



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ARTHUR ALVES COELHO

**Efeitos comportamentais e moleculares do butirato de sódio no córtex pré-  
frontal de camundongos expostos a um modelo de transtorno de estresse pós-  
traumático**

Ribeirão Preto

2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ARTHUR ALVES COELHO

**Efeitos comportamentais e moleculares do butirato de sódio no córtex pré-frontal de camundongos expostos a um modelo de transtorno de estresse pós-traumático**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Sabrina Francesca de Souza Lisboa

Ribeirão Preto  
2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Coelho, Arthur Alves.

Efeitos comportamentais e moleculares do butirato de sódio no córtex pré-frontal de camundongos expostos a um modelo de transtorno de estresse pós-traumático / Arthur Alves Coelho; Orientadora: Sabrina Francesca de Souza Lisboa, Ribeirão Preto, 2024.

175 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Versão corrigida

1. TEPT; 2. Medo condicionado contextual; 3. Extinção; 4. HDACs; 5. Sistema endocanabinoide.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Coelho, Arthur Alves

Título: Efeitos comportamentais e moleculares do butirato de sódio no córtex pré-frontal de camundongos expostos a um modelo de transtorno de estresse pós-traumático

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: **Farmacologia**

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/2024

Banca examinadora

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

---

***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais, por todo suporte e ajuda. Por cada palavra de amor.*

---

---

***AGRADECIMENTOS***

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela infraestrutura que permitiu a realização do projeto.

À FAPESP (processos: 2021/01656-3, 2021/13878-0 e 2017/19731-6), CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

À banca examinadora, pelo aceite do convite e pelas contribuições para o trabalho.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sabrina Lisboa, pela confiança em todo o processo, por todos os ensinamentos e pelas incríveis oportunidades proporcionadas.

Ao corpo técnico do laboratório, Flávia e Míriam, pelo apoio e ajuda sempre que foi necessário.

Aos membros do NPPLab e companhia, Pedro, Fernanda, Gabriela, Kennia, Luana, Antônio, Erika, Izabela, Mylena, Arlindo, Anísia, Laura, Lívea, Marco pelas discussões científicas, ajudas nos experimentos e momentos de descontração, mesmo quando ninguém tinha tempo pra nada.

Aos meus colegas da Dinamarca, Cláudia, Erik, Carol, Rodrigo, Fernanda, Karina, Luana, Nicole, Rachele, Shokouh, Lia, Márcia e Kurt, por manterem meu coração aquecido no lugar mais frio em que eu já pisei.

Ao Prof. Dr. Gregers Wegener, por ter me aceitado como aluno. Por todos os conhecimentos passados. Por ter me inspirado como cientista. Por ter me mandado sair do laboratório para aproveitar outras partes da vida.

Ao Prof. Dr. Francisco e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sâmia, pelas conversas inspiradoras.

Aos meus amigos de Indaiatuba, Athos, João, Larissa, Thaise e Gabriela, por fazerem com que eu ainda me sinta em casa, mesmo a tantos anos longe da minha cidade natal. Por transformarem cada encontro em um momento único, apesar de repetirmos (quase) sempre a mesma programação.

À Dra. Mariana, por cada palavra de motivação quando eu estava desanimado. Por tanto conhecimento passado adiante. Pela ajuda em tantos protocolos. E principalmente, por ser uma pósdoc com alma de IC, mantendo o brilho no olhar a cada resultado discutido, fazendo com que eu me lembrasse o quanto o que a gente faz é legal, quando às vezes eu esquecia.

À Isabela, minha IC, pela ajuda nos experimentos. Por ter topado este desafio e confiado em mim. Por ter me ensinado mais do que eu te ensinei. Por cada momento



em que você me irritou tanto, mas que hoje eu já sinto saudades. Por antes de ser minha IC, ser uma amiga incrível.

À Bruna, por ser a pessoa mais parceira possível. Por ter me encorajado em todas as decisões que tomei. Por ter me levado pros esportes. Por cada jogo do Corinthians que torcemos. Pela companhia na procrastinação. Por todos momentos em que você simplificou em uma frase uma grande argumentação que eu tinha na minha cabeça. Por ser a definição do que uma amizade deve ser.

Ao Gabriel, por viver na minha casa e hoje me receber na sua. Por cada final de semana que passamos só nós dois, formulando ideias mirabolantes que variaram de abriremos uma rede empresa de suco em shoppings até sermos presidente da república e ministro da ciência juntos. Por me convencer a te acompanhar em dezenas de situações, mesmo eu tendo negado inúmeras vezes antes. Por me fazer desligar completamente do laboratório quando eu precisava.

À minha companheira, Anna Júlia, por ser a melhor surpresa possível quando eu menos esperava. Não só por ter aceitado sair comigo, mas por ter me ensinado a fazer macarrão de pizza no primeiro encontro. Por compartilharmos as mesmas bobagens. Por ter ouvido meus desabafos. Por ser a pessoa que mais se interessou neste projeto de pesquisa até hoje. Por me fazer companhia nas madrugadas em que escrevi esta dissertação. Por tanto amor e carinho.

Ao meu refúgio, Fábio, Sávio e Yurie, por cada piada feita. E foram muitas! Por cada risada que compartilhamos. Por terem transformado a rotina difícil de um laboratório em uma desculpa para estarmos juntos. Por terem feito tudo valer a pena. Por cada vez que falaram “vai dar certo”, mesmo sem ninguém acreditar. Deu! Muito obrigado!

À minha família, Marcelo, meu pai, Ione, minha mãe e Clara, minha irmã, por serem meu ponto de apoio. Por terem me acolhido em todos os surtos. Por sempre estarem disponíveis. Por me apoiarem em todas minhas decisões. Por fazerem meu sonho ser possível. Por todo amor e carinho que recebi desde sempre.

A todos que valorizam a ciência, mesmo em tempos em que ela foi tão desacreditada. Aos que lutam pelos direitos dos pesquisadores. Aos que acreditam na frase que estampa o brasão da Universidade que sinto tanto orgulho em fazer parte: *Scientia Vincet*. Vencerás pela ciência!

*“Somos o que lembramos e também  
aquilo que não queremos lembrar”*

**- Ivan Izquierdo**

---

---

***RESUMO***

## RESUMO

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.** 175 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2024.

A exposição a estressores intensos pode induzir distúrbios neuropsiquiátricos, notadamente o transtorno de estresse pós-traumático (PTSD). No PTSD, o prejuízo na memória de extinção do medo é um fator chave, e a ativação do sistema endocanabinoide, particularmente dos receptores CB<sub>1</sub>, facilita a extinção dessas memórias em modelos animais e em seres humanos. Existem, ainda, evidências de que mecanismos epigenéticos estão envolvidos no PTSD. O estresse ativa enzimas histona deacetilases (HDACs) e as alterações na acetilação das histonas, resultantes do aumento da atividade dessas enzimas, pode modular a expressão dos mediadores do sistema endocanabinoide. As enzimas HDACs podem ser moduladas farmacologicamente, como pelo butirato de sódio (NaB). Neste estudo, investigamos se o NaB administrado durante o estresse, previne os efeitos a longo prazo na memória do medo condicionado contextual, bem como nos comportamentos do tipo-ansioso e esquiva social. Para isso, foi feita a administração de diferentes doses de NaB (25, 50 e 100 mg/kg) sistemicamente em camundongos 30 minutos antes de cada sessão do protocolo de estresse de derrota social repetida (EDSR) (6 dias, 2 horas/dia). Os animais foram então submetidos a testes comportamentais, incluindo o teste de campo aberto (TCA) e o teste de esquiva social (TES) no dia seguinte ao término do EDSR, e ao teste de medo condicionado contextual (MCC), uma semana depois. Os resultados indicaram que o EDSR induziu hipolocomoção no TCA, e déficits na extinção do medo no MCC. Ainda, observou-se aumento da emocionalidade geral e uma maior proporção de animais afetados emocionalmente no grupo estresse em relação aos naives. Além disso, a administração de NaB, nas doses de 25 e 50 mg/kg, intensificou a hipolocomoção induzida pelo EDSR no TCA. No entanto, a dose de 50 mg/kg atenuou o déficit de extinção do MCC e houve tendência à redução da emocionalidade geral, além de reduzir a proporção de animais afetados emocionalmente. Em animais não estressados, o NaB na dose de 50 mg/kg induziu um efeito ansiolítico, sem afetar a locomoção, no TCA, mas não alterou os comportamentos observados no TES e MCC. Em nível molecular, o EDSR aumentou

a expressão proteica de HDAC3 e CB<sub>2</sub> na fração citoplasmática, mas não nucleares, do córtex pré-frontal, enquanto o NaB reduziu a expressão de HDAC1 (independentemente do EDSR) e de CB<sub>2</sub> (dependente do EDSR). Não foram observadas alterações na expressão de HDAC2, HDAC4, CB<sub>1</sub>, TRPV1, NAPE-PLD e FAAH em nenhuma das frações celulares. Esses achados sugerem que o efeito do NaB pode ser por meio da inibição de HDACs citoplasmáticas, possivelmente através de vias não epigenéticas, envolvendo modulação de GPCRs, fatores imunológicos e microbiota. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar essas conclusões e para melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à resposta comportamental ao EDSR e tratamento com NaB.

**Palavras-chave:** TEPT, Medo condicionado contextual, Extinção, HDACs, Sistema endocanabinoide.

---

***ABSTRACT***

## ABSTRACT

COELHO, A.A. **Behavioral and molecular effects of sodium butyrate in the prefrontal cortex of mice exposed to a model of post-traumatic stress disorder.**

175 p. Dissertation (Master's) – Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2024.

Exposure to intense stressors can induce neuropsychiatric disorders, notably post-traumatic stress disorder (PTSD). In PTSD, impairment in fear extinction memory is a key factor, and activation of the endocannabinoid system, particularly CB<sub>1</sub> receptors, facilitates the extinction of these memories in animal models and humans. There is also evidence that epigenetic mechanisms are involved in PTSD. Stress activates histone deacetylase enzymes (HDACs), and alterations in histone acetylation, resulting from increased activity of these enzymes, can modulate the expression of endocannabinoid system mediators. HDAC enzymes can be pharmacologically modulated, such as by sodium butyrate (NaB). In this study, we investigated whether NaB administered during stress prevents long-term effects on contextual fear conditioning memory, as well as on anxiety-like and social avoidance behaviors. Therefore, different doses of NaB (25, 50, and 100 mg/kg) were systemically administered to mice 30 minutes before each session of the repeated social defeat stress (RSDS) protocol (6 days, 2 hours/day). The animals were then subjected to behavioral tests, including the open field test (OFT) and the social avoidance test (SAT) on the day following the end of RSDS, and the contextual fear conditioning test (CFC), one week later. The results indicated that RSDS induced hypolocomotion in the OFT, and impairment of fear extinction in the CFC. Furthermore, an increase in overall emotionality and a higher proportion of emotionally affected animals were observed in the stress group compared to naïve animals. Additionally, administration of NaB at doses of 25 and 50 mg/kg intensified the hypolocomotion induced by RSDS in the OFT. However, the dose of 50 mg/kg attenuated the impairment in fear extinction in the CFC, and there was a tendency towards reducing overall emotionality, as well as reducing the proportion of emotionally affected animals. In non-stressed animals, NaB at a dose of 50 mg/kg induced an anxiolytic effect without affecting locomotion in the OFT but did not alter behaviors observed in the SAT and CFC. At the molecular level, RSDS increased protein expression of HDAC3 and CB<sub>2</sub> in the cytoplasmic fraction of the

prefrontal cortex, while NaB reduced the expression of HDAC1 (independent of RSDS) and CB<sub>2</sub> (RSDS-dependent). No changes were observed in the expression of HDAC2, HDAC4, CB<sub>1</sub>, TRPV1, NAPE-PLD, and FAAH in any of the cellular fractions. These findings suggest that the effect of NaB may be through inhibition of cytoplasmic HDACs, possibly through non-epigenetic pathways involving modulation of GPCRs, immune factors, and the microbiota. However, further studies are needed to confirm these conclusions and to better understand the underlying mechanisms of the behavioral response to RSDS and treatment with NaB.

**Key-words:** PTSD, Contextual fear conditioning, Extinction, HDACs, Endocannabinoid system.



---

---

***LISTA DE ABREVIATURAS***

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>2-AG</b>	2-araquidonoilglicerol
<b>AA-5HT</b>	Araquidonoil serotonina
<b>AEA</b>	Anandamida (N-araquidonoiletanolamina)
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>BET</b>	Proteínas com bromodomínio e domínio extraterminal
<b>CB<sub>1</sub></b>	Receptor canabinoide do tipo 1
<b>CB<sub>2</sub></b>	Receptor canabinoide do tipo 2
<b>CBD</b>	Canabidiol
<b>CPF</b>	Córtex pré-frontal
<b>CPFm</b>	Córtex pré-frontal medial
<b>CUS</b>	Estresse crônico imprevisível
<b>DAGL</b>	Diacilglicerol lipase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferase
<b>eCB</b>	Endocanabinoide
<b>EDSR</b>	Estresse de derrota social repetida
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>FAAH</b>	Enzima amida hidrolase de ácidos graxos
<b>FCFRP/USP</b>	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>HAT</b>	Histona acetiltransferases
<b>HDAC</b>	Histona deacetilase
<b>IL</b>	Infralímbico
<b>iNOS</b>	Isoforma induzível da enzima sintase de óxido nítrico
<b>ISRS</b>	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
<b>KO</b>	Knockout
<b>MAGL</b>	Monoacilglicerol lipase
<b>MCC</b>	Medo condicionado contextual
<b>mGlu<sub>2</sub></b>	Receptor metabotrópico de glutamato 2
<b>NaB</b>	Butirato de sódio
<b>NAc</b>	Núcleo Accumbens
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
<b>NAPE-PLD</b>	N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipase D
<b>NpY</b>	Neuropeptídeo Y
<b>pCREB</b>	Proteína de ligação ao elemento de resposta do ampc fosforilada
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PL</b>	Pré-límbico
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma $\gamma$
<b>PTSD</b>	<i>Posttraumatic stress disorder</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>SCFA</b>	Short-chain fatty acid

<b>SEFL</b>	<i>Stress-enhanced fear learning</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SPS</b>	Estresse único prolongado
<b>TBS-T</b>	Solução de salina tris-tamponada com 0,1% de <i>Tween 20</i>
<b>TCA</b>	Teste de campo aberto
<b>TES</b>	Teste de esquiva social
<b>TET</b>	Proteínas da família <i>ten-eleven translocation</i>
<b>THC</b>	$\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol
<b>TRPV1</b>	Receptor vaniloide 1
<b>VTA</b>	Área tegmentar ventral
<b>WB</b>	<i>Western Blotting</i>



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Imagem representativa do sistema eCB. (1) Frente a neurotransmissão de glutamato exacerbada, (2) as enzimas de síntese NAPE-PLD e DAGL são ativadas, produzindo AEA e 2-AG, respectivamente. (3) Esses eCBs retornam ao neurônio pré-sináptico ativando receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, que inibem a liberação do neurotransmissor, (4) ou, quando em maiores concentrações, a AEA pode agir em TRPV1, que intensifica ainda mais a neurotransmissão. (5) Por fim, os eCBs são degradados pelas enzimas FAAH e MAGL. Feito no *Mind the Graph* (autoria própria).

**Figura 2:** Imagem representativa da interação entre a atividade de HDAC2 e componentes do sistema eCB. (1) O estresse induz aumento da expressão e atividade de HDAC2 levando à redução de resíduos de histona acetilados associados ao gene do receptor CB<sub>1</sub>. Além disso, (2) a atividade de TRPV1 está associada à expressão e atividade de HDAC2. Feito no *Mind the Graph* (autoria própria).

**Figura 3:** Linha do tempo do protocolo experimental para avaliação do NaB em contrapor os efeitos do EDSR.

**Figura 4:** Efeito do EDSR e do tratamento com NaB na (A) distância total percorrida, (B) distância percorrida em cada zona do aparato, (C) número de entradas no centro e (D) tempo em cada zona do TCA e (E) Z-Score no teste. Foram utilizados 20 animais naives, 20 EDSR-veh, 20 EDSR-NaB25, 21 EDSR-NaB50 e 21 EDSR-NaB100. Os dados são representados pela média ± EPM. \* indica p<0,05.

**Figura 5:** Efeito do EDSR e do tratamento com NaB na (A) distância total percorrida, (B) distância percorrida, (C) número de entradas e (D) tempo em cada zona e (E) Z-Score no TES. Foram utilizados 22 animais naives, 20 EDSR-veh, 22 EDSR-NaB25, 17 EDSR-NaB50 e 17 EDSR-NaB100. Os dados são representados pela média ± EPM.

**Figura 6:** Efeito do EDSR e tratamento com NaB no MCC. A aquisição da extinção foi feita 1 dia e sua evocação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 20 animais naives e 20 EDSR-Veh, 23 EDSR-NaB25, 20 EDSR-NaB50 e 21 EDSR-NaB100. Os dados são representados pela média ± EPM. \* indica p<0,05 entre os grupos naive e EDSR-Veh.

**Figura 7:** Linha do tempo do protocolo experimental para avaliação do NaB em animais não estressados

**Figura 8:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais não estressados na (A) distância total percorrida, (B) distância percorrida em cada zona do aparato, (C) número de entradas no centro e (D) tempo em cada zona do TCA e (E) Z-Score no teste. Foram utilizados 9 animais naive-veh e 19 naive-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$  entre os grupos.

**Figura 9:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais não estressados na (A) distância total percorrida, (B) distância percorrida, (C) número de entradas e (D) tempo em cada zona e (E) Z-Score no TES. Foram utilizados 9 animais naive-veh e 19 naive-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$  entre os grupos.

**Figura 10:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais não estressados no MCC. A aquisição da extinção foi feita 1 dia e sua evocação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 8 animais naive-veh e 19 naive-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM.

**Figura 11:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados na (A) distância total percorrida, (B) distância percorrida em cada zona do aparato, (C) número de entradas no centro e (D) tempo em cada zona do TCA e (E) Z-Score no teste. Foram utilizados 28 animais naive-veh, 19 naive-NaB50, 20 animais EDSR-veh e 21 animais EDSR-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$  na ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Tukey.

**Figura 12:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados na (A) distância total percorrida, (B) número de entradas e (C) tempo em cada zona do TES e (D) Z-Score no teste. Foram utilizados 27 animais naive-veh, 17 naive-NaB50, 20 animais EDSR-veh e 18 animais EDSR-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$  na ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Tukey.

**Figura 13:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados no MCC. A aquisição da extinção foi feita 1 dia e sua evocação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 26 animais naive-veh e 19

naive-NaB50, 20 EDSR-veh e 20 EDSR-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM.

**Figura 14:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados na emocionalidade geral analisada pela (A) média e EPM e (B) proporção de animais em cada classificação

**Figura 15:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados na expressão proteica de (A) HDAC1, (B) HDAC2, (C) HDAC3 e (D) HDAC4, (E) CB1, (F) CB2, (G) NAPE-PLD, (H) FAAH e (I) monômero e (J) dímero de TRPV1 no córtex pré frontal. Imagem representativa da (K) marcação de cada proteína analisada e da (L) marcação de proteína total por poço. \* indica  $p < 0,05$ , Tukey, # indica  $p < 0,05$  no fator tratamento da ANOVA de duas vias.

**Figura 16:** Matriz de correlação de Pearson levando em conta emocionalidade geral, os níveis de congelamento nos 10 primeiros e 10 últimos minutos da sessão de aquisição da extinção e nos 10 minutos da sessão de evocação da extinção do medo condicionado, além da expressão proteica de HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, CB1, CB2, dímero e monômero de TRPV1, NAPE-PLD e FAAH nas frações citoplasmáticas e nucleares de amostras de CPF de animais tratados com salina. \* indica  $p < 0,05$  e # indica  $0,05 < p < 0,1$ .

**Figura 17:** Matriz de correlação de Pearson levando em conta emocionalidade geral, os níveis de congelamento nos 10 primeiros e 10 últimos minutos da sessão de aquisição da extinção e nos 10 minutos da sessão de evocação da extinção do medo condicionado, além da expressão proteica de HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, CB1, CB2, dímero e monômero de TRPV1, NAPE-PLD e FAAH nas frações citoplasmáticas e nucleares de amostras de CPF de animais tratados com NaB. \* indica  $p < 0,05$  e # indica  $0,05 < p < 0,1$ .

**Figura 18:** Correlação entre o congelamento no final da sessão de aquisição da extinção com a sessão de evocação dividida em animais tratados (A) com veículo e (B) NaB na dose de 50 mg/Kg. Os valores acima da legenda dos grupos indicam o coeficiente de correlação de Pearson (r).

**Figura 19:** Correlações entre (A-B) o congelamento no final da sessão de aquisição da extinção com expressão proteica de HDAC2 no citoplasma e no núcleo

e (C-D) o congelamento no final da sessão de aquisição da extinção com a expressão proteica de monômero de TRPV1 no núcleo. As correlações foram divididas em animais tratados com veículo (A e C) e NaB na dose de 50 mg/Kg (B e D). Os valores acima da legenda dos grupos indicam o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ).

**Figura 20:** Correlações entre (A-B) expressão proteica de HDAC3 no núcleo e NAPE-PLD no citoplasma, (C-D) HDAC3 no citoplasma e CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> e FAAH no citoplasma e (E-F) HDAC1 no núcleo e CB<sub>1</sub> e HDAC4 no citoplasma. As correlações foram divididas em animais tratados com veículo (A, C e E) e NaB na dose de 50 mg/Kg (B, D e F). Os valores acima da legenda dos grupos indicam o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ).





## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
1.1. Transtorno do estresse pós-traumático e medo condicionado .....	29
1.2. Sistema endocanabinoide em condições aversivas.....	31
1.3. Acetilação de histonas.....	35
1.4. Acetilação de histonas e memórias aversivas .....	37
1.5. Interação entre acetilação de histonas e o sistema eCB.....	39
<b>2. HIPÓTESE.....</b>	<b>43</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
3.1. Objetivo geral .....	45
3.2. Objetivos específicos.....	45
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1. Animais e drogas .....	47
4.2. Estresse de derrota social repetida .....	47
4.3. Teste de campo aberto .....	48
4.4. Teste de esquiva social .....	48
4.5. Medo condicionado contextual .....	48
4.6. Processamento das amostras.....	49
4.7. Western blotting .....	49
4.8. Análise estatística .....	50
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1. Avaliação do efeito do tratamento repetido com butirato de sódio em animais submetidos ao EDSR.....</b>	<b>54</b>
5.1.1. Teste de campo aberto.....	54
5.1.2. Teste de esquiva social .....	56
5.1.3. Medo condicionado contextual .....	57
<b>5.2. Avaliação do efeito do tratamento repetido com butirato de sódio em animais não estressados.....</b>	<b>59</b>
5.2.1. Teste de campo aberto.....	60
5.2.2. Teste de esquiva social .....	61

5.2.3. Medo condicionado contextual .....	62
<b>5.3. Análise conjunta dos dados .....</b>	<b>63</b>
5.3.1. Teste de campo aberto.....	64
5.3.2. Teste de esquiva social .....	66
5.3.3. Medo condicionado contextual .....	67
5.3.4. Análise de susceptibilidade ao estresse .....	69
5.3.5. Análise de expressão proteica no córtex pré-frontal .....	71
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>100</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>119</b>
9.1. Anexo A - Autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	119
9.2. Artigos publicados .....	120
9.2.1. Anexo B: Endocannabinoid signalling and epigenetics modifications in the neurobiology of stress-related disorders.....	120
9.2.2. Anexo C: Inducible nitric oxide synthase inhibition in the medial prefrontal cortex attenuates the anxiogenic-like effect of acute restraint stress via CB <sub>1</sub> receptors.....	144
9.2.3. Anexo D: Decoding the neurobiological mechanisms associated with resilience and vulnerability to depression and PTSD with a novel gene-environment animal model (Preprint).....	155

---

---

## ***INTRODUÇÃO***

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Transtorno do estresse pós-traumático e medo condicionado

Estudos mostram que cerca de 70% da população mundial experiencia algum tipo de trauma durante a vida, podendo desenvolver o transtorno de estresse pós-traumático (*PTSD*, do inglês, *posttraumatic stress disorder*), um transtorno neuropsiquiátrico crônico e debilitante. Após um trauma, cerca de 4% das pessoas desenvolve o *PTSD*, sendo que este valor varia de 0,1% a 19% de acordo com o trauma experienciado (KESSLER et al., 2017). A prevalência de 8% foi observada em adolescentes brasileiros (AVANCI et al., 2021). Ao contrário de outros transtornos psiquiátricos, o critério diagnóstico é a exposição a eventos traumáticos, como por exemplo guerras, violência sexual, assaltos, desastres naturais, entre outros. Enquanto a maioria dos indivíduos se recupera desta resposta de estresse aguda, alguns desenvolverão o *PTSD* (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; BONNE et al., 2004; BREMNER et al., 1995; DYKMAN et al., 1997; GILBOA et al., 1994; YEHUDA, 2009). O *PTSD* é caracterizado pela presença de sintomas que incluem intrusão e reexperimentação, evitação de pensamentos, lembranças que remetem ao trauma, alterações negativas de humor e cognição e alta excitabilidade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Dentre os sintomas do *PTSD*, alterações observadas em processo de condicionamento ao medo são muito características (AMSTADTER et al., 2009; FILIPOVIC et al., 2011; GILBOA et al., 1994; MILAD et al., 2009; MUTSO et al., 2012). Essas características e a ocorrência de patologias associadas se devem a uma ativação anormal de estruturas encefálicas. O córtex pré-frontal (CPF), por exemplo, desempenha funções complexas, como a integração e processamento de diferentes estímulos para tomada de decisões, comportamentos dirigidos a objetivos e memória de trabalho (FRIEDMAN et al., 2022; LE MERRE et al., 2021), além de processamento emocional. A porção medial do CPF (CPFm), muito envolvida no enfrentamento do estresse (MCKLVEEN et al., 2015), é dividida nas porções pré-límbica (PL) e infralímbica (IL), as quais podem ter funções distintas ou opostas (MANOOCHEI et al., 2022; VAN AERDE et al., 2008) devido às suas conexões e projeções distintas (GABBOTT et al., 2005; VERTES, 2004), além do CPFm cingulado.

De forma geral, o CPF é amplamente ativado durante o estresse agudo, e o excesso de liberação de glutamato e sua reabsorção prejudicada mediada por

glicocorticoides podem resultar em neurotoxicidade (POPOLI et al., 2012), liberação de fatores pró-inflamatórios e morte neuronal (GADEK-MICHALSKA et al., 2013; PANDEY et al., 2012). Essas mudanças resultam em atrofia neuronal observada no CPF de pacientes com depressão e *PTSD* e em modelos animais envolvendo exposição ao estresse (BANASR et al., 2011; RAUCH et al., 2003), o que pode resultar em projeções enfraquecidas do CPF para a amígdala e hipocampo, prejudicando a função modulatória exercida pelo CPF sobre essas regiões cerebrais (ARNSTEN, 2015; WOO et al., 2021). No *PTSD*, a hiperatividade da amígdala pela falta de inibição de sua atividade pelo CPF contribui para os sintomas do transtorno, incluindo déficits de extinção de memórias aversivas (KOENIGS et al., 2009; LIBERZON et al., 2016). Além disso, a disfunção do hipocampo e a falta de controle do CPFm sobre ele contribuem para prejuízos na discriminação de contextos relacionados ao trauma ou não, resultando em generalização de respostas de medo (LIBERZON et al., 2016)

Apesar do prejuízo na qualidade de vida dos indivíduos, além do alto custo em saúde que o *PTSD* gera, a farmacoterapia é bastante limitada, sendo quase que restrita a antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), que, por muitas vezes, podem não ser eficazes (FRIEDMAN et al., 2017; KRYSTAL et al., 2017; WHITTLE et al., 2014). Desta forma, estudos que visam melhor compreender a fisiopatologia do transtorno são necessários para a identificação de novos alvos terapêuticos. Recentemente, diversos estudos têm avaliado esses mecanismos em modelos animais de medo condicionado intensificado pelo estresse (*SEFL*, do inglês *Stress-Enhanced Fear Learning*), sendo este um modelo importante para o estudo do *PTSD*, onde o animal é exposto a um estressor para indução de disfunções no protocolo de medo condicionado, como por exemplo déficit de extinção (BLOUIN et al., 2016; VANELZAKKER et al., 2014).

O medo condicionado consiste no pareamento de um estímulo neutro com um estímulo aversivo, como por exemplo o choque nas patas, de forma que o estímulo neutro se torna um estímulo condicionado, pois prediz a ocorrência do estímulo aversivo (FENDT et al., 1999). Sendo assim, quando o animal é re-exposto ao contexto em que aconteceu o pareamento, reações de defesa, como por exemplo o comportamento de congelamento, ou *freezing*, são desencadeadas, mesmo que desta vez não haja a presença de estímulo aversivo (CARRIVE, 2000; FENDT et al., 1999; MEULDERS, 2020; RESSTEL et al., 2006). Conforme o animal é re-exposto ao contexto sem a presença de estímulo aversivo de forma repetida ou prolongada, uma

nova memória, denominada memória de extinção, é formada. Esta se sobrepõe à memória do condicionamento fazendo com que o estímulo condicionado deixe de prever o estímulo aversivo, reduzindo assim as reações desencadeadas pelo contexto (MAREN et al., 2016; QUIRK et al., 2006; QUIRK et al., 2008; VANELZAKKER et al., 2014).

Dentre os diversos estressores que podem ser utilizados no *SEFL*, o estresse de derrota social repetida (EDSR) é um modelo de agressão e estresse social que reproduz diversos comportamentos observados em pacientes com *PTSD*, como por exemplo, evitação social, ansiedade exagerada, anedonia (BERTON et al., 2006; HAMMELS et al., 2015; KINSEY et al., 2007; KRISHNAN et al., 2007), déficits de extinção do medo condicionado contextual (MCC) (LISBOA et al., 2018), além de reproduzir parâmetros fisiológicos observados nestes pacientes, como aumento da atividade da amígdala por redução de sua inibição pelo córtex pré-frontal (HULTMAN et al., 2016) e inflamação central e periférica duradoura (READER et al., 2015). Por fim, também é possível observar um prejuízo na qualidade de sono, resultando em diminuição de sono REM e aumento de sono não REM (KAMPHUIS et al., 2015; MEERLO et al., 1997). Desta forma, a literatura demonstra que o EDSR possui validade de face, de construto e preditiva para o *PTSD*, visto que os comportamentos induzidos pelo estresse mimetizam sintomas observados no transtorno, suas bases biológicas são semelhantes e estas alterações podem ser revertidas pelo tratamento com fármacos já utilizados na clínica para esta condição (VERBITSKY et al., 2020). Sendo assim, a combinação deste modelo de trauma com o protocolo de MCC se torna muito relevante para os estudos que investigam a fisiopatologia do *PTSD* (BOWERS et al., 2015).

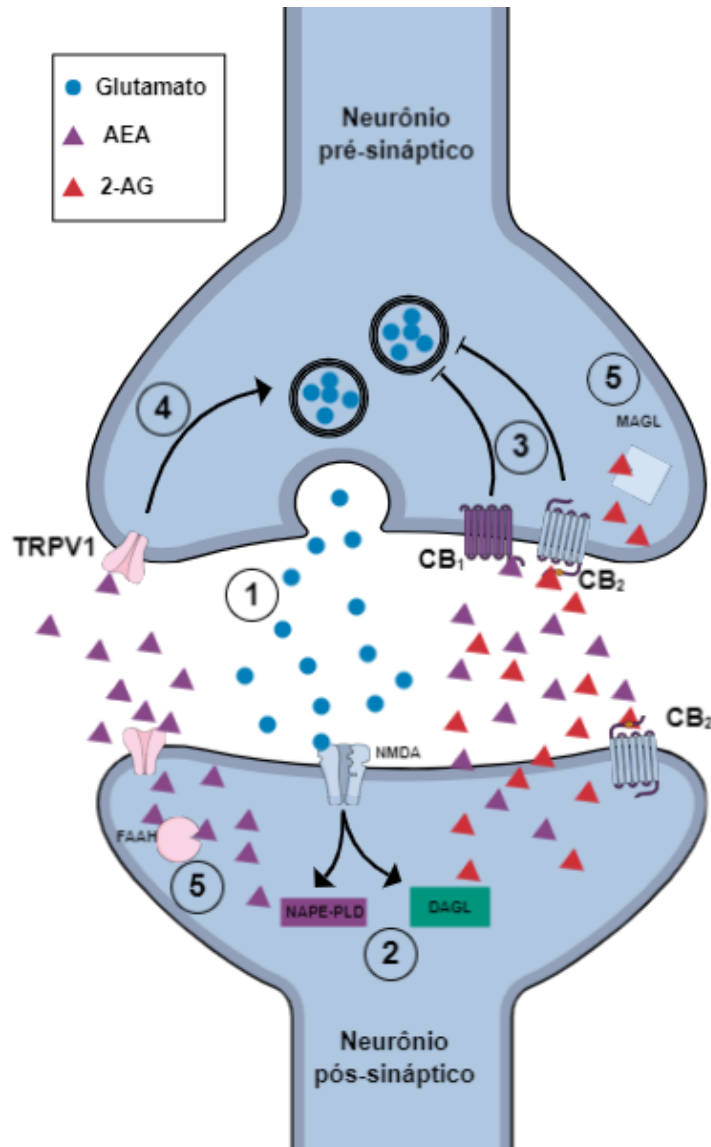
## **1.2. Sistema endocanabinoide em condições aversivas**

O sistema endocanabinoide (eCB) é considerado um sistema tampão, sendo essencial em diversas funções fisiológicas, incluindo a regulação da neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC). Os eCBs mais bem caracterizados são a anandamida (AEA) e o 2-arachidonoilglicerol (2-AG), que são sintetizados sob demanda pós-sinápticamente pelas enzimas N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD) e da diacilglicerol lipase (DAGL), respectivamente, em resposta ao aumento da atividade neuronal. Esses eCBs são liberados na fenda sináptica e atuam retrogradamente nos receptores canabinoides (CB<sub>1/2</sub>), pós-sinápticamente em CB<sub>2</sub>, ou

ainda em células da glia. CB<sub>1/2</sub> são receptores acoplados à proteína G (GPCR) inibitória, sendo assim, sua ativação induz inibição da enzima adenilato ciclase, e consequentemente da proteína quinase A (PKA), resultando em redução do influxo de Ca<sup>2+</sup> celular. Desta forma, acontece a redução da liberação de neurotransmissores, como por exemplo o glutamato, que acontece de maneira exacerbada durante situações estressantes. Por fim, a AEA é degradada pela enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), principalmente no neurônio pós-sináptico, enquanto o 2-AG é metabolizado pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) no neurônio pré-sináptico (CRISTINO et al., 2020).

O receptor vaniloide 1 (TRPV1) é um canal iônico expresso tanto pré- quanto pós-sinapticamente. O TRPV1 pode ser ativado pela AEA, resultando no aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> e, consequentemente, na liberação de neurotransmissores. Evidências sugerem que a AEA exerce suas ações preferencialmente por meio dos receptores CB<sub>1</sub>, enquanto, em concentrações elevadas, os efeitos sobre o TRPV1 são predominantes. Esta é uma das possíveis explicações para a curva dose-resposta em “U” invertido, frequentemente observada com a AEA em respostas comportamentais (WITKIN et al., 2005). A administração do URB597, um inibidor de FAAH, facilitou a extinção do medo condicionado em camundongos *knockout* (KO) para a isoforma induzível da enzima sintase de óxido nítrico (iNOS) (LISBOA et al., 2015), um modelo genético de déficit de extinção. Além disso, foi demonstrado que a administração de um agonista CB<sub>1/2</sub> facilita o processo de aprendizagem de extinção (LISBOA et al., 2015; LISBOA et al., 2018), enquanto o tratamento com um agonista do receptor TRPV1 teve efeito oposto (TERZIAN et al., 2014). Por fim, o favorecimento da sinalização da via do receptor CB<sub>1</sub> pela araquidonoil serotonina (AA-5HT), uma droga que inibe FAAH e antagoniza os receptores TRPV1, reduz a expressão do medo no MCC em uma dose menor do que a inibição desses dois alvos individualmente (GOBIRA et al., 2017), o que apoia o papel oposto dos receptores CB<sub>1</sub> e TRPV1 na indução do comportamento de medo.





**Figura 1:** Imagem representativa do sistema eCB. (1) Frente a neurotransmissão de glutamato exacerbada, (2) as enzimas de síntese NAPE-PLD e DAGL são ativadas, produzindo AEA e 2-AG, respectivamente. (3) Esses eCBs retornam ao neurônio pré-sináptico ativando receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, que inibem a liberação do neurotransmissor, (4) ou, quando em maiores concentrações, a AEA pode agir em TRPV1, que intensifica ainda mais essa neurotransmissão. (5) Por fim, os eCBs são degradados pelas enzimas FAAH e MAGL. Feito no *Mind the Graph* (autoria própria).

O sistema eCB pode ser alterado em várias condições patológicas, inclusive em condições psiquiátricas relacionadas ao estresse (BASSIR NIA et al., 2019; PATEL et al., 2017). Foi demonstrado, por exemplo, que mulheres deprimidas apresentam níveis séricos reduzidos de AEA e 2-AG (HILL et al., 2009) e que vítimas de suicídio têm aumento da expressão de receptores CB<sub>1</sub> no CPF dorsolateral (HUNGUND et al., 2004). Além disso, a presença do polimorfismo rs7766029 do receptor CB<sub>1</sub> interagem com o enfrentamento de dificuldades financeiras em pacientes com alto score de ansiedade e depressão (GONDA et al., 2019), e outros polimorfismos deste receptor

se correlacionam com diferentes sintomas e resistência ao tratamento em pacientes deprimidos (DOMSCHKE et al., 2008; MITJANS et al., 2013). Por fim, estudos farmacológicos mostram que a administração de rimonabant, um antagonista CB<sub>1</sub>, aumenta os sintomas de depressão e ansiedade em indivíduos saudáveis (CHRISTENSEN et al., 2007), e que os efeitos dos medicamentos antidepressivos convencionais dependem do sinalização eCB (HILL et al., 2008).

Níveis periféricos reduzidos de AEA e expressão aumentada de receptores CB<sub>1</sub> no cérebro são relatados em pacientes com *PTSD* (NEUMEISTER et al., 2013). Um estudo demonstrou que indivíduos saudáveis que tinham o alelo C385A do polimorfismo rs324420, uma mutação do gene que codifica a FAAH, apresentaram atividade reduzida desta enzima e conseqüentemente níveis aumentados de AEA, extinção de medo facilitada (MAYO et al., 2020) e reatividade amigdalár reduzida (ZABIK et al., 2022). Além disso, polimorfismos do receptor CB<sub>2</sub> e da enzima FAAH foram associados a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na vida adulta após passarem por um trauma quando crianças (LAZARY et al., 2016; 2019). Outros polimorfismos no sistema eCB, incluindo no receptor CB<sub>1</sub>, estão associados à extinção de medo e/ou *PTSD* (LISBOA et al., 2019; NEY et al., 2022; NEY et al., 2021).

Estudos com modelos animais também corroboram o envolvimento da sinalização eCB no desenvolvimento de alterações comportamentais induzidas pelo estresse. Camundongos KO para CB<sub>1</sub>, por exemplo, têm aumento de comportamentos depressivos e ansiosos após estresse (ASO et al., 2011; HALLER et al., 2002; MARTIN et al., 2002; VALVERDE et al., 2012). Além disso, esses camundongos também têm extinção de medo prejudicada (MARSICANO et al., 2002; MIKICS et al., 2006). Além disso, vários estudos relataram facilitação da extinção de medo induzida pela atividade de CB<sub>1</sub> em diferentes modelos animais (GANON-ELAZAR et al., 2013; LARICCHIUTA et al., 2013; MARSICANO et al., 2002). A participação de CB<sub>2</sub> nessas respostas parece ser mais complexa. A superexpressão desse receptor promoveu níveis reduzidos de comportamentos do tipo-ansioso no caixa claro-escuro e labirinto em cruz elevado em camundongos (GARCÍA-GUTIÉRREZ, MARÍA S. et al., 2010). No entanto, evidências mostram que a administração crônica de um antagonista do CB<sub>2</sub> produz um efeito ansiolítico (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2012). Outro estudo do mesmo grupo observou que a superexpressão dos receptores CB<sub>2</sub> reduziu comportamentos do tipo-depressivo em camundongos, enquanto a administração do

AM630, um antagonista CB<sub>2</sub>, induziu efeito antidepressivo em camundongos WT. A droga não teve efeito na linhagem transgênica (GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al., 2010). Além disso, camundongos KO para CB<sub>2</sub> também apresentam prejuízo no condicionamento ao medo contextual, mas não a pista (LI et al., 2016).

Múltiplos mecanismos envolvidos na fisiopatologia de condições psiquiátricas podem ser regulados pelo sistema eCB. Os eCBs podem, por exemplo, reduzir a desregulação na liberação de neurotransmissores nestas condições (FERREIRA et al., 2012; GERDEMAN et al., 2001; POLISSIDIS et al., 2013), promover neuroplasticidade (ASO et al., 2008; BLÁZQUEZ et al., 2015) e atenuar alterações inflamatórias induzidas pelo estresse (COELHO et al., 2022; LISBOA et al., 2016; LISBOA et al., 2018; ZOPPI et al., 2014). Em camundongos, tanto a deleção genética quanto o antagonismo dos receptores CB<sub>1</sub> no CPFm prolongaram a liberação de CORT após estresse. Foi proposto que a ativação do CB<sub>1</sub> em interneurônios GABAérgicos do córtex pré-frontal medial desinibe projeções neuronais excitatórias responsáveis pela terminação da resposta ao estresse (HILL et al., 2011). Uma proposta mais recente sobre as consequências do estresse implica na interação entre mecanismos endocanabinoides e epigenéticos no cérebro para promover alterações comportamentais (COELHO et al., 2023; LOMAZZO et al., 2017; WANG, S. E. et al., 2017; WANG et al., 2018).

### **1.3. Acetilação de histonas**

A epigenética é o campo de estudo dedicado aos mecanismos que alteram a expressão gênica sem mudanças na sequência do DNA (RUSSO et al., 1996). Em células eucarióticas o DNA é organizado em cromatina dentro do núcleo celular. A cromatina é composta por nucleossomos, que consistem em 146-147 pares de bases de DNA, que envolvem um octâmero de proteínas histonas, formado por dímeros de H2A, H2B, H3 e H4 (ZHANG et al., 2021). Diferentes mecanismos regulam a compactação da cromatina, influenciando na transcrição do DNA. A metilação do DNA, mediada pela atividade das enzimas DNA metiltransferases (DNMT), por exemplo, geralmente aumenta compactação da cromatina, reduzindo o acesso da maquinaria transcricional e, conseqüentemente, reduzindo a expressão gênica. Por outro lado, a acetilação de resíduos de lisinas nas caudas de proteínas histonas, mediada pelas histona acetiltransferases (HAT), promove descompactação da cromatina, pois reduz a carga positiva desses resíduos, reduzindo sua força de ligação

com o DNA, com carga negativa (HANDEL et al., 2010). Além disso, resíduos de lisina acetilados também são reconhecidos por proteínas com bromodomínio e domínio extraterminal (BET), que se ligam a eles e recrutam fatores de transcrição e a maquinaria transcricional, incluindo a RNA polimerase II (BENTON et al., 2017). Desta forma, a acetilação de histonas, geralmente está associada ao aumento da transcrição gênica (ZHANG et al., 2021).

Tanto a metilação do DNA quanto a acetilação de histonas podem ser revertidas, processos catalisados pelas proteínas da família *ten-eleven translocation* (TET) e pelas enzimas histona deacetilase (HDAC), respectivamente (HANDEL et al., 2010). Particularmente em relação às HDACs, investigadas nesse trabalho, em mamíferos existem 18 tipos, que são divididas em 4 classes com base na similaridade de suas sequências. As classes I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), IIa e IIb (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10) e IV (HDAC11) são dependentes de zinco, enquanto a classe III (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7) é dependente de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD<sup>+</sup>) (SETO et al., 2014). As HDACs são expressas diferencialmente em relação ao tecido e à localização celular, além de também possuírem diferentes reguladores e acetilarem diferentes resíduos de lisina. Desta forma, em conjunto e junto com as HATs, elas geram um “código de histonas” que será interpretado e regulará o processo de transcrição de maneira altamente específica (BENTON et al., 2017; DI GIORGIO et al., 2016).

Diversos estudos demonstram que a inibição das HDACs pode resultar em alteração no padrão de acetilação de histonas e conseqüentemente alteração no padrão de expressão gênica, tanto em processos fisiológicos, como patológicos. Dentro deste contexto, os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA, *Short-chain fatty acid*) se destacam por inibirem HDACs e já serem utilizados em ensaios clínicos para condições como obesidade (PENG et al., 2023), doenças inflamatórias intestinais (SILVA et al., 2018) e diferentes tipos de cânceres (SUN et al., 2024). Os SCFA são moléculas sintetizadas naturalmente no intestino via fermentação, pela microbiota, a partir de carboidratos que não foram digeridos, sendo posteriormente absorvidos e distribuídos para todo o organismo (RÍOS-COVIÁN et al., 2016). Dentro deste grupo, o butirato recebe bastante destaque, pois constitui cerca de 20% do conteúdo total de SCFA (SUN et al., 2024) e seus níveis estão reduzidos em patologias relacionadas a processos inflamatórios (RÍOS-COVIÁN et al., 2016), sendo sua suplementação muitas vezes testada pré-clinicamente na forma de butirato de sódio (NaB).

Entretanto, apesar do efeito de inibição das HDACs de classe I e IIa do NaB ser extensamente descrito na literatura pré-clínica (EDIRIWEERA, 2023), sabe-se que os SCFAs podem exercer efeitos via interação direta com GPCRs, alteração da microbiota e modulação de fatores imunológicos (DALILE et al., 2019), sendo estes efeitos mais discutidos na literatura clínica.

#### **1.4. Acetilação de histonas e memórias aversivas**

Os mecanismos epigenéticos são altamente dinâmicos e podem ser ativados ou desativados dependendo do contexto (BRETON et al., 2014) e das circunstâncias enfrentadas por cada indivíduo (FEIL et al., 2012). Desta forma, o ambiente e as experiências vivenciadas têm um impacto direto no padrão epigenético de um indivíduo, influenciando, conseqüentemente, sua expressão gênica (FEIL et al., 2012; KLENGEL et al., 2015). Esta interação gene-ambiente é particularmente relevante para o estudo de transtornos psiquiátricos, como depressão e *PTSD*, por exemplo, visto que a fisiopatologia destes está diretamente relacionada com a exposição ao estresse, um fator ambiental que influencia na expressão de diversos genes relacionados à plasticidade sináptica, ao eixo neuroendócrino e fatores inflamatórios (KLENGEL et al., 2015).

Devido à dificuldade de acesso a tecidos cerebrais em humanos, os estudos que avaliam alterações epigenéticas em pacientes de *PTSD* se restringem à tecidos periféricos e são em sua maioria relacionados a ensaios de metilação do DNA (KIM et al., 2018). Entretanto, já foi observado que pacientes com *PTSD* possuem aumento da trimetilação dos resíduos H3K4, H3K9, H3K27 e H3K26 em células mononucleares do sangue periférico, sendo que H3K4me3 apresentou associação com os genes do interferon gama e do fator de transcrição T-box 21, componentes do sistema imune (BAM et al., 2016). Outro estudo encontrou níveis elevados de metilação do sítio CpG cg22937172 no gene codificador de HDAC4 no sangue de mulheres pacientes de *PTSD* em relação a voluntárias saudáveis (MADDOX et al., 2018). Existem mais estudos com acetilação de histonas em humanos em outros transtornos psiquiátricos. Foi observada que a expressão dos RNAm de HDAC2 e HDAC5 em células sanguíneas periféricas aumentou em pacientes de depressão maior, mas não quando estavam em estado de remissão, quando comparados com os controles saudáveis. (HOBARA et al., 2010). Além disso, foi observado que a fluoxetina crônica, um ISRS, reduz a acetilação total de H3 e aumenta a dimetilação de H3K9 no promotor de

CaMKII $\alpha$  no Núcleo Accumbens (NAc) post-mortem de pacientes depressivos, reduzindo a expressão desta proteína (ROBISON et al., 2014). Desta forma, existem evidências de que os mecanismos de acetilação de histonas em estruturas cerebrais estão relacionados à fisiopatologia do *PTSD* e ao mecanismo de ação de drogas utilizadas em seu tratamento.

Apesar do número restrito de estudos em humanos, o papel de HDACs na formação de memórias e enfrentamento ao estresse é muito explorado em modelos animais de *PTSD* e outros transtornos relacionados ao estresse. A exposição de camundongos a estresse de restrição crônico por 21 dias, por exemplo, reduziu a expressão da HAT P300, reduzindo assim, a acetilação de H3K27. Como consequência, foi observada uma redução da expressão do receptor metabotrópico de glutamato 2 (mGlu2) no hipocampo e aumento de comportamentos do tipo-depressivo e ansioso (NASCA et al., 2015). Em ratos, foi demonstrado que o estresse de privação materna aumentou a expressão de HDAC2 na área tegmentar ventral (VTA), reduzindo os níveis de acetilação em H3K9. Nesses animais também foi observada redução da expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que foi revertida pela administração aguda de um inibidor de HDACs de classe I (SHEPARD et al., 2018). Estes achados apontam para o envolvimento direto das enzimas HDAC na supressão da expressão gênica pós estresse, particularmente de genes importantes para a plasticidade sináptica, como o BDNF.

Em modelos envolvendo o protocolo de medo condicionado, diversos estudos mostram que a inibição de HDACs facilita a formação de memórias. Ratos submetidos ao protocolo de estresse único prolongado (SPS) apresentaram déficit na evocação da extinção do medo condicionado a pistas, além de atividade aumentada de HDACs e redução da expressão de BDNF no CPFm IL. Todos os efeitos foram revertidos pela administração do NaB localmente no IL antes da sessão de aquisição da extinção (MOHAMMADI-FARANI et al., 2022). Outro estudo que também testou a administração do NaB no IL, constatou facilitação da extinção do medo condicionado contextual tanto quando administrada no início quanto depois da sessão de aquisição, indicando que a droga facilita também a consolidação dessa memória (STAFFORD et al., 2012). Além disso, o mesmo estudo observou que a administração intra-hipocampal da mesma droga após a sessão de extinção também facilitou o processo de consolidação da extinção, indicando que estes processos ocorrem no hipocampo (STAFFORD et al., 2012). Por fim, foi observado em ratos submetidos ao SPS que a

administração sistêmica de NaB em uma dose baixa por sete dias logo após o trauma preveniu a indução de déficit de extinção do medo condicionado contextual após uma semana (MOHAMMADI-FARANI et al., 2021).

### **1.5. Interação entre acetilação de histonas e o sistema eCB**

Estudos recentes mostram que componentes do sistema eCB regulam e podem ser regulados pelo mecanismo de acetilação de proteínas histonas. Foi observado, por exemplo, que a coadministração repetida de dois fitocanabinoides,  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD), aumentou a acetilação nos resíduos H3K9 e H3K14 na VTA de camundongos adultos (TODD et al., 2017). Em outro estudo, o tratamento agudo com CBD aumentou os níveis de marcadores de metilação e acetilação de histonas, H3K4me3, H3K27me3 e H3K9ac, no córtex cerebral. Em contraste, reduziu os níveis de H3K9ac no hipotálamo e H3K4me3 na ponte em ratos, demonstrando que seus efeitos são distintos dependendo da região encefálica (PASTRANA-TREJO et al., 2021).

