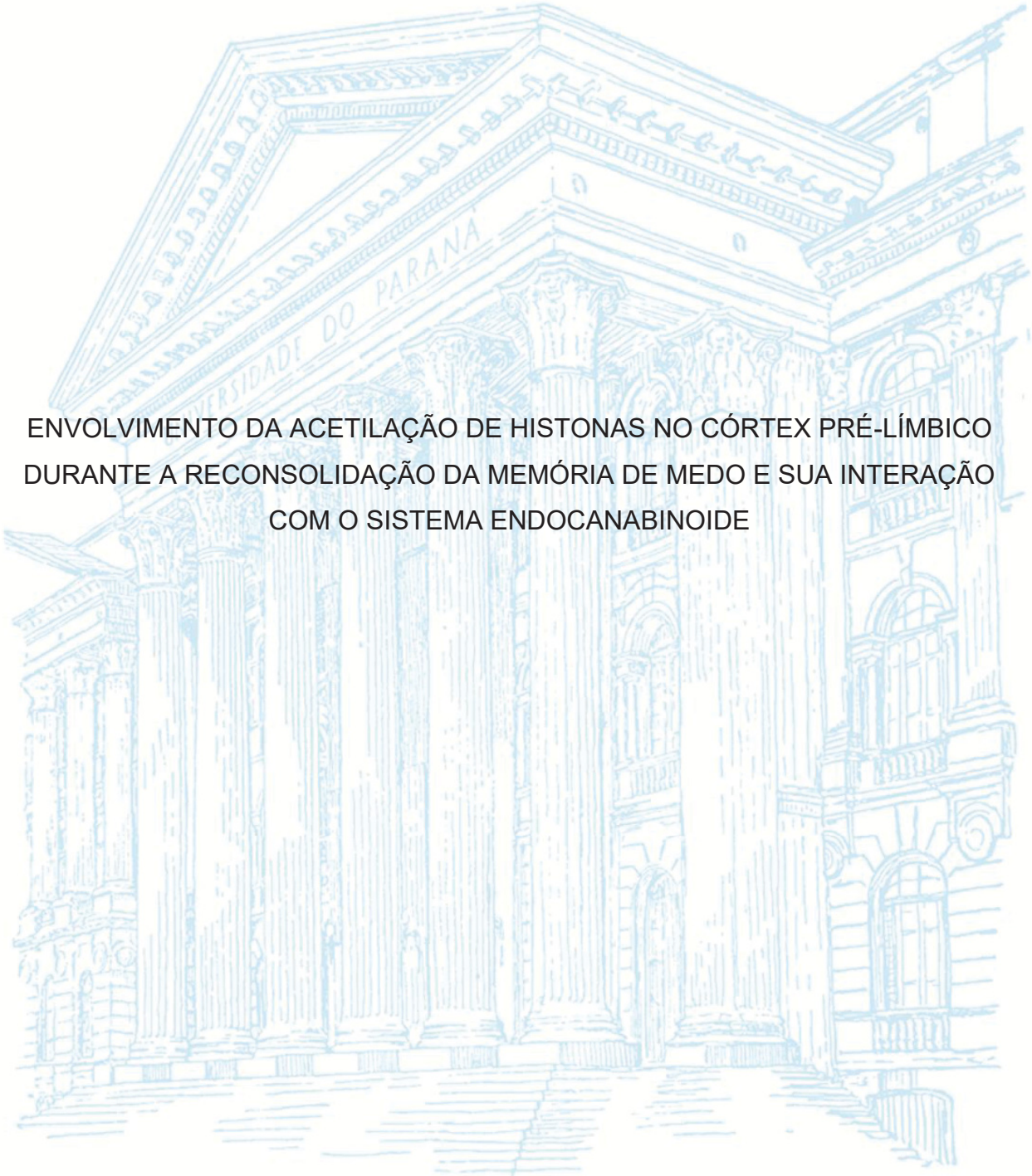
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA FURTADO BERGMANN



ENVOLVIMENTO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E SUA INTERAÇÃO COM O SISTEMA ENDOCANABINOIDE

CURITIBA

2025

MARIANA FURTADO BERGMANN

ENVOLVIMENTO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E SUA INTERAÇÃO COM O SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profª. Dra. Cristina A. Jark Stern

CURITIBA

2025

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

Bergmann, Mariana Furtado, 1999-.
Envolvimento da acetilação de histonas no córtex pré-límbico durante a reconsolidação da memória de medo e sua interação com o sistema endocanabinoide. / Mariana Furtado Bergmann. – Curitiba, 2025.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
Orientadora: Prof.ª Dra. Cristina A. Jark Stern.

1. Medo-Aspectos psicológicos. 2. Córtex Pré-Frontal. 3. Histonas. 4. Endocanabinoides. 5. Memória. I. Stern, Cristina A. J. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título

Bibliotecária: Rosilei Vilas Boas CRB-9/939

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 dissertação de Mestrado de **MARIANA FURTADO BERGMANN**, intitulada: **ENVOLVIMENTO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E SUA INTERAÇÃO COM O SISTEMA ENDOCANABINOIDE**, 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 mestra 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 Março de 2025.

Assinatura Eletrônica
15/04/2025 08:50:36.0
CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
09/04/2025 10:06:18.0
LEANDRO JOSE BERTOGLIO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
08/04/2025 12:42:02.0
PAULA SANTANA LUNARDI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARNÁ)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 440995
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 440995

Dedico este trabalho às matriarcas da minha família: minha bisavó Luiza, minhas avós Melanda e Maria, e minha mãe Emanuela. Mulheres guerreiras, capazes de carregar o mundo nas costas e que, embora não tenham tido as mesmas oportunidades, dedicaram suas vidas para que eu pudesse estar aqui hoje.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vilmar e Emanuela, meus alicerces, que sempre me deram suporte para ter uma formação, me apoiam e me guiam em todas as minhas decisões. À minha irmã, pela amizade e pela honra de ver seu crescimento. Ao Thales, pelo companheirismo, reconhecimento, compromisso, confiança e cuidado.

À professora e orientadora, Drª Cristina A. J. Stern, pelo suporte, confiança, paciência e incentivo ao longo destes anos, para o desenvolvimento, condução e sucesso deste trabalho, além de toda a sua contribuição para o meu crescimento profissional.

Aos meus colegas do *Fear Memory Lab*, Ana Maria, Jeferson, Daiane, Nathalie, Manoela, Mateus e Gabriel, pelo dia a dia vivenciado, pelas sugestões e ajuda no decorrer deste trabalho. À Ana Maria, pela ajuda em todos os experimentos comportamentais e moleculares realizados, pela sua disposição e paciência para me ensinar e me escutar, e pela sua bondade como pessoa. Ao Jeferson, pela ajuda durante os experimentos e pela paciência em me ensinar na condução experimental e análise dos dados. À Manoela, pelo seu apoio nos experimentos, por compartilhar seu trabalho comigo e por sua ternura.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela infraestrutura e pela oportunidade de realização deste projeto. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica. Aos discentes do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo voto de confiança em me eleger Representante Discente.

Ao Departamento de Fisiologia, pela utilização do fotodocumentador, e ao professor Dr. Bruno Martynhak e à técnica Débora, por me auxiliarem nos agendamentos e no acompanhamento das revelações de membranas.

À minha família que sempre me apoiou e torceu pelos meus sonhos, Oma, Vó Melanda, Madrinha, Padrinho, Ká, Beto, Tia Gio, Helô, Ju, Gabi, Bruna e Tia Solange.

Aos meus amigos, Ana Carolina, Júlia e Diana, Gabriel Carvalho, Ahmad, João Henrique, Jogabe, Well, Rafael, Kael, Gustavo, Fernando, Veve, Nunes, Ana Maria, Nathalie, Manoela, Mateus, entre tantos outros, agradeço imensamente por torcerem por mim, compartilharem a vida comigo, e me trazerem momentos de diversão e reflexão. Saibam que vocês são essenciais para o meu crescimento pessoal!

Agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

“Traçamos nossa vida por meio de tudo o que lembramos... Conhecemos a nós mesmos por meio da arte e do ato de recordar. As memórias nos oferecem um mundo onde não há morte, onde somos sustentados pelos rituais de afeto e lembrança.”

— Bell Hooks.

RESUMO

Evidências sugerem que prejudicar a reconsolidação da memória de medo pode ser uma estratégia terapêutica promissora para o transtorno de estresse pós-traumático, uma doença mental originada pela formação de uma memória de medo. A evocação da memória pode tornar o traço de memória novamente lábil, sendo necessário a subsequente reconsolidação, processo que estabiliza memórias e depende de diversos mecanismos celulares como aqueles relacionados ao sistema endocanabinoide, e moleculares, como os mecanismos epigenéticos. Esses mecanismos são recrutados em áreas envolvidas com a consolidação e expressão da memória de medo, como o córtex pré-límbico (PL). Sugere-se que a acetilação de histona, mediada por histona acetiltransferases (HATs) como a p300/CBP, desempenha um papel crucial nesse processo em áreas que se conectam com o córtex PL, como a amígdala lateral. Entretanto, a contribuição específica da HAT p300/CBP para a reconsolidação da memória no córtex PL, ainda não foi explorada. Ainda, há evidências de uma interação entre a acetilação de histona e o sistema endocanabinoide durante a consolidação da memória de medo, mas o papel da acetilação de histona no córtex PL e sua interação com esse sistema durante a reconsolidação não foi abordado anteriormente. O objetivo deste estudo foi investigar o envolvimento da atividade HAT p300/CBP no PL durante a reconsolidação da memória de medo ao contexto e explorar o papel do sistema endocanabinoide nesse processo. Ratos Wistar machos adultos com cânulas-guia direcionadas ao córtex PL foram submetidos ao condicionamento de medo ao contexto. Imediatamente, 1 h ou 6 h após a evocação da memória, os ratos receberam VEI ou C646 (5 ou 50 ng/0,2 uL/lado; inibidor da HAT p300/CBP). O córtex PL foi coletado para análise dos níveis de histona H3, acetilação de histonas H3 e receptores CB_1. Além disso, imediatamente ou 1 h após a evocação os ratos receberam AM251 (50 pmol/0,2 µL/lado; antagonista do receptor CB_1) ou URB597 (10 pmol/0,2 µL/lado; inibidor da amida hidrolase de ácido graxo) e 5 min ou 1 h após C646 na concentração subeficaz. A infusão de C646 (50 ng) 1 h após a evocação prejudicou significativamente a reconsolidação, evidenciada por uma redução no comportamento de congelamento 24 h depois. Esse efeito foi dependente da reativação da memória, sem interferir no comportamento tipo-ansioso ou na atividade locomotora. Observou-se um aumento na acetilação de histona H3 120 minutos após a evocação em animais tratados com VEI, enquanto a infusão de C646 (50 ng) impediu esse aumento. Nestes mesmos tempos, a administração de C646 (50 ng) não alterou a expressão de receptores CB_1. O antagonismo CB_1 não afetou os efeitos do C646 (50 ng) imediatamente após a evocação, mas impediu seu efeito quando administrado 1 h depois. Além disso, uma combinação de C646 (5 ng) com URB597 resultou em comportamento de congelamento reduzido após 24 h, sugerindo que o efeito do C646 foi mediado pela anandamida. Esses resultados indicam que a HAT p300/CBP no PL está envolvida na reconsolidação da memória de medo até 1 h após a evocação. Esse processo é modulado por receptores CB_1 e pela anandamida, sugerindo uma interação entre o sistema endocanabinoide e os mecanismos epigenéticos na reconsolidação da memória de medo.

Palavras-chave: reconsolidação, condicionamento de medo ao contexto, córtex pré-límbico, acetilação de histonas, sistema endocanabinoide.

ABSTRACT

Studies suggest that disrupting the reconsolidation of fear memory may be a promising therapeutic strategy for post-traumatic stress disorder, a mental illness induced by the formation of fear memory. Memory retrieval can make the memory trace labile again, requiring subsequent reconsolidation, a process that stabilizes memories after reactivation and depends on many cellular mechanisms, such as the requirement of the endocannabinoid system, as well as molecular mechanisms, like epigenetic processes. These mechanisms are recruited in brain areas involved in the consolidation and expression of fear memory, such as the prelimbic cortex (PL). It is suggested that histone acetylation, mediated by histone acetyltransferases (HATs) such as p300/CBP, plays a crucial role in this process in areas connected to the PL cortex, such as the lateral amygdala. However, the specific contribution of HAT p300/CBP to memory reconsolidation in the PL cortex, remains underexplored. Furthermore, there is evidence suggesting a bidirectional influence between histone acetylation and the endocannabinoid system during fear memory consolidation, but the role of histone acetylation in the PL and its interaction with this system during reconsolidation have not been addressed previously. The aim of this study was to investigate the involvement of HAT p300/CBP activity in the PL during contextual fear memory reconsolidation and to explore the role of the endocannabinoid system in this process. Adult male Wistar rats with guide cannulas implanted in the PL underwent contextual fear conditioning. Immediately, 1 h ou 6 h after retrieval, independent groups of rats received either VEI or C646 (5 ou 50 ng/0.2uL/lado;HAT p300/CBP inhibitor). The PL cortex was collected for analysis of histone H3, histone H3 acetylation, and CB1 receptor levels. Additionally, immediately or 1 h after retrieval rats received AM251 (50 pmol/0.2 µL/lado; CB1 receptor antagonist) or URB597 (10 pmol/0.2 µL/lado; fatty acid amide hydrolase inhibitor) and 5 minutes or 1 h after C646. Infusion of C646 (50 ng) 1 hour after memory retrieval significantly impaired reconsolidation, as evidenced by a reduction in freezing behavior 24 hours later. This effect was dependent on memory retrieval and was not associated with anxiety-like behavior or locomotor activity. An increase in histone H3 acetylation was observed 120 minutes after retrieval in VEI-treated animals, while C646 (50 ng) infusion prevented this increase. C646 administration did not alter CB1 receptor expression. At the same time points, CB1 receptor antagonism did not affect the effect of C646 (50 ng) administered immediately after retrieval but prevented its effect when infused 1 h after retrieval. Furthermore, a synergistic effect was observed when C646 (5 ng) was combined with URB597 1 hour post-retrieval, resulting in reduced freezing behavior 24 h later. This suggests that the effect of C646 1 h after retrieval was mediated by anandamide. Our findings indicate that HAT p300/CBP in the PL is involved in memory reconsolidation within 1 h post-reactivation. This involvement of HAT p300/CBP is modulated by CB1 receptors and anandamide, suggesting an interaction between the endocannabinoid system and epigenetic mechanisms in fear memory reconsolidation.

Keywords: reconsolidation, contextual fear memory, prelimbic cortex, histone acetylation, endocannabinoid system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - LTP COMO MECANISMO MOLECULAR NA FORMAÇÃO DAS MEMÓRIAS……...21

FIGURA 2 - CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO ……...23

FIGURA 3 - PROCESSO DE RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO …….24

FIGURA 4 - REGIÕES CEREBRAIS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA ……..26

FIGURA 5 - CONEXÕES DO CÓRTEX PL RESPONSÁVEIS POR AUMENTAR A RESPOSTA DE MEDO …….27

FIGURA 6 - MECANISMOS EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA EXPRESSÃO GÊNICA ……28

FIGURA 7 - O PROCESSO DE ACETILAÇÃO E DESACETILAÇÃO DE HISTONAS ……31

FIGURA 8 - DISSECÇÃO DA ÁREA CEREBRAL PARA WESTERN BLOTTING E LOCAL REPRESENTATIVO DE INFUSÃO NO CÓRTEX PL ……..36

FIGURA 9 - A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL IMEDIATAMENTE OU 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA PREJUDICA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA.....…….44

FIGURA 10 - OMISSÃO DA SESSÃO DE EVOCAÇÃO IMPEDE OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA ……..……46

FIGURA 11 - EFEITOS DO TRATAMENTO COM INIBIDOR DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E ATIVIDADE LOCOMOTORA …….....……49

FIGURA 12 - EFEITOS DO TRATAMENTO COM INIBIDOR HAT p300/CBP NA ACETILAÇÃO DA HISTONA H3 NO CÓRTEX PL ……..51

FIGURA 13 - A HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL É NECESSÁRIA PARA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO……63

FIGURA 14 - SISTEMA ENDOCANABINOIDE ……..……66

FIGURA 15 - EFEITOS DO TRATAMENTO COM INIBIDOR HAT p300/CBP NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES CB_1 NO CÓRTEX PL…….75

FIGURA 16 - OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO NÃO É INFLUENCIADO PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES CB_1……...76

FIGURA 17 - OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL 1 H APÓS A EVOCAÇÃO É INFLUENCIADO PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES CB_1 IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO ……..77

FIGURA 18 - OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL 1 H APÓS A EVOCAÇÃO É INFLUENCIADO PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES CB_1 1 H APÓS A EVOCAÇÃO ……..79

FIGURA 19 - A ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES CB_1 IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO, NECESSÁRIA PARA PROMOVER O PREJUÍZO NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA, INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP, É INDEPENDENTE DE AEA ……..80

FIGURA 20 - A INIBIÇÃO DA FAAH 1 H APÓS A EVOCAÇÃO FACILITA O EFEITO DA INIBIÇÃO DA HAT P300CBP SOBRE A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA ……..…..81

FIGURA 21 - A ATIVIDADE DE CB1 E AEA 1 H APÓS A EVOCAÇÃO É ESSENCIAL PARA O PREJUÍZO DA RECONSOLIDAÇÃO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP……..90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%EBA	Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos
%TBA	Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AA	Ácido Araquidônico
acH3	Histona H3 acetilada
AEA	Anandamida ou N-araquidoniletanolamina
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiônico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BLA	Amígdala basolateral
BSA	Albumina de Soro Bovino
CaMKII	Cálcio-calmodulina quinase II
CBD	Canabidiol
CBP	Proteína de ligação à CREB
CC	Córtex cingulado
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CMC	Condicionamento de Medo ao Contexto
CPF	Córtex Pré-frontal
CPFm	Córtex Pré-frontal Medial
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
dACC	Córtex Cingulado Anterior Dorsal
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol Lipase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	DNA metiltransferase

DTP	Distância Total Percorrida
EBF	Entradas nos Braços Fechados
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo Incondicionado
EMT	Transportador de Membrana Endocanabinoide
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FAAH	Amida Hidrolase de Ácidos Graxos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
IL	Infra-límbico
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
LA	Amígdala Lateral
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTP	Potenciação de longa duração, do inglês "*long term potentiation*"
MAGL	Monoacilglicerol Lipase
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno
NAPE	N-araquidonoil fosfatidil etanolamina
NC	Número de Cruzamentos
NMDA	N-metil-D-aspartato
p300	Proteína de ligação a E1A
pCAF	Fator associado a p300/CBP
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKMζ	Proteína quinase M zeta
PL	Pré-límbico
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma

PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RC	Resposta condicionada
RNAm	RNA mensageiro
TBS-T	Solução Salina Tamponada com Tris e Tween 20
TCA	Teste de Campo Aberto
TEPT	Transtorno de Estresse Pós Traumático
THC	Δ9-tetrahydrocannabinol
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1
TSA	Tricostatina A
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VEI	Veículo
vmPFC	Córtex Pré-frontal Ventromedial

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO E SUA INFLUÊNCIA NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO18
1. INTRODUÇÃO 18
1.1 TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO 18
1.2 A FORMAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO 20
1.2.1 Condicionamento de Medo ao Contexto 22
1.3 RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO 23
1.4 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL 25
1.5 MECANISMOS EPIGENÉTICOS E SUA RELAÇÃO COM A MEMÓRIA 27
1.6 O PAPEL DAS HISTONAS ACETILTRANSFERASES E DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NA FORMAÇÃO E MODULAÇÃO DAS MEMÓRIAS 30
2. OBJETIVO 33
2.1 OBJETIVO GERAL 33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33
3 MATERIAIS E MÉTODOS 34
3.1 ANIMAIS 34
3.2 DROGAS 34
3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E INFUSÃO DE DROGAS 34
3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO 36
3.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO 37
3.6 TESTE DE CAMPO ABERTO 38
3.7 WESTERN BLOTTING 38
3.8 DESENHO EXPERIMENTAL 40
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 41
4 RESULTADOS 42

4.1 A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP IMEDIATAMENTE OU 1 H, MAS NÃO 6 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA, REDUZ O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NOS TESTES A_1 E A_2. 42

4.2 A REDUÇÃO DA PORCENTAGEM DE TEMPO DE CONGELAMENTO NO TESTE A_1 APÓS A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP É DEPENDENTE DA EVOCAÇÃO DE MEMÓRIA. 45

4.3 A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NÃO AFETA O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO OU A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS CONDICIONADOS, MAS AUMENTA O COMPORTAMENTO TIPO ANSIOGÊNICO EM RATOS NÃO CONDICIONADOS. 47

4.4 A ACETILAÇÃO DA HISTONA H3 AUMENTA NO CÓRTEX PL 120 MINUTOS APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E A INIBIÇÃO DO HAT p300/CBP PREVINE ESTE EFEITO. 50

5 DISCUSSÃO 52

5.1 A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP IMEDIATAMENTE OU 1 H, MAS NÃO 6 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA, PREJUDICA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA. 52

5.2 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP IMEDIATAMENTE OU 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA SÃO DEPENDENTES DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA. 56

5.3 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E ATIVIDADE LOCOMOTORA 57

5.4 O PAPEL DA ACETILAÇÃO DA HISTONA H3 E DA INIBIÇÃO DE p300/CBP NO CÓRTEX PL APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO... 59

6 CONCLUSÕES 62

CAPÍTULO 2 - O PAPEL DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA MODULAÇÃO DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO VIA ACETILAÇÃO DE HISTONAS 64

1 INTRODUÇÃO 64

1.1 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E SUA RELAÇÃO COM A FORMAÇÃO E MODULAÇÃO DAS MEMÓRIAS 64

1.2 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE COM O MECANISMO DE ACETILAÇÃO DE HISTONAS 67

2 OBJETIVO 69

2.1 OBJETIVO GERAL 69

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 69

3 MATERIAIS E MÉTODOS 70

3.1 ANIMAIS..... 70

3.2 DROGAS..... 70

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E INFUSÃO DE DROGAS 71

3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO 71

3.5 WESTERN BLOTTING..... 71

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL 72

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 74

4 RESULTADOS..... 74

4.1 A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NÃO ALTERA A EXPRESSÃO DE RECEPTORES CB_1 NO CÓRTEX PL..... 74

4.2 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO SÃO INFLUENCIADOS PELO BLOQUEIO IMEDIATO DOS RECEPTORES CB_1. 75

4.3 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA SÃO INFLUENCIADOS PELO BLOQUEIO IMEDIATO DOS RECEPTORES CB_1. 76

4.4 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA SÃO INFLUENCIADOS PELO BLOQUEIO TARDIO DOS RECEPTORES CB_1. 78

4.5 A INIBIÇÃO SUBEFICAZ DA HAT p300/CBP 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO É INFLUENCIADO PELA INIBIÇÃO IMEDIATA DA FAAH. 79

4.6 A INIBIÇÃO SUBEFICAZ DA HAT p300/CBP 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA É INFLUENCIADA PELA INIBIÇÃO TARDIA DA FAAH. 80

5 DISCUSSÃO 82

5.1 A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO ALTERA A EXPRESSÃO DE CB_1 NO CÓRTEX PL: O PAPEL DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NA MODULAÇÃO DE RECEPTORES CANABINOIDES. 82

5.2 ENTENDENDO COMO OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP É INFLUENCIADO PELO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES CB_1. 84

5.3 O AUMENTO DOS NÍVEIS DE AEA PODE ATUAR SINERGICAMENTE COM INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP SUBEFICAZ 87

6 CONCLUSÕES 89

CONSIDERAÇÕES FINAIS 91

REFERÊNCIAS 95

CAPÍTULO 1 - ACETILAÇÃO DE HISTONAS NO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO E SUA INFLUÊNCIA NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO

1. INTRODUÇÃO

A memória é um processo biológico necessário para o armazenamento e recuperação de informações. As memórias se diferem de acordo com a função, duração e conteúdo, podendo ser classificadas como declarativas ou não declarativas (Izquierdo, 2011). Memórias declarativas refletem as lembranças de fatos, eventos e conceitos que podem ser evocadas de forma consciente enquanto que memórias não declarativas podem ser evocadas de forma inconsciente, tal qual memórias motoras, associativas e não associativas (da Cunha; Sanchez-Luna; Pochapski, 2023). Quando associada a um componente emocional, seja ele agradável ou aversivo, a memória tende a ser mais facilmente lembrada. No entanto, quando relacionada a um evento traumático ou estressante pode levar a respostas de medo intensas e favorecer o desenvolvimento de transtornos cognitivos e psiquiátricos como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT). Por esta razão, compreender a neurobiologia da memória de medo é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento do TEPT.

1.1 TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

Estima-se que em torno de 70% da população mundial seja exposta a pelo menos um evento traumático durante a vida. Uma das consequências possíveis após vivenciar ou testemunhar eventos potencialmente traumáticos e estressantes é o desenvolvimento do TEPT. Acredita-se que em torno de 5,6% das pessoas que foram expostas ao trauma desenvolvem o TEPT, no entanto a probabilidade de desenvolver esse transtorno varia dependendo do tipo de evento traumático vivenciado, predisposição genética, região geográfica, entre outros fatores (Koenen *et al.*, 2017; OMS, 2024).

De acordo com o DSM-5-TR (*American Psychiatric Association*, 2023), o TEPT é caracterizado através de um grupo de 4 sintomas persistentes, que incluem sintomas intrusivos, evitação, alterações negativas na cognição e humor, e perturbação do sono ou hiperexcitação. Os sintomas intrusivos, como lembranças

angustiantes, pesadelos e *flashbacks* estão associados a formação de uma memória de medo mal-adaptativa que pode ser evocada e revivida de várias maneiras gerando uma resposta de medo intensa e generalizada. Além disso, as pessoas que desenvolvem o TEPT apresentam um risco elevado para o desenvolvimento de outras comorbidades como ansiedade, depressão e abuso de drogas (American Psychiatri Association, 2014; Hayes; Vanelzakker; Shin, 2012; Gazarini; Stern; Bertoglio, 2023).

Memórias envolvendo um componente emocional são naturalmente mais lembradas do que informações neutras (Hayes; Vanelzakker; Shin, 2012). No entanto, no TEPT é possível observar uma desregulação da sinalização de catecolaminas, glicocorticoides e do sistema endocanabinoide que favorece a formação de uma memória mais persistente (Hauer *et al.*, 2014). Sugere-se que a presença reduzida de endocanabinoides resulta em uma modulação inibitória prejudicada, o que leva a um aumento da secreção de neurotransmissores na fenda sináptica (Hauer *et al.*, 2014). Em contrapartida, o aumento de glicocorticóides e catecolaminas durante o estresse levam a uma potencialização da transmissão excitatória (Hauer *et al.*, 2014).

Além disso, pacientes com TEPT frequentemente apresentam alterações na atividade de regiões cerebrais envolvidas no processamento e expressão da memória de medo, como a amígdala, hipocampo, córtex cingulado anterior dorsal (dACC) e córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC). Em pacientes com TEPT a amígdala e o dACC, região homóloga ao córtex pré-límbico (PL) de ratos, encontram-se hiperativadas, enquanto o hipocampo e o vmPFC, região homóloga ao córtex infra-límbico (IL) de ratos, encontram-se hipoativados (Hayes; Vanelzakker; Shin, 2012; Kredlow *et al.*, 2021).

No Brasil, o “Caderno técnico de tratamento do transtorno de estresse pós-traumático” publicado pela Secretaria Nacional de Segurança Pública reconhece a terapia cognitivo-comportamental como principal tratamento para o TEPT, visto que tem se mostrado mais eficaz do que a farmacoterapia. No entanto, como o TEPT pode estar associado a sintomas de depressão e ansiedade, frequentemente estes pacientes são também tratados com antidepressivos da classe de inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS). Apesar dos esforços para reduzir os sintomas da doença, as terapias cognitivas comportamentais apresentam altas taxas de abandono e cerca de metade dos casos de TEPT tem uma reincidência a longo prazo (Kessler

et al., 2017). Em vista disso, buscar por fármacos que interfiram diretamente com a memória traumática e entender melhor a neurobiologia da memória de medo é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

1.2 A FORMAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

A memória é um processo biológico que possibilita o armazenamento e recuperação de informações relevantes (San Luis; Ryan, 2022). Quando as memórias são formadas a partir da exposição de um indivíduo a um evento aversivo, pode se formar uma memória de medo que desencadeia uma resposta de medo quando lembrada (Hayes; Vanelzakker; Shin, 2012).

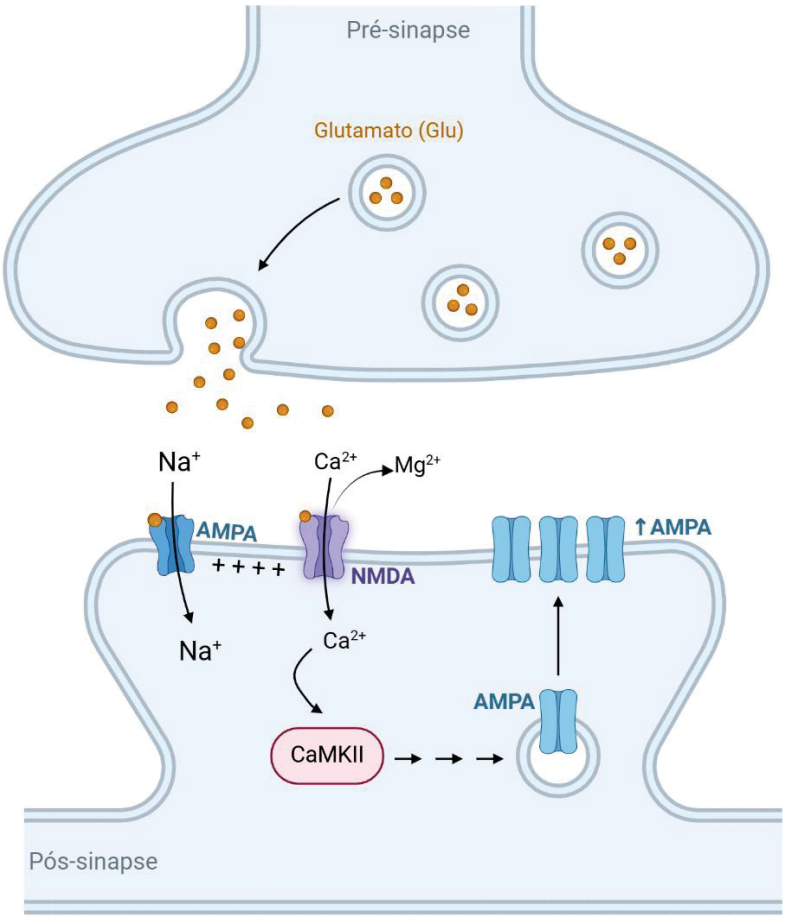
A aquisição da memória ocorre quando um episódio é vivenciado, levando ao armazenamento da mesma no cérebro. Inicialmente, esta memória fica disponível para uso, e, no caso de uma informação relevante, inicia-se um processo conhecido como consolidação, que permite a formação de uma memória de longo prazo (Dudai, 2004, San Luis; Ryan, 2022; da Cunha; Sanchez-Luna; Pochapski, 2023).

