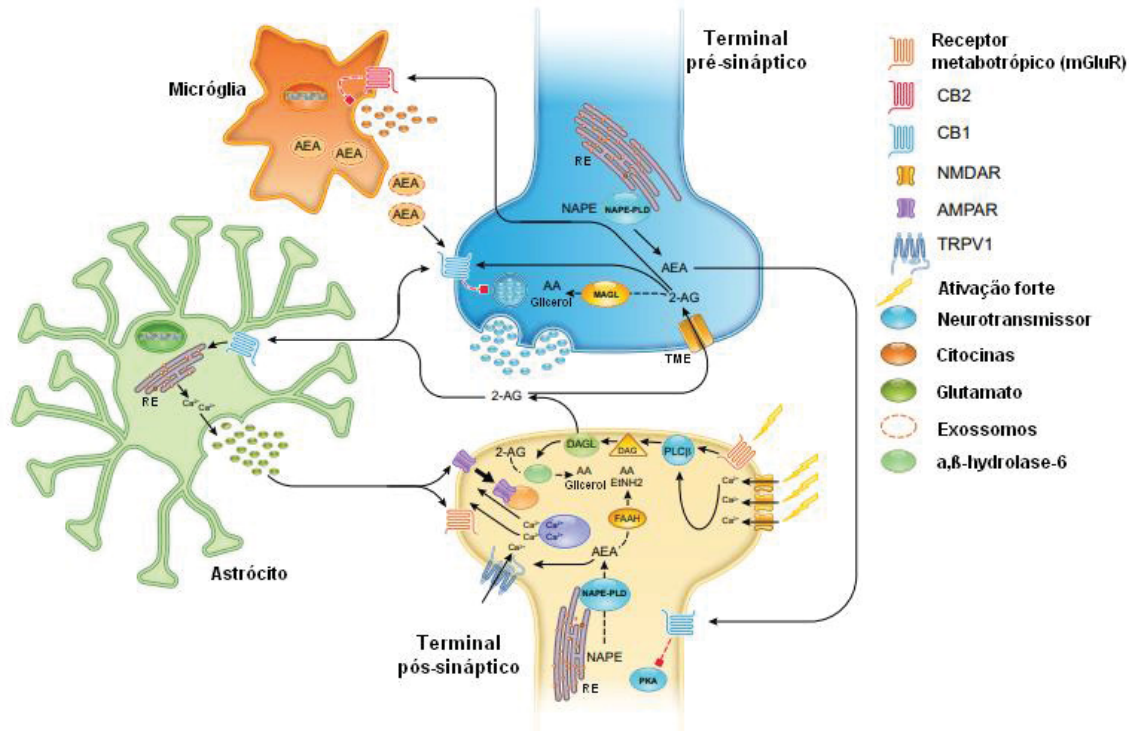


Figura 9. Representação do sistema endocanabinoide em neurônios e células da glia. Uma forte ativação neuronal, induz a síntese de endocanabinoides no terminal pós-sináptico. Ao serem liberados, ativam receptores CB1 presentes em terminais pré-sinápticos ou astrócitos, ou receptores CB2 presentes em micróglia. A ativação de receptores CB1 em neurônios diminui a liberação de neurotransmissores, enquanto em astrócitos induz a liberação de glutamato. A ativação de receptores CB2 em micróglia inibe a liberação de citocinas. As setas pretas indicam estimulação e as vermelhas embotadas indicam inibição. As setas pretas pontilhadas indicam transformação enzimática. AA: Ácido aracdônico; AEA: Anandamida; DAG: Diacilglicerol; DAGL: Diacilglicerol lipase; EtNH₂: Etil amina; FAAH: Amida hidrolase de ácidos graxos; MAGL: Monoacilglicerol lipase; NAPE: N-acil-fosfatidiletanolamina; NAPE-PLD: Fosfolipase D para N-acil-fosfatidiletanolamina; PLC: Fosfolipase C; PKA: Proteína quinase A; RE: Retículo endoplasmático; TME: Transportador membranar de endocanabinoides. FONTE: Adaptado de Ligresti, De Petrocellis e Di Marzo (2016).

Além dos receptores canabinoides, existem evidências de que endocanabinoides, assim como fitocanabinoides são capazes de se ligar e ativar receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPARs; O'SULLIVAN, 2016; O'SULLIVAN; KENDALL; RANDALL, 2009), que compreende uma família de receptores nucleares. Assim, embora, o THC não seja tão promíscuo como o CBD (IZZO et al., 2009), estudos sugerem que em especial os receptores PPAR γ podem ser ativados pelo THC (O'SULLIVAN et al., 2005; VARA et al., 2013) e que inclusive alguns efeitos neuroprotetores do THC são mediados por esse mecanismo (CARROL et al., 2012; FISHBEIN-KAMINIETSKY; GAFNI; SARNE, 2014).

O sistema endocanabinoide modula diversas funções fisiológicas e patológicas, inclusive aquelas relacionadas à formação de uma memória traumática

(BITENCOURT; TAKAHASHI, 2018; STERN et al., 2017; RAYMUNDI et al., 2020a). Em pacientes com TEPT encontra-se uma redução nos níveis de anandamida e 2-AG, além de um aumento na expressão de receptores CB1, caracterizando um baixo “tônus endocanabinoide”, fato que explicaria parcialmente o aumento das reações de medo e ansiedade nesses pacientes (HILL et al., 2013; NEUMEISTER, 2013). Em estudos pré-clínicos, o antagonismo de receptores CB1 está associado à generalização da memória de medo (GAZARINI et al., 2022), enquanto a ativação desses receptores indiretamente pelo CBD é capaz de prejudicar a consolidação e a reconsolidação da memória de medo contextual (STERN et al., 2012; 2017; RAYMUNDI et al., 2020a).

Embora, de fato, o CBD tenha um perfil mais seguro e com menores efeitos adversos, o THC está presente em várias preparações medicinais sozinho ou combinado com o CBD (FREEMAN et al., 2019). O THC sintético (dronabinol) é aprovado para náuseas e vômitos em pacientes submetidos à quimioterapia (SERAFIMOVSKA et al., 2020) e o Sativex®, que contém uma proporção de ~ 1:1 de THC e CBD, é aprovado para esclerose múltipla (MACCALLUM; RUSSO, 2018). Além disso, há resultados de estudos abertos, populacionais e duplo-cegos placebo-controlados mostrando os benefícios do uso de THC, do dronabinol ou do seu análogo nabilona para controlar insônia e pesadelos em pacientes com TEPT (JETLY et al., 2015; CAMERON; WATSON; ROBINSON; 2014; ROITMAN et al., 2014). Assim como há evidências do próprio uso de *Cannabis* apontando uma melhora dos sintomas, como já descrito anteriormente (BETTHAUSER; PILZ; VOLLMER, 2015; BONN-MILLER et al., 2007; BREMNER et al., 1996; SZNITMAN et al., 2022). No entanto, também existem resultados contraditórios, levando alguns autores a questionar o valor dessa abordagem (SHISHKO et al., 2018; ABIZAID; MERALI; ANISMAN, 2019; BONN-MILLER et al., 2014; WILKINSON; STEFANOVICS; ROSENHECK, 2015).

Isso faz sentido considerando que o THC exerce efeitos bifásicos, que dependem de vários fatores, como a dose e a intensidade do estresse provocado. Por exemplo, dependendo da intensidade do condicionamento, a infusão de THC no núcleo accumbens de ratos foi capaz de prejudicar ou potencializar a consolidação da memória de medo (HUDSON et al., 2022; FITOUSSI et al., 2018). Além disso, tanto em humanos quanto em animais, altas doses de THC aumentam as respostas de medo ou prejudicam a extinção (ASHTON; SMITH; DARLINGTON, 2008; METNA-

LAURENT et al., 2012), enquanto doses baixas não produzem efeito ou reduzem as respostas de medo (METNA-LAURENT et al., 2012; KLUMPERS et al., 2012; RABINAK et al., 2013; RAYMUNDI et al., 2020b). Em humanos, inclusive, a facilitação da extinção induzida pelo THC está associada ao aumento da ativação do CPFvm e do hipocampo (RABINAK et al., 2014). Esses efeitos bifásicos também são reportados quanto ao comportamento tipo-ansiedade (IGLESIAS et al., 2022), em doses convencionalmente utilizadas em ratos machos (de 0,075 a 10 mg/kg). Recentemente também foi observado em ratas submetidas ao labirinto em cruz elevado, que doses na faixa de 0,075-0,1 mg/kg induzem efeitos tipo-ansiolíticos, enquanto a dose de 1 mg/kg induz efeitos tipo-ansiolíticos (SALVIATO et al., 2021).

Em parte, esses efeitos duais podem ser explicados pela ativação de receptores CB1 presentes em diferentes tipos celulares. Estudos realizados em animais *knockout* para o receptor CB1 localizado em terminais GABAérgicos ou glutamatérgicos corticais mostram que os efeitos produzidos por baixas doses de agonistas canabinóides dependem da ativação CB1 em terminais glutamatérgicos, enquanto doses mais elevadas ativam também os receptores CB1 de terminais GABAérgicos (STEINDEL et al., 2013). Sugere-se que essas diferenças acontecem devido ao acoplamento do CB1 à proteína G do terminal glutamatérgico ser aproximadamente três vezes mais eficiente do que o acoplamento do CB1 à proteína G do terminal GABAérgico (STEINDEL et al., 2013). Assim, os efeitos induzidos por doses altas de canabinóides na memória têm sido associados com a supressão da liberação de GABA, resultando em um aumento do tônus excitatório (KATONA; FREUND, 2012).

Indo um pouco na contramão da literatura, em que a maioria dos trabalhos exploram doses elevadas de THC, recentemente, foi relatado o efeito neuroprotetor de uma dose ultrabaixa de THC (0,002 mg/kg; 3-4 ordens de magnitude menor que as doses convencionais; FISHBEIN et al., 2012; SARNE et al., 2018). Essa dose de THC protegeu os camundongos do déficit cognitivo decorrente da idade, induzido pela droga epileptogênica pentilenotetrazol (PTZ) ou por LPS (FISHBEIN et al., 2012; FISHBEIN-KAMINIETSKY; GAFNI; SARNE, 2014; SARNE et al., 2018). A ativação dos receptores CB1 e o aumento de CREB e BDNF no HD e no córtex pré-frontal (CPF), respectivamente, foram associados aos efeitos dessa dose ultrabaixa de THC (FISHBEIN et al., 2012). Além disso, o mesmo tratamento foi capaz de retardar também o declínio da memória em camundongos modelos para a doença de

Alzheimer (FIHURKA et al., 2022; NITZAN et al., 2022), sugerindo o potencial terapêutico de usar doses extremamente baixas de THC.

Apesar dessa evidência benéfica de doses ultrabaixas de THC na memória, até então não se tem relatos do seu uso em memórias aversivas, e conseqüentemente, não se sabe como afetariam a labilização da memória. Em relação a reconsolidação, os resultados que existem são contraditórios: a administração de doses convencionais de THC imediatamente após a evocação tanto prejudicou a reconsolidação da memória de medo contextual, como não afetou, dependendo do estudo e da dose utilizada (STERN et al., 2015; MURKAR et al., 2019). Além disso, há evidências de que o THC diminui a expressão e aumenta a internalização de receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA no hipocampo de camundongos (FAN et al., 2010; CHEN et al., 2013), no entanto, não se sabe se doses ultrabaixas também seriam capazes de modular essa expressão ou interferir com a reconsolidação da memória. Assim, o avanço no conhecimento sobre o efeito do THC na labilização e reconsolidação da memória se torna importante pensando no desenvolvimento de tratamentos apropriados à base de *Cannabis* para o TEPT.

2. Hipótese

Como o THC, principalmente pela ativação de receptores CB1, produz efeitos duais, sendo esses muitas vezes associados à dose utilizada, assim como o próprio uso de *Cannabis* pode exercer efeitos benéficos ou não no tratamento para o TEPT, a hipótese do presente trabalho é de que o THC pode facilitar ou prejudicar a labilização da memória de medo contextual dependendo da dose. Além disso, como doses ultrabaixas de THC têm sido associadas a efeitos neuroprotetores, é possível que uma dose ultrabaixa de THC possa prejudicar a reconsolidação da memória. Como o receptor CB1 e receptores GluN2B (ou a razão adequada de GluN2A/GluN2B) são importantes para a labilização e também estão associados com a generalização da memória, é possível que a interferência induzida pelo THC na labilização possa alterar a expressão de GluN2A, GluN2B ou a razão GluN2A/GluN2B nas regiões importantes para a memória de medo: HD, AMG e CPFm. Além disso, os efeitos do THC na labilização/reconsolidação da memória podem depender da ativação de receptores GluN2B-NMDA e do UPS do HD.

3. Objetivo geral

Avaliar o efeito de uma dose ultrabaixa (0,002 mg/kg) e uma dose convencional (0,3 mg/kg) de THC na labilização e na reconsolidação da memória de medo contextual, assim como a dependência de receptores GluN2A-NMDA, GluN2B-NMDA ou do UPS do HD nesses efeitos, em ratos *Wistar* machos adultos.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do THC na labilização ou reconsolidação da memória quando administrado antes da evocação;
- Avaliar se o efeito do THC 0,002 depende da evocação da memória;
- Avaliar se o efeito do THC 0,002 depende de receptores CB1 do HD;
- Avaliar o efeito do THC na reconsolidação da memória quando administrado depois da evocação;
- Avaliar se o THC nas doses utilizadas interfere agudamente no comportamento tipo-ansioso ou na locomoção no LCE;
- Avaliar se o THC nas doses utilizadas interfere na locomoção dos animais 24 h após o tratamento;
- Avaliar se o THC altera a expressão de GluN2B, GluN2A ou a razão GluN2A/GluN2B no HD após a evocação ou após o Teste A1
- Avaliar se o THC altera a expressão de GluN2B, GluN2A ou a razão GluN2A/GluN2B no CPFm e na AMG após o Teste A1;
- Avaliar se o antagonismo dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD interfere com a labilização ou reconsolidação da memória;
- Avaliar se o efeito do THC 0,002 depende dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD;
- Avaliar se o efeito do THC 0,3 depende dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD;

- Avaliar se o efeito do THC 0,3-IFE-ANI depende da evocação da memória;
- Avaliar se a inibição do UPS no HD interfere com a labilização ou reconsolidação da memória;
- Avaliar se o efeito do THC 0,002 depende do UPS do HD;
- Avaliar se o efeito do THC 0,3 depende do UPS do HD;

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos, com cerca de 3 meses de idade, obtidos do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato (48 x 37 x 21 cm) em grupos de quatro, receberam água e ração *ad libitum*, foram mantidos sob temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e em ciclo claro-escuro de 12 horas (luz inicia às 7:00h). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Local (número 1247) e foram realizados seguindo a legislação brasileira e as 10 diretrizes essenciais do ARRIVE (Percie du Sert et al. 2020).

2.2 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: THC (0,002 ou 0,3 mg/kg, agonista parcial dos receptores CB1 e CB2; AuraPharma, Uruguai), Ifenprodil (IFE; 1 ng/ μl , antagonista seletivo dos receptores GluN2B-NMDA; Sigma-Aldrich, Alemanha), PEAQX (1 ng/ μl , antagonista seletivo de receptores GluN2A-NMDA, Sigma-Aldrich, Alemanha), clasto-lactacistina β -lactona (βlac ; 32 ng/ μl ; inibidor de UPS; Cayman Chemical, EUA), Anisomicina (ANI; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; inibidor de síntese de proteínas; Sigma-Aldrich, Alemanha) e AM251 (1 nmol// μl , antagonista seletivo de receptores CB1; Tocris, Reino Unido). O THC e o AM251 foram dissolvidos em Tween© 80 a 5% dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%; pH = 7,04). A ANI foi dissolvida em HCl 1 M diluído com solução de tampão fosfato-salina (PBS), e o pH foi ajustado para 7,4 usando NaOH 1 M. Ifenprodil, PEAQX e β -lac foram diluídos em PBS.

A seleção de doses foi baseada em estudos anteriores em que o THC interferiu na expressão da memória de medo ou exerceu efeitos neuroprotetores (STERN et al., 2015; FISHBEIN et al., 2012; SARNE et al., 2018). A dose de AM251 foi baseada em estudos mostrando que não possui efeito *per se*, mas previne o efeito do CBD na consolidação da memória de medo (STERN et al., 2017; RAYMUNDI et al., 2020a). As doses de β lac e ANI foram baseadas em estudos mostrando prejuízo na labilização e reconsolidação da memória do medo, respectivamente (LEE et al., 2008; MILTON et al., 2013), e as doses de PEAQX e IFE foram menores do que as utilizadas em estudos anteriores que mostraram interferir na expressão e reconsolidação da memória (MILTON et al., 2013; BEN MAMOU; GAMACHE; NADER, 2006). Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

2.3 Cirurgia estereotáxica e microinfusão de drogas

Animais profundamente anestesiados (cetamina 75 mg/kg + xilazina 10 mg/kg) foram colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), com as cabeças fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. A limpeza do campo cirúrgico foi feita com uma solução contendo iodo a 2% e foi administrada a anestesia local (cloridrato de lidocaína 3% com vasoconstritor adrenalina - 1:50.000) na região da incisão. Uma incisão longitudinal foi realizada, expondo a calvária, e o periósteo foi removido por raspagem. Na sequência, dois orifícios foram perfurados com uma broca odontológica acoplada a um mini-motor de suspensão, para a fixação de dois microparafusos de aço inoxidável. Outros dois orifícios foram perfurados e as cânulas-guia bilaterais, confeccionadas de aço inoxidável (9,0 x 0,7 mm), mirando a região CA1 do HD (seguindo as coordenadas partindo do bregma: AP = -3,8 mm, ML = \pm 2,5 mm e DV = -1,8 mm; PAXINOS; WATSON, 2009) foram implantadas e fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. Um mandril de aço inoxidável foi introduzido dentro de cada cânula-guia para evitar a oclusão. Após a cirurgia, os ratos receberam 0,4 ml de ibuprofeno por via oral (20 mg/ml, Natulab, Brasil). Os experimentos foram realizados após 10 dias de recuperação.

As drogas foram infundidas no HD com agulhas odontológicas (diâmetro externo = 0,3 mm) introduzidas pelas cânulas-guia até que suas pontas estivessem 1,5 mm abaixo das extremidades da cânula. Um cateter de polietileno (p10) foi interposto entre

a extremidade superior das agulhas e as microseringas e o deslocamento de uma bolha de ar dentro do cateter foi utilizado para monitorar o fluxo da droga. Por 1 minuto, 0,5 μL /lado do tratamento foi injetado usando duas microseringas de 10 μL (Hamilton, EUA) conectadas a uma bomba de infusão (Insight, Brasil). As agulhas foram removidas 30 s após a conclusão das injeções.

Após cada experimento, os ratos foram profundamente anestesiados conforme descrito e Azul de Metileno (0,5 μL /lado) foi injetado através das cânulas-guia. O encéfalo foi removido e imerso em solução de formol 10%. Após alguns dias, seções do cérebro (100 μm de espessura) foram obtidas em um vibrátomo (Leica, Alemanha) e dispostas em uma lâmina histológica para verificar o local da injeção. Os animais foram incluídos na análise quando ambos os lados do HD (AP aproximadamente de -2.5 a -4.5 mm do bregma) foram marcados com Azul de Metileno, assim como exemplificado na Figura 10.

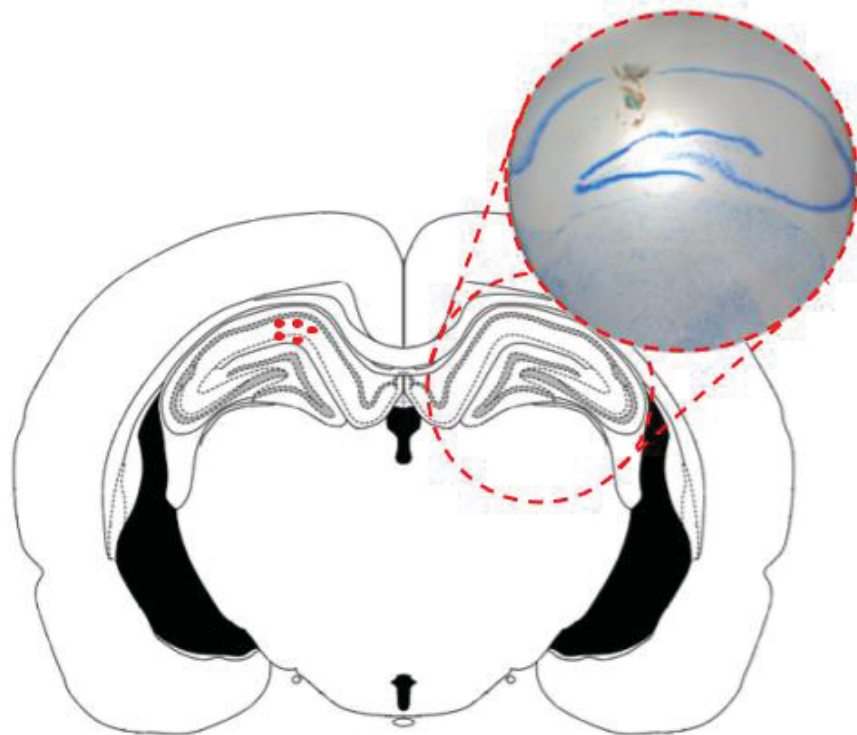


Figura 10. Imagem representativa do sítio de injeção no HD. O círculo mostra uma fatia marcada com azul de metileno, além dos círculos vermelhos que representam locais em que as drogas foram infundidas.

4.4 Condicionamento de Medo ao Contexto

O condicionamento de medo foi realizado sob luminosidade de 70 lux, das 13h às 17h, conforme descrito anteriormente por Raymundi et al. (2020a). A caixa de condicionamento consiste em uma câmara retangular (Contexto A; 35 × 20 × 30 cm) com paredes laterais de alumínio e uma parede frontal e porta de teto em acrílico transparente. Seu piso gradeado é constituído por barras de aço inoxidável e conectado a uma placa de circuito e um gerador de choque (Insight, Brasil). Na sessão de familiarização, os animais foram colocados no Contexto A para explorá-lo livremente por 3 min. No dia seguinte, na sessão de condicionamento, foram re-expostos ao Contexto A para a associação com o EI (30 s iniciais, três choques elétricos de 1,0 mA/3 s com 30 s de intervalo e 30 s finais).

A sessão de evocação da memória foi realizada no dia seguinte, consistindo na re-exposição ao Contexto A por 3 min, sem o EI. Antes e/ou após esta sessão, os animais foram dispostos randomicamente nos grupos de tratamento de acordo com o desenho experimental. 24 h depois, a avaliação dos efeitos do tratamento foi realizada re-expondo os animais apenas ao Contexto A por 3 min (Teste A1). Em alguns casos, esta sessão foi repetida uma semana depois (Teste A2) para avaliar se os efeitos eram duradouros.

Para investigar a generalização da memória de medo, 24 horas após o Teste A1 e o Teste A2 os animais foram expostos a um contexto de diferentes características constituído por uma caixa de acrílico transparente com uma tampa de acrílico preto (Contexto B; 33 x 34 x 26 cm) por 3 min, consistindo no Teste B1 e Teste B2, respectivamente. O protocolo está representado na Figura 11. Este contexto também foi usado para omitir a sessão de evocação quando aplicável. A porcentagem de tempo de congelamento (ausência de movimentos excluindo aqueles relacionados à respiração; BLANCHARD; BLANCHARD, 1969) foi quantificada em segundos. O índice de discriminação (ID) foi calculado por $[\% \text{ de tempo de congelamento no Teste A} - \% \text{ de tempo de congelamento no Teste B} / (\% \text{ de tempo de congelamento no Teste A} + \% \text{ de tempo de congelamento no Teste B})]$ do Teste A1 e Teste B1 ou Teste A2 e Teste B2, resultando nos respectivos ID1 e ID2, em que uma diminuição no parâmetro significa uma menor discriminação entre os contextos, e assim uma memória menos específica.

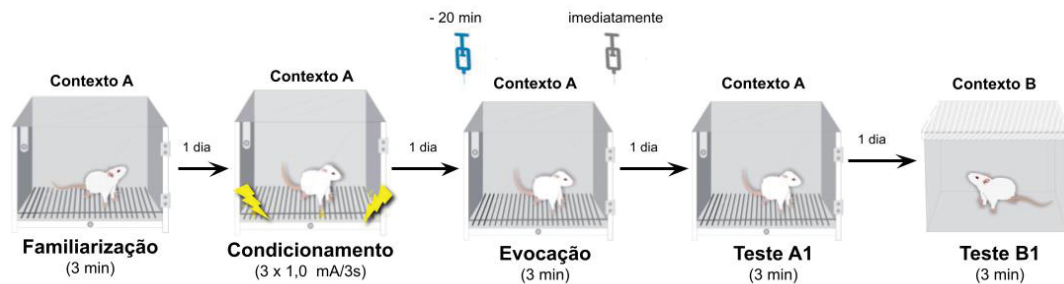


Figura 11. Protocolo de condicionamento de medo ao contexto adotado. A seringa azul representa o pré-tratamento, 20 min antes da evocação, enquanto a seringa cinza representa o tratamento imediatamente após a evocação.

4.5 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Grupos independentes de animais foram submetidos ao LCE 20 min após o tratamento com VEI ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg). O aparato do LCE é construído de madeira e consiste em dois braços fechados opostos (50 × 10 × 40 cm) e dois braços abertos (50 × 10 cm), cercados por uma borda de madeira de 1,0 cm de altura, conectados por uma plataforma central (10 × 10 cm), elevado 50 cm acima do piso, conforme descrito em Salviato et al. (2021). O LCE foi colocado em uma sala iluminada a 40 lux. Os animais foram colocados na plataforma central de frente para um braço fechado e foi permitido explorar o aparato livremente por 5 min. O tempo e as entradas (quando os animais estavam com as quatro patas dentro do braço) em cada braço foram medidos. A porcentagem de tempo nos braços abertos $\{\%TBA; [(tempo\ em\ braços\ abertos/300) \times 100]\}$ e a porcentagem de entradas nos braços abertos $\{\%EBA; [entradas\ de\ braços\ abertos/(entradas\ de\ braços\ abertos\ +\ fechados) \times 100]\}$ foram calculados. As %TBA e %EBA foram usados como índices de comportamento tipo-ansioso. O número de entradas nos braços fechados (EBF) foi usado como um índice geral de atividade exploratória (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

4.6. Teste do campo aberto

Grupos independentes de animais foram submetidos ao campo aberto 24 h após o tratamento com VEI ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg). O aparato do campo aberto consiste em uma arena circular preta (100 cm de diâmetro, 32,5 cm de altura) dividida

em 19 quadrantes de tamanho aproximadamente igual, em uma sala iluminada a 70 lux. Os ratos foram gentilmente colocados no centro do aparato, e exploraram livremente por 5 min. O número de quadrantes cruzados e a distância total percorrida (em metros) foram registrados usando o software ANY-maze (Stoelting Co., EUA). Um cruzamento foi contabilizado quando todas as quatro patas do animal passaram de um quadrante para outro.