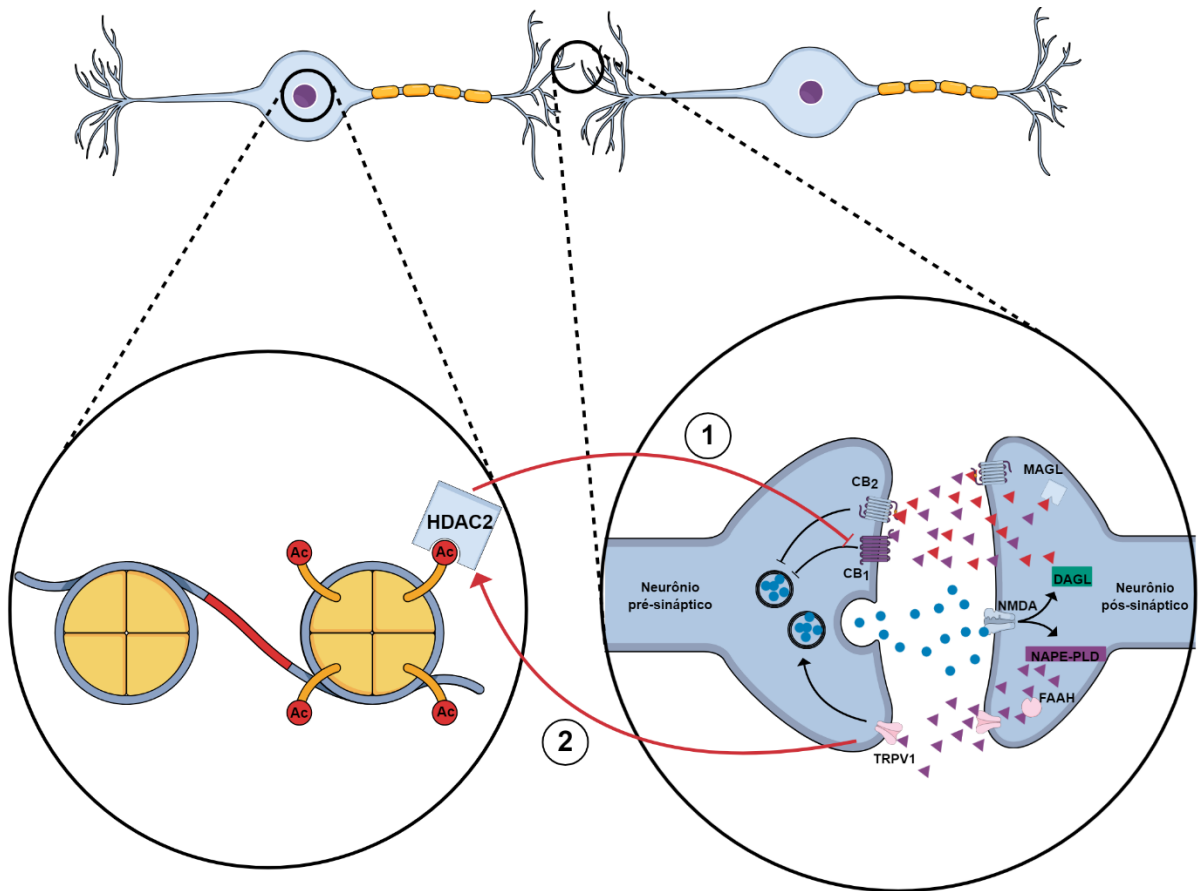
O tratamento com etanol no dia pós-natal 7 em camundongos induziu neurodegeneração no hipocampo e córtex, quando avaliados na vida adulta, resultando em déficit sináptico. Foi observado que neste protocolo ocorre o aumento da síntese de AEA via aumento da expressão de NAPE-PLD, além de aumento de CB<sub>1</sub> nestas regiões, que resulta na inibição da fosforilação de ERK1/2 e AKT, componentes importantes da via do BDNF para plasticidade sináptica. O antagonismo de CB<sub>1</sub> antes do tratamento com etanol atenuou a fosforilação de ERK1/2, mas não de AKT, e preveniu a neurodegeneração (PUCCI et al., 2019). Posteriormente, outro estudo do grupo observou, no mesmo protocolo, que o aumento da expressão de CB<sub>1</sub> neste modelo acontece via aumento da acetilação do resíduo H4K8 no promotor do gene pelo etanol. Também foi observado que a exposição ao etanol induziu déficits de memória espacial e social na vida adulta dos animais, que foram prevenidos pelo tratamento com um antagonista CB<sub>1</sub> pré etanol (SUBBANNA et al., 2015). Por fim, em um modelo de compulsão alimentar foi observado redução da expressão de FAAH no hipotálamo de ratos que foi associado à redução da acetilação de H3K9 associada ao gene da FAAH (PUCCI et al., 2019).

Em modelos que visam avaliar comportamentos defensivos, foi observado que o estresse crônico imprevisível (CUS) aumentou a expressão nuclear e a atividade de HDAC2 e diminuiu os níveis de expressão de CB<sub>1</sub>, principalmente em neurônios

glutamatérgicos, no córtex cingulado de camundongos. Além disso, o CUS reduziu a acetilação de H3K9 associada aos genes CB<sub>1</sub> e Neuropeptídeo Y (NpY). Eles também mostraram que o URB597, um inibidor de FAAH, reverteu os efeitos do estresse no gene do NpY, mas não do CB<sub>1</sub>, e no comportamento do tipo-ansioso induzido pelo estresse (LOMAZZO et al., 2017). Assim como a exposição a estressores, a capsaicina, um agonista TRPV1, aumentou a imobilidade no teste de nado forçado, indicando comportamento do tipo-depressivo, além de aumentar a expressão de HDAC2 no giro denteado do hipocampo de camundongos (WANG et al., 2018). Além disso, este tratamento induziu aumento da expressão de HDAC2 nos promotores dos genes *Dlg4*, *Syp*, *Gria1* e *Gria2*, todos relacionados à neuroplasticidade (WANG, S. E. et al., 2017). Em contraste, a deleção genética dos receptores TRPV1, que induziu um fenótipo semelhante ao antidepressivo, reduziu os níveis de HDAC2 na mesma região cerebral e, conseqüentemente, aumentou os níveis de acetilação global de H3 e H4. Além disso, camundongos com deleção de TRPV1, ao contrário do que foi observado com a injeção de capsaicina, mostraram níveis aumentados de genes relacionados à plasticidade e neurogênese no hipocampo, além de serem resilientes ao estresse (WANG, S. E. et al., 2017). Portanto, considerando que a AEA ativa os receptores CB<sub>1</sub> e TRPV1, recentemente sugerimos que o efeito deste eCB em forma de “U” invertido em comportamentos defensivos pode ser mediado por efeitos diferenciais nestes receptores regulando a expressão e atividade de HDAC2, níveis de acetilação de histonas, expressão gênica e neuroplasticidade (COELHO et al., 2023).

Em conclusão, já foi observado que mecanismos de acetilação de histonas e do sistema eCB se regulam e estão relacionados à regulação do comportamento frente a eventos estressores e no processamento de memórias. Entretanto, a expressão diferencial de genes relacionados ao sistema eCB regulada por mecanismos de acetilação de histonas ainda não foi explorada em um modelo de *SEFL*.





**Figura 2:** Imagem representativa da interação entre a atividade de HDAC2 e componentes do sistema eCB. (1) O estresse induz aumento da expressão e atividade de HDAC2 levando à redução de resíduos de histona acetilados associados ao gene do receptor CB<sub>1</sub>. Além disso, (2) a atividade de TRPV1 está associada à expressão e atividade de HDAC2. Feito no *Mind the Graph* (autoria própria).

---

---

***HIPÓTESE***

## **2. HIPÓTESE**

As informações apresentadas anteriormente sugerem que a exposição a um estresse repetido induziria déficits de extinção do medo condicionado contextual, como resultado de alterações no processo de acetilação de proteínas histonas e de componentes do sistema endocanabinoide. Dessa forma, no presente trabalho testamos a hipótese de que a inibição farmacológica sistêmica de enzimas HDACs com o butirato de sódio e conseqüentemente aumento do padrão de acetilação de proteínas histonas durante a exposição de camundongos ao estresse de derrota social repetida atenua o déficit de extinção do medo condicionado contextual via modulação de componentes do sistema endocanabinoide.

---

---

## ***OBJETIVOS***

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Testar a hipótese de que o desenvolvimento das consequências comportamentais decorrentes da exposição ao trauma é associado a alterações em mecanismos de acetilação de proteínas histonas, particularmente relacionadas a moléculas do sistema endocanabinoide, envolvido na manutenção da homeostase sináptica após estresse.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar se a exposição de camundongos Balb/C ao EDSR induz déficit de extinção do medo condicionado contextual;
- Avaliar se os déficits na extinção do medo condicionado após estresse envolvem alteração na expressão de HDACs e moléculas relacionados ao sistema endocanabinoide no CPF;
- Avaliar se o tratamento repetido com o Butirato de sódio (NaB), um inibidor de HDACs, atenua os efeitos comportamentais gerados pelo EDSR no medo condicionado contextual;
- Avaliar se o tratamento com NaB modula a expressão de HDACs e componentes do sistema endocanabinoide no CPF;
- Avaliar o efeito do EDSR e tratamento com NaB na proporção de animais com emocionalidade afetada e não afetada.
- Avaliar a existência de correlações entre as expressões no CPF de proteínas HDACs e relacionadas ao sistema endocanabinoide e parâmetros comportamentais.

---

---

***MATERIAIS E MÉTODOS***

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais e drogas**

Camundongos BALB/c (6 semanas de idade, 25g) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, foram alocados em grupos de 3 animais por gaiola e aclimatados no biotério do Departamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) até atingirem a idade necessária para o início dos experimentos (8 semanas), mantidos com água e comida *ad libitum*, em ciclo claro-escuro de 12 h e temperatura controlada ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Camundongos CD-1 (4 meses), utilizados como intrusos no modelo de trauma, foram obtidos dos Laboratórios *Charles River* (EUA). Após serem aposentados como reprodutores, foram mantidos isolados para privá-los do convívio social e aumentar o comportamento agressivo, o que é necessário para o modelo de trauma utilizado, como amplamente descrito na literatura (LISBOA et al., 2018). O NaB (Sigma-Aldrich, EUA) nas doses 25, 50 e 100 mg/Kg (10 mL/Kg) foi dissolvido em salina e administrado intraperitonealmente aos animais 30 minutos antes de cada sessão de estresse (6 administrações). Os grupos controles foram administrados com salina. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCFRP/USP (Aprovação 21.1.526.60.9).

### **4.2. Estresse de derrota social repetida**

O EDSR foi realizado por 6 dias, durante 2h por dia, período no qual um animal CD-1 foi inserido na caixa de um grupo de 3 camundongos residentes. Durante o período do estresse, um observador permaneceu na sala para evitar que os animais experimentais fossem gravemente lesados pelo camundongo agressor. Os comportamentos que se espera observar nos animais CD-1 são posturas ameaçadoras, perseguição, imobilização, montagem e mordida na região dorsal posterior. Nos casos em que o intruso não iniciou um encontro agressivo em 10-15 minutos, este foi substituído por outro. Depois de cada ciclo de estresse, o intruso foi removido e os residentes foram deixados intactos até a próxima sessão. Os grupos de camundongos controles foram alojados nas mesmas condições e foram manipulados no mesmo período que os camundongos estressados. Todos os animais, incluindo os animais naive, foram mantidos isolados ao término do estresse até o final do protocolo do medo condicionado contextual, a fim de excluir o efeito confundidor de brigas entre os residentes.

### **4.3. Teste de campo aberto**

Foi realizado antes do início do estresse (medida basal) e na manhã seguinte ao término do EDSR. O TCA foi utilizado para avaliarmos a atividade locomotora, evidenciada pela distância total percorrida no teste, e comportamento do tipo-ansioso dos animais, evidenciados pelo número de entradas, tempo e distância percorrida na área central e periférica do aparato. Para isso, eles foram introduzidos em uma arena redonda de 30 cm de diâmetro por 5 minutos e todos estes parâmetros foram analisados pelo software AnyMaze.

### **4.4. Teste de esquiva social**

No TES os animais foram submetidos a uma arena quadrada contendo uma pequena gaiola vazia por 2 minutos e 30 segundos. Em seguida, foi introduzido um camundongo CD-1 não utilizado no EDSR na gaiola e os animais experimentais ficaram na arena por mais 2 minutos e 30 segundos. Foram avaliados o tempo, número de entradas e distância percorrida na área próxima à gaiola e nos dois cantos opostos ao lado onde se localizava a gaiola com o animal agressor, normalizados pelos mesmos parâmetros de quando o agressor não estava presente. Além disso foram avaliadas a distância total percorrida durante o teste. As medidas foram obtidas pelo software AnyMaze. Espera-se que animais que passaram pelo EDSR fiquem mais tempo nos cantos opostos (corners) e menos tempo na zona próxima ao agressor.

### **4.5. Medo condicionado contextual**

O protocolo teve início 8 dias após o término do trauma. No dia do condicionamento, os animais foram colocados na caixa de condicionamento contextual e tiveram um período de habituação de 2 minutos e 30 segundos. Após este período, os animais passaram pela sessão de condicionamento, durante a qual 3 choques inescapáveis (0,70 mA, 2 segundos cada) foram aplicados às patas através do chão da caixa, uma grade metálica. 24 h após a sessão de condicionamento, os animais foram re-expostos à caixa, sem apresentação de choques, durante 30 minutos para avaliação da resposta de aquisição da extinção. Após outras 24h, os animais foram novamente testados na mesma caixa, por 10 minutos, para avaliar a evocação da resposta de extinção, também sem apresentação de choques nas patas. O tempo de congelamento foi registrado pelo software AnyMaze, integrado ao sistema de condicionamento automatizado da Ugo Basile, como medida de medo do animal frente



ao contexto previamente pareado com choques elétricos nas patas. O limiar utilizado para a imobilidade ser considerada congelamento foi de 1000 milissegundos.

#### **4.6. Processamento das amostras**

As amostras de CPF foram coletadas imediatamente após o fim do protocolo de MCC e foram processadas conforme instruções do fornecedor do Kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (#78833, *ThermoFisher*) para separação de proteínas em frações citoplasmática e nuclear.

#### **4.7. Western blotting**

O *Western Blotting* (WB) foi realizado para quantificação do nível proteico das amostras das frações nucleares e citoplasmáticas de CPF nas condições Naive e EDSR, que receberam administração de veículo ou NaB na dose de 50 mg/Kg. Primeiramente, as proteínas de cada amostra foram quantificadas pelo método de Bradford<sup>101</sup>. Posteriormente, as amostras foram diluídas em água milli-Q, e foi adicionada a solução tampão de carga (10% de 2-mecaptoethanol (*Sigma* #M3148) em Laemmli (*Biorad* #1610747)). Após 7 minutos de aquecimento à 95°C para desnaturação proteica, cada poço foi carregado com 20 µg de proteína total de cada amostra em gel 12% de poliacrilamida (*Biorad*) para separação das proteínas de acordo com o peso molecular. A eletroforese foi realizada em solução tampão de corrida (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%), acompanhando-se a corrida com o padrão de peso molecular (*Li-cor* #102971-126).

Logo após, o conteúdo proteico dos géis foi transferido para membranas de nitrocelulose por meio de um sistema semiúmido de transferência *Trans-Blot* (*Turbo Transfer System - BioRad*) a 25V, 1.0A, 30 minutos, em tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%). Após este processo, as membranas foram secas overnight a temperatura ambiente para realização da coloração total de proteínas pelo kit Revert™ 700 Total Protein Stain Pack Insert (*Li-cor* #926-11016), conforme as instruções do fabricante. Com isso, normalização de cada amostra foi feita pela quantidade proteína total do próprio poço, não sendo necessária a utilização de diferentes normalizadores para a fração citoplasmática e nuclear. Em seguida, as membranas foram descoradas utilizando solução de 0,1 M de hidróxido de sódio, 30% de metanol em água milli-Q.

Por fim, foi realizado o bloqueio de proteínas com solução de bloqueio (*LI-COR*, #220422) por 2 horas em temperatura ambiente e agitação suave constante.

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários, **anti-HDAC1** (1:1000, #ab109411, Abcam), **anti-HDAC2** (1:1000, #ab124974, Abcam), **anti-HDAC3** (1:1000, #ab137704, Abcam), **anti-HDAC4** (1:1000, #ab12172, Abcam), **anti-CB1** (1:1000, #ab23703, Abcam), **anti-CB2** (1:200, #101550, Cayman), **anti-NAPE-PLD** (1:1000, #ab95397, Abcam), **anti-FAAH** (1:500, #s-100739, Sanra Cruz) e **anti-TRPV1** (1:500, #ab203103, Abcam), *overnight* à 4°C e sob agitação constante. No dia seguinte, as membranas foram brevemente lavadas em solução de salina tris-tamponada com 0,1% de *Tween* 20 (TBS-T) por 3 vezes de 5 minutos e incubadas com os respectivos anticorpos secundários fluorescentes (**anti-rabbit**, 1:10000, #926-68073 e #926-32216, Li-cor; **anti-mouse**, 1:10000, #926-32212 e #926-68072, Li-Cor) por 1 hora em temperatura ambiente e agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBS-T por 3 vezes de 5 minutos e reveladas em um fotodocumentador de fluorescência (*Odyssey DLx Imager, LI-COR*). A densidade das bandas marcadas foi quantificada utilizando o *software ImageStudio Lite*. Os valores obtidos foram normalizados pelo valor de proteína total do poço.

#### 4.8. Análise estatística

Os dados são representados como média  $\pm$  EPM.

Primeiramente, em cada teste foi realizado o teste de ROUT com valor de Q em 5% para detecção de outliers. Os outliers identificados foram excluídos das análises (MOTULSKY et al., 2006). Todos os dados foram testados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, além da avaliação de igualdade de variâncias. Nos casos em que as amostras não passaram em um destes testes foi realizado teste não-paramétrico.

Para os protocolos 1e 2, no TCA e TES foi realizada a relação teste/basal. Os grupos naive e EDSR-Veh foram comparados por teste t de Student (paramétrico) ou Mann-Whitney (não paramétrico). Para avaliação do efeito do tratamento foi utilizado teste ANOVA de 1 via, seguido de pós teste de Dunnett. No teste de MCC foi feito ANOVA de medidas repetidas na sessão de condicionamento e aquisição da extinção, onde o tempo foi a medida repetida e a condição do animal (naive ou EDSR-veh) o fator analisado, seguido de pós teste de Dunnett (análise intragrupos) e Sídák (análise entre grupos). O mesmo teste foi repetido com os grupos EDSR tratados com veículo ou droga para avaliação do efeito do tratamento, porém com pós teste de Dunnett. Em ambas as sessões também foi realizada uma terceira ANOVA de

medidas repetidas, com análise intra-grupos com pós teste de Sídák. Avaliamos, também, se a memória de extinção foi retida calculando a diferença entre o tempo de congelamento durante a sessão do dia 3 e os 10 últimos minutos da sessão do dia 2 para cada grupo ( $\Delta$  de congelamento). Tanto esta como, a análise da sessão de evocação isoladamente, foram feitas da mesma forma que no TCA e TES.

No protocolo 3, os parâmetros avaliados no TCA e TES foram avaliados por ANOVA de 2 vias, sendo estresse e tratamento os fatores analisados, seguido por pós-teste de Tukey. No MCC, as análises do condicionamento e aquisição da extinção foram feitas por ANOVA de medidas repetidas, sendo o estresse e tratamento os fatores e o tempo a medida repetida, seguida de pós-teste de Dunnett. A evocação da extinção,  $\Delta$  de congelamento e Z-Score foram avaliadas por ANOVA de 2 vias, assim como no TCA e TES.

Por fim, em todos os testes comportamentais foi feito o cálculo de Z-Score (equação 1), conforme descrito por (GUILLOUX et al., 2011), afim de reduzir a variabilidade comportamental dentro da amostra e gerar um score geral de emocionalidade dos animais. Para o TCA, os parâmetros utilizados foram tempo, distância e número de entradas no centro. Para o TES, foram tempo nos corners e na zona de interação. Para o MCC, foram porcentagem de tempo em congelamento nos 10 primeiros minutos da sessão do dia 2 e do dia 3. O Z-Score geral de emocionalidade foi realizado com os parâmetros do TES e do MCC.

**Equação 1:**

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

X é o valor observado para o animal no parâmetro em questão

$\mu$  é a média do grupo controle

$\sigma$  é o desvio padrão do grupo controle.

Para a análise da expressão de proteínas foi utilizado o teste de ANOVA de duas vias, levando em consideração os fatores condição (Naive ou EDSR) e tratamento (veículo ou NaB 50 mg/Kg), seguido de pós teste de Tukey. Por fim, realizamos uma análise de correlação de Person levando em consideração cada valor de expressão proteica nas frações citoplasmáticas e nucleares, emocionalidade geral, nível de congelamento nos 10 primeiros e 10 últimos minutos da sessão de aquisição da extinção e os 10 minutos da sessão de evocação da extinção do medo condicionado contextual.

O nível de significância assumido para todos os testes foi menor que 0,05. Foi

considerado tendência estatística valores de p entre 0,05 e 0,1.

---

---

## ***RESULTADOS***

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação do efeito do tratamento repetido com butirato de sódio em animais submetidos ao EDSR

Para a realização do protocolo experimental, primeiramente os animais foram submetidos ao TCA basal para randomização dos grupos de forma homogênea com base na distância total percorrida durante o teste (dados não mostrados). No dia seguinte se iniciou o protocolo de EDSR por 6 dias, com a administração da droga NaB 30 minutos antes de cada sessão de estresse em três diferentes doses (25, 50 e 100 mg/Kg), e os animais foram isolados ao final da última sessão. No sétimo dia do protocolo os animais foram submetidos novamente ao teste de TCA e em seguida ao TES. Por fim, os animais foram submetidos ao MCC nos dias 14, 15 e 16 e foram eutanasiados ao final do teste. O protocolo completo pode ser observado na Figura 3.

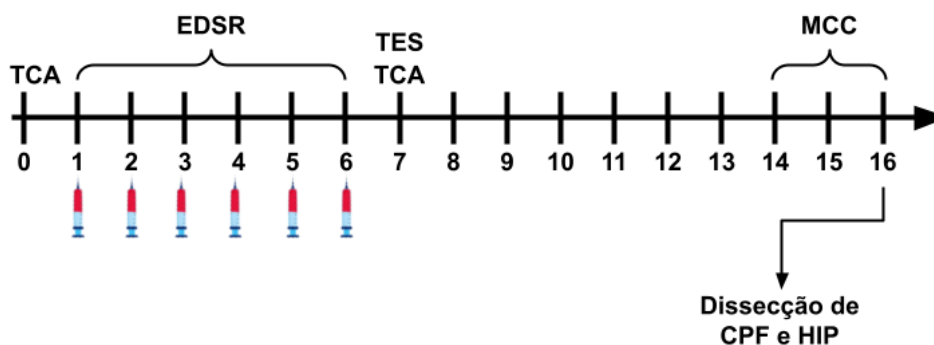
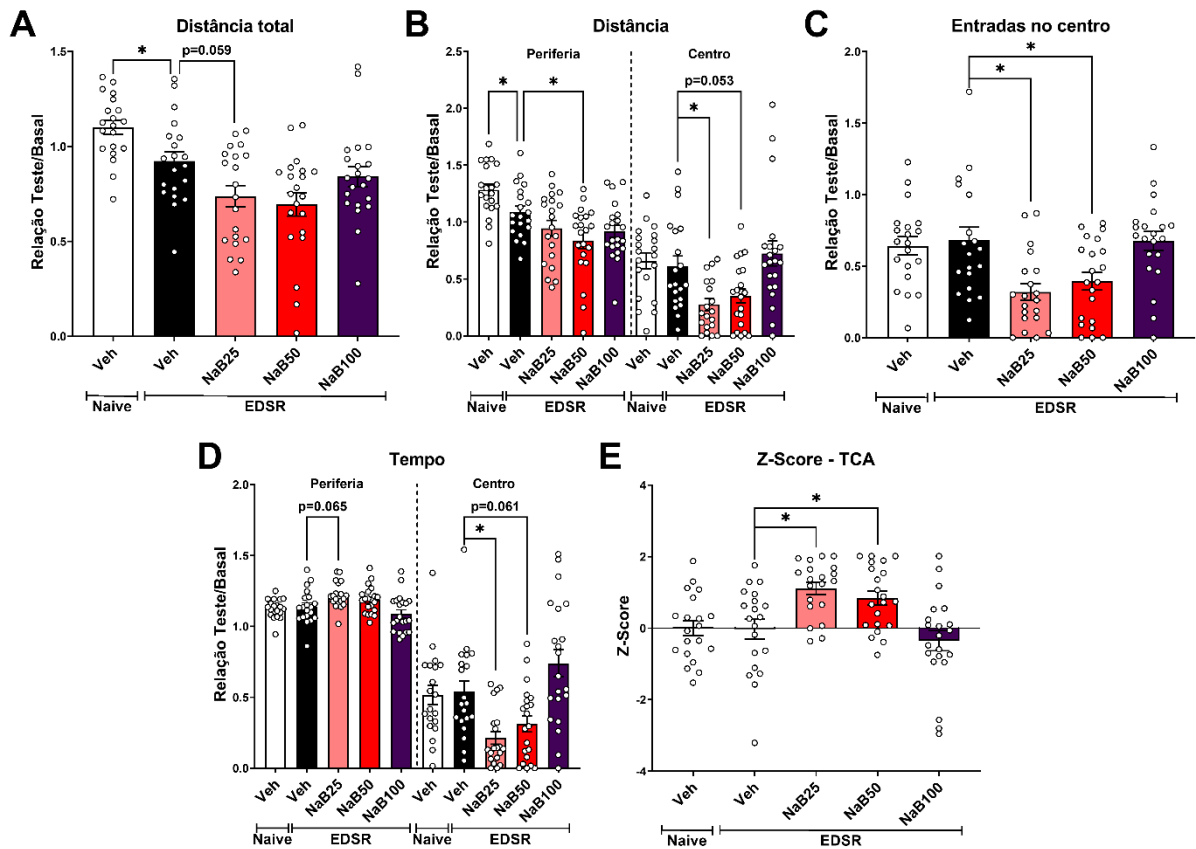


Figura 3: Linha do tempo do protocolo experimental para avaliação do NaB em contrapor os efeitos do EDSR.

#### 5.1.1. Teste de campo aberto

No TCA, houve hipolocomoção induzida pelo EDSR, evidenciada pela redução na distância total percorrida ( $T_{38}=2,848$ ;  $p<0,05$ , teste t de Student) (Figura 4A), efeito este que também foi observado quando avaliada apenas na periferia ( $T_{38}=2,731$ ;  $p<0,05$ , teste t de Student), mas não quando apenas no centro ( $T_{38}=0,418$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student) do aparato (Figura 4B). Em relação ao tratamento com NaB, a dose de 25 mg/Kg apresentou tendência em reduzir ainda mais a locomoção dos animais estressados ( $F_{(3,78)}=0,580$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via;  $p=0,059$ , Dunnett), porém as outras doses não tiveram efeito ( $p>0,05$ ). Quando a distância percorrida foi analisada nas diferentes áreas do aparato, evidenciou-se que a redução observada

pela dose de 25 mg/Kg aconteceu no centro ( $F_{(3,78)}=1,108$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via;  $p<0,05$ , Dunnett), mas não na periferia ( $F_{(3,78)}=0,972$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via;  $p>0,05$ , Dunnett), enquanto a dose de 50 mg/Kg apresentou redução na periferia ( $p<0,05$ , Dunnett) e tendência a este efeito no centro ( $p=0,053$ , Dunnett). Além disso, o EDSR não induziu alterações no número de entradas no centro ( $T_{38}=0,379$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student) (Figura 4C), porém tanto a dose de 25 mg/Kg quanto a de 50 mg/Kg induziram redução neste parâmetro ( $F_{(3,68.55)}=7,264$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via;  $p<0,05$  em ambas as doses, Dunnett). Por fim, o EDSR não alterou o tempo gasto na periferia ( $T_{38}=0,443$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student), nem no centro ( $T_{38}=0,235$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student) (Figura 4D) do aparato. Nestes parâmetros, a dose de 25 mg/Kg reduziu o tempo gasto no centro ( $F_{(3,60.57)}=11,06$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via;  $p<0,05$ , Dunnett), e apresentou tendência em aumentar o tempo gasto na periferia ( $F_{(3,71.32)}=5,575$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via;  $p=0,065$ , Dunnett). A dose de 50 mg/Kg apresentou tendência em reduzir o tempo gasto no centro ( $p=0,061$ , Dunnett) e não influenciou no tempo na periferia ( $p>0,05$ , Dunnett). O EDSR também não alterou pontuação de Z-Score neste teste ( $T_{38}=0,071$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student), mas o tratamento nas doses de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg aumentou esta pontuação  $F_{(3,78)}=8,677$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via;  $p<0,05$  em ambas as doses, Dunnett) (Figura 4E). A dose de 100 mg/Kg não apresentou efeito em nenhum dos parâmetros apresentados ( $p>0,05$ , Dunnett). Com estes dados, pode-se concluir que o EDSR induziu efeito hipolocomotor, mas não ansiogênico. Já o tratamento com NaB parece induzir efeito ansiogênico devido à redução da exploração do centro do aparato, porém não se pode descartar que este seja um efeito intensificador da hipolocomoção. Desta forma, os dados do TCA foram excluídos do cálculo de Z-Score geral de emocionalidade descrito no final da sessão 5.3.4.

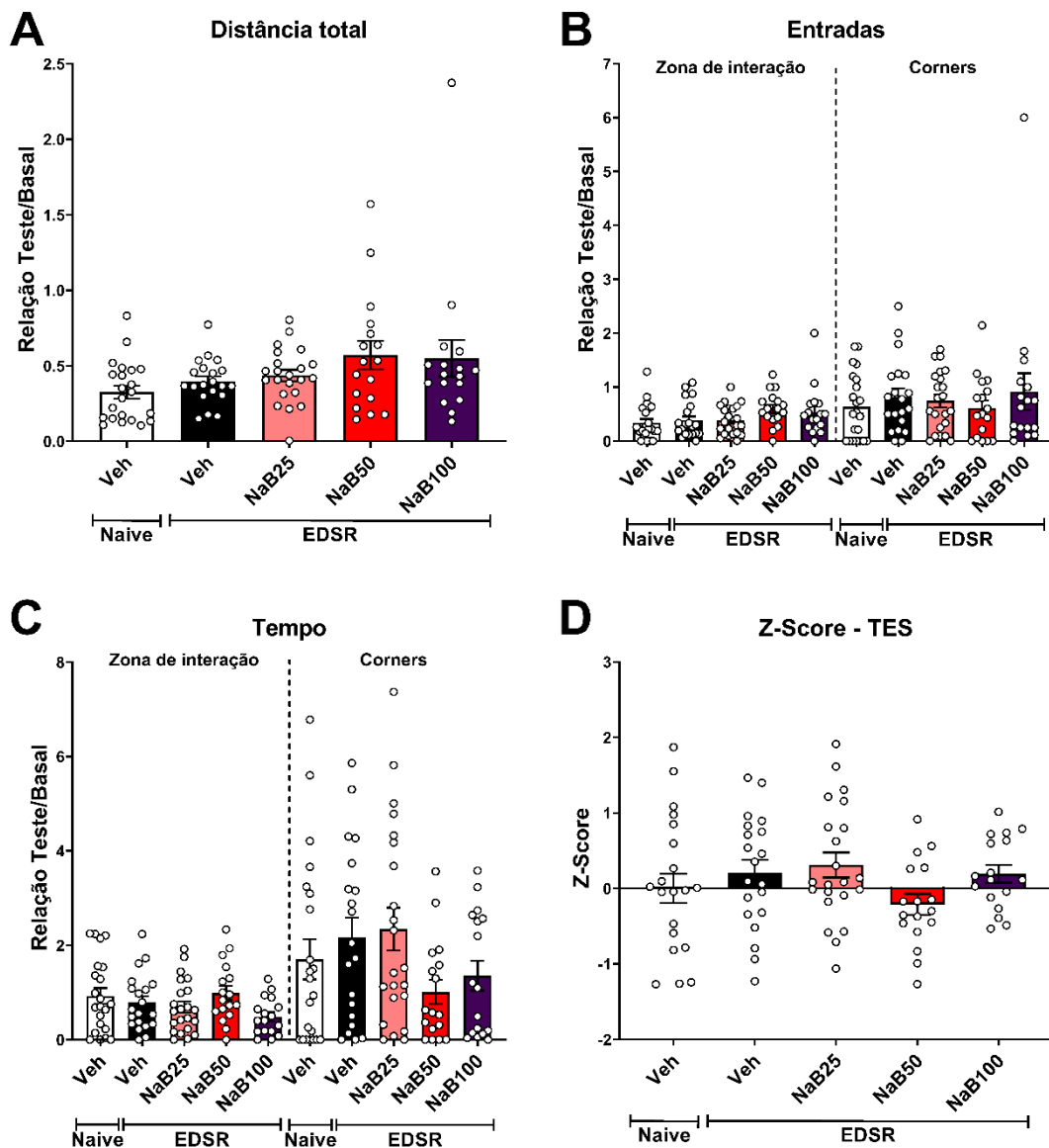


**Figura 4:** Efeito do EDSR e do tratamento com NaB na (A) distância total percorrida, (B) distância percorrida em cada zona do aparato, (C) número de entradas no centro e (D) tempo em cada zona do TCA e (E) Z-Score no teste. Foram utilizados 20 animais naives, 20 EDSR-veh, 20 EDSR-NaB25, 21 EDSR-NaB50 e 21 EDSR-NaB100. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$ .

### 5.1.2. Teste de esquiva social

Em relação ao TES, nenhum efeito do EDSR foi observado em nenhum dos parâmetros avaliados (distância total:  $U=160$ ;  $p > 0,05$ ; entradas na zona de interação:  $U=199,5$ ,  $p > 0,05$ ; entradas nos corners:  $U=180$ ,  $p > 0,05$ ; tempo na zona de interação:  $U=206,5$ ,  $p > 0,05$ ; tempo nos corners:  $U=172$ ;  $p > 0,05$ , Mann-Whitney). A administração de NaB apresentou tendência a diferença estatística no tempo de interação e tempo nos corners (tempo na zona de interação:  $F_{(3,72)}=2,391$ ,  $p=0,075$ ; tempo nos corners:  $F_{(3,72)}=2,704$ ,  $p=0,051$ , ANOVA de 1 via), mas sem efeito no pós-teste ( $p > 0,05$ , Dunnett). Não houve efeito em nenhum outro parâmetro (distância total:  $F_{(3,37.7)}=1,141$ ,  $p > 0,05$ ; entradas na zona de interação:  $F_{(3,72)}=0,147$ ,  $p > 0,05$ ; entradas nos corners:  $F_{(3,34.85)}=0,364$ ,  $p > 0,05$ ). Na avaliação por Z-Score, não houve efeito do EDSR ( $T_{48}=0,064$ ;  $p > 0,05$ , teste t de Student), nem do tratamento ( $F_{(3,72)}=2,128$ ,  $p > 0,05$ , ANOVA de 1 via). Os dados estão reunidos na Figura 5.





**Figura 5:** Efeito do EDSR e do tratamento com NaB na (A) distância total percorrida, (B) número de entradas e (C) tempo em cada zona e (D) Z-Score no TES. Foram utilizados 22 animais naives, 20 EDSR-veh, 22 EDSR-NaB25, 17 EDSR-NaB50 e 17 EDSR-NaB100. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM.

### 5.1.3. Medo condicionado contextual

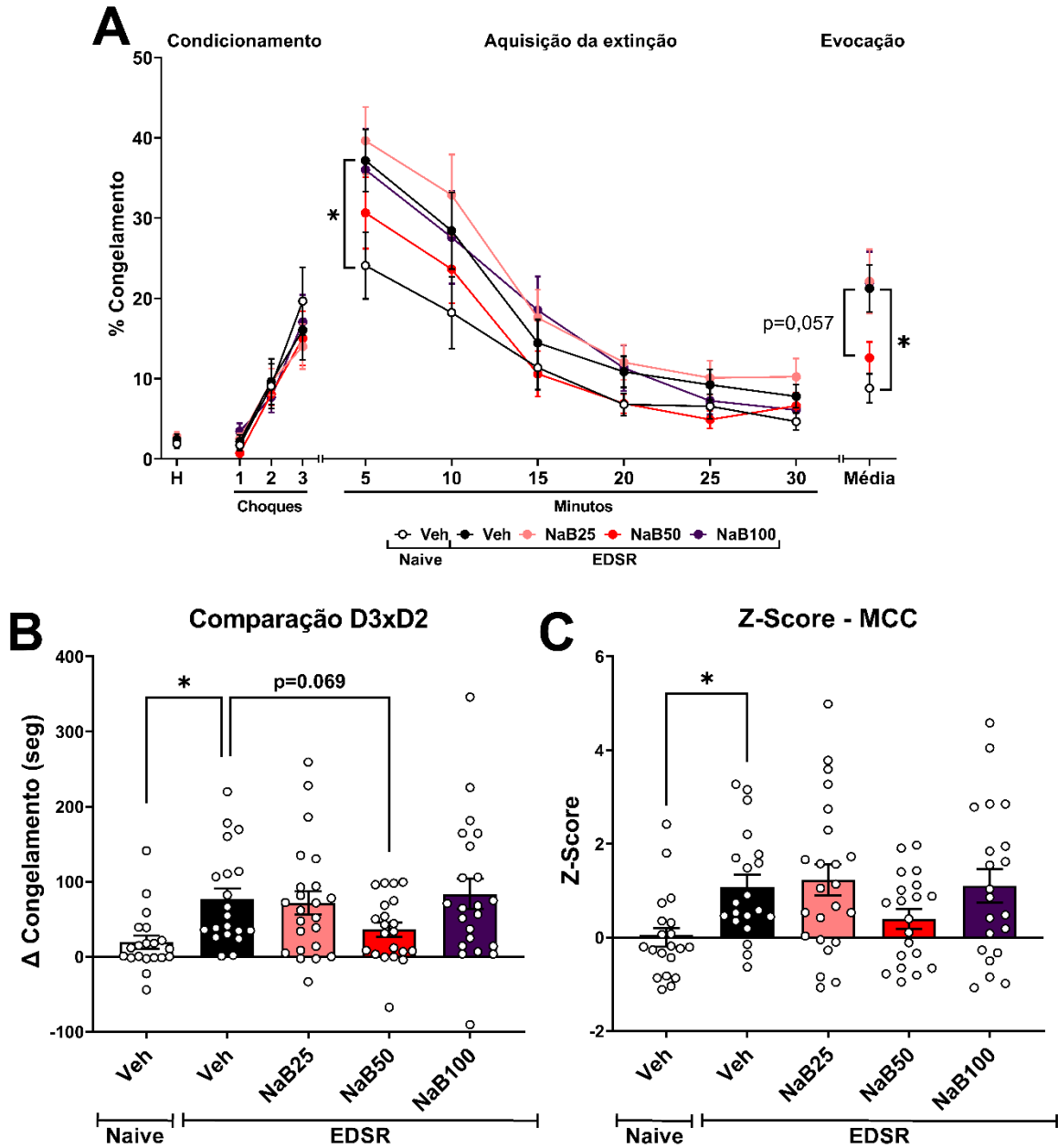
No protocolo de MCC, primeiramente ficou evidente que todos os grupos condicionaram, visto que houve efeito do tempo (fator tempo:  $F_{(3,297)}=66,78$ ,  $p<0,05$ ; fator condição:  $F_{(4,99)}=0,167$ ,  $p>0,05$ ; interação:  $F_{(12,297)}=0,388$ ,  $p>0,05$ ; ANOVA de medidas repetidas). Na análise intragrupos, os grupos Naive-veh, EDSR-veh e EDSR-NaB25 apresentaram aumento do congelamento a partir do segundo choque, enquanto os grupos EDSR-NaB50 e EDSR-NaB100 no terceiro choque em comparação com o período de habituação ( $p<0,05$ , Dunnett). Na análise entre grupos não foi observado efeito do EDSR (fator tempo:  $F_{(3,114)}=25,21$ ,  $p<0,05$ ; fator estresse:

$F_{(1,38)}=0,046$ ,  $p>0,05$ ; interação:  $F_{(3,114)}=0,473$ ,  $p>0,05$ ; ANOVA de medidas repetidas) ou do NaB (fator tempo:  $F_{(3,240)}=52,33$ ,  $p<0,05$ ; fator condição:  $F_{(3,80)}=0,148$ ,  $p>0,05$ ; interação:  $F_{(9,240)}=0,344$ ,  $p>0,05$ ; ANOVA de medidas repetidas), indicando que o EDSR e o tratamento não afetaram a aquisição do MCC (figura 6A).

Na sessão do dia 2, todos os grupos adquiriram a memória de extinção ( $F_{(5,495)}=119,9$ ,  $p>0,05$ , ANOVA de medidas repetidas), visto que na análise intragrupos dos grupos EDSR-veh e EDSR-NaB100 houve redução de congelamento já a partir do segundo bloco de 5 minutos ( $p<0,05$ , Dunnett), enquanto nos grupos Naive, EDSR-NaB25 e EDSR-NaB50 esta redução aconteceu a partir do terceiro bloco ( $p<0,05$ , Dunnett). Na análise entre grupos, primeiramente observa-se que o EDSR induziu maior evocação da memória de medo/efeito ansiogênico (fator tempo:  $F_{(5,190)}=40,60$ ,  $p<0,05$ ; fator condição:  $F_{(1,38)}=3,730$ ,  $p=0,060$ ; interação:  $F_{(5,190)}=2,083$ ,  $p=0,069$ ; ANOVA de medidas repetidas), já que nos primeiros 5 minutos da sessão apresentaram maior nível de congelamento que o grupo naive ( $p<0,05$ , Sídák). Apesar deste efeito do EDSR, não houve diferença entre os grupos em outros momentos da sessão ( $p>0,05$ , Sídák), indicando que ambos adquiriram a extinção igualmente. Além disso, também não houve diferença entre os grupos tratados e veículo nesta sessão (fator tempo:  $F_{(5,400)}=109,4$ ,  $p<0,05$ ; fator condição:  $F_{(3,80)}=1,034$ ,  $p>0,05$ ; interação:  $F_{(15,400)}=0,464$ ,  $p>0,05$ ; ANOVA de medidas repetidas;  $p>0,05$ , Sídák), indicando que a droga não teve efeito neste momento (figura 6A).

Na segunda re-exposição dos animais à caixa de condicionamento, na avaliação da evocação da memória de extinção, houve diferença significativa nos níveis de congelamento entre os grupos naive e EDSR-veh ( $U=85$ ,  $p<0,05$ , teste de Mann Whitney), indicando que o estresse induziu déficit da evocação da extinção, como esperado. Em relação ao tratamento, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo EDSR-veh e os grupos EDSR tratados ( $F_{(3,43.16)}=3,351$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via), entretanto no pós-teste apenas o grupo EDSR-NaB50 apresentou tendência a esta diferença ( $p=0,057$ , Dunnett) (figura 6A). Na análise do  $\Delta$  de congelamento, novamente o EDSR induziu déficit de extinção, explicitado pelo maior aumento de congelamento em relação à sessão do dia anterior ( $U=70$ ,  $p<0,05$ , teste de Mann Whitney), e o tratamento com NaB 50 mg/Kg novamente apresentou tendência estatística em reduzir este efeito do estresse ( $F_{(3,44.09)}=3,351$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de 1 via;  $p=0,069$ , Dunnett) (figura 6B). A análise por Z-Score demonstrou efeito do estresse ( $U=82$ ,  $p<0,05$ , teste de Mann Whitney), tendência ao efeito do

tratamento ( $F_{(3,43.88)}=2,326$ ,  $p=0,087$ , ANOVA de 1 via), mas sem diferença no pós teste ( $p>0,05$ , Dunnett) (figura 6C).

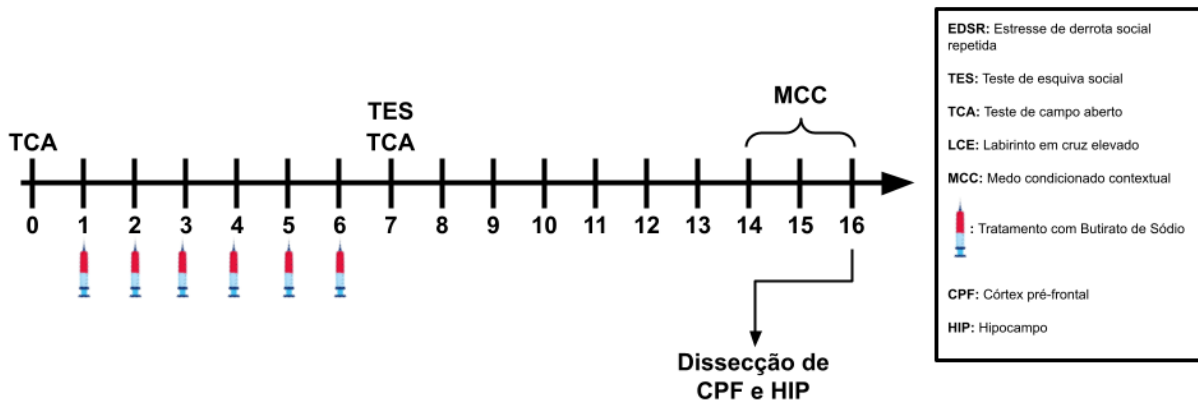


**Figura 6:** Efeito do EDSR e tratamento com NaB no MCC. A aquisição da extinção foi feita 1 dia e sua evocação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 20 animais naives e 20 EDSR-Veh, 23 EDSR-NaB25, 20 EDSR-NaB50 e 21 EDSR-NaB100. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p<0,05$  entre os grupos naive e EDSR-Veh.

## 5.2. Avaliação do efeito do tratamento repetido com butirato de sódio em animais não estressados

Para o segundo experimento do projeto, foi utilizado o mesmo protocolo experimental, porém sem o EDSR. Desta forma o NaB na dose de 50 mg/kg (dose

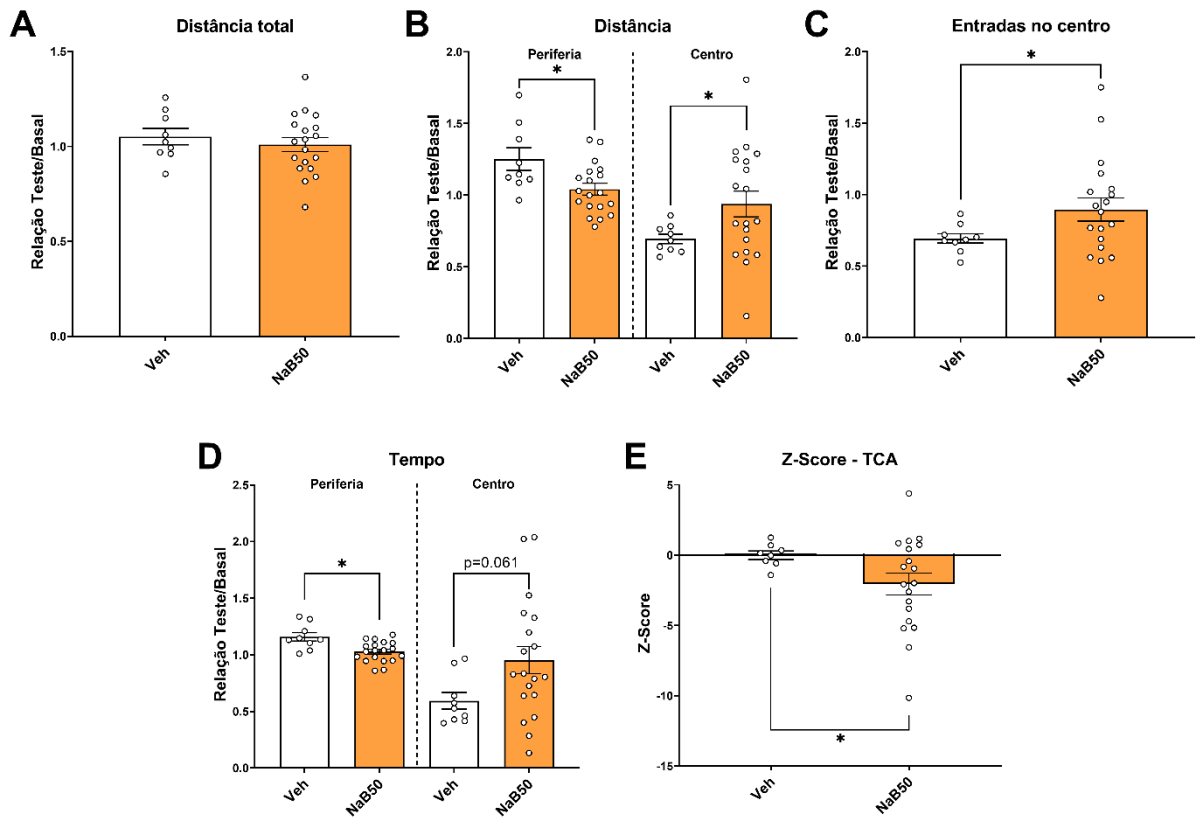
que facilitou a extinção no MCC em animais estressados) foi testado em animais que não passaram pelo estresse. A linha do tempo do experimento pode ser observada na figura 7.



**Figura 7:** Linha do tempo do protocolo experimental para avaliação do NaB em animais não estressados.

### 5.2.1. Teste de campo aberto

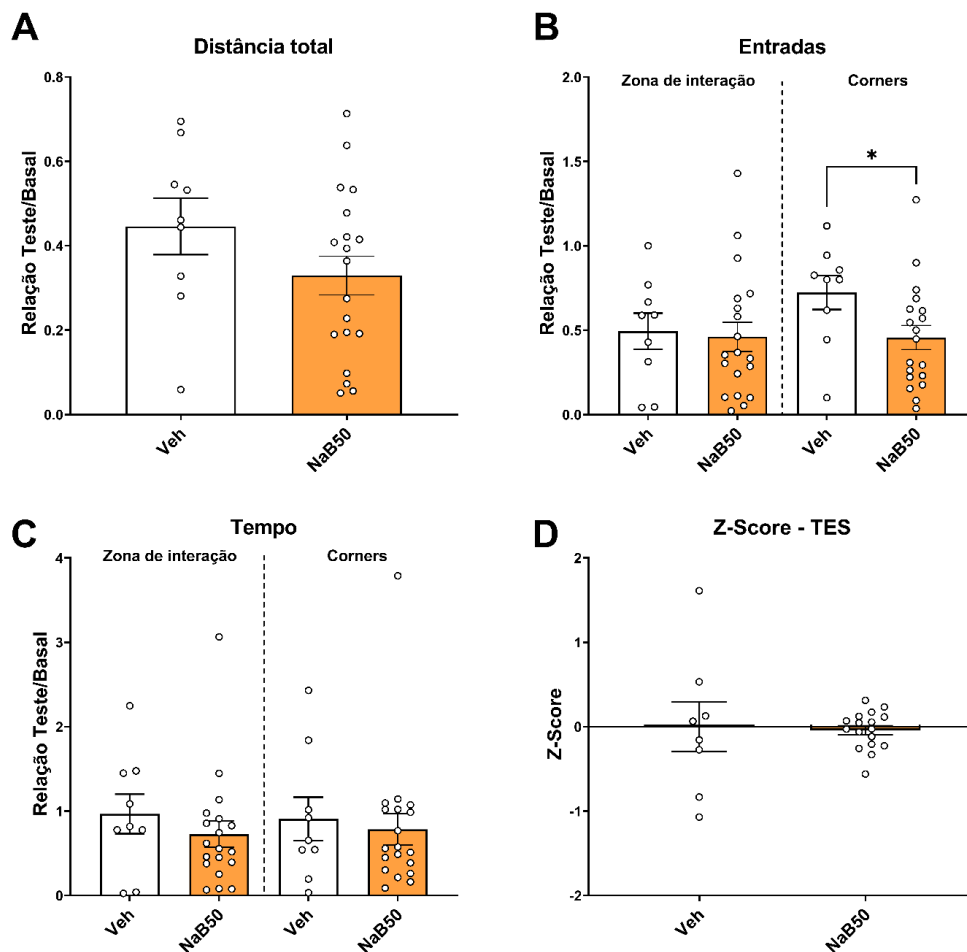
No TCA, não houve efeito locomotor do NaB ( $T_{26}=0,679$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student) (figura 8A). Entretanto, foi observado que o NaB reduziu a distância percorrida na periferia ( $T_{26}=2,634$ ;  $p<0,05$ , teste t de Student), e aumentou a distância percorrida no centro ( $T_{26}=2,575$ ;  $p<0,05$ , teste t de Student) do aparato (figura 8B). Além disso, o NaB induziu aumento no número de entradas no centro ( $T_{26}=2,326$ ;  $p<0,05$ , teste t de Student) (figura 8C), redução do tempo gasto na periferia ( $T_{26}=3,330$ ;  $p<0,05$ , teste t de Student) e tendência a aumento do tempo gasto no centro ( $T_{26}=1,953$ ;  $p=0,061$ , teste t de Student) (figura 8D). Por fim, também foi observado redução da pontuação Z-Score induzida pelo NaB ( $T_{26}=2,483$ ;  $p<0,05$ , teste t de Student) (figura 8E). Com estes dados, conclui-se que tratamento com NaB parece induzir efeito ansiolítico nos animais não estressados, devido ao aumento da exploração do centro do aparato, sem alteração na locomoção dos animais.