No início do século XX, foi proposto que as memórias são formadas a partir do recrutamento de um conjunto de neurônios (engrama), capazes de codificar uma determinada informação através do fortalecimento da conexão sináptica entre eles (San Luis; Ryan, 2022; da Cunha; Sanchez-Luna; Pochapski, 2023). De fato, durante o processo de consolidação da memória, que dura aproximadamente 6 horas, a depender do tipo e intensidade da memória, são iniciados mecanismos celulares envolvendo a despolarização de neurônios, liberação de neurotransmissores, recrutamento de receptores, fosforilação de proteínas e expressão gênica para estabilizar e fortalecer sinapses (Dudai, 2004; Shafe; Ledoux, 2000; Izquierdo, 2011).

Um dos mecanismos que conduz a consolidação da memória é a potencialização de longa duração (do inglês *long-term potentiation* - LTP). Conforme pode ser observado na Figura 1, a LTP inicia quando o glutamato liberado pela pré-sinapse ativa receptores ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiônico (AMPA). Por se tratar de receptores excitatórios, a ativação dos receptores AMPA leva ao influxo de Na^+ causando despolarização do neurônio pós-sináptico. O glutamato presente na sinapse também atua sobre os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)

pós-sinápticos, que através da despolarização promovida pela ativação de receptores AMPA e remoção do íon Mg^{2+} do receptor NMDA gera o influxo de Ca^{2+}. O aumento de cálcio intracelular estimula uma série de enzimas como a cálcio-calmodulina quinase II (CaMKII) que irá atuar no recrutamento de receptores AMPA para a sinapse a fim de facilitar a transmissão de impulsos posteriores (San Luis; Ryan, 2022; Izquierdo, 2011).

FIGURA 1 – LTP COMO MECANISMO MOLECULAR NA FORMAÇÃO DAS MEMÓRIAS.



LEGENDA: A figura ilustra uma sinapse glutamatérgica durante o processo de LTP. A ativação de receptores AMPA pelo glutamato leva a despolarização pós-sináptica e ativação do receptor NMDA, gerando um aumento da concentração de cálcio intracelular. O cálcio leva a ativação de CaMKII que irá atuar no recrutamento de novos receptores AMPA para a membrana com o objetivo de facilitar a transmissão sináptica. FONTE: A autora (2025).

Além disso, a ativação de receptores metabotrópicos leva ao aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e ativação de cascatas de sinalização por meio da proteína quinase A (PKA). A ativação desta cascata de sinalização resulta no recrutamento de fatores de transcrição e mecanismos epigenéticos para que haja expressão gênica e síntese de proteínas necessárias para promover o brotamento de

novas sinapses. Uma das proteínas importantes para a plasticidade sináptica, que também já mostrou estar envolvida na formação da memória, é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), estimulado a partir do aumento da fosforilação da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB; Izquierdo, 2011; Kandel, 2001). Evidências também sugerem que a ação dos sistemas noradrenérgico, glicocorticoide e endocanabinoide também são capazes de regular o processo de consolidação da memória (Hauer *et al.*, 2014; Gazarini *et al*., 2022).

Os processos de consolidação e expressão de memórias recentes estão relacionados à atividade do hipocampo e amígdala (Quinn *et al*., 2008; Albo; Graff, 2018). Após a aquisição da memória de medo ao contexto, o hipocampo se comunica com a amígdala basolateral (BLA) através de projeções glutamatérgicas (Careaga; Girardi; Sucheki, 2016). Com o passar do tempo este traço de memória torna-se mais dependente do neocórtex, como por exemplo o córtex PL e córtex cingulado (CC), sub regiões ativas na expressão da memória remota (Quinn *et al*., 2008; Peters; Kalivas; Quirk, 2009; Stern *et al*., 2013; da Silva *et al*., 2020a). Esse processo é conhecido como consolidação sistêmica e pode levar de meses a anos (Kitamura *et al*., 2017; da Cunha; Sanchez-Luna; Pochapski, 2023).

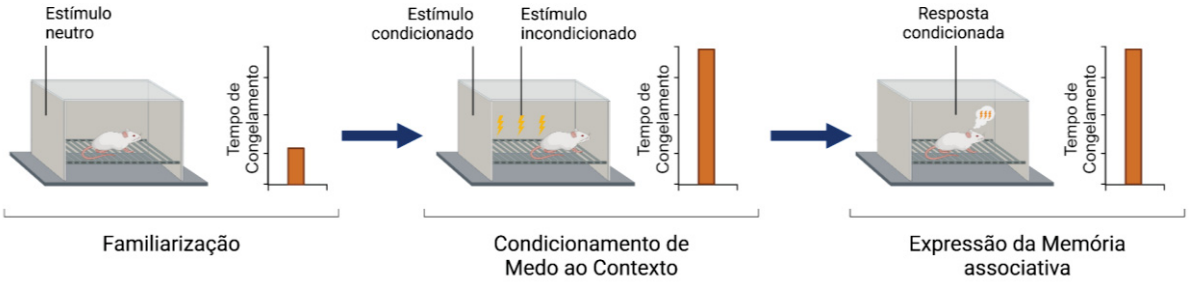
1.2.1 Condicionamento de Medo ao Contexto

A memória de medo pode ser estudada através do aprendizado associativo, como o condicionamento clássico, também conhecido como condicionamento Pavloviano. Este paradigma baseia-se na apresentação de um estímulo incondicionado (EI), capaz de induzir uma resposta aversiva de forma natural, como um choque, associado à exposição a um estímulo inicialmente neutro, como um contexto, um tom ou um odor. A associação entre o EI com o estímulo neutro, torna-o um estímulo condicionado (EC), resulta na formação de uma memória associativa e leva a expressão de uma resposta condicionada (RC) quando o animal é reexposto ao EC (Maren, 2001; Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016).

Um dos paradigmas muito utilizados para o estudo da memória de medo é o condicionamento de medo ao contexto (CMC). Neste protocolo, esquematizado pela Figura 2, o EI representa um ou mais choques nas patas, enquanto que o EC é o

próprio contexto. A RC padrão observada em protocolos envolvendo o CMC é o comportamento de congelamento, ou *freezing*, resultado de uma imobilidade generalizada dos músculos esqueléticos, exceto pelos utilizados na respiração (Maren, 2001; Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016).

FIGURA 2 - CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO



LEGENDA: Representação esquemática do CMC. Durante a sessão de familiarização o animal é exposto ao contexto (estímulo neutro), que não induz uma resposta aversiva, conforme pode ser observado pelo tempo de congelamento. Em seguida, durante o CMC a apresentação dos choques (EI) leva ao aumento do tempo de congelamento dos animais por ser naturalmente aversivo. Durante esta sessão o contexto, anteriormente neutro, passa a ser considerado um EC. A associação entre o EI e o EC leva a formação de uma memória associativa que pode ser expressa através da RC quando o animal é exposto no EC. A RC leva ao aumento do tempo de congelamento dos animais mesmo na ausência da apresentação do choque. FONTE: A autora (2025).

Já foi demonstrado que os parâmetros do EI podem influenciar na RC. Estudos anteriores demonstraram que quanto maior a intensidade ou número de choque durante o condicionamento, maior a RC no EC e em novos contextos, indicando um maior desenvolvimento da generalização da memória (Baldi; Lorenzini; Buscherelli, 2004; Santos *et al*., 2005; Daviu *et al*., 2024). Alem disso, nos protocolos de CMC já foi observado que pré-expor os animais ao contexto leva a um enriquecimento de informações deste estímulo neutro, o que gera uma melhor discriminação do contexto após o pareamento do EI com o EC. Além disso, esta familiarização ao EC antes do CMC, impede a generalização da memória em um contexto alterado (Biedenkapp; Rudy, 2007).

1.3 RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

Após consolidada uma memória de medo se evocada pode gerar uma resposta de medo (Hayes; Vanelzakker; Shin, 2012). Foi estudando este processo que Misain; Miller e Lewis (1968) descobriram que um choque eletroconvulsivo administrado após a apresentação de um EC era capaz de prejudicar a memória após

24 h. Alguns anos depois Lewis; Bregman e Mahan (1972) também verificaram que a evocação 7 dias após a aquisição também era capaz de ser prejudicada pelo choque eletroconvulsivo.

Apesar dessas descobertas, apenas após os estudos de Przybyslawski e Sara (1997) e Nader, Schafe e LeDoux (2000) houve um aumento nas investigações sobre intervenções pós-evocação, visto que esta etapa era suscetível a interferências farmacológicas. No estudo de Przybyslawski e Sara (1997) foi observado que uma memória espacial previamente consolidada poderia ser prejudicada quando administrado um antagonista dos receptores NMDA após a sua evocação. Além disso, pouco tempo depois, Nader, Schafe e LeDoux (2000) mostraram que a inibição da síntese proteica após a evocação também era capaz de prejudicar a memória de medo de maneira duradoura. Assim, tanto memórias de medo quanto memórias neutras poderiam ser modificadas, um processo que ficou conhecido como reconsolidação.

Hoje entende-se que a reativação da memória, frente a apresentações de pistas relacionadas à memória original, pode levar à desestabilização da memória, processo também conhecido como labilização ou desestabilização. A labilização torna esta memória passível de modificações, pois é necessário que ocorra um processo de reconsolidação, onde a memória é re-estabilizada para promover novamente o fortalecimento das sinapses e atualização da memória. Este processo de reconsolidação é sintetizado pela Figura 3 (Nader; Schafe; LeDoux, 2000; Kida, 2019).

FIGURA 3 - PROCESSO DE RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

LEGENDA: Representação esquemática do processo de reconsolidação da memória. Após a exposição a um episódio traumático (aquisição), um conjunto de neurônios é recrutado e uma série de mecanismos moleculares se iniciam para estabilizar o traço de memória. Após a estabilização ocorre a formação de uma memória de longa duração que pode ser evocada e labilizada, levando à desestabilização do traço de memória original. Após a labilização é necessário um processo de re-estabilização para que ocorra a reconsolidação da memória. Durante o processo de reconsolidação a memória pode ser atualizada, levando ao fortalecimento ou enfraquecimento da resposta de medo original. FONTE: A autora (2025).

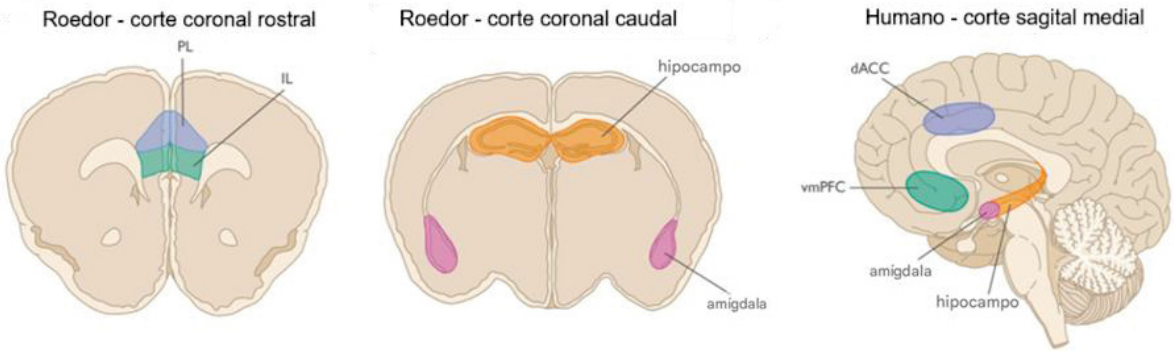
Reconhece-se que a reconsolidação da memória compartilha semelhanças com a consolidação e requer a ativação de receptores, ativação de cascatas de sinalização, recrutamento de fatores de transcrição e síntese de proteínas durante aproximadamente 6 horas após a reativação (Nader; Eirnarsson, 2010; Kida, 2019). Desde então diferentes drogas capazes de impedir ou enfraquecer os mecanismos necessários para a re-estabilização mostraram serem capazes de prejudicar a reconsolidação da memória de medo (Debiec; Ledoux; Nader, 2002; Bustos, Maldonado; Molina, 2006; Stern *et al*., 2014, 2015, 2017; da Silva *et al*., 2016, 2020a, 2020b; Daneluz *et al.*, 2022, Raymundi *et al.*, 2023).

Assim como na consolidação da memória, já foi demonstrado que após a evocação da memória há um aumento da expressão de fatores de transcrição como o CREB, NFkB eArc em regiões como o hipocampo dorsal e amígdala (Lee; Everitt; Thomas, 2004; De La Fuente; Freudenthal; Romano, 2011; Kim *et al.*, 2014). Além disso, já foi observado que há um aumento da expressão de Zif268, um marcador mais seletivo para a reconsolidação, no córtex PL e CC após a evocação da memória de medo contextual (Stern *et al.*, 2013; Bayer *et al.*, 2022). Apesar de memórias remotas serem consideradas menos susceptíveis a intervenções em comparação a memórias recentes (Albo; Graff, 2018; Nader; Schafe; Ledoux, 2000), já foi demonstrado que a administração de drogas diretamente nesta região, é capaz de alterar a reconsolidação da memória de medo recente e remota (Stern *et al.*, 2015; da Silva *et al.* 2020a, 2020b), destacando o papel da região do córtex PL para a reconsolidação da memória recente e remota.

1.4 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL

O córtex pré-frontal medial (CPFm) é uma região cerebral capaz de regular respostas emocionais em humanos e roedores, incluindo a formação e evocação da memória (Damasio *et al.*, 1995). O CPFm, região do neocórtex em ratos, é subdividido em três sub-regiões, sendo elas o CC, córtex PL e córtex IL (Heidbreder; Groenewegen, 2003). Conforme pode ser observado na Figura 4, os córtices PL e IL de ratos são regiões homólogas ao dACC e vmPFC de humanos, e juntos com o hipocampo e a amígdala, compõem regiões cerebrais para o processamento das memórias de medo (Kredlow *et al.*, 2021).

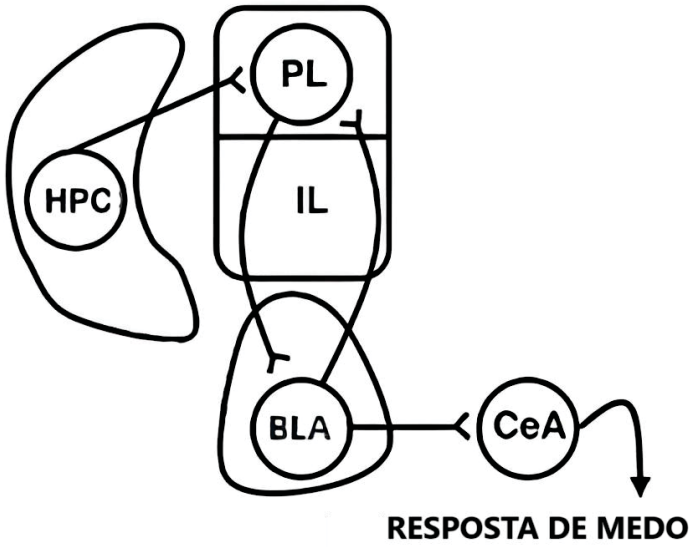
FIGURA 4 – REGIÕES CEREBRAIS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA



LEGENDA: Representação Esquemática das regiões cerebrais envolvidas na formação da memória. Os cortes coronais representam o cérebro de roedores e o corte sagital representa o cérebro humano. Em verde está representado o córtex PL, região homóloga ao dACC em humanos, em azul está representado o córtex IL, homólogo ao vmPFC, em amarelo está representado o hipocampo e em rosa a amígdala. FONTE: Adaptado de Kredlow *et al.* (2021).

A expressão da memória de medo remota, assim como o processo de reconsolidação dependem da atividade do córtex PL (Quinn *et al*., 2008; Stern *et al.*, 2013). Conforme esquematizado na Figura 5, o aumento da atividade desta região pode levar ao aumento da expressão da memória de medo, uma vez que estimula por meio de projeções excitatórias, a BLA. Além disso, o córtex PL recebe projeções excitatórias do hipocampo ventral e da BLA (Hoover; Vertes, 2007). Já foi demonstrado que o silenciamento das projeções do córtex PL para a BLA através de optogenética foi capaz de prejudicar a evocação da memória de medo (Do-Monte *et al*., 2015). Além disso, o recrutamento do córtex PL após a evocação da memória parece ser importante também para a reconsolidação da memória de medo, visto que inativar esta região com um agonista $GABA_A$ é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória de medo (Stern *et al.,* 2013).

FIGURA 5 – CONEXÕES DO CÓRTEX PL RESPONSÁVEIS POR AUMENTAR A RESPOSTA DE MEDO.



LEGENDA: Representação esquemática das projeções recebidas e enviadas do córtex PL. O córtex PL recebe projeções excitatórias no hipocampo e BLA. O córtex PL envia projeções excitatórias para a BLA, que levam a ativação da amígdala central, responsável por gerar a resposta de medo. FONTE: Adaptado de Sierra-Mercado; Padilla-Corean e Quirk (2011).

Estudos têm mostrado que a região do córtex PL também está envolvida em transtornos de ansiedade. Em estudos com animais, tanto a inativação do córtex PL, como a ativação dessa região, atua aumentando a exploração nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, sugerindo um papel ambíguo para o córtex PL na regulação de comportamentos relacionados à ansiedade (Stern et *al*., 2010; Green *et al*., 2020; Wang *et al*., 2015; Smoak *et al.,* 2024). Em humanos, a modulação do dACC parece depender do tipo de transtorno de ansiedade, com estudos mostrando que esta região pode estar hipoativada ou hiperativada (Cisler; Olantuji, 2012; Amir *et al*., 2005; Simmons *et al*., 2008; Bramson *et al*., 2023). Além de participar do processamento da memória de medo e na ansiedade, estudos tem sugerido também a participação do CPFm na discriminação de contextos seguros e aversivos (Vieira *et al*., 2014; Bailey *et al*., 2024).

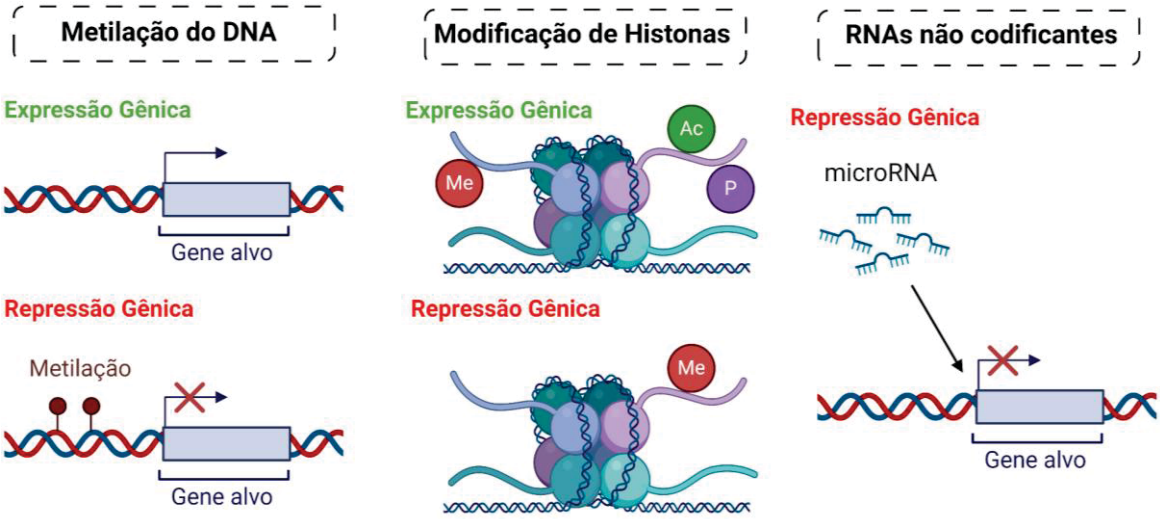
1.5 MECANISMOS EPIGENÉTICOS E SUA RELAÇÃO COM A MEMÓRIA

A consolidação e reconsolidação da memória requerem um processo de estabilização dependente da expressão gênica e síntese de proteínas (Dudai, 2004;

Nader *et al.*, 2000). Durante a re-estabilização necessária para a reconsolidação, a memória se torna temporariamente suscetível à interferência, permitindo a manutenção e ou atualização do traço de memória original (Przybyslawski; Sara, 1997; Nader; Schafe; LeDoux, 2000) Nesse contexto, interferir em mecanismos epigenéticos se mostra uma estratégia promissora para interromper a reconsolidação da memória.

Os mecanismos epigenéticos compreendem um conjunto de processos que permitem a modulação da expressão gênica em resposta a sinais fisiológicos e ambientais, assim como à experiência (Valor *et al.*, 2013; Day; Sweatt, 2011). Entre os mecanismos moleculares que podem levar a alterações epigenéticas estão a regulação da estrutura da cromatina por meio de modificações pós-traducionais de histonas, a metilação do DNA e a expressão de RNAs não codificantes conhecidos como microRNAs, conforme pode ser observado na Figura 6 (Day; Sweatt, 2011; Levenson; Sweatt, 2005).

FIGURA 6 - MECANISMOS EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA EXPRESSÃO GÊNICA



LEGENDA: Representação esquemática dos principais mecanismos epigenéticos e como eles podem alterar a expressão gênica. A Metilação do DNA é um processo que leva a incorporação de grupamentos Metil diretamente ao DNA levando a repressão gênica. A Modificação de Histonas pode compreender a acetilação, metilação ou fosforilação de proteínas histonas. Enquanto que a Acetilação leva a ativação da transcrição a metilação de histonas pode levar tanto a supressão como a ativação da transcrição. Já os RNAs não codificantes normalmente estão relacionados à repressão gênica. FONTE: A autora (2025).

A metilação do DNA consiste na adição de grupos metil para resíduos de citosina do DNA. Este processo é catalisado por enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs) e está associado a supressão da transcrição genética e

até silenciamento completo do gene associado (Day; Sweatt, 2011). Isso ocorre porque a metilação do DNA desencadeada pelas DNMTs se perpetua mesmo após a divisão celular (Roth; Sweatt, 2009).

Estudos têm mostrado que a metilação do DNA é um mecanismo capaz de regular a plasticidade e memória de animais através do bloqueio da LTP no hipocampo (Levenson *et al.*, 2006; Miller; Campbell; Sweatt, 2008). Além disso, a metilação do DNA é capaz de controlar a iniciação específica do sítio da transcrição do gene *bdnf* durante a formação da memória (Lubin; Roth; Sweatt, 2008). Nesse sentido estes estudos sugerem que a metilação do DNA é regulada dinamicamente no sistema nervoso, sendo uma etapa crucial na formação da memória.

As histonas são proteínas responsáveis por organizar o DNA de forma compacta em torno de nucleossomos dentro do núcleo. Os nucleossomos são formados por um octâmero de histonas contendo dois pares de histonas, H2A, H2B, H3 e H4. Além disso, a histona H1 está presente no núcleo com a finalidade de juntar nucleossomos uns aos outros para formar a cromatina, que pode existir como heterocromatina, forma condensada que suprime a transcrição, ou como eucromatina, forma relaxada que permite o acesso e ligação de fatores de transcrição ao DNA. Sugere-se que as caudas N-terminais das histonas se projetam além do DNA, ficando disponíveis para modificações pós-traducionais a fim de controlar o empacotamento da cromatina (Day; Sweatt, 2011; Zovkic; Sweatt, 2013; Kouzarides, 2007).

As histonas podem sofrer uma série de modificações, incluindo acetilação, fosforilação e metilação. A acetilação e fosforilação de histonas normalmente estão relacionadas ao aumento da expressão gênica, enquanto que a metilação da histona pode promover a transcrição ou suprimi-la, dependendo de qual resíduo da histona é modificado (Day; Sweatt, 2011; Zovkic; Sweatt, 2013; Kouzarides, 2007). Apesar da literatura abordar principalmente a acetilação, fosforilação e metilação, também existem outros tipos de modificações de histonas como ubiquitinação, sumoilação, ribosilação, deiminação e isomerização (Kouzarides, 2007). Estas modificações ocorrem em posições específicas da cromatina, de modo que são capazes de influenciar seletivamente a expressão genética (Day; Sweatt, 2012).

Já foi demonstrado que modificações como a acetilação, fosforilação e metilação são induzidas em processos de memória (Graff *et al.*, 2012; Levenson *et al*.

2004). Por exemplo, na consolidação de uma memória de reconhecimento de objetos houve um aumento transitório da fosforilação de H3 e acetilação de H3 e H4 no hipocampo, que persistiu por até 7 dias no córtex pré-frontal (CPF; Graff *et al.*, 2012). Além disso, já foi visto que as modificações pós-traducionais de histonas também são afetadas por memórias aversivas, como no protocolo de CMC que induziu níveis aumentados de acetilação, fosforilação e trimetilação no hipocampo (Levenson *et al*. 2004).

Os RNAs não codificantes, ou microRNAs são moléculas de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos transcritos pela RNA polimerase II e enviados para o citoplasma pela Exportina-5 onde são processados a microRNAs maduros. Seu mecanismo de ação se dá pela ligação com o RNA mensageiro (RNAm) alvo, promovendo uma regulação negativa de sua estabilidade e tradução. Ou seja, sua ligação ao RNAm impede a síntese de proteínas (Chuang; Jones, 2007). Estudos recentes propõem que os microRNAs circulantes poderiam ser usados como biomarcadores no TEPT. Isso porque já foi observado uma redução na expressão de microRNAs relacionados aos genes FKBP5 e *bdnf* no hipocampo de ratos (Wang; Ho; Tsai, 2022).

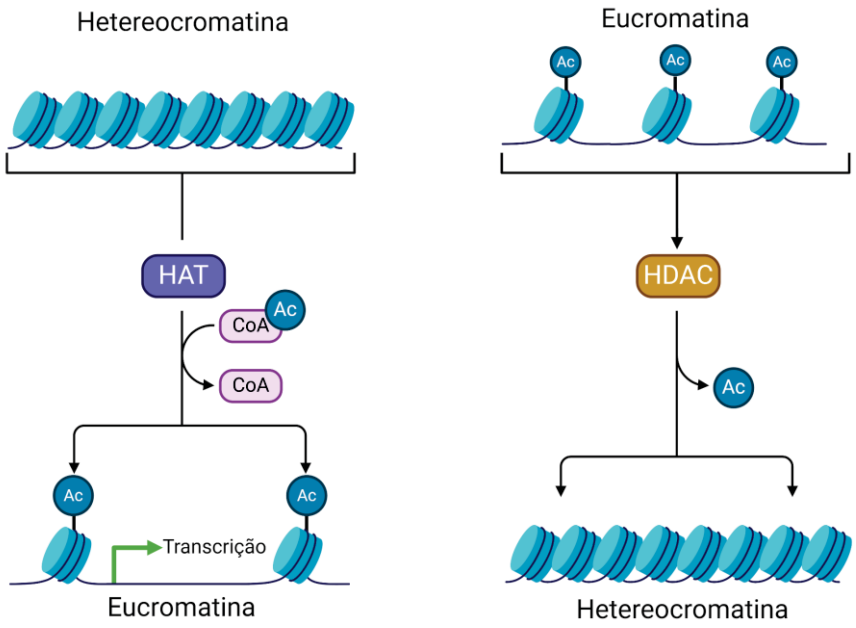
Em suma, diferentes mecanismos epigenéticos desempenham papéis fundamentais na regulação da expressão gênica e na plasticidade neuronal, o que pode contribuir diretamente para os processos de formação e manutenção da memória. Dessa forma, estes mecanismos podem ser alvos do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para transtornos relacionados à memória e ao aprendizado, como o TEPT.

1.6 O PAPEL DAS HISTONAS ACETILTRANSFERASES E DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NA FORMAÇÃO E MODULAÇÃO DAS MEMÓRIAS

A modificação pós-traducional de histonas mais reconhecida, ocorre pela acetilação de resíduos de lisina. Conforme pode ser observado na Figura 7, a histona acetiltransferase (HAT) é a enzima responsável por transferir um grupamento acetil da acetil-CoA para o grupamento amina da histona. Este processo leva a mudança da conformação da cromatina para eucromatina, tornando possível a ligação de fatores de transcrição ao DNA e aumento da expressão gênica. Por se tratar de um processo reversível, a enzima histona desacetilase (HDAC) catalisa a remoção de grupos acetil

dos resíduos de lisina, modificando a conformação da cromatina para heterocromatina e suprimindo a expressão gênica (Day; Sweatt, 2011). Importante ressaltar que este processo de acetilação de histonas ocorre de maneira direcionada para regiões específicas da cromatina, sendo capaz de selecionar genes específicos para serem transcritos, como *Bdnf, Arc, Fosb, Cdk5* (Day; Sweatt, 2012; Zovkic; Sweatt, 2013).

FIGURA 7 - O PROCESSO DE ACETILAÇÃO E DESACETILAÇÃO DE HISTONAS.



LEGENDA: Representação esquemática do processo de acetilação e desacetilação de histonas. A acetilação de histonas é promovida pela ação da HAT que transferem um grupamento acetil da acetil-CoA para caudas lisinas presentes na proteínas histonas. Esse processo de acetilação leva a expressão da eucromatina que permite que ocorra transcrição. O processo de desacetilação é promovido pela ação de HDACs que vão promover a retirada do grupo acetil das histonas, mudando a conformação da cromatina para heterocromatina e impedindo que ocorra expressão gênica. FONTE: A autora (2025).

O processo de acetilação de histonas pode ser recrutado pela transdução de sinais intracelulares. Uma das proteínas responsáveis por promover a acetilação de histonas e modificar o empacotamento da cromatina é a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que leva ao recrutamento da MAPK, que consequentemente, fosforila CREB. CREB leva ao recrutamento da proteína de ligação à CREB (CBP), um coativador transcricional com atividade HAT (Swank; Sweatt, 2001). Além disso, já foi observado que o NF-κB também é um fator de transcrição que recruta a atividade de HAT para promover a expressão gênica (Lubin; Sweatt, 2007). Importante notar que o aumento destes fatores de transcrição já foi relacionado aos processos de consolidação da memória (Lee; Everitt; Thomas, 2004; De La Fuente; Freudenthal;

Romano, 2011; Kim *et al.*, 2014). Portanto, é viável sugerir que durante a formação da memória de medo esses fatores de transcrição levam ao aumento da acetilação de histonas.

As vias de sinalização levam ao recrutamento de diferentes HATs. Entre elas, podemos citar a CBP, a proteína de ligação a E1A (p300) e o fator associado a p300/CBP (PCAF; Zovkic; Sweatt, 2013). Já foi observado que há aumento da atividade de CBP após a consolidação da memória (Ranjan *et al.,* 2017; Bousiges *et al*., 2010). A eliminação total ou parcial de HATs, como PCAF, p300 ou CBP, prejudica a consolidação de vários tipos de memória, incluindo memória espacial, memória de reconhecimento de objetos, memória de localização de objetos, memória de medo ao contexto e da memória de condicionamento ao som (Korzus; Rosenfeld; Mayford, 2004; Alarcon *et al.*, 2004; Valor *et al*., 2011; Duclot *et al*., 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Vieira; Korzus, 2016).