4.7 Análise de expressão de proteínas por *Western Blotting*

O HD, o CPFm e a AMG de grupos independentes de animais foram removidos imediatamente após a sessão de evocação ou do Teste A1 e armazenados a -80 °C. As regiões removidas estão exemplificadas na Figura 12. As mesmas regiões de um grupo de animais *naive* foram utilizados para registrar a expressão basal de proteínas. O processamento das amostras foi realizado de acordo com Raymundi et al. (2020a), em que o extrato total das proteínas contidas nas amostras foi obtido. Para extração de proteínas, os tecidos foram homogeneizados em 0,6 ml de tampão de solubilização [10 mM EDTA, 100 mM Tris pH 7,5, 0,2% coquetel inibidor de protease (PROMEGA) e 1% Triton X-100]. O material insolúvel foi removido por centrifugação (13000 rpm por 20 min a 4°C). A concentração de proteína sobrenadante foi determinada colorimetricamente (Bradford Protein Assay, Bio-Rad). Extratos de tecido (500 µl) foram desnaturados em água fervente por 5 min em tampão Laemmli contendo 200 mM de DTT. Os extratos de proteína (volume correspondente a 100 µg de proteína) foram separados por *SDS-PAGE*, transferidos para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm; BIO-RAD), que foi posteriormente bloqueada com BSA 3% (Sigma, EUA) diluído em TBS-T por 2 h. As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo primário anti-GluN2A [Santa Cruz Biotechnology anti-NMDA ϵ 1 (D-8): sc-390094; 1:500], anti-GluN2B [Santa Cruz Biotechnology anti-NMDA ϵ 2 (A-8): sc-365597; 1:500], ou anti- α -tubulina [Santa Cruz Biotechnology anti- α 1a tubulina (7-RY28): sc-134237; 1:2500] diluído em TBS-T com BSA 3%. O anticorpo secundário anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology m-IgGk BP-HRP: sc-516102; 1:5000) foi diluído em TBS-T com BSA 1% e incubado por 1 h. As membranas foram reveladas por quimioluminescência usando ECL Western Blotting Substrate (PROMEGA). A análise quantitativa foi realizada por densitometria utilizando o software Scion Image

Beta 4.03 for Windows (Scion Corporation, EUA). As intensidades foram normalizadas para valores correspondentes para a expressão de α -tubulina. A razão GluN2A/GluN2B foi calculada com os valores normalizados. Os valores foram expressos em relação à expressão basal (grupo *naive*).

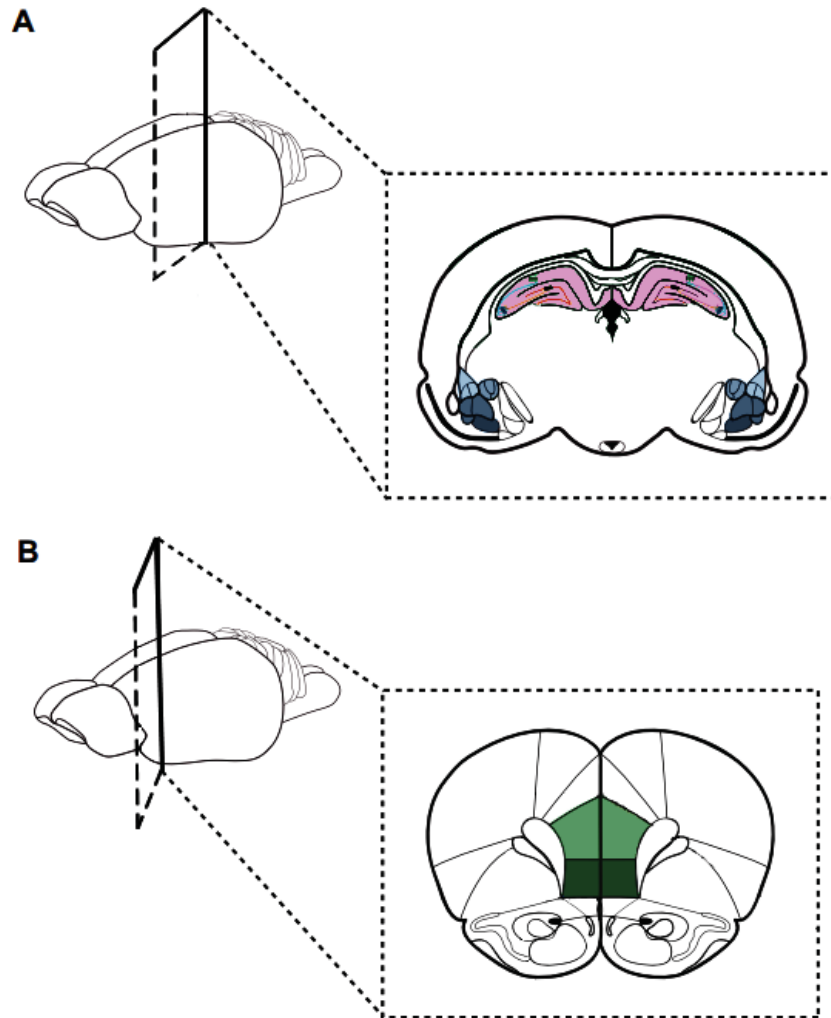


Figura 12. Esquema representativo das regiões coletadas para a análise de expressão de proteínas por *Western Blotting*. **A)** Corte representando o AP -3,8 em que o hipocampo dorsal (HD) é marcado em rosa e a amígdala (AMG) é marcada em azul. **B)** Corte representando o AP +3,0 em que o córtex pré-frontal medial (CPFm) é marcado em verde. FONTE: Adaptado de Izquierdo, Furini e Myskiw (2016).

4.8 Análise Estatística

Após testar a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, os resultados foram separadamente submetidos aos testes *t* de Student, a ANOVA de uma via, de duas vias ou de medidas repetidas, de acordo com o experimento. O teste de

Newman-Keuls foi utilizado para comparações post-hoc quando os valores de F atingiram significância estatística ($p < 0,05$). Na ANOVA de duas vias ou medidas repetidas, o post-hoc foi realizado apenas quando a interação entre as variáveis independentes alcançou significância estatística (os fatores: pré-tratamento, tratamento e re-exposição ao contexto, quando aplicável). Além disso, apenas os valores de F das interações foram representados e os valores de F dos efeitos principais foram omitidos. O eta-quadrado (η^2) foi calculado para estimar o tamanho do efeito ($\eta^2 \geq 0,14$ = efeito grande; MAHER et al., 2013). O Statistica 12 (StatSoft, EUA) foi usado para análise estatística e o GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism, EUA) para a representação gráfica.

O tamanho amostral *a priori* determinado para os experimentos foi de 6-8 animais por grupo para ANOVA de uma via e 8-11 animais por grupo para ANOVA de duas vias ou medidas repetidas ($\alpha=0,05$; $\beta=0,20$; $\eta^2=0,14$ com base em efeitos grandes alcançados em estudos anteriores em condições semelhantes, STERN et al., 2015; 2017; RAYMUNDI et al., 2020b)., calculado por G-Power (HHU: Universität Düsseldorf, Alemanha). Os tamanhos dos grupos foram iguais pelo design, mas devido a perdas experimentais (por exemplo, quando o tratamento foi infundido fora da região cerebral alvo), em alguns casos, eles foram desiguais. As exclusões foram substituídas para tentar manter o estudo equilibrado e manter seu poder.

4.9 Desenho experimental

Experimento 1. Para avaliar o efeito do THC na labilização ou reconsolidação da memória quando administrado antes da evocação, grupos independentes de animais condicionados ao medo foram tratados com veículo (VEI) ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) i.p. 20 min antes da evocação e, imediatamente após esta sessão, receberam a infusão de VEI ou ANI no HD. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1, Teste B1, Teste A2 e Teste B2.

Experimento 2. Para avaliar se o efeito do THC 0,002 depende da evocação da memória, grupos independentes de animais condicionados ao medo foram tratados com VEI ou THC 0,002 i.p. 20 min antes da sessão de não-evocação (exposição ao

contexto B) e, imediatamente após esta sessão, receberam a infusão de VEI no HD. Os animais foram posteriormente submetidos ao Teste A1.

Experimento 3. Para avaliar se o efeito do THC 0,002 depende de receptores CB1 do HD, grupos independentes de animais receberam VEI ou THC 0,002 i.p. 20 min antes da evocação e, imediatamente após receberam AM251 ou VEI no HD. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1 e Teste B1.

Experimento 4. Para avaliar o efeito do THC na reconsolidação da memória quando administrado depois da evocação, grupos independentes de animais condicionados ao medo foram tratados com veículo (VEI) ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) i.p. imediatamente após a evocação da memória. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1, Teste B1, Teste A2 e Teste B2.

Experimento 5. Para avaliar se o THC nas doses utilizadas interfere no comportamento tipo-ansioso ou na locomoção no LCE, grupos independentes de animais receberam veículo ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) i.p. 20 minutos antes de serem submetidos ao LCE.

Experimento 6. Para avaliar se o THC nas doses utilizadas interfere na locomoção dos animais no dia seguinte ao tratamento, grupos independentes de animais receberam veículo ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) 24 h antes de serem submetidos ao campo aberto.

Experimento 7. Para avaliar se o THC altera a expressão de GluN2B, GluN2A ou a razão GluN2A/GluN2B no HD, grupos independentes de animais condicionados ao medo foram tratados com veículo (VEI) ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) i.p. 20 min antes da evocação e tiveram seu encéfalo removido após a evocação ou após o Teste A1. Um grupo adicional de animais *naïve* também teve seu encéfalo removido. O HD foi processado e submetido à análise de expressão de proteínas por *Western Blotting*.

Experimento 8. Para avaliar se o THC altera a expressão de GluN2B, GluN2A ou a razão GluN2A/GluN2B no CPFm e na AMG, o encéfalo dos mesmos animais do experimento anterior removidos após o Teste A1 foi utilizado. O CPFm e a AMG foram processados e submetidos à análise de expressão de proteínas por *Western Blotting*.

Experimento 9. Para avaliar se o antagonismo dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD interfere com a labilização ou reconsolidação da memória, grupos independentes de animais condicionados ao medo receberam VEI i.p. e logo após VEI, PEAQX ou IFE no HD, 20 min antes da evocação, e imediatamente após essa sessão, receberam VEI ou ANI no HD. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1 e Teste B1.

Experimento 10. Para avaliar se o efeito do THC 0,002 depende dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD, grupos independentes de animais condicionados ao medo receberam VEI ou THC 0,002 mg/kg i.p. e logo após VEI, PEAQX ou IFE no HD, 20 min antes da evocação. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1 e Teste B1.

Experimento 11. Para avaliar se o efeito do THC 0,3 depende dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD, grupos independentes de animais condicionados ao medo receberam THC 0,3 mg/kg i.p. e logo após VEI, PEAQX ou IFE no HD, 20 min antes da evocação, e imediatamente após essa sessão, receberam VEI ou ANI no HD. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1 e Teste B1.

Experimento 12. Para avaliar se o efeito do THC 0,3-IFE-ANI depende da evocação da memória, grupos independentes de animais condicionados ao medo foram tratados com THC 0,3 mg/kg i.p. e logo após VEI ou IFE no HD 20 min antes da sessão de não-evocação (exposição ao contexto B) e, imediatamente após esta sessão, receberam a infusão de ANI no HD. Os animais foram posteriormente submetidos ao Teste A1.

Experimento 13. Para avaliar se a inibição do UPS no HD interfere com a labilização ou reconsolidação da memória, grupos independentes de animais condicionados ao medo receberam VEI i.p. e logo após VEI ou β lac no HD, 20 min antes da evocação, e imediatamente após essa sessão, receberam VEI ou ANI no HD. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1 e Teste B1.

Experimento 14. Para avaliar se o efeito do THC 0,002 depende do UPS do HD, grupos independentes de animais condicionados ao medo receberam VEI ou THC

0,002 mg/kg i.p. e logo após VEI ou β lac no HD, 20 min antes da evocação. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1 e Teste B1.

Experimento 15. Para avaliar se o efeito do THC 0,3 depende do UPS do HD, grupos independentes de animais condicionados ao medo receberam THC 0,3 mg/kg i.p. e logo após VEI ou β lac no HD, 20 min antes da evocação, e imediatamente após essa sessão, receberam VEI ou ANI no HD. Os animais foram posteriormente submetidos aos Teste A1 e Teste B1.

5. Resultados

5.1 Experimento 1. O efeito da administração de THC antes da evocação da memória na labilização e reconsolidação da memória do medo

Para avaliar se a administração de THC antes da evocação da memória afeta a labilização e/ou a reconsolidação da memória de medo, ratos condicionados ao medo receberam randomicamente veículo ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) i.p. 20 minutos antes da sessão de evocação, e veículo ou ANI intra-HD imediatamente após essa sessão (n = 8-10/grupo).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao Contexto A [$F_{(4,92)} = 4,432$; $p = 0,003$; $\eta^2 = 0,161$]. Conforme mostrado na Figura 13A, comparado aos controles, os ratos VEI-ANI apresentaram menor porcentagem de tempo de congelamento no Teste A1 e no Teste A2, sugerindo que a administração de ANI prejudicou a reconsolidação da memória de medo de forma duradoura. Em contraste, o grupo THC 0,3-ANI não apresentou diferenças em relação ao controle no Teste A1 e no Teste A2. Assim, embora o THC 0,3 não induza efeitos *per se*, sua administração previne os efeitos prejudiciais da ANI na reconsolidação da memória de medo, sugerindo um prejuízo na labilização da memória. O pré-tratamento com THC 0,002 reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento no Teste A1 e no Teste A2. Além disso, a administração de THC 0,002 e ANI juntos induziu um efeito semelhante. Em conjunto, esses resultados sugerem que a dose ultrabaixa de THC prejudica a reconsolidação da memória de medo de forma duradoura e preserva a labilidade da memória.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não há interação significativa entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição na exposição ao Contexto B [$F_{(2,46)} = 2,027$; $p = 0,143$; $\eta^2 = 0,090$] e no ID [$F_{(2,46)} = 1,735$; $p = 0,188$; $\eta^2 = 0,070$]. Conforme observado na Figura 13B-C, não há diferenças entre os grupos no Teste B1 e Teste B2 e no ID1 e ID2, sugerindo não haver influência do tratamento na generalização da memória de medo.

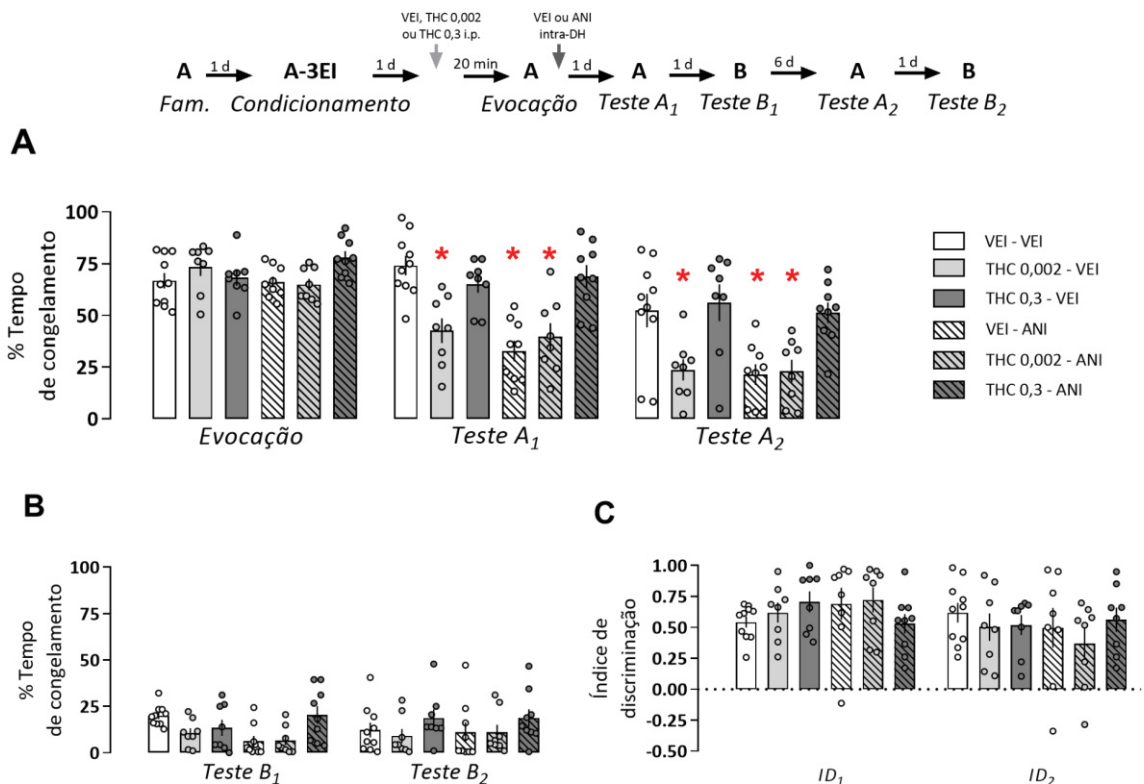


Figura 13. Efeitos do THC na labilização e reconsolidação da memória de medo quando administrado antes da evocação. **A)** A infusão de ANI no HD após a evocação reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento no Teste A1 e no Teste A2 em animais pré-tratados com VEI ou THC 0,002, mas não THC 0,3, comparados aos controles. O pré-tratamento com THC 0,002, mas não THC 0,3, reduziu a porcentagem de tempo de congelamento no Teste A1 e no Teste A2, sugerindo um prejuízo duradouro na reconsolidação da memória. **B)** Não foi observada diferença significativa no comportamento de congelamento no Teste B1 e no Teste B2. **C)** Nenhuma diferença significativa foi observada no ID1 e ID2. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

5.2 Experimento 2. A dependência da evocação da memória no efeito da dose ultra-baixa de THC na reconsolidação da memória

Para avaliar se o efeito de THC 0,002 é dependente da evocação, os animais receberam veículo ou THC 0,002 mg/kg i.p. e veículo intra-HD ($n = 8$ /grupo) 20 min

antes da sessão de não-evocação. O teste *t* de Student não mostrou efeito do tratamento durante a não-evocação ($t_{14} = 0,239$; $p = 0,814$) ou Teste A1 ($t_{14} = 1,122$; $p = 0,280$). Conforme observado na Figura 14, uma porcentagem semelhante de congelamento foi expressa pelo grupo THC 0,002-VEI em comparação com os controles durante a exposição ao contexto B e Teste A1, sugerindo que o efeito do THC 0,002 depende da evocação da memória.

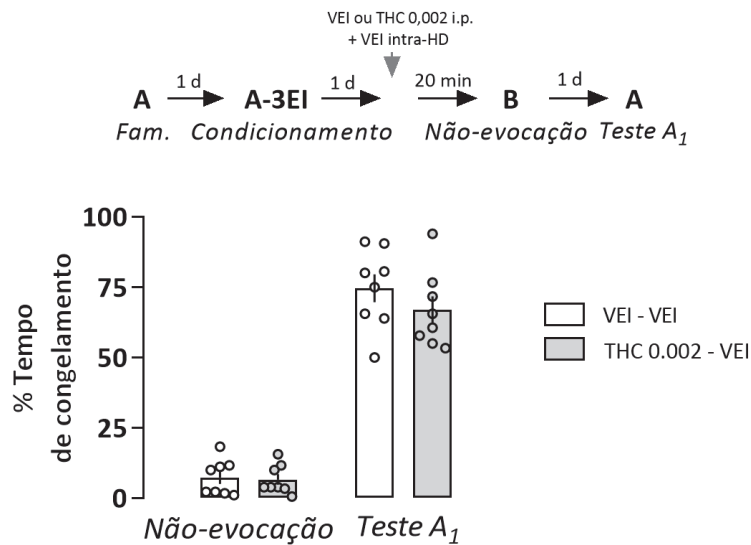


Figura 14. Efeito do THC 0,002 quando foi feita a omissão da evocação. Não foi observada diferença entre os grupos VEH-VEI e THC 0,002-VEI durante o Teste A1, sugerindo que o efeito do THC 0,002 depende da evocação da memória.

5.3 Experimento 3. A influência dos receptores CB1 no efeito da dose ultrabaixa de THC na reconsolidação da memória

Para avaliar a participação dos receptores CB1 no efeito do THC 0,002 mg/kg, ratos condicionados ao medo receberam randomicamente veículo ou THC 0,002 mg/kg i.p., seguido imediatamente de veículo ou AM251 no HD, 20 minutos antes da sessão de evocação da memória ($n = 7$ /grupo).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao contexto A [$F_{(1,24)} = 20,756$, $p = 0,0001$; $\eta^2 = 0,464$]. Conforme observado na Figura 15A, o grupo THC 0,002-VEI apresenta uma redução na porcentagem de tempo de congelamento em relação aos controles durante o Teste A1, confirmando que a administração de THC 0,002 antes da evocação prejudica a

reconsolidação da memória. No entanto, o tratamento com AM251 previne este efeito, sugerindo que o efeito do THC 0,002 na reconsolidação da memória depende dos receptores CB1 do HD.

A ANOVA de duas vias não mostrou interação significativa entre pré-tratamento x tratamento na exposição ao Contexto B [$F_{(1,24)} = 1,609$, $p = 0,216$; $\eta^2 = 0,062$] e no ID [$F_{(1,24)} = 0,207$, $p = 0,652$; $\eta^2 = 0,008$]. Conforme observado na Figura 15B-C, não há diferença significativa entre os grupos no Teste B1 ou no ID1, sugerindo não haver influência dos tratamentos na generalização da memória.

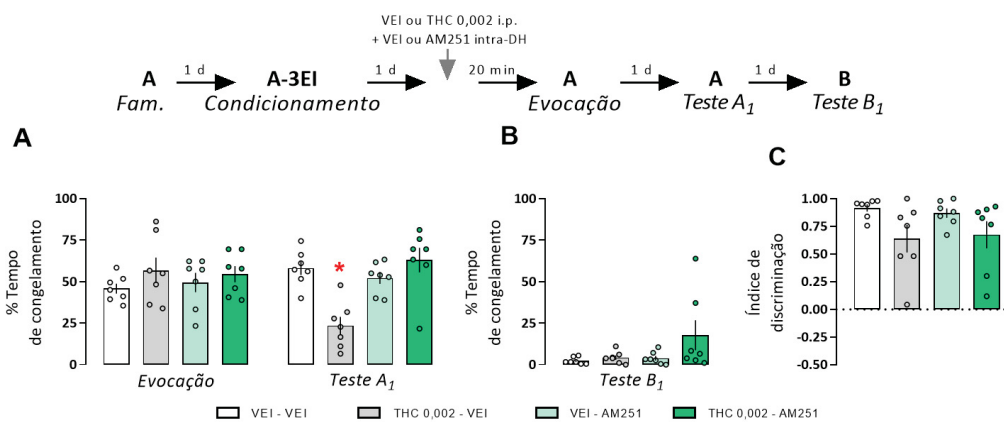


Figura 15. Efeitos do antagonismo dos receptores CB1 do HD nos efeitos do THC 0,002. **A)** No Teste A1, o grupo THC 0,002-VEI mas não THC-0,002-AM251, mostraram uma redução no comportamento de congelamento, sugerindo um prejuízo na reconsolidação, e o antagonismo dos receptores CB1 previne esse efeito. **B)** No Teste B1, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. **C)** No ID, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

5.4 Experimento 4. O efeito da administração de THC imediatamente após a evocação na reconsolidação da memória do medo

Para avaliar se os efeitos do THC dependem do momento da administração, no caso após a evocação, ratos condicionados ao medo receberam randomicamente veículo ou THC i.p. (0,002 ou 0,3 mg/kg; $n = 8-10$ /grupo) imediatamente após a evocação da memória. A ANOVA de medidas repetidas mostrou interação entre tratamento x re-exposição ao Contexto A [$F_{(4,50)} = 5,983$; $p = 0,0005$; $\eta^2 = 0,323$]. Conforme observado na Figura 16A, o tratamento com THC 0,002, mas não com THC 0,3, diminuiu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento no Teste

A1 e no Teste A2 em relação ao grupo controle, sugerindo um prejuízo na reconsolidação da memória de medo.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não há interação significativa entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao contexto na exposição Contexto B [$F_{(2,25)} = 0,350$, $p = 0,708$; $\eta^2 = 0,027$] e no ID [$F_{(2,25)} = 0,291$; $p = 0,750$; $\eta^2 = 0,023$]. Conforme observado na Figura 16B-C, não há diferenças entre os grupos no Teste B1 e Teste B2 e no ID1 e ID2, sugerindo não haver influência do tratamento na generalização da memória de medo.

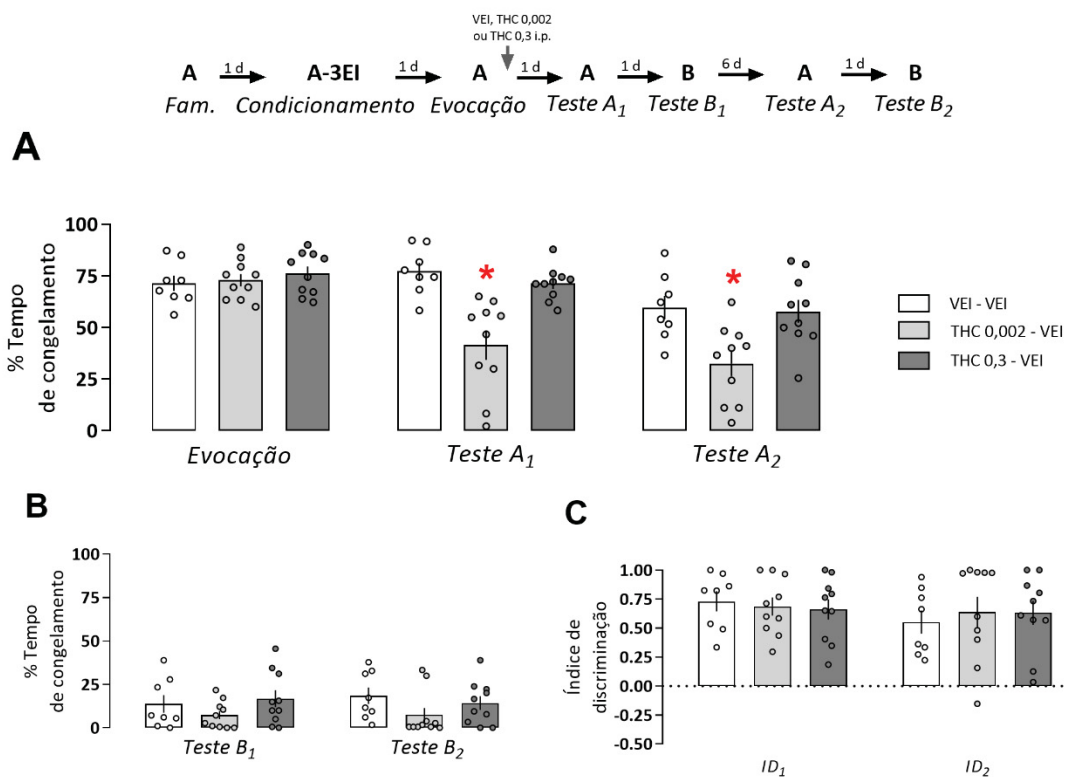


Figura 16. Efeitos do THC na reconsolidação da memória de medo quando administrado depois da evocação. **A)** O tratamento com THC 0,002, mas não THC 0,3, reduziu a porcentagem de tempo de congelamento no Teste A1 e no Teste A2, sugerindo um prejuízo duradouro na reconsolidação da memória. **B)** Não foi observada diferença significativa no comportamento de congelamento no Teste B1 e no Teste B2. **C)** Nenhuma diferença significativa foi observada no ID1 e ID2. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

5.5 Experimento 5. Avaliação do efeito agudo do tratamento com THC em comportamentos tipo-ansiedade e locomotores no LCE

Para avaliar se as doses de THC aqui utilizadas interferem no comportamento tipo-ansioso ou na locomoção no LCE, ratos receberam veículo ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) 20 minutos antes de serem submetidos ao LCE (n=9-12/grupo). A ANOVA de uma via mostrou que não há efeito significativo do tratamento entre os grupos na %TBA [$F_{(2,28)} = 0,106$; $p = 0,899$; $\eta^2 = 0,008$], %EBA [$F_{(2,28)} = 0,899$; $p = 0,418$; $\eta^2 = 0,048$] e EBF [$F_{(2,28)} = 2,894$; $p = 0,072$; $\eta^2 = 0,171$]. Conforme mostrado na Tabela 1, não há diferença entre os grupos nos parâmetros avaliados.