**Figura 8:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais não estressados na (A) distância total percorrida, (B) distância percorrida em cada zona do aparato, (C) número de entradas no centro e (D) tempo em cada zona do TCA e (E) Z-Score no teste. Foram utilizados 9 animais naive-veh e 19 naive-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$  entre os grupos.

### 5.2.2. Teste de esquia social

Em relação ao TES, o NaB reduziu o número de entradas nos corners ( $T_{26}=2,137$ ;  $p < 0,05$ , teste t de Student) (figura 9B). Não houve efeito da droga em nenhum dos outros parâmetros avaliados (distância total:  $T_{26}=1,440$ ;  $p > 0,05$ ; entradas na zona de interação:  $T_{26}=0,219$ ,  $p > 0,05$ ; tempo na zona de interação:  $T_{26}=0,861$ ,  $p > 0,05$ ; tempo nos corners:  $T_{26}=0,385$ ;  $p > 0,05$ ; Z-score:  $T_{26}=0,191$ ,  $p > 0,05$ ; teste t de Student). Os dados estão reunidos na figura 9.



**Figura 9:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais não estressados na (A) distância total percorrida, (B) número de entradas e (C) tempo em cada zona e (D) Z-Score no TES. Foram utilizados 9 animais naive-veh e 19 naive-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$  entre os grupos.

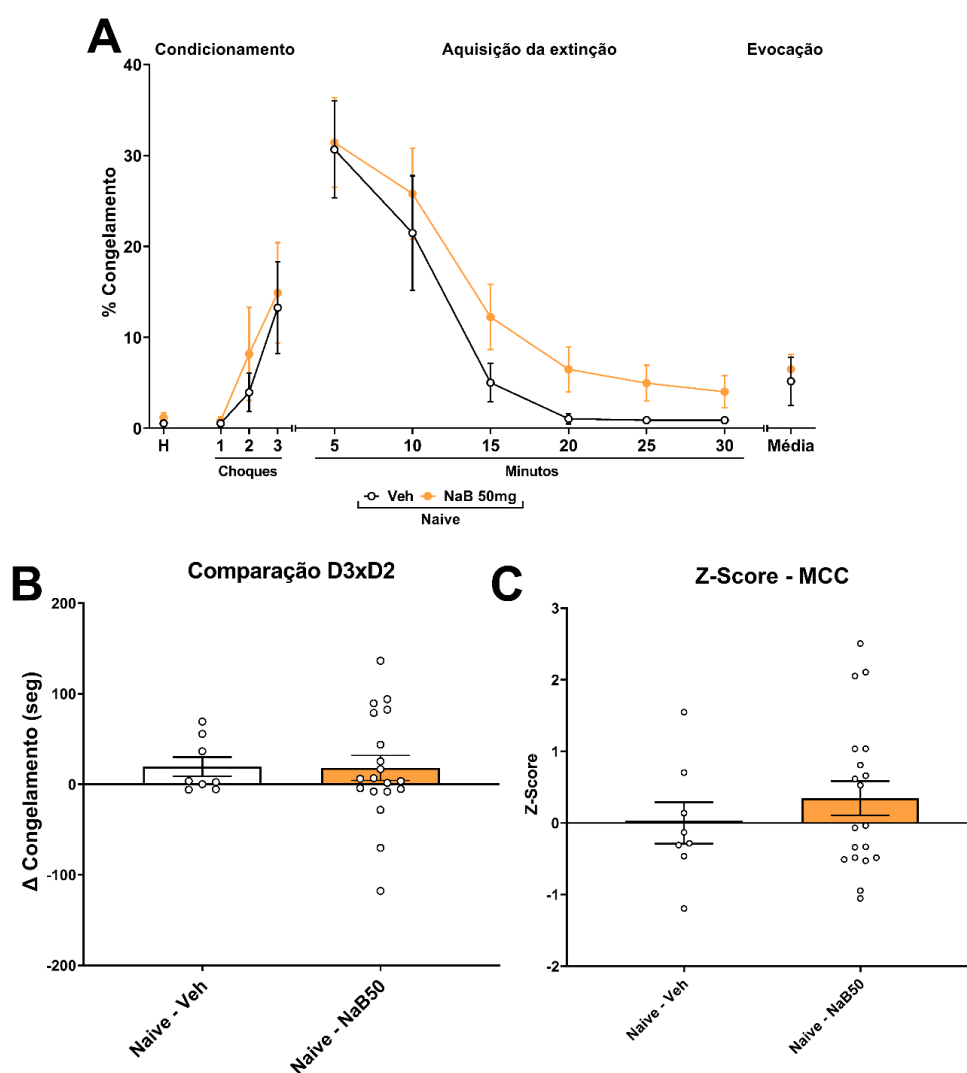
### 5.2.3. Medo condicionado contextual

No protocolo de MCC, primeiramente observa-se que ambos os grupos condicionaram, visto que houve efeito do tempo e na análise intragrupos apresentaram tendência estatística em aumentar o congelamento no terceiro choque em comparação com o período de habituação (fator tempo:  $F_{(1,400,35.01)}=5.734$ ,  $p < 0,05$ ; fator tratamento:  $F_{(1,25)}=0,166$ ,  $p > 0,05$ ; interação:  $F_{(3,75)}=0,115$ ,  $p > 0,05$ ; ANOVA de medidas repetidas). Na análise entre grupos não foi observado efeito do NaB, indicando que o tratamento não afetou a aquisição do MCC (figura 10A).

Na sessão do dia 2, os dois grupos adquiriram a memória de extinção (fator tempo:  $F_{(1,823,45,59)}=37,85$ ,  $p < 0,05$ ; fator tratamento:  $F_{(1,25)}=0,784$ ,  $p > 0,05$ ; interação:  $F_{(5,125)}=0,297$ ,  $p > 0,05$ ; ANOVA de medidas repetidas), visto que na análise intragrupos tanto nos animais tratados com veículo, quanto nos tratados com NaB, houve redução de congelamento já a partir do segundo bloco de 5 minutos ( $p < 0,05$ , Dunnett). Na

análise entre grupos, constatou-se que não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ , Sidak), indicando que a droga não teve efeito neste momento do protocolo (figura 10A).

Na segunda re-exposição dos animais à caixa de condicionamento, na avaliação da evocação da memória de extinção, novamente não houve efeito do tratamento com NaB em animais não estressados ( $T_{25} = 1,051$ ;  $p > 0,05$ , teste t de Student) (figura 10A). Nas análises de  $\Delta$  de congelamento ( $T_{25} = 0,064$ ;  $p > 0,05$ , teste t de Student) (figura 10B) e Z-Score ( $T_{16.78} = 0,912$ ;  $p > 0,05$ , teste t de Student) (figura 10C), também não houve diferença entre os grupos.



**Figura 10:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais não estressados no MCC. A aquisição da extinção foi feita 1 dia e sua evocação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 8 animais Naive-veh e 19 naive-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM.

### 5.3. Análise conjunta dos dados

Em seguida, foi feita a comparação da resposta dos animais Naive-veh dos

experimentos em ambos os protocolos na distância total percorrida ( $T_{26}=0,926$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student) e no tempo no gasto no centro ( $T_{27}=0,659$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student) no TCA, no tempo gasto na zona de interação ( $T_{25}=0,220$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student) e nos corners no TES ( $T_{25}=0,393$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student), e no tempo de congelamento no terceiro dia do MCC ( $T_{24}=1,143$ ;  $p>0,05$ , teste t de Student). Visto que não houve diferenças de respostas dos animais Naïve-veh dos diferentes experimentos nos diferentes parâmetros avaliados (gráficos não apresentados), e com objetivo de reduzir o número de animais utilizados, foi realizada a análise conjunta dos dados entre naïves e estressados que receberam NaB na dose de 50 mg/Kg.

### 5.3.1. Teste de campo aberto

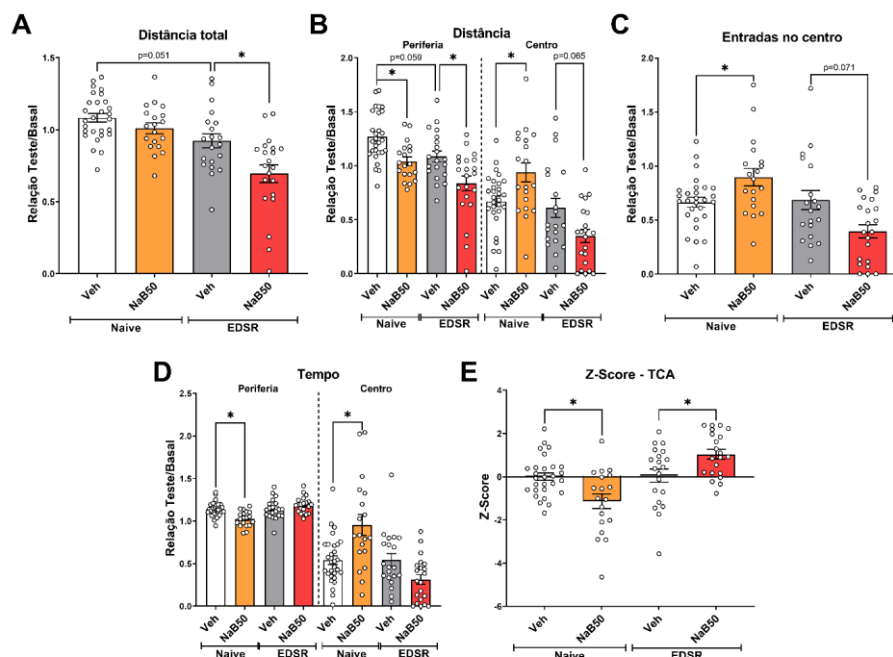
No TCA houve efeito do EDSR ( $F_{(1,84)}=27,75$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias), do tratamento ( $F_{(1,84)}=11,20$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias) e tendência estatística na interação entre os fatores ( $F_{(1,84)}=2,920$ ,  $p=0,089$ , ANOVA de duas vias) na distância total percorrida durante o teste (figura 11A). Quando a distância percorrida foi analisada nas diferentes áreas do aparato foi constatado efeito do EDSR ( $F_{(1,84)}=13,54$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias) e do tratamento ( $F_{(1,84)}=20,87$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias), porém sem interação entre os fatores ( $F_{(1,84)}=0,047$ ,  $p>0,05$ , ANOVA de duas vias) na periferia e efeito do EDSR ( $F_{(1,84)}=20,44$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias) e interação entre os fatores ( $F_{(1,84)}=13,55$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias), porém sem efeito do tratamento ( $F_{(1,84)}=0,003$ ,  $p>0,05$ , ANOVA de duas vias) no centro (figura 11B). O mesmo foi observado no número de entradas no centro do aparato (figura 11C), tempo gasto na periferia e no centro do aparato (figura 11D) e na avaliação por Z-Score (figura 11E). Nestes parâmetros, constatou-se efeito do EDSR (entradas no centro:  $F_{(1,84)}=12,32$ ,  $p<0,05$ ; tempo na periferia:  $F_{(1,84)}=15,50$ ,  $p<0,05$ ; tempo no centro:  $F_{(1,84)}=17,35$ ,  $p<0,05$ ; Z-Score:  $F_{(1,84)}=18,36$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias) e interação entre os fatores (entradas no centro:  $F_{(1,84)}=14,56$ ,  $p<0,05$ ; tempo na periferia:  $F_{(1,84)}=13,97$ ,  $p<0,05$ ; tempo no centro:  $F_{(1,84)}=16,95$ ,  $p<0,05$ ; Z-Score:  $F_{(1,84)}=16,72$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias), porém sem efeito do tratamento (entradas no centro:  $F_{(1,84)}=0,161$ ,  $p>0,05$ ; tempo na periferia:  $F_{(1,84)}=2,270$ ,  $p>0,05$ ; tempo no centro:  $F_{(1,84)}=1,357$ ,  $p>0,05$ ; Z-Score:  $F_{(1,84)}=0,076$ ,  $p>0,05$ , ANOVA de duas vias).

Desta forma, o EDSR reduziu distância total percorrida durante o teste ( $p=0,051$ , Tukey), que também foi observada quando avaliada apenas na periferia ( $p=0,059$ , Tukey), mas não no centro ( $p>0,05$ , Tukey) do aparato. Não foi observado nenhum efeito no número de entradas no centro ou tempo em ambas as áreas do



aparato, ou no Z-Score ( $p > 0,05$ , Tukey). Comparando grupos EDSR-veh e EDSR-NaB50, observou-se que nos animais estressados o tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg induziu efeito de aumento da hipolocomoção, evidenciado pela redução da distância total percorrida ( $p < 0,05$ , Tukey). Efeito este também observado quando avaliado apenas na periferia ( $p > 0,05$ , Tukey) e com tendência quando avaliado apenas no centro ( $p = 0,065$ , Tukey). Além disso, houve tendência estatística no número de entradas no centro ( $p > 0,071$ , Tukey), porém sem alteração no tempo gasto em cada área do aparato ( $p > 0,05$ , Tukey). Por fim, houve aumento do Z-Score no teste ( $p < 0,05$ , Tukey), porém este efeito provavelmente é devido à intensificação da hipolocomoção induzida pelo EDSR, e não a um aumento de comportamentos do tipo-ansioso. Desta forma, este teste foi desconsiderado no cálculo do Z-Score de emocionalidade geral, apresentado na sessão 5.3.4..

Por fim, nos animais não estressados o tratamento não induziu efeito locomotor, pois não houve alteração na distância total percorrida ( $p > 0,05$ , Tukey), mas sim induziu efeito ansiolítico, evidenciado pelo aumento de entradas, tempo e distância percorrida no centro e redução da distância e tempo gasto na periferia ( $p < 0,05$ , Tukey).

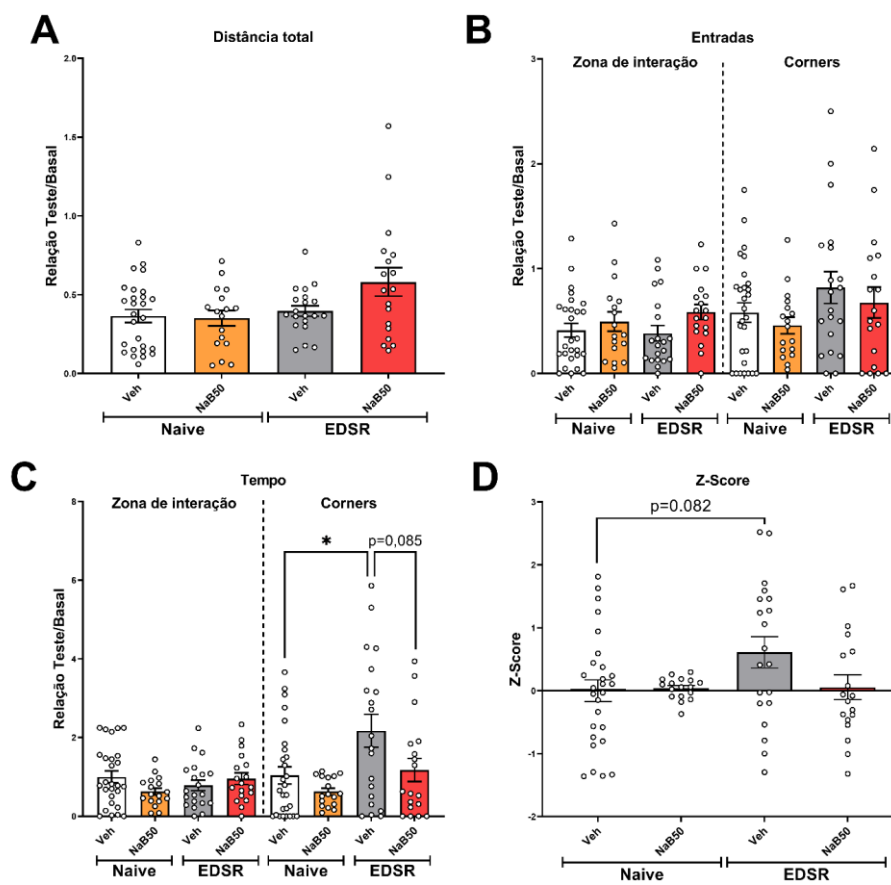


**Figura 11:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados na (A) distância total percorrida, (B) distância percorrida em cada zona do aparato, (C) número de entradas no centro e (D) tempo em cada zona do TCA e (E) Z-Score no teste. Foram utilizados 28 animais naive-veh, 19 naive-NaB50, 20 animais EDSR-veh e 21 animais EDSR-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$  na ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Tukey.

### 5.3.2. Teste de esquiva social

Em relação ao TES, houve efeito do EDSR ( $F_{(1,78)}=5,610$ ,  $p<0,05$ ) e tendência a interação entre os fatores ( $F_{(1,78)}=3,197$ ,  $p=0,077$ , ANOVA de duas vias) na distância total percorrida, mas não efeito do tratamento ( $F_{(1,78)}=2,365$ ,  $p>0,05$ ) (figura 12A). No número de entradas na zona de interação houve tendência a efeito do tratamento ( $F_{(1,78)}=3,550$ ,  $p=0,063$ ; ANOVA de duas vias), mas sem efeito do EDSR ( $F_{(1,78)}=0,169$ ,  $p>0,05$ ), nem interação entre os fatores ( $F_{(1,78)}=0,618$ ,  $p>0,05$ ) (figura 12B). Nos corners, houve tendência a efeito do EDSR ( $F_{(1,78)}=3,544$ ,  $p=0,063$ ), mas sem efeito do tratamento ( $F_{(1,78)}=1,098$ ,  $p>0,05$ ) ou interação entre os fatores ( $F_{(1,78)}=0,015$ ,  $p>0,05$ ; ANOVA de duas vias). No tempo gasto na zona de interação houve tendência a interação entre os fatores ( $F_{(1,78)}=3,705$ ,  $p=0,057$ ; ANOVA de duas vias), mas sem efeito do EDSR ( $F_{(1,78)}=0,155$ ,  $p>0,05$ ), nem do tratamento ( $F_{(1,78)}=0,525$ ,  $p>0,05$ ). Por fim, houve efeito do EDSR ( $F_{(1,78)}=8,503$ ,  $p<0,05$ ) e do tratamento ( $F_{(1,78)}=6,037$ ,  $p<0,05$ ) no tempo gasto nos corners, porém sem interação entre os fatores ( $F_{(1,78)}=1,033$ ,  $p>0,05$ ; ANOVA de duas vias) (figura 12C). Na avaliação por Z-Score não houve efeito do EDSR ( $F_{(1,78)}=2,647$ ,  $p>0,05$ ), do tratamento ( $F_{(1,78)}=1,806$ ,  $p>0,05$ ), ou interação entre os fatores ( $F_{(1,78)}=2,409$ ,  $p>0,05$ ; ANOVA de duas vias) (figura 12D).

Ao comparar os grupos Naive-veh e EDSR-veh, o EDSR não induziu efeito algum sobre a distância total percorrida, entradas em ambas as zonas do aparato nem no tempo na zona de interação ( $p>0,05$ , Tukey). Apesar disso, o EDSR induziu aumento do tempo de permanência nos corners ( $p<0,05$ , Tukey) e tendência estatística em aumentar o grau geral de emocionalidade (Z-Score do teste;  $p=0,082$ , Tukey), indicando aumento da esquiva social. O tratamento com NaB tendeu a reduzir a esquiva social induzida pelo estresse, evidenciado pela redução do tempo nos corners em comparação com o grupo EDSR-veh ( $p=0,085$ , Tukey). Não houve alteração em nenhum dos outros parâmetros avaliados no teste ou no Z-Score ( $p>0,05$ , Tukey). Em animais não estressados o tratamento não alterou nenhum dos parâmetros avaliados, inclusive o Z-Score ( $p>0,05$ , Tukey).



**Figura 12:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados na (A) distância total percorrida, (B) número de entradas e (C) tempo em cada zona do aparato e (D) Z-Score no teste. Foram utilizados 27 animais naive-veh, 17 naive-NaB50, 20 animais EDSR-veh e 18 animais EDSR-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM. \* indica  $p < 0,05$  na ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Tukey.

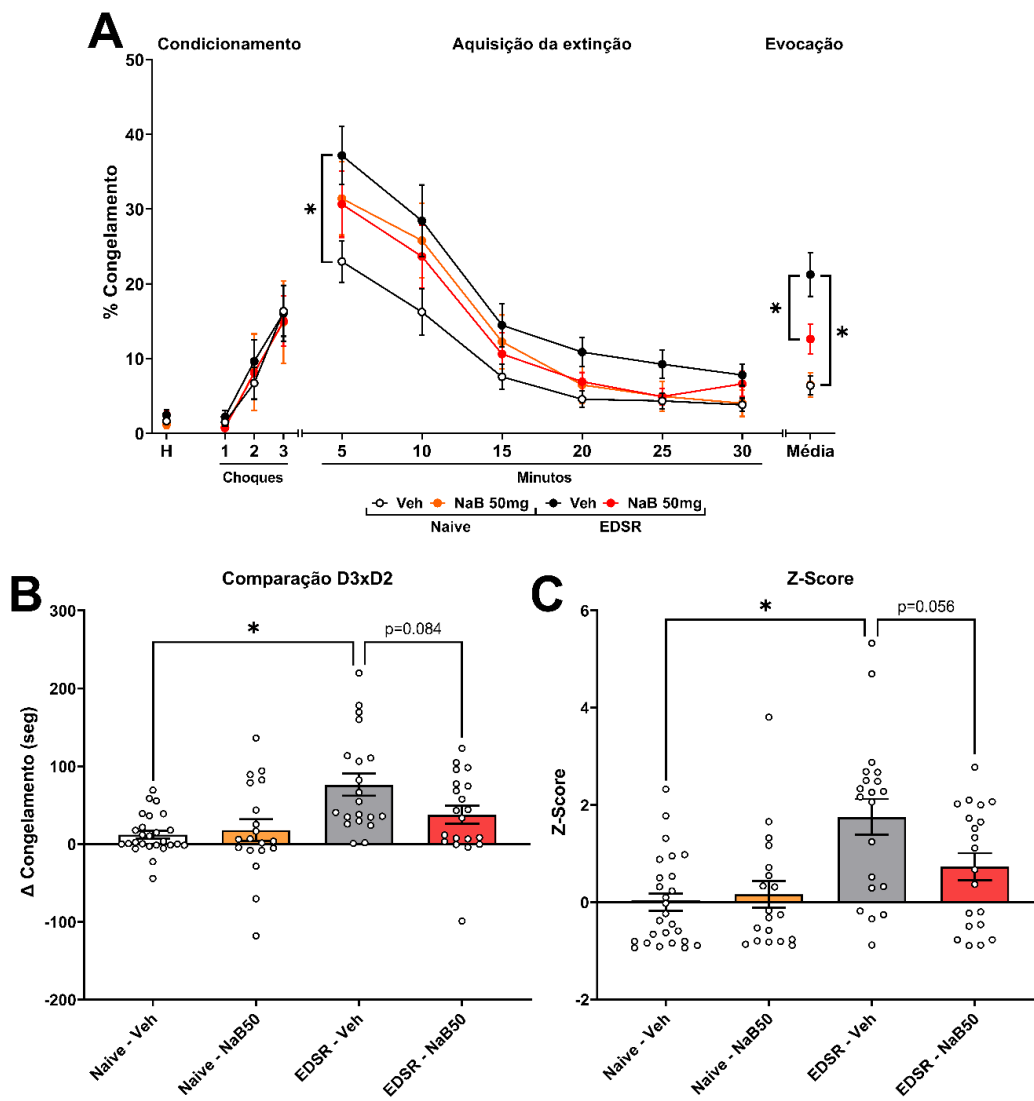
### 5.3.3. Medo condicionado contextual

Inicialmente os grupos não apresentaram diferenças entre si no tempo de congelamento durante a habituação, e todos condicionaram igualmente, visto que houve efeito do tempo ( $F_{(3,243)}=36,86$ ,  $p < 0,05$ ), mas não do estresse ( $F_{(1,81)}=1,154$ ,  $p > 0,05$ ) ou do tratamento ( $F_{(1,81)}=0,145$ ,  $p > 0,05$ ). Tampouco foi observado efeito da interação entre tempo e estresse ( $F_{(3,243)}=0,094$ ,  $p > 0,05$ ), tempo e tratamento ( $F_{(3,243)}=0,076$ ,  $p > 0,05$ ), tratamento e estresse ( $F_{(1,81)}=0,045$ ,  $p > 0,05$ ) e tempo, tratamento e estresse ( $F_{(3,243)}=0,139$ ,  $p > 0,05$ ). Em seguida foi realizado pós teste de Dunnett que comparou todos os pontos com o momento de habituação do grupo Naive-veh. Foi observado que todos os grupos apresentaram inicialmente o mesmo nível de congelamento ( $p > 0,05$ , Dunnett) e passaram a expressar maior nível de congelamento após o terceiro choque ( $p < 0,05$ , Dunnett). Desta forma, não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 13A).

Na sessão de aquisição da memória de extinção foi observado efeito do tempo

( $F_{(5,405)}=107,6$ ,  $p<0,05$ ), tendência a efeito do estresse ( $F_{(1,81)}=3,359$ ,  $p=0,070$ ) e interação entre estresse e tratamento ( $F_{(1,81)}=3,806$ ,  $p=0,054$ ). Não houve efeito apenas do tratamento ( $F_{(1,81)}=0,0009$ ,  $p>0,05$ ) ou interação entre tempo e estresse ( $F_{(5,405)}=0,655$ ,  $p>0,05$ ), tempo e tratamento ( $F_{(5,405)}=0,554$ ,  $p>0,05$ ) e tempo, tratamento e estresse ( $F_{(5,405)}=1,758$ ,  $p>0,05$ , ANOVA de medidas repetidas). Comparando todos os pontos com os 5 primeiros minutos do grupo controle Naive-veh, evidenciou-se efeito ansiogênico do estresse, representado pelo aumento do nível de congelamento nos 5 primeiros minutos da sessão ( $p<0,05$ , Dunnett), diferença esta que não foi observada nos grupos EDSR-NaB e Naive-NaB ( $p>0,05$ , Dunnett). Além disso, todos os grupos adquiriram a memória de extinção, visto que houve redução dos níveis de congelamento nos grupos Naive-veh e EDSR-NaB a partir dos 15 minutos da sessão ( $p<0,05$ , Dunnett), enquanto esta diferença foi observada nos grupos EDSR-veh e Naive-NaB a partir dos 20 minutos da sessão ( $p<0,05$ , Dunnett), indicando que nos animais estressados o tratamento acelerou a aquisição da extinção, enquanto nos animais naives a retardou (Figura 13A).

Por fim, houve efeito do EDSR ( $F_{(1,81)}=25,58$ ,  $p<0,05$ ), tendência a efeito do tratamento ( $F_{(1,81)}=3,246$ ,  $p=0,07$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(1,81)}=6,256$ ,  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias) na evocação da memória de extinção. Comparando os grupos Naive-veh e EDSR-veh, observa-se efeito de déficit de extinção nos animais estressados ( $p<0,05$ , Tukey), que foi atenuado pelo tratamento, evidenciado pela comparação entre os grupos EDSR-veh e EDSR-NaB ( $p<0,05$ , Tukey). O tratamento não teve efeito em animais não estressados ( $p>0,05$ , Tukey) (Figura 13A). Na avaliação do delta de congelamento, houve efeito do estresse ( $F_{(1,81)}=14,29$ ,  $p<0,05$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(1,81)}=4,025$ ,  $p<0,05$ ), porém sem efeito do tratamento ( $F_{(1,81)}=2,168$ ,  $p>0,05$ , ANOVA de duas vias). Com isso, foi observado aumento do delta de congelamento induzido pelo EDSR em comparação com o grupo Naive-veh ( $p<0,05$ , Tukey) e tendência da droga em atenuar este aumento ( $p=0,084$ , Tukey). Novamente sem efeito do tratamento em animais não estressados (Figura 13B). Na avaliação por Z-Score, o mesmo foi observado. Efeito do estresse ( $F_{(1,81)}=17,96$ ,  $p<0,05$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(1,81)}=4,657$ ,  $p<0,05$ ), mas sem efeito do tratamento ( $F_{(1,81)}=2,449$ ,  $p>0,05$ ). Na análise de pós teste, houve aumento do Z-score dos animais EDSR-veh em comparação com os Naive-veh ( $p<0,05$ , Tukey) e tendência do tratamento em atenuar este aumento ( $p=0,056$ , Tukey), sem efeito da droga em animais não estressados ( $p>0,05$ , Tukey) (Figura 13C).



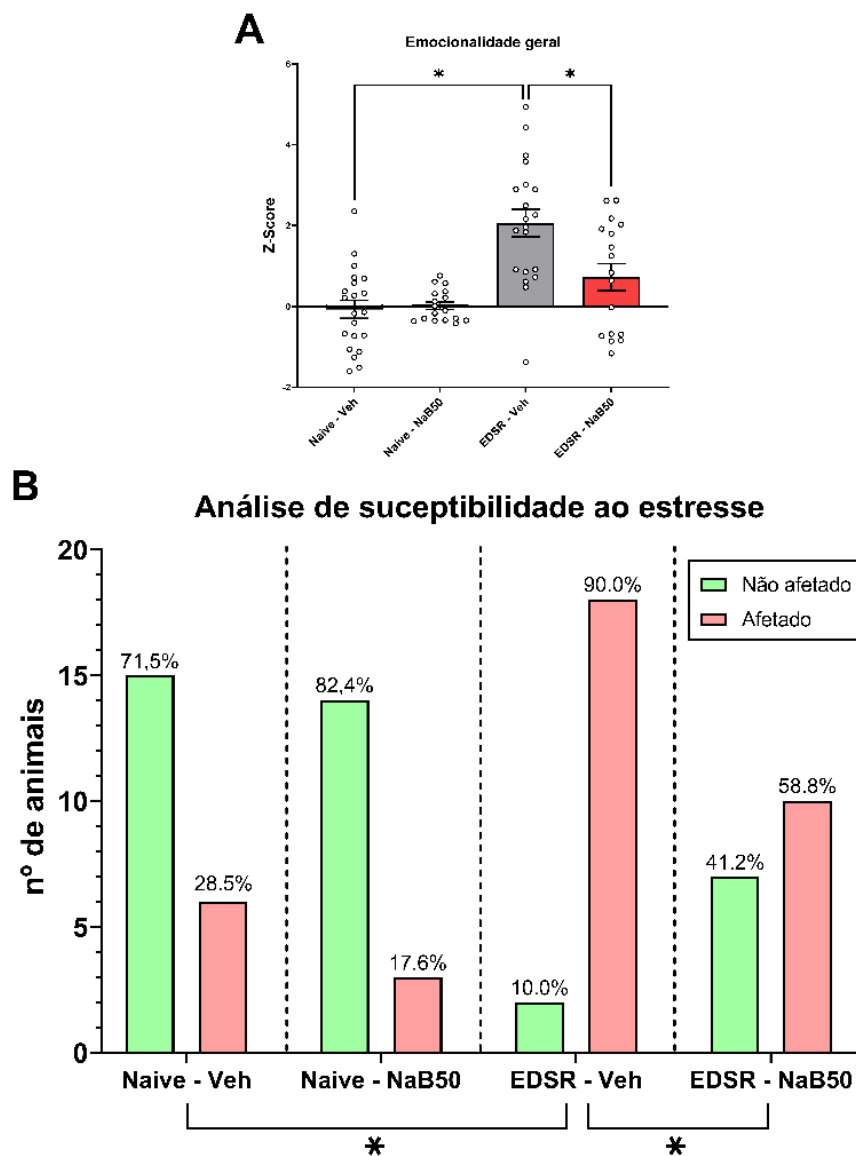
**Figura 13:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados no MCC. A aquisição da extinção foi feita 1 dia e sua evocação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 26 animais naive-veh e 19 naive-NaB50, 20 EDSR-veh e 20 EDSR-NaB50. Os dados são representados pela média  $\pm$  EPM.

### 5.3.4. Análise de susceptibilidade ao estresse

Para análise de susceptibilidade ao estresse foi calculado o Z-Score de emocionalidade, que se baseia na média do Z-Score dos testes de TES e MCC. Primeiramente foi observado efeito estresse ( $F_{(1,71)}=27,74$ ,  $p<0,05$ ), tratamento ( $F_{(1,71)}=5,281$ ,  $p<0,05$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(1,71)}=6,948$ ,  $p<0,05$ ). Com isso, o EDSR aumentou o Z-Score de emocionalidade em comparação com o grupo Naive-veh ( $p<0,05$ , Tukey) e que este efeito foi atenuado pelo tratamento com NaB ( $p<0,05$ , Tukey). Não houve efeito da droga em animais não estressados ( $p>0,05$ ) (Figura 14A).

Por fim foi analisada a proporção de animais afetados (Z-Score geral maior que 0,5) ou não (Z-Score geral menor que 0,5) pelo estresse (adaptado de GUILLOUX

et al. (2011)) (Figura 14B). O EDSR aumentou significativamente o número de animais com emocionalidade afetada em relação aos animais naives ( $\chi^2=15,93$ ,  $p<0,05$ , teste de  $\chi^2$ ), com as proporções passando de 71,5% para 10% com fenótipo não afetado e de 28,5% para 90% com fenótipo afetado. O tratamento com NaB em animais estressados reduziu este efeito ( $\chi^2=4,852$ ,  $p<0,05$ , teste de  $\chi^2$ ), com as proporções passando de 10% para 42,2% de animais não afetados e de 90% para 58,8% de animais afetados. O tratamento com NaB em animais naives não induziu alteração significativa da proporção de animais em cada classificação ( $\chi^2=0,620$ ,  $p>0,05$ , teste de  $\chi^2$ ).



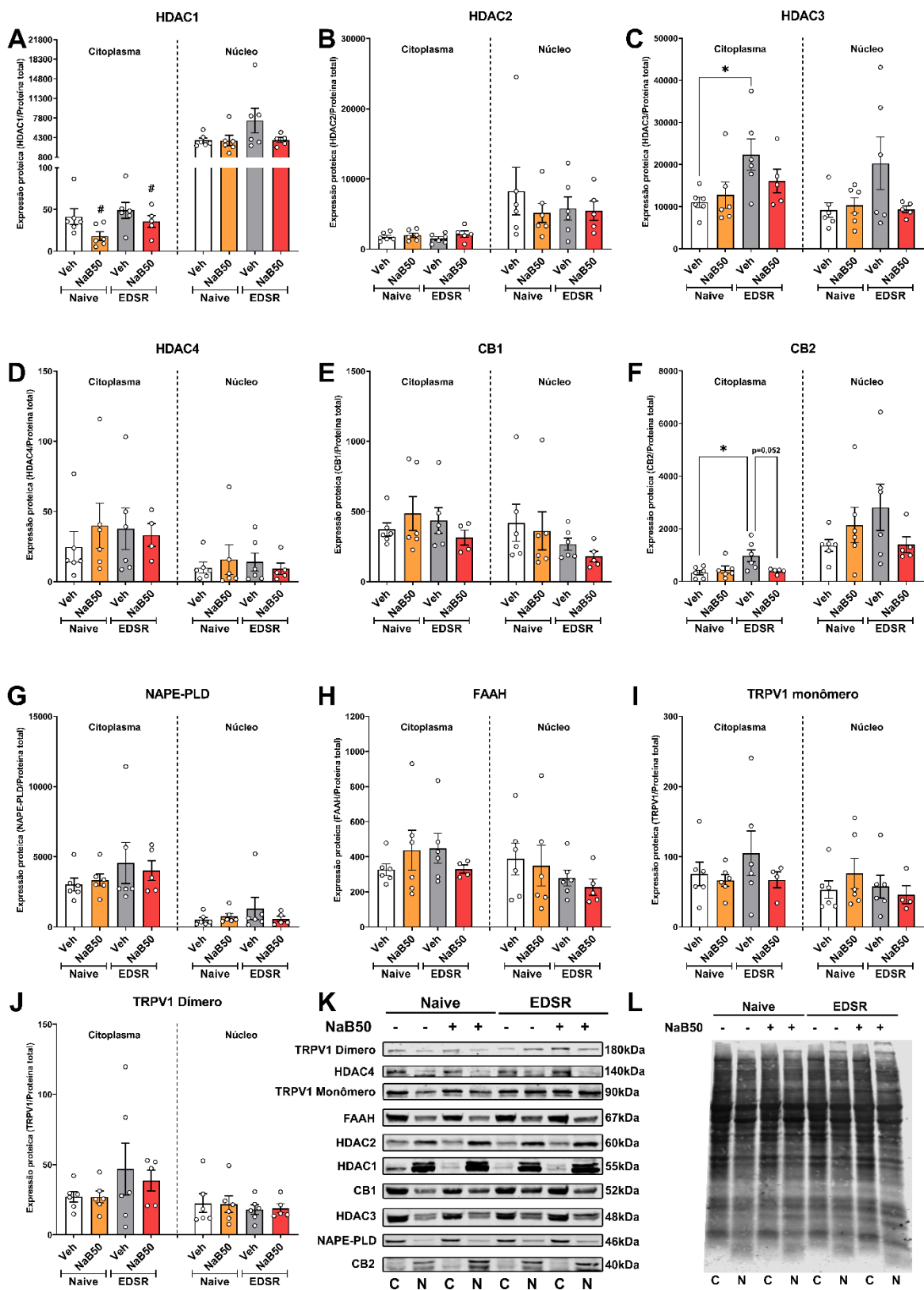
**Figura 14:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados na emocionalidade geral analisada pela (A) média  $\pm$  EPM e (B) proporção de animais com emocionalidade afetada ou não. \* indica  $p<0,05$  no teste de  $\chi^2$ .

### 5.3.5. Análise de expressão proteica no córtex pré-frontal

Ao final dos testes comportamentais, a expressão proteica de HDACs e de genes relacionados ao sistema endocanabinoide foram avaliados por Western Blot. As imagens representativas podem ser observadas nas figuras 15K-L.

Em relação à expressão de HDAC1 na fração citoplasmática (Figura 15A), não houve efeito do estresse ( $F_{(1,19)}=2,339$ ,  $p>0,05$ ), nem interação entre os fatores ( $F_{(1,19)}=0,357$ ,  $p>0,05$ ). Entretanto, o tratamento com NaB na dose de 50mg/Kg, de forma geral, reduziu a expressão desta enzima ( $F_{(1,19)}=4,950$ ,  $p<0,05$ ). Já a expressão de HDAC3 na fração citoplasmática (Figura 15C), sofreu influência positiva do estresse ( $F_{(1,19)}=6,362$ ,  $p<0,05$ ), sem efeito do tratamento ( $F_{(1,19)}=0,620$ ,  $p>0,05$ ), nem interação entre os fatores ( $F_{(1,19)}=1,894$ ,  $p>0,05$ ). O grupo EDSR-Veh apresentou maior nível de expressão desta proteína em relação ao grupo Naive-Veh ( $p<0,05$ , Tukey). Por fim, observamos que o nível de expressão do receptor CB2 na fração citoplasmática (13F), não sofreu influência do tratamento ( $F_{(1,19)}=2,679$ ,  $p>0,05$ ), mas apresentou tendência a efeito do estresse ( $F_{(1,19)}=4,119$ ,  $p=0,056$ ) e efeito da interação entre os fatores ( $F_{(1,19)}=5,757$ ,  $p<0,05$ ). Houve aumento da expressão de CB2 no grupo EDSR-Veh em comparação ao grupo Naive-Veh ( $p<0,05$ , Tukey), e tendência a atenuação desse efeito pelo tratamento ( $p=0,052$ , Tukey, entre os grupos EDSR-Veh e EDSR-NaB50). Já na fração nuclear, de forma geral não houveram diferenças entre os grupos, a não ser uma tendência na expressão de CB2. Não houve efeito do estresse ( $F_{(1,19)}=0,33$ ,  $p>0,05$ ) ou do tratamento na expressão de CB2 ( $F_{(1,19)}=0,273$ ,  $p>0,05$ ), mas houve tendência à interação entre os fatores ( $F_{(1,19)}=3,296$ ,  $p=0,085$ ).

As demais proteínas avaliadas que não foram alteradas por nenhum dos fatores, bem como a descrição estatística, podem ser observadas na Figura 15 e na tabela 1, respectivamente.



**Figura 15:** Efeito do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg em animais estressados e não estressados na expressão proteica de (A) HDAC1, (B) HDAC2, (C) HDAC3 e (D) HDAC4, (E) CB1, (F) CB2, (G) NAPE-PLD, (H) FAAH e (I) monômero e (J) dímero de TRPV1 no córtex pré frontal. Imagem representativa da (K) marcação de cada proteína analisada e da (L) marcação de proteína total por poço. \* indica  $p < 0,05$ , Tukey, # indica  $p < 0,05$  no fator tratamento da ANOVA de duas vias.

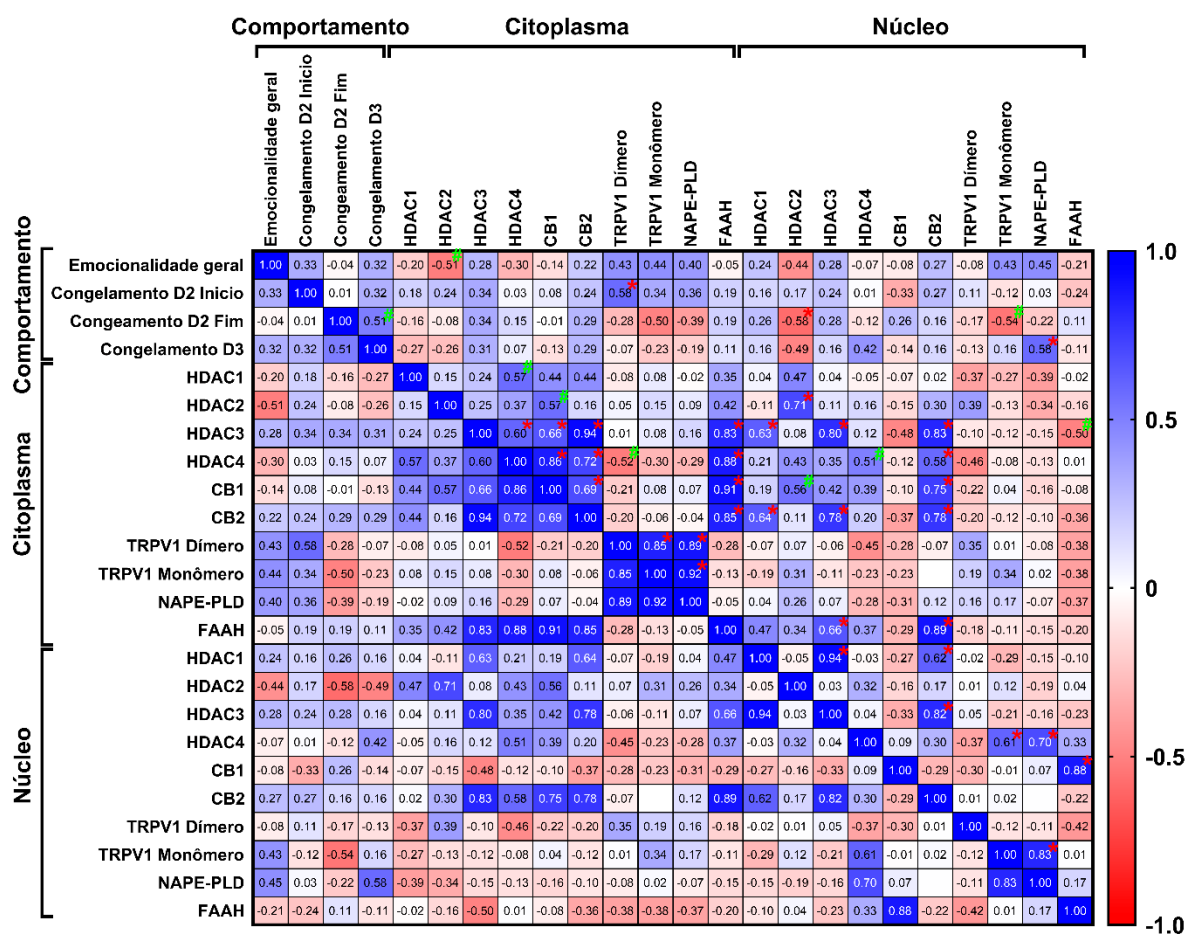


**Tabela 1:** Resumo da descrição estatística da avaliação de expressão de proteínas no CPF.

Proteína	Localização	Fator	Estatística
HDAC1 (Figura 15A)	Citoplasma	Estresse	$F_{(1,19)}=2,339, p>0,05$
		<b>Tratamento*</b>	<b><math>F_{(1,19)}=4,950, p&lt;0,05</math></b>
		Interação	$F_{(1,19)}=0,357, p>0,05$
	Núcleo	Estresse	$F_{(1,19)}=1,979, p>0,05$
		Tratamento	$F_{(1,19)}=1,851, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,19)}=1,783, p>0,05$
HDAC2 (Figura 15B)	Citoplasma	Estresse	$F_{(1,19)}=0,007, p>0,05$
		Tratamento	$F_{(1,19)}=1,925, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,19)}=0,410, p>0,05$
	Núcleo	Estresse	$F_{(1,19)}=0,238, p>0,05$
		Tratamento	$F_{(1,19)}=0,616, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,19)}=0,416, p>0,05$
HDAC3 (Figura 15C)	Citoplasma	<b>Estresse*</b>	<b><math>F_{(1,19)}=6,362, p&lt;0,05</math></b>
		Tratamento	$F_{(1,19)}=0,620, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,19)}=1,894, p>0,05$
	Núcleo	Estresse	$F_{(1,19)}=2,027, p>0,05$
		Tratamento	$F_{(1,19)}=1,867, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,19)}=2,843, p>0,05$
HDAC4 (Figura 15D)	Citoplasma	Estresse	$F_{(1,18)}=0,047, p>0,05$
		Tratamento	$F_{(1,18)}=0,148, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,18)}=0,503, p>0,05$
	Núcleo	Estresse	$F_{(1,19)}=0,001, p>0,05$
		Tratamento	$F_{(1,19)}=0,037, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,19)}=0,867, p>0,05$
CB <sub>1</sub> (Figura 15E)	Citoplasma	Estresse	$F_{(1,18)}=0,367, p>0,05$
		Tratamento	$F_{(1,18)}=0,001, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,18)}=1,721, p>0,05$
	Núcleo	Estresse	$F_{(1,19)}=2,650, p>0,05$
		Tratamento	$F_{(1,19)}=0,495, p>0,05$
		Interação	$F_{(1,19)}=0,020, p>0,05$

CB <sub>2</sub> (Figura 15F)	Citoplasma	<b>Estresse*</b>	<b>F<sub>(1,19)</sub>=4,119, p=0,056</b>
		Tratamento	F <sub>(1,19)</sub> =2,679, p>0,05
		<b>Interação*</b>	<b>F<sub>(1,19)</sub>=5,757, p&lt;0,05</b>
	Núcleo	Estresse	F <sub>(1,19)</sub> =0,336, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,19)</sub> =0,273, p>0,05
		<b>Interação</b>	<b>F<sub>(1,19)</sub>=3,296, p=0,08</b>
NAPE-PLD (Figura 15G)	Citoplasma	Estresse	F <sub>(1,19)</sub> =1,530, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,19)</sub> =0,018, p>0,05
		Interação	F <sub>(1,19)</sub> =0,239, p>0,05
	Núcleo	Estresse	F <sub>(1,19)</sub> =0,484, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,19)</sub> =0,316, p>0,05
		Interação	F <sub>(1,19)</sub> =1,191, p>0,05
FAAH (Figura 15H)	Citoplasma	Estresse	F <sub>(1,18)</sub> =0,006, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,18)</sub> =0,001, p>0,05
		Interação	F <sub>(1,18)</sub> =1,946, p>0,05
	Núcleo	Estresse	F <sub>(1,19)</sub> =1,906, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,19)</sub> =0,297, p>0,05
		Interação	F <sub>(1,19)</sub> =0,005, p>0,05
TRPV1 (Monômero) (Figura 15I)	Citoplasma	Estresse	F <sub>(1,18)</sub> =0,512, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,18)</sub> =1,256, p>0,05
		Interação	F <sub>(1,18)</sub> =0,461, p>0,05
	Núcleo	Estresse	F <sub>(1,18)</sub> =0,556, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,18)</sub> =0,113, p>0,05
		Interação	F <sub>(1,18)</sub> =0,997, p>0,05
TRPV1 (Dímero) (Figura 15J)	Citoplasma	Estresse	F <sub>(1,19)</sub> =2,216, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,19)</sub> =0,145, p>0,05
		Interação	F <sub>(1,19)</sub> =0,143, p>0,05
	Núcleo	Estresse	F <sub>(1,19)</sub> =0,494, p>0,05
		Tratamento	F <sub>(1,19)</sub> =0,0009, p>0,05
		Interação	F <sub>(1,19)</sub> =0,021, p>0,05

Em seguida, foram feitas matrizes de correlação de Pearson levando em conta os dados de expressão de cada proteína analisada, emocionalidade geral e os níveis de congelamento nos 10 primeiros e 10 últimos minutos da sessão de aquisição da extinção e no tempo total da sessão de evocação da extinção do medo condicionado. Foram realizadas análises distintas: uma levando em conta animais estressados e não estressados tratados com veículo e uma segunda levando em conta animais estressados e não estressados tratados com NaB. O valor de r de Pearson de cada análise de correlação pode ser observado na figura 16 (animais tratados com salina) e figura 17 (animais tratados com NaB). As correlações estatisticamente significantes entre parâmetros comportamentais e expressão proteica (tabelas 2 e 6), entre expressão de proteínas citoplasmáticas (tabelas 3 e 7), entre expressão de proteínas nucleares (tabelas 4 e 8) e entre expressão de proteínas nucleares e citoplasmáticas (tabelas 5 e 9) podem ser observadas nas tabelas indicadas.



**Figura 16:** Matriz de correlação de Pearson levando em conta emocionalidade geral, os níveis de congelamento nos 10 primeiros e 10 últimos minutos da sessão de aquisição da extinção e nos 10 minutos da sessão de evocação da extinção do medo condicionado, além da expressão proteica de HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, CB1, CB2, dímero e monômero de TRPV1, NAPE-PLD e FAAH nas frações citoplasmáticas e nucleares de amostras de CPF de animais tratados com veículo. \* indica p<0,05 e # indica 0,05<p<0,1.

**Tabela 2:** Correlações entre parâmetros comportamentais e expressões proteicas estatisticamente significantes em animais tratados com salina.