Interferir na expressão das HATs é capaz de prejudicar a formação e manutenção das memórias pois se tratam de enzimas que interferem diretamente com o processo de acetilação de histonas. A acetilação das histonas H2A, H2B, H3 e H4 foi extensivamente estudada, sendo capazes de prejudicar a formação de memórias de localização de objetos e medo contextual (Barret *et al*., 2011; Valor *et al.,* 2011). No contexto da reconsolidação, as pesquisas se concentram principalmente nas histonas H3 e H4. Estudos mostraram que alterações na acetilação da histona H3, em regiões cerebrais como o hipocampo, a amígdala e o CPFm, podem alterar a memória durante o processo de reconsolidação de diversos tipos de memória, incluindo memória espacial, memória de medo ao contexto, memória de condicionamento ao som e memórias relacionadas ao uso de drogas (Villain; Florian; Roullet, 2016; Graff *et al*., 2014; Federman; Fustiñana; Romano, 2012; Maddox *et al.*, 2013; Maddox; Watts; Schafe, 2013; Monsey; Sanchez; Taylor, 2017; Dunbar; Taylor, 2017; Cheng et al., 2024). Além disso, estudos já mostraram que inibidores da HAT administrados na amígdala lateral (LA) ou sistemicamente interrompem a reconsolidação da memória de condicionamento ao som (Maddox *et al*., 2013; Maddox; Watts; Schafe, 2013).

Apesar das evidências que relacionam o aumento da acetilação de histonas à consolidação e reconsolidação da memória, o papel das HATs na memória de medo ao contexto e no TEPT permanece pouco explorado. Estudos clínicos que investigam

o envolvimento de mecanismos epigenéticos em pacientes com TEPT têm se concentrado principalmente na metilação do DNA e das histonas, com atenção mínima às enzimas que regulam a acetilação das histonas (Al Jowf *et al*., 2021; Boks *et al.,* 2016; Kaminsky *et al*., 2015; Maddox *et al*., 2017). Além disso, os estudos pré-clínicos estudando o envolvimento da HAT p300 e CBP na acetilação de histonas em memórias de medo se concentraram em entender o papel de regiões como hipocampo e amígdala.

Sendo assim, entender melhor como o processo de acetilação de histonas pode ser afetado pela inibição da HAT p300/CBP no córtex PL, assim como seu papel na reconsolidação da memória de medo ao contexto é fundamental para entender melhor a neurobiologia da memória de medo e levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento do TEPT. Nossa hipótese é que a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL prejudica a reconsolidação da memória de medo no início da janela de reconsolidação. Além disso, hipotetizamos que há um aumento da acetilação de histonas no córtex PL após a evocação da memória de medo ao contexto e que a inibição da HAT p300/CBP diminui os níveis de acetilação da histona H3 no córtex PL.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inibição da HAT p300/CBP no córtex PL sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da inibição da HAT p300/CBP na reconsolidação da memória de medo, por meio da administração de C646 no córtex PL em diferentes intervalos (imediatamente, 1 hora e 6 horas) após a sessão de evocação da memória.

Determinar se o efeito da inibição da HAT p300/CBP no córtex PL é dependente da reativação da memória.

Avaliar se a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL influencia comportamentos semelhantes à ansiedade e a atividade locomotora, tanto em animais condicionados quanto em não condicionados ao medo.

Analisar se a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL, após a sessão de evocação, altera os níveis de acetilação da histona H3 e os níveis totais de histona H3 nesta região.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos adultos, com idades entre 11 e 14 semanas de vida e peso entre 350 e 400 g, foram obtidos do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e alojados em grupos de quatro em gaiolas de policarbonato (48 × 37 × 21 cm). Os animais tiveram acesso *ad libitum* a comida e água e foram mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C) com um ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7:00 da manhã e apagadas às 7:00 da noite). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com número de autorização 1209.

3.2 DROGAS

C646 (Sigma, EUA), um inibidor da HAT p300/CBP, foi diluído em uma solução veículo (VEI) contendo salina (0,9% NaCl) com 50% de dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações de 0,25 µg/µL e 0,025 µg/µL, para infusão no córtex PL de 5 e 50 ng/0,2 µL/hemisfério.

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E INFUSÃO DE DROGAS

Os animais foram pesados individualmente e anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administradas por via intraperitoneal. Em seguida,

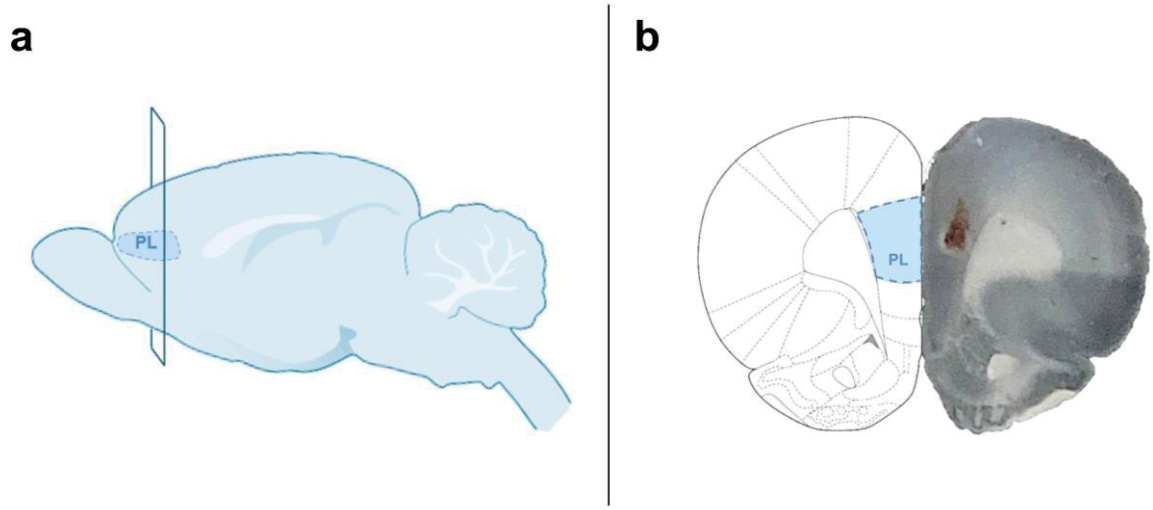
os animais, já profundamente anestesiados, foram posicionados no aparelho estereotáxico, com as cabeças fixadas pelo osso temporal e pelos incisivos superiores. Após a assepsia local com álcool iodado a 2% e a aplicação de 0,2 mL de anestésico local (lidocaína 2,0% com fenilefrina 1:2500; SSWhite, Brasil), para promover analgesia e vasoconstrição, minimizando o sangramento no local, foi realizada uma incisão para exposição da calvária e remoção do periósteo por raspagem. Com o auxílio de uma broca odontológica, foram perfurados dois orifícios intracranianos, um na região mais anterior e outro na região posterior em relação ao bregma, para fixação de microparafusos de aço inoxidável. Para a introdução das cânulas-guia bilaterais, confeccionadas em aço inoxidável (11,0 x 7,0 mm) e direcionadas ao córtex PL, foram perfurados dois orifícios orientados a partir das coordenadas descritas por Paxinos e Watson (2009), sendo elas: +3,0 mm no eixo ântero-posterior (relativo ao bregma), ±0,5 mm no eixo médio-lateral e -1,8 mm no eixo dorso-ventral. As cânulas-guia foram fixadas na calota craniana por meio de uma resina acrílica autopolimerizável, e, para prevenir a sua oclusão, um mandril de aço inoxidável foi colocado em cada uma delas. Após a cirurgia, os animais receberam 0,4 mL de ibuprofeno por via oral (20 mg/mL) e uma solução de 0,2 mg/mL de ibuprofeno solubilizado na água dos bebedouros por dois dias.

Os experimentos começaram dez dias após a cirurgia estereotáxica, período estabelecido para a recuperação dos animais. Em diferentes tempos após a reativação da memória, os animais receberam a administração bilateral das drogas, através da introdução de agulhas gengivais (diâmetro externo = 0,3 mm) nas cânulas-guia até que suas pontas atingissem 2,2 mm abaixo da extremidade da cânula. Durante 1 minuto, foram infundidos 0,2 µL das drogas por hemisfério, utilizando microseringas conectadas a uma bomba de infusão (Insight, Brasil). Um cateter de polietileno foi conectado entre a extremidade superior da agulha e a microseringa, e o movimento de uma bolha de ar dentro do polietileno foi utilizado para monitorar o fluxo da droga.

Para avaliar o local de infusão das drogas, após a conclusão de cada experimento, os ratos foram submetidos a uma anestesia profunda e receberam 0,2 µL/hemisfério de corante Azul de Metileno infundido no córtex PL, por meio das cânulas-guia. Em seguida, o cérebro foi removido e imerso em uma solução de formalina a 10%. Fatias de cérebro com 100 µm de espessura foram obtidas em um

vibrátomo (Leica, Alemanha), colocadas em lâminas histológicas, e o local da injeção foi determinado. Conforme pode ser observado na Figura 8b, somente animais com ambos os lados do córtex PL marcados foram incluídos na análise.

FIGURA 8 - DISSECÇÃO DA ÁREA CEREBRAL PARA WESTERN BLOTTING E LOCAL REPRESENTATIVO DE INFUSÃO NO CÓRTEX PL



LEGENDA: (a) Seção sagital esquemática representando o córtex PL com coordenadas baseadas no atlas do cérebro de ratos (AP = +5,16 a +2,52 mm do bregma). (b) Esquerda: Seção coronal esquemática adaptada de Paxinos e Watson (2009), ilustrando o córtex PL. Direita: Local de infusão representativo da administração do C646 no córtex PL com coordenadas (AP = +3,0 mm do bregma, ML = ±0,5 mm da sutura central, DV = -4,0 mm da superfície do crânio).

3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

O CMC foi realizado no Contexto A (EC), uma caixa retangular (35 × 20 × 30 cm) com paredes laterais de alumínio, parede frontal e tampa superior feitas de acrílico transparente. O Contexto A também possuía um piso de grade composto por barras de aço inoxidável, conectadas a um gerador de choque (Insight, Brasil). Já o Contexto B, utilizado como contexto neutro, era formado por paredes e piso de acrílico transparente, coberto com uma tampa preta (33 × 34 × 26 cm).

Os experimentos foram realizados entre 12 e 18 horas, em uma sala com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e iluminação ajustada. Antes dos experimentos, os animais foram mantidos por pelo menos 30 minutos em uma sala adjacente para ambientação.

O CMC foi conduzido conforme metodologia previamente descrita pelo grupo (Stern *et al*., 2017; da Silva *et al.* 2020a, 2020b). No dia 1, cada rato foi colocado

individualmente no Contexto A por 3 minutos para uma sessão de familiarização. Após a livre exploração, os animais retornaram às suas caixas de moradia.

No dia 2, os ratos foram reexpostos ao Contexto A para a sessão de condicionamento de medo. Nessa sessão, os animais receberam a apresentação do EI, que consistiu em 3 choques nas patas (0,8 mA/3 s), com intervalos de 30 segundos entre eles. Após o último choque, o animal permaneceu na caixa por mais 30 segundos, totalizando 2 minutos de sessão.

Após 24 horas, um grupo de animais foi submetido individualmente a uma sessão de evocação da memória no Contexto A por 3 minutos, sem a apresentação do EI, para induzir a reconsolidação da memória. Outro grupo foi exposto ao Contexto B por 3 minutos, em uma sessão de omissão da evocação, para prevenir a reativação e a reconsolidação da memória. Os tratamentos foram administrados em diferentes tempos após essas sessões.

Para avaliar os efeitos dos tratamentos, os animais foram reexpostos ao Contexto A após 1 e 7 dias, nos Testes A_1 e A_2, respectivamente. Para investigar a generalização da memória do medo, 24 horas após os Testes A_1 e A_2, os animais foram expostos ao Contexto B por 3 minutos, nos Testes B_1 e B_2.

A porcentagem de tempo de congelamento (definido como a ausência completa de movimentos, exceto os respiratórios) foi registrada manualmente por um experimentador treinado e utilizado como medida de retenção da memória de medo (Blanchard; Blanchard, 1969).

3.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O comportamento semelhante à ansiedade foi avaliado utilizando o labirinto em cruz elevado (LCE). O LCE é um aparato de madeira composto por dois braços fechados (50 × 10 × 40 cm) e dois braços abertos (50 × 10 × 0,6 cm), dispostos em forma de cruz e separados por uma plataforma central (10 × 10 cm), elevada 50 cm acima do chão.

Os animais foram colocados na plataforma central, voltados para um braço fechado, e tiveram 5 minutos para explorar o labirinto. Os testes foram gravados por uma câmera posicionada acima do aparato e analisados manualmente por um experimentador treinado. As medidas analisadas incluíram o tempo gasto em cada braço e o número de entradas em cada braço. Para contabilizar o tempo gasto e o número de entradas nos braços aberto e fechado, considerou-se que o animal deveria estar completamente dentro do braço, com todas as quatro patas.

A partir destas medidas foram calculados a porcentagem de tempo nos braços abertos {%TBA; [(tempo nos braços abertos/300) × 100]} e a porcentagem de entradas nos braços abertos {%EBA; [entradas nos braços abertos/(entradas de braços abertos + fechados) × 100]}. A %TBA e a %EBA foram utilizados como parâmetros de comportamento tipo-ansioso. O número de entradas nos braços fechados (EBF) foi utilizado como um índice geral de atividade locomotora.

3.6 TESTE DE CAMPO ABERTO

O comportamento locomotor foi avaliado utilizando o teste de campo aberto (TCA). O aparato consiste em uma arena quadrada preta (60 × 60 × 30 cm), dividida em nove seções de tamanho igual (quadrantes).

Os ratos foram colocados no centro do aparato e tiveram 5 minutos para explorá-lo. O número de cruzamentos (NC) foi registrado por um experimentador treinado sempre que o animal entrava em um novo quadrante com todas as quatro patas. A distância total percorrida (DTP, em centímetros) foi mensurada e analisada utilizando o software Ethovision (Noldus Information Technology, Inc., Holanda). Tanto o NC quanto a DTP foram utilizados como índices de atividade locomotora.

3.7 WESTERN BLOTTING

Os animais foram submetidos à reativação da memória e, imediatamente ou 1 hora após essa sessão, receberam a infusão de C646 50 ng/0,2 uL/hemisfério ou VEI. A partir das coordenadas Paxinos e Watson (2009; AP = +5,16 a +2,52 mm de

bregma; Figura 8A), amostras do córtex PL foram coletadas 60 minutos após o tratamento, o que corresponde a 60 ou 120 minutos após a reativação da memória, dependendo do momento da infusão. Amostras de animais *Sham* foram utilizadas para avaliação da expressão basal de proteínas. Os tecidos coletados foram imediatamente armazenados a -80°C. A partir do tecido coletado foi realizado a extração de proteínas através da sonicação em 0,3 mL de tampão de solubilização (10 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 7,5, Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor e 1% Triton X-100), seguido de centrifugação (12.000 rpm a 4 °C por 20 min) para remover o material insolúvel. O Bradford Protein Assay (Bio-Rad, EUA) foi utilizado para determinar a concentração de proteína do sobrenadante colorimetricamente. Os extratos de proteína foram desnaturados por fervura a 100 ºC em tampão Laemmli, contendo 200 mM de ditiotreitol por 5 minutos. Os extratos (em volumes correspondentes a 25 µg de proteína) foram separados por SDS-PAGE contendo 14% de poliacrilamida e transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad, EUA). As membranas foram bloqueadas com 3% de albumina de soro bovino (BSA; Sigma, EUA) em solução salina tamponada com Tris e Tween 20 (TBS-T) por 1 hora. Subsequentemente, eles foram incubados durante a noite a 4 °C um dos seguintes anticorpos primários: anti-Acetil-Histona H3 (K9/K14) (Cell Signaling Technology; #9677; 1:1000), anti-Histona H3 (Cell Signaling Technology; #14269; 1:1000) ou anti-Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (GAPDH) (Santa Cruz Biotechnology; sc-32233; 1:2500), diluídos em TBS-T com 3% de BSA. O anticorpo secundário anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology m-IgGκ BP-HRP: sc-516102; 1:5000) ou IgG-HRP de cabra anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology; sc-2004; 1:5000) foram diluídos em TBS-T com 1% de BSA e foram incubados por 1 hora. A quimioluminescência foi empregada para visualizar as membranas usando o substrato ECL Western Blotting (Bio-Rad, EUA). A análise quantitativa foi realizada por densitometria usando o software Scion Image Beta 4.03 para Windows (Scion Corporation, EUA). As intensidades foram normalizadas para valores correspondentes para a expressão de do controle de carga (GAPDH). As amostras foram excluídas da análise caso a membrana tivesse sido cortada erroneamente, resultando na perda da banda de GAPDH.

3.8 DESENHO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Efeitos da inibição da HAT p300/CBP imediatamente, 1 h ou 6 h após a evocação da memória de medo.

Para investigar se a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL afeta a reconsolidação da memória, os animais foram submetidos a uma sessão de reativação no Contexto A e, em seguida, aleatoriamente alocados para receber infusões de VEI, C646 5 ou C646 50 ng/0,2 µl/hemisfério no córtex PL. As infusões foram realizadas imediatamente, 1 h ou 6 h após a sessão de evocação (8-12 animais por grupo). Os testes A_1 e A_2 foram realizados com 1 e 7 dias de intervalo da sessão de evocação, respectivamente. Os testes B_1 e B_2 foram realizados 1 dia após os testes A_1 e A_2, respectivamente (Figura 9A).

Experimento 2: Efeitos da inibição da HAT p300/CBP imediatamente ou 1 h após a omissão da reativação.

Para determinar se os efeitos da inibição da HAT p300/CBP dependem da reativação da memória, grupos independentes de animais condicionados ao contexto foram submetidos à omissão da reativação. Imediatamente ou 1 h após a omissão, os animais receberam infusões de VEI ou C646 50 ng/0,2 µl/hemisfério no córtex PL (7 animais por grupo). O teste A_1 e o teste B_1 foram realizados 1 e 2 dias após a sessão de evocação, respectivamente (Figura 10A).

Experimento 3: Efeitos da inibição da HAT p300/CBP na ansiedade e atividade locomotora.

Para avaliar se a inibição da HAT p300/CBP está associada a alterações no comportamento tipo-ansioso ou atividade locomotora, os animais foram divididos em três grupos: (1) não condicionados, que receberam VEI ou C646 (50 ng/0,2 µl/hemisfério) no córtex PL; (2) condicionados, que receberam VEI ou C646 imediatamente após a evocação; e (3) condicionados, que receberam VEI ou C646 1 h após a evocação. Após 24 horas do tratamento, todos os grupos foram testados no LCE e no TCA, com um intervalo de 5 minutos entre os testes, seguindo o alinhamento temporal do Teste A_1 do Experimento 1 (Figura 11A).

Experimento 4: Efeitos da inibição da HAT p300/CBP nos níveis de histona H3 total, e histona H3 acetilada (acH3) no córtex PL.

Animais condicionados ao contexto foram aleatoriamente alocados para receber VEI ou C646 50 ng/0,2 µl/hemisfério no córtex PL imediatamente ou 1 h após a sessão de reativação no Contexto A. Os animais foram sacrificados 60 minutos após o tratamento, e amostras do córtex PL foram coletadas para avaliar os níveis de histona H3 total e histona H3 acetilada (acH3) por meio de Western blotting. Um grupo adicional de animais *sham* (não condicionados) teve o córtex PL coletado para estabelecer os níveis basais de expressão proteica (Figura 12A).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra *a priori* foi calculado usando G-Power (HHU: Universität Düsseldorf, Alemanha) e definido em 8 animais por grupo para ANOVA de uma via (usado em análises moleculares) e 12 animais por grupo para ANOVA de medidas repetidas (usado em experimentos comportamentais), com parâmetros de $\alpha = 0,05$, $\beta = 0,8$ e $\eta^2 = 0,2$, com base em grandes tamanhos de efeito relatados em estudos anteriores. Para o teste t de Student, o tamanho foi de 8 animais por grupo com parâmetros de $\alpha = 0,05$, $\beta = 0,8$ e Cohen d = 1,6. Apesar do tamanho da amostra ter sido calculado previamente, é possível observar diferenças entre os grupos devido a perdas experimentais, como infusão fora da região cerebral alvo.

Após confirmar a normalidade dos dados usando o teste de Shapiro-Wilk, os dados comportamentais e moleculares foram submetidos a testes estatísticos apropriados com base no delineamento experimental. Para dados não normais, transformações sqrt(Y) foram aplicadas para atingir a normalidade antes da análise. O teste t de Student não pareado, ANOVA de uma via ou de medidas repetidas foram selecionados para análise. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p \leq 0,05$. O teste *post hoc* de Newman-Keuls foi usado para comparações múltiplas. O tamanho do efeito foi avaliado usando o eta quadrado parcial (η^2) para ANOVA de uma via ou de medidas repetidas, e d de Cohen (d) para o teste t de Student. Foi considerado um tamanho de efeito pequeno para $\eta^2 = 0,01$ e d = 0,2, médio para $\eta^2 = 0,06$ e d = 0,5, e grande para $\eta^2 = 0,14$ e d = 0,8.

Os resultados são apresentados como média ± EPM, juntamente com pontos de dados individuais. Todas as análises estatísticas foram conduzidas usando Statistica 12 (StatSoft, EUA), e a representação gráfica foi realizada com GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP IMEDIATAMENTE OU 1 H, MAS NÃO 6 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA, REDUZ O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NOS TESTES A_1 E A_2.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre o tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(4, 48) = 6,878$, $p = 0,0002$, $\eta^2 = 0,364$] quando os animais foram tratados imediatamente após a evocação da memória de medo. Durante a sessão de evocação, todos os grupos apresentaram uma porcentagem semelhante de tempo congelamento. No dia seguinte, o *post hoc* de Newman-Keuls demonstrou que os animais tratados com C646 50 ng imediatamente após a evocação da memória expressaram uma menor porcentagem de tempo de congelamento em comparação aos controles no Teste A_1 e Teste A_2 (Figura 9B). Além disso, a ANOVA de medidas repetidas revelou que não há interação significativa entre o tratamento e a exposição ao Contexto B quando os animais receberam o tratamento imediatamente após a sessão de evocação [$F(2, 24) = 1,108$, $p = 0,170$, $\eta^2 = 0,137$] e nenhuma diferença foi observada entre os grupos no Teste B_1 ou Teste B_2 (Figura 9C).

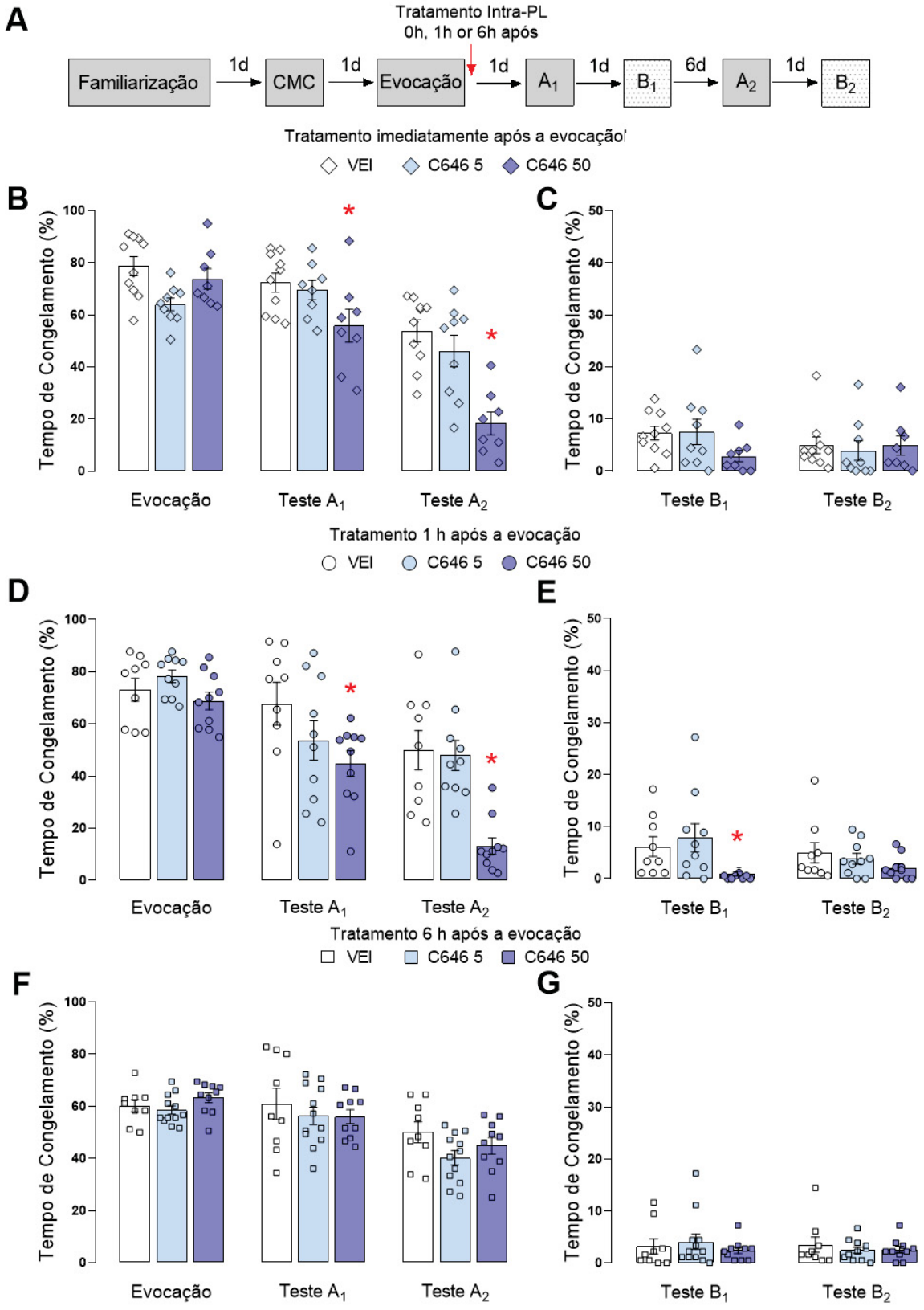
Similarmente ao observado com o tratamento imediatamente após a sessão de evocação, quando os animais receberam o tratamento 1 h após a sessão de evocação, a ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre o tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(4, 52) = 6,070$, $p = 0,0004$, $\eta^2 = 0,318$]. Novamente, é possível observar que todos os grupos apresentaram uma porcentagem semelhante de tempo congelamento durante a sessão de evocação (Figura 9D). No Teste A_1, o *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que os animais tratados com C646 50 ng 1 h após a sessão de evocação exibiram uma menor porcentagem de tempo de congelamento em comparação aos controles, e esse efeito durou pelo menos 7 dias, conforme observado no Teste A_2 (Figura 9D). No Contexto B, apesar da ANOVA de

medidas repetidas revelar que não há interação significativa entre o tratamento e a exposição ao Contexto B [$F(2, 26) = 2,188$, $p = 0,132$, $\eta^2 = 0,144$], pode ser observado um efeito significativo do tratamento durante a exposição ao Contexto B [$F(2, 26) = 5,022$, $p = 0,0143$, $\eta^2 = 0,279$]. Durante o Teste B_1, o *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que os animais tratados com C646 50 ng 1 h após a sessão de evocação exibiram uma porcentagem de tempo de congelamento reduzida em comparação aos controles (Figura 9E). No entanto, esse efeito não foi observado no Teste B_2 (Figura 9E).

Em contraste com os efeitos observados anteriormente, a ANOVA de medidas repetidas mostrou que não há interação entre o tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(4, 56) = 1,189$, $p = 0,326$, $\eta^2 = 0,078$] quando o tratamento foi administrado 6 h após a sessão de evocação. Além disso, a ANOVA de medidas repetidas revelou que não há interação significativa entre o tratamento e a exposição ao Contexto B quando o C646 foi administrado 6 h após a sessão de evocação [$F(2, 27) = 0,53567$, $p = 0,59137$, $\eta^2 = 0,038$]. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos durante qualquer sessão realizada neste ponto de tempo (Figura 9F e 9G).

Esses achados sugerem que a atividade da HAT p300/CBP no córtex PL, é crucial para a reconsolidação da memória de medo até 1 hora após a evocação. Em contraste, os resultados sugerem que a atividade da HAT p300/CBP no córtex PL, não desempenha um papel significativo 6 horas após a evocação. Além disso, os achados apoiam o potencial do inibidor da HAT p300/CBP administrado 1 hora após a evocação na melhora da discriminação contextual.

FIGURA 9 – A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL IMEDIATAMENTE OU 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA PREJUDICA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA.



LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) A infusão de C646 50 ng no córtex PL imediatamente após a evocação reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste A_1 e o Teste A_2. (C) A inibição da HAT p300/CBP no córtex PL imediatamente após a recuperação não alterou a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste B_1 e o Teste B_2. (n: VEI = 10; C646 5 ng = 9; C646 50 ng = 8). (D) A infusão de C646 50 ng no córtex PL 1 h após a evocação reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste A_1 e o Teste A_2. (E) A infusão de C646 50 ng no córtex PL 1 h após a evocação reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste B_1. Nenhuma alteração foi observada durante o Teste B_2. (n: VEI = 9; C646 5 ng = 10; C646 50 ng = 10). (F) A infusão de C646 5 e 50 ng no córtex PL 6 h após a evocação não afetou o tempo de congelamento durante o Teste A_1 e o Teste A_2. (G) A inibição da HAT p300/CBP no córtex PL 6 h após a evocação não afetou o comportamento de congelamento durante o Teste B_1 e o Teste B_2. (n: VEI = 9; C646 5 ng = 12; C646 50 ng = 10. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados são expressos como média ± EPM e os valores individuais. O * significa $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle da sessão.

4.2 A REDUÇÃO DA PORCENTAGEM DE TEMPO DE CONGELAMENTO NO TESTE A_1 APÓS A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP É DEPENDENTE DA EVOCAÇÃO DE MEMÓRIA.