Tabela 1. O efeito agudo do THC em comportamentos tipo-ansiedade e locomotores no LCE

	VEI	THC 0.002	THC 0.3
%TBA	24,06 ± 4,52	26,20 ± 4,96	23,30 ± 3,54
%EBA	29,07 ± 5,08	37,13 ± 5,14	37,14 ± 4,78
EBF	10,75 ± 0,77	7,90 ± 0,92	11,44 ± 0,96

Tabela 1. Grupos independentes de animais foram tratados com VEI ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) e 20 min depois foram submetidos ao LCE. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos; %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos; EBF: número de entradas nos braços fechados.

5.6 Experimento 6. Avaliação do efeito do tratamento com THC após 24 h na locomoção no campo aberto

Para avaliar se as doses de THC utilizadas interferem na locomoção dos animais no dia seguinte ao tratamento, ratos receberam veículo ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) 24 h antes de serem submetidos ao campo aberto (n = 8/grupo). A ANOVA de uma via mostrou que não há efeito do tratamento na distância total percorrida [$F_{(2,21)} = 1,719$; $p = 0,203$; $\eta^2 = 0,140$] e número de cruzamentos [$F_{(2,21)} = 0,946$; $p = 0,404$; $\eta^2 = 0,083$]. Como pode ser observado na Tabela 2, não há diferença entre os grupos nos parâmetros avaliados.

Tabela 2. Efeito do tratamento com THC 24 h após a administração na locomoção no campo aberto

	VEI	THC 0.002	THC 0.3
Distância total percorrida (m)	28.04 ± 1.02	37.53 ± 7.35	27.47 ± 0.77
Número de cruzamentos	153.00 ± 8.33	173.12 ± 22.08	146.25 ± 7.94

Tabela 2. Grupos independentes de animais foram tratados com VEI ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) e expostos ao campo aberto 24 h depois. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

5.7 Experimento 7. O efeito do tratamento com THC na expressão das subunidades GluN2A e GluN2B no HD

Para avaliar a expressão de GluN2B e GluN2A no HD, grupos independentes de animais condicionados ao medo e tratados com VEI ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) 20 minutos antes da evocação, tiveram seu HD removido imediatamente após a evocação (n = 6-7/grupo) ou Teste A1 (n = 5-7/grupo). Um grupo adicional (n = 7) de animais *naive* não condicionados também foi utilizado. Após a evocação, a ANOVA de uma via mostrou que não há efeito significativo do tratamento na expressão de GluN2B [$F_{(3,24)} = 0,459$; $p = 0,714$; $\eta^2 = 0,054$], GluN2A [$F_{(3,24)} = 0,093$; $p = 0,963$; $\eta^2 = 0,011$], ou na razão GluN2A/GluN2B [$F_{(3,23)} = 0,605$; $p = 0,618$; $\eta^2 = 0,073$] (Figura 17A-C). Após o Teste A1, ANOVA de uma via mostrou que não há efeito do tratamento na expressão de GluN2B [$F_{(3,20)} = 0,273$; $p = 0,844$; $\eta^2 = 0,039$]. No entanto, um efeito significativo do tratamento na expressão de GluN2A [$F_{(3,20)} = 3,308$; $p = 0,041$; $\eta^2 = 0,332$] e na razão GluN2A/GluN2B [$F_{(3,19)} = 3,159$; $p = 0,048$; $\eta^2 = 0,332$] foi observado. O tratamento com THC 0,3 diminuiu a expressão de GluN2A e a relação GluN2A/GluN2B em comparação ao grupo VEI (Figura 17D-F).

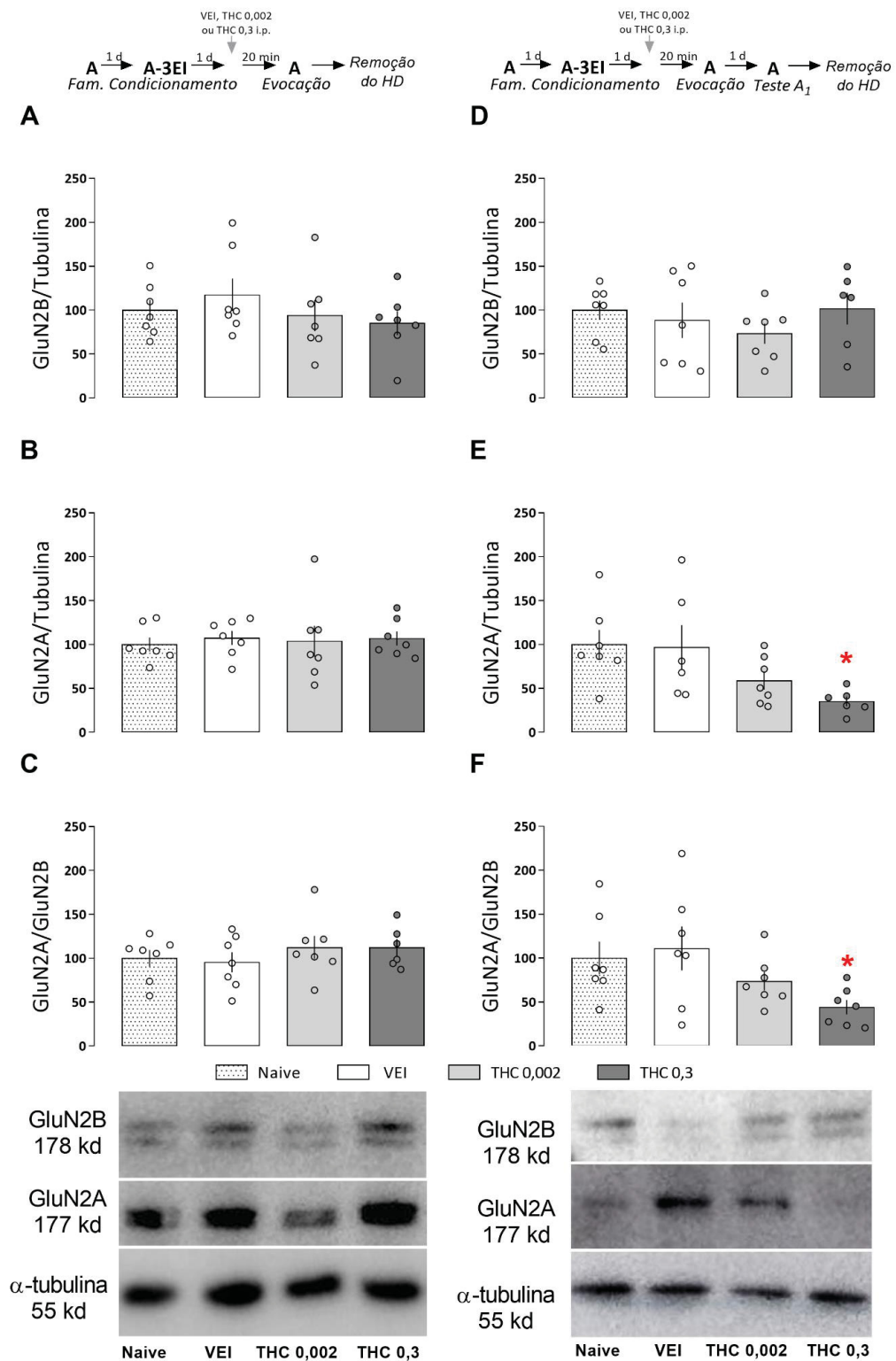


Figura 17. Efeitos do tratamento com THC na expressão de GluN2B e GluN2A no HD. **A)** Expressão de GluN2B após a evocação da memória. **B)** Expressão de GluN2A após a evocação da memória. **C)** Razão GluN2A/GluN2B após a evocação. **D)** Expressão de GluN2B após o Teste A1. **E)** Expressão de GluN2A após o Teste A1. **F)** Razão GluN2A/GluN2B após o Teste A1. O tratamento com THC 0,3 diminuiu a expressão de GluN2A e a razão GluN2A/GluN2B no HD após o Teste A1. Não foram observadas diferenças significativas após a evocação da memória. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo VEI.

5.8 Experimento 8. O efeito do tratamento com THC na expressão das subunidades GluN2A e GluN2B na AMG e no CPFm

Como no HD foram observadas alterações apenas após o Teste A1, para avaliar se o tratamento com THC altera a expressão de GluN2B e GluN2A também na AMG e no CPFm, amostras dos mesmos animais que receberam VEI ou THC (0,002 ou 0,3 mg/kg) 20 minutos antes da evocação e tiveram a remoção do cérebro após o Teste A1 ($n = 5-7/\text{grupo}$) foram analisadas. Na AMG, a ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento na expressão de GluN2B [$F_{(3,21)} = 3,715$; $p = 0,027$; $\eta^2 = 0,347$], mas não na expressão de GluN2A [$F_{(3,21)} = 0,718$; $p = 0,552$; $\eta^2 = 0,093$] ou na razão GluN2A/GluN2B [$F_{(3,22)} = 0,6081$; $p = 0,6168$; $\eta^2 = 0,076$]. Como observado na Figura 18A-C, o tratamento com THC 0,3 diminui exclusivamente a expressão de GluN2B em comparação ao grupo VEI. No CPFm, a ANOVA de uma via mostrou que não há efeito significativo do tratamento na expressão de GluN2B [$F_{(3,23)} = 1,396$; $p = 0,2693$; $\eta^2 = 0,154$], na expressão de GluN2A [$F_{(3,23)} = 0,6359$; $p = 0,5995$; $\eta^2 = 0,076$], ou na razão GluN2A/GluN2B [$F_{(3,21)} = 1,107$; $p = 0,3685$; $\eta^2 = 0,136$]. Como observado na Figura 18D-F, não há diferença significativa entre os grupos. Em conjunto esses resultados sugerem que tratamento com THC 0,3 antes da evocação da memória, atua diferentemente no o HD e na AMG, diminuindo a expressão de GluN2A e GluN2B, respectivamente.

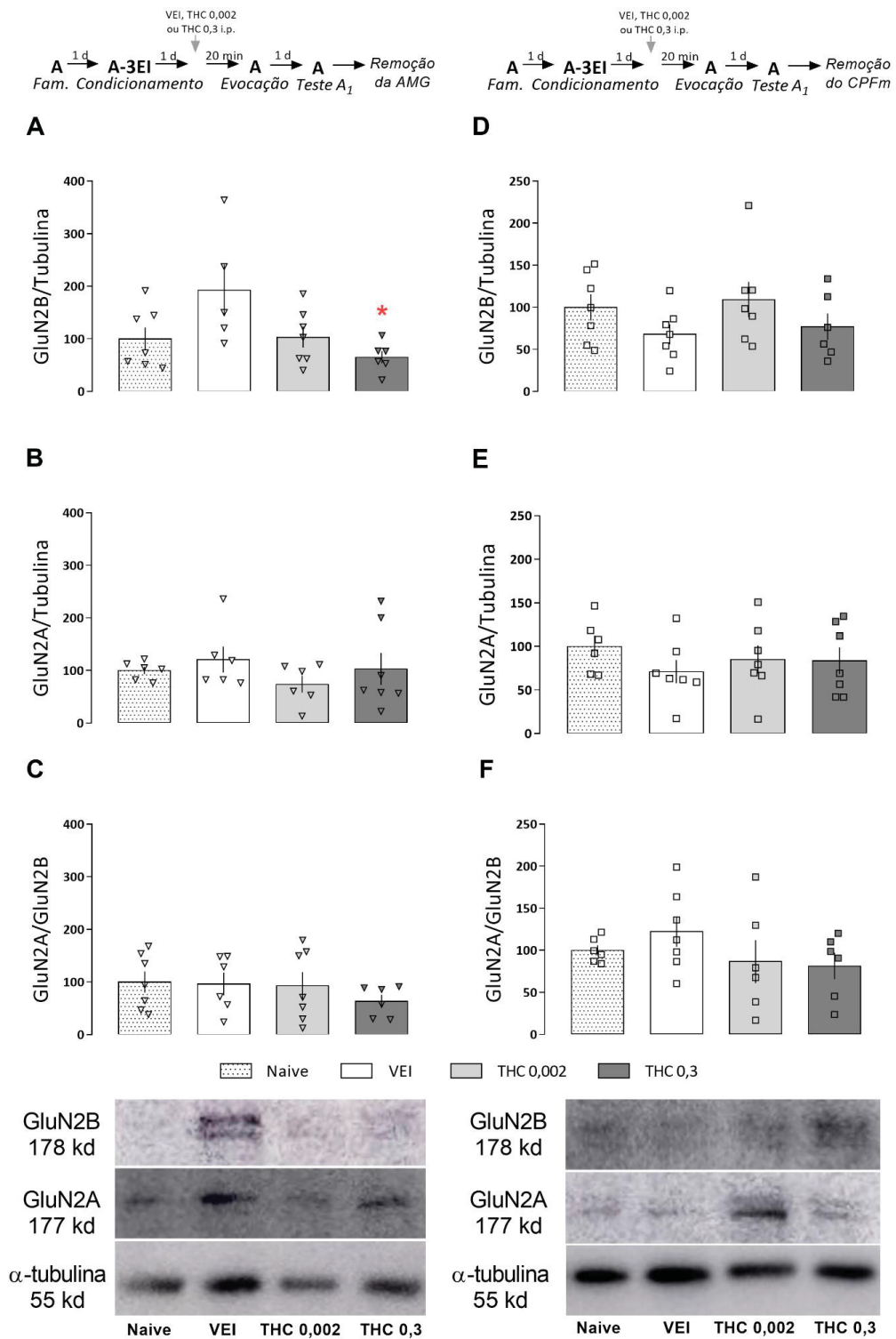


Figura 18. Efeitos do tratamento com THC na expressão de GluN2B e GluN2A após o Teste A1 na AMG e no CPFm. **A)** Expressão de GluN2B na AMG. **B)** Expressão de GluN2A na AMG **C)** Razão GluN2A/GluN2B na AMG. **D)** Expressão de GluN2B no CPFm. **E)** Expressão de GluN2A no CPFm. **F)** Razão GluN2A/GluN2B no CPFm. O tratamento com THC 0,3 diminuiu a expressão de GluN2B, sem alterar a de GluN2A ou a razão GluN2A/GluN2B na AMG após o Teste A1. Não foram observadas diferenças significativas no CPFm. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0.05$ comparado ao grupo VEI.

5.9 Experimento 9. Avaliação da participação dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA do HD na labilização e reconsolidação da memória

Para avaliar se o efeito de ANI na reconsolidação da memória de medo depende dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA, ratos condicionados ao medo receberam veículo i.p. e, posteriormente, receberam randomicamente veículo, PEAQX ou IFE intra-HD, 20 min antes da evocação. Imediatamente após a evocação, os animais receberam veículo ou ANI intra-HD (n = 9-11/grupo).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao Contexto A [$F_{(2,54)} = 4,448$; $p = 0,016$; $\eta^2 = 0,141$]. Conforme observado na Figura 19A, o tratamento com PEAQX ou IFE reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento durante a sessão de evocação em relação aos controles. No entanto, no Teste A1 os grupos VEI-PEAQX-VEI e VEI-IFE-VEI apresentaram porcentagens de tempo de congelamento semelhantes aos controles, sugerindo um comprometimento específico na expressão da memória do medo. No Teste A1, os grupos VEI-VEI-ANI e VEI-PEAQX-ANI apresentaram diminuição significativa na porcentagem de tempo de congelamento em relação aos controles, sugerindo um prejuízo na reconsolidação da memória. Este efeito não é observado no grupo VEI-IFE-ANI, sugerindo que no HD o antagonismo dos receptores GluN2B-NMDA, mas não GluN2A-NMDA, previne o efeito da ANI na reconsolidação.

A ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre pré-tratamento x tratamento na exposição Contexto B [$F_{(2,54)} = 18,466$; $p < 0,00001$; $\eta^2 = 0,406$] e no ID [$F_{(2,54)} = 9,108$; $p = 0,0004$; $\eta^2 = 0,252$]. Conforme observado na Figura 19B-C, os animais VEI-IFE-ANI apresentaram um aumento na porcentagem de tempo de congelamento no Teste B1 e uma redução no ID1, respectivamente, em relação aos controles, sugerindo que o antagonismo dos receptores GluN2B-NMDA não apenas previne o efeito da ANI na reconsolidação da memória do medo, mas também aumenta a generalização da memória do medo.

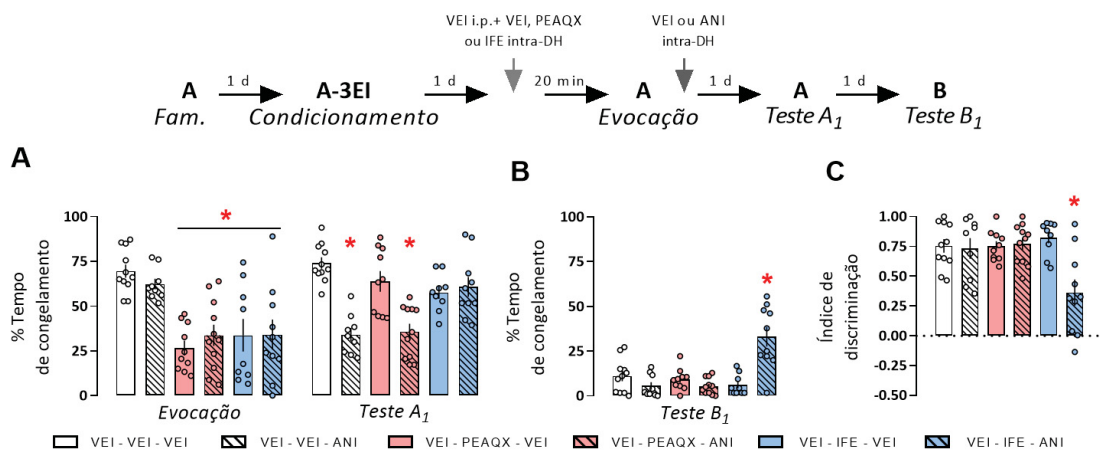


Figura 19. Efeitos do antagonismo dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD. **A)** Durante a sessão de evocação, o tratamento com PEAQX ou IFE reduziu o comportamento de congelamento, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. No Teste A1, os animais VEI-VEI-ANI e VEI-PEAQX-ANI, mas não VEI-IFE-ANI, mostraram uma redução no comportamento de congelamento comparado com os controles, sugerindo um prejuízo na reconsolidação, e o antagonismo dos receptores GluN2B-NMDA previne esse efeito. **B)** No Teste B1, o grupo VEI-IFE-ANI mostrou um aumento do comportamento de congelamento comparado com o grupo controle, sugerindo um aumento da generalização da memória. **C)** No ID, o grupo VEI-IFE-ANI mostrou uma redução quando comparado ao grupo controle, sugerindo uma memória menos específica. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

5.10 Experimento 10. Influência dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA do HD no efeito da dose ultrabaixa de THC na reconsolidação da memória

Para avaliar a participação dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA no efeito do THC 0,002 mg/kg, ratos condicionados ao medo receberam randomicamente veículo ou THC 0,002 mg/kg i.p., seguido imediatamente de veículo, PEAQX ou IFE no HD, 20 minutos antes da sessão de evocação da memória ($n = 8-10$ /grupo).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao contexto A [$F_{(2,46)} = 3,664$; $p = 0,033$; $\eta^2 = 0,137$]. Conforme observado na Figura 20A, o tratamento com PEAQX ou com IFE, independentemente do tratamento anterior com veículo ou THC 0,002, diminuiu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento durante a sessão de evocação. No entanto, os grupos VEI-PEAQX e VEI-IFE apresentaram comportamento de congelamento semelhante aos controles durante o Teste A1, sugerindo um comprometimento específico na expressão da memória. No Teste A1, os grupos THC 0,002-VEI e THC 0,002-PEAQX, mas não THC 0,002-IFE,

apresentaram redução significativa na porcentagem de tempo de congelamento em relação aos controles. Esses resultados sugerem que o efeito do THC 0,002 na reconsolidação da memória de medo é dependente dos receptores GluN2B-NMDA, mas não dos receptores GluN2A-NMDA.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não há interação significativa entre pré-tratamento x tratamento na exposição Contexto B [$F_{(2,46)} = 2,890$; $p = 0,066$; $\eta^2 = 0,112$] e no ID [$F_{(2,46)} = 0,677$; $p = 0,513$; $\eta^2 = 0,028$]. Conforme observado na Figura 20B-C, não há diferença entre os grupos no Teste B1 ou no ID1, sugerindo não haver influência dos tratamentos na generalização da memória.

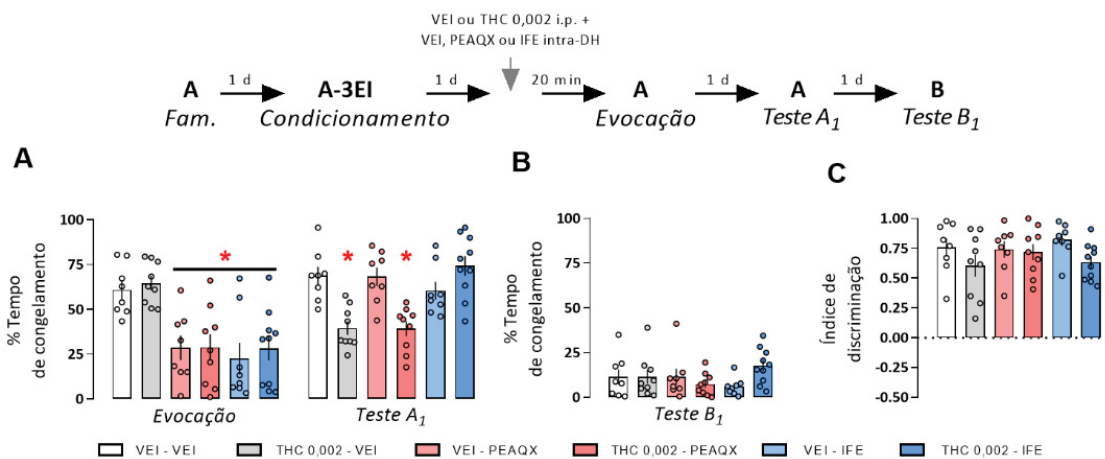


Figura 20. Efeitos do antagonismo dos receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD nos efeitos do THC 0,002. **A)** Durante a sessão de evocação, o tratamento com PEAQX ou IFE reduziu o comportamento de congelamento em grupos pré-tratados com VEI ou THC 0,002, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. No Teste A1, os grupos THC 0,002-VEI e THC 0,002-PEAQX, mas não THC-0,002-IFE, mostraram uma redução no comportamento de congelamento, sugerindo um prejuízo na reconsolidação, e o antagonismo dos receptores GluN2B-NMDA previne esse efeito. **B)** No Teste B1, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. **C)** No ID, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

3.11 Experimento 11. A influência dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA do HD no efeito da dose convencional de THC na reconsolidação da memória

Para avaliar se o efeito do THC 0,3 ao prevenir o efeito da ANI na reconsolidação da memória depende dos receptores GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA, ratos condicionados ao medo receberam THC 0,3 mg/kg i.p. e, posteriormente, receberam

randomicamente veículo, PEAQX ou IFE no HD 20 minutos antes da sessão de evocação de memória. Imediatamente após a sessão de evocação, os animais receberam veículo ou ANI no HD (n = 9-11/grupo).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao Contexto A [$F_{(2,56)} = 9,277$; $p = 0,0003$; $\eta^2 = 0,248$]. Conforme observado na Figura 21A, os grupos que receberam PEAQX ou IFE apresentaram menor percentual de tempo de congelamento durante a sessão de evocação, sugerindo prejuízo na expressão da memória, uma vez que, no Teste A1, os grupos THC 0,3-PEAQX-VEI e THC 0,3-IFE-VEI apresentaram comportamento de congelamento semelhante ao grupo controle. No Teste A1, os grupos THC 0,3-VEI-ANI e THC 0,3-PEAQX-ANI também não diferiram do controle, confirmando que a administração de THC 0,3 previne o efeito da ANI na reconsolidação da memória e sugerindo que este efeito não é dependente dos receptores GluN2A-NMDA. No entanto, o grupo THC 0,3-IFE-ANI apresentou uma redução significativa na porcentagem de tempo de congelamento em relação ao grupo controle, sugerindo um prejuízo na reconsolidação da memória e um envolvimento dos receptores GluN2B-NMDA no efeito da THC 0,3 na labilização.

A ANOVA de duas vias mostrou uma interação de pré-tratamento x tratamento na exposição do Contexto B [$F_{(2,56)} = 5,647$; $p = 0,006$; $\eta^2 = 0,167$] e no ID [$F_{(2,56)} = 4,381$, $p = 0,017$; $\eta^2 = 0,131$]. Conforme observado na Figura 21B-C, o grupo THC 0,3-VEI-ANI apresentou um aumento na porcentagem de tempo de congelamento no Teste B1 e uma redução no ID1, respectivamente, em comparação aos controles, sugerindo um aumento na generalização da memória de medo. O mesmo não foi observado no grupo THC 0,3-IFE-ANI no Teste B1 e no ID1, sugerindo que antagonizar os receptores GluN2B-NMDA também garante a especificidade da memória.