<b>Comportamento</b>	<b>Proteína</b>	<b>Localização</b>	<b>Tipo de correlação</b>
Congelamento D2 (início da sessão)	TRPV1 dímero	Citoplasma	Positiva
Congelamento D2 (fim da sessão)	HDAC2	Núcleo	Negativa
Congelamento D3	NAPE-PLD	Núcleo	Positiva
Emocionalidade geral	HDAC2	Citoplasma	Negativa (tendência)
Congelamento D2 (fim da sessão)	TRPV1 monômero	Citoplasma	Negativa (tendência)

**Tabela 3:** Correlações entre as expressões de proteínas citoplasmáticas estatisticamente significantes em animais tratados com salina.

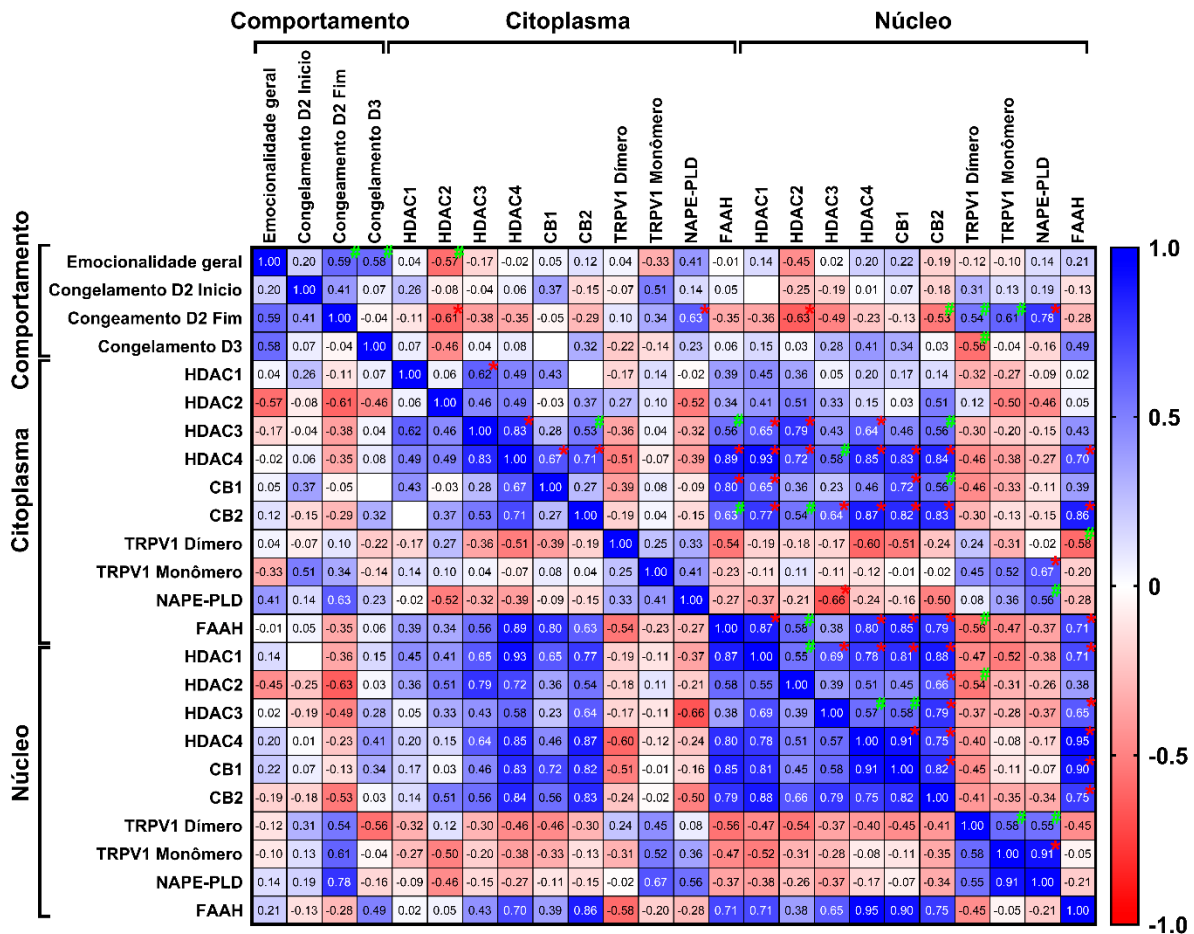
<b>Proteína 1</b>	<b>Proteína 2</b>	<b>Tipo de correlação</b>
HDAC3	HDAC4	Positiva
HDAC3	CB <sub>1</sub>	Positiva
HDAC3	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC3	FAAH	Positiva
HDAC4	CB <sub>1</sub>	Positiva
HDAC4	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC4	FAAH	Positiva
CB <sub>1</sub>	CB <sub>2</sub>	Positiva
CB <sub>1</sub>	FAAH	Positiva
CB <sub>2</sub>	FAAH	Positiva
TRPV1 Dímero	TRPV1 Monômero	Positiva
TRPV1 Dímero	NAPE-PLD	Positiva
TRPV1 Monômero	NAPE-PLD	Positiva
HDAC1	HDAC4	Positiva (tendência)
HDAC2	CB <sub>1</sub>	Positiva (tendência)
HDAC4	TRPV1 Dímero	Negativa (tendência)

**Tabela 4:** Correlações entre as expressões de proteínas nucleares estatisticamente significantes em animais tratados com salina.

<b>Proteína 1</b>	<b>Proteína 2</b>	<b>Tipo de correlação</b>
HDAC1	HDAC3	Positiva
HDAC1	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC3	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC4	TRPV1 Monômero	Positiva
HDAC4	NAPE-PLD	Positiva
CB <sub>1</sub>	FAAH	Positiva
TRPV1 Monômero	NAPE-PLD	Positiva

**Tabela 5:** Correlações entre as expressões de proteínas nucleares e citoplasmáticas estatisticamente significantes em animais tratados com salina.

<b>Proteína nuclear</b>	<b>Proteína citoplasmática</b>	<b>Tipo de correlação</b>
HDAC1	HDAC3	Positiva
HDAC1	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC2	HDAC2	Positiva
HDAC3	HDAC3	Positiva
HDAC3	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC3	FAAH	Positiva
CB <sub>2</sub>	HDAC3	Positiva
CB <sub>2</sub>	HDAC4	Positiva
CB <sub>2</sub>	CB <sub>1</sub>	Positiva
CB <sub>2</sub>	CB <sub>2</sub>	Positiva
CB <sub>2</sub>	FAAH	Positiva
HDAC2	CB <sub>1</sub>	Positiva (tendência)
HDAC4	HDAC4	Positiva (tendência)
FAAH	HDAC3	Negativa (tendência)



**Figura 17:** Matriz de correlação de Pearson levando em conta emocionalidade geral, os níveis de congelamento nos 10 primeiros e 10 últimos minutos da sessão de aquisição da extinção e nos 10 minutos da sessão de evocação da extinção do medo condicionado, além da expressão proteica de HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, CB1, CB2, dímero e monômero de TRPV1, NAPE-PLD e FAAH nas frações citoplasmáticas e nucleares de amostras de CPF de animais tratados com NaB. \* indica  $p < 0,05$  e # indica  $0,05 < p < 0,1$ .

**Tabela 6:** Correlações entre parâmetros comportamentais e expressões proteicas estatisticamente significantes em animais tratados com NaB.

Comportamento	Proteína	Localização	Tipo de correlação
Congelamento D2 (fim da sessão)	HDAC2	Citoplasma	Negativa
Congelamento D2 (fim da sessão)	NAPE-PLD	Citoplasma	Positiva
Congelamento D2 (fim da sessão)	HDAC2	Núcleo	Negativa
Congelamento D2 (fim da sessão)	NAPE-PLD	Núcleo	Positiva
Emocionalidade geral	HDAC2	Citoplasma	Negativa (tendência)
Congelamento D2 (fim da sessão)	CB <sub>2</sub>	Núcleo	Negativa (tendência)
Congelamento D2 (fim da sessão)	TRPV1 Dímero	Núcleo	Positiva (tendência)
Congelamento D2 (fim da sessão)	TRPV1 Monômero	Núcleo	Positiva (tendência)
Congelamento D3	TRPV1 Dímero	Núcleo	Negativa (tendência)

**Tabela 7:** Correlações entre as expressões de proteínas citoplasmáticas estatisticamente significantes em animais tratados com NaB.

<b>Proteína 1</b>	<b>Proteína 2</b>	<b>Tipo de correlação</b>
HDAC1	HDAC3	Positiva
HDAC3	HDAC4	Positiva
HDAC4	CB <sub>1</sub>	Positiva
HDAC4	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC4	FAAH	Positiva
CB <sub>1</sub>	FAAH	Positiva
HDAC3	CB <sub>2</sub>	Positiva (tendência)
HDAC3	FAAH	Positiva (tendência)
CB <sub>2</sub>	FAAH	Positiva (tendência)

**Tabela 8:** Correlações entre as expressões de proteínas nucleares estatisticamente significantes em animais tratados com NaB.

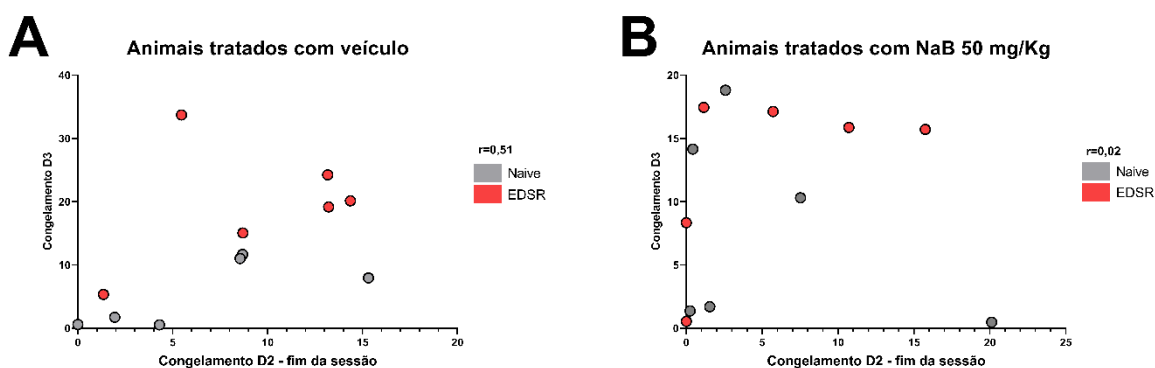
<b>Proteína 1</b>	<b>Proteína 2</b>	<b>Tipo de correlação</b>
HDAC1	HDAC3	Positiva
HDAC1	HDAC4	Positiva
HDAC1	CB <sub>1</sub>	Positiva
HDAC1	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC1	FAAH	Positiva
HDAC2	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC3	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC3	FAAH	Positiva
HDAC4	CB <sub>1</sub>	Positiva
HDAC4	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC4	FAAH	Positiva
CB <sub>1</sub>	CB <sub>2</sub>	Positiva
CB <sub>1</sub>	FAAH	Positiva
CB <sub>2</sub>	FAAH	Positiva
TRPV1 Monômero	NAPE-PLD	Positiva
HDAC1	HDAC2	Positiva (tendência)
HDAC2	TRPV1 Dímero	Negativa (tendência)
HDAC3	HDAC4	Positiva (tendência)
HDAC3	CB <sub>1</sub>	Positiva (tendência)
TRPV1 Dímero	TRPV1 Monômero	Positiva (tendência)
TRPV1 Dímero	NAPE-PLD	Positiva (tendência)

**Tabela 9:** Correlações entre as expressões de proteínas nucleares e citoplasmáticas estatisticamente significantes em animais tratados com salina.

<b>Proteína nuclear</b>	<b>Proteína citoplasmática</b>	<b>Tipo de correlação</b>
HDAC1	HDAC3	Positiva
HDAC1	HDAC4	Positiva
HDAC1	CB <sub>1</sub>	Positiva
HDAC1	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC1	FAAH	Positiva
HDAC2	HDAC3	Positiva
HDAC2	HDAC4	Positiva
HDAC3	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC3	NAPE-PLD	Negativa
HDAC4	HDAC3	Positiva
HDAC4	HDAC4	Positiva
HDAC4	CB <sub>2</sub>	Positiva
HDAC4	FAAH	Positiva
CB <sub>1</sub>	HDAC4	Positiva
CB <sub>1</sub>	CB <sub>1</sub>	Positiva
CB <sub>1</sub>	CB <sub>2</sub>	Positiva
CB <sub>1</sub>	FAAH	Positiva
CB <sub>2</sub>	HDAC4	Positiva
CB <sub>2</sub>	CB <sub>2</sub>	Positiva
CB <sub>2</sub>	FAAH	Positiva
NAPE-PLD	TRPV1 Monômero	Positiva
FAAH	HDAC4	Positiva
FAAH	CB <sub>2</sub>	Positiva
FAAH	FAAH	Positiva
HDAC2	CB <sub>2</sub>	Positiva (tendência)
HDAC2	FAAH	Positiva (tendência)
HDAC3	HDAC4	Positiva (tendência)
CB <sub>2</sub>	HDAC3	Positiva (tendência)
CB <sub>2</sub>	CB <sub>1</sub>	Positiva (tendência)
TRPV1 Dímero	FAAH	Negativa (tendência)
NAPE-PLD	NAPE-PLD	Positiva (tendência)
FAAH	TRPV1 Dímero	Negativa (tendência)

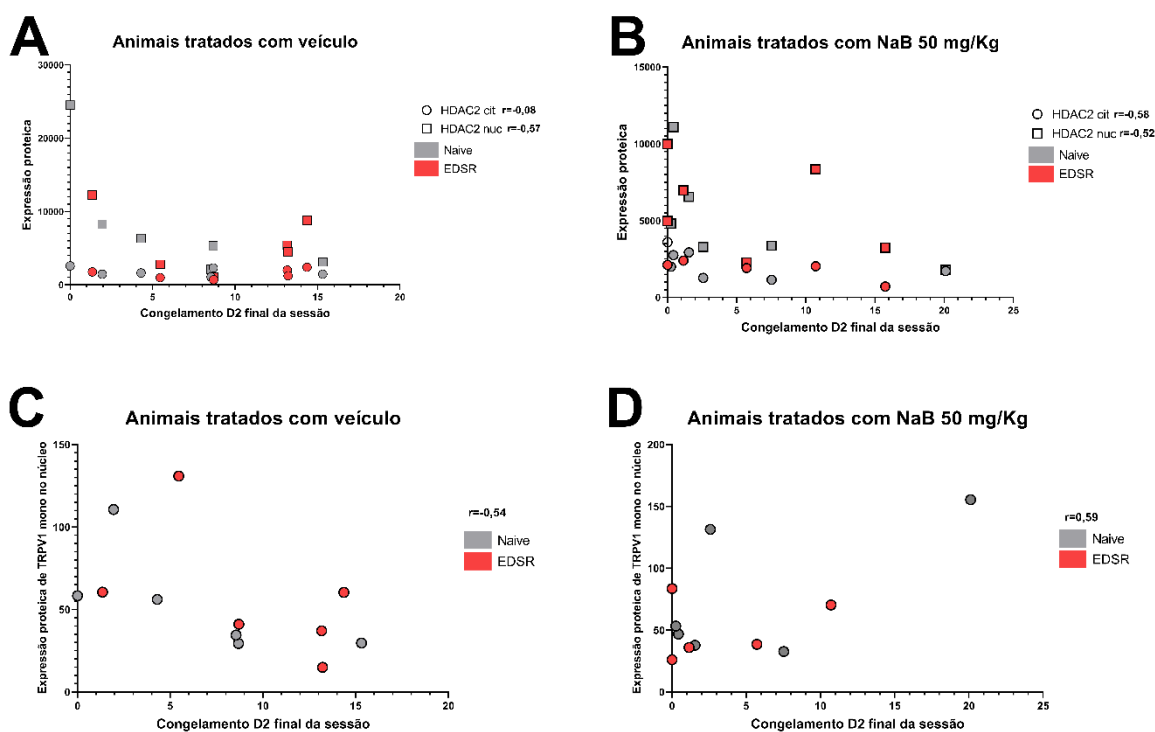


Após a realização das correlações de Pearson, foram consideradas as correlações com  $r > 0,5$  ou  $r < -0,5$  moderadas e as com  $r > 0,7$  ou  $r < -0,7$  fortes (tabelas 2-9). Com isso, algumas dessas correlações foram selecionadas para construção de gráficos e melhor compreensão dos resultados (figuras 18, 19 e 20). Animais tratados com veículo apresentaram correlação positiva entre o tempo de congelamento no final da sessão de aquisição da extinção e a sessão de evocação do MCC, indicando que os animais que tiveram redução da aquisição da extinção, evocaram mais a memória de medo, assim como esperado (figura 18A). Entretanto, em animais tratados com NaB não houve correlação entre os comportamentos. Além disso, o perfil onde animais estressados expressam maiores níveis de congelamento em D3, deixou de existir (figura 18B).



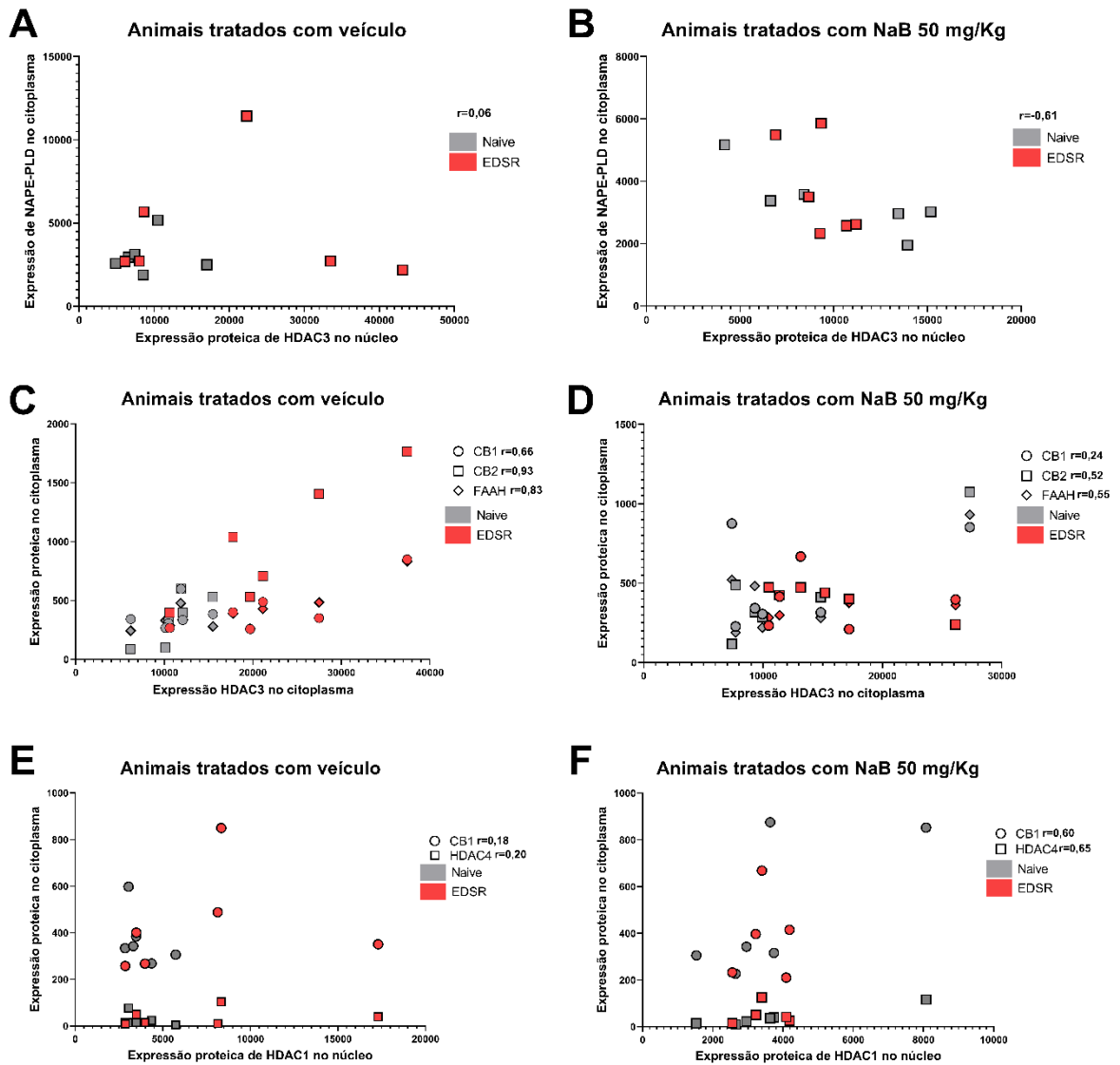
**Figura 18:** Correlação entre o congelamento no final da sessão de aquisição da extinção com a sessão de evocação dividida em animais tratados (A) com veículo e (B) NaB na dose de 50 mg/Kg. Os valores acima da legenda dos grupos indicam o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ).

Em seguida, ao contrário do inicialmente hipotetizado, os níveis de HDAC2 no núcleo se correlacionaram negativamente com o congelamento no fim da sessão de aquisição da extinção tanto em animais tratados com veículo, como com NaB, sendo que em animais tratados também houve correlação com os níveis nucleares desta enzima (figuras 19A e 19B). Além disso, os níveis de TRPV1 (monômero) no núcleo se correlacionam negativamente em animais tratados com veículo e positivamente em animais tratados com NaB, com este parâmetro comportamental (figuras 19C e 19D).



**Figura 19:** Correlações entre (A-B) o congelamento no final da sessão de aquisição da extinção com expressão proteica de HDAC2 no citoplasma e no núcleo e (C-D) o congelamento no final da sessão de aquisição da extinção com a expressão proteica de monômero de TRPV1 no núcleo. As correlações foram divididas em animais tratados com veículo (A e C) e NaB na dose de 50 mg/Kg (B e D). Os valores acima da legenda dos grupos indicam o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ).

Nas correlações entre níveis de expressão proteica, os níveis de HDAC3 no núcleo e NAPE-PLD no citoplasma se correlacionaram negativamente em animais tratados com NaB (figura 20B), mas não nos animais tratados com veículo (figura 20A). Já na fração citoplasmática, os níveis de HDAC3 se correlacionaram positivamente com CB1, CB2 e FAAH citoplasmáticas em animais tratados com veículo (figura 20C), mas não em animais tratados com NaB (figura 20D). Por fim, os níveis de HDAC1 no núcleo se correlacionaram com CB1 e HDAC4 no citoplasma em animais tratados com NaB (figura 20F), mas não em animais tratados com veículo (figura 20E).



**Figura 20:** Correlações entre (A-B) expressão proteica de HDAC3 no núcleo e NAPE-PLD no citoplasma, (C-D) HDAC3 no citoplasma e CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> e FAAH no citoplasma e (E-F) HDAC1 no núcleo e CB<sub>1</sub> e HDAC4 no citoplasma. As correlações foram divididas em animais tratados com veículo (A, C e E) e NaB na dose de 50 mg/Kg (B, D e F). Os valores acima da legenda dos grupos indicam o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ).

---

---

***DISCUSSÃO***

## 6. DISCUSSÃO

Inicialmente, constatou-se que o protocolo de EDSR induziu efeito hipolocomotor, ansiogênico e de déficit de extinção do MCC em camundongos machos da linhagem BALB/c. Além disso, apesar do tratamento com NaB na dose de 50 mg/kg agravar o efeito hipolocomotor, atenuou o efeito ansiogênico e de déficit de extinção do MCC induzidos pelo estresse. Em animais não estressados, o tratamento não alterou a locomoção, a esquivas social e a extinção do MCC, porém apresentou efeito ansiolítico no TCA. Molecularmente, o EDSR induziu aumento da expressão de HDAC3 e CB<sub>2</sub> na fração citoplasmática do CPF. Além disso, o NaB atenuou o efeito do EDSR nos receptores CB<sub>2</sub> e reduziu a expressão de HDAC1 nesta mesma fração de forma independente do estresse. Curiosamente, a expressão do CB<sub>2</sub> foi maior na fração nuclear do que citoplasmática, independente do grupo.

Estudos prévios já demonstram que a administração de NaB induz efeitos ansiolíticos e antidepressivos, ligados à redução de atividade de HDACs e consequentemente aumento do padrão de acetilação de proteínas histonas, em animais expostos a modelos de estresse (CRISTIANO et al., 2022; HAN et al., 2014; MOHAMMADI-FARANI et al., 2021; SCHROEDER et al., 2007). Dessa forma, levantou-se a hipótese de que a administração desta droga durante o protocolo de EDSR pudesse bloquear os efeitos ansiogênico e de esquivas social induzidos pelo mesmo, por bloquear enzimas HDAC. Entretanto, no presente estudo o efeito ansiogênico não foi observado nos animais tratados com veículo, mas nos tratados com NaB nas doses de 25 e 50 mg/Kg. Apesar de outro estudo já ter demonstrado que o tratamento agudo com NaB na dose de 100 mg/Kg pode apresentar efeito ansiogênico (GUNDERSEN et al., 2009), nos experimentos deste estudo considera-se que o efeito observado possa ser hipolocomoção, visto que o EDSR induziu tendência à redução da distância total percorrida no TCA, e que o tratamento agravou este efeito. Em animais não estressados, foram observados resultados mais robustos do tratamento com NaB, efeito ansiolítico evidenciado pelo aumento da exploração do centro do aparato e redução da pontuação de Z-Score, sem alteração da locomoção dos animais.

A literatura envolvendo efeitos do NaB em comportamentos relacionados à ansiedade em animais não estressados é escassa. O resultado do presente estudo corrobora evidência da literatura que mostra que o tratamento com NaB diluído na

água após o desmame por 4 semanas induziu efeito ansiolítico no TCA na vida adulta dos animais (ZHAO et al., 2020). Entretanto, outro estudo não viu efeito do NaB no grupo controle não estressado após injeção local no CPF IL, mas sim em animais estressados (MOHAMMADI-FARANI et al., 2022). Por fim, foi observado efeito antidepressivo, mas não ansiolítico, em ratos não estressados (YAMAWAKI et al., 2012). Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo a demonstrar o efeito ansiolítico do NaB após tratamento sistêmico intraperitoneal em camundongos não estressados.

Estudos observam que o NaB na dose 100 mg/Kg tem efeito pró-social em modelos de autismo (KRATSMAN et al., 2016). Ainda, o tratamento com NaB pode induzir comportamento social, incluindo preferência sexual e comportamentos de dominância (WANG, X. et al., 2023; ZHAO et al., 2020) quando diluído na água. Neste contexto, o tratamento repetido com o NaB da dose de 50 mg/Kg atenuou (tendência estatística) o aumento do tempo de permanência nos corners oposto a outro animal induzido pelo EDSR no TES, apesar de não ter aumentando o tempo na zona de interação. Neste teste, não foi observado efeito da droga em animais não estressados, indicando que o seu efeito deve ser dependente de alterações moleculares induzidas pelo estresse.

A administração repetida de NaB (50 mg/Kg) atenuou o déficit de extinção do medo condicionado contextual induzido pelo EDSR. Em animais tratados com veículo houve correlação entre o tempo de congelamento no fim da sessão de aquisição da extinção e a sessão de evocação, mas essa correlação não foi observada quando os animais foram tratados com NaB. Tal diferença pode acontecer provavelmente pelo tratamento reduzir os níveis de congelamento em animais estressados sem reduzir ao final na sessão de aquisição, mas aumentar sutilmente estes níveis em animais naives (não estatístico) no final da sessão de extinção sem aumentar na sessão de evocação. É importante mencionar que as correlações entre estes parâmetros comportamentais foram realizadas apenas com os animais que tiveram suas amostras avaliadas molecularmente, desta forma podem não refletir nosso n comportamental total.

Como mencionado, dentre os mecanismos propostos para o NaB, está a inibição de HDACs da classe I e IIa. Estudos demonstram que inibidores das HDACs facilitam o processo de extinção do medo condicionado quando administrados antes ou depois da sessão de aquisição da extinção, respectivamente (MATSUMOTO et al., 2013; WHITTLE et al., 2013). Outro estudo demonstrou que a administração do NaB de

forma repetida em uma dose baixa (0,5 mg/Kg) após a exposição de ratos ao modelo de trauma SPS, preveniu o déficit de extinção do MCC induzido pelo trauma (MOHAMMADI-FARANI et al., 2021). No entanto, estes estudos avaliam apenas o efeito do tratamento agudo durante o protocolo de medo condicionado, o que estaria mais relacionado ao tratamento da condição estabelecida, como ocorre na terapia de exposição, ou o tratamento repetido após o estresse, pré condicionamento. Alguns desses estudos verificaram que a atividade de HDACs após o tratamento com NaB era reduzida, sugerindo que as HDACs são envolvidas nos mecanismos observados. Até onde temos conhecimento, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que o NaB durante o estresse pode prevenir seus efeitos tardios na memória aversiva avaliada no MCC, indicando que os efeitos modulados por essa droga no estresse podem ser responsáveis pelas alterações observadas. Desta forma, sugere-se que mecanismos envolvendo a atividade de HDACs durante a exposição ao estresse podem ser necessários para o desenvolvimento de suas consequências. Entretanto outros mecanismos do NaB, discutidos a seguir, devem ser considerados.

A hipótese inicial do presente estudo era que a inibição das HDACs, particularmente da HDAC2, que se encontra hiperexpressa e com atividade aumentada após a exposição a estressores (LOMAZZO et al., 2017), regularia os níveis de acetilação de histonas, e com isso aumentaria a expressão de genes importantes para o enfrentamento ao estresse, diminuindo dessa forma, suas consequências. Já foi demonstrado, por exemplo, que a exposição de animais a um estressor reduz a expressão de BDNF e da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc fosforilada (pCREB) no hipocampo e que o tratamento com NaB restaura a expressão destas proteínas a níveis normais (HAN et al., 2014). O fato de o tratamento com NaB em animais não estressados não ter efeito a longo prazo no MCC no presente trabalho corrobora a hipótese de seu efeito ser dependente do estresse. Entretanto, não se observou diferenças induzidas pelo EDSR na expressão de HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 na fração nuclear do CPF desses animais cerca de uma semana após o estresse. Dessa forma, a diferença esperada na expressão de HDACs pode estar acontecendo de forma pontual durante o estresse, o que ainda não avaliamos, tendo efeitos a longo prazo na expressão gênica e proteica, sem manutenção da alteração nas HDACs. Ainda, como vários testes comportamentais foram realizados antes da eutanásia, isso pode ter interferido. Outra possibilidade é que esta diferença pode estar acontecendo em outras áreas encefálicas relacionadas

ao comportamento defensivo, como no hipocampo e na amígdala, por exemplo, que também participam do processo de formação tanto da memória do condicionamento, como de extinção. Ainda, mesmo no CPF estes mecanismos podem estar envolvidos de formas distintas em sub-regiões, pois existem evidências de que as porções PL e IL podem ter papéis diferenciais na extinção da memória de medo (SIERRA-MERCADO et al., 2011; VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). Dessa forma, a análise do CPF como um todo é uma limitação para a identificação de diferenças significativas.

No entanto, é importante ressaltar que ao contrário do inicialmente esperado, observou-se que houve correlação negativa entre os níveis de HDAC2 na fração nuclear e os níveis de congelamento no final da sessão de aquisição da extinção, tanto em animais tratados com NaB quanto com veículo. Esta correlação negativa também foi observada na fração citoplasmática em animais tratados com a droga. Apesar de essa expressão e atividade logo após o término do estresse não terem sido ainda avaliadas, quando esperara-se que estivesse aumentada, também é possível que os efeitos comportamentais observados não tenham um respaldo epigenético, com alteração de transcrição gênica mediada por essa HDAC, mas possa envolver alterações pós-traducionais de proteínas citoplasmáticas. As HDACs podem se localizar no citoplasma, sendo que geralmente este é considerado um processo regulatório para reduzir sua interação com histonas (SADOUL et al., 2011). Entretanto, estudos mostram que essas enzimas também podem deacetilar proteínas citoplasmáticas, alterando processos celulares fisiológicos e fisiopatológicos (PARRA, 2015; PENG et al., 2011).

Um recente estudo realizou um ensaio de acetiloma em cérebro de camundongos, revelando que muitas proteínas específicas do cérebro e de neurônios são modificadas por acetilação, como componentes do citoesqueleto, componentes sinápticos e canais iônicos (JI et al., 2022). Já foi observado, por exemplo, em neurônios de pacientes com doença de Huntington, que há um prejuízo no transporte e secreção de BDNF devido à mutação na proteína htt, que prejudica o transporte intracelular por microtúbulos. A hiperacetilação dos microtúbulos pela inibição de HDACs reverte essa deficiência (JIM et al., 2007). Em outro estudo, foi realizado acetiloma de amostra de cérebros post-mortem de indivíduos saudáveis ou com doença de Alzheimer. Foi constatado que as proteínas acetiladas foram majoritariamente encontradas no citosol (148), mas também na mitocôndria (100), núcleo (91) e membrana plasmática (58). Além disso, observaram que a acetilação de



18 proteínas mitocondriais estava reduzida e da proteína tau citoplasmática estava aumentada em pacientes com doença de Alzheimer (SUN et al., 2021). Em outro estudo, a acetilação de receptores AMPA, importantes mediadores de plasticidade sináptica e formação de memórias, foi avaliada. Foi constatado que a acetilação destes receptores aumenta sua internalização. Desta forma, camundongos KO para SIRT2, uma histona deacetilase, apresentaram níveis elevados de acetilação deste receptor, levando a prejuízo de plasticidade sináptica no hipocampo e déficits na expressão de memória de MCC (WANG, G. et al., 2017). Assim, níveis adequados de acetilação de proteínas são importantes para manutenção dos processos sinápticos e suas consequências, como modulação da memória. Ainda, é possível que a ativação da HDAC2 e alteração da acetilação das histonas seja importante durante o estresse para facilitar suas consequências, como proposto inicialmente, mas quando avaliada tardiamente, após o MCC, poderia ter outra função, regulando outras proteínas.

Corroborando para a argumentação de que os efeitos observados em nossos resultados podem não ser epigenéticos, observou-se aumento de HDAC3 na fração citoplasmática de animais submetidos ao EDSR. A HDAC3 é localizada tanto no núcleo como no citoplasma (YANG et al., 2002), inclusive podendo se ligar na membrana plasmática, onde ela é fosforilada pela quinase Src, aumentando sua atividade em queratinócitos (LONGWORTH et al., 2006). No citoplasma ela interage com a proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , sendo esta degradada, entre outros fatores, pela via de sinalização por TNF- $\alpha$ , deixando a HDAC3 em sua forma livre (VIATOUR et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que as HDAC1 e HDAC3 deacetilam p65 (CHEN et al., 2001), um dos dois componentes do NF- $\kappa$ B. A deacetilação de p65 promove a ligação de p65 com o I $\kappa$ B $\alpha$  e conseqüentemente sua manutenção no citoplasma em sua forma inativa (GREENE et al., 2004), levando à redução da transcrição de diversos fatores pró-inflamatórios. Entretanto a relação entre HDAC3 e a via do NF- $\kappa$ B parece ser mais complexa. Foi observado, por exemplo, que a inibição farmacológica desta enzima em camundongos APP/PS1, um modelo genético de doença de Alzheimer, reduziu os níveis de fosforilação de NF- $\kappa$ B no córtex destes animais, além de aumentar os níveis de pCREB, BDNF e TrkB nestas amostras (WANG, C. et al., 2023). Além disso, estudos com inibidores de HDACs têm resultados conflitantes, mostrando tanto aumento, quanto redução da transcrição dependente de NF- $\kappa$ B de citocinas pró-inflamatórias (SPANGE et al., 2009). Desta forma, pode-se sugerir que mecanismos inflamatórios relacionados ao NF- $\kappa$ B e sua regulação por HDAC3 podem estar

implicados nos resultados comportamentais do presente trabalho, porém componentes desta via ainda não foram avaliados.

Em relação ao sistema endocanabinoide, era esperado que, assim como em trabalhos anteriores (MORENA et al., 2016), o estresse repetido pudesse alterar a expressão de CB<sub>1</sub> e TRPV1 em regiões encefálicas importantes para o enfrentamento ao estresse, consequentemente influenciando nos déficits comportamentais observados. Entretanto, não foi observado alteração na expressão proteica de CB<sub>1</sub> e TRPV1 no CPF, e sim de CB<sub>2</sub>. Importante ressaltar que a expressão foi avaliada após o MCC e, portanto, é possível que após o estresse haja aumento de CB<sub>1</sub> e TRPV1 e, portanto, a influência destes receptores nos resultados não deve ser descartada. Em trabalho prévio do grupo, foi demonstrado que na manhã seguinte ao término do estresse houve aumento do mRNA de CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, mas TRPV1 não foi avaliado, em células Cd11b<sup>+</sup> (macrófagos e micróglia) do encéfalo dos animais estressados (LISBOA et al., 2018), o que indica que este sistema é alterado pelo estresse e sugere um papel importante para as micróglia.

Em relação ao TRPV1, apesar da ausência de alteração na sua expressão no presente trabalho, observou-se correlação negativa entre a expressão de TRPV1 no núcleo e os níveis de congelamento no final da sessão de aquisição da extinção em animais tratados com veículo. Em animais tratados com o NaB, esta correlação passa a ser positiva. Desta forma, pode-se sugerir um papel complexo deste receptor na modulação destas respostas. Além do papel de TRPV1 a partir de sua localização na membrana celular regulando o influxo de Ca<sup>2+</sup> e, consequentemente neurotransmissão e vias intracelulares (GAMBINO et al., 2020), estes receptores podem regular a transcrição gênica relacionada à inflamação ao ativarem fatores como NF-κB e CREB, por exemplo (THIEL et al., 2018). Já foi demonstrado a presença de receptores TRPV1 no núcleo celular em amostras de córtex de pacientes com displasia cortical focal do tipo 2 (SHU et al., 2013), uma das causas de epilepsia, entretanto sua função no núcleo ainda não foi avaliada. Ainda, existem evidências de sua localização perinuclear, no retículo endoplasmático (RE) (HAUSTRATE et al., 2020; ÖZ et al., 2022), importante para regulação dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. Apesar do processo de extração nuclear ser considerado específico, existe possibilidade de contaminação de até 10%, de acordo com o fabricante do kit. O próprio NaB pode também atuar no RE e regular os níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular (LIU et al., 2018; ZHANG et al., 2016). Além disso, já foi observado que a sinalização por Ca<sup>2+</sup>

no núcleo também é um importante regulador de transcrição de genes importantes para neurotransmissão e formação de memória, como por exemplo o BDNF (ZHANG et al., 2009). Assim, pode-se sugerir que a correlação observada poderia ter relação com o controle dos níveis de  $Ca^{+2}$  no núcleo e regulação da transcrição gênica.

Já em relação aos receptores  $CB_2$ , observou-se que o EDSR aumentou a expressão destes após a evocação da memória de extinção na fração citoplasmática, efeito este bloqueado pelo tratamento com NaB. O papel dos receptores  $CB_2$  na modulação da resposta de medo ainda não é completamente compreendida. Nosso grupo previamente demonstrou aumento de  $CB_2$  em células  $Cd11b+$  (microglia/macrófagos) do encéfalo de camundongos submetidos ao EDSR, o que foi atenuado por um agonista não seletivo de receptores canabinoides (LISBOA et al., 2018). Um aumento da expressão de  $CB_2$  em células microgliais também foi observado na amígdala basolateral em um modelo de déficit de extinção induzido por Orexina-A. Neste modelo, a administração intra-amigdalar do agonista inverso/antagonista  $CB_2$ , AM630, após cada sessão de extinção (sendo 5 no total), bloqueou o déficit de extinção do medo condicionado contextual observado (TEN-BLANCO et al., 2022), o que poderia sugerir que os receptores  $CB_2$  prejudicam a consolidação da extinção. Entretanto, apesar de outro estudo demonstrar que camundongos KO para  $CB_2$  apresentam expressão do medo condicionado contextual prejudicada (mas não no medo condicionado a pista), o que poderia indicar sua função também no processo de condicionamento, a administração do AM630 em animais *Wild Type* não teve efeito em nenhum tipo de memória avaliada (LI et al., 2016). Importante ressaltar que neste estudo não houve indução de déficit de extinção, o que pode justificar as diferenças.

Em outro teste envolvendo memória aversiva, o teste de esQUIVA inibitória, foi constatado que o AM630 reduz, enquanto o JWH133, um agonista, aumenta o comportamento de medo (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2013). Entretanto, em ratos expostos ao estresse de exposição ao predador, houve aumento da expressão de  $CB_2$  no CPF, e o tratamento com JWH133 reduziu o comportamento do tipo-ansioso avaliado no teste de labirinto em cruz elevado induzido por este estresse (IVY et al., 2020), desta forma o papel de receptores  $CB_2$  no medo inato ou condicionado parece ser distinto. Recentemente, nosso grupo observou que a administração tanto do JWH133 quanto do AM630 antes da sessão de aquisição de extinção do MCC, facilitaram, ainda que de forma sutil, esse processo (WERWORN et al., 2022). Desta

forma, o papel de receptores CB<sub>2</sub> na modulação de memórias aversivas, particularmente no CPF, ainda é pouco explorado e os trabalhos existentes apresentam resultados conflitantes.

O receptor CB<sub>2</sub> é expresso não só em neurônios, mas também na micróglia (MORCUENDE et al., 2022), e nestas células o CB<sub>2</sub> é responsável por contrapor os efeitos da neuroinflamação. Já foi demonstrado, por exemplo, que em um modelo de hipóxia em cultura de micróglia, a administração de um agonista CB<sub>2</sub> inibiu a liberação de citocinas pró-inflamatórias, de espécies reativas de oxigênio e a ativação de NF-κB (GUO et al., 2014). Além disso, já foi demonstrado in vivo em modelo de comportamentos do tipo-depressivo induzidos por LPS que o tratamento com agonista de receptores CB<sub>2</sub> tanto agudo, como crônico, bloqueou a expressão aumentada de TNFα, e de comportamentos do tipo-depressivo (SAHU et al., 2019). Em um modelo de dor crônica, o aumento da expressão de HDAC1, liberação de IL-10 e redução de expressão de IκB na micróglia de medula espinhal, indicativo de ativação da via do NF-κB, não foram observados quando os animais foram tratados com um agonista CB<sub>2</sub>. Desta forma, sugere-se que a atividade de HDAC1 pode ter influência na função anti-inflamatória de CB<sub>2</sub> (BORGONETTI et al., 2023). Assim, os efeitos de CB<sub>2</sub> podem, não necessariamente, ser decorrentes de modulação da neurotransmissão, mas por modular fatores pró-inflamatórios, que podem estar desregulados em transtornos psiquiátricos, como depressão e PTSD (DANTZER et al., 2008; KIM et al., 2020).

De forma similar aos resultados do presente estudo, foi observado no músculo de camundongos mdx, um modelo de distrofia muscular de Duchenne, aumento da expressão de receptores CB<sub>2</sub>, o que foi atenuado pelo NaB (100 mg/kg) (KALKAN et al., 2023). Neste mesmo estudo, em cultura de células de músculo esquelético estimuladas com LPS foi observado que o NaB reduz a expressão de citocinas inflamatórias e a regulação negativa de micro RNAs que interagem com o gene do receptor CB<sub>1</sub>, de forma dependente do receptor GPR109A e do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PPARγ) (KALKAN et al., 2023). Apesar de os efeitos relatados terem sido observados em músculo esquelético, mecanismos semelhantes podem estar acontecendo em estruturas encefálicas, regulando comportamentos defensivos em nossos experimentos. Curiosamente, já foi observado que os camundongos mdx apresentam comportamentos do tipo-ansioso e depressivo e déficits de memória, além de aumento de citocinas pró-inflamatórias e redução de BDNF no cérebro (COMIM et al., 2019), mas o envolvimento de CB<sub>2</sub> ou o efeito do

NaB não foram avaliados nesses parâmetros.

Como citado anteriormente, os *SCFA* podem exercer efeitos via interação direta com GPCRs, alteração da microbiota e modulação de fatores imunológicos, podendo ter influências diretas no comportamento e em transtornos psiquiátricos (DALILE et al., 2019). Já foi relatado tanto aumento (WANG et al., 2012) quanto redução (ADAMS et al., 2011) de *SCFA* no conteúdo fecal de crianças do espectro autista, além de níveis reduzidos em pacientes com depressão (SKONIECZNA-ŻYDECKA et al., 2018; SZCZESNIAK et al., 2016). Portanto, além dos efeitos do EDSR, os efeitos do NaB observados nesse estudo podem também não ser epigenéticos e sim relacionados a estes outros mecanismos.

Como citado acima, os PPARs podem mediar efeitos anti-inflamatórios do NaB (KALKAN et al., 2023). Estes receptores são responsáveis majoritariamente pelo metabolismo lipídico e glicose no cérebro, mas também estão associados ao crescimento, diferenciação, maturação e sobrevivência das células neuronais (LIM et al., 2021). O NaB induziu analgesia mecânica e térmica em um modelo de dor crônica, sendo que este efeito foi atenuado em camundongo KO para PPAR $\gamma$  ou quando o NaB foi administrado em conjunto com um antagonista deste receptor. Além disso, o tratamento com NaB aumentou a expressão de PPAR $\gamma$  e reduziu a expressão de componentes pró-inflamatórios (RUSSO et al., 2016). Em um modelo de dieta hipercalórica, foi observado redução de PPAR $\gamma$ , pCREB e BDNF no córtex cerebral e o tratamento com NaB restaurou os níveis de pCREB via ativação de PPAR $\gamma$ . Neste estudo, o NaB também reduziu os níveis elevados de componentes pró-inflamatórios induzidos pelo modelo (BAYAZID et al., 2022). Curiosamente, tanto a AEA, quanto o 2-AG ativam o PPAR $\gamma$ , mediando o efeito anti-inflamatório dos eCBs (IANNOTTI et al., 2021).

Outro receptor que pode mediar efeitos anti-inflamatórios do NaB, como mencionado anteriormente, é o GPR109A (KALKAN et al., 2023). O receptor GPR109A foi inicialmente descrito como um receptor do ácido nicotínico. Posteriormente foi constatado que o NaB é um de seus agonistas, e que sua ativação é importante, por exemplo, para a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica, por mecanismos ainda desconhecidos (FOCK et al., 2023). Em modelo in vitro de síndrome de Alzheimer, em que cultura de neurônios são expostas ao peptídeo de A $\beta$ , foi observado que o NaB preservou a viabilidade celular, reduzindo a liberação de espécies reativas de oxigênio. Na mesma linhagem celular, porém sem

tratamento com A $\beta$ , o NaB reduziu a expressão da proteína precursora amiloide (APP) e aumentou a expressão de BDNF. Todos estes efeitos deixaram de acontecer quando o NaB foi administração em conjunto com um antagonista de GPR109A, demonstrando que seus efeitos protetivos aconteceram via ativação deste receptor (SUN et al., 2020). Além disso, em um modelo de exposição crônica (6 semanas) ao álcool etílico em camundongos fêmeas, o álcool induziu déficit de memórias, efeito do tipo-ansioso e tipo-depressivo, neuroinflamação no hipocampo e CPF, redução do tamanho do cérebro, além de redução de GPR109A e PPAR $\gamma$  nestas regiões. Além de o NaB impedir todos os efeitos comportamentais, restaurou as expressões de GPR109A e PPAR $\gamma$  (WEI et al., 2022). Desta forma, visto a interação entre a expressão de receptores CB $_{1/2}$  com a atividade de receptores GPR109A e PPAR $\gamma$ , pode-se sugerir que o efeito do NaB em atenuar o déficit de extinção do MCC induzida pelo EDSR, pode envolver a ativação destes receptores modulando a expressão de CB $_2$  e de componentes pró-inflamatórios.

Apesar de alguns mecanismos descritos para o NaB que não envolvem HDACs, como discutido, não descartamos seus efeitos inibitórios nestas enzimas. Observou-se, por exemplo, que os níveis citoplasmáticos de HDAC3 se correlacionam positivamente com níveis de CB $_1$ , FAAH e, principalmente de CB $_2$ , sendo que os animais estressados apresentam os maiores níveis de expressão destas proteínas. Já após o tratamento com NaB, estas correlações deixam de ser observadas. Desta forma, pode-se sugerir que mecanismos de (de)acetilação no citoplasma influenciam a expressão de componentes do sistema eCB, sendo esta afetada tanto pelo EDSR, como pelo tratamento com NaB. Ainda, observou-se que os níveis de HDAC3 no núcleo se correlacionam negativamente com os níveis de NAPE-PLD no citoplasma apenas em animais tratados com NaB. Entretanto, essa correlação foi observada principalmente nos animais naives, o que sugere que efeitos epigenéticos podem ocorrer, mas neste caso não seria relacionado ao efeito do estresse.

Também foi observado efeito do NaB em reduzir a expressão de HDAC1 de forma independente do EDSR. A maior parte dos estudos com NaB avalia os níveis de acetilação de histonas H3 e H4 e atividade de HDACs, mas não a expressão dessas enzimas. Entretanto o presente resultado vai de acordo com outros estudos que mostraram essa regulação negativa da expressão de HDAC1 pelo NaB em outros tecidos, como no fígado (SUN et al., 2019) e em músculo esquelético (HONG et al., 2016), além de cultura de carcinoma (YUE et al., 2022) e de fibroblastos (MOHANA

KUMAR et al., 2007), por exemplo. Desta forma, o presente trabalho traz mais uma evidência de que o NaB não só inibe HDACs, como também pode reduzir a expressão de HDAC1, impactando os níveis de acetilação em proteínas celulares. Entretanto, o efeito observado foi na fração citoplasmática e não na nuclear (não especificado nos outros estudos) e, dessa forma, pode não impactar a acetilação de histonas, mas sim a acetilação de proteínas relacionadas a outros processos celulares, como mencionado anteriormente.

No presente trabalho, foi observada a expressão de receptores CB<sub>2</sub> nas frações nuclear e citoplasmática. A expressão nuclear de CB<sub>2</sub> poucas vezes foi relatada (ASSIMAKOPOULOU et al., 2017; BAEK et al., 2008; GRIMSEY et al., 2011). Nosso estudo, não só identifica este receptor na fração nuclear, como indica que sua expressão é maior nesta região. Já foi descrito que GPCRs podem estar localizados na membrana nuclear, exercendo diferentes funções, fisiológicas e fisiopatológicas, inclusive no SNC (GONÇALVES-MONTEIRO et al., 2021). Já foi relatado que a localização celular de CB<sub>2</sub> é distinta dependendo da região encefálica analisada (BRUSCO et al., 2008). Um estudo observou em cultura de neurônios de CPFm que o receptor CB<sub>2</sub> é muito mais expresso intracelularmente do que na membrana celular, entretanto não foi avaliado em qual porção intracelular ele se localizava (DEN BOON et al., 2012). Em um estudo em cultura de células epiteliais constatou-se que o efeito da administração de agonistas e antagonistas CB<sub>2</sub> foi maior quando estas drogas foram administradas de forma intracelular (BRAILOIU et al., 2014). Neste estudo, foi observado que tanto na porção intra, como extracelular, CB<sub>2</sub> se associa à proteína Gq, aumentando o influxo de Ca<sup>2+</sup>. Entretanto já foi constatado que receptores CB<sub>2</sub> são associados a proteína Gi no SNC (HOWLETT et al., 2002; HOWLETT et al., 1986; PACHECO et al., 1993). Desta forma, o receptor CB<sub>2</sub> media diferentes mecanismos dependendo de sua localização, sendo que aparentemente seus efeitos intracelulares são predominantes. Sugerimos, portanto, que efeitos de CB<sub>2</sub> intracelular observados no nosso e em outros estudos podem ser, na verdade, efeitos nucleares. Apesar disso, diversos problemas relacionados à falta de especificidade de anticorpos anti-CB<sub>2</sub> são relatados (ONAVI et al., 2011). Desta forma, novos experimentos utilizando diferentes técnicas devem ser realizados para confirmação deste resultado.