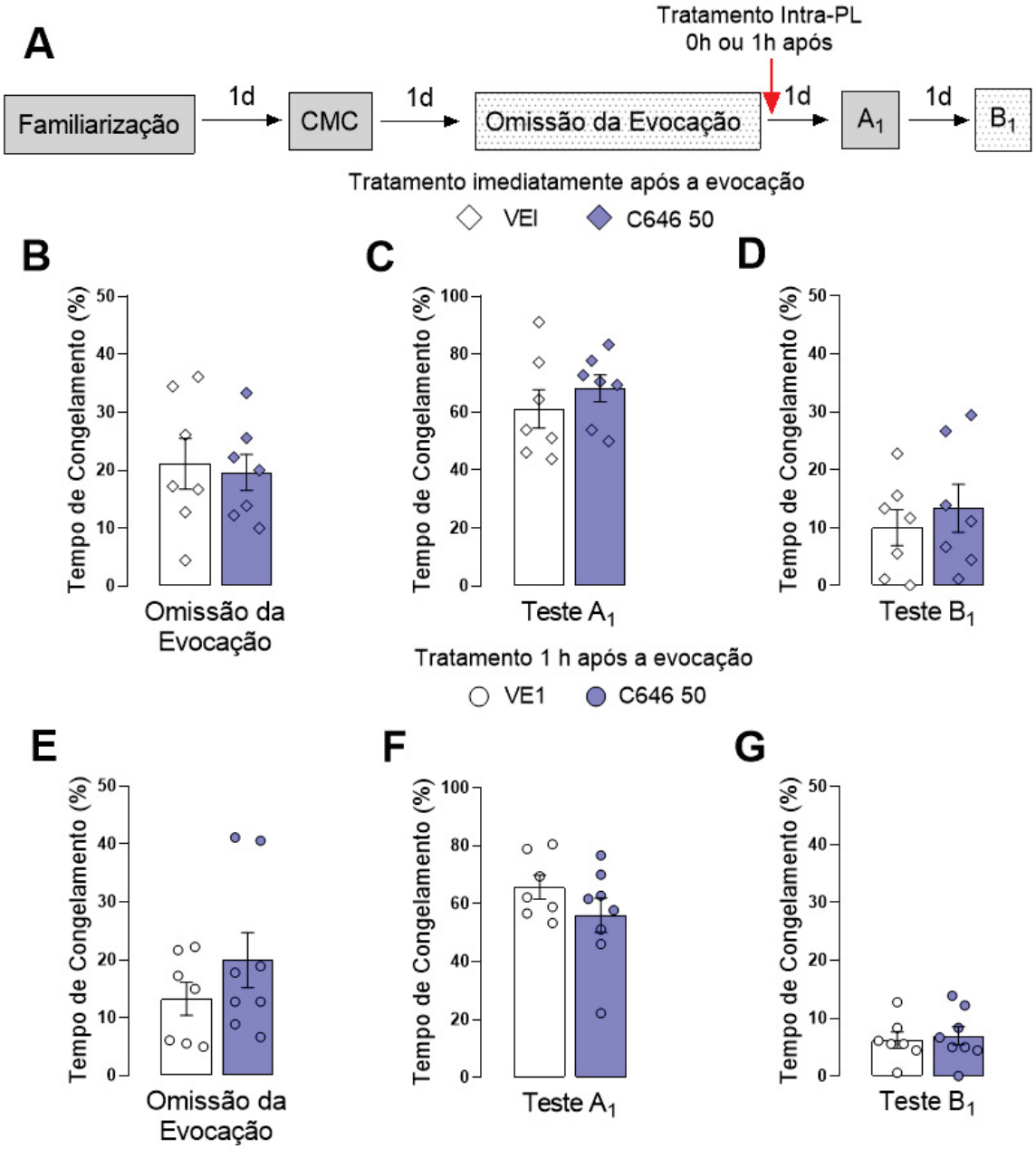
Como apenas o C646 na concentração de 50 ng induziu efeitos significativos no Experimento 1, selecionamos essa concentração para os experimentos subsequentes. Para confirmar que os resultados da inibição da HAT p300/CBP no córtex PL, imediatamente ou 1 h após a evocação, estavam relacionados à reconsolidação da memória de medo, ratos previamente condicionados foram expostos ao Contexto B para evitar que ocorresse a evocação e consequentemente a reconsolidação da memória de medo. Antes do tratamento com C646 ou VEI, durante a sessão de omissão da evocação, o teste t de Student mostrou que não há efeito significativo na porcentagem de tempo de congelamento [imediatamente: $t(12) = 0,280$, $p = 0,784$; $d = 0,150$; 1h $t(13) = 1,138$, $p = 0,276$, $d = 0,595$]. Durante as sessões de omissão da evocação não são observadas diferenças na porcentagem de tempo de congelamento entre os grupos (Figura 10B e 10E).

Quando o tratamento foi administrado imediatamente após a sessão de omissão da evocação, o teste t de Student mostrou que não há efeito significativo durante o Teste A_1 [$t(12) = 0,886$, $p = 0,393$, $d = 0,641$] e Teste B_1 [$t(12) = 0,645$, $p = 0,531$; $d = 0,150$]. Portanto, os grupos tratados com C646 apresentaram porcentagens de tempo de congelamento semelhantes ao do grupo controle nos Teste A_1 e B_1 (Figura 10C e 10D). Além disso, quando o tratamento foi administrado 1 h após a sessão de omissão da evocação, o teste t de Student mostrou que não há efeito

significativo durante o Teste A_1 [t(13) = 1,304, p = 0,215, d = 0,686] e Teste B_1 [t(13) = 0,351, p = 0,731; d = 0,183]. Não há diferenças entre os grupos na porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste A_1 e Teste B_1 (Figura 10F e 10G).

Esses resultados sugerem que os efeitos induzidos pela inibição do HAT p300/CBP no PL requerem a reativação da memória de medo ao contexto para afetar a reconsolidação da memória de medo.

FIGURA 10 – A OMISSÃO DA SESSÃO DE EVOCAÇÃO IMPEDE OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA.



LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) Os animais expressaram níveis de congelamento semelhantes antes do tratamento durante a sessão de omissão da evocação. (C) A infusão de C646 imediatamente após a sessão de omissão da evocação não afetou a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste A_1. (D) A infusão de C646 imediatamente após a sessão de omissão da evocação não alterou a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste B_1 (n: VEI = 7, C646 50 ng = 7). (E) Os animais expressaram porcentagem de tempo de congelamento semelhante antes do tratamento durante a sessão de omissão da evocação. (F) A infusão de C646 1 h após a sessão de omissão da evocação não afetou a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste A_1. (G) A infusão de C646 1 h após a sessão de omissão da evocação não alterou a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste B_1 (n: VEI = 7, C646 50 ng = 8). Teste t de Student. Os dados são apresentados como média ± EPM e valores individuais.

4.3 A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NÃO AFETA O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO OU A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS CONDICIONADOS, MAS AUMENTA O COMPORTAMENTO TIPO ANSIOGÊNICO EM RATOS NÃO CONDICIONADOS.

Em animais não condicionados, a administração de C646 no córtex PL resultou em um efeito significativo sobre a %TBA [t(14) = 2.375, p = 0,032; d = 1,187] e a %EBA [t(14) = 2,574, p = 0,022; d = 1,287] no LCE. O *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo tratado com C646 exibiu redução significativa da %TBA e %EBA em comparação com o grupo VEI (Figura 11B e 11C). Esses achados indicam que a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL pode induzir um comportamento tipo-ansiogênico em animais não condicionados. Por outro lado, o teste t de Student indicou que não há efeito significativo no EBF [t(14) = 0,191, p = 0,851; d = 0,096] no LCE, nem no DTP [t(14) = 0,828, p = 0,422; d = 0,414] e no NC [t(14) = 0,848, p = 0,411; d = 0,424] no TCA. Assim, não foram observadas alterações nos parâmetros de locomoção avaliados (Figura 11D, 11E e 11F), sugerindo que a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL não afeta a atividade locomotora em animais não condicionados. *Heatmaps* representativos do TCA confirmam esses resultados (Figura 11G).

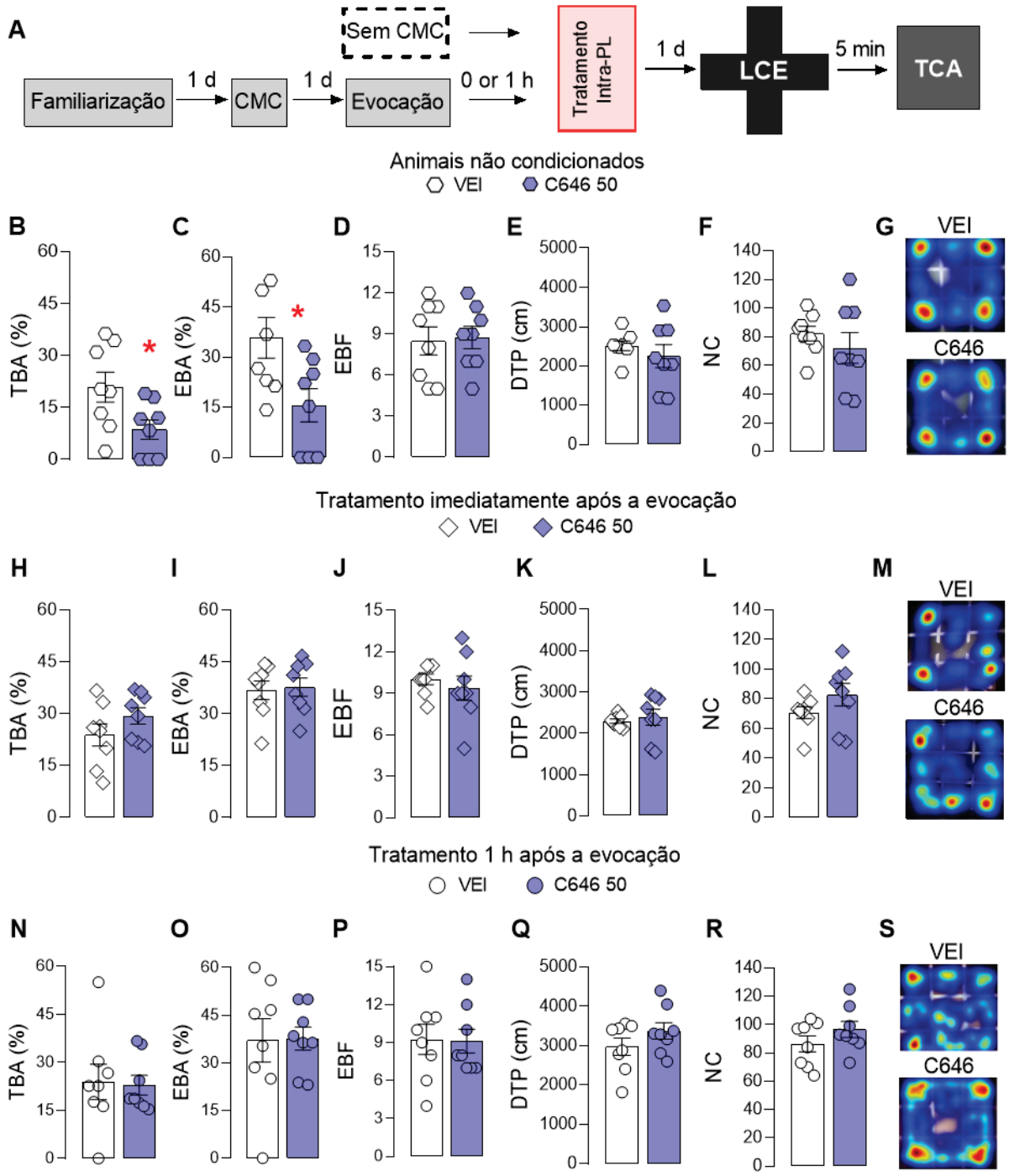
Em contrapartida, em animais condicionados, quando o tratamento foi administrado imediatamente após a sessão de evocação, o teste t de Student mostrou que não há efeito significativo em %TBA [t(14) = 1,367, p = 0,193; d = 0,683], %EBA [t(14) = 0,242, p = 0,812; d = 0,122] e EBF [t(14) = 0,662, p = 0,519; d = 0,331] no LCE. Consequentemente não foram observadas diferenças entre os grupos em %TBA, %EBA e EBF (Figura 11H, 11I e 11J). No TCA, o teste t de Student mostrou que não há efeito significativo quando o tratamento foi administrado imediatamente

após a sessão de evocação no DTP [t(12) = 0,645, p = 0,531; d = 0,150] e NC [t(14) = 1,403, p = 0,182; d = 0,701]. Novamente, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na DTP e NC (Figura 11K e 11L). *Heatmaps* representativos do TCA confirmam esses resultados (Figura 11M). Esses resultados sugerem que a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL imediatamente após a sessão de evocação não altera o comportamento tipo-ansioso e a atividade locomotora 24 h depois, quando os animais são expostos ao Teste A_1 .

Semelhante ao resultado anterior, quando o tratamento foi administrado 1 h após a sessão de evocação, o teste t de Student mostrou que não há efeito significativo em %TBA [t(14) = 0,166, p = 0,871, d = 0,083], %EBA [t(14) = 0,063, p = 0,950; d = 0,032] e EBF [t(14) = 0,083, p = 0,935; d = 0,041] no LCE. No TCA, o teste t de Student mostrou que não há efeito significativo quando o tratamento foi administrado imediatamente após a evocação no DTP [t(14) = 1,308, p = 0,212; d = 0,654] e NC [t(14) = 1,275, p = 0,223; d = 0,637]. Consequentemente, não foram observadas diferenças entre os grupos na %TBA, %EBA, EBF, DTP e NC (Figura 11N, 11O, 11P, 11Q e 11R). *Heatmaps* representativos do TCA confirmam esses resultados (Figura 11S). Esses resultados também sugerem que a inibição do HAT p300/CBP no córtex PL 1 h após a evocação não influencia o comportamento tipo-ansioso e a atividade locomotora 24 h depois.

Considerando os resultados obtidos em animais condicionados, pode-se sugerir que a inibição da HAT p300/CBP no córtex pré-límbico não altera o comportamento tipo-ansiogênico nem a atividade locomotora após 24 horas. Dessa forma, os efeitos observados do C646 no Teste A_1 do Experimento 1 parecem estar associados ao prejuízo da reconsolidação da memória de medo, e não a alterações no perfil de ansiedade ou locomoção dos animais.

FIGURA 11 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM INIBIDOR DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E ATIVIDADE LOCOMOTORA.



LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) O tratamento com C646 50 ng reduziu significativamente a %TBA no LCE dos grupos não condicionados (C) O tratamento com C646 50 ng reduziu significativamente a %EBA no LCE dos grupos não condicionados. (D) O tratamento com C646 50 ng não afetou o EBF dos grupos não condicionados. (E) O tratamento com C646 50 ng não afetou o DTP no TCA dos grupos não condicionados. (F) O tratamento com C646 50 ng não afetou o NC no TCA dos grupos não condicionados (n: VEI = 8, C646 50 ng = 8). (G) *Heatmaps* representativos de animais não condicionados tratados com VEI ou 50 ng de C646 no TCA. (H) O tratamento com C646 50 ng imediatamente após a evocação não afetou a %TBA no LCE. (I) O tratamento com C646 50 ng imediatamente após a evocação não afetou a %EBA no LCE. (J) O tratamento com C646 50 ng imediatamente após a evocação não afetou o EBF no LCE. (K) O tratamento com C646 50 ng imediatamente após a evocação não afetou o DTP no TCA. (L) O tratamento com C646 50 ng imediatamente após a evocação não afetou o NC no TCA (n: VEI = 8, C646 50 ng = 8). (M) *Heatmaps* representativos de animais tratados com VEI ou 50 ng de C646 imediatamente após a evocação no TCA. (N) O tratamento com C646 50 ng 1 h após a evocação não afetou a %TBA no LCE. (O) O tratamento com C646 50 ng 1 h após a evocação não afetou a %EBA no LCE. (P) O tratamento com C646 50 ng 1 h após a evocação não afetou o EBF no LCE. (Q) O tratamento com C646 50 ng 1 h após a evocação não afetou o DTP no TCA. (R) O tratamento com C646 50 ng 1 h após a evocação não afetou o NC no TCA (n: VEI = 8, C646 50 ng = 8). (S) *Heatmaps* de animais tratados com VEI ou 50 ng de C646 1 h após a evocação no TCA.Teste t de Student. Os resultados são expressos como média ± EPM e valores individuais. O * significa $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle da sessão.

4.4 A ACETILAÇÃO DA HISTONA H3 AUMENTA NO CÓRTEX PL 120 MINUTOS APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E A INIBIÇÃO DO HAT p300/CBP PREVINE ESTE EFEITO.

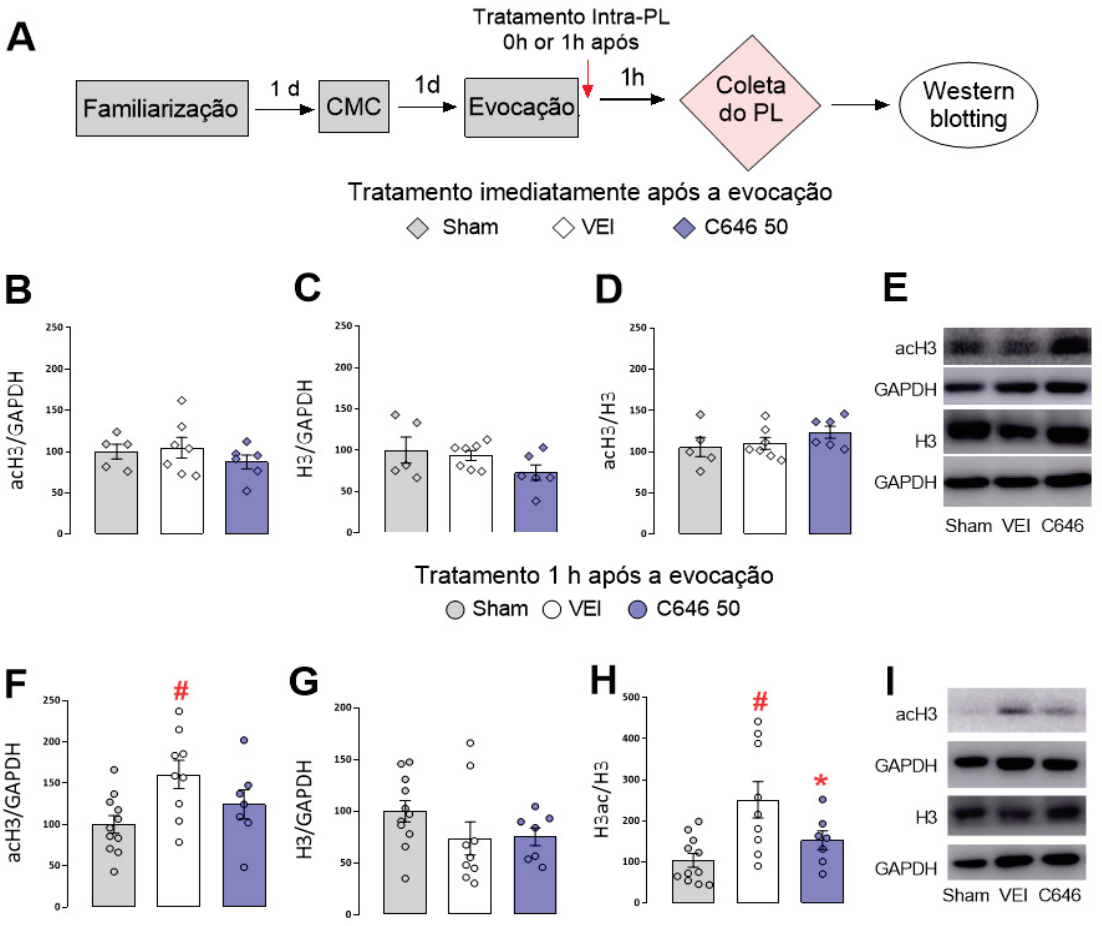
Quando os animais foram tratados imediatamente após a sessão de evocação, a ANOVA de uma via demostrou que não há efeito do tratamento nos níveis de H3 [$F(2,15) = 1,918$, $p = 0,181$, $\eta^2 = 0,204$], acH3 [$F(2,15) = 0,7216$, $p = 0,5021$, $\eta^2 = 0,087$] ou na razão acH3/H3 [$F(2,15) = 1,156$, $p = 0,3414$, $\eta^2 = 0,133$]. Consequentemente, nenhuma diferença foi observada nesses parâmetros (Figura 12B, 12C e 12D). A Figura 12E mostra imagens representativas de acH3, H3 e GAPDH desses animais.

Quando o tratamento foi administrado 1 h após a sessão de evocação, a ANOVA de uma via mostrou efeitos significativos nos níveis de acH3 [$F(2,24) = 4,639$, $p = 0,0198$, $\eta^2 = 0,278$] e na razão acH3/H3 [$F(2,24) = 6,763$, $p = 0,0047$, $\eta^2 = 0,360$], enquanto nenhuma alteração nos níveis de H3 foi detectada [$F(2,24) = 1,521$, $p = 0,2388$, $\eta^2 = 0,112$]. O *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo tratado com VEI, 1 h após a sessão de evocação, exibiu diferenças significativas nos níveis de acH3 ($p = 0,0232$) em comparação ao grupo sham (Figura 12F). Embora a redução nos níveis de acH3 no grupo C646 não tenha sido estatisticamente significativa em comparação ao grupo VEI ($p = 0,1022$), uma tendência de queda foi evidente (Figura

12F). Além disso, a razão acH3/H3 também aumentou no grupo VEI em comparação ao grupo sham (p = 0,0062) e o tratamento com C646 50 ng diminuiu significativamente a razão acH3/H3 (p = 0,0317) em comparação ao grupo VEI (Figura 12H). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos nos níveis de H3 (Figura 12G). A Figura 12I mostra imagens representativas de acH3, H3 e GAPDH desses animais.

Esses resultados demonstram que a evocação da memória de medo ao contexto promove um aumento na acetilação das histonas H3 no córtex PL após 120 minutos, como evidenciado pelos níveis elevados de acH3 e pelo aumento na razão acH3/H3 no grupo controle. Esses achados reforçam o papel da acetilação de histonas no córtex PL na reconsolidação da memória. O tratamento com C646 uma hora após a evocação impede esse aumento, indicando que a atividade da HAT p300/CBP modula os mecanismos epigenéticos envolvidos nesse processo.

FIGURA 12 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM INIBIDOR HAT p300/CBP NA ACETILAÇÃO DA HISTONA H3 NO CÓRTEX PL.



LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) O tratamento com VEI ou C646 50 ng imediatamente após a evocação não alterou os níveis de acH3. (C) O tratamento com VEI ou C646 50 ng imediatamente após a evocação não alterou os níveis totais de H3. (D) O tratamento com VEI ou C646 50 ng imediatamente após a evocação não alterou a razão acH3/H3 (n: Sham = 5, VEI = 7, C646 50 ng = 6). (E) Imagens representativas das proteínas alvo quando o tratamento foi dado imediatamente após a evocação. (F) O tratamento com VEI 1h após a evocação aumenta os níveis de acH3 em comparação com o grupo Sham. (G) O tratamento com VEI ou C646 50 ng 1 h após a evocação não alterou os níveis totais de H3. (H) O tratamento com VEI 1 h após a evocação aumenta a razão acH3/H3 em comparação com o grupo Sham, enquanto o tratamento com C646 50 ng reduz a razão acH3/H3 em comparação com o grupo VEI (n: Sham = 5, VEI = 7, C646 50 ng = 6). (I) Imagens representativas das proteínas alvo quando o tratamento foi dado 1 h após a evocação. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman–Keuls. Os resultados são mostrados como média ± EPM com valores individuais. O # significa $p < 0,05$, em comparação com o grupo sham. O * significa $p < 0,05$, comparado ao grupo VEI.

5 DISCUSSÃO

5.1 A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP IMEDIATAMENTE OU 1 H, MAS NÃO 6 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA, PREJUDICA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA.

A inibição da HAT p300/CBP no córtex PL, por meio da infusão de 50 ng de C646 imediatamente ou 1 hora após a evocação da memória, reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento nos testes A_1 e A_2. Esse resultado indica que a inibição da HAT p300/CBP até 1 hora após a evocação da memória de medo ao contexto é capaz de comprometer a reconsolidação da memória. Embora a acetilação de histonas na reconsolidação da memória de medo ainda seja pouco explorada, nossos achados concordam com estudos anteriores que demonstraram que a administração de inibidores da HAT prejudica a reconsolidação da memória de condicionamento ao som 1 hora após a evocação (Maddox *et al.,* 2013; Maddox; Watts; Schafe, 2013).

Apesar de nossos resultados demonstrarem um tamanho de efeito grande quando administrado até 1 h após a evocação da memória, é importante considerar um possível impacto do DMSO 50% utilizado como diluente do C646 no comportamento avaliado durante o Teste A1. Já foi demonstrado que, 5 minutos após o tratamento com DMSO 64%, foi observado um aumento na imobilidade de camundongos (Castro et al., 1995). No entanto, esse efeito não se sustentou 6 h após a administração do DMSO (Castro et al., 1995). Nesse sentido, considerando que as avaliações do comportamento dos animais foram realizadas 24 h após a infusão no córtex PL, e considerando ainda que não observamos alterações no tempo de

congelamento dos animais que receberam VEI (DMSO 50%), ou C646 5 ng, também diluído em DMSO 50%, podemos concluir que os efeitos observados foram específicos para a concentração de 50 ng de C646 e não devido à presença do DMSO. Além disso, foi mostrado anteriormente na LA que o C646 diluído em 100% DMSO também foi capaz de prejudicar a reconsolidação da memória, sem efeito do grupo veículo tratado apenas com DMSO 100% (Maddox; Watts; Schafe, 2013). Portanto, nossos dados fortalecem a evidência de que os efeitos no prejuízo da reconsolidação da memória de medo se dão pela inibição da HAT p300/CBP, e não devido a efeitos inespecíficos do DMSO.

Anteriormente, foi observado que o prejuízo da reconsolidação da memória de medo, induzido pela inibição da HAT, foi observado tanto em administrações sistêmicas quanto em infusões diretas na LA (Maddox *et al.,* 2013; Maddox; Watts; Schafe, 2013). Adicionalmente, estudos prévios mostraram que a interferência no perfil de acetilação de histonas no hipocampo dorsal de ratos, 1 hora após a evocação da memória de medo ao contexto, também prejudica a reconsolidação da memória (Lubin; Sweatt, 2007). Dessa forma, nossos resultados mostram que a acetilação de histonas no córtex PL desempenha um papel crucial na reconsolidação da memória de medo, assim como ocorre no hipocampo e na amígdala.

O papel das HATs na reconsolidação da memória não se restringe às memórias de condicionamento ao medo. Estudos demonstram que a administração sistêmica de inibidores da HAT também prejudica a reconsolidação de memórias associadas ao uso de cocaína e heroína (Monsey; Sanchez; Taylor, 2017; Dunbar; Taylor, 2017; Cheng *et al*., 2024). Além disso, já foi visto que o córtex PL é uma região cerebral recrutada na evocação da memória associada ao uso de cocaína e heroína (Rubio *et al*., 2019; Otis; Dashew; Mueller, 2013). Nesse sentido, é possível que a HAT p300/CBP no córtex PL possa igualmente influenciar a reconsolidação de memórias relacionadas ao uso de drogas.

A janela temporal para a reconsolidação da memória, assim como ocorre durante a consolidação, parece estender-se por até 6 horas após a evocação, já que intervenções farmacológicas realizadas após esse período não apresentam efeitos significativos (Nader; Schafe; LeDoux, 2000; Stern *et al*., 2012). Em nosso estudo, a infusão de 50 ng de C646 no córtex PL, 6 horas após a evocação da memória, não

alterou o comportamento de congelamento durante os testes A_1, indicando ausência de efeito sobre a reconsolidação da memória. Esse resultado está em consonância com estudos anteriores que investigaram a memória de condicionamento ao som, nos quais a administração de garcinol — um inibidor da HAT — ou de C646, 6 horas após a reativação, não afetou a reconsolidação da memória (Maddox *et al.,* 2013; Maddox; Watts; Schafe, 2013). Embora a janela de reconsolidação da memória seja comumente proposta para durar até 6 horas, a reativação de memórias recentes também pode recrutar ondas tardias de síntese proteica, as quais são essenciais para a persistência da memória a longo prazo (Nakayama *et al*., 2013; Nakayama *et al*., 2015). Trabalhos prévios do nosso grupo mostraram que a inibição da proteína quinase C (PKC) por meio da administração de tamoxifeno 6 e 9 horas após a reativação da memória é capaz de prejudicar a persistência da memória, sem interferir no processo de reconsolidação (da Silva *et al.,* 2016). Além disso, o córtex PL parece desempenhar um papel crucial na persistência da memória, uma vez que a inibição da PKC ou da proteína quinase M zeta (PKMζ) nessa região, 6 horas após a evocação, também prejudica a persistência da memória (da Silva et al., 2020a; da Silva et al., 2020b). No entanto, nossos resultados mostram que a infusão de 50 ng de C646, um inibidor da HAT p300/CBP, no córtex PL 6 horas após a evocação da memória, não alterou a porcentagem de tempo de congelamento durante o Teste A_2. Isso indica que a inibição da HAT p300/CBP nesse ponto de tempo não exerce efeito sobre a persistência da memória.

Nossas descobertas destacam que os processos epigenéticos envolvidos na reconsolidação da memória de medo ao contexto são tempo-dependentes, com a inibição da HAT p300/CBP produzindo efeitos apenas quando administrada dentro de uma janela temporal crítica após a evocação da memória. Esses resultados reforçam a importância da acetilação de histonas como um mecanismo epigenético essencial para a reconsolidação da memória, ao mesmo tempo em que evidenciam a relevância do córtex PL nesse processo.

Importante ressaltar que apesar da porcentagem de tempo de congelamento ter reduzido significativamente com a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL após a evocação de uma memória recente, não investigamos o efeito do C646 em uma memória remota. Estudos anteriores demonstraram que a administração de inibidores da HAT na LA também é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória de

condicionamento ao som 1 hora após a evocação de uma memória de medo remota (Maddox *et al.,* 2013; Maddox; Watts; Schafe, 2013). Em estudos com roedores, memórias remotas podem ser definidas como aquelas capazes de persistir por no mínimo 2 semanas, sendo mais estáveis e menos susceptíveis a intervenções em comparação a memórias recentes (Albo; Graff, 2018; Nader; Schafe; Ledoux, 2000). Grande parte dos estudos citam que a atividade hipocampal é mais importante para as memórias recentes, enquanto traços de memória remota são mantidos por regiões corticais (Albo; Graff, 2018). Nosso grupo já demonstrou que o córtex PL é uma região cerebral importante para a reconsolidação de memórias aversivas recentes e remotas (Stern *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2020a). Dado o papel do córtex PL na manutenção e reconsolidação de memórias remotas, é plausível que a inibição da HAT p300/CBP nessa região também seja capaz de prejudicar a reconsolidação de memórias remotas de medo, podendo ser uma hipótese a ser investigada em futuros estudos.

Os animais que receberam 50 ng de C646 imediatamente após a evocação não apresentaram efeitos significativos no Teste B_1 e no Teste B_2, apesar de um tamanho de efeito moderado. Uma possível explicação para esse resultado é que o protocolo utilizado não induziu a generalização do medo, fenômeno no qual os animais expressam respostas de defesa mesmo em contextos neutros e, consequentemente, tornam-se menos sensíveis aos efeitos do tratamento na reconsolidação (Gazarini *et al.*, 2024). Nesse sentido, como os grupos de controle exibiram níveis mínimos de congelamento no Teste B, a ausência de efeito pode estar relacionada a um efeito chão, já que nosso protocolo de CMC segue o padrão de trabalhos anteriores e não é capaz de gerar altos índices de congelamento no Teste B_1 e Teste B_2 (Stern *et al.*, 2021, 2013, 2015; Raymundi *et al.*, 2023).

Em contrapartida a infusão de C646 50 ng, no córtex PL, 1 h após a sessão de evocação não apenas reduziu o comportamento de congelamento no Teste A_1, mas também levou a uma redução adicional significativa na porcentagem de tempo de congelamento no Teste B_1. Embora o grupo de controle tenha exibido baixo comportamento de congelamento durante este teste, os resultados sugerem um papel potencial da HAT p300/CBP na discriminação de contexto.

Já foi observado que o cortex PL é uma região importante para expressão da memória de medo em contextos condicionados e para a discriminação de contexto

em ambientes neutros (Corches *et al.* 2019). Camundongos mutantes com expressão reduzida da HAT CBP no CPFm, especialmente no córtex PL, apresentam prejuízos na discriminação de contexto no condicionamento de medo ao som (Vieira *et al.*, 2014; Bailey *et al.*, 2024). Embora esses achados divergem dos nossos resultados, é importante considerar as diferenças metodológicas entre os estudos, especialmente em relação ao momento da intervenção. Em nosso experimento, a inibição da HAT p300/CBP ocorreu 1 hora após a reativação da memória, enquanto nos estudos referenciados, a redução da expressão da HAT CBP foi persistente ao longo de todo o protocolo de condicionamento e discriminação de contexto. Portanto, mais investigações são necessárias para elucidar se e como os inibidores da HAT p300/CBP influenciam na discriminação da memória.