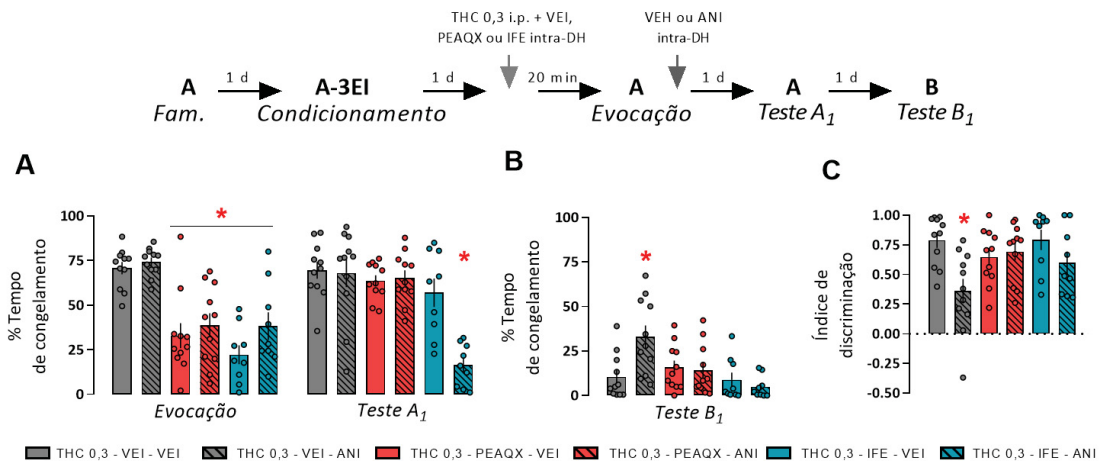


Figura 21. Efeitos do antagonismo de receptores GluN2A-NMDA e GluN2B-NMDA do HD nos efeitos do THC 0,3. **A)** Durante a sessão de evocação, o tratamento com PEAQX ou IFE reduziu o comportamento de congelamento, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. No Teste A1, grupo THC 0,3-IFE-ANI, mas não o THC 0,3-VEI-ANI e THC 0,3-PEAQX-ANI, mostrou uma redução no comportamento de congelamento, sugerindo que receptores GluN2B-NMDA, mas não GluN2A-NMDA, estão envolvidos em antagonizar o efeito induzido pelo THC 0,3 na labilização da memória. **B)** No Teste B1, os animais THC 0,3-VEI-ANI apresentaram um aumento no comportamento de congelamento comparado com o controle, e o grupo THC 0,3-IFE-ANI mostrou uma redução no comportamento de congelamento comparado com esse grupo, sugerindo que o antagonismo de receptores GluN2B-NMDA também previne a generalização da memória. **C)** No ID, o grupo THC 0,3-VEH-ANI apresentou uma diminuição desse parâmetro quando comparado ao controle, sugerindo uma memória menos específica. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

5.12 Experimento 12. A dependência da evocação da memória no efeito do THC 0,3-IFE-ANI na reconsolidação da memória

Em seguida, para avaliar se o efeito do THC 0,3-IFE-ANI na reconsolidação depende da evocação da memória, ratos condicionados ao medo, 20 minutos antes da exposição ao contexto B (sessão de não-evocação), receberam THC 0,3 mg/kg i.p. e receberam randomicamente veículo ou IFE no HD. Após exposição ao contexto B, os animais receberam ANI no HD ($n = 8/\text{grupo}$). O teste t de Student mostrou que não há efeito do tratamento durante a exposição ao Contexto B ($t_{14} = 0,566$; $p = 0,580$) ou Teste A1 ($t_{14} = -0,896$; $p = 0,385$). Conforme observado na Figura 22, nenhuma diferença foi observada entre os grupos THC 0,3-VEI-ANI e THC 0,3-IFE-ANI durante a exposição ao contexto B ou no Teste A1. Este resultado sugere que o tratamento com IFE depende da evocação da memória para restaurar o efeito amnésico da ANI em animais tratados com THC 0,3 mg/kg.

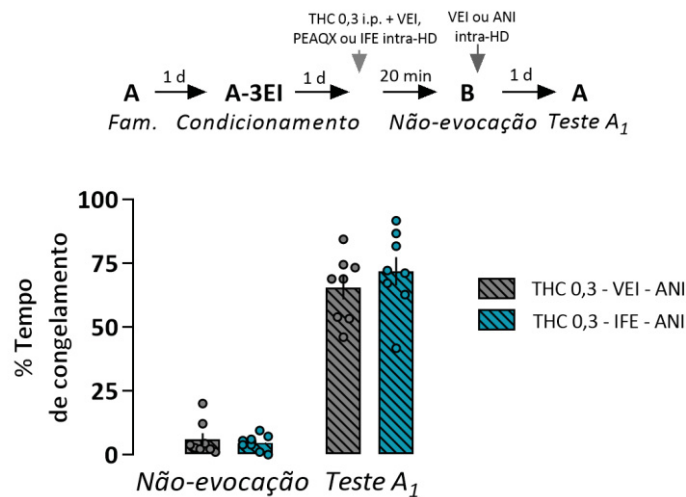


Figura 22. Efeito do THC 0,3-IFE-ANI quando a evocação foi omitida. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos THC 0,3-VEI-ANI e THC 0,3-IFE-ANI durante o Teste A₁, sugerindo que o efeito do THC 0,3-IFE-ANI depende da evocação da memória.

5.13 Experimento 13. A influência do UPS do HD na labilização e reconsolidação da memória

Para avaliar se a inibição do UPS afetaria o efeito da ANI na reconsolidação da memória, ratos condicionados ao medo receberam veículo i.p., então, receberam randomicamente veículo ou β lac no HD, 20 minutos antes da evocação da memória. Imediatamente após a sessão, receberam veículo ou ANI no HD ($n = 9-10$ /grupo).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao Contexto A [$F_{(1,33)} = 5,220$; $p = 0,029$; $\eta^2 = 0,136$]. Conforme observado na Figura 23A, a administração de β lac induziu uma redução na porcentagem de tempo de congelamento em comparação com o controle durante a sessão de evocação, mas este efeito não se manteve no Teste A₁, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. No Teste A₁, os animais VEI-VEI-ANI apresentaram redução no percentual de tempo de congelamento em comparação aos controles, no entanto, este efeito não é observado no grupo VEI- β lac-ANI, sugerindo que a inibição do UPS previne o efeito da ANI na reconsolidação da memória.

A ANOVA de duas vias mostrou que não há interação significativa entre pré-tratamento x tratamento na exposição ao contexto B [$F_{(1,33)} = 0,273$; $p = 0,605$; $\eta^2 = 0,008$] e no ID [$F_{(1,33)} = 0,961$; $p = 0,334$; $\eta^2 = 0,028$]. Conforme observado na Figura

23B-C, não há diferença significativa entre os grupos no Teste B1 ou no ID1, sugerindo não haver influência do tratamento na generalização da memória.

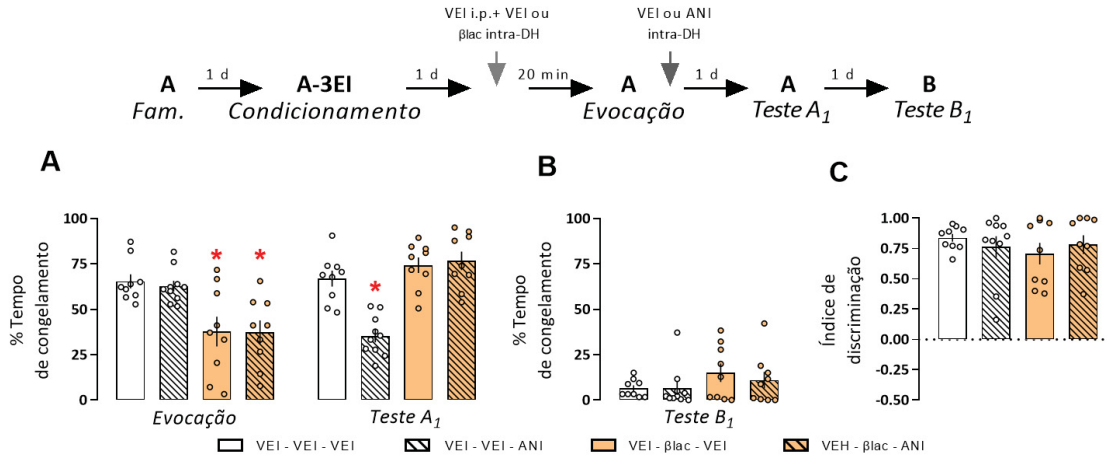


Figura 23. Efeitos da inibição do UPS do HD na labilização/reconsolidação da memória. **A)** Durante a sessão de evocação, o tratamento com βlac reduziu o comportamento de congelamento, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. No Teste A1, o grupo VEI-VEI-ANI, mas não VEI-βlac-ANI, mostrou uma redução no comportamento de congelamento, sugerindo um prejuízo na reconsolidação, e que a inibição do UPS prejudica a labilização da memória. **B)** No Teste B1, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. **C)** No ID, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Resultados são expressos por média ± EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

5.14 Experimento 14. Influência do UPS do HD no efeito do THC 0,002 na reconsolidação da memória

Para avaliar se a inibição do UPS interfere com o efeito do THC 0,002, ratos condicionados ao medo receberam veículo ou THC 0,002 i.p. e receberam randomicamente veículo ou βlac no HD, 20 minutos antes da sessão de evocação ($n = 8-10$ /grupo).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao Contexto A [$F_{(1,32)} = 5,733$; $p = 0,023$; $\eta^2 = 0,152$]. Conforme observado na Figura 24A, a administração de βlac induziu uma redução na porcentagem de tempo de congelamento em comparação com o grupo controle durante a sessão de evocação. Este efeito não foi duradouro no Teste A1, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. No Teste A1, os animais THC 0,002-VEI apresentaram redução na porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste A1 em relação aos controles, no entanto, esse efeito não é observado

no grupo THC 0,002- β lac, sugerindo que a inibição do UPS previne o efeito do THC 0,002 na reconsolidação da memória.

A ANOVA de duas vias não mostrou interação significativa entre pré-tratamento x tratamento na exposição ao Contexto B [$F_{(1,32)} = 0,096$; $p = 0,758$; $\eta^2 = 0,003$] e no ID [$F_{(1,32)} = 2,674$, $p = 0,112$; $\eta^2 = 0,077$]. Conforme observado na Figura 24B-C, não há diferença significativa entre os grupos no Teste B1 ou no ID1, sugerindo não haver influência do tratamento na generalização da memória.

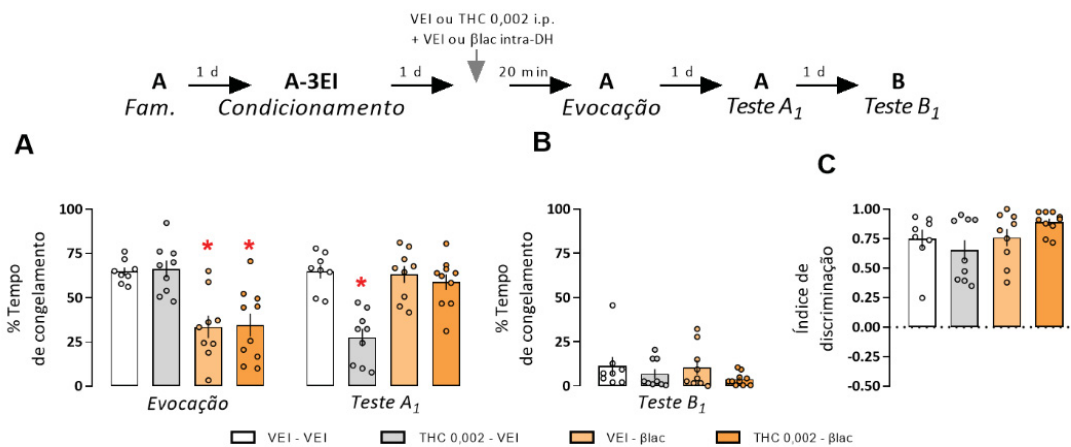


Figura 24. Efeitos da inibição do UPS do HD no efeito do THC 0,002 na labilização/reconsolidação da memória. **A)** Durante a sessão de evocação, o tratamento com β lac reduziu o comportamento de congelamento em grupos pré-tratados com VEI ou THC 0,002, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. No Teste A₁, o grupo THC 0,002-VEI, mas não THC 0,002- β lac, mostrou uma redução no comportamento de congelamento, sugerindo um prejuízo na reconsolidação, e que a inibição do UPS prejudica a labilização da memória. **B)** No Teste B₁, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. **C)** No ID, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

5.15 Experimento 15: Influência do UPS do HD no efeito do THC 0,3 na reconsolidação da memória

Para avaliar se a inibição do UPS interfere com o efeito do THC 0,3, ratos condicionados ao medo receberam THC 0,3 i.p. e posteriormente, randomicamente veículo ou β lac no HD, 20 minutos antes da sessão de evocação. Imediatamente após a evocação, eles receberam randomicamente veículo ou ANI no HD ($n = 9-10$ /grupo).

A ANOVA de medidas repetidas não mostrou interação significativa entre pré-tratamento x tratamento x re-exposição ao contexto A [$F_{(1,37)} = 5,258$, $p = 0,027$; $\eta^2 =$

0,124]. Conforme observado na Figura 25A, a administração de β lac induziu uma redução na porcentagem de tempo de congelamento durante a sessão de evocação em comparação com o controle, mas esse efeito não foi mantido no Teste A1, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. Durante o Teste A1, nem THC 0,3–VEI–ANI nem THC 0,3– β lac–ANI diferem do grupo controle. Este resultado confirma que a ANI não é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória de medo em animais tratados com THC 0,3, e também sugere que a inibição do UPS não modifica esse efeito.

A ANOVA de duas vias mostrou uma interação de pré-tratamento x tratamento na exposição ao Contexto B [$F_{(1,37)} = 4,203$, $p = 0,047$; $\eta^2 = 0,102$] e no ID [$F_{(1,37)} = 4,878$, $p = 0,033$; $\eta^2 = 0,116$], conforme observado na Figura 25H-I, o grupo THC 0,3–VEH–ANI apresentou uma porcentagem de tempo de congelamento significativamente maior no Teste B1 e uma redução significativa no ID1 em comparação aos controles, sugerindo um aumento na generalização da memória de medo. No entanto, este efeito não foi prevenido pela administração de β lac, sugerindo que a inibição do UPS em animais pré-tratados com THC 0,3 mantém a generalização da memória de medo.

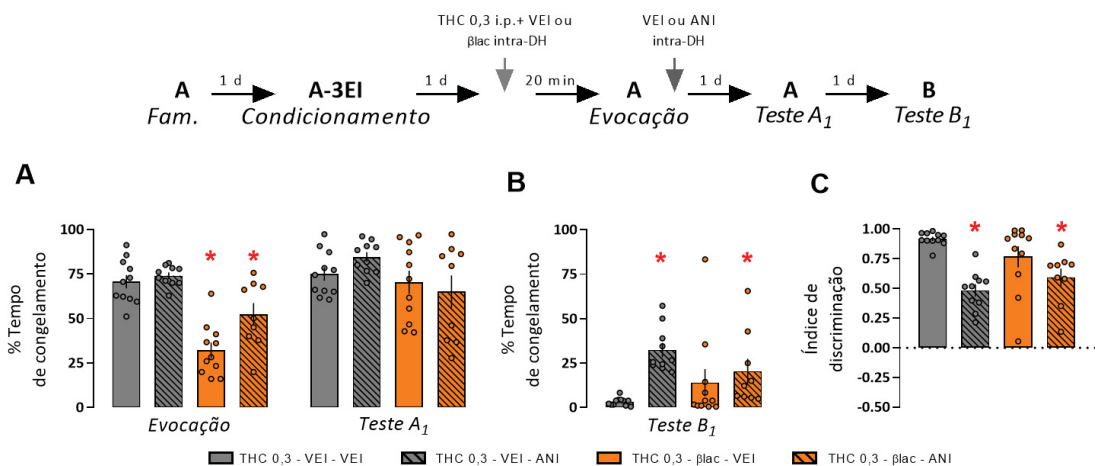


Figura 25. Efeitos da inibição do UPS do HD no efeito do THC 0,3 na labilização/reconsolidação da memória. **A)** Durante a sessão de evocação, o tratamento com β lac reduziu o comportamento de congelamento, sugerindo um prejuízo na expressão da memória. No Teste A1, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, sugerindo que o THC 0,3 previne o efeito da ANI na reconsolidação da memória de medo, e esse efeito não é prevenido pela inibição pela β lac. **B)** No Teste B1, os animais THC 0,3-VEI-ANI e THC 0,3- β lac-ANI apresentam um aumento no comportamento de congelamento, sugerindo que a inibição do UPS não preveniu a generalização da memória. **C)** No ID, os grupos THC 0,3-VEH-ANI e THC 0,3- β lac-ANI apresentaram uma diminuição nesse parâmetro, comparado com o controle, sugerindo uma memória menos específica. Resultados são expressos por média \pm EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ comparado ao grupo controle da sessão.

6. Discussão

Os resultados do presente trabalho mostraram que o THC 0,3 administrado antes da evocação não alterou a expressão de congelamento, mas aboliu o efeito da ANI na reconsolidação, sendo este efeito associado ao aumento da generalização e redução do índice de discriminação. Por sua vez, o THC 0,002 administrado antes da evocação prejudicou a reconsolidação da memória de medo. Esse efeito também foi observado quando o THC 0,002 foi administrado após a evocação. O THC 0,3 administrado antes da evocação diminuiu a expressão de GluN2A e a razão GluN2A/GluN2B no HD 24 h depois. No entanto, na AMG, o THC 0,3 diminuiu a expressão de GluN2B e não induziu alterações na expressão de GluN2A ou GluN2B no CPFm. O antagonismo dos receptores GluN2B-NMDA, mas não GluN2A-NMDA no HD preveniu os efeitos induzidos pela ANI e pelo THC 0,002 na reconsolidação e restaurou o efeito da ANI em animais pré-tratados com THC 0,3, além de prevenir a generalização do medo. A inibição do UPS no HD aboliu o efeito da ANI em animais pré-tratados com VEI ou THC 0,002, mas não interferiu no efeito do THC 0,3. Por fim, o antagonismo de receptores CB1 preveniu o efeito do THC 0,002 na reconsolidação. Juntos, esses resultados sugerem que o THC induziu um efeito bidirecional na labilização e reconsolidação da memória do medo dependendo da dose.

6.1 O efeito do THC na labilização e na reconsolidação da memória de medo

A infusão de ANI no HD de animais tratados com VEI reduziu significativamente o tempo de congelamento no Teste A1 e no Teste A2 em comparação ao grupo controle, sugerindo um prejuízo na reconsolidação da memória de medo. Este resultado concorda com estudos anteriores que relatam que a reconsolidação da memória de medo contextual depende de síntese proteica no HD (LEE et al., 2008; LEE, 2008; SUZUKI et al., 2009; MAMIYA et al., 2009). Além disso, o envolvimento do HD na resistência à labilização da memória do medo contextual também já foi descrito, já que a infusão de fármacos no HD é suficiente para bloquear ou facilitar a labilização da memória de medo contextual (LEE; FLAVELL, 2014; LEE et al., 2008; LEE, 2008; SUZUKI et al., 2008). Além disso, a sua integridade também é importante na resistência à labilização da memória de medo ao som (FERRARA et al., 2019).

A resistência à labilização é um fenômeno observado em modelos que induzem uma superconsolidação da memória com administração de ioimbina, estresse prévio ao condicionamento de medo, ou um condicionamento de alta intensidade (WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009; BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2015; COMAS MUTIS et al., 2021). No entanto, como a ANI prejudica a reconsolidação da memória nos animais que receberam VEI, os resultados do presente trabalho sugerem uma falta de resistência à labilização. Além disso, não foi observado aumento do comportamento de congelamento no grupo controle durante a exposição ao Contexto B. Nesse primeiro experimento todos os grupos apresentaram cerca de 20% ou menos de tempo de congelamento no Teste B1 e no Teste B2, diferentemente do observado nos estudos anteriores citados, em que a expressão do congelamento no Contexto B é cerca de 40% ou mais (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2015), ou até mesmo semelhante à porcentagem de congelamento expressa no contexto condicionado após 14 dias em um modelo com administração de corticosterona (DOS SANTOS CORRÊA et al., 2021), sugerindo que nas atuais condições, apenas a intensidade do treino não é suficiente para induzir a generalização da memória e a resistência à labilização.

Em contraste ao observado nos animais pré-tratados com VEI, apesar do pré-tratamento com THC 0,3 antes da evocação não alterar a expressão do comportamento de congelamento em relação ao grupo controle em nenhum dos testes *per se*, sua administração aboliu o efeito da ANI no Teste A1 e no Teste A2, sendo a expressão do congelamento do grupo THC 0,3-ANI semelhante ao grupo controle, sugerindo um prejuízo na labilização da memória. Estudos anteriores haviam mostrado que o receptor CB1 do HD é importante para a labilização da memória de medo contextual (SUZUKI et al., 2008; LEE; FLAVELL, 2014; LEE et al., 2019), no entanto, o resultado observado com o THC 0,3 contrasta com os relatos que mostraram que a administração de um antagonista de receptores CB1 (SR141716A) intra-HD preveniu o efeito induzido pela ANI de prejudicar a reconsolidação da memória de medo (SUZUKI et al., 2008). Por sua vez, em um protocolo de condicionamento ao contexto em que, apesar do treino ser de intensidade moderada (3 choques de 0.5 mA/2 s), foi realizada uma evocação de apenas 2 min, não sendo possível observar o efeito amnésico do antagonista de receptores NMDA (MK801) na reconsolidação da memória de medo *per se*, obteve-se uma facilitação da labilização

com a administração de um agonista de receptores CB1 (ACEA), permitindo o efeito do MK801 (LEE; FLAVELL, 2014). Alguns fatores podem explicar em parte os efeitos opostos observados, sendo um deles o momento da administração. LEE et al. (2019) sugeriram através da administração de SR141716A no HD, tanto antes quanto após a evocação, que a participação do receptor CB1 do HD na labilização da memória de medo contextual seria mais proeminente após a evocação, pois a administração do antagonista CB1 nesse momento foi capaz de prevenir o efeito amnésico do MK801. No trabalho de Suzuki et al. (2008), e no de Lee e Flavell (2014), a administração intra-HD de SR141716A e de ACEA, respectivamente, também foi após a evocação, mas o trabalho de Lee e Flavell (2014) também explorou a administração sistêmica de ACEA antes da evocação e o mesmo efeito facilitatório da labilização é reportado. No presente trabalho, a administração do THC também foi sistêmica, assim a participação de outras áreas cerebrais não pode ser excluída, como por exemplo da AMG, que envia projeções indiretas para o HD (DE OLMOS et al., 2004), e sugere-se que essa conexão HD-AMG seria importante para a labilização da memória (DONZIS; RENNAKER; THOMPSON, 2013; WELLS et al., 2011).

De fato, a infusão de ANI na BLA após a evocação de uma memória de medo contextual, além de prejudicar a reconsolidação, é capaz de induzir modificações estruturais no HD, como a diminuição de espinhas dendríticas (COMAS MUTIS et al., 2021). Ainda, Lee et al. (2019) sugerem que os receptores CB1 nessa região tenham uma maior participação na labilização da memória de medo contextual antes da evocação (LEE et al., 2019). De fato, a BLA também é importante para os processos de labilização e reconsolidação da memória de medo ao som (NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000; BEN MAMOU; GAMACHE; NADER, 2006; JAROME et al., 2015) e também da memória de medo ao contexto (COMAS MUTIS et al., 2021). No entanto, em protocolos de memória de medo ao som, a mudança de contexto parece fundamental para a labilização da memória (JAROME et al., 2015), assim a resistência à labilização pode ser induzida pela ausência de uma novidade durante a evocação. Estudos sugerem que a inibição da síntese proteica na BLA em protocolos com resistência à labilização, tanto pela ausência de novidade contextual, como induzido por um treino de alta intensidade (10 pareamentos som-choque de 1.5 mA/1 s), só foi capaz de prejudicar a reconsolidação quando foi feita a inativação prévia ou a lesão do HD (WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009; FERRARA et al., 2019).

Dessa forma, as projeções do HD para a AMG seriam importantes para a resistência à labilização. Como no presente trabalho a inibição da síntese proteica foi feita diretamente no HD, é provável que a ativação dos receptores CB1 do próprio HD, mesmo antes da evocação, esteja impedindo a labilização da memória, pela importância dessa região para esse fenômeno.

Outro fator que pode ter contribuído para os efeitos opostos observados, seria a própria característica das drogas canabinoides apresentarem efeitos bifásicos (CALABRESE; RUBIO-CASILLAS, 2018; PANDELIDES et al., 2020; RAYMUNDI et al., 2020b), incluindo os efeitos na memória e na ansiedade. Enquanto doses baixas de THC facilitam a extinção da memória e induzem comportamentos tipo-ansiolíticos (METNA-LAURENT et al., 2012; SALVIATO et al., 2021), doses mais altas exercem efeitos opostos, prejudicando a extinção e sendo tipo-ansio gênicas (PATEL; HILLARD, 2006; METNA-LAURENT et al., 2012; SALVIATO et al., 2021). Apesar da dose de 0,3 mg/kg de THC ser considerada uma dose baixa, pode ser que quanto ao processo de labilização da memória ela seja o suficiente para induzir efeitos na direção de prejuízo. Além disso, como comentado anteriormente, o protocolo utilizado no presente trabalho não induz a resistência à labilização, como observado no trabalho de Lee e Flavell (2014), assim, investigações futuras são necessárias para se avaliar em qual direção seria o efeito do THC nessa dose mudando as condições experimentais. Além disso, Lee e Flavell (2014) utilizaram o ACEA, que é um agonista total, bastante potente e com maior afinidade e seletividade para os receptores CB1 do que o THC (AN et al., 2020), que atua como um agonista parcial, podendo também ativar outros alvos, como o próprio receptor CB2 (PERTWEE, 2009). Pertwee (2009) comenta em sua revisão que pela sua baixa eficácia, menor até do que os agonistas canabinoides endógenos, o THC pode, em alguns casos, antagonizar fisiologicamente os efeitos da ativação endocanabinoide, o que pode ser o caso da dose 0,3 mg/kg nesse trabalho. Ainda, existem evidências de que o antagonismo de receptores CB2 no HD antes da evocação facilita a labilização da memória de medo contextual potencializada pela ioimbina (SCOZ-SILVA, 2018), assim, não se pode excluir que a resistência à labilização induzida pelo THC possa se dar também pela ativação de receptores CB2.