Estudos mostram que a resposta a estressores pode ser muito variada entre os animais e, desta forma, a separação dos animais em resilientes e susceptíveis para uma análise mais detalhada dos mecanismos subjacentes à resposta ao estresse se

faz necessária (ARDI et al., 2016; FRANKLIN et al., 2012; GUILLOUX et al., 2011; RICHTER-LEVIN et al., 2021). Diversos estudos utilizam a pontuação por Z-Score para uma análise integrada de comportamentos (EDGAR et al., 2011; MEKIRI et al., 2017; SHEPARD et al., 2016; SOUMIER et al., 2014). Dessa forma, no presente trabalho foi realizada análise por Z-Score e avaliação da proporção de animais que apresentaram emocionalidade afetada ou não. Como esperado, o ESDR induziu aumento da emocionalidade, que foi também observado no aumento da proporção de animais com emocionalidade afetada. Estes efeitos foram atenuados pelo tratamento com NaB. O tratamento não teve efeito na média de emocionalidade, nem na proporção de animais afetados não estressados. Desta forma, o presente estudo demonstrou que o NaB tem efeito protetor contra o estresse na emocionalidade geral e não só em comportamentos específicos, como outros estudos demonstram. Inicialmente, existia a proposta de fazer uma análise molecular diferencial entre animais afetados e não afetados pelo estresse, para identificação de possíveis marcadores de resiliência, entretanto como o ESDR induziu emocionalidade afetada em 90% dos animais, essa avaliação não foi possível.



---

---

**CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

No presente estudo, apesar dos efeitos comportamentais notáveis após o tratamento com NaB em animais estressados, os efeitos moleculares observados no CPF após a avaliação do MCC podem não envolver mecanismos epigenéticos, pois não houve alteração na expressão nuclear de HDACs após o EDSR ou tratamento com NaB. Entretanto, como até o momento a avaliação molecular foi feita apenas ao final do protocolo experimental, não se pode descartar que, como proposto inicialmente, mecanismos epigenéticos durante e logo após o estresse sejam responsáveis pelas consequências observadas tardiamente. Como o EDSR induziu aumento de HDAC3 e CB<sub>2</sub> na fração citoplasmática, e o NaB reduziu a expressão de HDAC1 (independente do EDSR) e de CB<sub>2</sub> (dependente do EDSR) também no citoplasma, uma sugestão é que o estresse altere a acetilação de proteínas citoplasmáticas via HDACs citoplasmáticas, e que o efeito do tratamento com NaB resulte da inibição destas HDACs por vias não epigenéticas. Estes efeitos poderiam ser decorrentes da alteração de processos celulares via ativação de GPCRs, modulação de fatores imunológicos e alteração da microbiota. É importante ressaltar que os níveis proteicos foram avaliados apenas no córtex pré-frontal e após a realização da evocação da memória de extinção, então não é possível excluir a participação destes mecanismos em outras estruturas ou em sub-regiões do CPF, ou mesmo em diferentes momentos da memória aversiva.

**Tabela 10:** Resumo dos achados do presente trabalho.

<b>Avaliação</b>	<b>Efeito do EDSR</b>	<b>Efeito do NaB</b>
TCA	Hipolocomoção	EDSR: Hipolocomoção (25 e 50 mg/Kg)
		Naïves: Ansiolítico (50 mg/Kg)
TES	Aumento do tempo nos corners	Atenua o efeito do EDSR (50 mg/Kg)
MCC	Ansiogênico	Atenua os efeitos do EDSR (50 mg/Kg)
	Déficit de extinção	
Z-Score	Aumento da emocionalidade geral	Atenua os efeitos do EDSR (50 mg/Kg)
	Aumenta proporção de animais afetados	
WB do CPF	Aumenta HDAC3 e CB <sub>2</sub> no citoplasma	Atenua o aumento de CB <sub>2</sub> no citoplasma (50 mg/Kg)
		Reduz HDAC1 no citoplasma (50 mg/Kg)

---

---

## ***REFERÊNCIAS***

## 8. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. B.; JOHANSEN, L. J.; POWELL, L. D.; QUIG, D. *et al.* Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. **BMC Gastroenterol**, 11, p. 22, Mar 16 2011.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5th ed. Washington DC: 2013.

AMSTADTER, A. B.; NUGENT, N. R.; KOENEN, K. C. Genetics of PTSD: Fear Conditioning as a Model for Future Research. **Psychiatr Ann**, 39, n. 6, p. 358-367, Jun 1 2009.

ARDI, Z.; ALBRECHT, A.; RICHTER-LEVIN, A.; SAHA, R. *et al.* Behavioral profiling as a translational approach in an animal model of posttraumatic stress disorder. **Neurobiol Dis**, 88, p. 139-147, Apr 2016.

ARNSTEN, A. F. T. Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. **Nature Neuroscience**, 18, n. 10, p. 1376-1385, 2015/10/01 2015.

ASO, E.; OZAITA, A.; SERRA, M.-À.; MALDONADO, R. Genes differentially expressed in CB1 knockout mice: Involvement in the depressive-like phenotype. **European Neuropsychopharmacology**, 21, n. 1, p. 11-22, 2011/01/01/ 2011.

ASO, E.; OZAITA, A.; VALDIZÁN, E. M.; LEDENT, C. *et al.* BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. **Journal of Neurochemistry**, 105, n. 2, p. 565-572, 2008/04/01 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05149.x>.

ASSIMAKOPOULOU, M.; PAGOULATOS, D.; NTERMA, P.; PHARMAKAKIS, N. Immunolocalization of cannabinoid receptor type 1 and CB2 cannabinoid receptors, and transient receptor potential vanilloid channels in pterygium. **Mol Med Rep**, 16, n. 4, p. 5285-5293, Oct 2017.

AVANCI, J. Q.; SERPELONI, F.; DE OLIVEIRA, T. P.; DE ASSIS, S. G. Posttraumatic stress disorder among adolescents in Brazil: a cross-sectional study. **BMC Psychiatry**, 21, n. 1, p. 75, 2021/02/05 2021.

BAEK, J.-H.; ZHENG, Y.; DARLINGTON, C. L.; SMITH, P. F. Cannabinoid CB2 receptor expression in the rat brainstem cochlear and vestibular nuclei. **Acta Oto-Laryngologica**, 128, n. 9, p. 961-967, 2008/01/01 2008.

BAM, M.; YANG, X.; ZHOU, J.; GINSBERG, J. P. *et al.* Evidence for Epigenetic Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines, Interleukin-12 and Interferon Gamma, in Peripheral Blood Mononuclear Cells from PTSD Patients. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, 11, n. 1, p. 168-181, 2016/03/01 2016.

BANASR, M.; DWYER, J. M.; DUMAN, R. S. Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. **Current Opinion in Cell Biology**, 23, n. 6, p.

730-737, 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**, 3, p. 2470547019864096, 2019/01/01 2019.

BAYAZID, A. B.; KIM, J. G.; AZAM, S.; JEONG, S. A. *et al.* Sodium butyrate ameliorates neurotoxicity and exerts anti-inflammatory effects in high fat diet-fed mice. **Food and Chemical Toxicology**, 159, p. 112743, 2022/01/01/ 2022.

BENTON, C. B.; FISKUS, W.; BHALLA, K. N. Targeting Histone Acetylation: Readers and Writers in Leukemia and Cancer. **The Cancer Journal**, 23, n. 5, 2017.

BERTON, O.; MCCLUNG, C. A.; DILEONE, R. J.; KRISHNAN, V. *et al.* Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science**, 311, n. 5762, p. 864-868, Feb 10 2006.

BLÁZQUEZ, C.; CHIARLONE, A.; BELLOCCHIO, L.; RESEL, E. *et al.* The CB1 cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. **Cell Death & Differentiation**, 22, n. 10, p. 1618-1629, 2015/10/01 2015.

BLOUIN, A. M.; SILLIVAN, S. E.; JOSEPH, N. F.; MILLER, C. A. The potential of epigenetics in stress-enhanced fear learning models of PTSD. **Learn Mem**, 23, n. 10, p. 576-586, Oct 2016.

BONNE, O.; GRILLON, C.; VYTHILINGAM, M.; NEUMEISTER, A. *et al.* Adaptive and maladaptive psychobiological responses to severe psychological stress: implications for the discovery of novel pharmacotherapy. **Neurosci Biobehav Rev**, 28, n. 1, p. 65-94, Mar 2004.

BORGONETTI, V.; MUGNAINI, C.; CORELLI, F.; GALEOTTI, N. The Selective CB2 Agonist COR167 Reduced Symptoms in a Mice Model of Trauma-Induced Peripheral Neuropathy through HDAC-1 Inhibition. **Biomedicines**, v.11, n. 6, DOI: 10.3390/biomedicines11061546.

BOWERS, M. E.; RESSLER, K. J. An Overview of Translationally Informed Treatments for Posttraumatic Stress Disorder: Animal Models of Pavlovian Fear Conditioning to Human Clinical Trials. **Biol Psychiatry**, 78, n. 5, p. E15-27, Sep 1 2015.

BRAILOIU, G. C.; DELIU, E.; MARCU, J.; HOFFMAN, N. E. *et al.* Differential Activation of Intracellular versus Plasmalemmal CB2 Cannabinoid Receptors. **Biochemistry**, 53, n. 30, p. 4990-4999, 2014/08/05 2014.

BREMNER, J. D.; RANDALL, P.; SCOTT, T. M.; BRONEN, R. A. *et al.* MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **Am J Psychiatry**, 152, n. 7, p. 973-981, Jul 1995.

BRETON, C. V.; MARUTANI, A. N. Air Pollution and Epigenetics: Recent Findings. **Current Environmental Health Reports**, 1, n. 1, p. 35-45, 2014/03/01 2014.

BRUSCO, A.; TAGLIAFERRO, P. A.; SAEZ, T.; ONAIVI, E. S. Ultrastructural Localization of Neuronal Brain CB2 Cannabinoid Receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1139, n. 1, p. 450-457, 2008/10/01 2008.

CARRIVE, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. **Brain Research**, 858, n. 2, p. 440-445, 2000/03/10/ 2000.

CHEN, L.-f.; FISCHLE, W.; VERDIN, E.; GREENE, W. C. Duration of Nuclear NF- $\kappa$ B Action Regulated by Reversible Acetylation. **Science**, 293, n. 5535, p. 1653-1657, 2001/08/31 2001.

CHRISTENSEN, R.; KRISTENSEN, P. K.; BARTELS, E. M.; BLIDDAL, H. *et al.* Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. **The Lancet**, 370, n. 9600, p. 1706-1713, 2007/11/17/ 2007.

COELHO, A. A.; BASTOS, S. L.; GOBIRA, P. H.; LISBOA, S. F. Endocannabinoid signalling and epigenetics modifications in the neurobiology of stress-related disorders. **Neuronal Signaling**, p. NS20220034, 2023.

COELHO, A. A.; VILA-VERDE, C.; SARTIM, A. G.; ULIANA, D. L. *et al.* Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition in the Medial Prefrontal Cortex Attenuates the Anxiogenic-Like Effect of Acute Restraint Stress via CB1 Receptors. 13, 2022-July-14 2022. Original Research.

COMIM, C. M.; VENTURA, L.; FREIBERGER, V.; DIAS, P. *et al.* Neurocognitive Impairment in mdx Mice. **Molecular Neurobiology**, 56, n. 11, p. 7608-7616, 2019/11/01 2019.

CRISTIANO, C.; CUOZZO, M.; CORETTI, L.; LIGUORI, F. M. *et al.* Oral sodium butyrate supplementation ameliorates paclitaxel-induced behavioral and intestinal dysfunction. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 153, p. 113528, 2022/09/01/ 2022.

CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, 16, n. 1, p. 9-29, 2020/01/01 2020.

DALILE, B.; VAN OUDENHOVE, L.; VERVLIET, B.; VERBEKE, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 16, n. 8, p. 461-478, 2019/08/01 2019.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J. C.; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W. *et al.* From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci**, 9, n. 1, p. 46-56, Jan 2008.

DEN BOON, F. S.; CHAMEAU, P.; SCHAAFSMA-ZHAO, Q.; VAN AKEN, W. *et al.* Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109, n. 9, p. 3534-3539, 2012/02/28 2012.

DI GIORGIO, E.; BRANCOLINI, C. Regulation of class IIa HDAC activities: it is not only matter of subcellular localization. **Epigenomics**, 8, n. 2, p. 251-269, 2016/02/01 2016.

DOMSCHKE, K.; DANNLOWSKI, U.; OHRMANN, P.; LAWFFORD, B. *et al.* Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in Major Depression. **European Neuropsychopharmacology**, 18, n. 10, p. 751-759, 2008/10/01/ 2008.

DYKMAN, R. A.; ACKERMAN, P. T.; NEWTON, J. E. Posttraumatic stress disorder: a sensitization reaction. **Integr Physiol Behav Sci**, 32, n. 1, p. 9-18, Jan-Mar 1997.

EDGAR, N. M.; TOUMA, C.; PALME, R.; SIBILLE, E. Resilient emotionality and molecular compensation in mice lacking the oligodendrocyte-specific gene *Cnp1*. **Translational Psychiatry**, 1, n. 9, p. e42-e42, 2011/09/01 2011.

EDIRIWEERA, M. K. Fatty acids as histone deacetylase inhibitors: Old biochemistry tales in a new life sciences town. **Drug Discovery Today**, 28, n. 5, p. 103569, 2023/05/01/ 2023.

FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature Reviews Genetics**, 13, n. 2, p. 97-109, 2012/02/01 2012.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev**, 23, n. 5, p. 743-760, May 1999.

FERREIRA, S. G.; TEIXEIRA, F. M.; GARÇÃO, P.; AGOSTINHO, P. *et al.* Presynaptic CB1 cannabinoid receptors control frontocortical serotonin and glutamate release – Species differences. **Neurochemistry International**, 61, n. 2, p. 219-226, 2012/07/01/ 2012.

FILIPOVIC, B. R.; DJUROVIC, B.; MARINKOVIC, S.; STIJAK, L. *et al.* Volume changes of corpus striatum, thalamus, hippocampus and lateral ventricles in posttraumatic stress disorder (PTSD) patients suffering from headaches and without therapy. **Cent Eur Neurosurg**, 72, n. 3, p. 133-137, Aug 2011.

FOCK, E.; PARNOVA, R. Mechanisms of Blood–Brain Barrier Protection by Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids. **Cells**, v.12, n. 4, DOI: 10.3390/cells12040657.

FRANKLIN, T. B.; SAAB, B. J.; MANSUY, I. M. Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. **Neuron**, 75, n. 5, p. 747-761, Sep 6 2012.

FRIEDMAN, M. J.; BERNARDY, N. C. Considering future pharmacotherapy for PTSD. **Neuroscience Letters**, 649, p. 181-185, 2017/05/10/ 2017.

FRIEDMAN, N. P.; ROBBINS, T. W. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. **Neuropsychopharmacology**, 47, n. 1, p. 72-89, 2022.

GABBOTT, P. L. A.; WARNER, T. A.; JAYS, P. R. L.; SALWAY, P. *et al.* Prefrontal

cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **The Journal of Comparative Neurology**, 492, n. 2, p. 145-177, 2005.

GADEK-MICHALSKA, A.; TADEUSZ, J.; RACHWALSKA, P.; BUGAJSKI, J. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, 65, n. 6, p. 1655-1662, 2013/11/01/ 2013.

GAMBINO, G.; RIZZO, V.; GIGLIA, G.; FERRARO, G. *et al.* Cannabinoids, TRPV and nitric oxide: the three ring circus of neuronal excitability. **Brain Structure and Function**, 225, n. 1, p. 1-15, 2020/01/01 2020.

GANON-ELAZAR, E.; AKIRAV, I. Cannabinoids and traumatic stress modulation of contextual fear extinction and GR expression in the amygdala-hippocampal-prefrontal circuit. **Psychoneuroendocrinology**, 38, n. 9, p. 1675-1687, 2013/09/01/ 2013.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; GARCÍA-BUENO, B.; ZOPPI, S.; LEZA, J. C. *et al.* Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors. **Br J Pharmacol**, 165, n. 4, p. 951-964, Feb 2012.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; MANZANARES, J. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. **Journal of Psychopharmacology**, 25, n. 1, p. 111-120, 2011/01/01 2010.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; ORTEGA-ÁLVARO, A.; BUSQUETS-GARCÍA, A.; PÉREZ-ORTIZ, J. M. *et al.* Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. **Neuropharmacology**, 73, p. 388-396, 2013/10/01/ 2013.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; PÉREZ-ORTIZ, J. M.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MANZANARES, J. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. **Br J Pharmacol**, 160, n. 7, p. 1773-1784, Aug 2010.

GERDEMAN, G.; LOVINGER, D. M. CB1 Cannabinoid Receptor Inhibits Synaptic Release of Glutamate in Rat Dorsolateral Striatum. **Journal of Neurophysiology**, 85, n. 1, p. 468-471, 2001/01/01 2001.

GILBOA, D.; FRIEDMAN, M.; TSUR, H. The Burn as a Continuous Traumatic Stress: Implications for Emotional Treatment During Hospitalization. **The Journal of Burn Care & Rehabilitation**, 15, n. 1, p. 86-94, 1994.

GOBIRA, P. H.; LIMA, I. V.; BATISTA, L. A.; DE OLIVEIRA, A. C. *et al.* N-arachidonoyl-serotonin, a dual FAAH and TRPV1 blocker, inhibits the retrieval of contextual fear memory: Role of the cannabinoid CB1 receptor in the dorsal hippocampus. **Journal of Psychopharmacology**, 31, n. 6, p. 750-756, 2017/06/01 2017.

GONÇALVES-MONTEIRO, S.; RIBEIRO-OLIVEIRA, R.; VIEIRA-ROCHA, M. S.; VOJTEK, M. *et al.* Insights into Nuclear G-Protein-Coupled Receptors as Therapeutic Targets in Non-Communicable Diseases. **Pharmaceuticals (Basel)**, 14, n. 5, May 7



2021.

GONDA, X.; PETSCHNER, P.; ESZLARI, N.; SUTORI, S. *et al.* Effects of Different Stressors Are Modulated by Different Neurobiological Systems: The Role of GABA-A Versus CB1 Receptor Gene Variants in Anxiety and Depression. 13, 2019-April-09 2019. Original Research.

GREENE, W. C.; CHEN, L.-F. Regulation of NF- $\kappa$ B Action by Reversible Acetylation. *In: Reversible Protein Acetylation*, 2004. p. 208-222. (Novartis Foundation Symposia).

GRIMSEY, N. L.; GOODFELLOW, C. E.; DRAGUNOW, M.; GLASS, M. Cannabinoid receptor 2 undergoes Rab5-mediated internalization and recycles via a Rab11-dependent pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, 1813, n. 8, p. 1554-1560, 2011/08/01/ 2011.

GUILLOUX, J.-P.; SENEY, M.; EDGAR, N.; SIBILLE, E. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: Relevance to emotionality and sex. **Journal of Neuroscience Methods**, 197, n. 1, p. 21-31, 2011/04/15/ 2011.

GUNDERSEN, B. B.; BLENDY, J. A. Effects of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in models of depression and anxiety. **Neuropharmacology**, 57, n. 1, p. 67-74, Jul 2009.

GUO, K.; MOU, X.; HUANG, J.; XIONG, N. *et al.* Trans-Caryophyllene Suppresses Hypoxia-Induced Neuroinflammatory Responses by Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation in Microglia. **Journal of Molecular Neuroscience**, 54, n. 1, p. 41-48, 2014/09/01 2014.

HALLER, J.; BAKOS, N.; SZIRMAY, M.; LEDENT, C. *et al.* The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. **European Journal of Neuroscience**, 16, n. 7, p. 1395-1398, 2002/10/01 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02192.x>.

HAMMELS, C.; PISHVA, E.; DE VRY, J.; VAN DEN HOVE, D. L. *et al.* Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. **Neurosci Biobehav Rev**, 59, p. 111-140, Dec 2015.

HAN, A.; SUNG, Y.-B.; CHUNG, S.-Y.; KWON, M.-S. Possible additional antidepressant-like mechanism of sodium butyrate: Targeting the hippocampus. **Neuropharmacology**, 81, p. 292-302, 2014/06/01/ 2014.

HANDEL, A. E.; EBERS, G. C.; RAMAGOPALAN, S. V. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. **Trends Mol Med**, 16, n. 1, p. 7-16, Jan 2010.

HAUSTRATE, A.; PREVARSKAYA, N.; LEHEN'KYI, V. y. Role of the TRPV Channels in the Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. **Cells**, v.9, n. 2, DOI: 10.3390/cells9020317.

HILL, M. N.; HO, W.-S. V.; HILLARD, C. J.; GORZALKA, B. B. Differential effects of the antidepressants tranylcypromine and fluoxetine on limbic cannabinoid receptor binding and endocannabinoid contents. **Journal of Neural Transmission**, 115, n. 12, p. 1673-1679, 2008/12/01 2008.

HILL, M. N.; MCLAUGHLIN, R. J.; PAN, B.; FITZGERALD, M. L. *et al.* Recruitment of Prefrontal Cortical Endocannabinoid Signaling by Glucocorticoids Contributes to Termination of the Stress Response. **Journal of Neuroscience**, 31, n. 29, p. 10506-10515, 2011.

HILL, M. N.; MILLER, G. E.; CARRIER, E. J.; GORZALKA, B. B. *et al.* Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. **Psychoneuroendocrinology**, 34, n. 8, p. 1257-1262, 2009/09/01/ 2009.

HOBARA, T.; UCHIDA, S.; OTSUKI, K.; MATSUBARA, T. *et al.* Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. **Journal of Psychiatric Research**, 44, n. 5, p. 263-270, 2010/04/01/ 2010.

HONG, J.; JIA, Y.; PAN, S.; JIA, L. *et al.* Butyrate alleviates high fat diet-induced obesity through activation of adiponectin-mediated pathway and stimulation of mitochondrial function in the skeletal muscle of mice. **Oncotarget**, 7, n. 35, p. 56071-56082, Aug 30 2016.

HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. **Pharmacological Reviews**, 54, n. 2, p. 161, 2002.

HOWLETT, A. C.; QUALY, J. M.; KHACHATRIAN, L. L. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. **Mol Pharmacol**, 29, n. 3, p. 307-313, Mar 1986.

HULTMAN, R.; MAGUE, S. D.; LI, Q.; KATZ, B. M. *et al.* Dysregulation of Prefrontal Cortex-Mediated Slow-Evolving Limbic Dynamics Drives Stress-Induced Emotional Pathology. **Neuron**, 91, n. 2, p. 439-452, Jul 20 2016.

HUNGUND, B. L.; VINOD, K. Y.; KASSIR, S. A.; BASAVARAJAPPA, B. S. *et al.* Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPγS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. **Molecular Psychiatry**, 9, n. 2, p. 184-190, 2004.

IANNOTTI, F. A.; VITALE, R. M. The Endocannabinoid System and PPARs: Focus on Their Signalling Crosstalk, Action and Transcriptional Regulation. **Cells**, v.10, n. 3, DOI: 10.3390/cells10030586.

IVY, D.; PALESE, F.; VOZELLA, V.; FOTIO, Y. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors mediate the anxiolytic-like effects of monoacylglycerol lipase inhibition in a rat model of predator-induced fear. **Neuropsychopharmacology**, 45, n. 8, p. 1330-1338, 2020/07/01 2020.

JI, Y.; CHEN, Z.; CEN, Z.; YE, Y. *et al.* A comprehensive mouse brain acetylome-the cellular-specific distribution of acetylated brain proteins. 16, 2022-August-30 2022. Original Research.

JIM, P. D.; JULIETTE, D. G.; BÉNÉDICTE, C. C.; FABRICE, P. C. *et al.* Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation. **The Journal of Neuroscience**, 27, n. 13, p. 3571, 2007.

KALKAN, H.; PAGANO, E.; PARIS, D.; PANZA, E. *et al.* Targeting gut dysbiosis against inflammation and impaired autophagy in Duchenne muscular dystrophy. **EMBO Molecular Medicine**, 15, n. 3, p. e16225, 2023/03/08 2023.

KAMPHUIS, J.; LANCEL, M.; KOOLHAAS, J. M.; MEERLO, P. Deep sleep after social stress: NREM sleep slow-wave activity is enhanced in both winners and losers of a conflict. **Brain Behav Immun**, 47, p. 149-154, Jul 2015.

KESSLER, R. C.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; ALONSO, J.; BENJET, C. *et al.* Trauma and PTSD in the WHO World Mental Health Surveys. **European Journal of Psychotraumatology**, 8, n. sup5, p. 1353383, 2017/10/27 2017.

KIM, G. S.; SMITH, A. K.; NIEVERGELT, C. M.; UDDIN, M. Chapter Ten - Neuroepigenetics of Post-Traumatic Stress Disorder. *In*: RUTTEN, B. P. F. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**: Academic Press, 2018. v. 158, p. 227-253.

KIM, T. D.; LEE, S.; YOON, S. Inflammation in Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD): A Review of Potential Correlates of PTSD with a Neurological Perspective. **Antioxidants**, v.9, n. 2, DOI: 10.3390/antiox9020107.

KINSEY, S. G.; BAILEY, M. T.; SHERIDAN, J. F.; PADGETT, D. A. *et al.* Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. **Brain Behav Immun**, 21, n. 4, p. 458-466, May 2007.

KLENGEL, T.; BINDER, Elisabeth B. Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene  $\times$  Environment Interactions. **Neuron**, 86, n. 6, p. 1343-1357, 2015.

KOENIGS, M.; GRAFMAN, J. Posttraumatic stress disorder: the role of medial prefrontal cortex and amygdala. **Neuroscientist**, 15, n. 5, p. 540-548, Oct 2009.

KRATSMAN, N.; GETSELTER, D.; ELLIOTT, E. Sodium butyrate attenuates social behavior deficits and modifies the transcription of inhibitory/excitatory genes in the frontal cortex of an autism model. **Neuropharmacology**, 102, p. 136-145, 2016/03/01/ 2016.

KRISHNAN, V.; HAN, M. H.; GRAHAM, D. L.; BERTON, O. *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, 131, n. 2, p. 391-404, Oct 19 2007.

KRYSTAL, J. H.; DAVIS, L. L.; NEYLAN, T. C.; M, A. R. *et al.* It Is Time to Address the Crisis in the Pharmacotherapy of Posttraumatic Stress Disorder: A Consensus Statement of the PTSD Psychopharmacology Working Group. **Biol Psychiatry**, 82, n. 7, p. e51-e59, Oct 1 2017.

LARICCHIUTA, D.; CENTONZE, D.; PETROSINI, L. Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. **Behavioural Brain Research**, 256, p. 101-107, 2013/11/01/ 2013.

LAZARY, J.; ESZLARI, N.; JUHASZ, G.; BAGDY, G. Genetically reduced FAAH activity may be a risk for the development of anxiety and depression in persons with repetitive childhood trauma. **European Neuropsychopharmacology**, 26, n. 6, p. 1020-1028, 2016/06/01/ 2016.

LAZARY, J.; ESZLARI, N.; JUHASZ, G.; BAGDY, G. A functional variant of CB2 receptor gene interacts with childhood trauma and FAAH gene on anxious and depressive phenotypes. **Journal of Affective Disorders**, 257, p. 716-722, 2019/10/01/ 2019.

LE MERRE, P.; ÄHRLUND-RICHTER, S.; CARLÉN, M. The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. **Neuron**, 109, n. 12, p. 1925-1944, 2021/06/16/ 2021.

LI, Y.; KIM, J. CB2 Cannabinoid Receptor Knockout in Mice Impairs Contextual Long-Term Memory and Enhances Spatial Working Memory. **Neural Plasticity**, 2016, p. 9817089, 2015/12/27 2016.

LIBERZON, I.; ABELSON, J. L. Context Processing and the Neurobiology of Post-Traumatic Stress Disorder. **Neuron**, 92, n. 1, p. 14-30, Oct 5 2016.

LIM, J.; KIM, H. I.; BANG, Y.; CHOI, H. J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel therapeutic target for cognitive impairment and mood disorders that functions via the regulation of adult neurogenesis. **Archives of Pharmacal Research**, 44, n. 6, p. 553-563, 2021/06/01 2021.

LISBOA, S. F.; GOMES, F. V.; GUIMARAES, F. S.; CAMPOS, A. C. Microglial Cells as a Link between Cannabinoids and the Immune Hypothesis of Psychiatric Disorders. 7, 2016-January-28 2016. Mini Review.

LISBOA, S. F.; GOMES, F. V.; SILVA, A. L.; ULIANA, D. L. *et al.* Increased Contextual Fear Conditioning in iNOS Knockout Mice: Additional Evidence for the Involvement of Nitric Oxide in Stress-Related Disorders and Contribution of the Endocannabinoid System. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 18, n. 8, p. pyv005, 2015.

LISBOA, S. F.; NIRAULA, A.; RESSTEL, L. B.; GUIMARAES, F. S. *et al.* Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. **Neuropsychopharmacology**, 43, n. 9, p. 1924-1933, Aug 2018.

LISBOA, S. F.; VILA-VERDE, C.; ROSA, J.; ULIANA, D. L. *et al.* Tempering

aversive/traumatic memories with cannabinoids: a review of evidence from animal and human studies. **Psychopharmacology**, 236, n. 1, p. 201-226, 2019/01/01 2019.

LIU, H.; WANG, J.; HE, T.; BECKER, S. *et al.* Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? **Advances in Nutrition**, 9, n. 1, p. 21-29, 2018/01/01/ 2018.

LOMAZZO, E.; KÖNIG, F.; ABASSI, L.; JELINEK, R. *et al.* Chronic stress leads to epigenetic dysregulation in the neuropeptide-Y and cannabinoid CB1 receptor genes in the mouse cingulate cortex. **Neuropharmacology**, 113, p. 301-313, 2017/02/01/ 2017.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src. **Oncogene**, 25, n. 32, p. 4495-4500, 2006/07/01 2006.

MADDOX, S. A.; KILARU, V.; SHIN, J.; JOVANOVIĆ, T. *et al.* Estrogen-dependent association of HDAC4 with fear in female mice and women with PTSD. **Molecular Psychiatry**, 23, n. 3, p. 658-665, 2018/03/01 2018.

MANOOCHERI, K.; CARTER, A. G. Rostral and caudal basolateral amygdala engage distinct circuits in the prelimbic and infralimbic prefrontal cortex. **eLife**, 11, p. e82688, 2022/12/07 2022.

MAREN, S.; HOLMES, A. Stress and Fear Extinction. **Neuropsychopharmacology**, 41, n. 1, p. 58-79, 2016/01/01 2016.

MARSICANO, G.; WOTJAK, C. T.; AZAD, S. C.; BISOGNO, T. *et al.* The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature**, 418, n. 6897, p. 530-534, 2002/08/01 2002.

MARTIN, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; MALDONADO, R. *et al.* Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. **Psychopharmacology (Berl)**, 159, n. 4, p. 379-387, Feb 2002.

MATSUMOTO, Y.; MORINOBU, S.; YAMAMOTO, S.; MATSUMOTO, T. *et al.* Vorinostat ameliorates impaired fear extinction possibly via the hippocampal NMDA-CaMKII pathway in an animal model of posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacology**, 229, n. 1, p. 51-62, 2013/09/01 2013.

MAYO, L. M.; ASRATIAN, A.; LINDÉ, J.; HOLM, L. *et al.* Protective effects of elevated anandamide on stress and fear-related behaviors: translational evidence from humans and mice. **Molecular Psychiatry**, 25, n. 5, p. 993-1005, 2020/05/01 2020.

MCKLVEEN, J. M.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. **Journal of Neuroendocrinology**, 27, n. 6, p. 446-456, 2015.

MEERLO, P.; PRAGT, B. J.; DAAN, S. Social stress induces high intensity sleep in rats. **Neurosci Lett**, 225, n. 1, p. 41-44, Mar 28 1997.

MEKIRI, M.; GARDIER, A. M.; DAVID, D. J.; GUILLOUX, J. P. Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female c57bl6 mice. **Exp Clin Psychopharmacol**, 25, n. 2, p. 94-104, Apr 2017.

MEULDERS, A. Fear in the context of pain: Lessons learned from 100 years of fear conditioning research. **Behaviour Research and Therapy**, 131, p. 103635, 2020/08/01/ 2020.

MIKICS, É.; DOMBI, T.; BARSVÁRI, B.; VARGA, B. *et al.* The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. **Behavioural Pharmacology**, 17, n. 3, 2006.

MILAD, M. R.; PITMAN, R. K.; ELLIS, C. B.; GOLD, A. L. *et al.* Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. **Biol Psychiatry**, 66, n. 12, p. 1075-1082, Dec 15 2009.

MITJANS, M.; SERRETTI, A.; FABBRI, C.; GASTÓ, C. *et al.* Screening genetic variability at the CNR1 gene in both major depression etiology and clinical response to citalopram treatment. **Psychopharmacology**, 227, n. 3, p. 509-519, 2013.

MOHAMMADI-FARANI, A.; FAKHRI, S.; JALILI, C.; SAMIMI, Z. Intra-mPFC injection of sodium butyrate promotes BDNF expression and ameliorates extinction recall impairment in an experimental paradigm of post-traumatic stress disorder. **Iran J Basic Med Sci**, 25, n. 9, p. 1150-1158, Sep 2022.

MOHAMMADI-FARANI, A.; LIMOEI, M.; SHIROOIE, S. Sodium butyrate enhances fear extinction and rescues hippocampal acetylcholinesterase activity in a rat model of posttraumatic stress disorder. **Behavioural Pharmacology**, 32, n. 5, 2021.

MOHANA KUMAR, B.; SONG, H.-J.; CHO, S.-K.; BALASUBRAMANIAN, S. *et al.* Effect of Histone Acetylation Modification with Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, on Cell Cycle, Apoptosis, Ploidy and Gene Expression in Porcine Fetal Fibroblasts. **Journal of Reproduction and Development**, 53, n. 4, p. 903-913, 2007.

MORCUENDE, A.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; TAMBARO, S.; NIETO, E. *et al.* Immunomodulatory Role of CB2 Receptors in Emotional and Cognitive Disorders. 13, 2022-April-15 2022. Review.

MORENA, M.; PATEL, S.; BAINS, J. S.; HILL, M. N. Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. **Neuropsychopharmacology**, 41, n. 1, p. 80-102, 2016/01/01 2016.

MOTULSKY, H. J.; BROWN, R. E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. **BMC Bioinformatics**, 7, n. 1, p. 123, 2006/03/09 2006.

MUTSO, A. A.; RADZICKI, D.; BALIKI, M. N.; HUANG, L. *et al.* Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. **J Neurosci**, 32, n. 17, p. 5747-5756, Apr 25 2012.

NASCA, C.; ZELLI, D.; BIGIO, B.; PICCININ, S. *et al.* Stress dynamically regulates behavior and glutamatergic gene expression in hippocampus by opening a window of epigenetic plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112, n. 48, p. 14960-14965, 2015/12/01 2015.

NEUMEISTER, A.; NORMANDIN, M. D.; PIETRZAK, R. H.; PIOMELLI, D. *et al.* Elevated brain cannabinoid CB1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study. **Molecular Psychiatry**, 18, n. 9, p. 1034-1040, 2013.

NEY, L. J.; CROMBIE, K. M.; MAYO, L. M.; FELMINGHAM, K. L. *et al.* Translation of animal endocannabinoid models of PTSD mechanisms to humans: Where to next? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 132, p. 76-91, 2022/01/01/ 2022.

NEY, L. J.; MATTHEWS, A.; HSU, C.-M. K.; ZUJ, D. V. *et al.* Cannabinoid polymorphisms interact with plasma endocannabinoid levels to predict fear extinction learning. **Depression and Anxiety**, 38, n. 10, p. 1087-1099, 2021/10/01 2021. <https://doi.org/10.1002/da.23170>.

ONAIWI, E. S.; ISHIGURO, H.; GU, S.; LIU, Q.-R. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. **Journal of Psychopharmacology**, 26, n. 1, p. 92-103, 2012/01/01 2011.

ÖZ, A.; ÇINAR, R.; NAZIROĞLU, M. TRPV1 stimulation increased oxidative neurotoxicity and apoptosis in the glia cell membrane but not in the perinuclear area: An evidence of TRPV1 subtype. **Metabolic Brain Disease**, 37, n. 7, p. 2291-2304, 2022/10/01 2022.

PACHECO, M. A.; WARD, S. J.; CHILDERS, S. R. Identification of cannabinoid receptors in cultures of rat cerebellar granule cells. **Brain Research**, 603, n. 1, p. 102-110, 1993/02/12/ 1993.

PANDEY, G. N.; RIZAVI, H. S.; REN, X.; FAREED, J. *et al.* Proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex of teenage suicide victims. **Journal of Psychiatric Research**, 46, n. 1, p. 57-63, 2012.

PARRA, M. Class IIa HDACs – new insights into their functions in physiology and pathology. **The FEBS Journal**, 282, n. 9, p. 1736-1744, 2015/05/01 2015.

PASTRANA-TREJO, J. C.; DUARTE-AKÉ, F.; US-CAMAS, R.; DE-LA-PEÑA, 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. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, 21, n. 2, p. 142-147, 2021.

PATEL, S.; HILL, M. N.; CHEER, J. F.; WOTJAK, C. T. *et al.* The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 76, p. 56-66, 2017/05/01/ 2017.

PENG, K.; DONG, W.; LUO, T.; TANG, H. *et al.* Butyrate and obesity: Current research

status and future prospect. 14, 2023-February-24 2023. Review.

PENG, L.; SETO, E. Deacetylation of Nonhistone Proteins by HDACs and the Implications in Cancer. *In*: YAO, T.-P. e SETO, E. (Ed.). **Histone Deacetylases: the Biology and Clinical Implication**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 39-56.

POLISSIDIS, A.; GALANOPOULOS, A.; NAXAKIS, G.; PAPAHTJIS, D. *et al.* The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 16, n. 2, p. 393-403, 2013.

POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B. S.; SANACORA, G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, 13, n. 1, p. 22-37, 2012.

PUCCI, M.; MICIONI DI BONAVENTURA, M. V.; VEZZOLI, V.; ZAPLATIC, E. *et al.* Preclinical and Clinical Evidence for a Distinct Regulation of Mu Opioid and Type 1 Cannabinoid Receptor Genes Expression in Obesity. **Front Genet**, 10, p. 523, 2019.

QUIRK, G. J.; GARCIA, R.; GONZÁLEZ-LIMA, F. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. **Biol Psychiatry**, 60, n. 4, p. 337-343, Aug 15 2006.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. **Neuropsychopharmacology**, 33, n. 1, p. 56-72, 2008/01/01 2008.

RAUCH, S. L.; SHIN, L. M.; SEGAL, E.; PITMAN, R. K. *et al.* Selectively reduced regional cortical volumes in post-traumatic stress disorder. **NeuroReport**, 14, n. 7, 2003.

READER, B. F.; JARRETT, B. L.; MCKIM, D. B.; WOHLEB, E. S. *et al.* Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. **Neuroscience**, 289, p. 429-442, Mar 19 2015.

RESSTEL, L. B.; JOCA, S. R.; GUIMARÃES, F. G.; CORRÊA, F. M. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**, 143, n. 2, p. 377-385, Dec 1 2006.

RICHTER-LEVIN, G.; SANDI, C. Title: "Labels Matter: Is it stress or is it Trauma?". **Translational Psychiatry**, 11, n. 1, p. 385, 2021/07/10 2021.

RÍOS-COVIÁN, D.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. *et al.* Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. 7, 2016-February-17 2016. Mini Review.

ROBISON, A. J.; VIALOU, V.; SUN, H.-S.; LABONTE, B. *et al.* Fluoxetine Epigenetically Alters the CaMKII $\alpha$  Promoter in Nucleus Accumbens to Regulate  $\Delta$ FosB Binding and Antidepressant Effects. **Neuropsychopharmacology**, 39, n. 5, p. 1178-1186, 2014/04/01 2014.



RUSSO, R.; DE CARO, C.; AVAGLIANO, C.; CRISTIANO, C. *et al.* Sodium butyrate and its synthetic amide derivative modulate nociceptive behaviors in mice. **Pharmacological Research**, 103, p. 279-291, 2016/01/01/ 2016.

RUSSO, V. E. A.; MARTIENSSEN, R. A.; RIGGS, A. D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. (Cold Spring Harbor monograph series ; 32. 0879694904.

SADOUL, K.; WANG, J.; DIAGOURAGA, B.; KHOCHBIN, S. The Tale of Protein Lysine Acetylation in the Cytoplasm. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011, p. 970382, 2010/11/28 2011.

SAHU, P.; MUDGAL, J.; ARORA, D.; KINRA, M. *et al.* Cannabinoid receptor 2 activation mitigates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Psychopharmacology**, 236, n. 6, p. 1829-1838, 2019/06/01 2019.

SCHROEDER, F. A.; LIN, C. L.; CRUSIO, W. E.; AKBARIAN, S. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. **Biol Psychiatry**, 62, n. 1, p. 55-64, Jul 1 2007.

SETO, E.; YOSHIDA, M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 6, n. 4, p. a018713, 2014.

SHEPARD, R.; PAGE, C. E.; COUTELLIER, L. Sensitivity of the prefrontal GABAergic system to chronic stress in male and female mice: Relevance for sex differences in stress-related disorders. **Neuroscience**, 332, p. 1-12, 2016/09/22/ 2016.

SHEPARD, R. D.; GOUTY, S.; KASSIS, H.; BERENJI, A. *et al.* Targeting histone deacetylation for recovery of maternal deprivation-induced changes in BDNF and AKAP150 expression in the VTA. **Experimental Neurology**, 309, p. 160-168, 2018/11/01/ 2018.

SHU, H.-F.; YU, S.-X.; ZHANG, C.-Q.; LIU, S.-Y. *et al.* Expression of TRPV1 in cortical lesions from patients with tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia type IIb. **Brain and Development**, 35, n. 3, p. 252-260, 2013/03/01/ 2013.

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**, 36, n. 2, p. 529-538, 2011/01/01 2011.

SILVA, J. P. B.; NAVGANTES-LIMA, K. C.; OLIVEIRA, A. L. B.; RODRIGUES, D. V. S. *et al.* Protective Mechanisms of Butyrate on Inflammatory Bowel Disease. **Curr Pharm Des**, 24, n. 35, p. 4154-4166, 2018.

SKONIECZNA-ŻYDECKA, K.; GROCHANS, E.; MACIEJEWSKA, D.; SZKUP, M. *et al.* Faecal Short Chain Fatty Acids Profile is Changed in Polish Depressive Women. **Nutrients**, 10, n. 12, Dec 7 2018.

SOUMIER, A.; SIBILLE, E. Opposing Effects of Acute versus Chronic Blockade of

Frontal Cortex Somatostatin-Positive Inhibitory Neurons on Behavioral Emotionality in Mice. **Neuropsychopharmacology**, 39, n. 9, p. 2252-2262, 2014/08/01 2014.

SPANGE, S.; WAGNER, T.; HEINZEL, T.; KRÄMER, O. H. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 41, n. 1, p. 185-198, 2009/01/01/ 2009.

STAFFORD, J. M.; RAYBUCK, J. D.; RYABININ, A. E.; LATTAL, K. M. Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. **Biol Psychiatry**, 72, n. 1, p. 25-33, Jul 1 2012.

SUBBANNA, S.; NAGRE, N. N.; UMAPATHY, N. S.; PACE, B. S. *et al.* Ethanol Exposure Induces Neonatal Neurodegeneration by Enhancing CB1R Exon1 Histone H4K8 Acetylation and Up-regulating CB1R Function causing Neurobehavioral Abnormalities in Adult Mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 18, n. 5, p. pyu028, 2015.

SUN, J.; CHEN, S.; ZANG, D.; SUN, H. *et al.* Butyrate as a promising therapeutic target in cancer: From pathogenesis to clinic (Review). **Int J Oncol**, 64, n. 4, Apr 2024.

SUN, J.; YUAN, B.; WU, Y.; GONG, Y. *et al.* Sodium Butyrate Protects N2a Cells against A $\beta$  Toxicity In Vitro. **Mediators of Inflammation**, 2020, p. 7605160, 2020/04/15 2020.

SUN, L.; BHAWAL, R.; XU, H.; CHEN, H. *et al.* The human brain acetylome reveals that decreased acetylation of mitochondrial proteins associates with Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, 158, n. 2, p. 282-296, 2021/07/01 2021.

SZCZESNIAK, O.; HESTAD, K. A.; HANSSSEN, J. F.; RUDI, K. Isovaleric acid in stool correlates with human depression. **Nutr Neurosci**, 19, n. 7, p. 279-283, Sep 2016.

TEN-BLANCO, M.; FLORES, Á.; PEREDA-PÉREZ, I.; PISCITELLI, F. *et al.* Amygdalar CB2 cannabinoid receptor mediates fear extinction deficits promoted by orexin-A/hypocretin-1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 149, p. 112925, 2022/05/01/ 2022.

TERZIAN, A. L. B.; DOS REIS, D. G.; GUIMARÃES, F. S.; CORRÊA, F. M. A. *et al.* Medial prefrontal cortex Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. **Psychopharmacology**, 231, n. 1, p. 149-157, 2014.

THIEL, G.; LESCH, A.; RUBIL, S.; BACKES, T. M. *et al.* Chapter Five - Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *In*: LOOS, F. (Ed.). **International Review of Cell and Molecular Biology**: Academic Press, 2018. v. 335, p. 167-189.

TODD, S. M.; ZHOU, C.; CLARKE, D. J.; CHOCHAN, T. W. *et al.* Interactions between cannabidiol and  $\Delta$ 9-THC following acute and repeated dosing: Rebound hyperactivity, sensorimotor gating and epigenetic and neuroadaptive changes in the mesolimbic pathway. **European Neuropsychopharmacology**, 27, n. 2, p. 132-145, 2017/02/01/

2017.

VALVERDE, O.; TORRENS, M. CB1 receptor-deficient mice as a model for depression. **Neuroscience**, 204, p. 193-206, 2012/03/01/ 2012.

VAN AERDE, K. I.; HEISTEK, T. S.; MANSVELDER, H. D. Prelimbic and Infralimbic Prefrontal Cortex Interact during Fast Network Oscillations. **PLOS ONE**, 3, n. 7, p. e2725, 2008.

VANELZAKKER, M. B.; DAHLGREN, M. K.; DAVIS, F. C.; DUBOIS, S. *et al.* From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. **Neurobiol Learn Mem**, 113, p. 3-18, Sep 2014.

VERBITSKY, A.; DOPFEL, D.; ZHANG, N. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. **Translational Psychiatry**, 10, n. 1, p. 132, 2020/05/06 2020.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, 51, n. 1, p. 32-58, 2004.

VIATOUR, P.; LEGRAND-POELS, S.; VAN LINT, C.; WARNIER, M. *et al.* Cytoplasmic I $\kappa$ B $\alpha$  Increases NF- $\kappa$ B-independent Transcription through Binding to Histone Deacetylase (HDAC) 1 and HDAC3\*. **Journal of Biological Chemistry**, 278, n. 47, p. 46541-46548, 2003/11/21/ 2003.

VIDAL-GONZALEZ, I.; VIDAL-GONZALEZ, B.; RAUCH, S. L.; QUIRK, G. J. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **J Learning & Memory**, 13, n. 6, p. 728-733, November 1, 2006 %J Learning & Memory 2006.

WANG, C.; SHEN, D.; HU, Y.; CHEN, J. *et al.* Selective Targeting of Class I HDAC Reduces Microglial Inflammation in the Entorhinal Cortex of Young APP/PS1 Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v.24, n. 5, DOI: 10.3390/ijms24054805.

WANG, G.; LI, S.; GILBERT, J.; GRITTON, H. J. *et al.* Crucial Roles for SIRT2 and AMPA Receptor Acetylation in Synaptic Plasticity and Memory. **Cell Reports**, 20, n. 6, p. 1335-1347, 2017/08/08/ 2017.

WANG, L.; CHRISTOPHERSEN, C. T.; SORICH, M. J.; GERBER, J. P. *et al.* Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. **Dig Dis Sci**, 57, n. 8, p. 2096-2102, Aug 2012.

WANG, S. E.; KO, S. Y.; JO, S.; CHOI, M. *et al.* TRPV1 Regulates Stress Responses through HDAC2. **Cell Reports**, 19, n. 2, p. 401-412, 2017/04/11/ 2017.

WANG, S. E.; KO, S. Y.; KIM, Y.-S.; JO, S. *et al.* Capsaicin upregulates HDAC2 via TRPV1 and impairs neuronal maturation in mice. **Experimental & Molecular Medicine**, 50, n. 3, p. e455-e455, 2018.

WANG, X.; SUN, Z.; YANG, T.; LIN, F. *et al.* Sodium butyrate facilitates CRHR2 expression to alleviate HPA axis hyperactivity in autism-like rats induced by prenatal lipopolysaccharides through histone deacetylase inhibition. **mSystems**, 8, n. 4, p. e00415-00423, 2023.

WEI, H.; REN, Y.; YU, C.; ZHANG, C. *et al.* Sodium butyrate alleviates chronic alcoholic neuroinflammation by regulating microgila polarization through GPR109A / PPAR- $\gamma$  / NF- $\kappa$ B signaling pathway. 2022.

WERWORN, L. F. M.; LISBOA, S. F. d. S. Avaliação da participação do sistema endocanabinoide na memória de extinção do medo condicionado em camundongos. **Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, 2022. Dissertação de mestrado.

WHITTLE, N.; SCHMUCKERMAIR, C.; GUNDUZ CINAR, O.; HAUSCHILD, M. *et al.* Deep brain stimulation, histone deacetylase inhibitors and glutamatergic drugs rescue resistance to fear extinction in a genetic mouse model. **Neuropharmacology**, 64, p. 414-423, 2013/01/01/ 2013.

WHITTLE, N.; SINGEWALD, N. HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand? **Biochemical Society Transactions**, 42, n. 2, p. 569-581, 2014.

WITKIN, J. M.; TZAVARA, E. T.; NOMIKOS, G. G. A role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. **Behavioural Pharmacology**, 16, n. 5-6, 2005.

WOO, E.; SANSING, L. H.; ARNSTEN, A. F. T.; DATTA, D. Chronic Stress Weakens Connectivity in the Prefrontal Cortex: Architectural and Molecular Changes. **Chronic Stress**, 5, p. 24705470211029254, 2021/01/01 2021.

YAMAWAKI, Y.; FUCHIKAMI, M.; MORINOBU, S.; SEGAWA, M. *et al.* Antidepressant-like effect of sodium butyrate (HDAC inhibitor) and its molecular mechanism of action in the rat hippocampus. **The World Journal of Biological Psychiatry**, 13, n. 6, p. 458-467, 2012/09/01 2012.

YANG, W.-M.; TSAI, S.-C.; WEN, Y.-D.; FEJÉR, G. *et al.* Functional Domains of Histone Deacetylase-3\*. **Journal of Biological Chemistry**, 277, n. 11, p. 9447-9454, 2002/03/15/ 2002.

YEHUDA, R. Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder. **Ann N Y Acad Sci**, 1179, p. 56-69, Oct 2009.

YUE, H. Q.; XU, P. F.; GUO, Y. D.; QI, J. *et al.* Sodium butyrate inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion by regulating the HDAC1/HSPB7 axis. **Neoplasma**, 69, n. 5, p. 1029-1040, Sep 2022.

ZABIK, N. L.; IADIPAULO, A. S.; MARUSAK, H. A.; PETERS, C. *et al.* A common genetic variant in fatty acid amide hydrolase is linked to alterations in fear extinction neural circuitry in a racially diverse, nonclinical sample of adults. **J Neurosci Res**, 100,

n. 3, p. 744-761, Mar 2022.

ZHANG, J.; YI, M.; ZHA, L.; CHEN, S. *et al.* Sodium Butyrate Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Colorectal Cells: Implications for Apoptosis. **PLOS ONE**, 11, n. 1, p. e0147218, 2016.