5.2 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP IMEDIATAMENTE OU 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA SÃO DEPENDENTES DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA.

Estudos iniciais sobre a reconsolidação da memória demonstraram que a reativação de memórias consolidadas, por meio da breve apresentação do contexto condicionado, induz a desestabilização dessas informações, colocando-as em um estado lábil que requer nova síntese proteica para sua reconsolidação. Quando a reexposição ao contexto condicionado é omitida, no entanto, a inibição da síntese proteica não afeta a expressão da memória, indicando que a reativação é um pré-requisito essencial para o processo de reconsolidação (Przybyslawski; Roullet; Sara, 1999; Nader; Schafe; Le Doux, 2000).

A inibição da HAT p300/CBP até 1 hora após a evocação da memória de medo ao contexto foi capaz de reduzir o comportamento de medo de ratos após 24 horas. Para determinar se esse efeito estava relacionado à reconsolidação ou a um possível efeito antiaversivo do inibidor C646, realizou-se experimentos adicionais omitindo o contexto condicionado na sessão denominada omissão da evocação. Nossos resultados demonstraram que esse efeito dependia da reativação da memória, pois a infusão de C646 50 ng no córtex PL após uma sessão de omissão da evocação não alterou a expressão da memória do medo.

Nossos estudos anteriores investigando o envolvimento do córtex PL descobriram que os efeitos das intervenções nesta área do cérebro na reconsolidação da memória de medo ao contexto dependiam da sessão de evocação (Stern *et al*., 2013; da Silva *et al.*, 2020b). Além disso, nossos achados estão alinhados com estudos anteriores que demonstraram que o tratamento com garcinol ou C646 na reconsolidação é específico para uma memória reativada (Maddox *et al.,* 2013; Maddox; Watts; Schafe, 2013). Em síntese, os resultados evidenciam que a regulação epigenética mediada pela HAT p300/CBP está diretamente associada à reativação da memória, sendo este um mecanismo essencial para a indução da diminuição de comportamentos de medo.

5.3 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E ATIVIDADE LOCOMOTORA

Estudos têm reportado efeitos heterogêneos dos inibidores da HAT no comportamento animal, destacando a complexidade de sua ação. Por exemplo, a administração de um extrato de *Garcinia cambogia* não alterou a atividade locomotora de animais, mas induziu comportamentos tipo-ansiogênicos (Ibrahim *et al*., 2022). Embora o extrato contenha garcinol, um conhecido inibidor da atividade HAT, seus efeitos comportamentais podem estar relacionados a interações com alvos não epigenéticos, sugerindo que os resultados observados não são exclusivamente mediados pela inibição da HAT. No entanto, ao observar os efeitos de inibidores específicos da HAT p300/CBP, como o C646, já foi demonstrado sua capacidade de reduzir a porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE 24 horas após o tratamento, embora essa redução não tenha sido estatisticamente significativa (Guan *et al.,* 2022). Esse achado levanta a possibilidade de que o C646 possa ter um efeito ansiogênico intrínseco, o que poderia influenciar a interpretação dos resultados anteriores.

Em nossos experimentos, ratos não condicionados exibiram comportamentos tipo-ansiogênicos 24 horas após a infusão do inibidor da HAT p300/CBP no córtex PL, sem alterações na atividade locomotora. Esses resultados estão alinhados com os estudos mencionados, sugerindo que a inibição da HAT p300/CBP, no córtex PL, em animais não condicionados pode contribuir para o desenvolvimento de

comportamentos semelhantes à ansiedade de longo-prazo. Essa desregulação pode, por sua vez, desempenhar um papel importante na manifestação de comportamentos ansiosos, reforçando a hipótese de que a modulação epigenética mediada pela HAT p300/CBP está envolvida na regulação de processos emocionais e comportamentais.

Já foi demonstrado que comportamentos tipo-ansiosos estão associados à diminuição da acetilação de histonas no promotor do gene da enzima acetilcolinesterase e do receptor glicocorticóide, o que pode levar à desregulação da função do sistema colinérgico e corticosteróide (Sailaja *et al*., 2012; Weaver *et a*l., 2004). Além disso, estudos mostraram que o estresse precoce em ratos induz uma diminuição da acetilação de histonas no CPFm resultando em comportamentos tipo-ansiosos de longo prazo (Demali et al., 2024). De fato, o CPF é uma região que desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da ansiedade (Li *et al*., 2023). O córtex PL, em particular, regula comportamentos tipo-ansiosos em roedores (Jinks; McGregor, 1997; Stern *et al*., 2010). Nesse sentido, nossos achados reforçam a ideia de que a modulação epigenética no CPF, incluindo o córtex PL, é capaz de alterar o comportamento tipo-ansioso a longo-prazo em animais não condicionados.

Em contrapartida, ao avaliar os efeitos do C646 em ratos condicionados e submetidos à evocação da memória de medo, não observamos alterações significativas no comportamento tipo-ansioso ou na atividade locomotora 24 horas após o tratamento, independentemente de o inibidor ter sido administrado imediatamente ou 1 h após a evocação.

Estudos anteriores sobre os efeitos do condicionamento do medo na ansiedade e na atividade locomotora apresentam resultados divergentes. Algumas pesquisas não relataram mudanças significativas no comportamento tipo-ansioso ou na atividade locomotora em animais condicionados pelo medo em comparação com controles não condicionados (Daviu *et al*., 2010; Hilton *et al.,* 2022), enquanto outras observaram aumento nos comportamentos tipo-ansiosos (Korte; Boer; Bohus, 1999; Zhang *et al.,* 2019) e redução na atividade locomotora (Daviu *et al*., 2010). Essas discrepâncias sugerem que os efeitos do condicionamento de medo podem variar dependendo de fatores como a intensidade dos choques e a quantidade de choques aplicados durante o treino, linhagens de animais ou condições ambientais. Em nossos experimentos, não observamos diferenças significativas no comportamento tipo-

ansioso ou na atividade locomotora dos grupos controle de animais condicionados e não condicionados.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a investigar os efeitos da inibição da HAT p300/CBP no córtex PL sobre comportamentos tipo-ansiosos e atividade locomotora 24 horas após a evocação da memória de medo ao contexto. Nossos dados sugerem que a reativação da memória de medo direciona a ação do C646 para processos relacionados à reconsolidação da memória, priorizando esses efeitos sobre possíveis alterações nos comportamentos tipo-ansiosos. Isso reforça a ideia de que a reativação da memória é um fator crítico para modular a seletividade da ação dos inibidores da HAT. Os fatores específicos que direcionam estes efeitos merecem investigação futura.

É importante destacar que nosso estudo não avaliou os efeitos agudos do C646, o que limita nossa compreensão sobre como a inibição da HAT p300/CBP atua a curto prazo após a administração. A escolha de avaliar os efeitos da inibição da HAT p300/CBP 24 horas após a infusão em ratos foi crucial para determinar se os efeitos observados durante o Teste A_1 estavam relacionados a impactos específicos na reconsolidação da memória de medo, e não a efeitos não específicos do C646 sobre a ansiedade ou a locomoção. Estudos futuros podem explorar de forma mais aprofundada como a inibição da HAT p300/CBP e acetilação de histonas no córtex PL é capaz de influenciar o comportamento tipo-ansioso e a locomoção de animais a curto prazo, bem como se os efeitos em animais não condicionados são duradouros.

5.4 O PAPEL DA ACETILAÇÃO DA HISTONA H3 E DA INIBIÇÃO DE p300/CBP NO CÓRTEX PL APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO.

Após um evento estressante, observa-se um aumento na expressão de genes de resposta imediata, processo que depende da acetilação de histonas (Reul, 2014). A acetilação de histonas, particularmente no hipocampo e na LA, tem sido amplamente associada à plasticidade sináptica durante a consolidação e reconsolidação da memória de medo (Lubin; Sweatt, 2007; Maddox *et al*., 2013; Maddox, Watts; Schafe, 2013). Em nossos estudos, investigamos a dinâmica da

acetilação da histona H3 no córtex PL após a evocação da memória de medo ao contexto, com foco no papel da HAT p300/CBP.

Nossos resultados demonstraram que não houve diferenças significativas nos níveis de histona H3 total, acH3 ou na razão acH3/H3 no córtex PL 60 minutos após a evocação da memória de medo ao contexto. No entanto, observamos um aumento significativo na acetilação da histona H3 120 minutos após a reativação da memória, efeito que foi bloqueado pela inibição da HAT p300/CBP com o composto C646. Isso sugere que a acetilação da histona H3 no córtex PL ocorre em um estágio mais tardio do processo de reconsolidação e é dependente da atividade da HAT p300/CBP.

Estudos anteriores sobre a acetilação de histonas após a reativação da memória de medo revelaram padrões temporais e regionais distintos. No hipocampo, por exemplo, a acetilação da histona H3 aumenta 60 minutos após a evocação (Lubin; Sweatt, 2007). Já na LA, a acetilação da histona H3 atinge um pico 90 minutos após a reativação, sem alterações significativas em 60 ou 120 minutos (Maddox; Schafe, 2011). No CPF, a maioria dos estudos concentrou-se na consolidação e extinção da memória. Siddiqui *et al.* (2017) relataram um aumento na acetilação de H3K9 no córtex PL 120 minutos após o condicionamento, enquanto no córtex IL o aumento ocorreu 120 minutos após a extinção. Da mesma forma, Bredy *et al.* (2007) observaram um aumento na acetilação de H3 ao redor do gene *BDNF* no CPF 120 minutos após a extinção. Em contraste, Graff *et al.* (2014) demonstraram um aumento na acetilação de H3K9/K14 no CPF 60 minutos após a evocação de memórias recentes e remotas.

Nossos achados de que a acetilação da histona H3 no córtex PL aumenta 120 minutos após a reativação estão alinhados com estudos que sugerem mudanças mais tardias na acetilação de histonas no CPF (Siddiqui *et al*., 2017; Bredy *et al.,* 2007). No entanto, contrastam com os resultados de Graff *et al*. (2014), que observaram alterações mais precoces (60 minutos) na acetilação de H3 no CPF. Essa discrepância pode ser atribuída a diferenças metodológicas, como a especificidade das sub-regiões do CPF analisadas. Enquanto nosso estudo focou exclusivamente no córtex PL, Graff *et al.* (2014) avaliaram o CPF como um todo, o que pode mascarar diferenças regionais.

É importante destacar que, embora não tenhamos observado alterações na acetilação da histona H3 60 minutos após a reativação, o tratamento com C646 reduziu significativamente o comportamento de congelamento 24 horas depois. Isso indica uma dissociação entre os eventos moleculares iniciais e os resultados comportamentais, sugerindo que a inibição da HAT p300/CBP afeta a reconsolidação da memória de medo sem necessariamente alterar os níveis de acetilação de histonas H3 em estágios iniciais. Além disso, como a p300/CBP é capaz de acetilar outras histonas (H2A, H2B e H4), é possível que o efeito do C646 envolva a modulação de múltiplas histonas, ampliando os mecanismos epigenéticos subjacentes à reconsolidação da memória (Sterner; Berger, 2000; Kouzarides, 2007).

Nossos resultados demonstrando que a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL leva a uma diminuição da acetilação de histonas pode indicar que o prejuízo da reconsolidação da memória de medo se dá pelo bloqueio da expressão de genes essenciais para a plasticidade sináptica. Sabe-se que a interação de CREB, um fator de transcrição, com a HAT CBP é necessária para induzir a expressão gênica necessária para a LTP e consolidação da memória de medo (Bridi *et al.*, 2016; Preethi *et al.*, 2014). Estudos demonstraram ainda que, juntamente com a ativação do CREB, modificações na cromatina estão envolvidas no processo de plasticidade sináptica, regulando a ativação de BDNF (Preethi *et al.*, 2014). Durante a consolidação e extinção da memória de medo há um aumento da acetilação de histonas direcionado ao gene *bdnf* no hipocampo e CPF, respectivamente (Lubin; Roth; Sweatt, 2008; Bredy *et al.,* 2007). Além disso, a acetilação de histonas pode induzir a ativação de genes imediatos precoces, como o Zif268, que desempenha um papel crítico na LTP e na plasticidade sináptica (Lubin; Roth; Sweatt, 2008). Stern e colaboradores (2013) demonstraram que há um aumento de Zif268 após a evocação da memória na região do córtex PL. Portanto, o prejuízo na reconsolidação observado em nosso estudo, após a inibição da HAT imediatamente e 1 hora após a evocação, pode estar relacionado a um bloqueio na expressão de BDNF e Zif268, impedindo a plasticidade sináptica necessária para a reconsolidação da memória. Nesse sentido, estudos futuros poderiam investigar diretamente a expressão desses genes após a inibição da HAT.

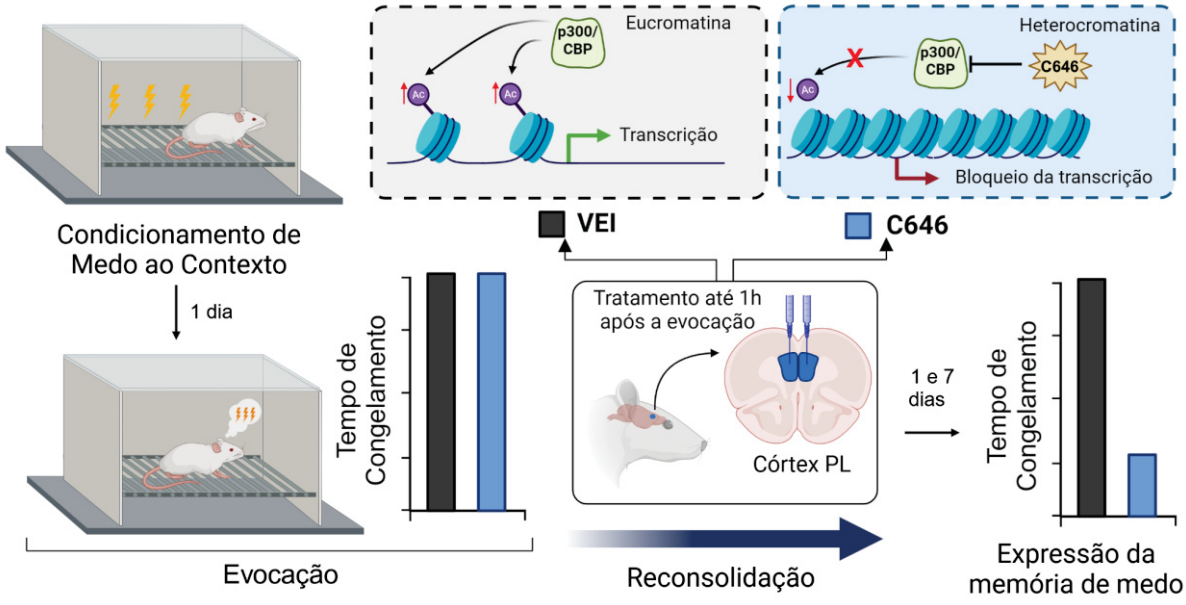
Em síntese, nossos resultados sugerem que a acetilação da histona H3 no córtex PL ocorre em um estágio mais intermediário (120 minutos) da reconsolidação

da memória de medo ao contexto, em contraste com outras regiões cerebrais, como o hipocampo e a LA, onde as alterações na acetilação são observadas mais precocemente. Essa dinâmica temporal ressalta a complexidade dos mecanismos epigenéticos envolvidos na reconsolidação da memória. Estudos futuros são necessários para explorar com maior detalhe a janela temporal da acetilação de histonas no córtex PL, bem como investigar o papel de outras histonas, como H2A, H2B e H4, nesse processo, a fim de compreender melhor os mecanismos moleculares que regulam a reconsolidação da memória.

6 CONCLUSÕES

As descobertas descritas neste estudo, sintetizadas na Figura 13, confirmam nossa hipótese e evidenciam o papel fundamental da HAT p300/CBP na reconsolidação da memória de medo ao contexto, indicando que o córtex PL atua como uma região crítica nesse processo. Especificamente, a atividade da p300/CBP no córtex PL parece promover a acetilação das histonas H3 em um estágio intermediário da reconsolidação. Embora a HAT p300/CBP seja capaz de modular comportamentos tipo-ansiosos em animais não condicionados, seus efeitos sobre a reconsolidação da memória de medo não afetam o comportamento tipo-ansioso ou a atividade locomotora. Além disso, os efeitos observados são estritamente dependentes da reativação da memória, reforçando a especificidade do mecanismo para o processo de reconsolidação da memória de medo.

FIGURA 13 - A HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL É NECESSÁRIA PARA A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO



LEGENDA: Um dia após o CMC, quando os animais são expostos novamente ao EC, é observado uma alta porcentagem de tempo de congelamento. Animais que tiverem, até 1 h após a evocação, a administração de C646, um inibidor da HAT p300/CBP - que impede a acetilação de histonas, mantendo a cromatina no estado de heterocromatina - apresentam uma redução na porcentagem de tempo de congelamento 1 e 7 dias depois. Em contrapartida, animais VEI, apresentam um aumento da acetilação de histonas no córtex PL, mudando a conformação da cromatina para eucromatina e permitindo que ocorra transcrição gênica necessária para que ocorra a reconsolidação da memória de medo.

Em conjunto, os resultados sugerem que, no córtex PL, a reconsolidação da memória de medo é regulada por mecanismos epigenéticos. Esses achados podem fornecer novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a memórias de medo mal-adaptativas, como aquelas observadas no TEPT.

CAPÍTULO 2 - O PAPEL DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA MODULAÇÃO DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO VIA ACETILAÇÃO DE HISTONAS

1 INTRODUÇÃO

O sistema endocanabinoide é um sistema neuromodulador com a capacidade de regular a liberação de neurotransmissores que desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase no corpo humano (Hill et al., 2018). Já foi observado que em pacientes com TEPT há uma redução dos níveis de endocanabinoides circulantes (Neumeister *et al*., 2013). Além disso, evidências sugerem que o sistema endocanabinoide é capaz de regular o processo de consolidação e reconsolidação da memória (Hauer *et al.*, 2014). Recentemente evidências têm sugerido que o sistema endocanabinoide pode recrutar mecanismos epigenéticos para produzir seus efeitos (Večeřa *et al*., 2018; Dulman *et al*., 2021). Além disso, também foi sugerido que mecanismos epigenéticos, como a acetilação de histonas, podem levar à modulação do sistema endocanabinoide. Nesse contexto, este capítulo teve o objetivo de investigar se o efeito da modulação da acetilação de histonas no córtex PL sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto altera a expressão de receptores canabinoides, assim como se modular o sistema endocanabinoide pode influenciar nos efeitos mediados pela inibição da HAT p300/CBP

.

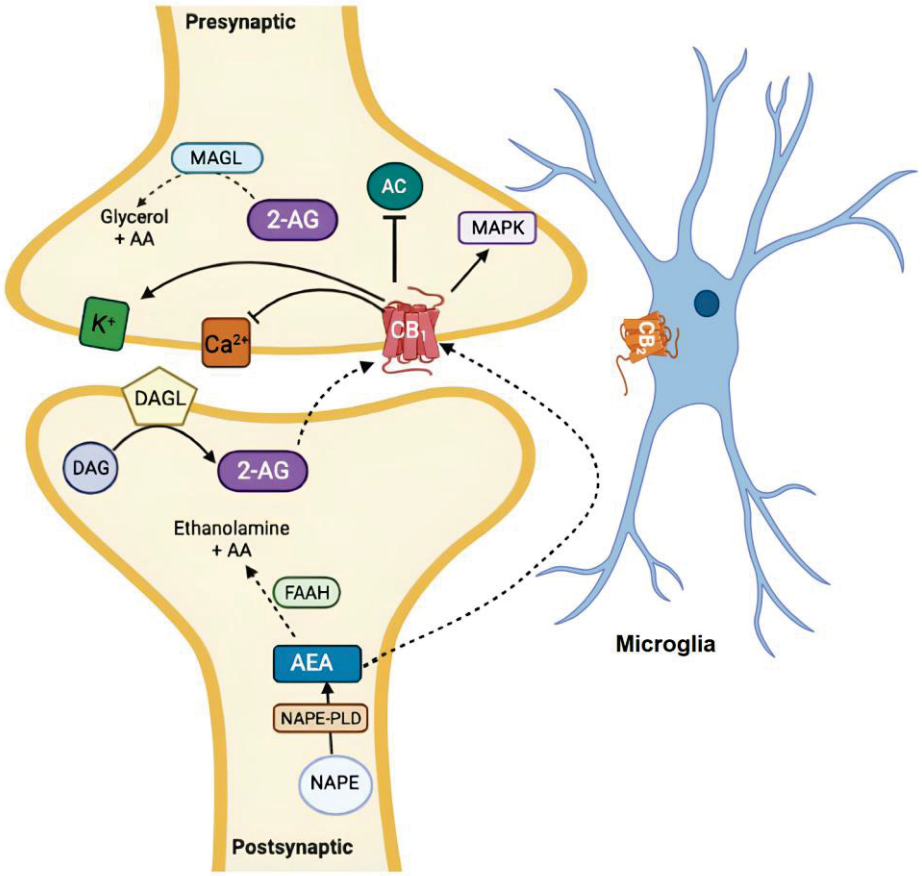
1.1 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E SUA RELAÇÃO COM A FORMAÇÃO E MODULAÇÃO DAS MEMÓRIAS

O sistema endocanabinoide é composto pelos receptores canabinoides, CB_1 e CB_2. Do mesmo modo, fazem parte deste sistema dois principais ligantes endógenos: a N-araquidoniletanolamina, também conhecida como anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). No entanto, existem outros endocanabinoides menos estudados como N-estearoiletanolamida, N-palmitoiletanolamidane e N-oleoiletanolamida. Fazem parte ainda do sistema endocanabinoide as enzimas metabólicas, amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) que age como principal metabolizador de AEA e a monoacilglicerol lipase (MAGL), principal metabolizador da 2-AG (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019; Hill *et al.*, 2018).

Os receptores canabinoides estão distribuídos tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico. Os receptores CB_1 estão localizados predominantemente no sistema nervoso central, com densidades particularmente altas no córtex, amígdala, hipocampo e gânglios da base (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019; Hill *et al.*, 2018). No CPFm em torno de 98% dos receptores CB_1 estão localizados nos terminais GABAérgicos, e a ativação desses receptores levam a redução da liberação de GABA (Hill *et al.*, 2018). No entanto, também é possível encontrar receptores CB_1 em neurônios glutamatérgicos e células gliais, como astrócitos e microglias, assim como em mitocôndrias no conteúdo intracelular (Lutz *et al.*, 2015). Em contrapartida os receptores CB_2, são considerados predominantemente periféricos e estão amplamente distribuídos no sistema imunológico (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019). No sistema nervoso central os receptores CB_2 são expressos na microglia, particularmente na microglia ativada (Lutz *et al.*, 2015).

A síntese de anandamida ocorre a partir da hidrólise de N-araquidonoil fosfatidil etanolamina (NAPE), por uma NAPE-PLD. O fosfatidilinositol se transforma em diacilglicerol (DAG) que através da ação da diacilglicerol lipase (DAGL) é transformado em 2-AG (Lu; Mackie, 2020). Após sintetizados os endocanabinoides são transportados pelo transportador de membrana endocanabinoide (EMT) para a sinapse, onde atuam retrogradamente nos receptores canabinoides no terminal pré-sináptico (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019; Lu; Mackie, 2020). Os receptores canabinoides são receptores acoplados à proteína Gi/o presentes em neurônios glutamatérgicos, GABAérgicos e alguns monoaminérgicos. A ativação desses receptores leva a inibição da adenilato ciclase e certos canais de cálcio sensíveis à voltagem, estimulam proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), ativam canais de potássio, recrutam beta-arrestinas, entre outras ações (Lu; Mackie, 2020; Hill *et al.*, 2018). Como resultado da ativação de receptores canabinoides ocorre a supressão da liberação de neurotransmissores na sinapse, sendo capaz de modular sinapses excitatórias ou inibitórias (Bassir Nia; Bender; Harpaz-Rotem, 2019). Uma representação do sistema endocanabinoide pode ser observado na Figura 14.

FIGURA 14 - SISTEMA ENDOCANABINOIDE



LEGENDA: Representação esquemática do sistema endocanabinoide. Os endocanabinoides AEA e 2-AGR são sintetizados na pós-sinapse. A síntese de anandamida ocorre a partir da hidrólise de NAPE, por uma NAPE-PLD enquanto que o 2-AG é produzido pela DAGL através de DAG. Os endocanabinoides atuam retrogradamente nos receptores CB_1 no terminal pré-sináptico. Além disso a AEA e 2-AG podem atuar também em receptores CB_2 presentes na microglia. Uma vez ativo os receptores CB_1 causam: a inibição da adenilato ciclase, representada como AC; inibição de canais de cálcio sensíveis à voltagem; estimulam MAPK e ativam canais de potássio. O processo é cessado pela ação das enzimas metabólicas FAAH e MAGL. A FAAH presente majoritariamente na pós sinapse age como principal metabolizadora de AEA, transformando-a em ácido araquidônico (AA), enquanto que a MAGL atua majoritariamente na pré-sinapse como principal metabolizadora da 2-AG. FONTE: Adaptado de Thornton e Roche (2021).

Além disso, os endocanabinoides podem também atuar em receptores não canabinoides como o receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) e o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR; Fox, 2010; Mechoulam et al., 2014). A ativação de TRPV1 na pós-sinapse promove a despolarização e maior liberação de neurotransmissores (Moreira et al., 2012). Já a ação de endocanabinoides em receptores PPARs, pode ocorrer através de uma ação direta ou indireta (Ratano *et al.,* 2017).

Estudos têm mostrado que a administração sistêmica de agonistas do receptor CB_1 prejudicam a consolidação de memórias aversivas e não aversivas (Morena; Campolongo, 2014; Morena *et al*., 2016). Já foi descrito um aumento de AEA no hipocampo após um protocolo de condicionamento (de Oliveira Alvares *et al*., 2008). Isso sugere que o sistema endocanabinoide é ativado após o condicionamento a fim de modular ou limitar a formação de uma memória aversiva (Hauer *et al.*, 2014). Evidências mostrando que a administração de um antagonista do receptor CB_1 no hipocampo é capaz de prejudicar a consolidação da memória no condicionamento de medo ao contexto concordam com essa ideia (de Oliveira Alvares *et al.*, 2010). Do mesmo modo, o nocaute de receptores CB_2 microglial do hipocampo foi capaz de prejudicar a aquisição da memória de medo contextual (Li; Kim, 2017). Além disso, no CPFm foi observado que a inibição de FAAH levou ao aprimoramento da memória, enquanto que o antagonismo do receptor CB_1 leva ao prejuízo da consolidação da memória de medo (Morena; Campolongo, 2014; Tan *et al.*, 2010). Além disso, canabinoides exógenos já mostraram ter capacidade de prejudicar a reconsolidação da memória de medo, inclusive quando administrados no córtex PL (Bayer et al., 2022; Stern *et al.*, 2012; Stern *et al*., 2015; Raymundi *et al*., 2023), ação que parece depender da atividade dos receptores CB_1 (Stern et al., 2015; Bayer et al., 2022). Além disso, estudos reforçam a ideia de que o sistema endocanabinoide atua na reconsolidação da memória, visto que diferentes agonistas de receptores CB_1, como a AEA, WIN55,212-2 ou HU-210 são capazes de prejudicar a reconsolidação da memória do medo (Lin *et al*., 2006; Kobilo *et al*., 2007; de Oliveira Alvares *et al.,* 2008).

Nesse sentido, o sistema endocanabinoide, seja pela ação dos seus ligantes endógenos ou pela ativação de seus receptores, mostram estar intimamente relacionados com os processos de consolidação e reconsolidação, e, modificar o perfil deste sistema demonstrou ser capaz de prejudicar ou potencializar a consolidação e reconsolidação da memória.

1.2 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE COM O MECANISMO DE ACETILAÇÃO DE HISTONAS

A expressão de componentes do sistema endocanabinoide, como receptores CB_1, podem ser regulados por modificações pós-traducionais de histonas e pela

metilação do DNA (Gomes *et al*., 2020). Do mesmo modo, os endocanabinoides podem induzir alterações nas enzimas responsáveis pelas modificações das histonas, tal como a HAT, com a finalidade de alterar a expressão de genes específicos (Stein; Stein, 1984). Isso significa que há uma interação bidirecional entre o sistema endocanabinoide e os mecanismos epigenéticos, sugerindo que os endocanabinoides não apenas têm sua expressão modulada por processos epigenéticos, como também podem influenciar mecanismos epigenéticos para regular a expressão gênica.

Em diferentes modelos animais, foi observado que a diminuição na acetilação de histonas levou a diminuição da expressão de *cnr1* no CC (Lomazzo *et al*., 2017) e de *faah* e *cnr1* na amígdala (Girella *et al*., 2024) e no CPFm (Demali *et al*., 2024).

Estudos avaliando como o sistema endocanabinoide pode regular mecanismos epigenéticos, mostraram que a diminuição da acetilação de histonas H3 podem ser promovidas pelo antagonismo de receptores CB_1 (Večeřa *et al*., 2018). O contrário também já foi relatado, onde o antagonismo de receptores CB_1 foram capazes de aumentar a acetilação de histonas e promover uma diminuição do comportamento tipo-ansioso (Dulman *et al*., 2021). Além disso a alteração de outros componentes do sistema endocanabinoide, como a diminuição de NAPE-PLD, enzima responsável pela síntese de AEA, mostrou gerar um aumento da fosforilação de CREB, atividade de HAT e acetilação de histonas H3 (Correa; Laurentiis; Franchi, 2016).

Juntos esses dados apoiam o fato de que os mecanismos epigenéticos podem impactar a expressão de moléculas do sistema endocanabinoide, que por sua vez podem regular os mecanismos epigenéticos. Também já foi observado que essas alterações no perfil de acetilação das histonas ocorrem pela administração de canabinoides. A administração crônica de uma dose baixa de Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) por 28 dias levou ao aumento da acetilação de histonas H3 e H4, efeito que prevenido pelo co-administração de um inibidor da HAT ou quando os animais eram nocaute para receptores CB_1 (Bilkei-Gorzo *et al*., 2017). Da mesma forma, a administração por 15 dias de THC + canabidiol (CBD) levou ao aumento da acetilação de histonas H3 (Todd *et al*., 2017). Em contrapartida, a administração aguda de CBD, THC ou THC + CBD levou a uma diminuição da acetilação de histonas, o que parece estar relacionada com a diminuição da atividade da HAT p300

(Stadelmann *et al.*, 2011; Pastrana-Trejo *et al.*, 2021). Além disso, um estudo mostrou que a administração crônica do canabinoide sintético WIN55212 (agonista CB_1) resultou em um aumento dos níveis de endocanabinoides e dos níveis de metilação do DNA, levando a um comprometimento da memória espacial no labirinto aquático de Morris e no condicionamento do medo (Tomas-Roig *et al*., 2016). Esses achados ressaltam a complexidade da interação entre o sistema endocanabinoide e os mecanismos epigenéticos, que ainda é pouco compreendida, especialmente no contexto da reconsolidação da memória de medo.