O tratamento com THC 0,002 antes da evocação da memória reduziu a porcentagem de tempo de congelamento no Teste A1 e no Teste A2, sugerindo que

a dose ultrabaixa de THC prejudicou a reconsolidação da memória de medo. Corroborando esse resultado, o efeito do THC no Teste A1 foi abolido quando o tratamento foi administrado antes da exposição a um Contexto B não-pareado, mostrando que a evocação da memória no contexto pareado é necessária para o efeito do THC na reconsolidação da memória. O efeito de uma dose ultrabaixa de THC na memória de medo não havia sido explorado até o momento, entretanto, esses resultados estão de acordo com estudos que mostram que o próprio THC em doses convencionais (STERN et al., 2015) ou que outros agonistas do receptor CB1 como o CP55,940 e a anandamida (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2008; SANTANA et al., 2016), ou fármacos que aumentam a transmissão endocanabinoide como o CBD (STERN et al., 2012; BAYER et al., 2021), prejudicam a reconsolidação da memória de medo por meio do receptor CB1. Ainda, o tratamento com THC 0,002 não alterou o efeito da ANI na reconsolidação da memória, sugerindo que essa dose de THC não afeta a labilização da memória.

A maioria dos trabalhos que mostram um prejuízo na reconsolidação da memória administram as drogas após a evocação. Aqui, o THC foi administrado antes, assim, para se avaliar se o efeito do THC depende do momento da administração, ambas as doses foram administradas também após a evocação. A administração de THC 0,3 após a evocação não prejudicou a reconsolidação da memória do medo, em contraste com nosso estudo anterior utilizando a mesma dose (STERN et al., 2015). Nas condições atuais, esse resultado não foi replicado, possivelmente devido à maior intensidade de choque utilizada no trabalho atual. No entanto, o THC 0,002 mg/kg administrado após a evocação também diminuiu a porcentagem de tempo de congelamento em comparação aos controles no Teste A1 e no Teste A2, sugerindo que independente do momento da administração, o THC nessa dose é capaz de prejudicar a reconsolidação. Como o THC também facilita a extinção (METNLAURENT et al., 2012; RABINAK et al., 2013), a administração antes da evocação, embora tenha sido uma evocação curta, poderia estar facilitando esse processo. No entanto, esse resultado da administração após a evocação, e o fato de o efeito ser duradouro, ou seja, pelo menos até sete dias após não sofrer recuperação espontânea, sugere que esse efeito seja por um prejuízo na reconsolidação, em vez de uma facilitação da extinção. Ainda assim, outros experimentos, como realizar uma reexposição ao Contexto A após um período de tempo ainda mais longo, por exemplo

21 dias, ou a indução da reinstalação poderiam ser feitos para confirmar essa suposição.

Esse padrão de resultados com o THC 0,002 concorda com trabalhos em memórias não emocionais, que mostraram que o THC nessa dose, administrado antes ou depois de uma administração de LPS ou PTZ, em camundongos, pode prevenir o déficit cognitivo (ASSAF et al., 2011; FISHBEIN-KAMINIETSKY; GAFNI; SARNE, 2014). Sarne (2019) comenta em sua revisão que apesar dessa dose causar um prejuízo cognitivo em animais jovens e saudáveis (ASSAF et al., 2011), quando administrada previamente ou após um insulto, seria capaz de evocar mecanismos compensatórios projetados para proteger o organismo de outros insultos mais severos, que no caso seria a própria evocação da memória aversiva. Os efeitos da dose ultrabaixa de THC nos estudos citados são principalmente mediados por receptores CB1 e estão relacionados às propriedades neuroprotetoras, como o aumento da expressão de BDNF, além do aumento da fosforilação da ERK2 e de CREB (FISHBEIN et al., 2012) e diminuição da expressão da COX-2 (FISHBEIN-KAMINIETSKY; GAFNI; SARNE, 2014) no hipocampo e CPF. Mais recentemente, também, foi mostrado que o tratamento com THC 0,002 retardou o declínio da memória em animais idosos (SARNE et al., 2018) e em modelos de doença de Alzheimer (FIHURKA et al., 2022; NITZAN et al., 2022), sendo esse efeito acompanhado por uma diminuição na reativação da micróglia no hipocampo (NITZAN et al., 2022). Como o THC 0,002 preserva a labilização da memória, é possível que mecanismos semelhantes de neuroproteção estejam sendo recrutados, pois já foi relatado que alguns mecanismos de neuroinflamação estão associados à formação e manutenção das memórias de medo contextuais, como ativação microglial e de inflamossomas (ENOMOTO; KATO, 2021; DONG et al., 2020), no entanto investigações futuras são necessárias para avaliar essa relação.

O antagonismo de receptores CB1 no HD preveniu o efeito da administração de THC 0,002 antes da evocação no Teste A1. Esse resultado concorda com um estudo prévio que mostra que o efeito das doses convencionais de THC na reconsolidação da memória depende do receptor CB1 (STERN et al., 2015). No entanto, no estudo anterior, a infusão de AM251 foi no CPFm, assim, não se pode excluir a possibilidade de que os efeitos do THC 0,002 dependam do receptor CB1 de outras áreas cerebrais. Apesar disso, no presente estudo, o antagonismo no HD foi suficiente para prevenir o

efeito do THC. Além disso, Fishbein-Kaminietsky, Gafni e Sarne (2014) mostraram que o efeito do THC 0,002 de prevenir o déficit cognitivo em camundongos tratados com LPS, depende não apenas de receptores CB1, mas também de receptores PPAR γ . Nessa linha, já foi mostrado que o prejuízo na consolidação da memória de medo, induzido pelo CBD administrado uma hora após a aquisição, também depende de receptores PPAR γ (RAYMUNDI et al., 2020a). Assim, não se pode excluir que o efeito do THC 0,002 na reconsolidação da memória possa ser mediado também por receptores PPAR γ .

Um fator que pode ter contribuído também para o THC ser efetivo quando administrado antes mesmo da evocação seria sua meia-vida bastante longa, em torno de 21-24 h (KLAUSNER et al., 1971; HLOŽEK et al., 2017). Além disso, sabe-se que o THC pode induzir efeitos tipo-ansiolíticos ou tipo-ansio gênicos, ou alterações em comportamentos locomotores (ONAVI; GREEN; MARTIN, 1990; BRAIDA et al., 2007; RUBINO et al., 2007; KARSTEN; ZHANG; BOEHM, 2019; SCHRAMM-SAPYTA et al., 2007). Assim, as alterações nesses comportamentos poderiam estar relacionadas à redução do congelamento no Teste A1. No entanto, nenhuma das doses de THC alterou agudamente o comportamento de ansiedade ou locomoção no LCE, ou a locomoção após 24 h no campo aberto. Esses resultados concordam com estudos anteriores mostrando que doses baixas de THC (0,075-1 mg/kg) não induziram alterações nos comportamentos tipo-ansiedade ou na locomoção tanto agudamente, como após 24 h em ratos machos (STERN et al., 2015; SALVIATO et al., 2021), sugerindo que os efeitos do THC observados até então não estão relacionados a alterações nos comportamentos de ansiedade ou locomoção dos animais.

6.2 O efeito do THC na expressão das subunidades GluN2A e GluN2B

Como a razão GluN2A/GluN2B em receptores NMDA tem sido relacionada à labilização da memória (ZHANG et al., 2018), decidiu-se investigar se o tratamento com THC antes da evocação da memória alteraria a expressão dos receptores GluN2A-NMDA e/ou GluN2B-NMDA no HD. Não foram observadas diferenças no grupo tratado com VEI em comparação com o grupo *naive*, tanto após a evocação da memória quanto após o Teste A1. Esses resultados concordam com os achados que mostram que, em protocolos incapazes de induzir resistência à labilização, embora

haja diferenças quanto ao tipo de condicionamento (condicionamento ao som vs. condicionamento ao contexto) e nas regiões avaliadas (BLA vs. HD), não são observadas alterações na expressão de GluN2A e GluN2B (HOLEHONNUR et al., 2016; WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009). Além disso, após a evocação, não foi observada diferença nos grupos tratados com THC, sugerindo nenhuma alteração imediata na expressão de GluN2A ou GluN2B. No entanto, quando avaliado após o Teste A1, uma redução significativa na expressão de GluN2A e na razão GluN2A/GluN2B foi observada no grupo tratado com THC 0,3 em comparação ao grupo VEI. Este resultado contrasta com outros que mostram que a resistência à labilização está associada a um aumento da razão GluN2A/GluN2B na BLA, ou uma diminuição da expressão de GluN2B também na BLA 48 h após protocolos de condicionamento de medo ao som de alta intensidade (HOLEHONNUR et al., 2016; WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009).

Alguns fatores podem contribuir para os resultados discrepantes. Primeiramente, esses trabalhos avaliaram apenas a BLA e não o HD, além disso, trata-se de um condicionamento auditivo e não contextual e por fim, a resistência à labilização no presente estudo foi induzida pelo THC em vez de um forte protocolo de condicionamento de medo. Ainda, há estudos que sugerem que a dinâmica dos receptores GluN2A/GluN2B-NMDA no HD e sua relação com a labilização da memória podem diferir da BLA. Por exemplo, tanto a superexpressão de GluN2A-NMDA na BLA como o *knockdown* de GluN2A-NMDA no hipocampo prejudicaram a consolidação da memória de medo (HOLEHONNUR et al., 2016; ACUTAIN et al., 2019). Já foi observado inclusive que o THC pode diminuir tanto a expressão de GluN2A como a de GluN2B no HD por meio da ativação de receptores CB1, efeitos que foram associados a prejuízos na memória de medo contextual (FAN et al., 2010; CHEN et al., 2013). Em contrapartida, a diminuição tanto de GluN2A como de GluN2B na BLA após um intenso condicionamento de medo ao som, sem alterar a razão GluN2A/GluN2B, foi associada à manutenção da memória de medo (ZINEBI et al., 2003). Assim, apesar da ausência de alterações após a evocação, é concebível sugerir que a redução subótima na razão GluN2A/GluN2B no HD contribui para a resistência à labilização da memória.

Quando avaliada a expressão na AMG, assim como no HD, não houveram diferenças significativas no grupo que recebeu VEI em relação ao *naive* após o Teste

A1. No entanto, o tratamento com THC 0,3 diminuiu a expressão de GluN2B em relação ao VEI, sem alterar significativamente a expressão de GluN2A ou a razão GluN2A/GluN2B. Isso difere do trabalho de Holehonnur et al. (2016), que mostrou que um aumento na razão GluN2A/GluN2B está associada a resistência à labilização da memória. Além disso, mais recentemente outros trabalhos observaram que o aumento da expressão de GluN2B na BLA está associado com a labilização da memória ao som, enquanto animais que não apresentam esse aumento, por sua vez, apresentam resistência à labilização (DE SOLIS et al., 2019; HAUBRICH; BERNABO; NADER, 2020). Uma limitação do presente trabalho é que a avaliação não foi feita especificamente na BLA, mas na AMG como um todo, o que pode ter contribuído para essa ausência, tanto da mudança na razão GluN2A/GluN2B, quanto de aumento de GluN2B. Apesar disso, os resultados observados aqui, em que há diminuição da expressão de GluN2B induzida pela administração de THC 0,3, concordam com a diminuição de GluN2B na BLA observada no estudo anteriormente citado (WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009), que foi associada à resistência à labilização. Juntos, esses efeitos sugerem que o THC altera diferentemente a expressão de GluN2A e GluN2B dependendo da área cerebral, corroborando a hipótese de que a dinâmica dos receptores GluN2A/GluN2B em relação à labilização da memória possa ser diferente no HD e na AMG.

Quanto ao CPFm, nenhuma diferença significativa foi observada na expressão das subunidades. Apesar de trabalhos mostrarem a participação dessa região, mais precisamente do PL, na reconsolidação da memória de medo contextual (STERN et al., 2014; 2015; VANVOSSSEN et al., 2017), de fato, o papel dos receptores GluN2A/GluN2B-NMDA do CPFm é menos caracterizado, principalmente em relação à labilização/reconsolidação. Um trabalho mostrou que altos níveis de proBDNF no PL induziu a labilização de uma memória de medo ao som em um protocolo de baixa intensidade (4 pareamentos som e choque), mas não de alta intensidade (8 pareamentos som e choque), em ratos juvenis e esse efeito dependeu de receptores GluN2B-NMDA, mas não de GluN2A-NMDA (SUN et al., 2022). Em relação às outras etapas da memória, alguns trabalhos apontam a participação do GluN2B do IL no processo de extinção do medo. A infusão de proBDNF no IL é capaz de extinguir memórias de medo condicionadas ao som, e requer receptores GluN2B-NMDA, mas não GluN2A-NMDA (SUN; LI; AN, 2018). Em contrapartida, a exposição crônica à

corticosterona, diminuiu a sua secreção endógena e prejudicou a extinção da memória de medo contextual, sendo esse efeito acompanhado por uma diminuição na expressão de GluN2B no CPFm (GOURLEY et al., 2008). Curiosamente, um aumento na expressão de GluN2B no IL foi associado à generalização da memória de medo ao som (ASIM et al., 2020). Assim, a participação de receptores GluN2B-NMDA do CPFm pode diferir de acordo com o protocolo adotado e a sub-região analisada, embora as evidências sejam poucas e mais estudos, principalmente avaliando a etapa da reconsolidação, ainda precisam ser feitos. Aqui o efeito do THC 0,3 na labilização não induz mudanças na expressão de GluN2A/GluN2B-NMDA nessa região, uma limitação também é que o CPFm foi analisado como um todo, e sabe-se que a participação do PL e do IL podem ser opostas, assim contribuindo para uma falta de efeito.

6.3 O efeito do THC quanto ao antagonismo dos receptores GluN2A- e GluN2B-NMDA e inibição do UPS

Para investigar melhor a participação dos receptores GluN2A- ou GluN2B-NMDA do HD na labilização/reconsolidação da memória, primeiro avaliamos a influência do antagonismo desses receptores nos efeitos induzidos pela ANI. O antagonismo dos receptores GluN2B-NMDA, mas não GluN2A-NMDA, preveniu o efeito da ANI na reconsolidação da memória em animais pré-tratados com VEI. Este resultado concorda com estudos que sugerem a participação diferencial de GluN2B-NMDA e GluN2A-NMDA na labilização e reconsolidação, respectivamente (BEN MAMOU; GAMACHE; NADER, 2006; MILTON et al., 2013), em que a administração do antagonista GluN2B-NMDA na BLA previne o efeito da ANI na reconsolidação da memória de medo ao som. No trabalho de Milton et al. (2013), a administração *per se* do antagonista GluN2A-NMDA antes da evocação prejudicou a reconsolidação da memória, o que não foi observado aqui, já que foi utilizada uma dose mais baixa do antagonista. No entanto, o antagonismo de receptores GluN2A-NMDA permitiu que a memória fosse modificada pela ANI, confirmando que esses receptores não estariam envolvidos com a labilização da memória. Esses resultados concordam também com um estudo que mostra que o antagonismo de GluN2B-NMDA do HD previne o efeito de uma recompensa apetitiva em diminuir as respostas de medo contextuais

condicionadas (HAUBRICH et al., 2015). Na mesma linha, Troyner e Bertoglio (2020; 2021) mostraram que o antagonismo de GluN2B-NMDA, mas não de GluN2A-NMDA, no núcleo reuniens do tálamo também previne o efeito da ANI e da clonidina na reconsolidação da memória. Em conjunto, os resultados sugerem que existe um consenso quanto a participação do GluN2B-NMDA, e que o seu antagonismo, independente da região cerebral, prejudica a labilização da memória, e aqui trazendo mais evidências para o seu papel no HD. Quanto ao GluN2A, também parece haver um consenso de que, dependendo da dose utilizada, o antagonismo desses receptores, prejudica a reconsolidação ou não altera a labilização da memória.

Da mesma forma, quando GluN2B-NMDA, mas não GluN2A-NMDA, do HD foi antagonizado em ratos pré-tratados com THC 0,002, o efeito do THC 0,002 na reconsolidação da memória de medo foi prevenido, sugerindo que o antagonismo de receptores GluN2B-NMDA do HD é suficiente para prevenir os efeitos da administração sistêmica do THC 0,002. Sendo assim, os mesmos mecanismos que previnem o efeito da inibição da síntese proteica aqui demonstrados também previnem o efeito do THC 0,002 na reconsolidação da memória.

Quanto aos animais pré-tratados com THC 0,3, observou-se que apenas o grupo tratado com THC 0,3-IFE-ANI apresentou menor tempo de congelamento durante o Teste A1 em comparação aos controles, sugerindo que o antagonismo de GluN2B-NMDA, mas não de GluN2A-NMDA, no HD previne o efeito do THC 0,3 na labilização e restaura o efeito da ANI na reconsolidação da memória. Embora o antagonismo do GluN2B-NMDA nesse resultado pareça induzir o efeito oposto do observado anteriormente nos animais pré-tratados com VEI, como o próprio THC impede a labilização da memória, a administração do antagonista aqui contrapõe o efeito anterior, tornando a memória suscetível às modificações. Embora não se saiba exatamente como essas duas intervenções - o THC 0,3 e o antagonismo de GluN2B-NMDA - que sozinhas vão na mesma direção, quando administradas juntas, tem seus efeitos na labilização anulados, é possível supor que o antagonismo de GluN2B-NMDA após o pré-tratamento com THC 0,3 pode prevenir as alterações na razão GluN2A/GluN2B no HD que estariam relacionadas com a resistência a labilização, portanto mantendo a memória suscetível às interferências na reconsolidação. Em relação ao efeito do antagonismo GluN2B-NMDA parecer ir na direção oposta, algo semelhante foi observado em outro modelo e outro tipo de memória. Em animais que

passaram por um treino de extinção na esQUIVA inibitória, a administração de rapamicina (inibidor da mTOR) previamente à evocação da memória de extinção induziu o retorno do medo, sendo esse efeito prevenido pelo antagonismo de receptores GluN2B-NMDA no HD (RADISKE et al., 2021), sugerindo que a participação desses receptores de fato possa estar envolvida também no fortalecimento da memória de medo, e nesse caso seu antagonismo favoreceria a diminuição da resposta de medo.

A resistência à labilização é comumente associada à generalização da memória de medo (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2015). Aqui, os animais VEI-IFE-ANI apresentaram um aumento significativo no comportamento de congelamento quando comparados aos controles durante o Teste B1, sendo esse efeito acompanhado de uma redução no ID1, sugerindo que os receptores GluN2B-NMDA do HD possam estar envolvidos na generalização da memória e a consequente diminuição na discriminação contextual. Esse resultado se assemelha ao que é observado quando o GluN2B-NMDA foi previamente antagonizado no PL, em um protocolo do tipo *delay fear conditioning* (quanto há um período de tempo entre a apresentação sonora e o choque, e requer a participação do hipocampo), ocorre o aumento da expressão do medo não apenas ao som, mas também ao contexto, o que pode ser caracterizado como uma generalização da resposta de medo (GILMARTIN; KWAPIS; HELMSTETTER, 2013). Ainda, em animais pré-tratados com THC 0,3, um efeito oposto foi observado. O grupo THC 0,3-IFE-ANI mostrou uma redução na porcentagem de tempo de congelamento em comparação com o grupo THC 0,3-VEI-ANI no Teste B1, sugerindo que o antagonismo GluN2B-NMDA não apenas restaura o efeito da ANI em prejudicar a reconsolidação da memória, mas também garante a especificidade da memória. É importante pontuar que o aumento na generalização da memória de medo observado no grupo THC 0,3-VEH-ANI não foi impedido pela administração de β lac. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos no Teste B1 ou no Teste B2 no primeiro experimento, mudanças na porcentagem de tempo de congelamento dos grupos controle (sendo um pouco maior no primeiro experimento do que nos demais) podem ter contribuído para essa discrepância. Algo que pode ter influenciado essa diferença entre experimentos é que no primeiro em comparação aos demais não há uma infusão intra-HD antes da evocação da memória, apenas após. Essa infusão prévia nos experimentos seguintes

pode ter induzindo um estresse nos animais, levando a uma resposta de medo diferente do primeiro experimento quando os animais foram posteriormente expostos ao Contexto B. Esses resultados concordam com trabalhos que mostram que GluN2B-NMDA tem sido associado à generalização da memória de medo (Asim et al., 2020; 2022). Nesses trabalhos foi visto que, após um treino de alta intensidade, os ratos apresentaram generalização da memória de medo ao som, sendo esse fenômeno associado a um aumento na expressão de GluN2B no IL e no núcleo accumbens (ASIM et al., 2020; 2022). Ainda, foi observado que a administração de cetamina reverte tanto os efeitos na generalização, quanto na expressão do GluN2B (ASIM et al., 2020; 2022). Um aumento na generalização da memória de medo da esquiva inibitória também foi observado com a administração de estradiol em ratas ovariectomizadas, e esse efeito foi prevenido pelo antagonismo do receptor GluN2B no HD e no ACC (ADKINS et al., 2019).

Aqui, um aumento na generalização da memória de medo foi observado apenas quando os grupos tratados com THC 0,3 receberam ANI no HD. Alguns estudos sugerem um aumento na liberação de monoaminas após a infusão de ANI na BLA e no HD (CANAL; CHANG; GOLD, 2007; QI; GOLD, 2009), e o aumento noradrenérgico também está relacionado à generalização do medo (GAZARINI et al., 2013; 2015). A falta de generalização da memória de medo em animais tratados apenas com THC 0,3 pode estar relacionada à falta de alteração na expressão de GluN2B no HD, sendo possível que a administração de ANI altere esse efeito, aumentando a expressão do GluN2B, embora isso ainda precise ser testado. De qualquer forma, a redução da razão GluN2A/GluN2B induzida pelo THC 0,3, alterando o equilíbrio para o GluN2B, pode contribuir para a resistência à labilização. Ainda, é importante pontuar que por mais que exista essa relação entre resistência a labilização e generalização, como esse aumento na resposta de medo no Contexto B se dá apenas com a administração da ANI, não se pode excluir que nesse caso há uma mudança na memória em relação aos animais que recebem apenas o THC 0,3. Assim, é possível que se tenha uma interpretação alternativa desses resultados, pois o THC 0,3 de fato impede o efeito da ANI na reconsolidação, sendo interpretado como um prejuízo na labilização da memória. No entanto a mudança observada no Teste B1 pode sugerir que não seja exatamente um prejuízo na labilização, mas uma alteração na memória no sentido de aumentar a sua suscetibilidade ao fortalecimento e as respostas generalizadas,

embora outras investigações ainda precisam ser feitas para compreender melhor o que de fato acontece com a memória de medo com essa dose de THC. Uma alternativa seria fazer a administração prévia de D-cicloserina, já que esse fármaco facilita a labilização, e observar se seria capaz de prevenir o efeito do THC 0,3 na memória.

O pré-tratamento com antagonistas GluN2A-NMDA ou GluN2B-NMDA no HD reduziu o tempo de congelamento durante a evocação. Um efeito semelhante foi observado quando um estereoisômero do PEAQX, NVP-AAM077, foi administrado na BLA antes do sobressalto potencializado pelo medo em uma dose maior, não equivalente à usada aqui (WALKER; DAVIS, 2008). Outro estudo também mostrou que a administração sistêmica de outro antagonista GluN2B-NMDA, Ro25-698, em uma dose alta, mas não em uma dose baixa, antes da evocação de uma memória de medo contextual, prejudica a expressão da memória, e esses efeitos não estão relacionados a alterações na locomoção dos animais (MIKICS et al., 2017). Aqui, na ausência de um agente amnésico (ANI ou THC 0,002), os animais apresentaram tempo de congelamento semelhante aos controles durante o Teste A1, sugerindo que o antagonismo dos receptores GluN2A-NMDA antes da evocação prejudica exclusivamente a expressão da memória de medo durante a sessão, enquanto o antagonismo dos receptores GluN2B-NMDA antes da evocação prejudica tanto a expressão quanto a labilização da memória de medo. Resultados semelhantes foram observados administrando um antagonista do receptor AMPA a caranguejos ou ratos antes da evocação da memória, sugerindo que a expressão da memória e a labilização/reconsolidação são processos independentes (BARREIRO et al., 2013; MILTON et al., 2013).

Além das subunidades específicas dos receptores NMDA, o UPS é amplamente descrito como necessário para a labilização da memória (LEE et al., 2008; LEE, 2008; SOL FUSTIÑANA et al., 2014). Além disso, é descrito que as cadeias C-terminais das subunidades GluN2B estão ligadas a CaMKII, uma proteína quinase capaz de ativar o UPS (BARRIA; MALINOW, 2005; BINGOL et al., 2010). A inibição do UPS no HD de animais pré-tratados com VEI previne o efeito da ANI no Teste A1, como visto com o antagonismo GluN2B-NMDA, sugerindo a abolição do efeito da ANI na reconsolidação. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores relatando o recrutamento do UPS, inclusive do HD, para labilização da memória (LEE et al., 2008;

LEE, 2008; SOL FUSTIÑANA et al., 2014). Da mesma forma, o efeito do THC 0,002 no Teste A1 também é prevenido pela inibição do UPS, sugerindo mais uma vez que o efeito do THC na reconsolidação, depende dos mecanismos classicamente descritos para a labilização da memória. No entanto, em animais pré-tratados com THC 0,3, a inibição do UPS não é capaz de modificar seu efeito. Levando em consideração que o UPS pode ser recrutado ativando outros receptores, como o muscarínico M1, por exemplo (STIVER et al., 2017), nossos resultados sugerem, até o momento, que o efeito do THC 0,3 na labilização é revertido exclusivamente quando receptores GluN2B-NMDA são antagonizados, sendo a inibição do UPS não suficiente para reverter esse efeito, possivelmente devido à sinalização de outras vias.

A administração do inibidor do UPS no HD previamente a evocação da memória também reduziu a expressão da memória de medo durante a evocação. Esse efeito não foi observado em outro trabalho que fez a mesma administração anteriormente a evocação da memória (SOL FUSTIÑANA et al., 2014). No entanto, curiosamente, há evidências que mostram que a inibição da síntese proteica na BLA previamente a evocação da memória de medo ao som, também previne a expressão da memória (LOPEZ et al., 2015). Além disso, há estudos que mostram a participação do UPS também na etapa de aquisição da memória de medo (DEVULAPALLI et al., 2019). Assim, é possível que exista um balanço entre os processos de degradação e síntese proteica durante as etapas de formação e manutenção da memória, o que incluiria também a importância do UPS para a expressão da memória de medo.

Juntos, os achados do presente trabalho sugerem que a estimulação de receptores CB1 ou CB2 por uma dose convencional de THC possivelmente interage com os receptores NMDA do HD prejudicando a labilização da memória. Nessa região, os receptores CB1 são expressos principalmente pré-sinápticamente em interneurônios GABAérgicos, mas também em neurônios piramidais e astrócitos em menor quantidade (CASTILLO et al., 2012). Devido a isso, é observado que enquanto baixas doses de THC podem diminuir a liberação de glutamato, altas doses podem suprimir a liberação de GABA, resultando em um aumento do tônus excitatório (KATONA; FREUND, 2012). Além disso, a ativação de receptores CB1 em astrócitos da CA1 do HD desencadeia a liberação de glutamato, devido ao acoplamento não-convencional do CB1 a uma proteína $G_{q/11}$ (NAVARRETE; ARAQUE, 2008). Assim, a ativação de CB1 induzida pelo THC pode aumentar o tônus excitatório induzindo um

rearranjo da expressão de GluN2B-NMDA e GluN2A-NMDA. Uma vez que os receptores GluN2A-NMDA possuem propriedades de desativação e dessensibilização mais rápidas, além de maior probabilidade de abertura do canal (NIU et al., 2022), sua expressão diminuída pode ser um mecanismo compensatório ao aumento da liberação de glutamato, conseqüentemente levando a uma memória de medo mais intensa, resistente à labilização.