ZHANG, S.-J.; ZOU, M.; LU, L.; LAU, D. *et al.* Nuclear Calcium Signaling Controls Expression of a Large Gene Pool: Identification of a Gene Program for Acquired Neuroprotection Induced by Synaptic Activity. **PLOS Genetics**, 5, n. 8, p. e1000604, 2009.

ZHANG, Y.; SUN, Z.; JIA, J.; DU, T. *et al.* Overview of Histone Modification. *In*: FANG, D. e HAN, J. (Ed.). **Histone Mutations and Cancer**. Singapore: Springer Singapore, 2021. p. 1-16.

ZHAO, P.; MENG, L.; DOU, M.; MAO, J. *et al.* Long-lasting effects of postweaning sodium butyrate exposure on social behaviors in adult mice. **Brain Research Bulletin**, 165, p. 209-217, 2020/12/01/ 2020.

ZOPPI, S.; MADRIGAL, J. L.; CASO, J. R.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. *et al.* Regulatory role of the cannabinoid CB2receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. **British Journal of Pharmacology**, 171, n. 11, p. 2814-2826, 2014.

---

---

***ANEXOS***

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo A - Autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Envolvimento da acetilação de proteínas histonas nas alterações comportamentais e em modificações no sistema endocanabinoide após exposição a um trauma em camundongos.", registrada sob nº 21.1.526.60.9, sob a responsabilidade de Arthur Alves Coelho e Sabrina Francesca de Souza Lisboa, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 14/02/2022 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaborador: Isabela Pavan Silva.

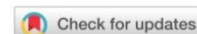
Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica		
Vigência da Autorização	17/02/2022 a 27/02/2024		
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. Isogênico BALB/c	Cam. Isogênico C57Bl/6	Cam. Het. CD-1
Nº de animais	348	348	136
Peso/Idade	20-30g/ 6 sem	20-30g/ 6 sem	50-60g/ 4 meses
Sexo	Macho	Macho	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP RP		Biotério da FCFRP

Ribeirão Preto, 15 de fevereiro de 2022.

**Danielle Palma de Oliveira**  
Coordenadora da CEUA-FCFRP

## 9.2. Artigos publicados

### 9.2.1. Anexo B: Endocannabinoid signalling and epigenetics modifications in the neurobiology of stress-related disorders



Neuronal Signaling (2023) 7 NS20220034  
https://doi.org/10.1042/NS20220034



#### Review Article

# Endocannabinoid signaling and epigenetics modifications in the neurobiology of stress-related disorders

Arthur A. Coelho<sup>1,2,\*</sup>, Sávio Lima-Bastos<sup>1,2,\*</sup>, Pedro H. Gobira<sup>2</sup> and Sabrina F. Lisboa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Department of BioMolecular Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

Correspondence: Sabrina F. Lisboa (sabrinalisboa@usp.br)



Stress exposure is associated with psychiatric conditions, such as depression, anxiety, and post-traumatic stress disorder (PTSD). It is also a vulnerability factor to developing or reinstating substance use disorder. Stress causes several changes in the neuro-immune-endocrine axis, potentially resulting in prolonged dysfunction and diseases. Changes in several transmitters, including serotonin, dopamine, glutamate, gamma-aminobutyric acid (GABA), glucocorticoids, and cytokines, are associated with psychiatric disorders or behavioral alterations in preclinical studies. Complex and interacting mechanisms make it very difficult to understand the pathophysiology of psychiatric conditions; therefore, studying regulatory mechanisms that impact these alterations is a good approach. In the last decades, the impact of stress on biology through epigenetic markers, which directly impact gene expression, is under intense investigation; these mechanisms are associated with behavioral alterations in animal models after stress or drug exposure, for example. The endocannabinoid (eCB) system modulates stress response, reward circuits, and other physiological functions, including hypothalamus–pituitary–adrenal axis activation and immune response. eCBs, for example, act retrogradely at presynaptic neurons, limiting the release of neurotransmitters, a mechanism implicated in the antidepressant and anxiolytic effects after stress. Epigenetic mechanisms can impact the expression of eCB system molecules, which in turn can regulate epigenetic mechanisms. This review will present evidence of how the eCB system and epigenetic mechanisms interact and the consequences of this interaction in modulating behavioral changes after stress exposure in preclinical studies or psychiatric conditions. Moreover, evidence that correlates the involvement of the eCB system and epigenetic mechanisms in drug abuse contexts will be discussed.

\*These authors contributed equally to the work and share the first authorship.

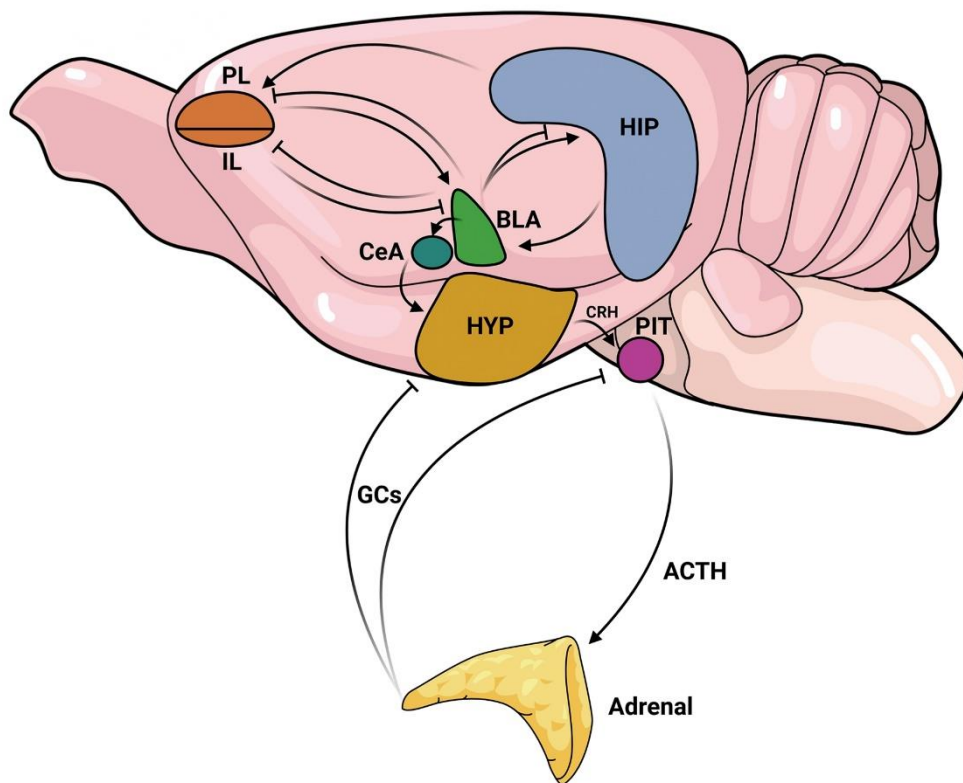
Received: 26 January 2023  
Revised: 30 June 2023  
Accepted: 07 July 2023

Accepted Manuscript online:  
11 July 2023  
Version of Record published:  
25 July 2023

## Overview of stress response and circuitry

Stress is an important and evolutionarily conserved response that modulates several central nervous system (CNS) regions and the endocrine system to prepare the organism to face a challenging experience. The stressors, stimuli that trigger the stress response, can be chemical, physical, psychological, or combinations of these; and they can recruit different brain regions, which could overlap depending on the circumstances [1]. In general, stress exposure activates the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis, leading to release of glucocorticoids (GCs) by the adrenal gland. GCs promote their stress effects mostly by activating glucocorticoid receptors (GR) in the periphery and in the brain, altering the expression of several genes to promote adaptation [2,3]. A simplified view of key brain regions involved in stress response is depicted in Figure 1. However, as reviewing this topic is beyond the scope of this study, the reader can find





**Figure 1. A simplified view of the key brain regions involved in the stress response**

The amygdala (basolateral-BLA and central-CeA nuclei) is a key region in initiating the stress response. It is an input region for projections sent by other regions, particularly by different subdivisions of the medial prefrontal cortex (mPFC). Specifically, the prelimbic region (PL) of the mPFC exerts excitatory influence on amygdala. In contrast, the infralimbic region (IL) inhibits the basolateral amygdala (BLA). The hippocampus (HIP) contributes to stress response by providing contextual information, with excitatory projections to the PL-mPFC and BLA. The BLA, in turn, inhibits the PL, IL, and has both inhibitory and excitatory projections to the HIP. The balance of these two projections controls the parallel HIP outputs. Integrating this information, the BLA activates the amygdala's output region, the CeA, which sends excitatory projections to the hypothalamus (HYP), stimulating the production and release of corticotropin-releasing hormone (CRH). CRH acts on the pituitary gland triggering the synthesis and release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). ACTH, in turn, is released in the blood and stimulates the synthesis of glucocorticoids (GCs) in the adrenal gland. Finally, released GCs establish a negative feedback loop within the hypothalamus and pituitary, modulating the peripheral and central nervous system areas to facilitate adaptive responses to stress. Depending on the duration and type of stressors, increased amygdala activity, cortical dysfunction and hippocampal atrophy can occur, impairing the ability of this adaptive response to occur, contributing to psychiatric disorders.

more comprehensive reviews about this topic, with figures summarizing the current knowledge, in several recent review studies [1,4–7]. Here, we will present some critical information about the central regions affected by stress, that influence behavioral response: the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus.

The prefrontal cortex (PFC) is responsible for complex functions such as integrating and processing different stimuli for decision-making, goal-directed behaviors, and working memory [8,9], in addition to emotional processing. The medial portion of the PFC (mPFC), the most studied in studies related to aversion and stress [10], is mainly divided into the prelimbic (PL) and the infralimbic (IL) portions, which can have distinct or opposite functions [11,12] due

to their partially distinct connections and projections [13,14]. In general terms, the PFC is greatly activated during acute stress, and the excess of glutamate release and its impaired reuptake mediated by GCs may result in neurotoxicity [15], proinflammatory factors release, and neuronal death [16,17]. These changes can be related to the neuronal atrophy observed in the PFC of depressed and PTSD patients and animal models involving stress exposure [18,19] which could result in weakened PFC projections to the amygdala and hippocampus, impairing modulatory function exerted by PFC on these brain regions [20,21].

The amygdala is also an essential structure for emotional processing [5] and is divided into different nuclei. The basolateral nucleus (BLA) integrates and processes aversive/stressful stimuli received by several brain regions, being greatly activated during stressful events [5] and fear memory conditioning acquisition and consolidation [22,23]. BLA sends several outputs to the central nucleus (CeA) and the medial nucleus (MeA), which in turn project to other brain areas that will be responsible for triggering adaptive behaviors to facing stress [5]. As mentioned before, the amygdala receives inhibitory projections from the IL mPFC, which can be weakened after stressful situations, resulting in a lack of inhibition of BLA by the PFC and hyperactivation of the amygdala [24,25]. For instance, depressed and PTSD patients have bigger and more active amygdala than healthy volunteers [26–28].

Finally, the hippocampus, which is connected to the amygdala and PFC [29], comprises the dentate gyrus (DG) and Ammon's horn/Cornu Ammonis (CA) subfields 1, 2, and 3. The CA1 region has outputs to several regions, including the PL and IL mPFC and BLA [30–32]. The hippocampus plays an important role in memory acquisition and discrimination of aversive contexts [33,34]. It also inhibits excessive activation of the HPA axis during stress response [35]. However, stress exposure can cause hippocampus atrophy and decreases neuronal plasticity, impairing its function and resulting, for example, in fear extinction learning deficits and fear generalization [33,36], anxiety-like and depressive-like behaviors [37]. Moreover, decreased hippocampal volume is reported in anxiety disorders, PTSD, and depression in humans [38–41]. Interestingly, based on a monozygotic twins study, it was suggested that a smaller hippocampal volume could be a risk factor for developing PTSD after traumatic events rather than a consequence of PTSD [42].

Although many other brain areas can be involved, it is well-known that a proper synchronization between the amygdala, mPFC, and hippocampus is necessary for adequate stress response and fear processing mechanisms. Therefore, impairment in this circuitry is frequently observed in psychiatric disorders. This poor connectivity can be associated with impaired molecular mechanisms in those brain regions, including dysfunctional neurotransmitter systems, such as endocannabinoids, and epigenetic modifications, which could control neuroplastic changes resulting in long-lasting consequences, such as impaired behavior.

## The (endo)cannabinoid signaling in stress response

The endocannabinoid (eCB) system, activated by stress exposure, is considered a stress-buffer system and essential for several physiological conditions. The main eCBs are anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which are produced on demand post-synaptically in response to an increase in neuronal activity, by actions of N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD) and diacylglycerol lipase (DAGL) on membrane phospholipids, respectively. These eCBs are released in the synaptic cleft and act retrogradely in cannabinoid receptors (CB<sub>1/2</sub>) or post-synaptically in CB<sub>2</sub>, or in glial cells. CB<sub>1/2</sub> are G<sub>i</sub>-coupled receptors, then their activation result in the inhibition of adenylyl cyclase, the protein kinase A (PKA), and cellular Ca<sup>2+</sup> influx, culminating in a blockade in neurotransmitter release that was increased before. Finally, AEA will be degraded by the fatty acid amide hydrolyase (FAAH) enzyme mostly in the postsynaptic neuron, whereas 2-AG will be metabolized by the monoacylglycerol lipase (MAGL) enzyme in the presynaptic neuron [43].

Contrasting to CB<sub>1/2</sub> receptors, the vanilloid receptor 1 (TRPV<sub>1</sub>) is expressed both pre- and post-synaptically. TRPV<sub>1</sub> can be activated by AEA, increasing the Ca<sup>2+</sup> influx and neurotransmitter release. Pieces of evidence suggest that AEA has its actions preferentially via CB<sub>1</sub> receptors, whereas, at higher concentrations, the predominant effect could reflect its effects on TRPV<sub>1</sub>. This is one of the possible explanations for the bell-shaped dose-response curve often seen with AEA in behavioral responses [44]. It has been shown, for example, that by inhibiting CB<sub>1</sub> receptors with an antagonist, the extinction learning process is impaired [45,46], and the treatment with a TRPV<sub>1</sub> receptor agonist has a similar effect [47]. Moreover, the administration of a FAAH inhibitor facilitated the extinction learning process in wild-type mice [46]. Finally, the facilitation of CB<sub>1</sub> signaling by a drug that blocks FAAH and antagonizes TRPV<sub>1</sub> receptors is more potent in blocking the expression of fear conditioning than inhibiting these two targets individually, supporting the opposite role for CB<sub>1</sub> and TRPV<sub>1</sub> receptors in triggering fear behavior [48].

Overall, a very reductionist description of the eCB system is described here. In the past few years, several other targets of the eCB system were described, such as the G-protein-coupled receptor 55 (GPR55) and the peroxisome

proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), which interact with eCBs and other substrates, promoting different effects. A more recent detailed review of this topic can be found in [43].

The eCB system is altered in several pathological conditions, such as cancer, gastrointestinal and cardiovascular diseases, eating disorders [49], and stress-related psychiatric conditions [39,40,50,51]. For instance, studies have shown that depressed women have decreased serum levels of AEA and 2-AG [52]. Moreover, depressed suicide victims have increased expression of CB<sub>1</sub> receptors in the dorsolateral PFC [53]. Finally, genetic studies have shown that polymorphisms of the CB<sub>1</sub> receptor have greater prevalence in depressed and anxious patients [54,55] and are correlated with treatment-resistant depression [56]. Interestingly, pharmacological studies indicate that the administration of rimonabant, a CB<sub>1</sub> antagonist, increases symptoms of depression and anxiety in healthy individuals [57] and that the effects of conventional antidepressant drugs depend on the eCB signaling [58].

In PTSD patients, reduced peripheral AEA levels and higher expression of CB<sub>1</sub> receptors in the brain are also reported [59]. Interestingly, non-PTSD individuals carrying the C385A allele of the rs324420 polymorphism, a mutation of the FAAH gene, had increased AEA levels, enhanced fear extinction [60], and lower amygdala reactivity during fear extinction recall [61]. Also, polymorphisms of the CB<sub>2</sub> receptor and FAAH enzyme have been associated with greater susceptibility to childhood trauma and the development of psychiatry disorders later in life [62,63]. Other polymorphisms in the eCB system, including in the CB<sub>1</sub> receptor, are associated with fear extinction and/or PTSD [64–66].

Altogether these data suggest a strong relationship between the eCB system and psychiatry conditions. Based on the existing evidence, impaired eCB signaling in the brain, induced by stress or as consequences of polymorphisms, could be involved in the neurobiology of stress-related disorders, including depression and PTSD. Therefore, targeting these changes in the eCB system is a potential tool to improve the outcome of those disorders, potentially achieving remission in treatment-resistant patients. However, this still need further investigation. More about these discussions can be found in excellent recently published reviews [64,67,68].

Animal model studies also corroborate the involvement of eCB signaling in the development of behavioral changes related to psychiatric symptoms. For instance, CB<sub>1</sub> KO mice have elevated levels of depression- and anxiety-like behaviors after stress [69–72]. Moreover, these mice also have impaired fear extinction, a key feature of PTSD animal models [73]. Pharmacologically, these behavioral alterations are reproduced after chronic administration of CB<sub>1</sub> antagonists [74,75]. CB<sub>1</sub> agonists have also been shown to have antidepressant and anxiolytic effects after stress [76–78]. Furthermore, several papers reported the participation of the eCB system, particularly CB<sub>1</sub> receptors, promoting fear extinction facilitation in different animal models [45,46,79,80]. CB<sub>2</sub> participation in promoting behavioral responses seems to be more complex. The overexpression of this receptor promoted reduced levels of anxiety-like behaviors in the light-dark box and elevated plus maze in mice [81]. However, evidence shows that chronic administration of a CB<sub>2</sub> antagonist produces an anxiolytic effect [82]. Another study from the same group observed that the overexpression of CB<sub>2</sub> receptors reduced depressive-like behaviors in mice, whereas the administration of AM630, a CB<sub>2</sub> antagonist, induced an antidepressant effect in wild-type mice. The drug had no effect in the transgenic line [83]. Moreover, CB<sub>2</sub> KO mice have impaired contextual, but not cued, fear conditioning and enhanced spatial memory [84]. More studies using genetic and molecular techniques with specific cell types, such as microglia and astrocytes, are needed to investigate the interaction of CB<sub>2</sub> expression and activity with other signaling systems involved in mood regulation and behavior.

Multiple mechanisms involved in the pathophysiology of psychiatric conditions, like major depression, anxiety, and PTSD, can be regulated by the eCB system. Therefore, the resultant effects from eCB system manipulation have been related to several molecular alterations. For example, eCBs can counteract dysregulation in neurotransmitter systems [85–87], promote neuroplasticity [88,89], and attenuate inflammatory effects [90–93] induced by stress. In mice, both genetic deletion and the antagonism of CB<sub>1</sub> receptors in the mPFC prolonged CORT release after stress. It has been proposed that the activation of CB<sub>1</sub> in mPFC GABAergic interneurons disinhibits excitatory neuronal projections that are responsible for terminating stress response [94].

A more recent proposal regarding stress consequences implies the modulation of epigenetic mechanisms in the brain to promote behavioral changes. This review will focus on the crosstalk between the eCB system and epigenetics mechanisms to modulate the stress response. Considering a general knowledge about epigenetic mechanisms are necessary to understand how they can impact the eCB system, in the next section we will give an overview about this knowledge.

## Key epigenetic mechanisms in stress response

Epigenetics focuses on the interaction between the environment and genome, whereby gene expression is modulated in response to new stimuli. In the short or long term after stress experiences, several epigenetic marks can be modified to adapt the organism to the environment; these marks can even be transmitted between generations. Because of a maladaptive response, these epigenetic changes can predispose the organism to diseases. There are three major epigenetic mechanisms for the regulation of gene expression: DNA modifications, histone modifications, and interference RNAs. Below, we will briefly describe each one of them, associating them with modifications in important stress-related systems.

### DNA methylation

The DNA is passive to chemical modifications that do not change the nucleotide sequence but regulate gene transcription. Among many modifications described in the literature, cytosine methylation at the 5' position (5mC) is the most investigated. The DNA-methyltransferases (DNMTs) family of enzymes in mammals, comprising DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b, catalyzes the reaction of a methyl group addition to a cytosine [95]. The reaction occurs mainly in CpG dinucleotides, distributed throughout the genome but more concentrated in CpG islands in promoter regions of the genes. 5mC is recognized by methyl-CpG binding proteins (MBPs), such as methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2), commonly related to psychiatry diseases [96,97]. 5mC is usually associated with the repression of gene expression, but it also can promote gene expression activation depending on the location of the CpG island in the gene body [98]. Despite some stability, DNA methylation is a dynamic process constantly subject to reversal (demethylation) by active and passive forms. The passive form occurs through DNA damage or replication, while the active form is a process based on methyl-cytosine modifications through the ten-eleven translocation (TET) enzyme family and the activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex (AID/APOBEC) [98].

Both DNA hyper- and hypomethylation of stress-related genes are found in various neuropsychiatric and neurological diseases [99–102]. Most clinical studies focus on genes related to glucocorticoid response and serotonin neurotransmission [100,103]. The promoter region of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) appears to be extremely sensitive to DNA methylation. Various stressor events, including child abuse, war and genocide-related trauma, maternal depression, or violence during pregnancy, correlate with increased [104–110] and decreased [105,111,112] methylation levels in NR3C1. Methylation of NR3C1 is also altered in the post-mortem brains of suicide victims and is associated with childhood traumatic experiences [113,114]. In these works, methylation levels frequently are inversely proportional to NR3C1 expression, and low levels of GR can directly impact the feedback of glucocorticoid release and HPA activity, contributing to altered responses to stress. Regarding the serotonergic system, the serotonin transporter gene (SLC6A4) methylation levels are related to traumatic events, child abuse, work stress, and depression [115–121], and although it does not correlate with mRNA expression in the blood of patients, the hypomethylation of SLC6A4 is proposed to be a biomarker of diagnosis and drug response to major depression [118,122].

### Histones modifications

Histones are proteins that, together with DNA, make the chromatin and organize its packaging state. There are four types of histones: H2A, H2B, H3, and H4. The addition of chemical groups to amino acid residues of the histones alters their binding to DNA modulating the access of transcription factors. The addition of group acetyl, or acetylation, is a modification primarily associated with gene expression. It occurs due to the action of histone acetyltransferases (HATs) and is erased by histone deacetylases (HDACs). Histone methylation is another modification related to gene expression or repression depending on the location of the methyl group. It is catalyzed by histone methyltransferases and reversed by histone demethylases, also occurring on lysine residues [123,124].

In humans, there are only a few works exploring histone mark changes in the context of stressful experiences and neuropsychiatric diseases. In these studies, they found differences in tri-methylation of H3 at lysine 27 (H3K27me3) and at lysine 4 (H3K4me3) levels in the brains of suicide victims when it was compared between control and depressive groups [125–127]. On the other hand, in animal models, several types of stressors, such as maternal separation, social stress, restraint stress, and chronic mild stress, induce alterations in HDACs and histone acetylation/methylation levels in a global or gene-specific manner [128–130]. Interestingly, antidepressant drugs with different mechanisms of action, such as ketamine, imipramine and fluoxetine, not only ameliorate behavior alterations after the stress but also alters HDACs activity and expression, or impact levels of acetylation at specific histone residues associated with important genes related to synaptic plasticity, such as *Nr2b* and *Bdnf* genes [131–138].

## Non-coding RNAs

Micro RNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs), long non-coding RNAs (lncRNAs), and piwi RNAs (piRNAs), along with others, are regulatory non-coding RNAs, which regulate transcription and translation processes most often through binding to mRNA [139]. Among these, miRNAs are the most characterized regarding their biogenesis and role in diseases. The binding of miRNA to complementary sequences of mRNAs induces their cleavage or, in the case of partial complementarity, induces the inhibition of translation in ribosomes [139].

miRNAs can either be regulated by stress signaling or act as a regulator of the stress response [140]. The capacity of a single miRNA to bind several mRNAs allows it to modulate entire cellular pathways, which in part explains altered levels of the same miRNA in different diseases. On stress-related diseases, it is possible to highlight some stress-regulated genes such as *Nr3c1*, *Bdnf*, *Ntrk2*, *Slc6a4*, and *Crhr1* [141–144], which are also found to be regulated by histone modifications and DNA methylation [145–147]. Moreover, the miRNA network regulates and is regulated by proteins related to other epigenetic processes, such as HDACs, DNMTs, and MeCP2 [148]. Due to the stability and the facility to detect changes in easily accessible tissues, such as blood and saliva, miRNAs are indicated as excellent biomarker candidates for disease and treatment responsiveness [149].

## Possible crosstalk between the eCB system and epigenetic mechanisms in stress response and psychiatric disorders (Endo)cannabinoid control of epigenetic mechanisms

*Cannabis* use induces epigenetic alterations, supporting a relationship between the eCB system and epigenetic mechanisms. For instance, *Cannabis*-dependent patients have reduced methylation of the CB<sub>1</sub> receptor gene promoter (*Cnr1*) and increased CB<sub>1</sub> expression in the blood [150]. The same profile of methylation and CB<sub>1</sub> expression was observed in peripheral blood lymphocytes of patients with schizophrenia reporting the use of *Cannabis* [151]. Moreover, prenatal *Cannabis* exposure decreased D<sub>2</sub> receptors mRNA in Nucleus Accumbens (NAc) and amygdala of aborted fetuses, which was replicated in an animal model. In this model, there was increased di-methylation at lysine 9 of H3 (H3K9me<sub>2</sub>), a repressive mark, and decreased H3K4me<sub>3</sub>, mentioned earlier, an enhancer mark, and RNA polymerase II at the *Drd2* gene locus [152,153], supporting the role of an epigenetic mechanism induced by *Cannabis* in decreasing D<sub>2</sub> expression. These changes have implications for drug addiction, which will be discussed later, and other psychiatric conditions. For instance, the chronic administration of a CB<sub>1</sub> agonist to adolescent male rats has been implicated in greater susceptibility to stress and anxiety-like behavior, in addition to increase DNMT and global methylation levels in the PFC of their adolescent offspring [154]. Also, paternal activation of CB<sub>2</sub> receptors was implicated in impaired offspring growth via reduced expression of TET enzymes and altered DNA methylation in several genes [155].

Regarding treatment with CBD, it was demonstrated that acute CBD treatment decreased immobility in mice in the forced swimming test, similar to what was observed with DNMT inhibitors (5-AzaD and RG108). Interestingly, the combination of ineffective doses of CBD and DNMT inhibitors induced similar antidepressant effects, suggesting CBD effects could be directly modulating DNMTs. In fact, all drugs prevented the swimming stress-induced reduction of the DNA methylation in the PFC and the increase in the hippocampus. However, whereas the DNMT activity was decreased by swimming stress in the PFC and increased in the hippocampus, CBD could only counteract the first in this work [156]. In contrast, the hippocampal neurodegeneration induced by iron administration in neonatal rats, which induces mitochondrial DNA methylation alterations, was reverted by treatment with chronic CBD during adulthood [157]. Finally, subacute treatment with CBD induced hypomethylation of DNMT3a in the mouse hippocampus [158], a mechanism already shown to induce gene expression related to neurogenesis [159,160]. These pieces of evidence suggest a role for DNA methylation in CBD effects in animal stress models. As described before, many of these markers are also involved in stress-related disorders, and CBD has anxiolytic/antidepressant effects in psychiatric patients [161]. Therefore, it is possible to suggest that these CBD effects may involve DNA methylation; however, there are no studies in humans with this analysis, which would be very useful for better conclusions.

Histone modifications may also be involved in effects mediated by cannabinoids. Repeated co-administration of THC and CBD increased the acetylation in lysine 9 (H3K9ac) and 14 (H3K14ac) of H3 in the ventral tegmental area of adult mice [162]. In another study, acute CBD treatment increased levels of methylation and acetylation markers H3K4me<sub>3</sub>, H3K27me<sub>3</sub>, and H3K9ac in the cerebral cortex. In contrast, it decreased H3K9ac levels in the hypothalamus and H3K4me<sub>3</sub> in the pons in rats, demonstrating that its effects are brain area-specific [163].

Chronic unpredictable stress (CUS) increased the nuclear expression and activity of HDAC2 and decreased the expression of CB<sub>1</sub> levels, mainly in glutamatergic neurons, in the mouse cingulate cortex. Moreover, CUS reduced the expression of H3K9ac associated with CB<sub>1</sub> and Neuropeptide Y (NpY) genes. They also showed that URB597, a

FAAH inhibitor, which is expected to increase anandamide levels, reverted stress effects in the *Npy* gene, but not in *Cnr1*, and anxious behavior [164]. Like stress, a TRPV<sub>1</sub> agonist (capsaicin), which increased immobility in the forced swimming test, increased HDAC2 expression in the mouse DG of the hippocampus [165] and enriched HDAC2 expression at *Dlg4*, *Syp*, *Gria1*, and *Gria2* gene promoters, all related to neuroplasticity [166]. In contrast, genetic deletion of TRPV<sub>1</sub> receptors, which induced an antidepressant-like phenotype, reduced HDAC2 levels in the same brain region and consequently increased levels of H3 and H4 global acetylation. In addition, TRPV<sub>1</sub> knockout mice, contrary to what was observed with capsaicin injection, showed increased levels of plasticity and neurogenesis-related genes in the hippocampus, in addition to being resilient to stress [166]. Therefore, considering anandamide activates CB<sub>1</sub> and TRPV<sub>1</sub> receptors, we suggest that the bell-shaped profile of anandamide effect on behavior may be mediated by differential effects on CB<sub>1</sub> and TRPV<sub>1</sub> receptors, among other mechanisms, regulating the expression and activity of HDAC2, histone acetylation levels, gene expression, and neuroplasticity.

As described before, miRNAs play an essential role in gene expression regulation, being implied in several diseases. eCB system activity, in turn, seems to regulate miRNA expression and, therefore, could impact the pathogenesis and treatment of stress-related diseases. In mice, chronic mild stress (CMS) increased expression of some miRNAs in the PFC (miR-9-5p, miR-128-1-5p, and miR-382-5p) [167] that target *Drd2*, *Clock*, *Map2k*, *Mapk1*, and *Bdnf* genes [168–170], all related to the physiopathology of depression. Moreover, CMS induced decreased expression of others miRNAs (miR-16-5p, miR-129-5p, and miR-219a-5p) [167], which target *Slc6a4*, *Htr2a*, *Bdnf*, *Grm7*, *Camk2a*, and *Camk2g* genes, which are also related to depression physiopathology and antidepressant response [168,171–174]. In the same study, stressed animals treated with anandamide showed increased expression of all these miRNAs compared with the vehicle group; the depressive-like effect of stress in the forced swimming test was reverted [167]. Moreover, early life stress-induced depressive-like behavior in rats and downregulated miR-16 in males and miR-135a in females in the mPFC. These changes were reversed when rats received a FAAH inhibitor [175].

Additionally, lower expression levels of *let-7d* miRNA were observed in the cortex and hippocampus of CB<sub>1</sub> knockout mice or after CB<sub>1</sub> knockdown in zebrafish embryos. Conversely, the knockdown of *let-7d* in zebrafish embryos increased the expression of CB<sub>1</sub> receptors, suggesting negative feedback in this regulation [176,177]. Moreover, *let-7d* overexpression in adult mouse hippocampus induced anxiolytic- and antidepressant-like effects [178]. Thus, it is arguable that anxiolytic and antidepressant effects induced by CB<sub>1</sub> activation are promoted by *let-7d* expression and that this mechanism may be impaired in psychiatric conditions, such as depression. Furthermore, the anxiolytic and antidepressant effects induced by *let-7d* increased expression may occur, between other mechanisms, by the negative regulation of dopamine D3 receptors, mu-opioid receptors, TLX, an orphan nuclear receptor, and upregulation of miR-9, regulating neuroplasticity, cellular proliferation, neuronal differentiation, and migration [178–180].

In summary, the eCB system activity regulates the expression and activity of epigenetic enzymes, such as TETs, DNMTs, and HDACs, which result in differential global and specific-site levels of DNA and histone modifications. Moreover, the eCB system is also involved in miRNA expression regulation. All these alterations change gene expression related to neurotransmission, neurogenesis, and neuroplasticity. These mechanisms, also altered by stress, may be involved in the development of psychiatric conditions; therefore, more studies are needed to better understand how they work in physiological and pathological conditions to determine if they could be targets for treating these conditions.

So far, only a few studies combine stress protocols, modulation of the eCB system, and evaluation of epigenetic output, highlighting the need for more studies addressing that combination. These studies are summarized in Table 1. How eCB system molecules modulate epigenetic factors in stress-related contexts are outlined in Figure 1A.

## Epigenetic control of the endocannabinoid system

Although the relevance of the epigenetic mechanisms to the activity of the endocannabinoid system is well known [181–184], this regulation in the context of stress is less explored. The investigation of epigenetic control of the eCB system relies mainly on the regulation of *Cnr1* and *Faah* genes. This specificity can be explained by the attention these two genes receive due to their pharmacological importance in physiology and disease and their susceptibility to being regulated by epigenetic marks.

DNA methylation levels of *Cnr1*, for example, is reported to be inversely proportional to mRNA and protein expression of the gene [185–191]. *Cnr1* methylation pattern is recurrently found altered in a variety of situations, such as diet [190,192,193], patients with schizophrenia [189], and THC consumption [150]; *Cnr1* is also susceptible to demethylation by the agent 5-aza-2-deoxycytidine [194]. On the other hand, *Faah* hypermethylation is associated with alcohol consumption [195], while hypomethylation, along with an increase in mRNA and protein expression, is related to Alzheimer's disease patients [196]. Nonetheless, the methylation of *Cnr1* and *Faah* in stressful conditions

**Table 1 Studies combining stress protocol, eCB system modulation and epigenetic output in animal models**

Pharmacological intervention	Sex, strain, age	Stress	Behavioral outputs	Molecular outputs	Reference
Prenatal CB1 agonist (WIN55212-2; 1.2 mg/Kg/day); from PND30 to PND49	♂ Rats, adolescent and adult	Offspring (PND60) exposed to Unpredictable stress during one week	Anxiogenic effect in the OFT induced by WIN in stressed offspring (PND68)	WIN ↑ global methylation and DNMT3a levels in the PFC of stressed offspring WIN ↑ DNMT1 levels in the PFC only in non-stressed offspring	[154]
FAAH inhibitor (URB-597; 1.0 mg/Kg/day); from the 5th to the 11th week of stress protocol	♂ mouse, 6 weeks old	CUS for eleven weeks	Not evaluated	CUS ↑ expression and activity of HDAC2 in the cingulate cortex CUS ↓ expression of H3K9ac associated with npy and cnr1 genes in the cingulate cortex URB reverted the effect of stress in the npy gene	[164]
TRPV1 KO TRPV1 KD in DG	♂ mouse, 4-5 weeks old	CUS for 14 days	CUS induced learned helplessness (LHT) in WT, but not in TRPV1 KO. Antidepressant- and anxiolytic effect of TRPV1 KO in the FST and NSFT, independent of stress exposure. TRPV1 KD in the DG mimics the TRPV1 KO phenotype in the FST	↓ HDAC2 levels in the hippocampus of TRPV1 KO ↑ H3 and H4 global acetylation levels in TRPV1 KO hippocampus ↑ expression of neuroplasticity and neurogenesis genes in TRPV1 KO hippocampus TRPV1 KD in the DG mimics the TRPV1 KO phenotype	[166]
AEA: 5 mg/Kg/day; After forced swimming pretest, 5 hours before and 1 hour after FST	♂ mouse, 3 months old	CMS for 7 weeks	CMS induced depressive-like behavior in the FST and SPT AEA ↓ the stress effect in the FST	CMS ↑ miR-9-5p, miR-128-1-5p, and miR-382-5p, and ↓ miR-16-5p, miR-129-5p, and miR-219a-5p expression in the PFC AEA ↑ expression of miR-9-5p, miR-128-1-5p, miR-382-5p, miR-16-5p, miR-129-5p, miR-219a-5p in the PFC of stressed mice	[167]
FAAH inhibitor (URB-597; 0.4 mg/Kg/day); From PND45 to PND60	♂ and ♀ rats	ELS (from PND7 to PND 14)	ELS: ♂: ↓ distance traveled and ↑ freezing time in the OFT; ♀: ↑ freezing time in the OFT; URB treatment: ↑ SP in stressed ♂ and ♀; ↓ SP in non-stressed ♀; ↑ the SR discrimination index in stressed ♂ and ♀; ↓ SR in non-stressed ♂; ↓ immobility in the FST in stressed ♂ and ♀; ↑ immobility in FST in non-stressed ♂;	URB treatment: ↑ expression of miR-135a in the mPFC and ↓ it in the LHa and DR of non-stressed ♂ and ♀; Normalized the expression of miR-135a in the mPFC of stressed ♀; ↓ expression of miR-135a in the CA1 region of non-stressed ♂; ↑ the expression of miR-135a in the CA1 region of non-stressed ♀; ↓ miR-135a expression in the DR of stressed ♀; Normalized the expression of miR-16 in the mPFC of stressed ♂; ↑ expression of miR-16 in the mPFC of non-stressed ♂ ↑ expression of miR-16 in CA1 region of non-stressed ♀ ↑ expression of miR-16 in the LHa of stressed ♂ ↓ expression of miR-16 in the LHa of non-stressed ♀; ↑ expression of miR-16 in the DR of stressed ♀;	[175]

Continued over

**Table 1 Studies combining stress protocol, eCB system modulation and epigenetic output in animal models (Continued)**

Pharmacological intervention	Sex, strain, age	Stress	Behavioral outputs	Molecular outputs	Reference
†: increased; ‡: decreased; ♀: female animals; ♂: male animals; AEA, anandamide; CA1, Cornus Ammonics subfield 1 of hippocampus; CB <sub>1</sub> and CB <sub>2</sub> , cannabinoid type 1 and 2 receptors; CMS, chronic mild stress; CUS, chronic unpredictable stress; DG, dentate gyrus; DNMT, DNA-methyltransferase; DR, dorsal raphe; ELS, early life stress; FAAH, fatty acid amide hydrolase; FST, forced swimming test; HDAC, histone deacetylase; KD, knockdown; KO, knockout; LHa, lateral habenula; LHT, learned helplessness test; mPFC, medial prefrontal cortex; NSFT, novelty suppressed feeding test; OFT, open field test; PFC, prefrontal cortex; PND, postnatal day; SP, sucrose preference; SPT, sucrose preference test; SR, social recognition; TRPV <sub>1</sub> , transient receptor potential vanilloid type 1.					

are less explored. Chronic stress induces depressive-like behavior and results in hypermethylation in *Cnr1* [188], including in several CpG islands of *Cnr1* gene in sperm of the stressed rats and in their offspring's brains [197]. In PTSD patients, the *Cnr1* gene was one of several uniquely methylated genes found in patient's PBMC [198], suggesting variations in CB<sub>1</sub> expression could be involved in the pathology of this disease, as well as other psychiatric diseases, as discussed in previous reviews [67,199].

Histone modifications are also found in *Cnr1* and *Faah* genes. Ethanol treatment in mice is correlated with an increase in histone acetylation marker H4K8a and *Cnr1* expression and a decrease in histone methylation marker H3K9me2 in the neocortex and hippocampus [200,201]. On the other hand, histone methylation marker H3K9me2 and mRNA expression of the *Cnr1* gene are induced at dorsal root ganglion in a model of nerve injury in mice [202]. Although no change in DNA methylation was observed in a model of binge-eating behavior, histone acetylation H3K9ac associated with the *Faah* gene and its mRNA expression decreased after frustration stress [203]. Moreover, after exposure to CUMS, histone acetylation H3K9ac decreased in the *Cnr1* gene, although its mRNA expression remained unchanged [164].

Several miRNAs are reported as modulators of genes of the eCB system, including genes of *Cnr1*, *Cnr2*, and *Faah* (Table 2). Except for the miR-let-7d, which inhibits but does not have *Cnr1* as a direct target [176], all described miRNAs have predicted pairing to their targets so far [176,192,204,205,206,207,208,209,210,211]. All these miRNAs directly bind to the transcript, inhibiting eCB-related gene expression.

Similar to what is seen in studies evaluating DNA methylation and histone modifications related to the eCB system, most works describe miRNAs regulating *Cnr1* expression in the context of stressful or psychiatric conditions. For instance, miR-128 is down-regulated in the blood of PTSD patients [224] but is up-regulated in the brain of depressed subjects [225]; however, it is also reported to increase in blood after 12 weeks of antidepressant treatment [146]. Overall, these data could suggest that miR-128 participates in disease and treatment response, but this pattern can be different depending on the psychiatric condition and the evaluated tissue. In animal models, miR-128 up-regulation is found in the amygdala, PFC, and hippocampus of stressed mice [220,225,226], which indicates it can participate in brain functions. Another miRNA, miR-301a, is also up-regulated in the brain of depressed suicide victims [227] and chronically stressed rats [228]. miR-494 findings in the blood and brain are contrasting: it was upregulated in blood of major depression patients [235] and after antidepressant treatment [146], in depression episodes [232], in a PTSD rat model [233]; however, it was downregulated in the brain of depressed suicide victims [227] or in the brain of acutely stressed rats [219]. miR-494 also had an anxiolytic effect in ethanol-exposed rats [231]. Moreover, miR-29a is up-regulated in the blood of stressed students but down-regulated in treatment-resistant depression patients [214,215]. After restraint stress, rats subjected or not to maternal separation have up-regulation of miR-29a in the amygdala and PFC [216], which is increased in the cerebral spinal fluid of MDD patients [217]; it is also increased in the frontal cortex of mice exposed to acute restraint stress [219] but decreased in the frontal cortex after chronic stress [218] and in the hippocampus 1 h after footshock stress in a fear conditioning paradigm [220]. Similarly, 1 h after fear conditioning, there was also a reduction in the miR-30b expression in the hippocampus [220], as seen after acute restraint stress [219], whereas chronic stress increases the same miR-30b in the hippocampus [223]. Another miRNA, miR-let-7d, appears to be important in various stress processes. It was reduced in the blood of MDD patients, and increased after antidepressant treatment [146,235]; its levels changed in the PFC, hypothalamus, hippocampus, and amygdala of animal models after different types of stressors [220,223,234,236]. Meanwhile, overexpression of miR-let-7d in the hippocampus has anxiolytic and antidepressant effects in mice, corroborating its function in behavior and potential impact in neuropsychiatry diseases [178]. Although there is no evidence of alterations in humans, miR-338-5p and miR-23a are altered after protocols of social stress and chronic unpredictable stress [212,223,229].



**Table 2 miRNAs related to the eCB system in animal models involving stress exposure or in psychiatric patients**

Gene	miRNA	Population/Model	Sample	Results	Reference
<b>Cnr1</b>	miR23a [192]	CSD susceptible mice	Hippocampus	↑	[212]
	miR-29a [204]	MS-ARS rats	mPFC	↑	[213]
		Treatment-resistant depression	Serum	↓	[214]
		Chronic academic stress students	Total blood	↑	[215]
		ARS mice	Basolateral amygdala	↑	[216]
	miR-29b [205]	MDD patients	Cerebral spinal fluid	↑	[217]
		CUMS mice	PFC	↓	[218]
		ARS mice	FC	↑	[219]
		Fear conditioning mice	Hippocampus	↓	[220]
	miR-30b [206]	MDD suicide subjects	PFC	↑	[221]
		ARS mice	FC	↑	[219]
		CSD rats	Ventral hippocampus	↑	[222]
		CUMS resilient mice	Amygdala	↓	[223]
		Fear conditioning mice	Hippocampus	↓	[220]
	miR-128 [207]	PTSD patients	Total blood	↓	[224]
		Tail shocks rats	Amygdala	↑	[225]
		Fear conditioning mice	PFC	↑	[226]
		Fear conditioning mice	Hippocampus	↑	[220]
		MDD patients after escitalopram treatment	Total blood	↑	[146]
		Depressed suicide subjects	Amygdala	↑	[225]
	miR-301* [192]	Depressed suicide subjects	PFC	↓	[227]
		CUMS mice	Ventral tegmental area	↓	[228]
	miR-338-5p [208]	Psychological stress susceptible mice	PFC	↑	[229]
		CUMS resilient mice	Amygdala	↓	[223]
	miR-494 [209]	Depressed suicide subjects	PFC	↓	[227]
		MDD patients	Plasma	↑	[230]
		Ethanol exposed rat overexpressing antagomiR-494	Amygdala	Anxiolytic	[231]
		MDD patients after escitalopram treatment	Total blood	↑	[146]
		MDE patients	Peripheral blood mononuclear cells	↑	[232]
		PTSD Rat model	Serum	↑	[233]
		ARS mice	FC	↓	[219]
	miRNA let-7d [176]	ARS mice	PFC	↓	[234]
		MDD patients	Total blood	↓	[235]
	MDD patients after escitalopram treatment	Total blood	↓	[146]	
	PTSD mice model	PFC	↓	[236]	
		Hypothalamus	↑	[236]	
	Mice overexpressing miRNA let-7d	Hippocampus	Anxiolytic	[178]	
			Antidepressant	[178]	
	CUMS resilient mice	Amygdala	↑	[223]	
	Fear conditioning mice	Hippocampus	↓	[220]	
<b>Cnr2</b>	miR-187-3p [210]	ARS mice	Basolateral amygdala	↓	[216]
		Contextual fear conditioning mice	Dorsal hippocampus	↓	[237]
		Extinction of contextual fear conditioning mice	Basolateral amygdala	↑	[238]
		Psychological stress susceptible mice	mPFC	↓	[229]

Continued over

**Table 2 miRNAs related to the eCB system in animal models involving stress exposure or in psychiatric patients (Continued)**

Gene	miRNA	Population/Model	Sample	Results	Reference
<i>Faah</i>	miR-665 [209] mir-411 [211]	CUMS susceptible mice	Amygdala	↓	[223]
		CUMS resilient mice	Amygdala	↑	[223]
		MS rats	Hypothalamus	↑	[239]
		MS rats	PFC	Inversely proportional to sucrose preference	[240]
		CUMS rats	Hippocampal Dentate Gyrus	↑	[241]

↑: miRNA up-regulation; ↓: miRNA down-regulation; ARS, acute restraint stress; CRS, chronic restraint stress; CSD, chronic social defeat; CUMS, chronic unpredictable mild stress; MDD, major depressive disease; mPFC, medial prefrontal cortex; MS, maternal separation; PFC, prefrontal cortex, PTSD, post-traumatic stress disorder.

These works evidence a complex control by different miRNAs, including similarities or differences among patients with different psychiatric conditions and differences in animal models involving stress exposure.

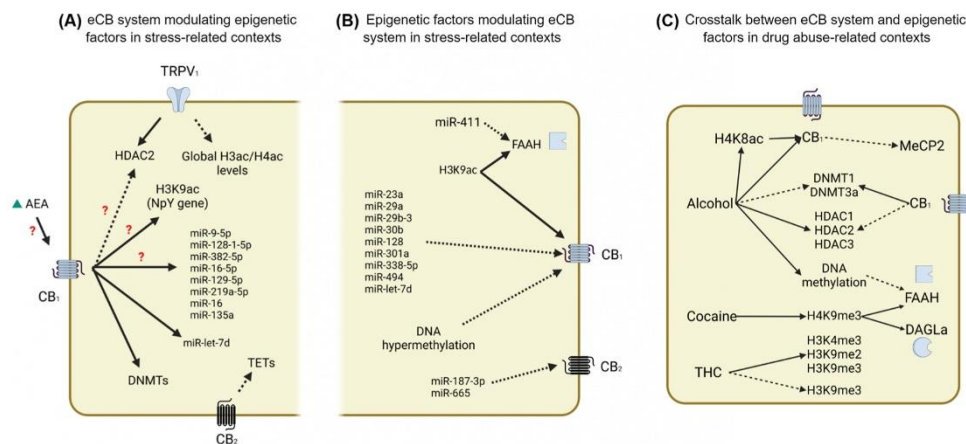
There are two miRNAs reported to modulate *Cnr2* in animal models of stress: miR-187-3p and miR-665. miR-187-3p is regulated in several stress protocols, including chronic mild stress, acute restraint stress, psychological stress, and after fear conditioning, indicating that miRNA as having an important role in stress responses in general [216,223,229,237,238]. Both acute and chronic stressors can decrease miR-187-3p expression in the amygdala, while it was up-regulated after the evaluation of extinction of conditioned fear memory [238]. Additionally, miR-665 is altered in the amygdala, being up-regulated after chronic mild stress [223]. miR-411, for the best of our knowledge, is the only FAAH miRNA regulated by stress, and it is only found regulated in animal models; it was increased in the hypothalamus, PFC, and hippocampus after maternal separation or chronic unpredictable mild stress [239–241].

eCB system genes are considerably sensitive to epigenetic control, particularly under stressful experiences, although the mechanisms are not completely elucidated. The discussed evidence highlights the importance of epigenetic mechanisms in the eCB system response to stress and in its dysfunction. For instance, histone modifications are fundamental to memory consolidation and extinction [242,243], and intervention in these processes could be key to treating trauma-related disorders. In fact, some stressors can induce histone modifications in the *Faah* and *Cnr1* genes, which can reverberate or not in mRNA expression; moreover, the histone modifications, as acetylation, is one of the proposed mechanisms for the action of antidepressant drugs [244]. Even when the gene or the protein expression is not altered, epigenetic markers can influence the gene expression pattern in response to the environment. DNA methylation and miRNA expression are already suggested as biomarkers of disorders, prognosis, treatment prediction, and response. Considering the findings with the CB<sub>1</sub> receptor in human and animal models, epigenetic modifications in the *Cnr1* gene are promising biomarkers in neuropsychiatry conditions [67].

## Possible cross-talk between eCB system and epigenetics in drug abuse and stress

The eCB system is critical to the reward-related effects of dopamine, which is involved in the neurobiological mechanism underlying drug addiction [245]. Indeed, the modulation of the eCB system regulates molecular and behavioral responses promoted by distinct addictive drugs, including psychostimulants and alcohol [246,247]. Stress is an important risk factor in the neurobiology of drug addiction [248,249]. Previous stress exposure is correlated to the vulnerability to developing the disorder and the reinstatement of drug seeking. Interestingly, behavioral and molecular evidence indicates that the eCB system is a required element in the ability of stress to modulate drug responses [250,251]. This convergence is consistent with the fact that exposure to addiction drugs promotes changes in important brain structures also involved in stress biology, such as the PFC, nucleus accumbens, hippocampus, and amygdala, which are also important targets for cannabinoids [252]. In this way, similarly to what was described for stress events, exposure to addiction drugs also modulated the eCB system, which involves epigenetic mechanisms.