Com base nos estudos apresentados, formulamos a hipótese de que a inibição da HAT p300/CBP pode alterar a expressão dos receptores CB_1 após a evocação da memória. Além disso, acreditamos que a ativação endógena dos receptores CB_1 por endocanabinoides, como a AEA, é essencial para que os efeitos do inibidor da HAT p300/CBP sobre a reconsolidação da memória sejam observados.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do sistema endocanabinoide, mediado pelos receptores CB_1 e pela AEA, na modulação dos efeitos da inibição da HAT p300/CBP sobre a reconsolidação da memória de medo no córtex PL.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se a inibição da HAT p300/CBP no córtex pré-límbico, após a evocação da memória de medo, modula a expressão dos receptores CB_1.

Avaliar, no córtex PL, o papel imediato do receptor CB_1 na modulação dos efeitos da inibição da HAT p300/CBP sobre a reconsolidação da memória de medo, quando a inibição ocorre imediatamente após a evocação.

Avaliar, no córtex PL, o papel imediato do receptor CB_1 na modulação dos efeitos da inibição da HAT p300/CBP sobre a reconsolidação da memória de medo, quando a inibição ocorre 1 h após a evocação.

Avaliar, no córtex PL, o papel tardio do receptor CB_1 na modulação dos efeitos da inibição da HAT p300/CBP sobre a reconsolidação da memória de medo, quando a inibição ocorre 1 h após a evocação.

Avaliar, no córtex PL, se a inibição imediata da FAAH influencia nos efeitos da inibição da HAT p300/CBP na reconsolidação da memória de medo, quando a inibição ocorre 1 h após a evocação.

Avaliar, no córtex PL, se a inibição tardia da FAAH influencia nos efeitos da inibição da HAT p300/CBP na reconsolidação da memória de medo, quando a inibição ocorre 1 h após a evocação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos adultos, com idades entre 11 e 14 semanas de vida e peso entre 350 e 400 g, foram obtidos do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em condições idênticas às descritas anteriormente na seção 3.1 do Capítulo 1. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com número de autorização 1570.

3.2 DROGAS

O C646 (Sigma, EUA) e seu respectivo veículo foram utilizados conforme descrito anteriormente na seção 3.2 do Capítulo 1. Com base nos resultados apresentados no Capítulo 1, a droga foi infundida no córtex PL em duas concentrações: a concentração eficaz de 50 ng/0,2 µL/hemisfério e a concentração subeficaz de 5 ng/0,2 µL/hemisfério. O AM251 (Tocris, EUA), um antagonista dos

receptores CB_1, foi utilizado na concentração de 0,25 µmol/mL, sendo infundido no córtex PL na concentração de 50 pmol/0,2 µL/lado. Já o URB597 (Cayman, EUA), um inibidor da enzima FAAH, foi utilizado na concentração de 50 nmol/mL, sendo administrado no PL na concentração de 10 pmol/0,2 µL/lado. As concentrações subeficazes de AM251 e URB597 foram determinadas com base em estudos prévios do grupo, os quais demonstraram que essas concentrações não produzem efeitos sobre a resposta condicionada (*freezing*) 24 horas após o tratamento, sendo inferiores às concentrações que apresentaram efeitos significativos (Stern *et al*., 2015; 2017). Ambos os compostos, AM251 e URB597, foram diluídos em solução salina (NaCl a 0,9%) contendo 5% de polioxietilenosorbitano monooleato (Tween 80).

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E INFUSÃO DE DROGAS

A cirurgia estereotáxica e a infusão de drogas foram realizadas conforme descrito na seção 3.3 do Capítulo 1. A principal diferença no protocolo ocorreu durante a administração das drogas no córtex PL, uma vez que, nos experimentos realizados, mais de um tratamento foi aplicado. Quando um pré-tratamento foi necessário, a segunda infusão foi realizada com um intervalo mínimo de 5 minutos entre as administrações, a fim de minimizar possíveis interações químicas e garantir que a distribuição das drogas fosse restrita à região alvo.

3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

O protocolo experimental adotado foi o mesmo descrito na seção 3.4 do Capítulo 1, com a ressalva de que os Testes A_2 e B_2 não foram realizados. Essa decisão foi fundamentada nos resultados obtidos no Experimento 1 da seção 2.4.1, nos quais foram observados efeitos significativos já em uma memória recente.

3.5 WESTERN BLOTTING

O procedimento experimental seguido foi idêntico ao detalhado na seção 3.7 do Capítulo 1, com a exceção de que os anticorpos primários empregados foram: anti-

CB_1 (Santa Cruz Biotechnology; 2F9; sc-293419; diluição 1:1000) e anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology; sc-32233; diluição 1:2500), ambos diluídos em TBS-T contendo 3% de BSA. Como anticorpo secundário, foi utilizado anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology; m-IgGκ BP-HRP: sc-516102; diluição 1:5000), diluído em TBS-T com 1% de BSA.

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Efeitos da inibição da HAT p300/CBP na expressão do receptor CB_1 no córtex PL.

Animais condicionados ao contexto foram aleatoriamente distribuídos para receber VEI ou C646 (50 ng/0,2 µl/lado) no córtex PL imediatamente ou 1 hora após a sessão de evocação. Os animais foram sacrificados 60 minutos após o tratamento, e amostras do córtex PL foram coletadas para análise da expressão de CB_1 por meio de Western blotting. Um grupo adicional de animais *sham* (não condicionados) teve o córtex PL coletado para estabelecer os níveis basais de expressão proteica (Figura 15A).

Experimento 2: Papel imediato do receptor CB_1 na modulação dos efeitos da inibição da HAT p300/CBP 0 h após a evocação da memória

Para investigar se os efeitos da inibição da HAT p300/CBP imediatamente após a evocação são mediados pela ativação do receptor CB_1, os animais foram pré-tratados com AM251 (50 pmol/0,2 µL/hemisfério do córtex PL) imediatamente após a sessão de evocação no Contexto A. Cinco minutos após o pré-tratamento, os animais receberam VEI ou C646 (50 ng/0,2 µL/hemisfério do córtex PL; 9-11 animais por grupo). O Teste A_1 foi realizado 1 dia após a sessão de evocação, enquanto o Teste B_1 foi conduzido 2 dias após a evocação para avaliar a generalização da memória (Figura 16A).

Experimento 3: Papel imediato do receptor CB_1 na modulação dos efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação da memória

Para investigar se os efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação são mediados pela ativação do receptor CB_1, os animais foram pré-tratados

com AM251 (50 pmol/0,2 µL/hemisfério do córtex PL) imediatamente após a sessão de evocação no Contexto A. Uma hora após o pré-tratamento, os animais receberam VEI ou C646 (50 ng/0,2 µL/hemisfério do córtex PL; 9-12 animais por grupo). O Teste A_1 foi realizado 1 dia após a sessão de evocação, enquanto o Teste B_1 foi conduzido 2 dias após a evocação para avaliar a generalização da memória (Figura 17A).

Experimento 4: Papel tardio do receptor CB_1 na modulação dos efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação da memória

Para investigar se os efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação são mediados pela ativação do receptor CB_1, os animais foram pré-tratados com AM251 (50 pmol/0,2 µL/hemisfério do córtex PL) uma hora após a sessão de evocação no Contexto A. Cinco minutos após o pré-tratamento, os animais receberam VEI ou C646 (50 ng/0,2 µL/hemisfério do córtex PL; 7-9 animais por grupo). O Teste A_1 foi realizado 1 dia após a sessão de evocação, enquanto o Teste B_1 foi conduzido 2 dias após a evocação para avaliar a generalização da memória (Figura 18A).

Experimento 5: Efeito da inibição imediata da FAAH sobre os efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 hora após a evocação da memória

Para investigar se os efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação são influenciados pelos níveis de anandamida, os animais foram pré-tratados com URB597 (10 pmol/0,2 µL/hemisfério do córtex PL) imediatamente após a sessão de evocação no Contexto A. Uma hora após o pré-tratamento, os animais receberam VEI ou C646 (5 ng/0,2 µL/hemisfério do córtex PL; 10-11 animais por grupo). O Teste A_1 foi realizado 1 dia após a sessão de evocação, enquanto o Teste B_1 foi conduzido 2 dias após a evocação para avaliar a generalização da memória (Figura 19A).

Experimento 6: Efeito da inibição tardia da FAAH sobre os efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação da memória

Para investigar se os efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação são influenciados pelos níveis de anandamida, os animais foram pré-tratados com URB597 (10 pmol/0,2 µL/hemisfério do córtex PL) 1 h após a sessão de evocação no Contexto A. Cinco minutos após o pré-tratamento, os animais receberam VEI ou C646 (5 ng/0,2 µL/hemisfério do córtex PL; 6-7 animais por grupo). O Teste A_1

foi realizado 1 dia após a sessão de evocação, enquanto o Teste B_1 foi conduzido 2 dias após a evocação para avaliar a generalização da memória (Figura 20A).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi conduzida conforme estabelecido na seção 3.9 do Capítulo 1. A principal diferença está na escolha do teste estatístico, optando-se por ANOVA de uma via, ANOVA de duas vias ou ANOVA de medidas repetidas, conforme apropriado para cada análise. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p \leq 0,05$, e o teste post hoc de Newman-Keuls foi aplicado para comparações múltiplas. Adicionalmente, o tamanho do efeito foi calculado e expresso por meio do eta quadrado parcial (η^2). Foi considerado um tamanho de efeito pequeno para $\eta^2 = 0,01$, médio para $\eta^2 = 0,06$ e grande para $\eta^2 = 0,14$.

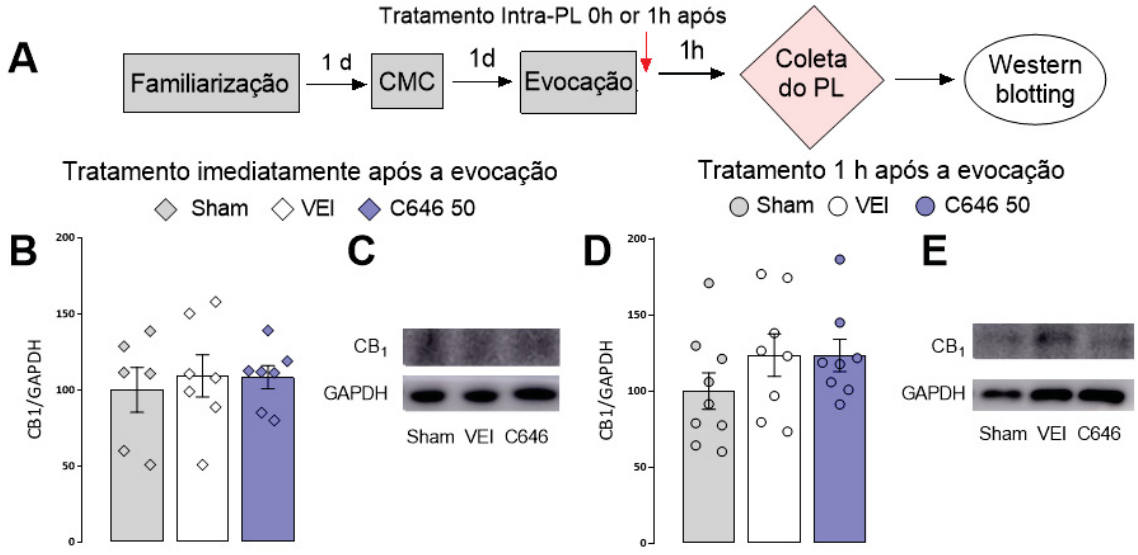
4 RESULTADOS

4.1 A INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NÃO ALTERA A EXPRESSÃO DE RECEPTORES CB_1 NO CÓRTEX PL.

Quando os animais foram tratados imediatamente após a sessão de evocação, a ANOVA de uma via demonstrou que não há efeito do tratamento na expressão de CB_1 [$F(2,17) = 0,1634$, $p = 0,851$, $\eta^2 = 0,019$]. Consequentemente, nenhuma diferença foi observada entre os grupos na expressão desse receptor (Figura 15B). A Figura 15C mostra imagens representativas de CB_1 e GAPDH desses animais. Novamente, quando o tratamento foi administrado 1 h após a sessão de evocação, a ANOVA de uma via demonstrou que não há efeito do tratamento na expressão de CB_1 [$F(2,22) = 1,270$, $p = 0,301$, $\eta^2 = 0,103$]. Consequentemente, nenhuma diferença foi observada entre os grupos na expressão desse receptor (Figura 15D). A Figura 15E mostra imagens representativas de CB_1 e GAPDH desses animais.

Esses resultados demonstram que a evocação da memória não altera a expressão de receptores CB_1 no córtex PL, e além disso, o tratamento com C646 também não é capaz de alterar a expressão desses receptores.

FIGURA 15 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM INIBIDOR HAT p300/CBP NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES CB_1 NO CÓRTEX PL.



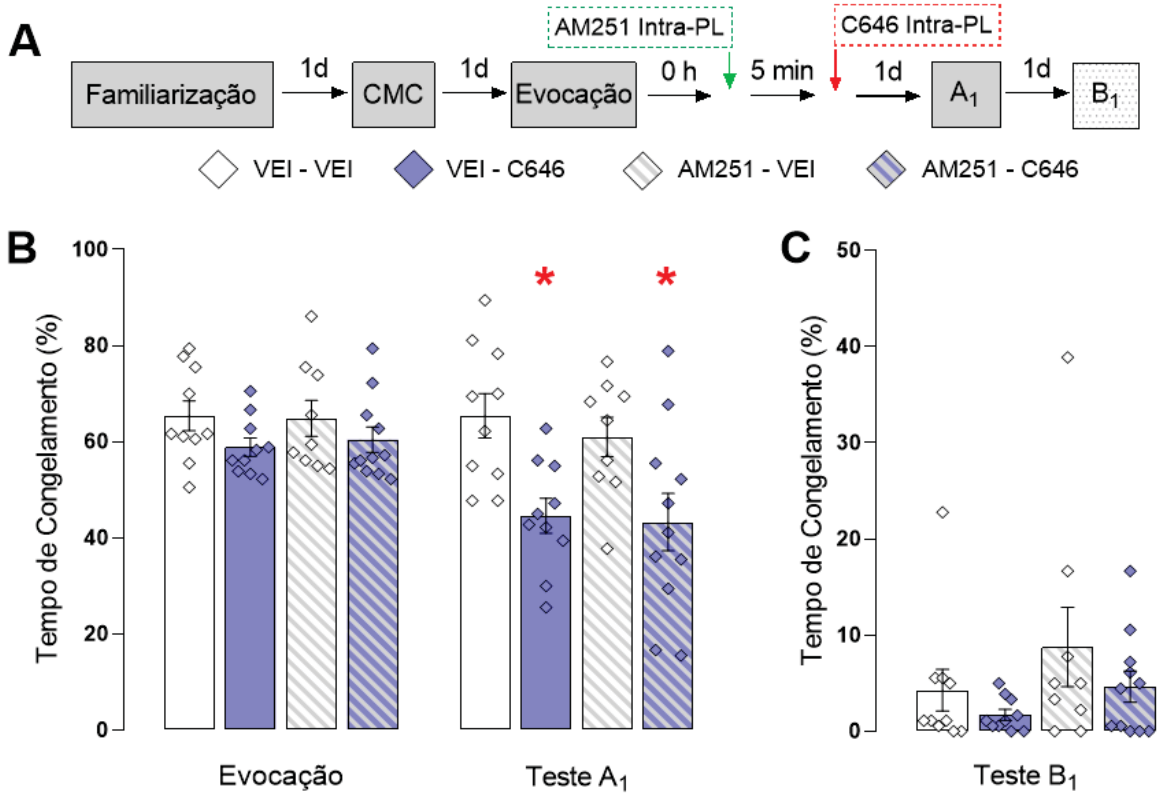
LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) O tratamento com VEI ou C646 50 ng imediatamente após a evocação não alterou a expressão de receptores CB_1 (n: Sham = 6, VEI = 7, C646 50 ng = 7). (C) Imagens representativas das proteínas alvo quando o tratamento foi dado imediatamente após a evocação. (D) O tratamento com VEI ou C646 50 ng 1h após a evocação não alterou a expressão de receptores CB_1 (n: Sham = 9, VEI = 8, C646 50 ng = 8). (E) Imagens representativas das proteínas alvo quando o tratamento foi dado 1 h após a evocação. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman–Keuls. Os resultados são mostrados como média ± EPM com valores individuais.

4.2 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO SÃO INFLUENCIADOS PELO BLOQUEIO IMEDIATO DOS RECEPTORES CB_1.

A ANOVA de medidas repetidas indicou uma interação significativa entre o tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(1, 36) = 9{,}716$, $p = 0{,}004$, $\eta^2 = 0{,}213$]. Contudo, não foi observada interação significativa entre o tratamento, o pré-tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(1, 36) = 0{,}116$, $p = 0{,}736$, $\eta^2 = 0{,}003$]. Durante a sessão de evocação, todos os grupos apresentaram porcentagens semelhantes de tempo de congelamento. No dia seguinte, o teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com C646 imediatamente após a evocação da memória, independentemente do pré-tratamento com VEI ou AM251, exibiram uma redução significativa no tempo de congelamento em comparação ao grupo controle VEI-VEI ($p = 0{,}011$ e $p = 0{,}0009$, respectivamente; Figura 16B). Adicionalmente, a ANOVA de duas vias revelou que não há interação significativa

entre o pré-tratamento e o tratamento durante a exposição ao Contexto B [$F(1, 36) = 0,041$, $p = 0,840$, $\eta^2 = 0,001$], tampouco diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no Teste B_1 (Figura 16C). Esses resultados sugerem que o prejuízo na reconsolidação da memória, induzido pela inibição da HAT p300/CBP no córtex PL imediatamente após a evocação, ocorre de forma independente da ativação dos receptores CB_1.

FIGURA 16 – OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO NÃO É INFLUENCIADO PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES CB_1.



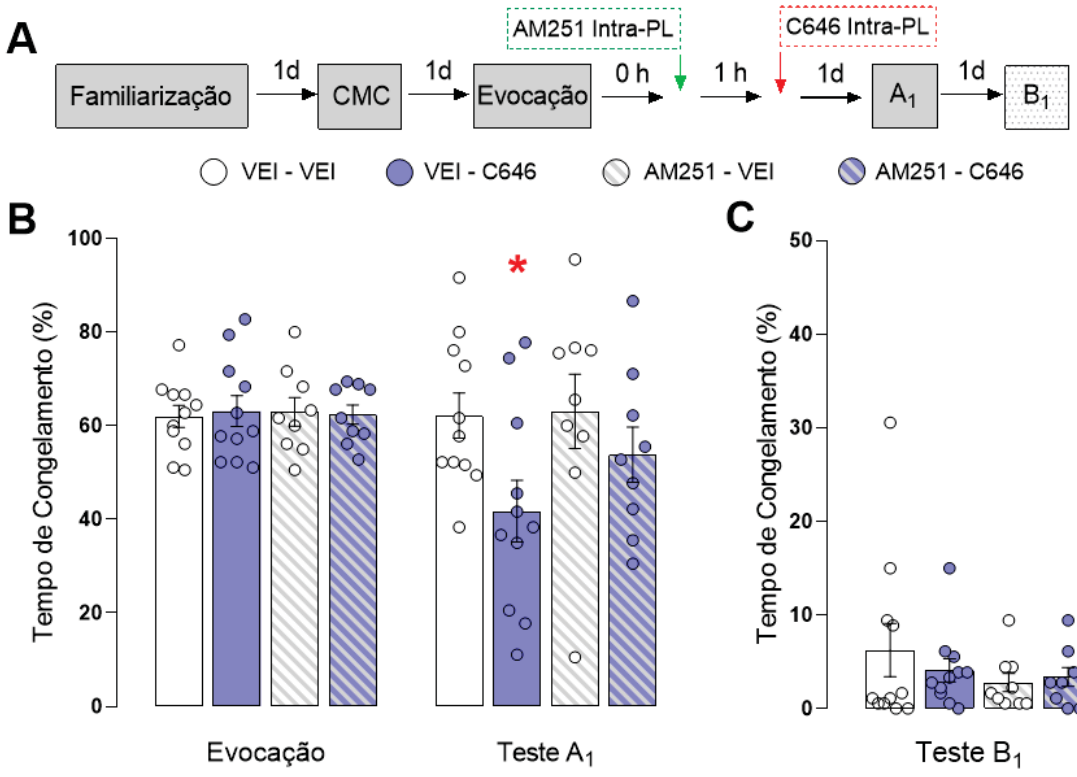
LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) O antagonismo dos receptores CB_1 não interferiu no efeito do C646 durante o Teste A_1. (C) Nenhuma diferença na porcentagem de tempo de congelamento foi observada entre os grupos no Teste B_1. (n: VEI-VEI = 10; VEI-C646 = 10; AM251-VEI = 9; AM251-C646 = 11). ANOVA de medidas repetidas ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados são expressos como média ± EPM e os valores individuais. O * significa $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle da sessão

4.3 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA SÃO INFLUENCIADOS PELO BLOQUEIO IMEDIATO DOS RECEPTORES CB_1.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre o tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(1, 36) = 5,819$, $p = 0,021$, $\eta^2 = 0,139$].

No entanto, não foi observada interação significativa entre o tratamento, o pré-tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(1, 36) = 1,046$, $p = 0,313$, $\eta^2 = 0,028$]. Durante a sessão de evocação, todos os grupos apresentaram porcentagens semelhantes de tempo de congelamento. No Teste A_1, o teste de *post hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com VEI-C646 exibiram uma redução significativa no tempo de congelamento em comparação ao grupo controle VEI-VEI ($p = 0,023$; Figura 17B). Por outro lado, nos animais que receberam o pré-tratamento com AM251 seguido de C646, não foi observada diferença significativa no tempo de congelamento em relação ao grupo VEI-VEI ($p = 0,456$) ou ao grupo VEI-C646 ($p = 0,087$; Figura 17B). Esses resultados sugerem que o prejuízo na reconsolidação da memória, induzido pela inibição da HAT p300/CBP no córtex PL 1 hora após a evocação, é parcialmente afetado pelo antagonismo dos receptores CB_1 imediatamente após a evocação da memória. Além disso, a ANOVA de duas vias mostrou que não há interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento durante a exposição ao Contexto B [$F(1, 36) = 0,029$, $p = 0,865$, $\eta^2 = 0,0008$], tampouco diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no Teste B1 (Figura 17C).

FIGURA 17 – OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL 1 H APÓS A EVOCAÇÃO É INFLUENCIADO PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES CB_1 IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO.

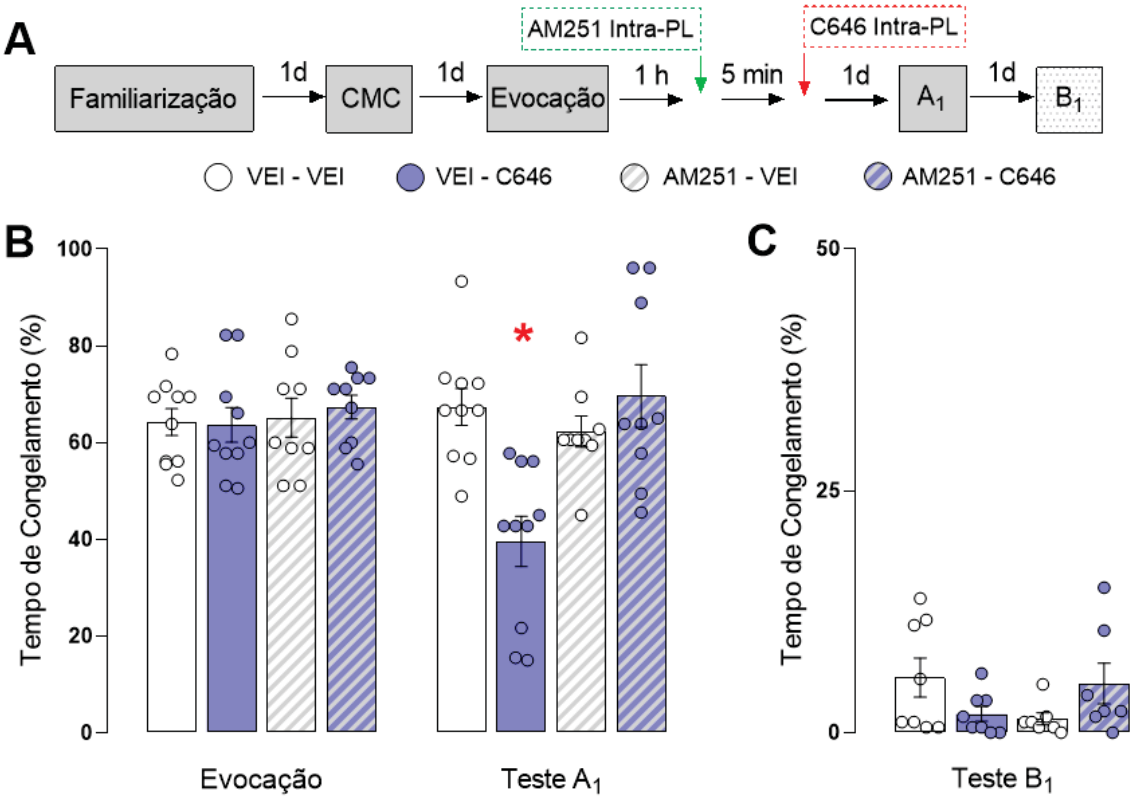


LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. Ratos submetidos ao CMC receberam AM251 ou VEI no córtex PL imediatamente após a evocação da memória, 1 h após o pré-tratamento os animais receberam VEI ou C646 50 ng/0,2 uL/lado no córtex PL. Após 24 h, cada rato foi reexposto ao Contexto A para avaliar os efeitos do tratamento durante o Teste A_1 e após 1 dia os animais foram expostos ao Contexto B para avaliar a generalização da memória. (B) O antagonismo dos receptores CB_1 impediu o efeito do C646 durante o Teste A_1. (C) Nenhuma diferença na porcentagem de tempo de congelamento foi observada entre os grupos no Teste B_1. (n: VEI-VEI = 11; VEI-C646 = 11; AM251-VEI = 9; AM251-C646 = 9). ANOVA de medidas repetidas ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados são expressos como média ± EPM e os valores individuais. O * significa $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle da sessão.

4.4 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA SÃO INFLUENCIADOS PELO BLOQUEIO TARDIO DOS RECEPTORES CB_1.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre o tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(1, 26) = 4,445$, $p=0,045$, $\eta^2 = 0,146$]. Além disso, foi observada interação significativa entre o tratamento, o pré-tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(1, 26) = 10,920$, $p=0,003$, $\eta^2 = 0,296$]. Durante a sessão de evocação, todos os grupos apresentaram porcentagens semelhantes de tempo de congelamento. No Teste A_1, a análise *post hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com VEI-C646 exibiram uma redução significativa no tempo de congelamento em comparação ao grupo controle VEI-VEI ($p = 0,001$) ou ao grupo AM251-C646 ($p = 0,001$; Figura 18B). Por outro lado, nos animais que receberam pré-tratamento com AM251 seguido de C646, não foi observada diferença significativa no tempo de congelamento em relação ao grupo VEI-VEI ($p = 0,976$; Figura 18B). Apesar da ANOVA de duas vias indicar que há uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento durante a exposição ao Contexto B [$F(1, 26) = 5,391$, $p = 0,028$, $\eta^2 = 0,172$], nenhuma diferença estatisticamente significativa a partir do teste *post hoc* foi observada entre os grupos no Teste B_1 (Figura 18C). Esses resultados sugerem que o prejuízo na reconsolidação da memória, induzido pela inibição da HAT p300/CBP no córtex PL 1 hora após a evocação, é dependente da ativação de receptores CB_1 1 h após a evocação da memória.

FIGURA 18 – OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP NO CÓRTEX PL 1 H APÓS A EVOCAÇÃO É INFLUENCIADO PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES CB_1 1 H APÓS A EVOCAÇÃO.



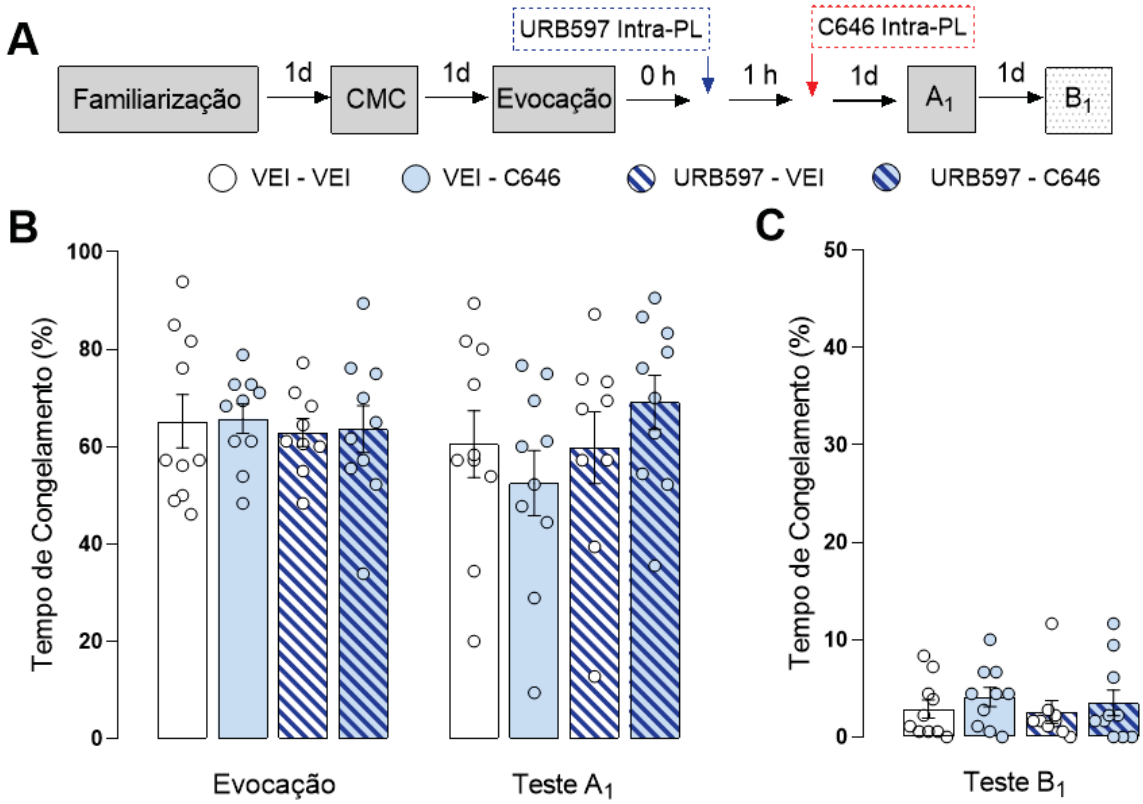
LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) O antagonismo dos receptores CB_1 impediu o efeito do C646 durante o Teste A_1. (C) Nenhuma diferença na porcentagem de tempo de congelamento foi observada entre os grupos no Teste B_1. (n: VEI-VEI = 9; VEI-C646 = 10; AM251-VEI = 9; AM251-C646 = 9). ANOVA de medidas repetidas ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados são expressos como média ± EPM e os valores individuais. O * significa $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle da sessão.