Além disso, já foi observado que os receptores GluN2A-NMDA são importantes para as interações entre neurônios e células da glia no HD e no CPFm (CARDIS et al., 2018; EYO et al., 2018), a ausência de GluN2A-NMDA aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo e também à ativação da microglia (EYO et al., 2018). Um aumento da atividade microglial associado à inflamação crônica também foi relacionado com a diminuição de GluN2A e com o aumento do GluN2B. Embora aqui não seja o caso de uma inflamação crônica, sabe-se que o THC em doses elevadas é capaz de induzir a ativação microglial (CUTANDO et al., 2013). Ainda, receptores CB2 microgliais do DH estão implicados na aquisição da memória de medo contextual (LI; KIM, 2017). Assim é possível que a resistência à labilização e a suscetibilidade a generalização induzidas pelo THC 0,3 possam se dar também por um aumento da ativação de micróglia, induzidos pela diminuição de GluN2A no HD, ou então que a ativação de receptores CB2 microgliais seria capaz de modular a expressão de GluN2A.

A figura 26 representa hipoteticamente os efeitos do THC na transmissão do HD.

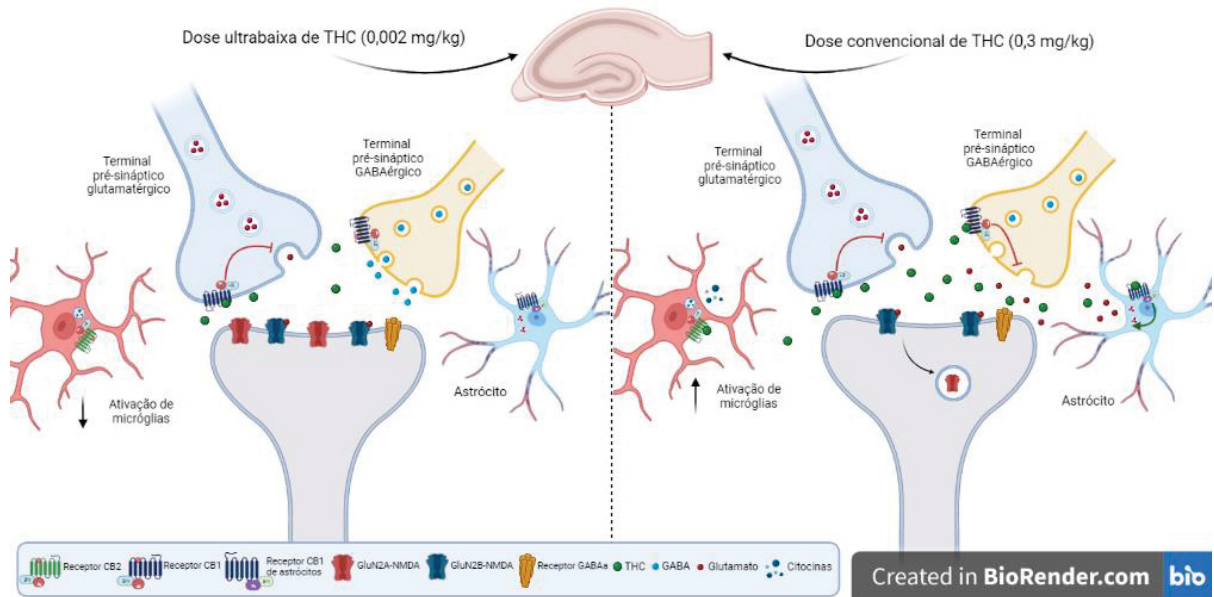


Figura 26. Representação hipotética dos efeitos do THC na transmissão do HD. A esquerda representa os efeitos decorrentes da administração da dose ultra-baixa de THC (0,002 mg/kg), em que a ativação de receptores CB1 presentes em terminais glutamatergicos, diminui a liberação de glutamato, e possivelmente a ativação de micróglias e isso levaria ao prejuízo na reconsolidação da memória de medo. A direita representa os efeitos decorrentes da administração da dose convencional de THC (0,3 mg/kg), em que a ativação de receptores CB1 presentes em terminais GABAérgicos, e de astrócitos, diminui a inibição e aumenta a liberação de glutamato, e possivelmente a ativação de micróglias e isso levaria ao prejuízo na labilização da memória.

Em resumo, o efeito de uma dose convencional de THC em prejudicar a labilização da memória envolve o receptor GluN2B-NMDA no HD, possivelmente como consequência do papel da generalização da memória de medo. Enquanto uma dose ultra-baixa de THC não afeta a labilização e prejudica a reconsolidação por meio de receptores CB1; além disso, esses efeitos dependem também dos mecanismos que sustentam a labilização da memória de medo: GluN2B-NMDA e UPS. Por fim, os resultados sugerem que um ajuste fino da razão GluN2A/GluN2B está subjacente aos efeitos do THC na labilização/reconsolidação e generalização da memória do medo.

As tabelas 3 e 4 resumizam os resultados obtidos nos experimentos comportamentais e moleculares, respectivamente.

Tabela 3. Síntese dos principais resultados obtidos nos experimentos comportamentais

Pré-tratamento	Tratamento	Desfecho	Dependente de GluN2B	Dependente de GluN2A	Dependente do UPS
VEI	ANI	Prejudica a reconsolidação	Sim	Não	Sim
THC 0,002	VEI ou ANI	Prejudica a reconsolidação	Sim	Não	Sim
THC 0,3	ANI	Prejudica a labilização e aumenta a generalização	Sim	Não	Não

Tabela 4. Síntese dos principais resultados obtidos nas análises moleculares

VEI	Sem mudanças em relação ao <i>naive</i>	Sem mudanças em relação ao <i>naive</i>	Sem mudanças em relação ao <i>naive</i>
THC 0,002	Sem mudanças em relação ao VEI	Sem mudanças em relação ao VEI	Sem mudanças em relação ao VEI
THC 0,3	Diminui a expressão de GluN2A e razão GluN2A/GluN2B em relação ao VEI após o Teste A1	Diminui a expressão de GluN2B em relação ao VEI após o Teste A1	Sem mudanças em relação ao VEI

6.4 Considerações finais

Levando em consideração os trabalhos que apontam tanto os benefícios (BETTHAUSER; PILZ; VOLLMER, 2015; BONN-MILLER et al., 2007; BREMNER et al., 1996), como os que apontam uma piora (BONN-MILLER et al., 2014; WILKINSON; STEFANOVICS; ROSENHECK, 2015) relacionada ao uso da *Cannabis* em pacientes com TEPT, o efeito de doses altas de THC (maiores do que 1 mg/kg) na memória de medo estudos pré-clínicos já era conhecido e de fato, tanto prejudicam a extinção da memória, como aumentam as respostas de ansiedade. A novidade aqui é que uma dose convencional de THC, mesmo que baixa, é capaz de levar ao prejuízo de labilização, tornando a memória de medo insensível ao efeito de fármacos amnésicos. Assim fazendo uma extrapolação, é possível que até mesmo as concentrações baixas

de THC contidas em algumas preparações, possam trazer prejuízo no tratamento sozinho ou associado a outros fármacos.

Em relação a isso não se deve deixar de levar em conta que em extratos totais ou em óleos ricos em CBD, mas que contém uma porcentagem de THC, o mecanismo acaba sendo mais complexo, já que estes compostos interagem entre si e, muitas vezes, dependendo da concentração, o CBD e outros canabinoides são capazes de contrapor os efeitos do THC, como observado em comportamentos de ansiedade (SALVIATO et al., 2021; RAYMUNDI et al., 2020b). Já foi observado que uma dose baixa e ineficaz de CBD (1 mg/kg) em associação a uma dose alta de THC que induziu um efeito tipo-ansiolítico em ratas no LCE, na proporção de 1:1 foi capaz de prevenir esse efeito tipo-ansiolítico do THC. Ainda, a associação da mesma dose ineficaz de CBD com uma dose baixa de THC (0,075 mg/kg) que induziu efeitos tipo-ansiolíticos em ratas no LCE, foi capaz de potencializar esse efeito (SALVIATO et al., 2021). Assim, embora os efeitos benéficos das doses ultrabaixas sejam promissores, ainda é necessário entender quais doses seriam equivalentes para transpor esses achados para o uso em humanos com segurança. Ainda, seria interessante verificar qual seria o efeito das doses utilizadas nesse trabalho em associação com o CBD, já que o uso de doses ineficazes de THC e CBD combinadas é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória de medo (STERN et al., 2015). Embora não haja relatos pré-clínicos sobre o uso da dose de 0,002 mg/kg em associação com CBD, nem em outros tipos de memória, é possível que essa associação seja benéfica, já essa dose seria equivalente a concentração de THC que é possível de se encontrar em alguns óleos ricos em CBD (menor que 0,2%) e que é considerada segura. Essa associação poderia levar à diminuição das doses de CBD, que em humanos são extremamente altas - geralmente cerca de 300 a 600 mg de CBD puro - o que muitas vezes encarece o tratamento para o paciente, e aumentar o perfil de segurança.

7. Conclusões

O THC nas doses utilizadas exerce efeitos duais na labilização e na reconsolidação da memória de medo contextual. A dose convencional (0,3 mg/kg) prejudica a labilização, impedindo o efeito da inibição da síntese proteica no HD, e aumentando a generalização da memória em um contexto neutro. Por outro lado, a

dose ultrabaixa (0,002 mg/kg) prejudica a reconsolidação da memória de medo. Ambos efeitos dependem da ativação de receptores GluN2B-NMDA do HD, mas apenas o efeito do THC 0,002 na reconsolidação é prevenido também pela inibição do UPS. Por fim, os efeitos da dose convencional de THC parecem depender de uma diminuição na expressão de GluN2A no HD e de GluN2B na AMG, sugerindo ainda que esses receptores possam estar envolvidos diferentemente na labilização e generalização da memória dependendo da região cerebral.

Os resultados aqui obtidos sugerem que doses ultrabaixas de THC possam ser benéficas para o tratamento do TEPT por interferências na reconsolidação, mas que se deve ter cautela com o seu uso até mesmo em doses baixas convencionais.

REFERÊNCIAS

- ABIZAID, A., MERALI, Z., ANISMAN, H. **Cannabis: A potential efficacious intervention for PTSD or simply snake oil?**. *Journal of psychiatry & neuroscience*. 2019, 44(2), 75–78.
- ABOUFATIMA, R., CHAIT, A., DALAL, A., DE BEAUREPAIRE, R. **Calcitonin microinjection into the periaqueductal gray impairs contextual fear conditioning in the rat**. *Neuroscience letters*. 1999, 275(2), 101–104.
- ACUTAIN, M. F., GRIEBLER LUFT, J., VAZQUEZ, C. A., POPIK, B., CERCATO, M. C., EPSTEIN, A., SALVETTI, A., JERUSALINSKY, D. A., DE OLIVEIRA ALVARES, L., BAEZ, M. V. **Reduced Expression of Hippocampal GluN2A-NMDAR Increases Seizure Susceptibility and Causes Deficits in Contextual Memory**. *Frontiers in neuroscience*. 2021, 15, 644100.
- ADKINS, J. M., LYNCH, J. F., 3RD, HAGERDORN, P., ESTERHUIZEN, M., JASNOW, A. M. **Anterior cingulate cortex and dorsal hippocampal glutamate receptors mediate generalized fear in female rats**. *Psychoneuroendocrinology*. 2019, 107, 109–118.
- ALBERINI, C. M. **The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage**. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2011, 5,12.
- ALBERINI, C. M., LEDOUX, J. E. **Memory reconsolidation**. *Curr Biol*. 2013, 23: R746-50.
- American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5ª edição, 2013
- AN, D., PEIGNEUR, S., HENDRICKX, L. A., TYTGAT, J. **Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products**. *International journal of molecular sciences*. 2020, 21(14), 5064.
- ASHTON, J. C., SMITH, P. F., DARLINGTON, C. L. **The effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on the extinction of an adverse associative memory**. *Pharmacology*. 2008, 81(1), 18–20.
- ASIM, M., HAO, B., WARIS, A., LIANG, Y. M., WANG, X. G. **Ketamine attenuates the PTSD-like effect via regulation of glutamatergic signaling in the nucleus accumbens of mice**. *Molecular and cellular neurosciences*. 2022, 120, 103723.
- ASIM, M., HAO, B., YANG, Y. H., FAN, B. F., XUE, L., SHI, Y. W., WANG, X. G., ZHAO, H. **Ketamine Alleviates Fear Generalization Through GluN2B-BDNF Signaling in Mice**. *Neuroscience bulletin*. 2020. 36(2), 153–164.
- ASSAF, F., FISHBEIN, M., GAFNI, M., KEREN, O., SARNE, Y. **Pre- and post-conditioning treatment with an ultra-low dose of Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) protects against pentylentetrazole (PTZ)-induced cognitive damage**. *Behavioural brain research*. 2011, 220(1), 194–201.
- BAILEY, C. R., CORDELL, E., SOBIN, S. M., NEUMEISTER, A. **Recent progress in understanding the pathophysiology of post-traumatic stress disorder: implications for targeted pharmacological treatment**. *CNS drugs*. 2013, 27(3), 221–232.

- BARREIRO, K. A., SUÁREZ, L. D., LYNCH, V. M., MOLINA, V. A., DELORENZI, A. **Memory expression is independent of memory labilization/reconsolidation.** *Neurobiology of learning and memory.* 2013, 106, 283–291.
- BARRIA, A., MALINOW, R. **NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII.** *Neuron.* 2005, 48(2), 289–301.
- BAYER, H., STERN, C., TROYNER, F., GAZARINI, L., GUIMARÃES, F. S., BERTOGLIO, L. J. **Medial prefrontal cortex mechanisms of cannabidiol-induced aversive memory reconsolidation impairments.** *Neuropharmacology.* 2022, 205, 108913.
- BELLONE, C., NICOLL, R. A. **Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors.** *Neuron.* 2007, 55(5), 779–785.
- BEN MAMOU, C., GAMACHE, K., NADER, K. **NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories.** *Nature neuroscience.* 2006, 9(10), 1237–1239.
- BENETTI, F., FURINI, C. R., DE CARVALHO MYSKIW, J., PROVENSÍ, G., PASSANI, M. B., BALDI, E., BUCHERELLI, C., MUNARI, L., IZQUIERDO, I., BLANDINA, P. **Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015, 112(19), E2536-E2542.
- BERGER, W., MENDLOWICZ, M. V., MARQUES-PORTELLA, C., KINRYS, G., FONTENELLE, L. F., MARMAR, C. R., FIGUEIRA, I. **Pharmacologic alternatives to antidepressants in posttraumatic stress disorder: a systematic review.** *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry.* 2009, 33(2), 169-180.
- BESNARD, A., CABOCHE, J., LAROCHE, S. **Reconsolidation of memory: a decade of debate.** *Progress in neurobiology.* 2012, 99(1), 61–80.
- BETTHAUSER, K., PILZ, J., VOLLMER, L. E. **Use and effects of cannabinoids in military veterans with posttraumatic stress disorder.** *American journal of health-system pharmacy.* 2015, 72(15), 1279-1284.
- BINGOL, B., WANG, C. F., ARNOTT, D., CHENG, D., PENG, J., SHENG, M. **Autophosphorylated CaMKII α acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines.** *Cell.* 2010, 140(4), 567–578.
- BITENCOURT, R. M., TAKAHASHI, R. N. **Cannabidiol as a Therapeutic Alternative for Post-traumatic Stress Disorder: From Bench Research to Confirmation in Human Trials.** *Frontiers in neuroscience.* 2018, 12, 502.
- BLANCHARD, R. J., BLANCHARD, D. C., GRIEBEL, G., NUTT, D. **Introduction to the handbook on fear and anxiety.** In: *Handbook of anxiety and fear.* Elsevier. 2008, 17: 3-7.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. **Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli.** *Journal of comparative and physiological psychology.* 1969, 68(1), 129-135.
- BLISS, T. V., COLLINGRIDGE, G. L. **A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.** *Nature.* 1993, 361(6407):31-39.

- BLISS, T. V., LØMO, T. **Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.** *The Journal of physiology.* 1973, 232(2):331-356.
- BOLSONI, L. M., CRIPPA, J., HALLAK, J., GUIMARÃES, F. S., ZUARDI, A. W. **Effects of cannabidiol on symptoms induced by the recall of traumatic events in patients with posttraumatic stress disorder.** *Psychopharmacology.* 2022, 239(5), 1499–1507.
- BOLSONI, L. M., CRIPPA, J., HALLAK, J., GUIMARÃES, F. S., ZUARDI, A. W. **Effects of cannabidiol on symptoms induced by the recall of traumatic events in patients with posttraumatic stress disorder.** *Psychopharmacology.* 2022, 239(5), 1499–1507.
- BONN-MILLER, M. O., BODEN, M. T., BUCOSSI, M. M., BABSON, K. A. **Self-reported cannabis use characteristics, patterns and helpfulness among medical cannabis users.** *The American journal of drug and alcohol abuse.* 2014, 40(1), 23–30.
- BONN-MILLER, M. O., VUJANOVIC, A. A., FELDNER, M. T., BERNSTEIN, A., ZVOLENSKY, M. J. **Posttraumatic stress symptom severity predicts marijuana use coping motives among traumatic event-exposed marijuana users.** *Journal of traumatic stress.* 2007, 20(4), 577-586.
- BOSIER, B., MUCCIOLI, G. G., HERMANS, E., LAMBERT, D. M. **Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities.** *Biochemical pharmacology.* 2010, 80(1), 1–12.
- BOUTON, M. E., MOODY, E. W. **Memory processes in classical conditioning.** *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2004, 28(7), 663-674.
- BRAIDA, D., LIMONTA, V., MALABARBA, L., ZANI, A., SALA, M. **5-HT_{1A} receptors are involved in the anxiolytic effect of Delta9-tetrahydrocannabinol and AM 404, the anandamide transport inhibitor, in Sprague-Dawley rats.** *European journal of pharmacology.* 2007, 555(2-3), 156–163.
- BREMNER, J. D., SOUTHWICK, S. M., DARNELL, A., CHARNEY, D. S. **Chronic PTSD in Vietnam combat veterans: course of illness and substance abuse.** *The American journal of psychiatry.* 1996, 153(3), 369–375.
- BREWIN C. R. **Memory and Forgetting.** *Current psychiatry reports.* 2018, 20(10), 87.
- BREWIN, C. R. **Episodic memory, perceptual memory, and their interaction: foundations for a theory of posttraumatic stress disorder.** *Psychological bulletin.* 2014, 140(1), 69–97.
- BRUNET, A., ORR, S. P., TREMBLAY, J., ROBERTSON, K., NADER, K., PITMAN, R. K. **Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder.** *Journal of psychiatric research.* 2008, 42(6), 503–506.
- BRUNET, A., SAUMIER, D., LIU, A., STREINER, D. L., TREMBLAY, J., PITMAN, R. K. **Reduction of PTSD Symptoms With Pre-Reactivation Propranolol Therapy: A Randomized Controlled Trial.** *The American journal of psychiatry.* 2018, 175(5), 427–433.

- BRUSCO, A., TAGLIAFERRO, P., SAEZ, T., ONAIVI, E. S. **Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus.** *Synapse*. 2008, 62(12), 944–949.
- BUSTOS, S. G., GIACHERO, M., MALDONADO, H., MOLINA, V. A. **Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration.** *Neuropsychopharmacology*. 2010, 35(5), 1097–1108.
- BUSTOS, S. G., MALDONADO, H., MOLINA, V. A. **Midazolam disrupts fear memory reconsolidation.** *Neuroscience*. 2006, 139(3):831-842.
- CALABRESE, E. J., RUBIO-CASILLAS, A. **Biphasic effects of THC in memory and cognition.** *European journal of clinical investigation*. 2018, 48(5), e12920.
- CAMERON, C., WATSON, D., ROBINSON, J. **Use of a synthetic cannabinoid in a correctional population for posttraumatic stress disorder-related insomnia and nightmares, chronic pain, harm reduction, and other indications: a retrospective evaluation.** *Journal of clinical psychopharmacology*. 2014, 34(5), 559–564.
- CAMP, R. M., JOHNSON, J. D. **Repeated stressor exposure enhances contextual fear memory in a beta-adrenergic receptor-dependent process and increases impulsivity in a non-beta receptor-dependent fashion.** *Physiology & behavior*. 2015, 150, 64-68.
- CANAL, C. E., CHANG, Q., GOLD, P. E. **Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104(30), 12500–12505.
- CARDIS, R., CABUNGAL, J. H., DWIR, D., DO, K. Q., STEULLET, P. **A lack of GluN2A-containing NMDA receptors confers a vulnerability to redox dysregulation: Consequences on parvalbumin interneurons, and their perineuronal nets.** *Neurobiology of disease*. 2018, 109(Pt A), 64–75.
- CAREAGA, M., GIRARDI, C., SUCHECKI, D. **Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation.** *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2016, 71, 48-57.
- CAROBREZ, A. P., BERTOGLIO, L. J. **Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on.** *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2005, 29(8), 1193–1205.
- CARRIVE, P., LEUNG, P., HARRIS, J., PAXINOS, G. **Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray.** *Neuroscience*. 1997, 78(1), 165–177.
- CARROLL, C. B., ZEISSLER, M. L., HANEMANN, C. O., ZAJICEK, J. P. **Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) exerts a direct neuroprotective effect in a human cell culture model of Parkinson's disease.** *Neuropathology and applied neurobiology*. 2012, 38(6), 535–547.
- CASCELLA, M., AL KHALILI, Y. **Short Term Memory Impairment.** In *StatPearls*. StatPearls Publishing. 2022

- CASSINI, L. F., FLAVELL, C. R., AMARAL, O. B., LEE, J. **On the transition from reconsolidation to extinction of contextual fear memories.** *Learning & memory*, 2017, 24(9), 392–399.
- CASTILLO, P. E., YOUNTS, T. J., CHÁVEZ, A. E., HASHIMOTODANI, Y. **Endocannabinoid signaling and synaptic function.** *Neuron*. 2012, 76(1), 70–81.
- CHAWLA, M. K., GUZOWSKI, J. F., RAMIREZ-AMAYA, V., LIPA, P., HOFFMAN, K. L., MARRIOTT, L. K., WORLEY, P. F., MCNAUGHTON, B. L., BARNES, C. A. **Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience.** *Hippocampus*. 2005, 15(5), 579-586.
- CHEN, R., ZHANG, J., FAN, N., TENG, Z. Q., WU, Y., YANG, H., TANG, Y. P., SUN, H., SONG, Y., CHEN, C. **Δ9-THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling.** *Cell*. 2013, 155(5), 1154–1165
- CIECHANOVER A. **Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting.** *Cell death and differentiation*. 2005, 12(9), 1178–1190.
- COGAN, E. S., SHAPSES, M. A., ROBINSON, T. E., TRONSON, N. C. **Disrupting reconsolidation: memory erasure or blunting of emotional/motivational value?.** *Neuropsychopharmacology*. 2019, 44(2), 399–407.
- COMAS MUTIS, R., ESPEJO, P. J., MARTIJENA, I. D., MOLINA, V. A., CALFA, G. D. **Temporal dynamic of the hippocampal structural plasticity associated with the fear memory destabilization/reconsolidation process.** *Hippocampus*. 2021, 31(10), 1080–1091.
- CREAMER, M., BURGESS, P., MCFARLANE, A. C. **Post-traumatic stress disorder: findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well-being.** *Psychological medicine*. 2001, 31(7), 1237-1247.
- CRESTANI, A. P., ZACOUTEGUY BOOS, F., HAUBRICH, J., ORDOÑEZ SIERRA, R., SANTANA, F., MOLINA, J. M., CASSINI, L., ALVARES, L., QUILLFELDT, J. A. **Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation.** *Scientific reports*. 2015, 5, 13633.
- CUTANDO, L., BUSQUETS-GARCIA, A., PUIGHERMANAL, E., GOMIS-GONZÁLEZ, M., DELGADO-GARCÍA, J. M., GRUART, A., MALDONADO, R., OZAITA, A. **Microglial activation underlies cerebellar deficits produced by repeated cannabis exposure.** *The Journal of clinical investigation*. 2013, 123(7), 2816–2831.
- DA SILVA, W. C., CARDOSO, G., BONINI, J. S., BENETTI, F., IZQUIERDO, I. **Memory reconsolidation and its maintenance depend on L-voltage-dependent calcium channels and CaMKII functions regulating protein turnover in the hippocampus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(16), 6566–6570.
- DANELUZ, D. M., SOHN, J., SILVEIRA, G. O., YONAMINE, M., STERN, C. A. **Evidence on the impairing effects of Ayahuasca on fear memory reconsolidation.** *Psychopharmacology*. 2022, 239(10), 3325-3336.

- DE OLIVEIRA ALVARES, L., PASQUALINI GENRO, B., DIEHL, F., MOLINA, V. A., QUILLFELDT, J. A. **Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction.** *Neuroscience*. 2008, 154(4), 1648–1655.
- DE OLMOS, J. S., BELTRAMINO, C. A., ALHEID, G. **Amygdala and extended amygdala of the rat: A Cytoarchitectonical, Fibroarchitectonical, and Chemoarchitectonical survey.** In G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (pp. 509–603). Academic Press. 2004
- DE SOLIS, C. A., GONZALEZ, C. U., GALDAMEZ, M. A., PERISH, J. M., WOODARD, S. W., SALINAS, C. E., MILLER, J. N., ELAHI, H., PINEDA, O. H., OAD, S., GATICA DE LAS FUENTES, S., OWEN, M. S., SANDOVAL, A., HOLEHONNUR, R., PLOSKI, J. E. **Increasing Synaptic GluN2B levels within the Basal and Lateral Amygdala Enables the Modification of Strong Reconsolidation Resistant Fear Memories.** *BioRxiv*. 2019, 537142.
- DESPREZ, T. **Role(s) of mitochondrial type-1 cannabinoid receptor in the brain.** Semantic Scholar, 2015.
- DEVANE, W. A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R. G., STEVENSON, L. A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A., MECHOULAM, R. **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** *Science*. 1992, 258(5090):1946-9
- DEVULAPALLI, R. K., NELSEN, J. L., ORSI, S. A., MCFADDEN, T., NAVABPOUR, S., JONES, N., MARTIN, K., O'DONNELL, M., MCCOIG, E. L., JAROME, T. J. **Males and Females Differ in the Subcellular and Brain Region Dependent Regulation of Proteasome Activity by CaMKII and Protein Kinase A.** *Neuroscience*. 2019, 418, 1–14.
- DIAMOND, D. M., ZOLADZ, P. R. **Dysfunctional or hyperfunctional? The amygdala in posttraumatic stress disorder is the bull in the evolutionary China shop.** *Journal of neuroscience research*. 2016, 94(6), 437–444.
- DONG, Y., LI, S., LU, Y., LI, X., LIAO, Y., PENG, Z., LI, Y., HOU, L., YUAN, Z., CHENG, J. **Stress-induced NLRP3 inflammasome activation negatively regulates fear memory in mice.** *Journal of neuroinflammation*. 2020, 17(1), 205.
- DONZIS, E. J., RENNAKER, R. L., THOMPSON, L. T. (2013). **Fear conditioning alters neuron-specific hippocampal place field stability via the basolateral amygdala.** *Brain research*. 2013, 1525, 16–25.
- DOS SANTOS CORRÊA, M., VAZ, B., MENEZES, B. S., FERREIRA, T. L., TIBA, P. A., FORNARI, R. V. **Corticosterone differentially modulates time-dependent fear generalization following mild or moderate fear conditioning training in rats.** *Neurobiology of learning and memory*. 2021, 184, 107487.
- DUCHAINÉ, C. S., AUBÉ, K., GILBERT-OUIMET, M., VÉZINA, M., NDJABOUÉ, R., MASSAMBA, V., TALBOT, D., LAVIGNE-ROBICHAUD, M., TRUDEL, X., PENAGRALLE, A. B., LESAGE, A., MOORE, L., MILOT, A., LAURIN, D., BRISSON, C. **Psychosocial Stressors at Work and the Risk of Sickness Absence Due to a Diagnosed Mental Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis.** *JAMA psychiatry*. 2020, 77(8), 842-851.