For instance, cocaine self-administration (SA) promotes histone modifications and chromatin looping in the eCB system-associated genes [253]. Animals exposed to cocaine demonstrated increased H3K4me3 enrichment on the hippocampus's promotor regions of FAAH and DAGL $\alpha$  coding genes. Moreover, using a 4C-seq approach targeting the *Cnr1* promoter, authors also demonstrated that cocaine SA induces remodeling of chromatin loops in the hippocampus and the NAC, suggesting that 3D chromatin architecture at the *Cnr1* locus was substantially changed



**Figure 2. Mechanisms involved in the cross-talk between the eCB system and epigenetic mechanisms in stress- and drug abuse-related contexts**

(A) In stressful contexts, interference with the eCB system can modulate a wide range of epigenetic factors. CB<sub>1</sub> receptors, for example, modulate the expression of DNMTs and the microRNA let-7d. Moreover, the inhibition of FAAH and consequent increase in AEA levels, which may act at CB<sub>1</sub> receptors, increases the expression of several miRNAs (miR-9-5p, miR-128-1-5p, miR-382-5p, miR-16-5p, miR-129-5p, miR-219a-5p, miR-16, and miR-135a) and H3K9ac levels at npy gene, and decreases the expression and activity of HDAC2. Moreover, TRPV<sub>1</sub> receptors activation increases the expression of HDAC2 and reduces global H3/H4 acetylation levels. Finally, CB<sub>2</sub> receptors have been shown to reduce TET enzyme levels. (B) Stress can regulate eCB genes through epigenetics tools. CB<sub>1</sub> expression is reported to be sensitive to hypermethylation and increased levels of H3K9ac of the gene and affected by miRNAs (miR-23a, miR-29a, miR-29b-3, miR-30b, miR-128, miR-301a, miR-338-5p, miR-494, and miR-let-7d). FAAH expression may also be altered by H3K9ac and the miR-411. Furthermore, CB<sub>2</sub> is one target of miR-187-3p and miR-665 expression. (C) The cross-talk between the systems in the context of drug abuse is very diversified since drugs with different mechanisms of action promote different alterations. For example, alcohol increases H4K8ac in the CB<sub>1</sub> gene, and its protein expression is related to the down-regulation of MeCP2. Alcohol also down-regulates DNMT1 and DNMT3a and upregulates HDAC1, HDAC2, and HDAC3, and all these effects are blocked by CB<sub>1</sub> antagonism. Moreover, DNA methylation of the FAAH gene is affected by alcohol exposure. Cocaine consumption is reported to increase H4K9me3 in FAAH and DAGL $\alpha$  genes. Regarding exposure to cannabinoids, THC induces global levels of H3K4me3 and H3K9me2 and can increase or decrease H3K9me3 depending on the exposure. More details about these mechanisms can be found in the main text. Dashed arrows indicate inhibition or reduction. Continuous arrow indicate induction or increase. Question mark indicates that the CB<sub>1</sub> involvement after FAAH inhibition was not directed tested.

following cocaine exposure [253]. Pieces of evidence also have demonstrated that the eCB system undergoes epigenetic modulation by alcohol, as briefly mentioned before. A blind epigenome-wide analysis of datasets that explored hazardous drinkers and binge drinkers versus controls evidenced that *Faah* hypermethylation is associated with alcohol consumption [195]. Accordingly, an elevation in the expression of CB<sub>1</sub> associated with increased H4K8ac at the *Cnr1* promoter was observed in adult mice exposed to alcohol on postnatal day 7 (PD7) [254]. These results provide evidence that epigenetic mechanisms contribute to altered regulation of the eCB system in response to specific abuse drugs.

Interestingly, epigenetic changes promoted by exposure to alcohol also appear to be modulated by the eCB system. Nagre and colleagues observed that treatment with ethanol in PD7 mice impaired DNA methylation through reduced DNA methyltransferases (DNMT1 and DNMT3A) levels; these effects were reversed by the blockade of CB<sub>1</sub> before ethanol treatment [255]. Similarly, alcohol exposure at the PD7 was associated with enhanced HDAC1, HDAC2, and HDAC3 expression, which was also prevented by administering a CB<sub>1</sub> receptor antagonist before alcohol exposure [256]. Moreover, using a similar protocol, another study demonstrated that exposure to ethanol activates the apoptotic caspase-3 enzyme via CB<sub>1</sub> in neonatal mice and causes a reduction in MeCP2 levels [257]. Regarding miRNA processes, a reduction in the expression of brain CB<sub>1</sub> was coupled with an increased complementary miR-26b in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders [258].

Corroborating the role of the eCB system in the regulation of drug response during development, converging pieces of evidence support that treatment with THC in early phases of development promotes epigenetic changes [259]. For instance, prenatal THC exposure significantly modifies the histone methylation profile in the NAc. Subjects exposed to THC during prenatal stage showed a decreased level of the H3K4me3 [152]. Similarly, persistent changes in H3K9, increased dimethylation and reduced trimethylation, were observed in the NAc of adult rats following adolescent THC exposure [260]. Another study observed a significant increase of H3K9me2 in the hippocampus and the amygdala of female rats exposed to THC during adolescence [261]. Moreover, using the same adolescent THC exposure, there was an enhancement in H3K9me3 in the nucleus accumbens, hippocampus, and PFC [261,262]. Preconception THC exposure also disrupts DNA methylation in the NAc, with cross-generational effects. In a study comparing rats with or without parental THC exposure, 1027 differentially methylated regions (406 hypermethylated and 621 hypomethylated) associated with parental THC exposure were found in the subsequent generation, even though they were not directly exposed to the drug [263].

Confirming the correlation between the inheritance of paternal epigenetic changes and cannabinoid exposure, developmental changes in the offspring were associated with pre-mating paternal THC exposure [264]. Exposure to cannabinoids has also been associated with changes in sperm DNA methylation. The analysis of sperm DNA from adult rats exposed to 2 mg/kg of THC for 12 days identified 627 genes whose methylation status was altered [265]. Similarly, significant differential methylation of genes related to neurodevelopment was observed in the sperm of rats exposed to THC via oral gavage [266]. Similarly to the preclinical reports, substantial changes in both hypo- and hyper-DNA methylation, with the latter predominating, were determined in the sperm methylome of marijuana smokers [265]. The impact of cannabis exposure on DNA methylation status also was investigated directly in human spermatogenesis *in vitro*. The results revealed alterations in DNA methylation levels of genes related to autism, HCN1, and NR4A2 [267]. These studies provide compelling evidence that preconception exposure to cannabinoids can impact reproduction and paternal epigenetic inheritance, potentially leading to altered DNA methylation patterns that have an impact on gene expression and developmental outcomes in offspring.

Altogether these findings support the idea that the eCB system is involved in regulating epigenetic mechanisms and has an essential role in the effects of addictive drugs. Since this response profile also was observed with stress exposure and considering the role of stress in the neurobiology of the substance use disorder, future studies might evaluate the involvement of the eCB system in the modulation of drug addiction by stress.

## Final remarks

In the last two decades, much attention was directed toward understanding how exposure to different stressors could result in long-term changes in the organism that could result in psychiatric disorders. In this context, a boom of studies evaluating epigenetic changes in animal models and a run to find epigenetic markers related to psychiatric conditions arose, bringing many new understandings in the neurobiology of psychiatric conditions.

Among several physiological systems affected by epigenetic modulation, one has, in particular, been in the spotlight of scientists for more than 20 years: the endocannabinoid system. As overviewed in this review, the eCB system has a fundamental role in controlling many functions, including the fine control of stress response and circuits involved in drug abuse. Although not fully explored, eCB system genes are sensitive to epigenetic control [183,184,268,269]. The discussed evidence highlights the importance of epigenetic mechanisms in the eCB system response to stress, drugs of abuse, and the dysfunctions caused by them. As epigenetic marks can persist, the long-term alteration in the expression of cannabinoid-related proteins may be part of triggering diseases, particularly after stressors or substance use disorder. More recently, as discussed, many studies have investigated if the behavioral consequences of exposure to stressors in animals' models could result in epigenetic regulation of the eCB system. Changes in miRNAs that regulate eCB system molecules, for example, are observed after acute protocols of stress in animal models but also in postmortem brains of depressive subjects. Epigenetic changes can persist through generations, indicating how stress and drug exposure, for example, can modify the neurobiology along the generations.

As also discussed, in animal models, cannabinoids, including THC and CBD, promote several behavioral changes related to psychiatric disorders and induce epigenetic modifications, mainly related to DNA methylation and histone modifications. Besides, *Cannabis* use in humans appears to induce epigenetic changes not only in the eCB system but also in the dopaminergic system and others, indicating a potential mechanism by which it could lead to psychiatric disorders, including substance use disorder. Finally, exposure to cannabinoids during critical periods of brain development can induce persistent brain and behavioral changes in adulthood.

As summarized in this review, therefore, there appears to have a close relationship between modulation of the eCB system and evaluation of epigenetic changes (DNA methylation, histones modifications, and miRNAs) under

stress conditions (Figure 2A) and how epigenetic markers under stress conditions, mainly miRNAs, influence the expression of eCB-related molecules (Figure 2B). Furthermore, common drugs of abuse, including alcohol, cocaine, and cannabis (THC), could promote their long-term effects by promoting epigenetic changes that impact the eCB system (Figure 2C). The elucidation of epigenetic mechanisms controlling, or being controlled by, the eCB system in stress-related disorders is essential to better understand the neurobiology of those disorders and to provide new treatment approaches. Finally, understanding the cross-talk between those systems can potentially lead to the identification of biomarkers, such as miRNAs, which could help to predict the course of the disease and treatment response.

#### Data Availability

Data sharing is not applicable.

#### Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

#### Funding

A.A.C. and S.L.B. are receivers of FAPESP Master's fellowship [grant numbers 2021/01656-3 and 2021/05406-1]; P.H.G. is supported by an Independent Research Fund Denmark fellowship (DFF-Forskningsprojekt 1 – Project Number 8020-00310B) provided by an Academic Cooperation Agreement between FCFRP/USP and Aarhus University; S.F.L. is supported by a FAPESP Young Research Grant [grant number 2017/19731-6].

#### Open Access

Open access for the present article was enabled after accepting the invitation to contribute with an article in the *Neuronal Signaling* journal, agreement with Portland Press and the Biochemical Society.

#### CRedit Author Contribution

**Arthur A. Coelho:** Conceptualization, Writing—original draft. **Savio L. Bastos:** Conceptualization, Writing—original draft. **Pedro H. Gobira:** Writing—original draft. **Sabrina F. Lisboa:** Conceptualization, Resources, Supervision, Funding acquisition, Writing—original draft, Writing—review & editing.

#### Abbreviations

AID-APOBEC, activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex; ARS, acute restraint stress; AEA, anandamide; BLA, basolateral amygdala; CA, Ammon's horn/Cornus Ammonis subfield; CB, cannabinoid receptor; CeA, central amygdala; CNS, central nervous system; CRS, chronic restraint stress; CSD, chronic social defeat; CUMS, chronic unpredictable mild stress; D2, dopamine receptor D2; DG, dentate gyrus; DAGL, diacylglycerol lipase; DNMT, DNA methyltransferase; eCB, endocannabinoid; FAAH, fatty acid amide hydrolase; GABA, gamma-aminobutyric acid; GC, glucocorticoid; GPR55, G protein-coupled receptor 55; GR, glucocorticoid receptor; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; IL, infralimbic; MAGL, monoacylglycerol lipase; MBP, methyl-CpG binding protein; MDD, major depressive disease; MeCP2, methyl CpG binding protein 2; MeA, medial amygdala; miRNA, micro RNA; mPFC, medial prefrontal cortex; MS, maternal separation; NAc, nucleus accumbens; NAPE-PLD, N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D; NpY, neuropeptide Y; NR3C1, glucocorticoid receptor gene; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PD7, postnatal day 7; PFC, prefrontal cortex; PKA, protein kinase A; PL, prelimbic; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PTSD, post-traumatic stress disorder; SA, self-administration; SLC6A4, solute carrier family 6 member 4; TET, ten-eleven translocation enzyme; TRPV1, vanilloid receptor 1; 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; 5mC, cytosine methylated at the 5' position.

#### References

- Godoy, L.D., Rossignoli, M.T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N. and de Lima Umeoka, E.H. (2018) A comprehensive overview on stress neurobiology: basic concepts and clinical implications. *Front Behav. Neurosci.* **12**, 1–23, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>
- Yamamoto, K.R. (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* **19**, 209–252, <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.19.120185.001233>
- Wang, J.-C., Derynck, M.K., Nonaka, D.F., Khodabakhsh, D.B., Haqq, C. and Yamamoto, K.R. (2004) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15603–15608, <https://doi.org/10.1073/pnas.0407008101>
- Murphy, M.D. and Heller, E.A. (2022) Convergent actions of stress and stimulants via epigenetic regulation of neural circuitry. *Trends Neurosci.* **45**, 955–967, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.10.001>
- Zhang, W.-H., Zhang, J.-Y., Holmes, A. and Pan, B.-X. (2021) Amygdala circuit substrates for stress adaptation and adversity. *Biol. Psychiatry* **89**, 847–856, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.12.026>

- 6 Alexandra Kredlow, M., Fenster, R.J., Laurent, E.S., Ressler, K.J. and Phelps, E.A. (2022) Prefrontal cortex, amygdala, and threat processing: implications for PTSD. *Neuropsychopharmacology* **47**, 247–259, <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01155-7>
- 7 Sousa, N. (2016) The dynamics of the stress neuromatrix. *Mol. Psychiatry* **21**, 302–312, <https://doi.org/10.1038/mp.2015.196>
- 8 Le Merre, P., Åhrlund-Richter, S. and Carlén, M. (2021) The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. *Neuron* **109**, 1925–1944, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.035>
- 9 Friedman, N.P. and Robbins, T.W. (2022) The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology* **47**, 72–89, <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01132-0>
- 10 McKlveen, J.M., Myers, B. and Herman, J.P. (2015) The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. *J. Neuroendocrinol.* **27**, 446–456, <https://doi.org/10.1111/jne.12272>
- 11 Manoocheri, K. and Carter, A.G. (2022) Rostral and caudal basolateral amygdala engage distinct circuits in the prelimbic and infralimbic prefrontal cortex. *eLife* **11**, e82688, <https://doi.org/10.7554/eLife.82688>
- 12 van Aerde, K.I., Heistek, T.S. and Mansvelder, H.D. (2008) Prelimbic and infralimbic prefrontal cortex interact during fast network oscillations. *PLoS ONE* **3**, e2725, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002725>
- 13 Gabbott, P.L.A., Warner, T.A., Jays, P.R.L., Salway, P. and Busby, S.J. (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J. Comp. Neurol.* **492**, 145–177, <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- 14 Vertes, R.P. (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* **51**, 32–58, <https://doi.org/10.1002/syn.10279>
- 15 Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S. and Sanacora, G. (2012) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 22–37, <https://doi.org/10.1038/nrn3138>
- 16 Gądek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwałska, P. and Bugajski, J. (2013) Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Rep.* **65**, 1655–1662, [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71527-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71527-5)
- 17 Pandey, G.N., Rizavi, H.S., Ren, X., Fareed, J., Hoppensteadt, D.A., Roberts, R.C. et al. (2012) Proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex of teenage suicide victims. *J. Psychiatr. Res.* **46**, 57–63, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.08.006>
- 18 Banasr, M., Dwyer, J.M. and Duman, R.S. (2011) Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 730–737, <https://doi.org/10.1016/jceb.2011.09.002>
- 19 Rauch, S.L., Shin, L.M., Segal, E., Pitman, R.K., Carson, M.A., McMullin, K. et al. (2003) Selectively reduced regional cortical volumes in post-traumatic stress disorder. *Neuroreport* **14**, 913–916, <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000071767.24455.10>
- 20 Arnsten, A.F.T. (2015) Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. *Nat. Neurosci.* **18**, 1376–1385, <https://doi.org/10.1038/nn.4087>
- 21 Woo, E., Sansing, L.H., Arnsten, A.F.T. and Datta, D. (2021) Chronic stress weakens connectivity in the prefrontal cortex: architectural and molecular changes. *Chronic Stress* **5**, 24705470211029254, <https://doi.org/10.1177/24705470211029254>
- 22 Sun, Y., Gooch, H. and Sah, P. (2020) Fear conditioning and the basolateral amygdala. *F1000Research* **9**, 53
- 23 Duvarci, S., Popa, D. and Pare, D. (2011) Central amygdala activity during fear conditioning. *J. Neurosci.* **31**, 289–294, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4985-10.2011>
- 24 Hu, F., Liang, W., Zhang, L., Wang, H., Li, Z. and Zhou, Y. (2022) Hyperactivity of basolateral amygdala mediates behavioral deficits in mice following exposure to bisphenol A and its analogue alternative. *Chemosphere* **287**, 132044, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132044>
- 25 Inagaki, R., Moriguchi, S. and Fukunaga, K. (2018) Aberrant amygdala-dependent fear memory in corticosterone-treated mice. *Neuroscience* **388**, 448–459, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.004>
- 26 Siegle, G.J., Steinhauer, S.R., Thase, M.E., Stenger, V.A. and Carter, C.S. (2002) Can't shake that feeling: event-related fMRI assessment of sustained amygdala activity in response to emotional information in depressed individuals. *Biol. Psychiatry* **51**, 693–707, [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01314-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01314-8)
- 27 Lupien, S.J., Parent, S., Evans, A.C., Tremblay, R.E., Zelazo, P.D., Corbo, V. et al. (2011) Larger amygdala but no change in hippocampal volume in 10-year-old children exposed to maternal depressive symptomatology since birth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 14324–14329, <https://doi.org/10.1073/pnas.1105371108>
- 28 Frodl, T., Meisenzahl, E., Zetzsche, T., Bottlender, R., Born, C., Groll, C. et al. (2002) Enlargement of the amygdala in patients with a first episode of major depression. *Biol. Psychiatry* **51**, 708–714, [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01359-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01359-2)
- 29 Dejean, C., Courtin, J., Rozeske, R.R., Bonnet, M.C., Dousset, V., Michelet, T. et al. (2015) Neuronal circuits for fear expression and recovery: recent advances and potential therapeutic strategies. *Biol. Psychiatry* **78**, 298–306, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.017>
- 30 Thierry, A.-M., Gioanni, Y., Dégénétais, E. and Glowinski, J. (2000) Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* **10**, 411–419, [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:4%3c411::AID-HIPO7%3e3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:4%3c411::AID-HIPO7%3e3.0.CO;2-A)
- 31 Ishikawa, A. and Nakamura, S. (2003) Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. *J. Neurosci.* **23**, 9987–9995, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-31-09987.2003>
- 32 Kim, W.B. and Cho, J.-H. (2017) Synaptic targeting of double-projecting ventral CA1 hippocampal neurons to the medial prefrontal cortex and basal amygdala. *J. Neurosci.* **37**, 4868–4882, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3579-16.2017>
- 33 Çalıskan, G. and Stork, O. (2019) Hippocampal network oscillations at the interplay between innate anxiety and learned fear. *Psychopharmacology (Berl.)* **236**, 321–338, <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5109-z>
- 34 Asok, A., Kandel, E.R. and Rayman, J.B. (2019) The neurobiology of fear generalization. *Front Behav Neurosci.* **12**, 1–15, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00329>
- 35 Kim, E.J., Pellman, B. and Kim, J.J. (2015) Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn. Memory* **22**, 411–416, <https://doi.org/10.1101/lm.037291.114>

- 36 Webler, R.D., Berg, H., Fhong, K., Tuominen, L., Holt, D.J., Morey, R.A. et al. (2021) The neurobiology of human fear generalization: meta-analysis and working neural model. *Neurosci. Biobehavioral Rev.* **128**, 421–436, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.035>
- 37 Murray, F., Smith, D.W. and Hutson, P.H. (2008) Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **583**, 115–127, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.014>
- 38 Gurvits, T.V., Shenton, M.E., Hokama, H., Ohta, H., Lasko, N.B., Gilbertson, M.W. et al. (1996) Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* **40**, 1091–1099, [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(96\)00229-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(96)00229-6)
- 39 Nolan, M., Roman, E., Nasa, A., Levins, K.J., O'Hanlon, E., O'Keane, V. et al. (2020) Hippocampal and amygdalar volume changes in major depressive disorder: a targeted review and focus on stress. *Chronic Stress* **4**, 2470547020944553, <https://doi.org/10.1177/2470547020944553>
- 40 Karl, A., Schaefer, M., Malta, L.S., Dörfel, D., Rohleder, N. and Werner, A. (2006) A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **30**, 1004–1031, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.03.004>
- 41 Bremner, J.D., Randall, P., Scott, T.M., Bronen, R.A., Seibyl, J.P., Southwick, S.M. et al. (1995) MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am. J. Psychiatry* **152**, 973–981, <https://doi.org/10.1176/ajp.152.7.973>
- 42 Gilbertson, M.W., Shenton, M.E., Ciszewski, A., Kasai, K., Lasko, N.B., Orr, S.P. et al. (2002) Smaller hippocampal volume predicts pathological vulnerability to psychological trauma. *Nat. Neurosci.* **5**, 1242–1247, <https://doi.org/10.1038/nn958>
- 43 Cristino, L., Bisogno, T. and Di Marzo, V. (2020) Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **16**, 9–29, <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>
- 44 Witkin, J.M., Tzavara, E.T. and Nomikos, G.G. (2005) A role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. *Behav. Pharmacol.* **16**, 333–352, <https://doi.org/10.1097/00008877-200509000-00005>
- 45 Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G. et al. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**, 530–534, <https://doi.org/10.1038/nature00839>
- 46 Lisboa, S.F., Gomes, F.V., Silva, A.L., Uliana, D.L., Camargo, L.H.A., Guimarães, F.S. et al. (2015) Increased contextual fear conditioning in iNOS knockout mice: additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **18**, pyv005, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv005>
- 47 Terzian, A.L.B., Dos Reis, D.G., Guimarães, F.S., Corrêa, F.M.A. and Resstel, L.B.M. (2014) Medial prefrontal cortex transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl.)* **231**, 149–157, <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3211-9>
- 48 Gobira, P.H., Lima, I.V., Batista, L.A., de Oliveira, A.C., Resstel, L.B., Wotjak, C.T. et al. (2017) N-arachidonoyl-serotonin, a dual FAAH and TRPV1 blocker, inhibits the retrieval of contextual fear memory: Role of the cannabinoid CB1 receptor in the dorsal hippocampus. *J. Psychopharmacol.* **31**, 750–756, <https://doi.org/10.1177/0269881117691567>
- 49 Marzo, V.D., Bifulco, M. and Petrocellis, L.D. (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discovery* **3**, 771–784, <https://doi.org/10.1038/nrd1495>
- 50 Bassir Nia, A., Bender, R. and Harpaz-Rotem, I. (2019) Endocannabinoid system alterations in posttraumatic stress disorder: a review of developmental and accumulative effects of trauma. *Chronic Stress* **3**, 2470547019864096, <https://doi.org/10.1177/2470547019864096>
- 51 Patel, S., Hill, M.N., Cheer, J.F., Wotjak, C.T. and Holmes, A. (2017) The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. *Neurosci. Biobehavioral Rev.* **76**, 56–66, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.033>
- 52 Hill, M.N., Miller, G.E., Carrier, E.J., Gorzalka, B.B. and Hillard, C.J. (2009) Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology* **34**, 1257–1262, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.03.013>
- 53 Hungund, B.L., Vinod, K.Y., Kassir, S.A., Basavarajappa, B.S., Yalamanchili, R., Cooper, T.B. et al. (2004) Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTP-γS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Mol. Psychiatry* **9**, 184–190, <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001376>
- 54 Gonda, X., Petschner, P., Eszlari, N., Sutori, S., Gal, Z., Koncz, S. et al. (2019) Effects of different stressors are modulated by different neurobiological systems: the role of GABA-A versus CB1 receptor gene variants in anxiety and depression. *Front Cell Neurosci.* **13**, 1–12, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00138>
- 55 Mitjans, M., Serretti, A., Fabbri, C., Gastó, C., Catalán, R., Fañanás, L. et al. (2013) Screening genetic variability at the CNR1 gene in both major depression etiology and clinical response to citalopram treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* **227**, 509–519, <https://doi.org/10.1007/s00213-013-2995-y>
- 56 Domschke, K., Dannlowski, U., Ohrmann, P., Lawford, B., Bauer, J., Kugel, H. et al. (2008) Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in Major Depression. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **18**, 751–759, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.05.003>
- 57 Christensen, R., Kristensen, P.K., Bartels, E.M., Bliddal, H. and Astrup, A. (2007) Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet North Am. Ed.* **370**, 1706–1713, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61721-8)
- 58 Hill, M.N., Ho, W.-S.V., Hillard, C.J. and Gorzalka, B.B. (2008) Differential effects of the antidepressants tranylcypromine and fluoxetine on limbic cannabinoid receptor binding and endocannabinoid contents. *J. Neural Transm.* **115**, 1673–1679, <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0131-7>
- 59 Neumeister, A., Normandin, M.D., Pietrzak, R.H., Piomelli, D., Zheng, M.Q., Gujarró-Anton, A. et al. (2013) Elevated brain cannabinoid CB1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study. *Mol. Psychiatry* **18**, 1034–1040, <https://doi.org/10.1038/mp.2013.61>
- 60 Mayo, L.M., Asratian, A., Lindé, J., Holm, L., Nätt, D., Augier, G. et al. (2020) Protective effects of elevated anandamide on stress and fear-related behaviors: translational evidence from humans and mice. *Mol. Psychiatry* **25**, 993–1005, <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0215-1>

- 61 Zabik, N.L., Iadipalo, A.S., Marusak, H.A., Peters, C., Burghardt, K. and Rabinak, C.A. (2022) A common genetic variant in fatty acid amide hydrolase is linked to alterations in fear extinction neural circuitry in a racially diverse, nonclinical sample of adults. *J. Neurosci. Res.* **100**, 744–761, <https://doi.org/10.1002/jnr.24860>
- 62 Lazary, J., Eszlari, N., Juhasz, G. and Bagdy, G. (2016) Genetically reduced FAAH activity may be a risk for the development of anxiety and depression in persons with repetitive childhood trauma. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **26**, 1020–1028, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.03.003>
- 63 Lazary, J., Eszlari, N., Juhasz, G. and Bagdy, G. (2019) A functional variant of CB2 receptor gene interacts with childhood trauma and FAAH gene on anxious and depressive phenotypes. *J. Affect. Disord.* **257**, 716–722, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.07.083>
- 64 Ney, L.J., Crombie, K.M., Mayo, L.M., Felmingham, K.L., Bowser, T. and Matthews, A. (2022) Translation of animal endocannabinoid models of PTSD mechanisms to humans: Where to next? *Neurosci. Biobehavioral Rev.* **132**, 76–91, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.11.040>
- 65 Lisboa, S.F., Vila-Verde, C., Rosa, J., Uliana, D.L., Stern, C.A.J., Bertoglio, L.J. et al. (2019) Tempering aversive/traumatic memories with cannabinoids: a review of evidence from animal and human studies. *Psychopharmacology (Berl.)* **236**, 201–226, <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5127-x>
- 66 Ney, L.J., Matthews, A., Hsu, C.-M.K., Zuj, D.V., Nicholson, E., Steward, T. et al. (2021) Cannabinoid polymorphisms interact with plasma endocannabinoid levels to predict fear extinction learning. *Depress. Anxiety* **38**, 1087–1099, <https://doi.org/10.1002/da.23170>
- 67 Navarrete, F., García-Gutiérrez, M.S., Jurado-Barba, R., Rubio, G., Gasparyan, A., Austrich-Olivares, A. et al. (2020) Endocannabinoid system components as potential biomarkers in psychiatry. *Front Psychiatry* **11**, 1–30, <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00315>
- 68 Mayo, L.J., Rabinak, C.A., Hill, M.N. and Heilig, M. (2022) Targeting the endocannabinoid system in the treatment of posttraumatic stress disorder: a promising case of preclinical-clinical translation? *Biol. Psychiatry* **91**, 262–272, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.07.019>
- 69 Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C. and Freund, T.F. (2002) The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 1395–1398, <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02192.x>
- 70 Aso, E., Ozaita, A., Serra, M.-À. and Maldonado, R. (2011) Genes differentially expressed in CB1 knockout mice: Involvement in the depressive-like phenotype. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **21**, 11–22, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.06.007>
- 71 Valverde, O. and Torrens, M. (2012) CB1 receptor-deficient mice as a model for depression. *Neuroscience* **204**, 193–206, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.031>
- 72 Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R. and Valverde, O. (2002) Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl.)* **159**, 379–387, <https://doi.org/10.1007/s00213-001-0946-5>
- 73 Mikics, É., Dombi, T., Barsvári, B., Varga, B., Ledent, C., Freund, T.F. et al. (2006) The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CB1 mice. *Behav. Pharmacol.* **17**, <https://doi.org/10.1097/00008877-200605000-00003>
- 74 Beyer, C.E., Dwyer, J.M., Piesla, M.J., Platt, B.J., Shen, R., Rahman, Z. et al. (2010) Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiol. Dis.* **39**, 148–155, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.03.020>
- 75 O'Brien, L.D., Wills, K.L., Segsworth, B., Dashney, B., Rock, E.M., Limebeer, C.L. et al. (2013) Effect of chronic exposure to rimonabant and phytocannabinoids on anxiety-like behavior and saccharin palatability. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **103**, 597–602, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.10.008>
- 76 Rutkowska, M. and Jachimczuk, O. (2004) Antidepressant-like properties of ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide), the selective agonist of CB1 receptors. *Acta Pol. Pharm.* **61**, 165–167
- 77 Hill, M.N. and Gorzalka, B.B. (2005) Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **15**, 593–599, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.03.003>
- 78 Haller, J., Varga, B., Ledent, C. and Freund, T.F. (2004) CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav. Pharmacol.* **15**, 299–304, <https://doi.org/10.1097/01.fbp.0000135704.56422.40>
- 79 Ganon-Elazar, E. and Akirav, I. (2013) Cannabinoids and traumatic stress modulation of contextual fear extinction and GR expression in the amygdala-hippocampal-prefrontal circuit. *Psychoneuroendocrinology* **38**, 1675–1687, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.01.014>
- 80 Laricchiuta, D., Centonze, D. and Petrosini, L. (2013) Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. *Behav. Brain Res.* **256**, 101–107, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.010>
- 81 García-Gutiérrez, M.S. and Manzanares, J. (2010) Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J. Psychopharmacol.* **25**, 111–120, <https://doi.org/10.1177/0269881110379507>
- 82 García-Gutiérrez, M.S., García-Bueno, B., Zoppi, S., Leza, J.C. and Manzanares, J. (2012) Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 951–964, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01625.x>
- 83 García-Gutiérrez, M.S., Pérez-Ortiz, J.M., Gutiérrez-Adán, A. and Manzanares, J. (2010) Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 1773–1784, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00819.x>
- 84 Li, Y. and Kim, J. (2016) CB2 cannabinoid receptor knockout in mice impairs contextual long-term memory and enhances spatial working memory. *Neural Plast.* **2016**, 9817089, <https://doi.org/10.1155/2016/9817089>
- 85 Gerdeman, G. and Lovinger, D.M. (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J. Neurophysiol.* **85**, 468–471, <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.1.468>
- 86 Polissidis, A., Galanopoulos, A., Naxakis, G., Papahatjis, D., Papadopoulou-Daifoti, Z. and Antoniou, K. (2013) The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **16**, 393–403, <https://doi.org/10.1017/S1461145712000156>
- 87 Ferreira, S.G., Teixeira, F.M., Garção, P., Agostinho, P., Ledent, C., Cortes, L. et al. (2012) Presynaptic CB1 cannabinoid receptors control frontocortical serotonin and glutamate release – Species differences. *Neurochem. Int.* **61**, 219–226, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.05.009>
- 88 Blázquez, C., Chiarlone, A., Bellocchio, L., Resel, E., Prunssild, P., García-Rincón, D. et al. (2015) The CB1 cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. *Cell Death Differentiation* **22**, 1618–1629, <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.11>



- 89 Aso, E., Ozaita, A., Valdizán, E.M., Ledent, C., Pazos, Á., Maldonado, R. et al. (2008) BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J. Neurochem.* **105**, 565–572, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05149.x>
- 90 Zoppi, S., Madrigal, J.L., Caso, J.R., García-Gutiérrez, M.S., Manzanares, J., Leza, J.C. et al. (2014) Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2814–2826, <https://doi.org/10.1111/bph.12607>
- 91 Lisboa, S.F., Gomes, F.V., Guimarães, F.S. and Campos, A.C. (2016) Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. *Front Neurol.* **7**, <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00005>
- 92 Lisboa, S.F., Niraula, A., Resstel, L.B., Guimarães, F.S., Godbout, J.P. and Sheridan, J.F. (2018) Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. *Neuropsychopharmacology* **43**, 1924–1933, <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0064-2>
- 93 Coelho, A.A., Vila-Verde, C., Sartim, A.G., Uliana, D.L., Braga, L.A., Guimarães, F.S. et al. (2022) Inducible nitric oxide synthase inhibition in the medial prefrontal cortex attenuates the angiogenic-like effect of acute restraint stress via CB1 receptors. *Front Psychiatry* **13**, 1–11, <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.923177>
- 94 Hill, M.N., McLaughlin, R.J., Pan, B., Fitzgerald, M.L., Roberts, C.J., Lee, T.T.Y. et al. (2011) Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J. Neurosci.* **31**, 10506–10515, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0496-11.2011>
- 95 Lyko, F. (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 81–92, <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- 96 Chin, E.W.M. and Goh, E.L.K. (2019) MeCP2 dysfunction in rett syndrome and neuropsychiatric disorders. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 573–591, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9554-7\\_33](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9554-7_33)
- 97 Du, Q., Luu, P.L., Storzaker, C. and Clark, S.J. (2015) Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics* **7**, 1051–1073, <https://doi.org/10.2217/epi.15.39>
- 98 Ehrlich, M. (2019) DNA hypermethylation in disease: mechanisms and clinical relevance. *Epigenetics* **14**, 1141–1163, <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1638701>
- 99 Vinkers, C.H., Kalafateli, A.L., Rutten, B.P., Kas, M.J., Kaminsky, Z., Turner, J.D. et al. (2015) Traumatic stress and human DNA methylation: a critical review. *Epigenomics* **7**, 593–608, <https://doi.org/10.2217/epi.15.11>
- 100 Klengel, T., Pape, J., Binder, E.B. and Mehta, D. (2014) The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders. *Neuropharmacology* **80**, 115–132, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.013>
- 101 Zhang, Y. and Liu, C. (2022) Evaluating the challenges and reproducibility of studies investigating DNA methylation signatures of psychological stress. *Epigenomics* **14**, 405–421, <https://doi.org/10.2217/epi-2021-0190>
- 102 Bakusic, J., Schaufeli, W., Claes, S. and Godderis, L. (2017) Stress, burnout and depression: A systematic review on DNA methylation mechanisms. *J. Psychosom. Res.* **92**, 34–44, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2016.11.005>
- 103 Argentieri, M.A., Nagarajan, S., Seddighzadeh, B., Baccarelli, A.A. and Shields, A.E. (2017) Epigenetic pathways in human disease: the impact of DNA methylation on stress-related pathogenesis and current challenges in biomarker development. *EBioMedicine* **18**, 327–350, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.044>
- 104 Steiger, H., Labonté, B., Groleau, P., Turecki, G. and Israel, M. (2013) Methylation of the glucocorticoid receptor gene promoter in bulimic women: Associations with borderline personality disorder, suicidality, and exposure to childhood abuse. *Int. J. Eat. Disord.* **46**, 246–255, <https://doi.org/10.1002/eat.22113>
- 105 Labonté, B., Suderman, M., Maussion, G., Navarro, L., Yerko, V., Mahar, I. et al. (2012) Genome-wide epigenetic regulation by early-life trauma. *Arch. Gen. Psychiatry* **69**, 722–731, <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.2287>
- 106 Perroud, N., Paoloni-Giacobino, A., Prada, P., Oliè, E., Salzmann, A., Nicastro, R. et al. (2011) Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Transl. Psychiatry* **1**, e59, <https://doi.org/10.1038/tp.2011.60>
- 107 Radtke, K.M., Ruf, M., Gunter, H.M., Dohrmann, K., Schauer, M., Meyer, A. et al. (2011) Transgenerational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. *Transl. Psychiatry* **1**, e21, <https://doi.org/10.1038/tp.2011.21>
- 108 Tyrka, A.R., Price, L.H., Marsit, C., Walters, O.C. and Carpenter, L.L. (2012) Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults. *PLoS ONE* **7**, e30148, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030148>
- 109 Labonté, B., Azoulay, N., Yerko, V., Turecki, G. and Brunet, A. (2014) Epigenetic modulation of glucocorticoid receptors in posttraumatic stress disorder. *Transl. Psychiatry* **4**, e368, <https://doi.org/10.1038/tp.2014.3>
- 110 Vukojevic, V., Kolassa, I.T., Fastenrath, M., Gschwind, L., Spalek, K., Milnik, A. et al. (2014) Epigenetic modification of the glucocorticoid receptor gene is linked to traumatic memory and post-traumatic stress disorder risk in genocide survivors. *J. Neurosci.* **34**, 10274–10284, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1526-14.2014>
- 111 Na, K.-S., Chang, H.S., Won, E., Han, K.-M., Choi, S., Tae, W.S. et al. (2014) Association between glucocorticoid receptor methylation and hippocampal subfields in major depressive disorder. *PLoS ONE* **9**, e85425, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085425>
- 112 Yehuda, R., Flory, J.D., Bierer, L.M., Henn-Haase, C., Lehrner, A., Desarnaud, F. et al. (2015) Lower methylation of glucocorticoid receptor gene promoter 1F in Peripheral blood of veterans with posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* **77**, 356–364, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.02.006>
- 113 McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M. et al. (2009) Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat. Neurosci.* **12**, 342–348, <https://doi.org/10.1038/nn.2270>

- 114 Suderman, M., McGowan, P.O., Sasaki, A., Huang, T.C.T., Hallett, M.T., Meaney, M.J. et al. (2012) Conserved epigenetic sensitivity to early life experience in the rat and human hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 17266–17272, <https://doi.org/10.1073/pnas.1121260109>
- 115 Beach, S.R.H., Brody, G.H., Todorov, A.A., Gunter, T.D. and Philibert, R.A. (2010) Methylation at SLC6A4 is linked to family history of child abuse: An examination of the Iowa Adoptee sample. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **153B**, 710–713, <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31028>
- 116 Koehn, K.C., Uddin, M., Chang, S.-C., Aiello, A.E., Wildman, D.E., Goldmann, E. et al. (2011) SLC6A4 methylation modifies the effect of the number of traumatic events on risk for posttraumatic stress disorder. *Depress. Anxiety* **28**, 639–647, <https://doi.org/10.1002/da.20825>
- 117 Alasaari, J.S., Lagus, M., Ollila, H.M., Toivola, A., Kivimäki, M., Vahtera, J. et al. (2012) Environmental stress affects DNA methylation of a CpG rich promoter region of serotonin transporter gene in a nurse cohort. *PLoS ONE* **7**, e45813, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045813>
- 118 Kang, H.-J., Kim, J.-M., Stewart, R., Kim, S.-Y., Bae, K.-Y., Kim, S.-W. et al. (2013) Association of SLC6A4 methylation with early adversity, characteristics and outcomes in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **44**, 23–28, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.01.006>
- 119 Zhao, J., Goldberg, J., Bremner, J.D. and Vaccarino, V. (2013) Association between promoter methylation of serotonin transporter gene and depressive symptoms: A monozygotic twin study. *Psychosom. Med.* **75**, 523–529, <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3182924cf4>
- 120 Wang, D., Szyf, M., Benkelfat, C., Provençal, N., Turecki, G., Caramaschi, D. et al. (2012) Peripheral SLC6A4 DNA methylation is associated with in vivo measures of human brain serotonin synthesis and childhood physical aggression. *PLoS ONE* **7**, e39501, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039501>
- 121 Kim, J.M., Stewart, R., Kang, H.J., Kim, S.W., Shin, I.S., Kim, H.R. et al. (2013) A longitudinal study of SLC6A4 DNA promoter methylation and poststroke depression. *J. Psychiatr. Res.* **47**, 1222–1227, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.04.010>
- 122 Okada, S., Morinobu, S., Fuchikami, M., Segawa, M., Yokomaku, K., Kataoka, T. et al. (2014) The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J. Psychiatr. Res.* **53**, 47–53, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.02.002>
- 123 Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N. and Tang, Y. (2021) Overview of histone modification. In *Histone Mutations and Cancer* (Fang, D., Han, J. et al., eds), pp. 1–16, Springer Singapore, Singapore, [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1)
- 124 Lawrence, M., Dajut, S. and Schneider, R. (2016) Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression. *Trends Genet.* **32**, 42–56, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- 125 Fiori, L.M., Gross, J.A. and Turecki, G. (2012) Effects of histone modifications on increased expression of polyamine biosynthetic genes in suicide. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **15**, 1161–1166, <https://doi.org/10.1017/S1461145711001520>
- 126 Golden, S.A., Christoffel, D.J., Heshmati, M., Hodes, G.E., Magida, J., Davis, K. et al. (2013) Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression. *Nat. Med.* **19**, 337–344, <https://doi.org/10.1038/nm.3090>
- 127 Cruceanu, C., Alda, M., Nagy, C., Freemantle, E., Rouleau, G.A. and Turecki, G. (2013) H3K4 tri-methylation in synapsin genes leads to different expression patterns in bipolar disorder and major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **16**, 289–299, <https://doi.org/10.1017/S1461145712000363>
- 128 Nestler, E.J., Peña, C.J., Kundakovic, M., Mitchell, A. and Akbarian, S. (2016) Epigenetic basis of mental illness. *Neuroscientist: a Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* **22**, 447–463, <https://doi.org/10.1177/1073858415608147>
- 129 Thumfart, K.M., Jawaid, A., Bright, K., Flachsman, M. and Mansuy, I.M. (2022) Epigenetics of childhood trauma: Long term sequelae and potential for treatment. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **132**, 1049–1066, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.042>
- 130 Torres-Berrio, A., Issler, O., Parise, E.M. and Nestler, E.J. (2019) Unraveling the epigenetic landscape of depression: focus on early life stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* **21**, 341–357
- 131 Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R.L. and Nestler, E.J. (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* **9**, 519–525, <https://doi.org/10.1038/nn1659>
- 132 Réus, G.Z., Abelaira, H.M., dos Santos, M.A.B., Carlessi, A.S., Tomaz, D.B., Neotti, M.V. et al. (2013) Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav. Brain Res.* **256**, 451–456, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.041>
- 133 Nghia, N.A., Hirasawa, T., Kasai, H., Obata, C., Moriishi, K., Mochizuki, K. et al. (2015) Long-term imipramine treatment increases N-methyl-D-aspartate receptor activity and expression via epigenetic mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* **752**, 69–77, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.010>
- 134 Schmauss, C. (2015) An HDAC-dependent epigenetic mechanism that enhances the efficacy of the antidepressant drug fluoxetine. *Sci. Rep.* **5**, 8171, <https://doi.org/10.1038/srep08171>
- 135 Han, A., Sung, Y.B., Chung, S.Y. and Kwon, M.S. (2014) Possible additional antidepressant-like mechanism of sodium butyrate: targeting the hippocampus. *Neuropharmacology* **81**, 292–302, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.02.017>
- 136 Ershadi, A.S.B., Amini-Khoei, H., Hosseini, M.J. and Dehpour, A.R. (2021) SAHA improves depressive symptoms, cognitive impairment and oxidative stress: rise of a new antidepressant class. *Neurochem. Res.* **46**, 1252–1263, <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03263-8>
- 137 Hsing, C.H., Hung, S.K., Chen, Y.C., Wei, T.S., Sun, D.P., Wang, J.J. et al. (2015) Histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorated endotoxin-induced neuroinflammation and cognitive dysfunction. *Mediators Inflamm.* **2015**, 163140, <https://doi.org/10.1155/2015/163140>
- 138 Schroeder, F.A., Lin, C.L., Crusio, W.E. and Akbarian, S. (2007) Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol. Psychiatry* **62**, 55–64, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.06.036>
- 139 Panni, S., Lovering, R.C., Porras, P. and Orchard, S. (2020) Non-coding RNA regulatory networks. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 194417, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194417>
- 140 Lin, R. and Turecki, G. (2017) Noncoding RNAs in depression. In *Neuroepigenomics in Aging and Disease* (Delgado-Morales, R., ed.), pp. 197–210, Springer International Publishing, Cham, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1_11)
- 141 Snijders, C., de Nijis, L., Baker, D.G., Hauger, R.L., van den Hove, D. and Kenis, G. (2018) MicroRNAs in post-traumatic stress disorder. In *Behavioral Neurobiology of PTSD* (Vermetten, E., Baker, D.G., Risbrough, V.B. et al., eds), pp. 23–46, Springer International Publishing, Cham

- 142 Murphy, C.P. and Singewald, N. (2019) Role of MicroRNAs in anxiety and anxiety-related disorders. In *Behavioral Neurogenomics* (Binder, E.B. and Klengel, T., eds), pp. 185–219, Springer International Publishing, Cham
- 143 O'Connor, R.M., Gururajan, A., Dinan, T.G., Kenny, P.J. and Cryan, J.F. (2016) All roads lead to the miRNome: miRNAs have a central role in the molecular pathophysiology of psychiatric disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 1029–1044, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.004>
- 144 Dwivedi, Y. (2018) MicroRNAs in depression and suicide: recent insights and future perspectives. *J. Affect. Disord.* **240**, 146–154, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.07.075>
- 145 Hung, Y.-Y., Wu, M.-K., Tsai, M.-C., Huang, Y.-L. and Kang, H.-Y. (2019) Aberrant expression of intracellular let-7e, miR-146a, and miR-155 correlates with severity of depression in patients with major depressive disorder and is ameliorated after antidepressant treatment. *Cells* **8**, 1–12, <https://doi.org/10.3390/cells8070647>
- 146 Bocchio-Chiavetto, L., Maffioletti, E., Bettinsoli, P., Giovannini, C., Bignotti, S., Tardito, D. et al. (2013) Blood microRNA changes in depressed patients during antidepressant treatment. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **23**, 602–611, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.06.013>
- 147 Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.M. and Kellermann, O. (2010) miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* **329**, 1537–1541, <https://doi.org/10.1126/science.1193692>
- 148 Wang, S., Wu, W. and Claret, F.X. (2017) Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers. *Epigenetics* **12**, 187–197, <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1273308>
- 149 Pérez-Rodríguez, D., López-Fernández, H. and Agís-Balboa, R.C. (2021) Application of miRNA-seq in neuropsychiatry: a methodological perspective. *Comput. Biol. Med.* **135**, 104603, <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104603>
- 150 Rotter, A., Bayerlein, K., Hansbauer, M., Weiland, J., Sperling, W., Kornhuber, J. et al. (2013) CB1 and CB2 receptor expression and promoter methylation in patients with cannabis dependence. *Eur. Addict. Res.* **19**, 13–20, <https://doi.org/10.1159/000338642>
- 151 Liu, J., Chen, J., Ehrlich, S., Walton, E., White, T., Perrone-Bizzozero, N. et al. (2014) Methylation patterns in whole blood correlate with symptoms in schizophrenia patients. *Schizophr. Bull.* **40**, 769–776, <https://doi.org/10.1093/schbul/sbt080>
- 152 DiNieri, J.A., Wang, X., Szutorisz, H., Spano, S.M., Kaur, J., Casaccia, P. et al. (2011) Maternal cannabis use alters ventral striatal dopamine D2 gene regulation in the offspring. *Biol. Psychiatry* **70**, 763–769, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.027>
- 153 Wang, X., Dow-Edwards, D., Anderson, V., Minkoff, H. and Hurd, Y.L. (2004) In utero marijuana exposure associated with abnormal amygdala dopamine D2 gene expression in the human fetus. *Biol. Psychiatry* **56**, 909–915, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.10.015>
- 154 Ibn Lahmar Andaloussi, Z., Taghzouti, K. and Abboussi, O. (2019) Behavioural and epigenetic effects of paternal exposure to cannabinoids during adolescence on offspring vulnerability to stress. *Int. J. Dev. Neurosci.* **72**, 48–54, <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.11.007>
- 155 Innocenzi, E., De Domenico, E., Ciccarone, F., Zampieri, M., Rossi, G., Cicconi, R. et al. (2019) Paternal activation of CB2 cannabinoid receptor impairs placental and embryonic growth via an epigenetic mechanism. *Sci. Rep.* **9**, 17034, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53579-3>
- 156 Sales, A.J., Guimarães, F.S. and Joca, S.R.L. (2020) CBD modulates DNA methylation in the prefrontal cortex and hippocampus of mice exposed to forced swim. *Behav. Brain Res.* **388**, 112627, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112627>
- 157 da Silva, V.K., de Freitas, B.S., Dornelles, V.C., Kist, L.W., Bogo, M.R., Silva, M.C. et al. (2018) Novel insights into mitochondrial molecular targets of iron-induced neurodegeneration: Reversal by cannabidiol. *Brain Res. Bull.* **139**, 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.01.014>
- 158 Wanner, N.M., Colwell, M., Drown, C. and Faulk, C. (2020) Subacute cannabidiol alters genome-wide DNA methylation in adult mouse hippocampus. *Environ. Mol. Mutagen.* **61**, 890–900, <https://doi.org/10.1002/em.22396>
- 159 Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K. et al. (2010) Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* **329**, 444–448, <https://doi.org/10.1126/science.1190485>
- 160 Wu, Z., Huang, K., Yu, J., Le, T., Namihira, M., Liu, Y. et al. (2012) Dnmt3a regulates both proliferation and differentiation of mouse neural stem cells. *J. Neurosci. Res.* **90**, 1883–1891, <https://doi.org/10.1002/jnr.23077>
- 161 García-Gutiérrez, M.S., Navarrete, F., Gasparian, A., Austrich-Olivares, A., Sala, F. and Manzanera, J. (2020) Cannabidiol: a potential new alternative for the treatment of anxiety, depression, and psychotic disorders. *Biomolecules* **10**, 1–34, <https://doi.org/10.3390/biom10111575>
- 162 Todd, S.M., Zhou, C., Clarke, D.J., Chohan, T.W., Bahceci, D. and Arnold, J.C. (2017) Interactions between cannabidiol and  $\Delta^9$ -THC following acute and repeated dosing: Rebound hyperactivity, sensorimotor gating and epigenetic and neuroadaptive changes in the mesolimbic pathway. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **27**, 132–145, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.12.004>
- 163 Pastrana-Trejo, J.C., Duarte-Aké, F., Us-Camas, R., De-la-Peña, C., Parker, L., Pertwee, R.G. et al. (2021) 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. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **21**, 142–147, <https://doi.org/10.2174/1871524920666200924114524>
- 164 Lomazzo, E., König, F., Abassi, L., Jelinek, R. and Lutz, B. (2017) Chronic stress leads to epigenetic dysregulation in the neuropeptide-Y and cannabinoid CB1 receptor genes in the mouse cingulate cortex. *Neuropharmacology* **113**, 301–313, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.008>
- 165 Wang, S.E., Ko, S.Y., Kim, Y.-S., Jo, S., Lee, S.H., Jung, S.J. et al. (2018) Capsaicin upregulates HDAC2 via TRPV1 and impairs neuronal maturation in mice. *Exp. Mol. Med.* **50**, e455, <https://doi.org/10.1038/emm.2017.289>
- 166 Wang, S.E., Ko, S.Y., Jo, S., Choi, M., Lee, S.H., Jo, H.-R. et al. (2017) TRPV1 Regulates Stress Responses through HDAC2. *Cell Rep.* **19**, 401–412, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.050>
- 167 Buran, İ., Etem, E.Ö., Tektemur, A. and Elyas, H. (2017) Treatment with TREK1 and TRPC3/6 ion channel inhibitors upregulates microRNA expression in a mouse model of chronic mild stress. *Neurosci. Lett.* **656**, 51–57, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.017>
- 168 Lee, P.H., Perlis, R.H., Jung, J.Y., Byrne, E.M., Rueckert, E., Siburian, R. et al. (2012) Multi-locus genome-wide association analysis supports the role of glutamatergic synaptic transmission in the etiology of major depressive disorder. *Transl. Psychiatry* **2**, e184, <https://doi.org/10.1038/tp.2012.95>
- 169 Numakawa, T., Nakajima, S., Adachi, N., Richards, M. and Kunugi, H. (2013) Neurotrophin Bdnf and novel molecular targets in depression pathogenesis. *J. Neurol. Transl. Neurosci.* **1**, 1–8