4.5 A INIBIÇÃO SUBEFICAZ DA HAT p300/CBP 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO É INFLUENCIADO PELA INIBIÇÃO IMEDIATA DA FAAH.

A ANOVA de medidas repetidas indicou que não há uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento durante a exposição ao Contexto A [$F(1, 35) = 0,848$, $p = 0,363$, $\eta^2 = 0,024$]. Além disso, não foi observada interação significativa entre o tratamento, o pré-tratamento e a reexposição ao Contexto A [$F(1, 35) = 2,141$, $p = 0,152$, $\eta^2 = 0,058$]. Durante a sessão de evocação e Teste A_1, todos os grupos apresentaram porcentagens semelhantes de tempo de congelamento (Figura 19B). Adicionalmente, a ANOVA de duas vias revelou que não há interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento durante a exposição ao Contexto B

[F(1, 35) = 0,176, p = 0,677, η^2 = 0,005], tampouco diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no Teste B_1 (Figura 19C). Esses resultados sugerem que impedir a degradação de AEA imediatamente após a evocação associado à inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação não afeta a reconsolidação da memória.

FIGURA 19 – A ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES CB_1 IMEDIATAMENTE APÓS A EVOCAÇÃO, NECESSÁRIA PARA PROMOVER O PREJUÍZO NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA, INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP, É INDEPENDENTE DE AEA.



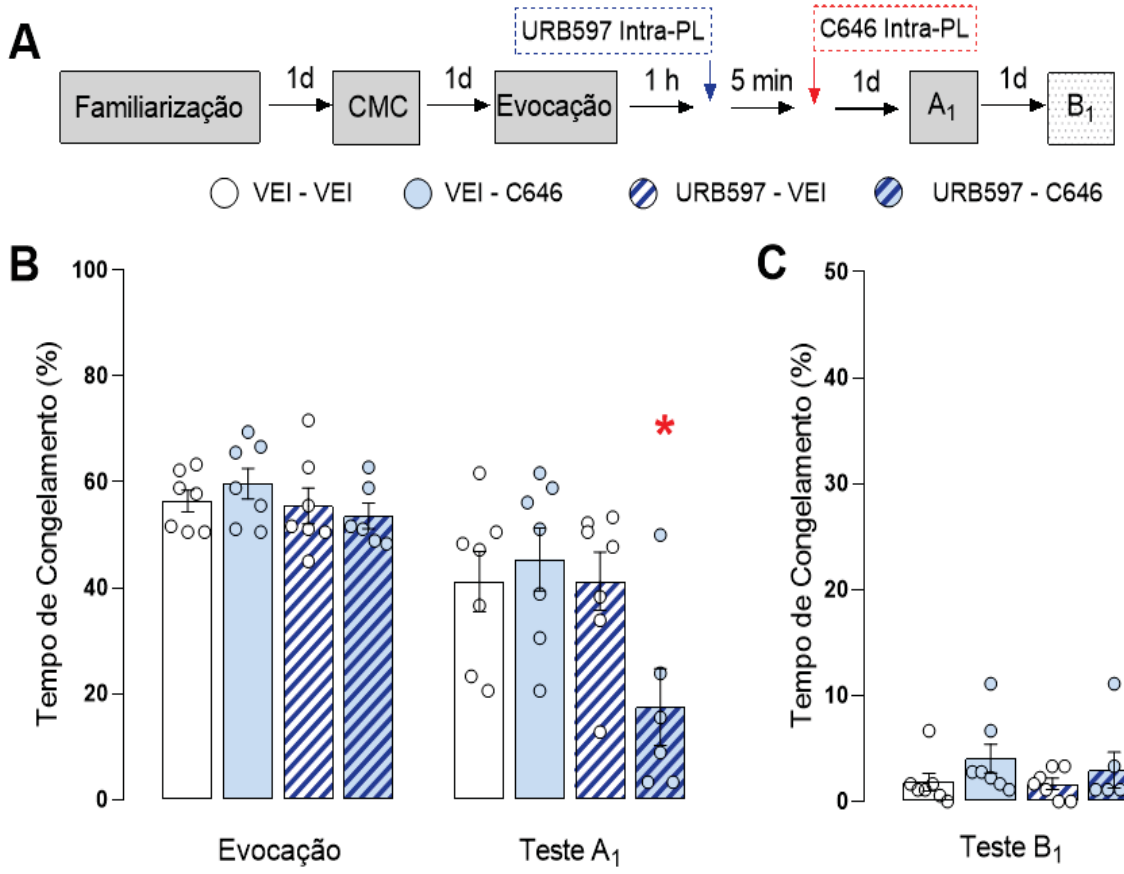
LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) Nenhuma diferença na porcentagem de tempo de congelamento foi observada entre os grupos no na sessão de evocação ou Teste A_1. (C) Nenhuma diferença na porcentagem de tempo de congelamento foi observada entre os grupos no Teste B_1. (n: VEI-VEI = 10; VEI-C646 = 10; AM251-VEI = 9; AM251-C646 = 10). ANOVA de medidas repetidas ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados são expressos como média ± EPM e os valores individuais.

4.6 A INIBIÇÃO SUBEFICAZ DA HAT p300/CBP 1 H APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA É INFLUENCIADA PELA INIBIÇÃO TARDIA DA FAAH.

A ANOVA de medidas repetidas indicou que há uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento durante a exposição ao Contexto A [F(1, 23) = 5,454, p = 0,029, η^2 = 0,192]. Contudo, não foi observada interação significativa entre

o tratamento, o pré-tratamento e a reexposição ao Contexto A [F(1, 23) = 3,380, p = 0,079, η^2 = 0,128]. Durante a sessão de evocação, todos os grupos apresentaram porcentagens semelhantes de tempo de congelamento. No Teste A_1, a análise *post hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com URB597-C646 exibiram uma redução significativa no tempo de congelamento em comparação ao grupo controle VEI-VEI (p = 0,001), ao grupo VEI-C646 (p = 0,0008) e ao grupo URB597-VEI (p = 0,003; Figura 20B). A ANOVA de duas vias revelou que não há interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento durante a exposição ao Contexto B [F(1, 23) = 0,368, p = 0,550, η^2 = 0,016]. Além disso, não são observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no Teste B_1 (Figura 20C). Esses resultados sugerem que impedir a degradação de AEA 1 hora após a evocação associado à inibição da HAT p300/CBP, afeta a reconsolidação da memória.

FIGURA 20 – A INIBIÇÃO DA FAAH 1 H APÓS A EVOCAÇÃO FACILITA O EFEITO DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP SOBRE A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA



LEGENDA: (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) Os animais que receberam URB597-C646 tiveram uma redução da porcentagem de tempo de congelamento significativa em comparação aos demais grupos no Teste A_1. (C) Nenhuma diferença na porcentagem de tempo de congelamento foi observada entre os grupos no Teste B_1. (n: VEI-VEI = 7; VEI-C646 = 7; AM251-VEI = 7; AM251-C646 = 6). ANOVA de medidas repetidas ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados são expressos como média ± EPM e os valores individuais. O * significa p < 0,05 em comparação com o grupo controle da sessão.

5 DISCUSSÃO

5.1 A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO ALTERA A EXPRESSÃO DE CB_1 NO CÓRTEX PL: O PAPEL DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS NA MODULAÇÃO DE RECEPTORES CANABINOIDES.

A exposição ao trauma em pacientes com TEPT está associada a uma redução na disponibilidade periférica de AEA, resultando em uma regulação positiva dos receptores CB_1 em todo o cérebro (Neumeister *et al*., 2013). Apesar disso, a análise da expressão de receptores CB_1 tem tido pouco foco em modelos animais utilizados para estudar a memória de medo, como o condicionamento de medo ao contexto. Considerando que a reconsolidação pode ser utilizada para modular uma memória traumática, o aumento do número de receptores canabinoides pode ser benéfico para potencializar os efeitos de ligantes endocanabinoides e favorecer um prejuízo na reconsolidação da memória (D'addario *et al*. 2013).

Em nosso estudo, investigamos a expressão de CB_1 no córtex PL após a evocação da memória de medo ao contexto, considerando que a atividade dos receptores CB_1 nessa região é crucial para modular a reconsolidação da memória de medo (Stern *et al*., 2015; Bayer *et al*., 2022). Além disso, avaliamos se a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL é capaz de modular a expressão de CB_1, visto que estudos já demonstraram que interferir na acetilação de histonas pode influenciar a expressão do gene *cnr1*, que regula a síntese de receptores CB_1 (Lomazzo *et al.*, 2017; De Sa Nogueira *et al*., 2022; Demali *et al*., 2024).

Nossos resultados demonstraram que não houve diferenças significativas na expressão de CB_1 no córtex PL 60 ou 120 minutos após a evocação da memória de medo ao contexto em animais condicionados que receberam VEI como tratamento. Esses achados estão alinhados com estudos anteriores, como o de Coelho (2024), que também não observou alterações na expressão de CB_1 no CPF de camundongos após o término de um protocolo de condicionamento de medo ao contexto. No entanto, é importante ressaltar que o estudo mencionado avaliou a expressão de CB_1 após um protocolo de extinção da memória, que difere do processo de reconsolidação investigado em nosso trabalho. Nesse sentido, os processos de extinção e reconsolidação podem envolver mecanismos neurobiológicos distintos, embora ambos estejam relacionados à modulação da memória de medo. Por outro lado,

estudos anteriores demonstraram que 48 horas após o condicionamento de medo ao contexto há um aumento na expressão de RNAm de CB_1 (Lisboa *et al.*, 2010). Embora os níveis proteicos de CB_1 não tenham sido avaliados nesse estudo, esses achados sugerem que a expressão de CB_1 no córtex PL pode ser afetada mais a longo prazo, e não a curto prazo, como foi investigado em nosso trabalho.

Além disso, outros estudos investigaram a expressão de CB_1 em resposta a outros eventos. Em modelos de estresse crônico, estresse precoce ou isolamento social, observa-se frequentemente uma redução na expressão de CB_1 ou seu RNAm, o que está associado a comportamentos semelhantes à ansiedade (Morena et al., 2016; Lomazzo *et al*., 2017; Demali *et al.*, 2024; Girella *et al*., 2024). Da mesma forma, em memórias associadas ao uso de cocaína, há evidências de que a sinalização endocanabinoide pode ser alterada, com uma *upregulation* da expressão de CB_1 e FAAH no CPF (Nogueira *et al.*, 2022). É importante destacar que, embora o condicionamento de medo ao contexto seja um evento estressante, ele difere significativamente de protocolos de estresse ou de modelos de memória de abuso. Essas diferenças sugerem que os mecanismos de regulação da expressão de receptores CB_1 podem variar dependendo do tipo de estresse ou memória envolvida, reforçando a necessidade de estudos que explorem a expressão desses receptores na memória de medo ao contexto de forma específica e em diferentes janelas temporais, a fim de compreender melhor a dinâmica de sua regulação.

Adicionalmente, diferente do esperado, em nossos resultados observamos que, pelo menos até 120 minutos após a evocação, a inibição da HAT p300/CBP não foi capaz de alterar a expressão de receptores CB_1. Interferir na acetilação de histonas utilizando um inibidor da HDAC também não foi capaz de alterar a expressão de CB_1 no CPF de camundongos após o término de um protocolo de condicionamento de medo ao contexto (Coelho, 2024). Esses resultados, em conjunto, podem indicar que alterar a acetilação de histonas no CPF não é capaz de influenciar na expressão de receptores CB_1 em memórias de medo ao contexto.

No entanto, outros modelos experimentais já mostraram que a interferência na acetilação de histonas pode influenciar a expressão de CB_1 ou seu RNAm, assim como outros componentes do sistema endocanabinoide. Por exemplo, o isolamento social foi capaz de reduzir os níveis de RNAm de FAAH e CB_1 na amígdala, associado

a uma diminuição na acetilação de H3K9 (Girella *et al.*, 2024). O estresse crônico também levou à redução da acetilação de H3K9 no gene *cnr1*, resultando em menor expressão proteica de CB_1 em neurônios não GABAérgicos. Da mesma forma, o estresse precoce em ratos induziu uma diminuição da acetilação de H3 e redução da expressão de CB_1 e FAAH no CPFm, efeitos que persistiram até a idade adulta (Demali *et al*., 2024). Esses achados sugerem que, embora a acetilação de histonas não tenha alterado a expressão de CB_1 em nosso modelo de memória de medo contextual, ela pode modular a expressão desses receptores em resposta a outros eventos.

Nosso estudo focou em avaliar se a inibição da HAT p300/CBP seria capaz de alterar a expressão de receptores CB_1, no entanto, é possível que a acetilação de histonas module a expressão de outros componentes do sistema endocanabinoide. Estudos já demonstraram que o estresse pode reduzir a acetilação de H3K9 e interferir na expressão do RNAm de FAAH, o que levaria ao aumento dos níveis de AEA (Pucci et al., 2019). Por outro lado, o aumento da acetilação de histonas H3K27, promovido por memórias associadas ao uso de cocaína, é capaz de aumentar a expressão do RNAm de FAAH no hipocampo e no CPF. Além disso, o aumento da acetilação de histonas induzido pela inibição da HDAC também já demonstrou diminuir a expressão de CB_2 após o término de um protocolo de condicionamento de medo ao contexto (Coelho, 2024). Nesse sentido propõem-se que investigações futuras explorem como alterações na acetilação de histonas podem influenciar não apenas CB_1, mas também outros alvos do sistema endocanabinoide, como CB_2 e FAAH, na evocação da memória de medo ao contexto.

5.2 ENTENDENDO COMO OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP É INFLUENCIADO PELO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES CB_1.

Como observado no capítulo anterior, a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL não foi capaz de alterar a expressão de receptores CB_1 nesta região. No entanto, é importante destacar que, assim como os mecanismos epigenéticos podem modular o sistema endocanabinoide, a modulação do sistema endocanabinoide também pode influenciar os efeitos induzidos por mecanismos epigenéticos. Nesse sentido, investigamos se o antagonismo de receptores CB_1 pode influenciar nos efeitos da

inibição da HAT p300/CBP no córtex PL sobre a reconsolidação da memória de medo. Nossos resultados demonstraram que o antagonismo de receptores CB_1 não influencia os efeitos da inibição da HAT p300/CBP quando o bloqueio CB_1 é realizado imediatamente após a evocação da memória.

Nesse sentido, pode-se sugerir que, em um período mais imediato, outros receptores-alvo do sistema endocanabinoide poderiam influenciar os efeitos da inibição da HAT p300/CBP. Por exemplo, em um modelo de abuso de nicotina, o desenvolvimento de comportamentos tipo-ansiosos foi prevenido em camundongos tratados concomitantemente com inibidores de HDAC, que induzem o aumento da acetilação de histonas. Este efeito foi bloqueado quando os animais receberam um antagonista do receptor TRPV1, um canal iônico que pode ser ativado pela AEA (Hayase, 2024). Além disso, é possível sugerir que o sistema endocanabinoide não é o único capaz de influenciar os efeitos da inibição da HAT p300/CBP, e outros receptores e sistemas podem desempenhar um papel importante nesse processo. Um estudo recente demonstrou que a HAT PCAF, tipicamente envolvida em processos epigenéticos associados à memória de longo prazo, também influencia a memória de curto prazo no hipocampo dorsal, possivelmente por meio da atividade não genômica de receptores de estrogênio citoplasmáticos e ligados à membrana em ratos machos, mas não em fêmeas (Mitchnick *et al*., 2024). Considerando que os receptores de estrogênio podem ter efeitos rápidos, eles poderiam ser um dos alvos relacionados à ativação das HATs. Além disso, já foi demonstrado que o enriquecimento ambiental leva ao aumento da acetilação de histonas H3 no hipocampo e no córtex (Fischer *et al*., 2007), o que pode melhorar a função cognitiva em camundongos idosos e aumentar a potenciação de longa duração, efeito que parece depender da ativação de receptores NMDA (Stein *et al*., 2016). Nesse contexto, o receptor NMDA, um canal iônico que pode gerar efeitos rápidos, também poderia ser um dos alvos relacionados à ativação das HATs. Esses achados destacam a complexidade das interações entre diferentes sistemas de sinalização e os mecanismos epigenéticos, sugerindo que múltiplos receptores e vias de sinalização podem modular os efeitos da inibição de HATs, como a p300/CBP. Isso reforça a necessidade de investigações futuras para elucidar melhor quais receptores e sistemas de sinalização podem estar envolvidos nos efeitos da inibição da HAT imediatamente após a evocação da memória de medo.

Em nossos resultados observamos ainda que a atividade dos receptores CB_1 parece ser necessária para que os efeitos da inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação sejam evidentes. Nesse sentido, Dulman *et al.* (2021) demonstraram que o antagonismo dos receptores CB_1 reduziu comportamentos tipo-ansiosos ao elevar os níveis de pCREB e da HAT CBP, resultando em maior acetilação de histonas. Resultados semelhantes foram observados por Večeřa *et al.* (2018), que relataram um aumento na acetilação de histonas em resposta ao bloqueio dos receptores CB_1. Ademais, estudos sobre a administração aguda de agonistas canabinoides, como CBD, THC ou THC + CBD, demonstraram que esses compostos reduzem a atividade de HATs, como a p300, levando à diminuição da acetilação de histonas (Pastrana-Trejo *et al.*, 2021; Stadelman *et al.*, 2011). Esses achados sugerem que, enquanto o antagonismo dos receptores CB_1 pode favorecer a acetilação das histonas, o agonismo desses receptores tende a reduzir esse processo.

No contexto dos efeitos dos canabinoides na reconsolidação da memória de medo, os últimos estudos citados fornecem uma explicação consistente sobre seus efeitos. O CBD e o THC demonstraram, em diversas pesquisas, a capacidade de prejudicar a reconsolidação da memória de medo, inclusive quando administrados no córtex PL (Bayer et al., 2022; Stern *et al.*, 2012; Stern *et al.*, 2015; Raymundi *et al.*, 2023). Simplificadamente, a reconsolidação da memória de medo depende da síntese de proteínas, a qual, por sua vez, está associada à acetilação de histonas. Assim, é plausível sugerir que a administração desses canabinoides possa interferir nesse processo, inibindo ou reduzindo a acetilação de histonas, o que contribuiria para o comprometimento da reconsolidação da memória. Ademais, os estudos citados ajudam a explicar nossos resultados, nos quais a inibição da HAT p300/CBP, 1 hora após a evocação da memória, é parcialmente ou totalmente prevenida pelo antagonismo dos receptores CB_1. Nesse contexto, o antagonismo de receptores CB_1 favoreceria uma maior acetilação de histonas, superando a redução induzida pela inibição da HAT p300/CBP, o que resultaria na preservação da reconsolidação da memória, sem comprometê-la.

Nesse sentido, nossos achados mostramque a sinalização endocanabinoide mediada por receptores CB_1 pode desempenhar um papel temporal específico na modulação dos mecanismos epigenéticos envolvidos na reconsolidação da memória de medo. Enquanto a inibição da HAT p300/CBP imediatamente após a evocação

ocorre de forma independente da atividade de CB_1, a intervenção tardia exige a funcionalidade desses receptores, indicando uma interação dinâmica na qual a modulação do sistema endocanabinoide pode contrapor os efeitos dos mecanismos epigenéticos na reconsolidação da memória de medo.

5.3 O AUMENTO DOS NÍVEIS DE AEA PODE ATUAR SINERGICAMENTE COM INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP SUBEFICAZ

Como discutido no tópico anterior, a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL, 1 hora após a evocação da memória de medo, é bloqueada pelo antagonismo dos receptores CB_1. A AEA, um endocanabinoide com alta afinidade pelos receptores CB_1, é degradada pela enzima FAAH (Maccarrone; Finazzi-Agró, 2003). Dessa forma, investigamos se o aumento dos níveis de AEA, por meio da inibição da FAAH, poderia atuar sinergicamente os efeitos do C646 em uma concentração subeficaz, com o objetivo de avaliar se a modulação do sistema endocanabinoide amplifica os efeitos epigenéticos da inibição de HAT p300/CBP.

Nossos resultados demonstraram que a inibição da FAAH, quando realizada imediatamente após a evocação da memória, não influenciou os efeitos da inibição da HAT p300/CBP com a concentração subeficaz de C646 administrada 1 hora depois. Considerando nossos achados anteriores, que mostraram que a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL foi bloqueada pelo antagonismo dos receptores CB_1, podemos sugerir que a ativação desses receptores, nesse contexto, pode não estar sendo mediada predominantemente pela AEA.

Considerando estes resultados, outros endocanabinoides com afinidade pelo receptor CB_1 podem estar desempenhando um papel na regulação epigenética associada à reconsolidação da memória. Apesar de poucas evidências terem investigado a relação entre os níveis de 2-AG e a acetilação de histonas, um estudo recente demonstrou que o aumento da acetilação de histonas induzido pela administração de cocaína resulta em um aumento do conteúdo de 2-AG no núcleo accumbens e hipocampo (De Sa Nogueira *et al.*, 2022). Considerando esse aspecto estudos futuros podem investigar se o aumento dos níveis de 2-AG influencia os efeitos da inibição da HAT p300/CBP na reconsolidação da memória de medo,

Além disso, apesar da AEA possuir alta afinidade pelos receptores CB_1, é contribuindo para uma compreensão mais aprofundada da interação entre o sistema endocanabinoide e os mecanismos epigenéticos envolvidos nesse processo importante considerar que esse endocanabinoide também pode se ligar ao receptor TRPV1, que, de forma oposta à ativação do receptor CB_1, promove maior despolarização e liberação de neurotransmissores, processos necessários para facilitar respostas de medo condicionado (Moreira *et al*., 2012). Além disso, como já citado anteriormente, um estudo demonstrou que os efeitos da inibição da HDAC no comportamento tipo-ansioso de animais foram modulados pelo bloqueio do receptor TRPV1 (Hayase, 2024). Portanto, outra hipótese a ser considerada é que o aumento dos níveis de AEA, por meio da inibição da FAAH, poderia estar levando a um maior recrutamento de receptores TRPV1 imediatamente após a evocação da memória, agindo de maneira contrária aos efeitos promovidos pela inibição da HAT p300/CBP na reconsolidação da memória. Essa interação entre os sistemas endocanabinoide e TRPV1 poderia explicar a ausência de efeitos observada em nossos resultados, sugerindo que o balanço entre a ativação de CB_1 e TRPV1 pode desempenhar um papel crucial na modulação da reconsolidação da memória de medo.

Uma terceira hipótese a ser considerada é que o antagonismo dos receptores CB_1 com AM251, realizado imediatamente após a evocação da memória, pode ter persistido até 1 hora após a evocação, período em que o C646 foi administrado. Nesse cenário, o aumento dos níveis de AEA no córtex PL, promovido pela inibição da FAAH imediatamente após a evocação, pode não ter sido suficiente para afetar a reconsolidação da memória quando combinado com a concentração subeficaz de C646. Essa possibilidade é reforçada pelos nossos resultados, nos quais foi observado um efeito sinérgico entre a inibição da FAAH, realizada 1 hora após a evocação, e a inibição subeficaz da HAT p300/CBP, administrada 5 minutos após o pré-tratamento com URB597. Esses achados sugerem a existência de uma janela temporal específica em que o sistema endocanabinoide modula os mecanismos epigenéticos envolvidos na reconsolidação da memória de medo. Evidências prévias indicam que, 10 minutos após o condicionamento, há um aumento nos níveis de AEA no hipocampo, que retorna ao basal após 30 minutos. Em contrapartida, no CPFm, esse aumento dos níveis de AEA é observado apenas 60 minutos após o treinamento (Morena *et al*., 2014). Assim, é possível que, durante a reconsolidação da memória, a

ativação do sistema endocanabinoide no córtex PL, uma sub-região do CPFm, ocorra de forma mais tardia, promovendo uma redução na acetilação de histonas que, por sua vez, pode atuar sinergicamente com a inibição subeficaz da HAT p300/CBP pelo C646 5 ng, promovendo um prejuízo da reconsolidação da memória.

O efeito sinérgico entre a inibição tardia da FAAH e a inibição subeficaz da HAT p300/CBP também pode estar relacionado à ativação dos receptores PPAR-γ. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que os efeitos do CBD na consolidação da memória podem ser modulados pelo antagonismo dos receptores PPAR-γ quando realizado 1 hora após o treino, mas não imediatamente após, sugerindo uma ação mais tardia desses receptores (Raymundi *et al.,* 2020). Evidências indicam que os endocanabinoides podem modular os receptores PPAR tanto por ligação direta quanto por mecanismos indiretos, nos quais a ativação dos receptores CB_1 na superfície celular desencadeia cascatas de sinalização intracelular que levam à ativação dos PPAR (Ratano *et al.,* 2017). Dessa forma, é possível que o aumento dos níveis de AEA, 1 hora após a evocação da memória, esteja modulando direta ou indiretamente os receptores PPAR-γ, promovendo, de maneira sinérgica com a inibição subeficaz da HAT p300/CBP pelo C646 (5 ng), um prejuízo na reconsolidação da memória. Considerando essa possibilidade, estudos futuros podem investigar mais detalhadamente o papel dos receptores PPAR-γ na interação entre o sistema endocanabinoide e os mecanismos epigenéticos envolvidos na reconsolidação da memória de medo.

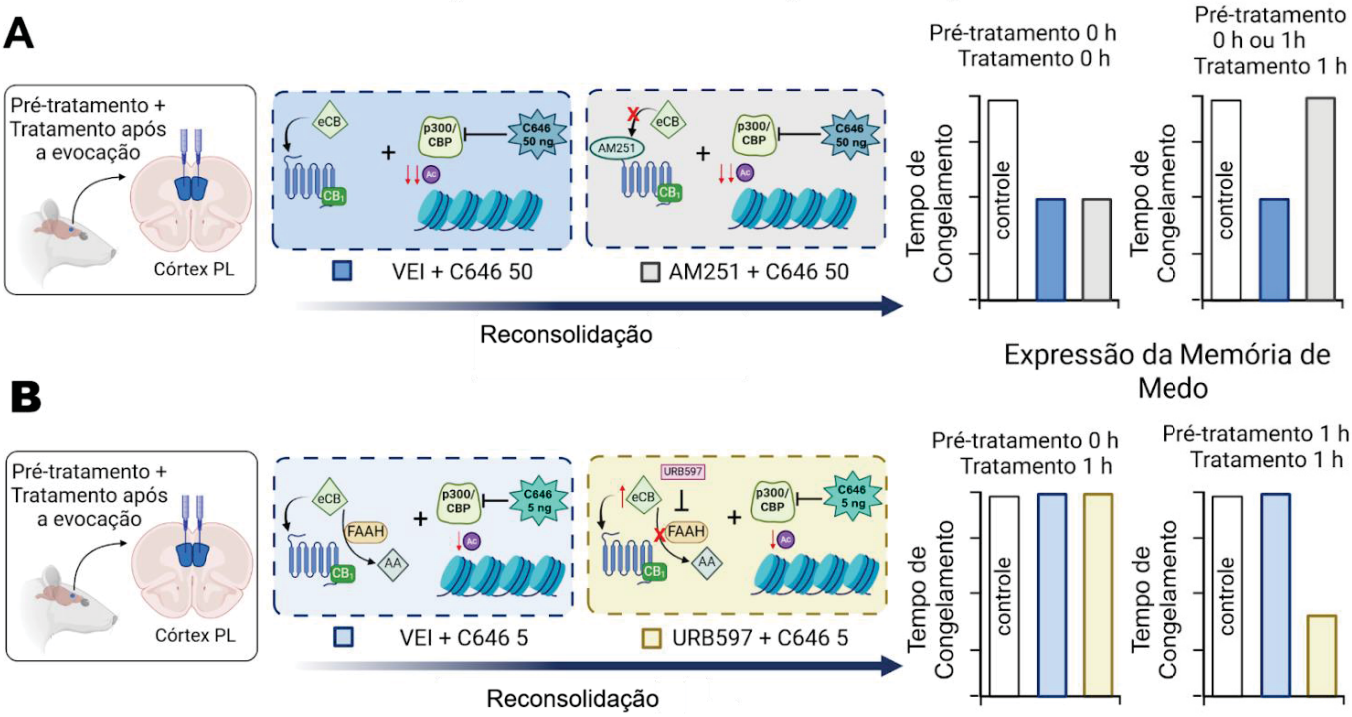
6 CONCLUSÕES

Diferente da hipótese inicial, nossos achados sugerem que, pelo menos em um curto-prazo após a evocação da memória de medo ao contexto, não há alteração na expressão de receptores CB_1 no córtex PL, e a inibição da HAT p300/CBP não é capaz de modificar a expressão destes receptores nesse período. Portanto parece que a acetilação de histonas pode não influenciar a curto-prazo na regulação de CB_1 no córtex PL.

Conforme ilustrado na Figura 20, nossos achados apontam que os efeitos da inibição da HAT p300/CBP, quando realizada 1 h após a evocação, mas não

imediatamente após, são impedidos pelo antagonismo dos receptores CB_1. Além disso, observamos que a inibição tardia da FAAH, com o objetivo de aumentar os níveis de AEA, atua de forma sinérgica com a inibição da HAT p300/CBP em uma concentração subeficaz. Esses resultados apontam que a atividade dos receptores CB_1 e os níveis de AEA, 1 h após a evocação, desempenham um papel fundamental no prejuízo da reconsolidação da memória induzida pela inibição da HAT p300/CBP no córtex PL. Nesse sentido, nossa hipótese é parcialmente confirmada, sugerindo uma interação complexa entre o sistema endocanabinoide e mecanismos epigenéticos.

FIGURA 21 - A ATIVIDADE DE CB_1 E AEA 1 H APÓS A EVOCAÇÃO É ESSENCIAL PARA O PREJUÍZO DA RECONSOLIDAÇÃO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA HAT p300/CBP.



LEGENDA: (A) Imediatamente ou 1h após a evocação da memória os animais receberam infusões no córtex PL do AM251 (antagonista de receptores CB_1) e 5 min ou 1h após o pré-tratamento receberam C646 na concentração eficaz (50 ng). Após 24 horas foi observado que os efeitos no prejuízo da reconsolidação da memória promovidos pela inibição da HAT p300/CBP, quando realizada 1 h após a evocação, mas não imediatamente após, foram impedidos pelo antagonismo dos receptores CB_1. (A) Imediatamente ou 1h após a evocação da memória os animais receberam infusões no córtex PL do URB597 (inibidor da FAAH) e 1h após a evocação receberam C646 na concentração subeficaz (5 ng). Após 24 horas foi observado um efeito sinérgico entre a inibição da FAAH e a inibição da HAT p300/CBP na concentração subeficaz.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho aprofundam o conhecimento sobre o papel da acetilação de histonas no córtex PL, na reconsolidação de memórias aversivas. Mostramos que a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL, até 1 h após a evocação da memória, prejudica a reconsolidação da memória. Esses achados mostram que a atividade da HAT p300/CBP no córtex PL é fundamental para a reconsolidação da memória de medo assim como em outras regiões, como hipocampo e amígdala (Lubin; Sweatt, 2007; Maddox *et al*., 2013; Maddox, Watts; Schafe, 2013). Além do córtex PL, no CPFm também estão localizados o córtex IL e CC (Heidbreder; Groenewegen, 2003). O córtex IL é responsável por inibir respostas de medo produzidas pela amígdala, sendo uma região essencial para a extinção da memória de medo (Kredlow *et al*., 2021). Estudos de um mesmo grupo já demonstraram que inibir a HAT PCAF no córtex IL foi capaz de impedir a extinção da memória de medo, enquanto inibir a HAT p300/CBP melhorou a formação da memória extinção (Marek *et al.*, 2011; Wei *et al*., 2012). Esses dados sugerem um papel diferencial para as HATs p300/CBP e PCAF, onde a ativação da HAT p300/CBP é responsável por aumentar a expressão da memória de medo, enquanto a ativação da PCAF seria responsável por inibir respostas de medo. Sob essa perspectiva, considerando que o CC está relacionado à expressão de memórias de medo remotas e à generalização da memória à medida que o tempo passa (Bian *et al*., 2019; Ortiz *et al.*, 2019), é possível que a atividade da HAT p300/CBP esteja mais envolvida com a funções desta região. Assim, futuras pesquisas podem explorar mais profundamente a atividade dessas HATs, investigando seus mecanismos e possíveis implicações para a modulação da memória.