- DUDAI, Y. **Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond.** Oxford University Press. 2002
- DUDAI, Y. **The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. Annual review of psychology.** 2004, 55, 51–86.
- DUNCAN C. P. **The retroactive effect of electroshock on learning. Journal of comparative and physiological psychology.** 1949, 42(1), 32–44.
- EHLERS M. D. **Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system.** Nature neuroscience. 2003, 6(3), 231–242.
- EHLERS, A., HACKMANN, A., MICHAEL, T. **Intrusive re-experiencing in post-traumatic stress disorder: phenomenology, theory, and therapy.** Memory. 2004, 12:403-415.
- EINARSSON, E. Ö., NADER, K. **Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory.** Learning & memory. 2012, 19(10), 449-452.
- ELSEY, J., KINDT, M. **Tackling maladaptive memories through reconsolidation: From neural to clinical science.** Neurobiology of learning and memory. 2017, 142(Pt A), 108-117.
- ENOMOTO, S., KATO, T. A. **Involvement of microglia in disturbed fear memory regulation: Possible microglial contribution to the pathophysiology of posttraumatic stress disorder.** Neurochemistry international. 2021, 142, 104921.
- ERREGER, K., DRAVID, S. M., BANKE, T. G., WYLLIE, D. J., TRAYNELIS, S. F. **Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles.** The Journal of physiology. 2005, 563(Pt 2), 345–358.
- ESPEJO, P. J., ORTIZ, V., MARTIJENA, I. D., MOLINA, V. A. **Stress-induced resistance to fear memory destabilization is associated with an impairment of Lys-48-linked protein polyubiquitination in the Basolateral Amygdala: Influence of D-cycloserine.** Neurobiology of learning and memory. 2021, 179, 107386.
- FAN, N., YANG, H., ZHANG, J., CHEN, C. **Reduced expression of glutamate receptors and phosphorylation of CREB are responsible for in vivo Delta9-THC exposure-impaired hippocampal synaptic plasticity.** Journal of neurochemistry. 2010, 112(3), 691–702.
- FANSELOW, M. S. **Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus.** Behavioural brain research. 2000, 110(1-2), 73-81.
- FANSELOW, M. S. **Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear.** Psychonomic Bulletin & Review. 1994, 1(4), 429-438.
- FANSELOW, M. S., DONG, H. W. **Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?** Neuron. 2010, 65(1):7-19
- FANSELOW, M. S., PONNUSAMY, R. **The use of conditioning tasks to model fear and anxiety** In: Handbook of anxiety and fear. Elsevier. 2008, 17: 46-65.
- FASTENRATH, M., COYNEL, D., SPALEK, K., MILNIK, A., GSCHWIND, L., ROOZENDAAL, B., PAPASSOTIROPOULOS, A., DE QUERVAIN, D. J.

- Dynamic modulation of amygdala-hippocampal connectivity by emotional arousal.** *The Journal of neuroscience*. 2014, 34(42), 13935–13947.
- FERRARA, N. C., TRASK, S., PULLINS, S. E., HELMSTETTER, F. J. **The dorsal hippocampus mediates synaptic destabilization and memory lability in the amygdala in the absence of contextual novelty.** *Neurobiology of learning and memory*. 2019, 166, 107089.
- FIHURKA, O., HONG, Y., YAN, J., BROWN, B., LIN, X., SHEN, N., WANG, Y., ZHAO, H., GORDON, M. N., MORGAN, D., ZHOU, Q., CHANG, P., CAO, C. **The Memory Benefit to Aged APP/PS1 Mice from Long-Term Intranasal Treatment of Low-Dose THC.** *International journal of molecular sciences*. 2022, 23(8), 4253.
- FISHBEIN, M., GOV, S., ASSAF, F., GAFNI, M., KEREN, O., SARNE, Y. **Long-term behavioral and biochemical effects of an ultra-low dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC): neuroprotection and ERK signaling.** *Experimental brain research*. 2012, 221(4), 437–448.
- FISHBEIN-KAMINIETSKY, M., GAFNI, M., SARNE, Y. **Ultralow doses of cannabinoid drugs protect the mouse brain from inflammation-induced cognitive damage.** *Journal of neuroscience research*. 2014, 92(12), 1669–1677.
- FITOUSSI, A., ZUNDER, J., TAN, H., LAVIOLETTE, S. R. **Delta-9-tetrahydrocannabinol potentiates fear memory salience through functional modulation of mesolimbic dopaminergic activity states.** *The European journal of neuroscience*. 2018, 47(11), 1385–1400.
- FLEXNER, L. B., FLEXNER, J. B., ROBERTS, R. B. **Memory in mice analyzed with antibiotics. Antibiotics are useful to study stages of memory and to indicate molecular events which sustain memory.** *Science*. 1967, 155(3768), 1377–1383.
- FORCATO, C., FERNANDEZ, R. S., PEDREIRA, M. E. **Strengthening a consolidated memory: the key role of the reconsolidation process.** *Journal of physiology*. 2014, 108(4-6), 323–333.
- FOSTER, K. A., MCLAUGHLIN, N., EDBAUER, D., PHILLIPS, M., BOLTON, A., CONSTANTINE-PATON, M., SHENG, M. **Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation.** *The Journal of neuroscience*. 2010, 30(7), 2676–2685.
- FRANKLAND, P. W., BONTEMPI, B., TALTON, L. E., KACZMAREK, L., SILVA, A. J. **The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory.** *Science*. 2004, 304(5672), 881–883.
- FRANZEN, J. M., GIACHERO, M., BERTOGLIO, L. J. **Dissociating retrieval-dependent contextual aversive memory processes in female rats: Are there cycle-dependent differences?** *Neuroscience*. 2019, 406, 542–553.
- FREEMAN, A. M., PETRILLI, K., LEES, R., HINDOCHA, C., MOKRYSZ, C., CURRAN, H. V., SAUNDERS, R., FREEMAN, T. P. **How does cannabidiol (CBD) influence the acute effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans? A systematic review.** *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2019, 107, 696–712.

- GAO, C., GILL, M. B., TRONSON, N. C., GUEDEA, A. L., GUZMÁN, Y. F., HUH, K. H., CORCORAN, K. A., SWANSON, G. T., RADULOVIC, J. **Hippocampal NMDA receptor subunits differentially regulate fear memory formation and neuronal signal propagation.** *Hippocampus*. 2010, 20(9), 1072–1082.
- GAONI, Y., MECHOULAM, R. **Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish.** *Journal of the American Chemical Society*. 1964, 86: 1646-1964.
- GAZARINI, L. **Revisitando os mecanismos de modulação noradrenérgica sobre as memórias de medo: do fisiológico ao disfuncional.** Tese. (Doutorado em Farmacologia). UFSC. 2015
- GAZARINI, L., STERN, C. A., CAROBREZ, A. P., BERTOGLIO, L. J. **Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors.** *Learning & memory*. 2013, 20(4), 210–219.
- GAZARINI, L., STERN, C. A., PIORNEDO, R. R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J. **PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation.** *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2014, 18(1), pyu026.
- GAZARINI, L., STERN, C. A., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J. **Interactions of Noradrenergic, Glucocorticoid and Endocannabinoid Systems Intensify and Generalize Fear Memory Traces.** *Neuroscience*. 2022, 497, 118–133.
- GERARD R. W. **Biological roots of psychiatry.** *Science*. 1955, 122(3162), 225–230.
- GIACHERO, M., BUSTOS, S. G., CALFA, G., MOLINA, V. A. **A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace.** *Learning & memory*. 2013, 20(5): 245-55
- GILMARTIN, M. R., KWAPIS, J. L., HELMSTETTER, F. J. **NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex differentially mediate trace, delay, and contextual fear conditioning.** *Learning & memory*. 2013, 20(6), 290–294.
- GOLD P. E. **Revisiting and Revising Memory Consolidation: Personal Reflections on the Research Legacy of Ivan Izquierdo.** *Neuroscience*. 2022, 497, 4–13.
- GÓMEZ-GONZALO, M., NAVARRETE, M., PEREA, G., COVELO, A., MARTÍN-FERNÁNDEZ, M., SHIGEMOTO, R., LUJÁN, R., ARAQUE, A. **Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission.** *Cerebral cortex*. 2015, 25(10), 3699–3712.
- GOULART, V. G., ROCHA-MENDONÇA, H., MAISONNETTE, S., PANDOLFO, P., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., CAMPELLO-COSTA, P. **Differential expression of glutamatergic receptor subunits in the hippocampus in carioca high- and low-conditioned freezing rats.** *Molecular and cellular neurosciences*. 2021, 116, 103666.

- GOURLEY, S. L., KEDVES, A. T., OLAUSSON, P., TAYLOR, J. R. **A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF.** *Neuropsychopharmacology*. 2009, 34(3), 707–716.
- HARDT, O., EINARSSON, E. O., NADER, K. **A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions.** *Annual review of psychology*. 2010, 61, 141–167.
- HAUBRICH J, BERNABO M, NADER K. **Noradrenergic projections from the locus coeruleus to the amygdala constrain fear memory reconsolidation.** *Elife*. 2020 May 18;9:e57010.
- HAUBRICH, J., CRESTANI, A. P., CASSINI, L. F., SANTANA, F., SIERRA, R. O., ALVARES, L., QUILLFELDT, J. A. **Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information.** *Neuropsychopharmacology*. 2015, 40(2), 315–326.
- HEBB, D. O. **The Organisation of Behaviour.** New York: Wiley. 1949
- HERKENHAM, M., LYNN, A. B., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S., DE COSTA, B. R., RICE, K. C. **Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study.** *The Journal of neuroscience*. 1991, 11, 563–583.
- HERNÁNDEZ-RABAZA, V., HONTECILLAS-PRIETO, L., VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ, C., FERRAGUD, A., PÉREZ-VILLABA, A., ARCUSA, A., BARCIA, J. A., TREJO, J. L., CANALES, J. J. **The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward.** *Neurobiology of learning and memory*. 2008, 90(3), 553–559.
- HILL, M. N., BIERER, L. M., MAKOTKINE, I., GOLIER, J. A., GALEA, S., MCEWEN, B. S., HILLARD, C. J., YEHUDA, R. **Reductions in circulating endocannabinoid levels in individuals with posttraumatic stress disorder following exposure to the world trade center attacks.** *Psychoneuroendocrinology*. 2013, 38:2952-61.
- HLOŽEK, T., UTTL, L., KADERÁBEK, L., BALÍKOVÁ, M., LHOTKOVÁ, E., HORSLEY, R. R., NOVÁKOVÁ, P., ŠÍCHOVÁ, K., ŠTEFKOVÁ, K., TYLŠ, F., KUCHAR, M., PÁLENÍČEK, T. **Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC.** *European neuropsychopharmacology*. 2017, 27(12), 1223–1237.
- HOLEHONNUR, R., PHENSY, A. J., KIM, L. J., MILIVOJEVIC, M., VUONG, D., DAISON, D. K., ALEX, S., TINER, M., JONES, L. E., KROENER, S., PLOSKI, J. E. **Increasing the GluN2A/GluN2B Ratio in Neurons of the Mouse Basal and Lateral Amygdala Inhibits the Modification of an Existing Fear Memory Trace.** *The Journal of neuroscience*. 2016, 36(36), 9490–9504.
- HONG, I., KIM, J., KIM, J., LEE, S., KO, H. G., NADER, K., KAANG, B. K., TSIEN, R. W., CHOI, S. **AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(20), 8218-8223.

- HORN, S. R., CHARNEY, D. S., FEDER, A. **Understanding resilience: New approaches for preventing and treating PTSD.** *Experimental neurology*. 2016, 284(Pt B), 119-132.
- HOWLETT A. C. **Cannabinoid receptor signaling.** *Handbook of experimental pharmacology*. 2005, (168), 53–79.
- HOWLETT, A. C., BARTH, F., BONNER, T. I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W. A., FELDER, C. C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B. R., MECHOULAM, R., PERTWEE, R. G. **International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors.** *Pharmacological reviews*. 2002, 54(2): 161-202.
- HUDSON, R., NORRIS, C., SZKUDLAREK, H. J., KHAN, D., SCHMID, S., RUSHLOW, W. J., LAVIOLETTE, S. R. **Anxiety and cognitive-related effects of Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) are differentially mediated through distinct GSK-3 vs. Akt-mTOR pathways in the nucleus accumbens of male rats.** *Psychopharmacology*. 2022, 239(2), 509–524.
- HUGHES, K. C., SHIN, L. M. **Functional neuroimaging studies of post-traumatic stress disorder.** *Expert review of neurotherapeutics*. 2011, 11(2), 275–285.
- HYMAN, J. M., WHITMAN, J., EMBERLY, E., WOODWARD, T. S., SEAMANS, J. K. **Action and outcome activity state patterns in the anterior cingulate cortex.** *Cerebral cortex*. 2013, 23(6), 1257-1268.
- IGLESIAS, L. P., BEDESCHI, L., AGUIAR, D. C., ASTH, L., MOREIRA, F. A. **Effects of Δ 9-THC and Type-1 Cannabinoid Receptor Agonists in the Elevated Plus Maze Test of Anxiety: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Cannabis and cannabinoid research*. 2022, 10.1089/can.2022.0078. No prelo.
- ISHII, T., MORIYOSHI, K., SUGIHARA, H., SAKURADA, K., KADOTANI, H., YOKOI, M., AKAZAWA, C., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., MASU, M. **Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits.** *The Journal of biological chemistry*. 1993, 268(4), 2836–2843.
- IZQUIERDO, I., DA CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M. B., MEDINA, J. H. **Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat.** *Behavioral and neural biology*. 1992, 58(1), 16-26.
- IZQUIERDO, I., FURINI, C. R., MYSKIW, J. C. **Fear Memory.** *Physiological reviews*. 2016, 96(2), 695–750.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., BIANCHIN, M., WALZ, R., ZANATTA, M. S., DA SILVA, R. C., BUENO E SILVA, M., RUSCHEL, A. C., PACZKO, N. **Memory processing by the limbic system: role of specific neurotransmitter systems.** *Behavioural brain research*. 1993, 58(1-2), 91-98.
- IZQUIERDO, I., SCHRÖDER, N., NETTO, C. A., MEDINA, J. H. **Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CaMKII-dependent mechanisms in the hippocampus.** *The European journal of neuroscience*. 1999, 11(9), 3323–3328.
- IZZO, A. A., MUCCIOLI, G. G., RUGGIERI, M. R., SCHICHO, R. **Endocannabinoids and the Digestive Tract and Bladder in Health and Disease.** *Handbook of experimental pharmacology*. 2015, 231, 423–447.

- JAROME, T. J., FERRARA, N. C., KWAPIS, J. L., HELMSTETTER, F. J. **Contextual Information Drives the Reconsolidation-Dependent Updating of Retrieved Fear Memories.** *Neuropsychopharmacology*. 2015, 40(13), 3044-3052.
- JETLY, R., HEBER, A., FRASER, G., BOISVERT, D. **The efficacy of nabilone, a synthetic cannabinoid, in the treatment of PTSD-associated nightmares: A preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled cross-over design study.** *Psychoneuroendocrinology*. 2015, 51, 585–588.
- JONES, C., SMITH-MACDONALD, L., VAN VEELLEN, N., VANDERLAAN, A., KANEVA, Z., DUNLEAVY, R. S., HAMILTON, T., VERMETTEN, E., BREMAULT-PHILLIPS, S. **Therapist and operator experiences utilizing multi-modal motion-assisted Memory Desensitization and Reconsolidation (3MDR) for treatment of combat related posttraumatic stress disorder amongst military and veteran populations.** *European journal of psychotraumatology*. 2022, 13(1), 2062996.
- JOSHI, S. A., DUVAL, E. R., KUBAT, B., LIBERZON, I. **A review of hippocampal activation in post-traumatic stress disorder.** *Psychophysiology*. 2020, 57(1), e13357.
- JOSSELYN S. A. **Continuing the search for the engram: examining the mechanism of fear memories.** *Journal of psychiatry & neuroscience*. 2010, 35(4), 221–228.
- JOSSELYN, S. A., KÖHLER, S., FRANKLAND, P. W. **Finding the engram.** *Nature reviews. Neuroscience*. 2015, 16(9), 521–534.
- JOVANOVIC, T., KAZAMA, A., BACHEVALIER, J., DAVIS, M. **Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD.** *Neuropharmacology*. 2012, 62(2), 695–704.
- KASTEN, C. R., ZHANG, Y., BOEHM, S. L., **2ND Acute Cannabinoids Produce Robust Anxiety-Like and Locomotor Effects in Mice, but Long-Term Consequences Are Age- and Sex-Dependent.** *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2019, 13, 32.
- KATONA, I., FREUND, T. F. **Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain.** *Annual review of neuroscience*. 2012, 35, 529–558.
- KIM, J. J., FANSELOW, M. S. **Modality-specific retrograde amnesia of fear.** *Science*. 1992, 256(5057), 675–677.
- KIM, R., MOKI, R., KIDA, S. **Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze.** *Molecular brain*. 2011, 4, 9.
- KINDT, M. **The surprising subtleties of changing fear memory: a challenge for translational science.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 2018, 373(1742), 20170033.
- KINDT, M., SOETER, M., VERVLIET, B. **Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear.** *Nature neuroscience*. 2009, 12(3), 256-258.

- KITAMURA, T., OGAWA, S. K., ROY, D. S., OKUYAMA, T., MORRISSEY, M. D., SMITH, L. M., REDONDO, R. L., TONEGAWA, S. **Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory.** *Science*. 2017, 356(6333), 73-78.
- KLAUSNER, H. A., DINGELL, J. V. **The metabolism and excretion of delta 9-tetrahydrocannabinol in the rat.** *Life sciences. Pt. 1: Physiology and pharmacology*. 1971, 10(1), 49–59.
- KLUMPERS, L. E., COLE, D. M., KHALILI-MAHANI, N., SOETER, R. P., TE BEEK, E. T., ROMBOUTS, S. A., VAN GERVEN, J. M. **Manipulating brain connectivity with δ^9 -tetrahydrocannabinol: a pharmacological resting state fMRI study.** *NeuroImage*. 2012, 63(3), 1701–1711.
- LATTAL, K. M., ABEL, T. **Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, 101(13), 4667-4672.
- LEDOUX, J. E., IWATA, J., CICCHETTI, P., REIS, D. J. **Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear.** *The Journal of neuroscience*. 1988, 8(7), 2517–2529.
- LEE, J. L. **Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning.** *Nature neuroscience*. 2008, 11(11), 1264-1266.
- LEE, J. L. **Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content.** *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2010, 4, 168.
- LEE, J. L., FLAVELL, C. R. **Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization.** *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014, 8, 144.
- LEE, J., AMORIM, F. E., CASSINI, L. F., AMARAL, O. B. **Different temporal windows for CB1 receptor involvement in contextual fear memory destabilisation in the amygdala and hippocampus.** *PloS one*. 2019, 14(1), e0205781.
- LEE, S. H., CHOI, J. H., LEE, N., LEE, H. R., KIM, J. I., YU, N. K., CHOI, S. L., LEE, S. H., KIM, H., KAANG, B. K. **Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory.** *Science*. 2008, 319(5867), 1253-1256.
- LEUTGEB, J. K., LEUTGEB, S., MOSER, M. B., MOSER, E. I. **Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus.** *Science*. 2007, 315(5814), 961-966.
- LEWIS, D. J., BREGMAN, N. J., MAHAN, J. J., JR **Cue-dependent amnesia in rats.** *Journal of comparative and physiological psychology*. 1972, 81(2), 243–247.
- LI, H. L. **An archeological and historical account of cannabis in China.** *Economic Botany*. 1973, 28: 437-448.
- Li, Y., Kim, J. **Distinct roles of neuronal and microglial CB2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus.** *Neuroscience*. 2017, 363, 11–25.
- LI, Y., KIM, J. **Neuronal expression of CB2 cannabinoid receptor mRNAs in the mouse hippocampus.** *Neuroscience*. 2015, 311, 253–267.
- LIGRESTI, A., DE PETROCELLIS, L., DI MARZO, V. **From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological**

- and Pathological Roles Through Complex Pharmacology.** *Physiological reviews.* 2016, 96(4), 1593–1659.
- LINGG, R. T., JOHNSON, S. B., EMMONS, E. B., ANDERSON, R. M., ROMIG-MARTIN, S. A., NARAYANAN, N. S., MCGAUGH, J. L., LALUMIERE, R. T., RADLEY, J. J. **Bed nuclei of the stria terminalis modulate memory consolidation via glucocorticoid-dependent and -independent circuits.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2020, 117(14), 8104–8114.
- LIU, X. Y., YAO, B., HAO, J. R., JIN, L., GAO, Y., YANG, X., LIU, L., SUN, X. Y., SUN, N., GAO, C. **IQGAP1/ERK regulates fear memory formation via histone posttranslational modifications induced by HDAC2.** *Neurobiology of learning and memory.* 2020, 171, 107210.
- LOEFFLER, G., COLLER, R., TRACY, L., DERDERIAN, B. R. **Prescribing Trends in US Active Duty Service Members With Posttraumatic Stress Disorder: A Population-Based Study From 2007-2013.** *The Journal of clinical psychiatry.* 2018, 79(4), 17m11667.
- LOPEZ, J., GAMACHE, K., SCHNEIDER, R., NADER, K. **Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking.** *The Journal of neuroscience.* 2015, 35(6), 2465–2475.
- LOTHMANN, K., DEITERSEN, J., ZILLES, K., AMUNTS, K., HEROLD, C. **New boundaries and dissociation of the mouse hippocampus along the dorsal-ventral axis based on glutamatergic, GABAergic and catecholaminergic receptor densities.** *Hippocampus.* 2021, 31(1), 56-78.
- LUCHKINA, N. V., BOLSHAKOV, V. Y. **Mechanisms of fear learning and extinction: synaptic plasticity-fear memory connection.** *Psychopharmacology.* 2019, 236(1), 163-182.
- MACCALLUM, C. A., RUSSO, E. B. **Practical considerations in medical cannabis administration and dosing.** *European journal of internal medicine.* 2018, 49, 12–19.
- MACTUTUS, C. F., RICCIO, D. C., FERREK, J. M. **Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics.** *Science.* 1979, 204(4399), 1319-1320.
- MAHER, J. M., MARKEY, J. C., EBERT-MAY, D. **The other half of the story: effect size analysis in quantitative research.** *CBE life sciences education.* 2013, 12(3), 345–351.
- MALLET, C., CHICK, C. F., MAATOUG, R., FOSSATI, P., BRUNET, A., MILLET, B. **Memory reconsolidation impairment using the β -adrenergic receptor blocker propranolol reduces nightmare severity in patients with posttraumatic stress disorder: a preliminary study.** *Journal of clinical sleep medicine.* 2022, 18(7), 1847–1855.
- MAMIYA, N., FUKUSHIMA, H., SUZUKI, A., MATSUYAMA, Z., HOMMA, S., FRANKLAND, P. W., KIDA, S. **Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory.** *The Journal of neuroscience.* 2009, 29(2), 402–413.

- MARCU, J. P., CHRISTIAN, R. T., LAU, D., ZIELINSKI, A. J., HOROWITZ, M. P., LEE, J., PAKDEL, A., ALLISON, J., LIMBAD, C., MOORE, D. H., YOUNT, G. L., DESPREZ, P. Y., MCALLISTER, S. D. **Cannabidiol enhances the inhibitory effects of delta9-tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival.** *Molecular cancer therapeutics*. 2010, 9(1), 180–189.
- MAREN, S. **Putting the brakes on fear.** *Neuron*. 2013, 80(4), 837-838.
- MARKOWITZ, S., FANSELOW, M. **Exposure Therapy for Post-Traumatic Stress Disorder: Factors of Limited Success and Possible Alternative Treatment.** *Brain sciences*. 2020, 10(3), 167.
- MARMAR, C. R., SCHLENGER, W., HENN-HAASE, C., QIAN, M., PURCHIA, E., LI, M., CORRY, N., WILLIAMS, C. S., HO, C. L., HORESH, D., KARSTOFT, K. I., SHALEV, A., KULKA, R. A. **Course of Posttraumatic Stress Disorder 40 Years After the Vietnam War: Findings From the National Vietnam Veterans Longitudinal Study.** *JAMA psychiatry*. 2015, 72(9), 875-881.
- MCGAUGH J. L. **Consolidating memories.** *Annual review of psychology*. 2015, 66, 1–24.
- MCGAUGH, J. L. **Hormonal influences on memory.** *Annual review of psychology*. 1983, 34:297-323
- MCGAUGH, J. L. **Memory - a century of consolidation.** *Science*. 2000, 14287: 248-51.
- MCGAUGH, J. L. **Time-Dependent Processes in Memory Storage.** *Science*. 1996, 153(3742), 1351–1358.
- MCKINNEY, M.K., CRAVATT, B.F. **Structure and function of fatty acid amide hydrolase.** *Annual review of biochemistry*. 2005, 74, 411–432.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N. E., SCHATZ, A. R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B. R., COMPTON, D. R., PERTWEE, R. G., GRIFFIN, G., BAYEWITCH, M., BARG, J., VOGEL, Z. **Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.** *Biochemical pharmacology*. 1995, 50(1):83-90
- MECHOULAM, R., SHANI, A., EDERY, H., GRUNFELD, Y. **Chemical basis of hashish activity.** *Science*. 1970, 169(945):611-2
- METNA-LAURENT, M., SORIA-GÓMEZ, E., VERRIER, D., CONFORZI, M., JÉGO, P., LAFENÊTRE, P., MARSICANO, G. **Bimodal control of fear-coping strategies by CB₁ cannabinoid receptors.** *The Journal of neuroscience*. 2012, 32(21), 7109–7118.
- MICHOPOULOS, V., ROTHBAUM, A. O., JOVANOVIC, T., ALMLI, L. M., BRADLEY, B., ROTHBAUM, B. O., GILLESPIE, C. F., RESSLER, K. J. **Association of CRP genetic variation and CRP level with elevated PTSD symptoms and physiological responses in a civilian population with high levels of trauma.** *The American journal of psychiatry*. 2015, 172(4), 353–362.
- MIKICS, E., TOTH, M., BIRO, L., BRUZSIK, B., NAGY, B., HALLER, J. **The role of GluN2B-containing NMDA receptors in short- and long-term fear recall.** *Physiology & behavior*. 2017, 177, 44–48.

- MILTON, A. L., MERLO, E., RATANO, P., GREGORY, B. L., DUMBRECK, J. K., EVERITT, B. J. **Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory.** *The Journal of neuroscience.* 2013, 33(3), 1109–1115.
- MISANIN, J. R., MILLER, R. R., LEWIS, D. J. **Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace.** *Science.* 1968, 160(3827), 554-555.
- MONORY, K., POLACK, M., REMUS, A., LUTZ, B., KORTE, M. **Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus.** *The Journal of neuroscience.* 2015, 35(9), 3842–3850.
- MONYER, H., BURNASHEV, N., LAURIE, D. J., SAKMANN, B., SEEBURG, P. H. **Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors.** *Neuron.* 1994, 12(3), 529–540.
- MOSER E. I. **The multi-laned hippocampus.** *Nature neuroscience.* 2011, 14(4), 407-408.
- MÜLLER, G. E., PILZECKER, A. **Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss.** *Zeitschrift fuer Psychologie. Ergänzungsband.* 1900, 1: 1–300.
- MUNRO, S., THOMAS, K.L., ABU-SHAAR, M. **Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.** *Nature.* 1993, 365(6441):61-5
- MUNSTER, V. J., KOOPMANS, M., VAN DOREMALEN, N., VAN RIEL, D., DE WIT, E. **A Novel Coronavirus Emerging in China - Key Questions for Impact Assessment.** *The New England journal of medicine.* 2020, 382(8), 692–694.
- MURKAR, A., KENT, P., CAYER, C., JAMES, J., DURST, T., MERALI, Z. **Cannabidiol and the Remainder of the Plant Extract Modulate the Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol on Fear Memory Reconsolidation.** *Frontiers in behavioral neuroscience.* 2019, 13, 174.
- NADER, K., SCHAFFE, G. E., LE DOUX, J. E. **Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval.** *Nature.* 2000, 406(6797), 722–726.
- NAVARRETE, M., ARAQUE, A. **Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication.** *Neuron.* 2008, 57: 883-893.
- NAVARRO, G., REYES-RESINA, I., RIVAS-SANTISTEBAN, R., SÁNCHEZ DE MEDINA, V., MORALES, P., CASANO, S., FERREIRO-VERA, C., LILLO, A., AGUINAGA, D., JAGEROVIC, N., NADAL, X., FRANCO, R. **Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB1 and CB2 receptors with smaller effect in CB1-CB2 heteroreceptor complexes.** *Biochemical pharmacology.* 2018, 157, 148–158.
- NESTLER, E. J., HYMAN, S. E. **Animal models of neuropsychiatric disorders.** *Nature neuroscience.* 2010, 13(10):1161-1169.
- NEUMEISTER, A., NORMANDIN, M. D., PIETRZAK, R. H., PIOMELLI, D., ZHENG, M. Q., GUJARRO-ANTON, A., POTENZA, M. N., BAILEY, C. R., LIN, S. F., NAJAFZADEH, S., ROPCHAN, J., HENRY, S., CORSI-TRAVALI, S., CARSON, R. E., HUANG, Y. **Elevated brain cannabinoid CB1 receptor availability in**

- post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study.** *Molecular psychiatry*. 2013, 18(9), 1034–1040.
- NEVES, G., COOKE, S. F., BLISS, T. V. **Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality.** *Nature reviews. Neuroscience*. 2008, 9(1):65-75
- NITZAN, K., ELLENBOGEN, L., BENTULILA, Z., DAVID, D., FRANKO, M., BREAK, E. P., ZOHARETZ, M., SHAMIR, A., SARNE, Y., DORON, R. **An Ultra-Low Dose of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Alleviates Alzheimer's Disease-Related Cognitive Impairments and Modulates TrkB Receptor Expression in a 5XFAD Mouse Model.** *International journal of molecular sciences*. 2022, 23(16), 9449.
- NIU, M., YANG, X., LI, Y., SUN, Y., WANG, L., HA, J., XIE, Y., GAO, Z., TIAN, C., WANG, L., SUN, Y. **Progresses in GluN2A-containing NMDA Receptors and their Selective Regulators.** *Cellular and molecular neurobiology*. 2022, no prelo.
- NORRHOLM, S. D., JOVANOVIĆ, T., BRISCIONE, M. A., ANDERSON, K. M., KWON, C. K., WARREN, V. T., BOSSHARDT, L., BRADLEY, B. **Generalization of fear-potentiated startle in the presence of auditory cues: a parametric analysis.** *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014, 8, 361.
- O'KEEFE, J., NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map.** Oxford: Oxford University Press. 1978
- ONAIWI, E. S., GREEN, M. R., MARTIN, B. R. **Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1990, 253(3), 1002–1009.
- ONAIWI, E. S., ISHIGURO, H., GONG, J. P., PATEL, S., PERCHUK, A., MEOZZI, P. A., MYERS, L., MORA, Z., TAGLIAFERRO, P., GARDNER, E., BRUSCO, A., AKINSHOLA, B. E., LIU, Q. R., HOPE, B., IWASAKI, S., ARINAMI, T., TEASENFITZ, L., UHL, G. R. **Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain.** *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006, 1074, 514–536.
- O'REILLY, R. C., MCCLELLAND, J. L. **Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off.** *Hippocampus*. 1994, 4(6), 661–682.
- O'SULLIVAN S. E. **An update on PPAR activation by cannabinoids.** *British journal of pharmacology*. 2016, 173(12), 1899–1910.
- O'SULLIVAN, S. E., KENDALL, D. A., RANDALL, M. D. **Time-dependent vascular effects of Endocannabinoids mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ).** *PPAR research*, 2009, 425289.
- O'SULLIVAN, S. E., TARLING, E. J., BENNETT, A. J., KENDALL, D. A., RANDALL, M. D. **Novel time-dependent vascular actions of Delta9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *Biochemical and biophysical research communications*. 2005, 337(3), 824–831.
- PANDELIDES, Z., THORNTON, C., LOVITT, K. G., FARUQUE, A. S., WHITEHEAD, A. P., WILLETT, K. L., ASHPOLE, N. M. **Developmental exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) causes biphasic effects on longevity,**

- inflammation, and reproduction in aged zebrafish (*Danio rerio*).** *GeroScience*. 2020, 42(3), 923–936.
- PAOLETTI, P., BELLONE, C., ZHOU, Q. **NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease.** *Nature reviews. Neuroscience*. 2013. 14(6), 383-400.
- PATEL, S., HILLARD, C. J. **Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006, 318(1), 304–311.
- PAVLOV, I. P. **Conditioned Reflexes.** London: Oxford University Press. 1927
- PAXINOS G, WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates** (compact 6th ed.), Academic Press, San Diego. 2009.
- PERCIE DU SERT, N., HURST, V., AHLUWALIA, A., ALAM, S., AVEY, M. T., BAKER, M., BROWNE, W. J., CLARK, A., CUTHILL, I. C., DIRNAGL, U., EMERSON, M., GARNER, P., HOLGATE, S. T., HOWELLS, D. W., KARP, N. A., LAZIC, S. E., LIDSTER, K., MACCALLUM, C. J., MACLEOD, M., PEARL, E. J., ... WÜRBEL, H. **The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research.** *BMJ open science*. 2020, 4(1), e100115.
- PERTWEE R. G. **Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines.** *British journal of pharmacology*. 2009, 156(3), 397–411.
- PHELPS, E. A., HOFMANN, S. G. **Memory editing from science fiction to clinical practice.** *Nature*. 2019, 572(7767), 43-50.
- PHILPOT, B. D., CHO, K. K., BEAR, M. F. **Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex.** *Neuron*. 2007, 53(4), 495–502.
- PITMAN R. K. **Will reconsolidation blockade offer a novel treatment for posttraumatic stress disorder?.** *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2011, 5, 11.
- POMPILI, M., SHER, L., SERAFINI, G., FORTE, A., INNAMORATI, M., DOMINICI, G., LESTER, D., AMORE, M., GIRARDI, P. **Posttraumatic stress disorder and suicide risk among veterans: a literature review.** *The Journal of nervous and mental disease*. 2013, 201(9), 802-812.
- PRZIBYLASWSKI, J., SARA, S. J. **Reconsolidation of memory after its reactivation.** *Behavioural brain research*. 1997, 84(1-2), 241–246.
- QI, Z., GOLD, P. E. **Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine.** *Learning & memory*. 2009, 16(5), 308–314.
- RABINAK, C. A., ANGSTADT, M., LYONS, M., MORI, S., MILAD, M. R., LIBERZON, I., PHAN, K. L. **Cannabinoid modulation of prefrontal-limbic activation during fear extinction learning and recall in humans.** *Neurobiology of learning and memory*. 2014, 113, 125–134.
- RABINAK, C. A., ANGSTADT, M., SRIPADA, C. S., ABELSON, J. L., LIBERZON, I., MILAD, M. R., PHAN, K. L. **Cannabinoid facilitation of fear extinction memory recall in humans.** *Neuropharmacology*. 2013, 64(1), 396–402.

- RADISKE, A., GONZALEZ, M. C., NÔGA, D. A., ROSSATO, J. I., BEVILAQUA, L., CAMMAROTA, M. **GluN2B and GluN2A-containing NMDAR are differentially involved in extinction memory destabilization and restabilization during reconsolidation.** *Scientific reports*. 2021, 11(1), 186.
- RAUCH, S. L., SHIN, L. M., PHELPS, E. A. **Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research--past, present, and future.** *Biological psychiatry*. 2006, 60(4), 376–382.
- RAUT, S. B., CANALES, J. J., RAVINDRAN, M., ERI, R., BENEDEK, D. M., URSANO, R. J., JOHNSON, L. R. **Effects of propranolol on the modification of trauma memory reconsolidation in PTSD patients: A systematic review and meta-analysis.** *Journal of psychiatric research*. 2022, 150, 246–256.
- RAYMUNDI, A. M., DA SILVA, T. R., SOHN, J., BERTOGLIO, L. J., STERN, C. A. **Effects of Δ 9-tetrahydrocannabinol on aversive memories and anxiety: a review from human studies.** *BMC psychiatry*. 2020b, 20(1), 420.
- RAYMUNDI, A. M., DA SILVA, T. R., ZAMPRONIO, A. R., GUIMARÃES, F. S., BERTOGLIO, L. J., STERN, C. **A time-dependent contribution of hippocampal CB1, CB2 and PPAR γ receptors to cannabidiol-induced disruption of fear memory consolidation.** *British journal of pharmacology*. 2020a, 177(4), 945–957.
- REIJMERS, L. G., PERKINS, B. L., MATSUO, N., MAYFORD, M. **Localization of a stable neural correlate of associative memory.** *Science*. 2007, 317(5842), 1230-1233.
- REUL, J. M., NUTT, D. J. **Glutamate and cortisol--a critical confluence in PTSD?** *Journal of psychopharmacology*. 2008, 22(5), 469–472.
- ROITMAN, P., MECHOULAM, R., COOPER-KAZAZ, R., SHALEV, A. **Preliminary, open-label, pilot study of add-on oral Δ 9-tetrahydrocannabinol in chronic post-traumatic stress disorder.** *Clinical drug investigation*. 2014, 34(8), 587–591.
- ROULLET, P., VAIVA, G., VÉRY, E., BOURCIER, A., YRONDI, A., DUPUCH, L., LAMY, P., THALAMAS, C., JASSE, L., EL HAGE, W., BIRMES, P. **Traumatic memory reactivation with or without propranolol for PTSD and comorbid MD symptoms: a randomised clinical trial.** *Neuropsychopharmacology*. 2021, 46(9), 1643–1649.
- RUBINO, T., SALA, M., VIGANÒ, D., BRAIDA, D., CASTIGLIONI, C., LIMONTA, V., GUIDALI, C., REALINI, N., PAROLARO, D. **Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats.** *Neuropsychopharmacology*. 2007, 32(9), 2036–2045.
- RUGGIERO, R. N., BUENO-JÚNIOR, L. S., ROSS, J. B., FACHIM, H. A., PADOVAN- NETO, F. E., MERLO, S., ROHNER, C. J. S., IKEDA, E. T., BRUSCO, J., MOREIRA, J. E. **Neurotransmissão glutamatérgica e a plasticidade sináptica: aspectos molecular, clínicos e filogenéticos.** *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2011, 44(2): 143-56

- RUMPEL, S., LEDOUX, J., ZADOR, A., MALINOW, R. **Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning.** *Science*. 2005, 308(5718), 83-88.
- SALVIATO, B. Z., RAYMUNDI, A. M., RODRIGUES DA SILVA, T., SALEMME, B. W., BATISTA SOHN, J. M., ARAÚJO, F. S., GUIMARÃES, F. S., BERTOGLIO, L. J., STERN, C. A. **Female but not male rats show biphasic effects of low doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on anxiety: can cannabidiol interfere with these effects?** *Neuropharmacology*. 2021, 196, 108684.
- SANDRINI, M., COHEN, L. G., CENSOR, N. **Modulating reconsolidation: a link to causal systems-level dynamics of human memories.** *Trends in cognitive sciences*. 2015, 19(8), 475–482.
- 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*. 2016, 127, 42–47.
- SARNE Y. **Beneficial and deleterious effects of cannabinoids in the brain: the case of ultra-low dose THC.** *The American journal of drug and alcohol abuse*. 2019, 45(6), 551–562.
- SARNE, Y., TOLEDANO, R., RACHMANY, L., SASSON, E., DORON, R. **Reversal of age-related cognitive impairments in mice by an extremely low dose of tetrahydrocannabinol.** *Neurobiology of aging*. 2018, 61, 177–186.
- SAUNDERS, R. C., ROSENE, D. L. **A comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: I. Convergence in the entorhinal, prorhinal, and perirhinal cortices.** *The Journal of comparative neurology*. 1988, 271(2), 153–184.
- SCHILLER, D., MONFILS, M. H., RAIIO, C. M., JOHNSON, D. C., LEDOUX, J. E., PHELPS, E. A. **Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms.** *Nature*. 2010, 463(7277), 49–53.
- SCHRAMM-SAPYTA, N. L., CHA, Y. M., CHAUDHRY, S., WILSON, W. A., SWARTZWELDER, H. S., KUHN, C. M. **Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in adolescent and adult rats.** *Psychopharmacology*. 2007, 191(4), 867–877.
- SCOVILLE, W. B., MILNER, B. **Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1957, 20:11-21.
- SCOZ-SILVA, R. **Papel dos receptores canabinoides do tipo 2 hipocampais na modulação das memórias traumáticas.** Tese (Doutorado em Farmacologia). UFSC.
- SERAFIMOVSKA, T., DARKOVSKA-SERAFIMOVSKA, M., STEFKOV, G., ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z., BALKANOV, T. **Pharmacotherapeutic Considerations for Use of Cannabinoids to Relieve Symptoms of Nausea and Vomiting Induced by Chemotherapy.** *Folia medica*. 2020, 62(4), 668–678.

- SHENG, M., CUMMINGS, J., ROLDAN, L. A., JAN, Y. N., JAN, L. Y. **Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex.** *Nature*. 1994, 368(6467), 144-147.
- SHEPHERD, J. D., BEAR, M. F. **New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity.** *Nature neuroscience*. 2011, 14(3), 279-284
- SHIN, L. M., RAUCH, S. L., PITMAN, R. K. **Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD.** *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006, 1071, 67–79.
- SHISHKO, I., OLIVEIRA, R., MOORE, T. A., ALMEIDA, K. **A review of medical marijuana for the treatment of posttraumatic stress disorder: Real symptom re-leaf or just high hopes?.** *The mental health clinician*. 2018, 8(2), 86–94.
- SOBCZYK, A., SCHEUSS, V., SVOBODA, K. **NMDA receptor subunit-dependent [Ca²⁺] signaling in individual hippocampal dendritic spines.** *The Journal of neuroscience*. 2005, 25(26), 6037–6046.
- SOHN, J., DE SOUZA, S., RAYMUNDI, A. M., BONATO, J., DE OLIVEIRA, R., PRICKAERTS, J., STERN, C. A. **Persistence of the extinction of fear memory requires late-phase cAMP/PKA signaling in the infralimbic cortex.** *Neurobiology of learning and memory*. 2020, 172, 107244.
- SOL FUSTIÑANA, M., DE LA FUENTE, V., FEDERMAN, N., FREUDENTHAL, R., ROMANO, A. **Protein degradation by ubiquitin-proteasome system in formation and labilization of contextual conditioning memory.** *Learning & memory*. 2014, 21(9), 478–487.
- SOYA, S., SAKURAI, T. **Orexin as a modulator of fear-related behavior: Hypothalamic control of noradrenaline circuit.** *Brain research*. 2020, 1731, 146037.
- STEIN, D. J., IPSEY, J. C., SEEDAT, S. **Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD).** *The Cochrane database of systematic reviews*. 2006, 1, CD002795.
- STEINDEL, F., LERNER, R., HÄRING, M., RUEHLE, S., MARSICANO, G., LUTZ, B., MONORY, K. **Neuron-type specific cannabinoid-mediated G protein signalling in mouse hippocampus.** *Journal of neurochemistry*. 2013,124(6), 795–807.
- STERN, C. A., GAZARINI, L., TAKAHASHI, R. N., GUIMARÃES, F. S., BERTOGLIO, L. J. **On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment.** *Neuropsychopharmacology*. 2012, 37(9):2132-42.
- STERN, C. A., GAZARINI, L., VANVOSSSEN, A. C., HAMES, M. S., BERTOGLIO, L. J. **Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time.** *Learning & memory*. 2013. 21(1), 14–20.
- STERN, C. A., GAZARINI, L., VANVOSSSEN, A. C., ZUARDI, A. W., GALVE-ROPERH, I., GUIMARAES, F. S., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J. **Δ9-Tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption.** *European neuropsychopharmacology*. 2015, 25(6), 958–965.

- STERN, C., DA SILVA, T. R., RAYMUNDI, A. M., DE SOUZA, C. P., HIROAKI-SATO, V. A., KATO, L., GUIMARÃES, F. S., ANDREATINI, R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J. **Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors.** *Neuropharmacology*. 2017, 125, 220–230.
- STIVER, M. L., CLOKE, J. M., NIGHTINGALE, N., RIZOS, J., MESSER, W. S., JR, WINTERS, B. D. **Linking muscarinic receptor activation to UPS-mediated object memory destabilization: Implications for long-term memory modification and storage.** *Neurobiology of learning and memory*. 2017, 145, 151–164.
- SUN, L., SUN, Z., WU, L., ZHU, Z., ZHANG, F., SHANG, Z., JIA, Y., GU, J., ZHOU, Y., WANG, Y., LIU, N., LIU, W. **Prevalence and risk factors for acute posttraumatic stress disorder during the COVID-19 outbreak.** *Journal of affective disorders*. 2021, 283, 123–129.
- SUN, W., CHEN, X., MEI, Y., YANG, Y., LI, X., AN, L. **Prelimbic proBDNF Facilitates Retrieval-Dependent Fear Memory Destabilization by Regulation of Synaptic and Neural Functions in Juvenile Rats.** *Molecular neurobiology*. 2022, 59(7), 4179–4196.
- SUN, W., LI, X., AN, L. **Distinct roles of prelimbic and infralimbic proBDNF in extinction of conditioned fear.** *Neuropharmacology*. 2018, 131, 11–19.
- 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*. 2008, 15(6), 426–433.
- SZNITMAN, S. R., MEIRI, D., AMIT, B. H., ROSENBERG, D., GREENE, T. **Posttraumatic stress disorder, sleep and medical cannabis treatment: A daily diary study.** *Journal of anxiety disorders*. 2022, 92, 102632.
- TAN, H., LAUZON, N. M., BISHOP, S. F., BECHARD, M. A., LAVIOLETTE, S. R. **Integrated cannabinoid CB1 receptor transmission within the amygdala-prefrontal cortical pathway modulates neuronal plasticity and emotional memory encoding.** *Cerebral Cortex*. 2010, 20:1486-96.
- TAN, H., LAUZON, N. M., BISHOP, S. F., BECHARD, M. A., LAVIOLETTE, S. R. **Cannabinoid transmission in the basolateral amygdala modulates fear memory formations via functional inputs to the prelimbic.** *The Journal of neuroscience*. 2011, 31(14), 5300–5312.
- TONEGAWA, S., LIU, X., RAMIREZ, S., REDONDO, R. **Memory Engram Cells Have Come of Age.** *Neuron*. 2015, 87(5), 918–931.
- TREVES, A., TASHIRO, A., WITTER, M. P., MOSER, E. I. **What is the mammalian dentate gyrus good for?.** *Neuroscience*. 2008, 154(4), 1155-1172.
- TRONSON, N. C., TAYLOR, J. R. **Molecular mechanisms of memory reconsolidation.** *Nature reviews. Neuroscience*. 2007, 8(4), 262–275.
- TROYNER, F., BERTOGLIO, L. J. **Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory reconsolidation.** *Neurobiology of learning and memory*. 2021, 177, 107343.

- TROYNER, F., BERTOGLIO, L. J. **Thalamic nucleus reuniens regulates fear memory destabilization upon retrieval.** *Neurobiology of learning and memory.* 2020, 175, 107313.
- TULVING, E. **Elements of Episodic Memory.** Oxford: Clarendon Press, 1933.
- VAN HOESEN G. W. **Neural systems of the non-human primate forebrain implicated in memory.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1985, 444, 97–112.
- VANVOSSSEN, A. C., PORTES, M., SCOZ-SILVA, R., REICHMANN, H. B., STERN, C., BERTOGLIO, L. J. **Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors.** *Neurobiology of learning and memory.* 2017, 137, 154–162.
- VARA, D., MORELL, C., RODRÍGUEZ-HENCHE, N., DIAZ-LAVIADA, I. **Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma.** *Cell death & disease.* 2013, 4(5), e618.
- VARELA, C., WEISS, S., MEYER, R., HALASSA, M., BIEDENKAPP, J., WILSON, M. A., GOOSENS, K. A., BENDOR, D. **Tracking the Time-Dependent Role of the Hippocampus in Memory Recall Using DREADDs.** *PloS one,* 2016, 11(5), e0154374.
- VAZDARJANOVA, A., RAMIREZ-AMAYA, V., INSEL, N., PLUMMER, T. K., ROSI, S., CHOWDHURY, S., MIKHAEL, D., WORLEY, P. F., GUZOWSKI, J. F., BARNES, C. A. **Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain.** *The Journal of comparative neurology.* 2006, 498(3), 317-329.
- VIEIRA, M., YONG, X., ROCHE, K. W., ANGGONO, V. **Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits.** *Journal of neurochemistry.* 2020, 154(2), 121–143.
- WALKER, D. L., DAVIS, M. **Amygdala infusions of an NR2B-selective or an NR2A-preferring NMDA receptor antagonist differentially influence fear conditioning and expression in the fear-potentiated startle test.** *Learning & memory.* 2008, 15(2), 67–74.
- WANG, S. H., DE OLIVEIRA ALVARES, L., NADER, K. **Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation.** *Nature neuroscience.* 2009, 12(7), 905–912.
- WELLS, A. M., LASSETER, H. C., XIE, X., COWHEY, K. E., REITTINGER, A. M., FUCHS, R. A. **Interaction between the basolateral amygdala and dorsal hippocampus is critical for cocaine memory reconsolidation and subsequent drug context-induced cocaine-seeking behavior in rats.** *Learning & memory.* 2011, 18(11), 693–702.
- WIDMER, M., HANEMANN, C. O., ZAJICEK, J. **High concentrations of cannabinoids activate apoptosis in human U373MG glioma cells.** *Journal of neuroscience research.* 2008, 86(14), 3212–3220.
- WILKINSON, S. T., STEFANOVICS, E., ROSENHECK, R. A. **Marijuana use is associated with worse outcomes in symptom severity and violent behavior**

- in patients with posttraumatic stress disorder.** *The Journal of clinical psychiatry.* 2015, 76(9), 1174–1180.
- WILTGEN, B. J., SILVA, A. J. **Memory for context becomes less specific with time.** *Learning & memory.* 2007, 14(4), 313–317.
- WINOCUR, G., MOSCOVITCH, M., ROSENBAUM, R. S., SEKERES, M. **An investigation of the effects of hippocampal lesions in rats on pre- and postoperatively acquired spatial memory in a complex environment.** *Hippocampus.* 2010, 20(12), 1350–1365.
- WOOD, N. E., ROSASCO, M. L., SURIS, A. M., SPRING, J. D., MARIN, M. F., LASKO, N. B., GOETZ, J. M., FISCHER, A. M., ORR, S. P., PITMAN, R. K. **Pharmacological blockade of memory reconsolidation in posttraumatic stress disorder: three negative psychophysiological studies.** *Psychiatry research.* 2015, 225(1-2), 31–39.
- YANG, F. C., LIANG, K. C. **Interactions of the dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in formation of fear memory: difference in inhibitory avoidance learning and contextual fear conditioning.** *Neurobiology of learning and memory.* 2014, 112, 186–194.
- YEHUDA, R., HOGE, C. W., MCFARLANE, A. C., VERMETTEN, E., LANIUS, R. A., NIEVERGELT, C. M., HOBFOLL, S. E., KOENEN, K. C., NEYLAN, T. C., HYMAN, S. E. **Post-traumatic stress disorder.** *Nature reviews. Disease primers.* 2015, 1, 15057.
- ZAIZAR, E. D., PAPINI, S., O'CONNOR, P., TELCH, M. J. **Impact of cannabidiol-rich hemp extract oil on reconsolidation disruption of naturalistic interoceptive aversive memory in humans: Protocol for a randomized clinical trial.** *Contemporary clinical trials.* 2022, 119, 106847.
- ZHANG, J. J., HAUBRICH, J., BERNABO, M., FINNIE, P., NADER, K. **Limits on lability: Boundaries of reconsolidation and the relationship to metaplasticity.** *Neurobiology of learning and memory.* 2018, 154, 78–86.
- ZHANG, Y., FUKUSHIMA, H., KIDA, S. **Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory.** *Molecular brain.* 2011, 4, 4.
- ZINEBI, F., XIE, J., LIU, J., RUSSELL, R. T., GALLAGHER, J. P., MCKERNAN, M. G., SHINNICK-GALLAGHER, P. **NMDA currents and receptor protein are downregulated in the amygdala during maintenance of fear memory.** *The Journal of neuroscience.* 2003, 23(32), 10283–10291.