Neste trabalho foi observado ainda que preservar a atividade normal da HAT p300/CBP no córtex PL, após a evocação de uma memória aversiva é capaz de aumentar a acetilação das histonas H3. Esse aumento de acetilação de histonas H3 no córtex PL, comparado a outras regiões envolvidas com a memória, como hipocampo e amígdala, ocorre mais lentamente, sugerindo um envolvimento um pouco mais tardio desta região na reconsolidação da memória de medo. Nosso estudo se concentrou na acetilação de H3, no entanto, continua sendo possível que o efeito de C646 na interrupção da reconsolidação da memória de medo ao contexto possa

envolver outras histonas, como H4, H2A e H2B. Mais pesquisas são necessárias para investigar a contribuição potencial de outras histonas neste processo.

Além disso, mostramos que mesmo com um protocolo que não induz a generalização da memória, a inibição da HAT p300/CBP 1 h após a evocação reduziu a resposta de medo em um contexto novo, o que sugere um potencial da HAT p300/CBP em aprimorar a discriminação de contexto. Considerando que os estudos sobre os mecanismos epigenéticos no CPFm e a discriminação de contexto focaram na hipofunção persistente da HAT CBP (Vieira *et al.*, 2014; Bailey *et al*., 2024), investigar os efeitos da inibição pontual da HAT na discriminação de contextos em memórias mais generalizada pode ter relevância para tratamentos que visam a reconsolidação em pacientes com TEPT, especialmente em um contexto translacional.

Alterações no perfil de acetilação de histonas estão relacionadas com modulação da ansiedade, e, o córtex PL já se mostrou ser uma região recrutada nesse processo (Demali *et al.*, 2024; Jinks; Mc Gregor, 1997; Stern *et al.*, 2010). Nossos resultados mostram que em animais não condicionados a inibição da HAT p300/CBP no córtex PL é capaz de induzir um comportamento tipo-ansiogênico. No entanto, quando se trata de animais condicionados não é observada alteração no comportamento tipo-ansioso ou na atividade locomotora de animais. Isso pode significar que a reativação da memória de medo pode estar recrutando a atividade da HAT p300/CBP para o processamento da reconsolidação da memória, direcionando sua ação para a modificação da memória, em vez de para o processamento da ansiedade. Apesar do estudo sobre o comportamento tipo-ansioso não ser o foco principal deste estudo, os resultados apresentados chamam a atenção para futuras pesquisas sobre esse comportamento, especialmente em relação ao papel da acetilação de histonas no córtex PL.

Uma limitação do nosso estudo, bem como de outros estudos que investigam a atividade da HAT, é a falta de compreensão sobre se os inibidores da HAT influenciam a reconsolidação da memória contextual do medo em fêmeas. Estudos recentes mostraram que os níveis de estrogênio em mulheres com TEPT estão associados à metilação do DNA do gene HDAC4, o que resulta em níveis reduzidos dessas enzimas e um risco aumentado de desenvolver TEPT, o que pode estar relacionado a um maior nível da acetilação de histonas (Maddox *et al*., 2017). Isso

ressalta a necessidade de pesquisas futuras explorarando potenciais diferenças específicas de sexo no recrutamento de p300/CBP e acetilação de histona, dados os distintos perfis epigenéticos observados em mulheres.

Outro aspecto relevante deste trabalho foi a investigação da interação entre os mecanismos epigenéticos e o sistema endocanabinoide, um sistema neuromodulador extensamente envolvido na regulação da plasticidade sináptica e dos processos de aprendizado e memória (Hill *et al.*, 2018; Hauer *et al.*, 2014). Nossos resultados indicam que, a curto prazo, a inibição da HAT p300/CBP não altera de forma significativa a expressão dos receptores CB_1 no córtex PL e deixam como dúvida ainda se a manipulação da atividade desta enzima poderia alterar a expressão destes receptores a longo prazo.

Apesar de estudos já terem mostrado anteriormente que o sistema endocanabinoide é capaz de produzir mudanças na expressão gênica através da modulação da acetilação de histonas, este foi o primeiro estudo a evidenciar como a inibição da HAT p300/CBP pode ser influenciada de maneira tempo dependente pela atividade de AEA e receptores CB_1. Nossos dados indicam que a modulação do sistema endocanabinoide, através do antagonismo dos receptores CB_1 é capaz de prevenir os efeitos do C646 administrado 1 h após a evocação. Apesar do antagonismo de receptores CB_1 não alterar os efeitos do C646 administrado imediatamente após a evocação, ainda é possível que o sistema endocanabinoide esteja sendo recrutado por outros receptores alvos dos endocanabinoides, como receptores CB_2 e TRPV1.

Além disso, nossos dados indicam que a modulação recente, mas não imediata, do sistema endocanabinoide através da AEA produz um sinergismo com a concnetração subeficaz de C646 administrada 1 h após a evocação. Estudos anteriores demonstram que, no CPFm, os níveis de AEA aumentam apenas 60 minutos após o treinamento (Morena *et al*., 2014). Considerando isso, é possível que imediatamente após a evocação, a inibição da FAAH no córtex PL não tenha sido suficiente para elevar os níveis de AEA, considerando que esse endocanabinoide pode ainda não ter sido mobilizado nesse momento. Estudos futuros podem avaliar molecularmente a expressão de AEA no córtex PL após a evocação da memória de medo. Além disso, é necessário compreender se a manipulação farmacológica de outros alvos do sistema endocanabinoide, como os receptores CB_2, TRPV1 e PPAR-

γ, bem como a possível participação de outros endocanabinoides, como o 2-AG, contribuem para a interação entre o sistema endocanabinoide e a acetilação de histonas.

Canabinoides exógenos como o CBD e o THC, que podem modular o sistema endocanabinoide, já demonstraram prejudicar a reconsolidação da memória. Dessa forma, entender como os diferentes componentes do sistema endocanabinoide interagem com mecanismos epigenéticos pode fornecer novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a memórias de medo, especialmente no contexto de transtornos como o TEPT.

REFERÊNCIAS

AL JOWF, G. I. et al. The molecular biology of susceptibility to post-traumatic stress disorder: Highlights of epigenetics and epigenomics. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 19, p. 10743, 2021.

ALARCÓN, J. M. et al. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/− mice. **Neuron**, v. 42, n. 6, p. 947–959, 2004.

ALBO, Z.; GRÄFF, J. The mysteries of remote memory. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 373, n. 1742, p. 20170029, 2018.

AMERICAN PSYCHIATRIC **ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-V-TR**, 5. ed. texto revisado. Porto Alegre: Artmed, 2023.

AMIR, N. et al. Increased activation of the anterior cingulate cortex during processing of disgust faces in individuals with social phobia. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 9, p. 975–981, 2005.

BAILEY, T. W. et al. The neuronal hypofunction of subdivisions of the prefrontal cortex shows differential effects on contingency judgment learning to gauge fear responses. **Neuroscience insights**, v. 19, 2024.

BALDI, E. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. **Neurobiology of learning and memory**, v. 81, n. 3, p. 162–166, 2004.

BARRETT, R. M. et al. Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 8, p. 1545–1556, 2011.

BASSIR NIA, A.; BENDER, R.; HARPAZ-ROTEM, I. Endocannabinoid system alterations in posttraumatic stress disorder: A review of developmental and accumulative effects of trauma. **Chronic stress (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 3, 2019.

BAYER, H. et al. Medial prefrontal cortex mechanisms of cannabidiol-induced aversive memory reconsolidation impairments. **Neuropharmacology**, v. 205, n. 108913, p. 108913, 2022.

BIAN, X.-L. et al. Anterior cingulate cortex to ventral hippocampus circuit mediates contextual fear generalization. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 29, p. 5728–5739, 2019.

BIEDENKAPP, J. C.; RUDY, J. W. Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: Implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 3, p. 200–203, 2007.

BILKEI-GORZO, A. et al. A chronic low dose of Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. **Nature medicine**, v. 23, n. 6, p. 782–787, 2017.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 67, n. 3, p. 370–375, 1969.

BOKS, M. P. et al. SKA2 methylation is involved in cortisol stress reactivity and predicts the development of post-traumatic stress disorder (PTSD) after military deployment. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 5, p. 1350–1356, 2016.

BOUSIGES, O. et al. Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 13, p. 2521–2537, 2010.

BRAMSON, B. et al. Anxious individuals shift emotion control from lateral frontal pole to dorsolateral prefrontal cortex. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 4880, 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E SEGURANÇA PÚBLICOS, SECRETARIA NACIONAL DE SEGURANÇA PÚBLICA. **Caderno técnico de tratamento do transtorno de estresse pós-traumático** – TEPT. 1 ED. Brasília: SENAP, 2019.

BREDY, T. W. et al. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 4, p. 268–276, 2007.

BRIDI, M. S. et al. Pharmacological activators of the NR4A nuclear receptors enhance LTP in a CREB/CBP-dependent manner. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 6, p. 1243–1253, 2017.

BUSTOS, S. G.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 831–842, 2006.

CAREAGA, M. B. L.; GIRARDI, C. E. N.; SUCHECKI, D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 71, p. 48–57, 2016.

CASTRO, C. A. et al. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 50, n. 4, p. 521–526, 1995.

CHENG, J. et al. Regulation of histone acetylation by garcinol blocks the reconsolidation of heroin-associated memory. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 173, n. 116414, p. 116414, 2024.

CHUANG, J. C.; JONES, P. A. Epigenetics and MicroRNAs. **Pediatric research**, v. 61, n. 5 Part 2, p. 24R-29R, 2007.

CISLER, J. M.; OLATUNJI, B. O. Emotion regulation and anxiety disorders. **Current psychiatry reports**, v. 14, n. 3, p. 182–187, 2012.

COELHO, A. A. **Efeitos comportamentais e moleculares do butirato de sódio no córtex pré-frontal de camundongos expostos a um modelo de transtorno de estresse pós-traumático**. 2024. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024. doi:10.11606/D.17.2024.tde-25072024-105142.

CORCHES, A. et al. Differential fear conditioning generates prefrontal neural ensembles of safety signals. **Behavioural brain research**, v. 360, p. 169–184, 2019.

CORREA, F.; DE LAURENTIIS, A.; FRANCHI, A. M. Ethanol downregulates N- acyl phosphatidylethanolamine-phospholipase D expression in BV2 microglial cells via epigenetic mechanisms. **European journal of pharmacology**, v. 786, p. 224–233, 2016.

DA CUNHA, C.; SANCHEZ-LUNA, W.; POCHAPSKI, J. A. Aprendizagem e Memória. In: Lent, W. **Neurociência da Mente e do Comportamento.** 2 ed.Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2023. p. 233-258.

DA SILVA, T. R. et al. Evidence for an expanded time-window to mitigate a reactivated fear memory by tamoxifen. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 10, p. 1601–1609, 2016.

DA SILVA, T. R. et al. Role of prelimbic cortex PKC and PKMζ in fear memory reconsolidation and persistence following reactivation. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 4076, 2020b.

DA SILVA, T. R. et al. The role of prelimbic and anterior cingulate cortices in fear memory reconsolidation and persistence depends on the memory age. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 27, n. 8, p. 292–300, 2020a.

DAMASIO, A. R. On some functions of the human prefrontal cortexa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 769, n. 1, p. 241–252, 1995.

DANELUZ, D. M. et al. Evidence on the impairing effects of Ayahuasca on fear memory reconsolidation. **Psychopharmacology**, v. 239, n. 10, p. 3325–3336, 2022.

DAVIU, N. et al. A single footshock causes long-lasting hypoactivity in unknown environments that is dependent on the development of contextual fear conditioning. **Neurobiology of learning and memory**, v. 94, n. 2, p. 183–190, 2010.

DAVIU, N. et al. Influence of footshock number and intensity on the behavioral and endocrine response to fear conditioning and cognitive fear generalization in male rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 135, n. 111112, p. 111112, 2024.

DAY, J. J.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in cognition. **Neuron**, v. 70, n. 5, p. 813–829, 2011.

DAY, J. J.; SWEATT, J. D. Epigenetic treatments for cognitive impairments. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 247–260, 2012.

DE LA FUENTE, V.; FREUDENTHAL, R.; ROMANO, A. Reconsolidation or extinction: Transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 15, p. 5562–5573, 2011.

DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1648–1655, 2008.

DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 17, n. 4, p. 202–209, 2010.

DE SA NOGUEIRA, D. et al. Hippocampal cannabinoid 1 receptors are modulated following cocaine self-administration in male rats. **Molecular neurobiology**, v. 59, n. 3, p. 1896–1911, 2022.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 527–538, 2002.

DEMAILI, A. et al. Early life stress induces decreased expression of CB1R and FAAH and epigenetic changes in the medial prefrontal cortex of male rats. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 18, 2024.

DO-MONTE, F. H.; QUIÑONES-LARACUENTE, K.; QUIRK, G. J. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. **Nature**, v. 519, n. 7544, p. 460–463, 2015.

DUCLOT, F. et al. Alteration of working memory but not in anxiety or stress response in p300/CBP associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice bred on a C57BL/6 background. **Neuroscience letters**, v. 475, n. 3, p. 179–183, 2010.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annual review of psychology**, v. 55, n. 1, p. 51–86, 2004.

DULMAN, R. S. et al. CB1 receptor neutral antagonist treatment epigenetically increases neuropeptide Y expression and decreases alcohol drinking. **Neuropharmacology**, v. 195, n. 108623, p. 108623, 2021.

DUNBAR, A. B.; TAYLOR, J. R. Garcinol blocks the reconsolidation of multiple cocaine-paired cues after a single cocaine-reactivation session. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 9, p. 1884–1892, 2017.

FEDERMAN, N.; FUSTIÑANA, M. S.; ROMANO, A. Reconsolidation involves histone acetylation depending on the strength of the memory. **Neuroscience**, v. 219, p. 145–156, 2012.

FISCHER, A. et al. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. **Nature**, v. 447, n. 7141, p. 178–182, 2007.

GAZARINI, L. et al. Interactions of noradrenergic, glucocorticoid and endocannabinoid systems intensify and generalize fear memory traces. **Neuroscience**, v. 497, p. 118–133, 2022.

GAZARINI, L.; STERN, C. A. J.; BERTOGLIO, L. J. On making (and turning adaptive to) maladaptive aversive memories in laboratory rodents. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 147, n. 105101, p. 105101, 2023.

GIRELLA, A. et al. Fatty acid amide hydrolase and cannabinoid receptor type 1 genes regulation is modulated by social isolation in rats. **Neurochemical research**, v. 49, n. 5, p. 1278–1290, 2024.

GOMES, T. M. et al. Epigenetics and the endocannabinoid system signaling: An intricate interplay modulating neurodevelopment. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 162, n. 105237, p. 105237, 2020.

GRÄFF, J. et al. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. **Cell**, v. 156, n. 1–2, p. 261–276, 2014.

GRÄFF, J. et al. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 603–649, 2011.

GREEN, T. A. et al. Differential effects of GABAA receptor activation in the prelimbic and orbitofrontal cortices on anxiety. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 11, p. 3237–3247, 2020.

GUAN, L. et al. Contribution of amygdala histone acetylation in early life stress-induced visceral hypersensitivity and emotional comorbidity. **Frontiers in neuroscience**, v. 16, p. 843396, 2022.

HAUER, D. et al. The role of glucocorticoids, catecholamines and endocannabinoids in the development of traumatic memories and posttraumatic stress symptoms in survivors of critical illness. **Neurobiology of learning and memory**, v. 112, p. 68–74, 2014.

HAYASE, T. Interrelated involvement of the endocannabinoid/endovanilloid (TRPV1) systems and epigenetic processes in anxiety- and working memory impairment-related behavioural effects of nicotine as a stressor. **Addiction biology**, v. 29, n. 7, 2024.

HAYES, J. P.; VANELZAKKER, M. B.; SHIN, L. M. Emotion and cognition interactions in PTSD: a review of neurocognitive and neuroimaging studies. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 6, p. 89, 2012.

HEIDBREDER, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 27, n. 6, p. 555–579, 2003.

HILL, M. N. et al. Integrating endocannabinoid signaling and cannabinoids into the biology and treatment of posttraumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 80–102, 2018.

HILTON, J. R. et al. Reactivity to conditioned threat cues is distinct from exploratory drive in the elevated plus maze. **The European journal of neuroscience**, v. 57, n. 1, p. 54–63, 2023.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain structure & function**, v. 212, n. 2, p. 149–179, 2007.

IBRAHIM, M. K. et al. Garcinia cambogia extract alters anxiety, sociability, and dopamine turnover in male Swiss albino mice. **SN applied sciences**, v. 4, n. 1, 2022.

IZQUIERDO, I. **Memória.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear memory. **Physiological reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.

JINKS, A. L.; MCGREGOR, I. S. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. **Brain research**, v. 772, n. 1–2, p. 181–190, 1997.

KAMINSKY, Z. et al. Epigenetic and genetic variation at SKA2 predict suicidal behavior and post-traumatic stress disorder. **Translational psychiatry**, v. 5, n. 8, p. e627–e627, 2015.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2001.

KESSLER, R. C. et al. Trauma and PTSD in the WHO world mental health surveys. **European journal of psychotraumatology**, v. 8, n. sup5, 2017.

KIDA, S. Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 49–57, 2019.

KIM, J. et al. Memory recall and modifications by activating neurons with elevated CREB. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 65–72, 2014.

KITAMURA, T. et al. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6333, p. 73–78, 2017.

KOBILO, T.; HAZVI, S.; DUDAI, Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. **The European journal of neuroscience**, v. 25, n. 11, p. 3417–3421, 2007.

KOENEN, K. C. et al. Posttraumatic stress disorder in the World Mental Health Surveys. **Psychological medicine**, v. 47, n. 13, p. 2260–2274, 2017.

KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; BOHUS, B. Fear-potentiation in the elevated plus-maze test depends on stressor controllability and fear conditioning. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 3, n. 1, p. 27–40, 1999.

KORZUS, E.; ROSENFELD, M. G.; MAYFORD, M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. **Neuron**, v. 42, n. 6, p. 961–972, 2004.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

KREDLOW, M. A. et al. Prefrontal cortex, amygdala, and threat processing: implications for PTSD. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 247–259, 2022.

LEE, J. L. C.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5672, p. 839–843, 2004.

LEVENSON, J. M. et al. Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. **The journal of biological chemistry**, v. 281, n. 23, p. 15763–15773, 2006.

LEVENSON, J. M. et al. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40545–40559, 2004.

LEWIS, D. J.; BREGMAN, N. J.; MAHAN, J. J., Jr. Cue-dependent amnesia in rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 81, n. 2, p. 243–247, 1972.

LI, J. et al. CB2R activation ameliorates late adolescent chronic alcohol exposure-induced anxiety-like behaviors during withdrawal by preventing morphological changes and suppressing NLRP3 inflammasome activation in prefrontal cortex microglia in mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 110, p. 60–79, 2023.

LI, Y.; KIM, J. Distinct roles of neuronal and microglial CB2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus. **Neuroscience**, v. 363, p. 11–25, 2017.

LIN, H.-C.; MAO, S.-C.; GEAN, P.-W. Effects of intra-amygdala infusion of CB1 receptor agonists on the reconsolidation of fear-potentiated startle. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 13, n. 3, p. 316–321, 2006.

LISBOA, S. F. et al. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 09, p. 1163–1173, 2010.

LOMAZZO, E. et al. Chronic stress leads to epigenetic dysregulation in the neuropeptide-Y and cannabinoid CB1 receptor genes in the mouse cingulate cortex. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 301–313, 2017.

LUBIN, F. D.; ROTH, T. L.; SWEATT, J. D. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 42, p. 10576–10586, 2008.

LUBIN, F. D.; SWEATT, J. D. The IkappaB kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. **Neuron**, v. 55, n. 6, p. 942–957, 2007.

LUTZ, B. et al. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 705–718, 2015.

MACCARRONE, M.; FINAZZI-AGRÓ, A. The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 10, n. 9, p. 946–955, 2003.

MADDOX, S. A. et al. Correction: A naturally-occurring histone acetyltransferase inhibitor derived from Garcinia indica impairs newly acquired and reactivated fear memories. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0181892, 2017.

MADDOX, S. A. et al. Estrogen-dependent association of HDAC4 with fear in female mice and women with PTSD. **Molecular psychiatry**, v. 23, n. 3, p. 658–665, 2018.

MADDOX, S. A.; SCHAFE, G. E. Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 18, n. 9, p. 579–593, 2011.

MADDOX, S. A.; WATTS, C. S.; SCHAFE, G. E. p300/CBP histone acetyltransferase activity is required for newly acquired and reactivated fear memories in the lateral amygdala. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 20, n. 2, p. 109–119, 2013.

MAREK, R. et al. Paradoxical enhancement of fear extinction memory and synaptic plasticity by inhibition of the histone acetyltransferase p300. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 20, p. 7486–7491, 2011.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual review of neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 897–931, 2001.

MECHOULAM, R. et al. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 757–764, 2014.

MILLER, C. A.; CAMPBELL, S. L.; SWEATT, J. D. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. **Neurobiology of learning and memory**, v. 89, n. 4, p. 599–603, 2008.

MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science (New York, N.Y.)**, v. 160, n. 3827, p. 554–555, 1968.

MITCHNICK, K. A. et al. The lysine acetyltransferase PCAF functionally interacts with estrogen receptor alpha in the hippocampus of gonadally intact male-but not female-rats to enhance short-term memory. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 44, n. 36, p. e1574232024, 2024.

MONSEY, M. S.; SANCHEZ, H.; TAYLOR, J. R. The naturally occurring compound Garcinia Indica selectively impairs the reconsolidation of a cocaine-associated memory. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 3, p. 587–597, 2017.

MOREIRA, F. A. et al. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience**, v. 204, p. 186–192, 2012a.

MOREIRA, F. A. et al. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety—two sides of one coin? **Neuroscience**, v. 204, p. 186–192, 2012b.

MORENA, M. et al. Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 80–102, 2016.

MORENA, M.; CAMPOLONGO, P. The endocannabinoid system: An emotional buffer in the modulation of memory function. **Neurobiology of learning and memory**, v. 112, p. 30–43, 2014.

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

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

NAKAYAMA, D. et al. Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 819–830, 2015.

NAKAYAMA, D. et al. Post-retrieval late process contributes to persistence of reactivated fear memory. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 20, n. 6, p. 307–310, 2013.

NEUMEISTER, A. et al. Elevated brain cannabinoid CB1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study. **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 9, p. 1034–1040, 2013.

OLIVEIRA, A. M. M. et al. Subregion-specific p300 conditional knock-out mice exhibit long-term memory impairments. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 18, n. 3, p. 161–169, 2011.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Transtorno de estresse pós-traumático.** 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/post-traumatic-stress-disorder. acesso em: fev 2025.

ORTIZ, S. et al. Anterior cingulate cortex and ventral hippocampal inputs to the basolateral amygdala selectively control generalized fear. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 33, p. 6526–6539, 2019.

OTIS, J. M.; DASHEW, K. B.; MUELLER, D. Neurobiological dissociation of retrieval and reconsolidation of cocaine-associated memory. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 3, p. 1271–1281, 2013.

PASTRANA-TREJO, J. C. et al. Effects on the post-translational modification of H3K4Me3, H3K9ac, H3K9Me2, H3K27Me3, and H3K36Me2 levels in cerebral cortex, hypothalamus and Pons of rats after a systemic administration of cannabidiol: A preliminary study. **Central nervous system agents in medicinal chemistry**, v. 21, n. 2, p. 142–147, 2021.

PETERS, J.; KALIVAS, P. W.; QUIRK, G. J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 16, n. 5, p. 279–288, 2009.

PREETHI, J. et al. Standardised extract of Bacopa monniera (CDRI-08) improves contextual fear memory by differentially regulating the activity of histone acetylation and protein phosphatases (PP1α, PP2A) in hippocampus. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 34, n. 4, p. 577–589, 2014.

PRZYBYSLAWSKI, J.; ROULLET, P.; SARA, S. J. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 15, p. 6623–6628, 1999.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural brain research**, v. 84, n. 1–2, p. 241–246, 1997.

PUCCI, M. et al. Transcriptional regulation of the endocannabinoid system in a rat model of binge-eating behavior reveals a selective modulation of the hypothalamic fatty acid amide hydrolase gene. **The international journal of eating disorders**, v. 52, n. 1, p. 51–60, 2019.

QUINN, J. J. et al. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 5, p. 368–372, 2008.

RANJAN, V. et al. Differential histone acetylation in sub-regions of bed nucleus of the stria terminalis underlies fear consolidation and extinction. **Psychiatry investigation**, v. 14, n. 3, p. 350, 2017.

RATANO, P. et al. Cannabinoid modulation of memory consolidation in rats: Beyond the role of cannabinoid receptor subtype 1. **Frontiers in pharmacology**, v. 08, 2017.

RAYMUNDI, A. M. et al. A time-dependent contribution of hippocampal CB_1, CB_2 and PPARγ receptors to cannabidiol-induced disruption of fear memory consolidation. **British journal of pharmacology**, v. 177, n. 4, p. 945–957, 2020.

RAYMUNDI, A. M. et al. Effects of delta-9 tetrahydrocannabinol on fear memory labilization and reconsolidation: A putative role of GluN2B-NMDA receptor within the dorsal hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 225, n. 109386, p. 109386, 2023.

REUL, J. M. H. M. et al. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. **Neurobiology of stress**, v. 1, p. 44–59, 2015.

ROTH, T. L.; SWEATT, J. D. Regulation of chromatin structure in memory formation. **Current opinion in neurobiology**, v. 19, n. 3, p. 336–342, 2009.

RUBIO, F. J. et al. Prelimbic cortex is a common brain area activated during cue-induced reinstatement of cocaine and heroin seeking in a polydrug self-administration rat model. **The European journal of neuroscience**, v. 49, n. 2, p. 165–178, 2019.

SAILAJA, B. S. et al. Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 52, 2012.

SAN LUIS, C. O.; RYAN, T. J. Understanding the physical basis of memory: Molecular mechanisms of the engram. **The journal of biological chemistry**, v. 298, n. 5, p. 101866, 2022.

SANTOS, J. M. et al. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 239–246, 2005.

SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Memory consolidation of auditory Pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 18, p. RC96–RC96, 2000.

SIDDIQUI, S. A. et al. Enhanced histone acetylation in the infralimbic prefrontal cortex is associated with fear extinction. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 37, n. 7, p. 1287–1301, 2017.

SIERRA-MERCADO, D.; PADILLA-COREANO, N.; QUIRK, G. J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 529–538, 2011.

SIMMONS, A. et al. Anxiety vulnerability is associated with altered anterior cingulate response to an affective appraisal task. **Neuroreport**, v. 19, n. 10, p. 1033–1037, 2008.

SMOAK, M. A. et al. **Prelimbic cortex activity predicts anxiety-like behavior in the Elevated Plus Maze**. 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/2024.12.26.630448>.

STADELMANN, A. M. et al. Association between a cannabinoid receptor gene (CNR1) polymorphism and cannabinoid-induced alterations of the auditory event-related P300 potential. **Neuroscience letters**, v. 496, n. 1, p. 60–64, 2011.

STEIN, G.; STEIN, J. Is human histone gene expression autogenously regulated? **Molecular and cellular biochemistry**, v. 64, n. 2, 1984.

STEIN, L. R. et al. Nampt is required for long-term depression and the function of GluN2B subunit-containing NMDA receptors. **Brain research bulletin**, v. 119, n. Pt A, p. 41–51, 2015.

STERN, C. A. J. et al. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 214–222, 2010.

STERN, C. A. J. et al. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 21, n. 1, p. 14–20, 2014.

STERN, C. A. J. et al. Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors. **Neuropharmacology**, v. 125, p. 220–230, 2017.

STERN, C. A. J. et al. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: Evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2132–2142, 2012.

STERN, C. A. J. et al. Δ-Tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 958–965, 2015.

STERNER, D. E.; BERGER, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 64, n. 2, p. 435–459, 2000.

SWANK, M. W.; SWEATT, J. D. Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 3383–3391, 2001.

TAN, H. et al. Integrated cannabinoid CB1 receptor transmission within the amygdala-prefrontal cortical pathway modulates neuronal plasticity and emotional memory encoding. **Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)**, v. 20, n. 6, p. 1486–1496, 2010.

TODD, S. M. et al. Interactions between cannabidiol and Δ9-THC following acute and repeated dosing: Rebound hyperactivity, sensorimotor gating and epigenetic and

neuroadaptive changes in the mesolimbic pathway. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 132–145, 2017.

TOMAS-ROIG, J. et al. Chronic exposure to cannabinoids during adolescence causes long-lasting behavioral deficits in adult mice. **Addiction biology**, v. 22, n. 6, p. 1778–1789, 2017.

VALOR, L. et al. Lysine acetyltransferases CBP and p300 as therapeutic targets in cognitive and neurodegenerative disorders. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 28, p. 5051–5064, 2013.

VALOR, L. M. et al. Ablation of CBP in forebrain principal neurons causes modest memory and transcriptional defects and a dramatic reduction of histone acetylation but does not affect cell viability. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 1652–1663, 2011.

VEČEŘA, J. et al. HDAC1 and HDAC3 underlie dynamic H3K9 acetylation during embryonic neurogenesis and in schizophrenia-like animals. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 1, p. 530–548, 2018.

VIEIRA, P. A. et al. Prefrontal consolidation supports the attainment of fear memory accuracy. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 21, n. 8, p. 394–405, 2014.

VIEIRA, P. A.; KORZUS, E. CBP-Dependent memory consolidation in the prefrontal cortex supports object-location learning: THEmPFC SUPPORTS SPATIAL RECOGNITION. **Hippocampus**, v. 25, n. 12, p. 1532–1540, 2015.

VILLAIN, H.; FLORIAN, C.; ROULLET, P. HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, 2016.

WANG, G.-Q. et al. Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. **Nature communications**, v. 6, n. 1, 2015.

WANG, I.-F.; HO, P.-C.; TSAI, K.-J. MicroRNAs in learning and memory and their impact on Alzheimer's disease. **Biomedicines**, v. 10, n. 8, p. 1856, 2022.

WEAVER, I. C. G. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847–854, 2004.

WEI, W. et al. p300/CBP-associated factor selectively regulates the extinction of conditioned fear. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 35, p. 11930–11941, 2012.

ZHANG, Y. et al. Conditioned stimulus presentations alter anxiety level in fear-conditioned mice. **Molecular brain**, v. 12, n. 1, 2019.

ZOVKIC, I. B.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in learned fear: implications for PTSD. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 77–93, 2013.