- 170 Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., Roberts, R.C., Conley, R.C., Tamminga, C.A. and Pandey, G.N. (2001) Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *J. Neurochem.* **77**, 916–928, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00300.x>
- 171 Launay, J., Mouillet-Richard, S., Baudry, A., Pietri, M. and Kellermann, O. (2011) Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Transl. Psychiatry* **1**, e56, <https://doi.org/10.1038/tp.2011.54>
- 172 Bai, M., Zhu, X., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, L., Xue, L. et al. (2012) Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life. *PLoS ONE* **7**, e46921, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046921>
- 173 Tochigi, M., Iwamoto, K., Bundo, M., Sasaki, T., Kato, N. and Kato, T. (2008) Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neurosci. Res.* **60**, 184–191, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.10.010>
- 174 Shi, Y., Yuan, Y., Xu, Z., Pu, M., Wang, C., Zhang, Y. et al. (2012) Genetic variation in the calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) pathway is associated with antidepressant response in females. *J. Affect. Disord.* **136**, 558–566, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.10.030>
- 175 Portugalov, A., Zaidan, H., Gaisler-Salomon, I., Hillard, C.J. and Akirav, I. (2022) FAAH Inhibition restores early life stress-induced alterations in PFC microRNAs associated with depressive-like behavior in male and female rats. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1–23, <https://doi.org/10.3390/ijms232416101>
- 176 Chiarlone, A., Börner, C., Marín-Gómez, L., Jiménez-González, A., García-Concejo, A., García-Bermejo, M.L. et al. (2016) MicroRNA let-7d is a target of cannabinoid CB1 receptor and controls cannabinoid signaling. *Neuropharmacology* **108**, 345–352, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.007>
- 177 Wei, Y.B., Liu, J.J., Villaescusa, J.C., Åberg, E., Brené, S., Wegener, G. et al. (2016) Elevation of IL6 is associated with disturbed let-7 biogenesis in a genetic model of depression. *Translational Psychiatry* **6**, e869, <https://doi.org/10.1038/tp.2016.136>
- 178 Bahi, A. and Dreyer, J.-L. (2018) Lentiviral-mediated let-7d microRNA overexpression induced anxiolytic- and anti-depressant-like behaviors and impaired dopamine D3 receptor expression. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **28**, 1394–1404, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.09.004>
- 179 Zhao, C., Sun, G., Ye, P., Li, S. and Shi, Y. (2013) MicroRNA let-7d regulates the TLX/microRNA-9 cascade to control neural cell fate and neurogenesis. *Sci. Rep.* **3**, 1329, <https://doi.org/10.1038/srep01329>
- 180 Chandrasekar, V. and Dreyer, J.-L. (2009) microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate Cocaine-induced Plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* **42**, 350–362, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.08.009>
- 181 Ferber, S.G., Roth, T.L. and Weller, A. (2020) Epigenetic fragility of the endocannabinoid system under stress: risk for mood disorders and pharmacogenomic implications. *Epigenomics* **12**, 657–660, <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0037>
- 182 Salamati, J.M., Abbott, K.L., Flannery, P.C., Ledbetter, E.L. and Pondugula, S.R. (2022) Interplay between the cannabinoid system and microRNAs in cancer. *ACS Omega* **7**, 9995–10000, <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00635>
- 183 Meccariello, R., Santoro, A., Angelo, S., Morrone, R., Fasano, S., Viggiano, A. et al. (2020) The epigenetics of the endocannabinoid system. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, <https://doi.org/10.3390/ijms21031113>
- 184 Gomes, T.M., Dias da Silva, D., Carmo, H., Carvalho, F. and Silva, J.P. (2020) Epigenetics and the endocannabinoid system signaling: An intricate interplay modulating neurodevelopment. *Pharmacol. Res.* **162**, 105237, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105237>
- 185 Tao, R., Li, C., Jaffe, A.E., Shin, J.H., Deep-Soboslay, A., Yamin, R. et al. (2020) Cannabinoid receptor CNR1 expression and DNA methylation in human prefrontal cortex, hippocampus and caudate in brain development and schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **10**, 158, <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0832-8>
- 186 Wang, D., Wang, H., Ning, W., Backlund, M.G., Dey, S.K. and DuBois, R.N. (2008) Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth. *Cancer Res.* **68**, 6468–6476, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0896>
- 187 Xia, D., Wang, D., Kim, S.-H., Katoh, H. and DuBois, R.N. (2012) Prostaglandin E2 promotes intestinal tumor growth via DNA methylation. *Nat. Med.* **18**, 224–226, <https://doi.org/10.1038/nm.2608>
- 188 Hong, S., Zheng, G. and Wiley, J.W. (2015) Epigenetic regulation of genes that modulate chronic stress-induced visceral pain in the peripheral nervous system. *Gastroenterology* **148**, 148.e7–157.e7, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.032>
- 189 D'Addario, C., Micale, V., Di Bartolomeo, M., Stark, T., Pucci, M., Sulcova, A. et al. (2017) A preliminary study of endocannabinoid system regulation in psychosis: Distinct alterations of CNR1 promoter DNA methylation in patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* **188**, 132–140, <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.01.022>
- 190 Pucci, M., Micioni Di Bonaventura, M.V., Vezzoli, V., Zaplatic, E., Massimini, M., Mai, S. et al. (2019) Preclinical and clinical evidence for a distinct regulation of Mu opioid and Type 1 cannabinoid receptor genes expression in obesity. *Front. Genet.* **10**, 523, <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00523>
- 191 Mancino, S., Burokas, A., Gutiérrez-Cuesta, J., Gutiérrez-Martos, M., Martín-García, E., Pucci, M. et al. (2015) Epigenetic and proteomic expression changes promoted by eating addictive-like behavior. *Neuropsychopharmacology* **40**, 2788–2800, <https://doi.org/10.1038/npp.2015.129>
- 192 Di Francesco, A., Falconi, A., Di Germanio, C., Micioni Di Bonaventura, M.V., Costa, A., Caramuta, S. et al. (2015) Extravirgin olive oil up-regulates CB1 tumor suppressor gene in human colon cancer cells and in rat colon via epigenetic mechanisms. *J. Nutr. Biochem.* **26**, 250–258, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.013>
- 193 D'Addario, C., Zaplatic, E., Giunti, E., Pucci, M., Micioni Di Bonaventura, M.V., Scherma, M. et al. (2020) Epigenetic regulation of the cannabinoid receptor CB1 in an activity-based rat model of anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* **53**, 432–446, <https://doi.org/10.1002/eat.23271>
- 194 Börner, C., Martella, E., Höllt, V. and Kraus, J. (2012) Regulation of opioid and cannabinoid receptor genes in human neuroblastoma and T cells by the epigenetic modifiers trichostatin A and 5-Aza-2'-deoxycytidine. *NeuroImmunoModulation* **19**, 180–186, <https://doi.org/10.1159/000331474>
- 195 Chen, J., Hutchison, K.E., Bryan, A.D., Filbey, F.M., Calhoun, V.D., Claus, E.D. et al. (2018) Opposite Epigenetic associations with alcohol use and exercise intervention. *Front. Psychiatry* **9**, 594, <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00594>
- 196 D'Addario, C., Di Francesco, A., Arosio, B., Gussago, C., Dell'Osso, B., Bari, M. et al. (2012) Epigenetic regulation of fatty acid amide hydrolase in Alzheimer disease. *PLoS ONE* **7**, e39186, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039186>

- 197 Franklin, T.B., Russig, H., Weiss, I.C., Gräff, J., Linder, N., Michalon, A. et al. (2010) Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol. Psychiatry* **68**, 408–415, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.036>
- 198 Uddin, M., Aiello, A.E., Wildman, D.E., Koenen, K.C., Pawelec, G., de los Santos, R. et al. (2010) Epigenetic and immune function profiles associated with posttraumatic stress disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 9470–9475, <https://doi.org/10.1073/pnas.0910794107>
- 199 Hill, M.N., Campolongo, P., Yehuda, R. and Patel, S. (2018) Integrating endocannabinoid signaling and cannabinoids into the biology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* **43**, 80–102, <https://doi.org/10.1038/npp.2017.162>
- 200 Subbanna, S., Nagre, N.N., Umapathy, N.S., Pace, B.S. and Basavarajappa, B.S. (2015) Ethanol exposure induces neonatal neurodegeneration by enhancing CB1R exon1 histone H4K8 acetylation and up-regulating CB1R function causing neurobehavioral abnormalities in adult mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **18**, pyu028, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu028>
- 201 Subbanna, S., Shivakumar, M., Psychoyos, D., Xie, S. and Basavarajappa, B.S. (2013) Anandamide-CB1 receptor signaling contributes to postnatal ethanol-induced neonatal neurodegeneration, adult synaptic, and memory deficits. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 6350–6366, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3786-12.2013>
- 202 Luo, Y., Zhang, J., Chen, L., Chen, S.-R., Chen, H., Zhang, G. et al. (2020) Histone methyltransferase G9a diminishes expression of cannabinoid CB1 receptors in primary sensory neurons in neuropathic pain. *J. Biol. Chem.* **295**, 3553–3562, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011053>
- 203 Pucci, M., Micioni Di Bonaventura, M.V., Zaplatic, E., Bellia, F., Maccarrone, M., Cifani, C. et al. (2019) 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. *Int. J. Eat. Disord.* **52**, 51–60, <https://doi.org/10.1002/eat.22989>
- 204 Tung, C.W., Ho, C., Hsu, Y.C., Huang, S.C., Shih, Y.H. and Lin, C.L. (2019) MicroRNA-29a attenuates diabetic glomerular injury through modulating cannabinoid receptor 1 signaling. *Molecules* **24**, <https://doi.org/10.3390/molecules24020264>
- 205 Sredni, S.T., Huang, C.C., Suzuki, M., Pundy, T., Chou, P. and Tomita, T. (2016) Spontaneous involution of pediatric low-grade gliomas: high expression of cannabinoid receptor 1 (CB1R) at the time of diagnosis may indicate involvement of the endocannabinoid system. *Childs Nervous System* **32**, 2061–2067, <https://doi.org/10.1007/s00381-016-3243-7>
- 206 Li, L., Xu, Y., Zhao, M. and Gao, Z. (2020) Neuro-protective roles of long non-coding RNA MALAT1 in Alzheimer's disease with the involvement of the microRNA-30b/CNR1 network and the following PI3K/AKT activation. *Exp. Mol. Pathol.* **117**, 104545, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104545>
- 207 Gou, X., Wu, J., Huang, M., Weng, Y., Yang, T., Chen, T. et al. (2020) microRNA-128 mediates CB1 expression and regulates NF-KB/p-JNK axis to influence the occurrence of diabetic bladder disease. *J. Transl. Med.* **18**, 284, <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02406-9>
- 208 Zhang, A., Bai, Z., Yi, W., Hu, Z. and Hao, J. (2021) Overexpression of miR-338-5p in exosomes derived from mesenchymal stromal cells provides neuroprotective effects by the Cnr1/Rap1/Akt pathway after spinal cord injury in rats. *Neurosci. Lett.* **761**, 136124, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136124>
- 209 Möhnle, P., Schütz, S.V., Schmidt, M., Hinske, C., Hübner, M., Heyn, J. et al. (2014) MicroRNA-665 is involved in the regulation of the expression of the cardioprotective cannabinoid receptor CB2 in patients with severe heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **451**, 516–521, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.008>
- 210 Xu, A., Yang, Y., Shao, Y., Wu, M. and Sun, Y. (2019) Inhibiting effect of microRNA-187-3p on osteogenic differentiation of osteoblast precursor cells by suppressing cannabinoid receptor type 2. *Differentiation* **109**, 9–15, <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.07.002>
- 211 Most, D., Salem, N.A., Tiwari, G.R., Blednov, Y.A., Mayfield, R.D. and Harris, R.A. (2019) Silencing synaptic MicroRNA-411 reduces voluntary alcohol consumption in mice. *Addict. Biol.* **24**, 604–616, <https://doi.org/10.1111/adb.12625>
- 212 Huang, C., Wang, Y., Wu, Z., Xu, J., Zhou, L., Wang, D. et al. (2021) miR-98-5p plays a critical role in depression and antidepressant effect of ketamine. *Transl. Psychiatry* **11**, 454, <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01588-0>
- 213 Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Funato, H., Hobar, T., Otsuki, K. et al. (2010) Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J. Neurosci.* **30**, 15007–15018, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1436-10.2010>
- 214 Maffioletti, E., Bocchio-Chiavetto, L., Perusi, G., Carvalho Silva, R., Sacco, C., Bazzanella, R. et al. (2021) Inflammation-related microRNAs are involved in stressful life events exposure and in trauma-focused psychotherapy in treatment-resistant depressed patients. *Eur. J. Psychotraumatol.* **12**, 1987655, <https://doi.org/10.1080/20008198.2021.1987655>
- 215 Honda, M., Kuwano, Y., Katsura-Kamano, S., Kamezaki, Y., Fujita, K., Akaike, Y. et al. (2013) Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood. *PLoS ONE* **8**, e75960, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075960>
- 216 Sullivan, S.E., Jones, M.E., Jamieson, S., Rumbaugh, G. and Miller, C.A. (2019) Bioinformatic analysis of long-lasting transcriptional and translational changes in the basolateral amygdala following acute stress. *PLoS ONE* **14**, e0209846, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209846>
- 217 Wan, Y., Liu, Y., Wang, X., Wu, J., Liu, K., Zhou, J. et al. (2015) Identification of differential microRNAs in cerebrospinal fluid and serum of patients with major depressive disorder. *PLoS ONE* **10**, e0121975, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121975>
- 218 Wan, Y.-Q., Feng, J.-G., Li, M., Wang, M.-Z., Liu, L., Liu, X. et al. (2018) Prefrontal cortex miR-29b-3p plays a key role in the antidepressant-like effect of ketamine in rats. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–14, <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0164-4>
- 219 Rinaldi, A., Vincenti, S., De Vito, F., Bozzoni, I., Oliverio, A., Presutti, C. et al. (2010) Stress induces region specific alterations in microRNAs expression in mice. *Behav. Brain Res.* **208**, 265–269, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.012>
- 220 Kye, M.J., Neveu, P., Lee, Y.S., Zhou, M., Steen, J.A., Sahin, M. et al. (2011) NMDA mediated contextual conditioning changes miRNA expression. *PLoS ONE* **6**, e24682, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024682>
- 221 Gorinski, N., Bijata, M., Prasad, S., Wirth, A., Abdel Galil, D., Zeug, A. et al. (2019) Attenuated palmitoylation of serotonin receptor 5-HT1A affects receptor function and contributes to depression-like behaviors. *Nat. Commun.* **10**, 3924, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11876-5>
- 222 Pearson-Leary, J., Eacret, D., Chen, R., Takano, H., Nicholas, B. and Bhatnagar, S. (2017) Inflammation and vascular remodeling in the ventral hippocampus contributes to vulnerability to stress. *Transl. Psychiatry* **7**, e1160, <https://doi.org/10.1038/tp.2017.122>

- 223 Shen, M., Song, Z. and Wang, J.H. (2019) microRNA and mRNA profiles in the amygdala are associated with stress-induced depression and resilience in juvenile mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **236**, 2119–2142, <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05209-z>
- 224 Martin, C.G., Kim, H., Yun, S., Livingston, W., Fetta, J., Mysliwiec, V. et al. (2017) Circulating miRNA associated with posttraumatic stress disorder in a cohort of military combat veterans. *Psychiatry Res.* **251**, 261–265, <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.01.081>
- 225 Roy, B., Dunbar, M., Agrawal, J., Allen, L. and Dwivedi, Y. (2020) Amygdala-based altered miRNome and epigenetic contribution of miR-128-3p in conferring susceptibility to depression-like behavior via Wnt signaling. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **23**, 165–177, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyz071>
- 226 Lin, Q., Wei, W., Coelho, C.M., Li, X., Baker-Andresen, D., Dudley, K. et al. (2011) The brain-specific microRNA miR-128b regulates the formation of fear-extinction memory. *Nat. Neurosci.* **14**, 1115–1117, <https://doi.org/10.1038/nn.2891>
- 227 Smalheiser, N.R., Lugli, G., Rizavi, H.S., Torvik, V.I., Turecki, G. and Dwivedi, Y. (2012) MicroRNA expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. *PLoS ONE* **7**, e33201, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033201>
- 228 Sun, X., Song, Z., Si, Y. and Wang, J.-H. (2018) microRNA and mRNA profiles in ventral tegmental area relevant to stress-induced depression and resilience. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **86**, 150–165, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.05.023>
- 229 Yang, J., Sun, J., Lu, Y., An, T., Lu, W. and Wang, J.H. (2020) Revision to psychopharmacology mRNA and microRNA profiles are associated with stress susceptibility and resilience induced by psychological stress in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl.)* **237**, 3067–3093, <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05593-x>
- 230 Homorogan, C., Enatescu, V.R., Nitusca, D., Marcu, A., Seclaman, E. and Marian, C. (2021) Distribution of microRNAs associated with major depressive disorder among blood compartments. *J. Int. Med. Res.* **49**, 3000605211006633, <https://doi.org/10.1177/03000605211006633>
- 231 Teppen, T.L., Krishnan, H.R., Zhang, H., Sakharkar, A.J. and Pandey, S.C. (2016) The potential role of amygdaloid microRNA-494 in alcohol-induced anxiety. *Biol. Psychiatry* **80**, 711–719, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.10.028>
- 232 Belzeaux, R., Bergon, A., Jeanjean, V., Llorid, B., Formisano-Tréziny, C., Verrier, L. et al. (2012) Responder and nonresponder patients exhibit different peripheral transcriptional signatures during major depressive episode. *Transl. Psychiatry* **2**, e185, <https://doi.org/10.1038/tp.2012.112>
- 233 Balakathiresan, N.S., Chandran, R., Bhomia, M., Jia, M., Li, H. and Maheshwari, R.K. (2014) Serum and amygdala microRNA signatures of posttraumatic stress: fear correlation and biomarker potential. *J. Psychiatr. Res.* **57**, 65–73, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.05.020>
- 234 Solich, J., Kolasa, M., Faron-Górecka, A., Hajto, J., Piechota, M. and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2021) MicroRNA Let-7e in the mouse prefrontal cortex differentiates restraint-stress-resilient genotypes from susceptible genotype. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–16, <https://doi.org/10.3390/ijms22179439>
- 235 Maffioletti, E., Cattaneo, A., Rosso, G., Maina, G., Maj, C., Gennarelli, M. et al. (2016) Peripheral whole blood microRNA alterations in major depression and bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* **200**, 250–258, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.04.021>
- 236 Maurel, O.M., Torrisi, S.A., Barbaggio, C., Purrello, M., Salomone, S., Drago, F. et al. (2021) Dysregulation of miR-15a-5p, miR-497a-5p and miR-511-5p is associated with modulation of BDNF and FKBP5 in brain areas of PTSD-related susceptible and resilient mice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22105157>
- 237 Zhao, C., Zhou, B., Cao, J., Zhang, Y., Li, W., Wang, M. et al. (2020) miR-187-3p participates in contextual fear memory formation through modulating SATB2 expression in the hippocampus. *Neuroreport* **31**, 909–917, <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001484>
- 238 Su, J., Li, P., Zhuang, Q., Chen, X., Zhang, X., Li, X. et al. (2021) Identification of the similarities and differences of molecular networks associated with fear memory formation, extinction, and updating in the amygdala. *Front. Mol. Neurosci.* **14**, 778170, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.778170>
- 239 McKibben, L.A. and Dwivedi, Y. (2021) Early life and adult stress promote sex dependent changes in hypothalamic miRNAs and environmental enrichment prevents stress-induced miRNA and gene expression changes in rats. *BMC Genomics* **22**, 701, <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08003-4>
- 240 McKibben, L.A. and Dwivedi, Y. (2021) Early-life stress induces genome-wide sex-dependent miRNA expression and correlation across limbic brain areas in rats. *Epigenomics* **13**, 1031–1056, <https://doi.org/10.2217/epi-2021-0037>
- 241 Patrício, P., Mateus-Pinheiro, A., Irmiler, M., Alves, N.D., Machado-Santos, A.R., Morais, M. et al. (2015) Differential and converging molecular mechanisms of antidepressants' action in the hippocampal dentate gyrus. *Neuropsychopharmacology* **40**, 338–349, <https://doi.org/10.1038/npp.2014.176>
- 242 Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D. et al. (2010) Histone methylation regulates memory formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 3589–3599, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3732-09.2010>
- 243 Peixoto, L. and Abel, T. (2013) The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology* **38**, 62–76, <https://doi.org/10.1038/npp.2012.86>
- 244 Ookubo, M., Kanai, H., Aoki, H. and Yamada, N. (2013) Antidepressants and mood stabilizers effects on histone deacetylase expression in C57BL/6 mice: Brain region specific changes. *J. Psychiatr. Res.* **47**, 1204–1214, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.05.028>
- 245 Manzanares, J., Cabañero, D., Puente, N., García-Gutiérrez, M.S., Grandes, P. and Maldonado, R. (2018) Role of the endocannabinoid system in drug addiction. *Biochem. Pharmacol.* **157**, 108–121, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.09.013>
- 246 Wolfe, S.A., Vozella, V. and Roberto, M. (2022) The synaptic interactions of alcohol and the endogenous cannabinoid system. *Alcohol Res.: Curr. Rev.* **42**, 03, <https://doi.org/10.35946/arcr.v42.1.03>
- 247 Gobira, P.H., Joca, S.R. and Moreira, F.A. (2022) Roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the modulation of psychostimulant responses. *Acta Neuropsychiatrica* **1–11**, <https://doi.org/10.1017/neu.2022.23>
- 248 Mantsch, J.R., Baker, D.A., Funk, D., Le, A.D. and Shaham, Y. (2016) Stress-induced reinstatement of drug seeking: 20 years of progress. *Neuropsychopharmacology* **41**, 335–356, <https://doi.org/10.1038/npp.2015.142>
- 249 Bardo, M.T., Hammerslag, L.R. and Malone, S.G. (2021) Effect of early life social adversity on drug abuse vulnerability: focus on corticotropin-releasing factor and oxytocin. *Neuropharmacology* **191**, 108567, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108567>

- 250 Tung, L.W., Lu, G.L., Lee, Y.H., Yu, L., Lee, H.J., Leishman, E. et al. (2016) Orexins contribute to restraint stress-induced cocaine relapse by endocannabinoid-mediated disinhibition of dopaminergic neurons. *Nat. Commun.* **7**, 12199, <https://doi.org/10.1038/ncomms12199>
- 251 McReynolds, J.R., Doncheck, E.M., Li, Y., Vranjkovic, O., Graf, E.N., Ogasawara, D. et al. (2018) Stress promotes drug seeking through glucocorticoid-dependent endocannabinoid mobilization in the prelimbic cortex. *Biol. Psychiatry* **84**, 85–94, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.024>
- 252 Sinha, R. (2008) Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1141** (1), 105–130, <https://doi.org/10.1196/annals.1441.030>
- 253 De Sa Nogueira, D., Bourdy, R., Alcalá-Vida, R., Filliol, D., Andry, V., Goumon, Y. et al. (2022) Hippocampal cannabinoid 1 receptors are modulated following cocaine self-administration in male rats. *Mol. Neurobiol.* **59**, 1896–1911, <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02722-9>
- 254 Subbanna, S., Nagre, N.N., Umapathy, N.S., Pace, B.S. and Basavarajappa, B.S. (2014) Ethanol exposure induces neonatal neurodegeneration by enhancing CB1R Exon1 histone H4K8 acetylation and up-regulating CB1R function causing neurobehavioral abnormalities in adult mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **18**, 1–15, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu028>
- 255 Nagre, N.N., Subbanna, S., Shivakumar, M., Psychoyos, D. and Basavarajappa, B.S. (2015) CB1-receptor knockout neonatal mice are protected against ethanol-induced impairments of DNMT1, DNMT3A, and DNA methylation. *J. Neurochem.* **132**, 429–442, <https://doi.org/10.1111/jnc.13006>
- 256 Shivakumar, M., Subbanna, S., Joshi, V. and Basavarajappa, B.S. (2020) Postnatal ethanol exposure activates HDAC-mediated histone deacetylation, impairs synaptic plasticity gene expression and behavior in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **23**, 324–338, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyaa017>
- 257 Subbanna, S., Nagre, N.N., Shivakumar, M., Joshi, V., Psychoyos, D., Kutlar, A. et al. (2018) CB1R-mediated activation of caspase-3 causes epigenetic and neurobehavioral abnormalities in postnatal ethanol-exposed mice. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 45, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00045>
- 258 Stringer, R.L., Laufer, B.I., Kleiber, M.L. and Singh, S.M. (2013) Reduced expression of brain cannabinoid receptor 1 (Cnr1) is coupled with an increased complementary micro-RNA (miR-26b) in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders. *Clin. Epigenetics* **5**, 14, <https://doi.org/10.1186/1868-7083-5-14>
- 259 Szutorisz, H. and Hurd, Y.L. (2018) High times for cannabis: Epigenetic imprint and its legacy on brain and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **85**, 93–101, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.011>
- 260 Tomasiewicz, H.C., Jacobs, M.M., Wilkinson, M.B., Wilson, S.P., Nestler, E.J. and Hurd, Y.L. (2012) Proenkephalin mediates the enduring effects of adolescent cannabis exposure associated with adult opiate vulnerability. *Biol. Psychiatry* **72**, 803–810, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.04.026>
- 261 Prini, P., Penna, F., Sciuccati, E., Alberio, T. and Rubino, T. (2017) Chronic  $\Delta$ 8-THC exposure differently affects histone modifications in the adolescent and adult rat brain. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, <https://doi.org/10.3390/ijms18102094>
- 262 Prini, P., Rusconi, F., Zamberletti, E., Gabaglio, M., Penna, F., Fasano, M. et al. (2018) Adolescent THC exposure in female rats leads to cognitive deficits through a mechanism involving chromatin modifications in the prefrontal cortex. *J. Psychiatry Neurosci.* **43**, 87–101, <https://doi.org/10.1503/jpn.170082>
- 263 Watson, C.T., Szutorisz, H., Garg, P., Martin, Q., Landry, J.A., Sharp, A.J. et al. (2015) Genome-wide DNA methylation profiling reveals epigenetic changes in the rat nucleus accumbens associated with cross-generational effects of adolescent THC exposure. *Neuropsychopharmacology* **40**, 2993–3005, <https://doi.org/10.1038/npp.2015.155>
- 264 Levin, E.D., Hawkey, A.B., Hall, B.J., Cauley, M., Slade, S., Yazdani, E. et al. (2019) Paternal THC exposure in rats causes long-lasting neurobehavioral effects in the offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* **74**, 106806, <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.04.003>
- 265 Murphy, S.K., Itchon-Ramos, N., Visco, Z., Huang, Z., Grenier, C., Schrott, R. et al. (2018) Cannabinoid exposure and altered DNA methylation in rat and human sperm. *Epigenetics* **13**, 1208–1221, <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1554521>
- 266 Schrott, R., Rajavel, M., Acharya, K., Huang, Z., Acharya, C., Hawkey, A. et al. (2020) Sperm DNA methylation altered by THC and nicotine: Vulnerability of neurodevelopmental genes with bivalent chromatin. *Sci. Rep.* **10**, 16022, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72783-0>
- 267 Schrott, R., Greeson, K.W., King, D., Symosko Crow, K.M., Easley, C.A. and Murphy, S.K. (2022) Cannabis alters DNA methylation at maternally imprinted and autism candidate genes in spermatogenic cells. *Systems Biol. Reproduct. Med.* **68**, 357–369, <https://doi.org/10.1080/19396368.2022.2073292>
- 268 D'Addario, C., Di Francesco, A., Pucci, M., Finazzi Agrò, A. and Maccarrone, M. (2013) Epigenetic mechanisms and endocannabinoid signalling. *FEBS J.* **280**, 1905–1917, <https://doi.org/10.1111/febs.12125>
- 269 Rusconi, F., Rubino, T. and Battaglioli, E. (2020) Endocannabinoid-epigenetic cross-talk: a bridge toward stress coping. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–13, <https://doi.org/10.3390/ijms21176252>

## 9.2.2. Anexo C: Inducible nitric oxide synthase inhibition in the medial prefrontal cortex attenuates the anxiogenic-like effect of acute restraint stress via CB<sub>1</sub> receptors



# Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition in the Medial Prefrontal Cortex Attenuates the Anxiogenic-Like Effect of Acute Restraint Stress *via* CB<sub>1</sub> Receptors

Arthur A. Coelho<sup>1,2†</sup>, Carla Vila-Verde<sup>1†</sup>, Ariandra G. Sartim<sup>2</sup>, Daniela L. Uliana<sup>1,3</sup>, Laura A. Braga<sup>1</sup>, Francisco S. Guimarães<sup>1</sup> and Sabrina F. Lisboa<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmacology Department, Ribeirão Preto Medical School-University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Biomolecular Sciences Department, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto-University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup>Departments of Neuroscience, Psychiatry and Psychology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, United States

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Maria Bove,  
University of Foggia, Italy

#### Reviewed by:

Giuseppe Di Giovanni,  
University of Malta, Malta  
Álvaro Llorente-Berzal,  
National University of Ireland  
Galway, Ireland

#### \*Correspondence:

Sabrina F. Lisboa  
sabrinalisboa@usp.br

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share first  
authorship

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Psychiatry,  
a section of the journal  
Frontiers in Psychiatry

Received: 19 April 2022

Accepted: 06 June 2022

Published: 14 July 2022

#### Citation:

Coelho AA, Vila-Verde C, Sartim AG,  
Uliana DL, Braga LA, Guimarães FS  
and Lisboa SF (2022) Inducible Nitric  
Oxide Synthase Inhibition in the Medial  
Prefrontal Cortex Attenuates the  
Anxiogenic-Like Effect of Acute  
Restraint Stress via CB<sub>1</sub> Receptors.  
*Front. Psychiatry* 13:923177.  
doi: 10.3389/fpsy.2022.923177

Stress exposure can result in several proinflammatory alterations in the brain, including overexpression of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) in the medial prefrontal cortex (mPFC). These changes may be involved in the development of many psychiatric conditions. However, it is unknown if iNOS in mPFC plays a significant role in stress-induced behavioral changes. The endocannabinoid (ECB) system is also influenced by stress. Its activation seems to be a counter regulatory mechanism to prevent or decrease the stress-mediated neuroinflammatory consequences. However, it is unclear if the ECB system and iNOS interact to influence stress consequences. This study aimed to test the hypothesis that the anti-stress effect of iNOS inhibition in mPFC involves the local ECB system, particularly the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors. Male Wistar rats with guide cannula aimed at the mPFC were submitted to acute restraint stress (RS) for 2 h. In the following morning, rats received bilateral microinjections of vehicle, AM251 (CB<sub>1</sub> antagonist; 100 pmol), and/or 1400W (iNOS selective inhibitor; 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, or 10<sup>-2</sup> nmol) into the prelimbic area of mPFC (PL-mPFC) before being tested in the elevated plus-maze (EPM). iNOS inhibition by 1400W prevented the anxiogenic-like effect observed in animals submitted to RS. The drug did not promote behavior changes in naive animals, demonstrating a stress-dependent effect. The 1400W-anti-stress effect was prevented by local pretreatment with AM251. Our data suggest that iNOS inhibition may facilitate the local endocannabinoid signaling, attenuating stress effects.

**Keywords:** iNOS, CB<sub>1</sub> receptor, medial prefrontal cortex, stress, anxiety

## INTRODUCTION

Stress exposure is linked to a persistent stage of low inflammatory levels in the periphery and central nervous system, predisposing the individual to develop several pathologies like diabetes, cancer, and cardiovascular diseases (1–4). In this context, the disbalance of immunological components, combined with dysfunctional neuroendocrine and neurotransmitter systems, appears to contribute to psychiatric disorders, such as major depression, anxiety, schizophrenia, and



posttraumatic stress disorder (PTSD) (4–11). Due to such relevance, many researchers worldwide turned their eyes to study the relationship between stress, neuroinflammation, and the development of psychiatric diseases.

Different stressors release danger/damage-associated molecular patterns (DAMPs) or “alarmins” involved in sterile inflammation, which can alter mood, increasing the risk of psychiatric disorders (12, 13). DAMPs, such as ATP, heat shock proteins, and high mobility group box1 (HMGB1) acting through pattern recognition receptors (PPRs), and proinflammatory mediators such as IL-1 $\beta$ , activate the transcription factor nuclear factor Kappa-B (NF- $\kappa$ B) (14). NF- $\kappa$ B is a significant regulator of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) isoform (15). iNOS expression and activation increase nitric oxide (NO) synthesis (15), potentially resulting in oxidative/nitrosative stress and neurotoxicity (16).

NMDA receptors activation by glutamate release, which increases in the medial prefrontal cortex (mPFC) during and after stress (17–19), also activates NF- $\kappa$ B (20). Mice exposure to restraint stress (RS) associated with acoustic stress augments iNOS expression in the mPFC (21). Similarly, RS alone increased iNOS activity in the cortex of rats (20). Besides, genetic deletion of iNOS and its systemic pharmacological inhibition reduced stress-elicited behavioral consequences (22). Despite this evidence, the role of iNOS specifically in the mPFC in developing stress-related behaviors is not entirely understood. Previously we demonstrated that the inhibition of neuronal NOS (nNOS) in the prelimbic region of mPFC (PL-mPFC) reverted the anxiogenic-like effect induced by acute stress (23). However, the role of iNOS in this region in stress modulation is still poorly explored. Thus, our first aim is to test the hypothesis that, similar to nNOS, the local inhibition of iNOS in the PL-mPFC reduces the anxiogenic-like effect induced by acute stress.

Exposure to stressful events may also stimulate the endocannabinoid (ECB) system (24). This system can act through retrograde neuromodulators, the endocannabinoids (ECBs), which include anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). These two ECBs act on presynaptic CB<sub>1</sub> receptors, reducing the Ca<sup>2+</sup> influx and decreasing glutamate release (25, 26). They can also activate CB<sub>2</sub> receptors, found predominantly in immune cells, like microglia (27), and show postsynaptic expression in neurons (28).

The ECB system is considered a stress-buffer system, preventing or attenuating stress-related emotional consequences. This neuromodulatory system also regulates proinflammatory mediators (29–32). Evidence suggests a functional interaction between the ECB and nitergic systems in brain regions engaged by exposure to aversive stimuli (33–35), including in the mPFC (36). Moreover, CB<sub>1</sub> KO mice have increased NOS activity in the brain (37) and pharmacological or genetic inhibition of cannabinoid receptors increases iNOS expression in the PFC after stress (31, 38). Therefore, iNOS inhibition may facilitate stress adaptation by favoring the ECB signaling. Thus, the second aim of this study is to test if the anti-stress effect of iNOS inhibition in the PL-mPFC depends on the CB<sub>1</sub> signaling.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

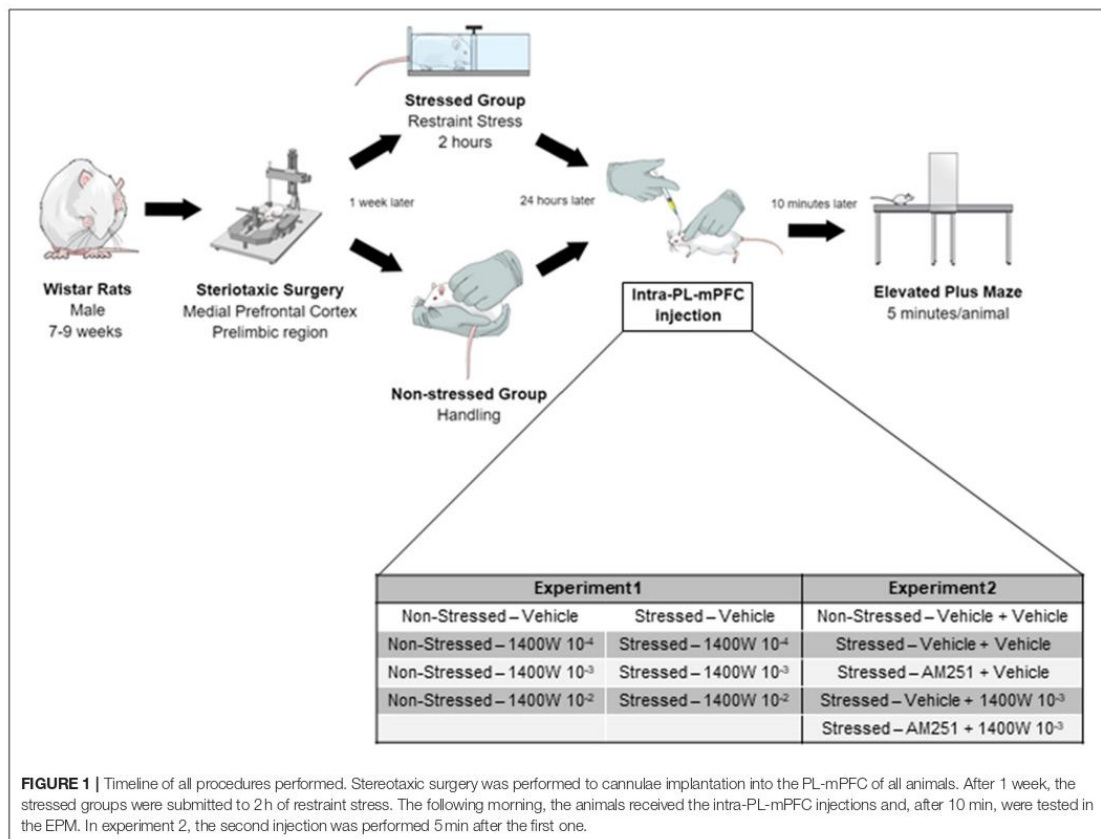
In the first part of this study (Experiment 1), male Wistar rats (240–300 g, 7–8 weeks old) were acquired from the animal facility of the University of São Paulo, campus Ribeirão Preto. However, this strain production was discontinued at Ribeirão Preto. Therefore, for Experiment 2 Wistar rats were obtained from the Anilab company (Paulínia, São Paulo, Brazil). Animals from different suppliers were not used in the same experiment. Rats were kept in the animal care unit of the Pharmacology Department (FMRP/USP). Rats were housed in groups of four animals per cage (acrylic boxes - 49 × 34 × 26 cm) in a temperature-controlled room (24 ± 1°C) under standard laboratory conditions: 12-h light/dark cycle (lights on at 06:00 a.m.), humidity of 50–55%, with free access to food (Nuvital, Nuvilab, Brazil) and filtered water. All experimental procedures, summarized in **Figure 1**, were approved by the Ethical Review Committee of the Medical School of Ribeirão Preto (protocol no. 224/2017). All efforts were made to reduce the suffering and the number of animals used in this study.

### Drugs

The selective, potent, and irreversible inhibitor of the iNOS enzyme, N-([3-(Aminomethyl)phenyl]methyl)ethanimidamide dihydrochloride (1400 W; Sigma-Aldrich, USA), at the doses of 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, and 10<sup>-2</sup> nmol/0.2  $\mu$ L/side, was dissolved in sterile saline. 1400 W doses were calculated based on the Ki for nNOS of a selective nNOS inhibitor, n-propyl-L-arginine (NPLA; 0.01 nmol/0.2  $\mu$ L). The dose of 0.01 nmol/0.2  $\mu$ L of NPLA in the mPFC attenuates immobility time in the forced swimming test (39). Based on this dose and the Ki of NPA (Ki = 57 nM) and 1400 W (Ki = 2,000 nM) for nNOS, we calculated the dose of 1400 W that would be equipotent to the dose of NPA to inhibit nNOS (~0.35 nmol). Considering that the Ki of 1400 W for inhibiting iNOS is around 286 times lower than that for inhibiting nNOS (7 nM), we calculated the dose of 0.0012 nmol (1.2 × 10<sup>-3</sup> nmol) of 1400 W would selectively inhibit iNOS. Higher and lower 1400 W doses were also employed based on this last dose.

The CB<sub>1</sub> receptor antagonist, N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251, Tocris, USA), 100 pmol/0.2  $\mu$ L/side, was dissolved in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in saline (0.9% NaCl). This dose was based on previous data (40–43). Drugs were freshly prepared before use, kept on ice, and protected from light during experimental sessions. Each control group received the corresponding vehicle of the drug being tested (1400 W: saline, 0.2  $\mu$ L/side, and AM251: 10% DMSO in saline, 0.2  $\mu$ L/side).

For the stereotaxic surgery, we administered the general anesthetic 2,2,2-Tribromoethanol (2.5%, 1 ml/kg-Sigma-Aldrich, USA), the local anesthetic lidocaine (2%-Dentsply, Brazil), the poly antibiotic preparation of streptomycin and penicillin (1.200.000 UI–0.2 ml/rat; Pentabiotic-Fort Dodge, Brazil), and



**FIGURE 1** | Timeline of all procedures performed. Stereotaxic surgery was performed to cannulae implantation into the PL-mPFC of all animals. After 1 week, the stressed groups were submitted to 2 h of restraint stress. The following morning, the animals received the intra-PL-mPFC injections and, after 10 min, were tested in the EPM. In experiment 2, the second injection was performed 5 min after the first one.

the anti-inflammatory flunixin meglumine (s.c., 0.025 g/kg; Banamine®-Schering Plough, Brazil) for postoperative analgesia.

### Stereotaxic Surgery

Five to seven days before the stress procedure, stereotaxic surgeries were performed in rodents to implant stainless steel guide cannula (11 mm, 0.6 mm outer diameter-OD) bilaterally into the pre- limbic region of the medial prefrontal cortex (PL-mPFC). Animals were previously anesthetized with 2,2,2-Tribromoethanol intraperitoneally (i.p.) and placed in the stereotaxic frame (Stoelting, USA). The skull was surgically exposed for cannulae implantation after scalp anesthesia with 2% lidocaine subcutaneous (s.c.). Based on the rat brain atlas (44), stereotaxic coordinates used were: AP: +3.3 mm from Bregma, L: +1.9 mm from the medial suture, V: -2.4 mm of the skull, and cannulae angle was 22°. The position of the incisor bar was adjusted to -3.2 mm. Guide cannulae were fixed to the skull with acrylic cement and a metal screw; a stylet inside the cannulae prevented obstruction. The animals received antibiotic (intramuscular - i.m. - Pentabiotic) and anti-inflammatory (s.c.-Banamine)

injections during the surgery to avoid infections and induce analgesia.

### Restraint-Stress (RS)

One day before the behavioral test, animals were submitted to the restraint-stress (RS). Rodents were immobilized in metallic tubes (20 × 7 × 4 cm) with adjustable roof and ventilation holes for 2 h. The non-stressed animals received handling procedures during the restraint session. The protocol was conducted in a sound-attenuated and temperature-controlled (24°C) room. At the end of the RS, the animals (stressed and non-stressed) were individually housed in acrylic cages (36 × 25 × 24 cm) until the behavioral test. Handling and restraint stress were performed in the morning.

### Drug Microinjection

Animals received bilateral injections (0.2 µL each) into the PL-mPFC using a dental needle (33 G/0.3 mm OD), 1 mm longer than the guide cannula, connected via polyethylene tubing (PE-10) to a 10-µl syringe (7001-KH; Hamilton Co., USA). Needles were carefully inserted into the guide cannula, and the solution

was infused for over 30 s with the help of an infusion pump (KD Scientific, Massachusetts, USA). The needles remained in the cannulae for an additional 30 s to prevent reflux.

### Elevated Plus Maze (EPM) and Experimental Design

All experiments were carried out between 7 a.m. and 2 p.m. Animals were transported to a sound-attenuated and temperature-controlled (24°C) room for habituation before starting experimental procedures. The injections were performed as described in the previous section. Ten minutes after the last injection, animals were subjected to the Elevated Plus Maze (EPM). The wood apparatus consists of two opposite open arms (50 cm length × 10 cm width), crossed at a right angle by two closed arms with the exact dimensions, enclosed by 40 cm high walls with no roof. The maze is 50 cm from the ground. The ANY-Maze™ software (version 4.7, Stoelting) (RRID: SCR\_014289) performed the behavior analysis of the movies recorded through a video camera. This software detects the animal's position within the maze by contrasting the animal's color with the maze floor and calculates the number of entries onto the arms and the time spent in the open arms. Each test lasted 5 min, and the apparatus was cleaned with an alcohol solution between trials.

All animals were habituated for at least 1 h in the experimental room. In the first experiment, rats received microinjections of vehicle (saline - 0.9% NaCl) or 1400 W ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ , or  $10^{-2}$  nmol) into the PL-mPFC. 10 min later, they were tested on the EPM. Similarly, in the second experiment, animals received a first local injection of vehicle (10% DMSO in saline) or AM251 (100 pmol) followed, 5 min later, by the second injection of vehicle (saline-0.9% NaCl) or 1400 W ( $10^{-3}$  nmol) into the PL-mPFC. They were tested on the EPM 10 min later.

### Histological Procedure

In the afternoon that followed the behavioral tests, the rats were anesthetized with chloral hydrate 5% (1 mL/kg, i.p.) and perfused with isotonic saline followed by 10% formalin solution. As a site marker, 0.2 μL of 1% Evan's blue dye was bilaterally injected into the PL-mPFC. The brains were postfixed in 10% formalin solution for 24 h, and sections of 40 μm were cut using a cryostat (CM-1900; Leica, Wetzlar, Germany). The injection sites were identified with the help of the rat brain atlas (44). Representative photomicrography of the injection sites into the PL-mPFC can be seen in Figure 2. Rats receiving injections outside the aimed area were excluded from the analyses.

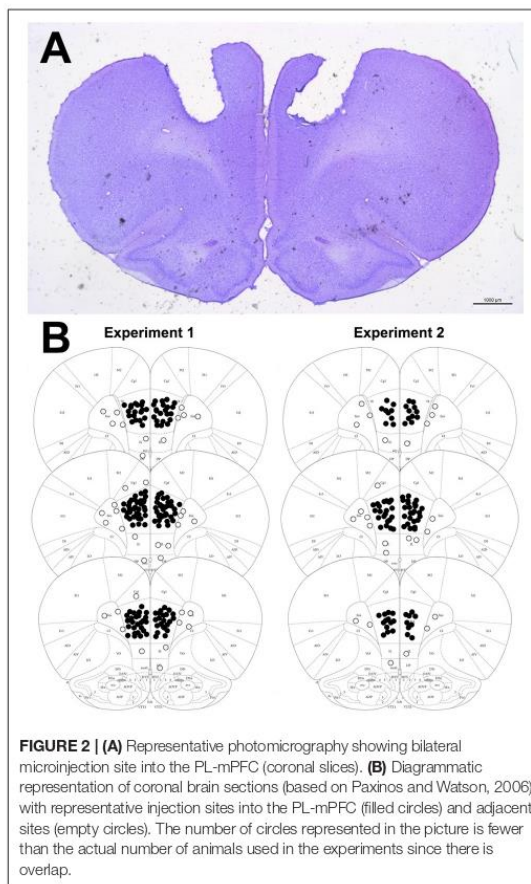
### Statistical Analysis

The anxiety index was calculated for each animal as in equation 1 (45):

#### Anxiety index

$$= 100 - \left[ \frac{\% \text{ entries in the open arms} + \% \text{ time in the open arms}}{2} \right]$$

The percentage of entries and time in the open arms of the maze were plotted and analyzed separately.



**FIGURE 2 | (A)** Representative photomicrography showing bilateral microinjection site into the PL-mPFC (coronal slices). **(B)** Diagrammatic representation of coronal brain sections (based on Paxinos and Watson, 2006) with representative injection sites into the PL-mPFC (filled circles) and adjacent sites (empty circles). The number of circles represented in the picture is fewer than the actual number of animals used in the experiments since there is overlap.

All data were tested for normality and homogeneity of variance by the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Welch's correction was performed to adjust the calculations of F and t ratios and degrees of freedom to adjust for heterogeneity of within-group variances. Behavioral parameters were expressed as the means ± standard error of the mean (SEM). For the first experiment, the anxiety index (percentage of entries and time in the open arm) and the number of enclosed arms entries were analyzed. First, all groups were analyzed by two-way Analysis of Variance (ANOVA), considering stress (condition) and treatment as factors to be analyzed. After that, naïve and stressed rats that received vehicle were compared by unpaired Student's *t*-test to verify stress interference. Then, each condition's data (naïve and stressed animals) were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. For the second experiment, there was no drug administration in naïve rats. Therefore, naïve and stressed-vehicle groups were compared by unpaired Student's *t*-test. After that, data from the stressed group were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Statistical differences were considered

significant when  $p < 0.05$ . Statistical tendency was considered if  $p = 0.06-0.1$ .

## RESULTS

### Intra-PL-mPFC Injection of 1400 W Reversed the Stress-Induced Anxiogenic-Like Effect in the Elevated Plus-Maze

In the anxiety index, a two-way ANOVA indicated a significant interaction between the factors (condition  $\times$  treatment) [ $F_{(3,79)} = 2.866, p = 0.041$ , two-way ANOVA]. Comparing naïve-vehicle and stressed-vehicle, we observed that acute restraint stress (RS) induced an anxiogenic-like effect in the EPM 24h later, increasing the anxiety index [ $t_{(23,35)} = 3.344, p = 0.002$ , unpaired  $t$ -test with Welch's correction] (Figure 3A). One-way ANOVA of stressed groups revealed that 1400 W ( $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  nmol) reversed the stress-induced anxiogenic-like effect [ $F_{(3,32)} = 6.399, p = 0.001$ , one-way ANOVA;  $10^{-3}$  nmol:  $p = 0.007$ ;  $10^{-2}$  nmol:  $p = 0.004$ , Tukey's *post hoc*]. A dose-response curve was generated by non-linear regression ( $r^2 = 0.374, df = 33$ ) (Figure 3D). 1400 W did not alter behavior in non-stressed animals [ $F_{(3,47)} = 0.173, p = 0.914$ , one-way ANOVA] (Figure 3C). In addition, no changes were observed in the enclosed arm entries, suggesting that neither acute stress nor 1400 W affected basal motor activity ( $p > 0.05$ ) (Figure 3B).

The analysis of the percentage of time and entries in the open arms of the EPM indicated the same conclusions. In the percentage of time spent in the open arms, there was an effect of condition [ $F_{(1,79)} = 5.820, p = 0.018$ ] and treatment [ $F_{(3,79)} = 2.756, p < 0.049$ ]. Moreover, there was a tendency for an interaction between the factors (condition  $\times$  treatment) in the percentage of time [ $F_{(3,79)} = 2.450, p = 0.069$ ] and entries [ $F_{(3,79)} = 2.545, p = 0.062$ ] in the open arms. When comparing vehicle-treated groups, RS reduced the percentage of entries [ $t_{(32)} = 2.669, p = 0.011$ , unpaired  $t$ -test] and time [ $t_{(21,55)} = 4.253, p = 0.0003$ , unpaired  $t$ -test with Welch's correction] in the open arms, suggesting an anxiogenic-like effect. Doses of  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  reversed the reduction in the percentage of entries [ $F_{(3,32)} = 4.383, p = 0.010$ , one-way ANOVA] [ $10^{-3}$  nmol:  $p = 0.036$ ;  $10^{-2}$  nmol:  $p = 0.022$ , Tukey's *post hoc*] (Figure 3E), and percentage of time [ $F_{(3,32)} = 6.611, p = 0.001$ , one-way ANOVA] [ $10^{-3}$  nmol:  $p = 0.005$ ;  $10^{-2}$  nmol:  $p = 0.005$ , Tukey's *post hoc*] (Figure 3F) in the open arms of the EPM. None of the doses affected the non-stressed animals ( $p > 0.05$ ).

### A CB<sub>1</sub> Receptor Antagonist Injected Into the PL-mPFC Prevented 1400 W Effects on Stress-Induced Behavioral Consequences in the Elevated Plus-Maze

Once again, RS induced an anxiogenic-like effect in the EPM, evidenced by the increase in the anxiety index [ $t_{(20)} = 2.206, p = 0.039$ ]. One-way ANOVA also revealed a significant effect of treatment in stressed animals [ $F_{(3,35)} = 4.584, p = 0.008$ ]. Confirming our previous result, the 1400 W injection (lower effective dose:  $10^{-3}$  nmol) reversed the stress effect ( $p = 0.012$ ,

Tukey's *post hoc*). Prior intra-PL-mPFC injection of the CB<sub>1</sub> receptor antagonist AM251 blocked the 1400 W effect ( $p > 0.999$  compared with Stress-Veh+Veh group; and  $p = 0.021$  compared with Stress-Veh+1400 W group, Tukey's *post hoc*). AM251 did not induce any effect *per se* ( $p = 0.939$ , Tukey's *post hoc*) (Figure 4A). No significant difference was observed in the enclosed arm entries ( $p > 0.05$ ) (Figure 4B).

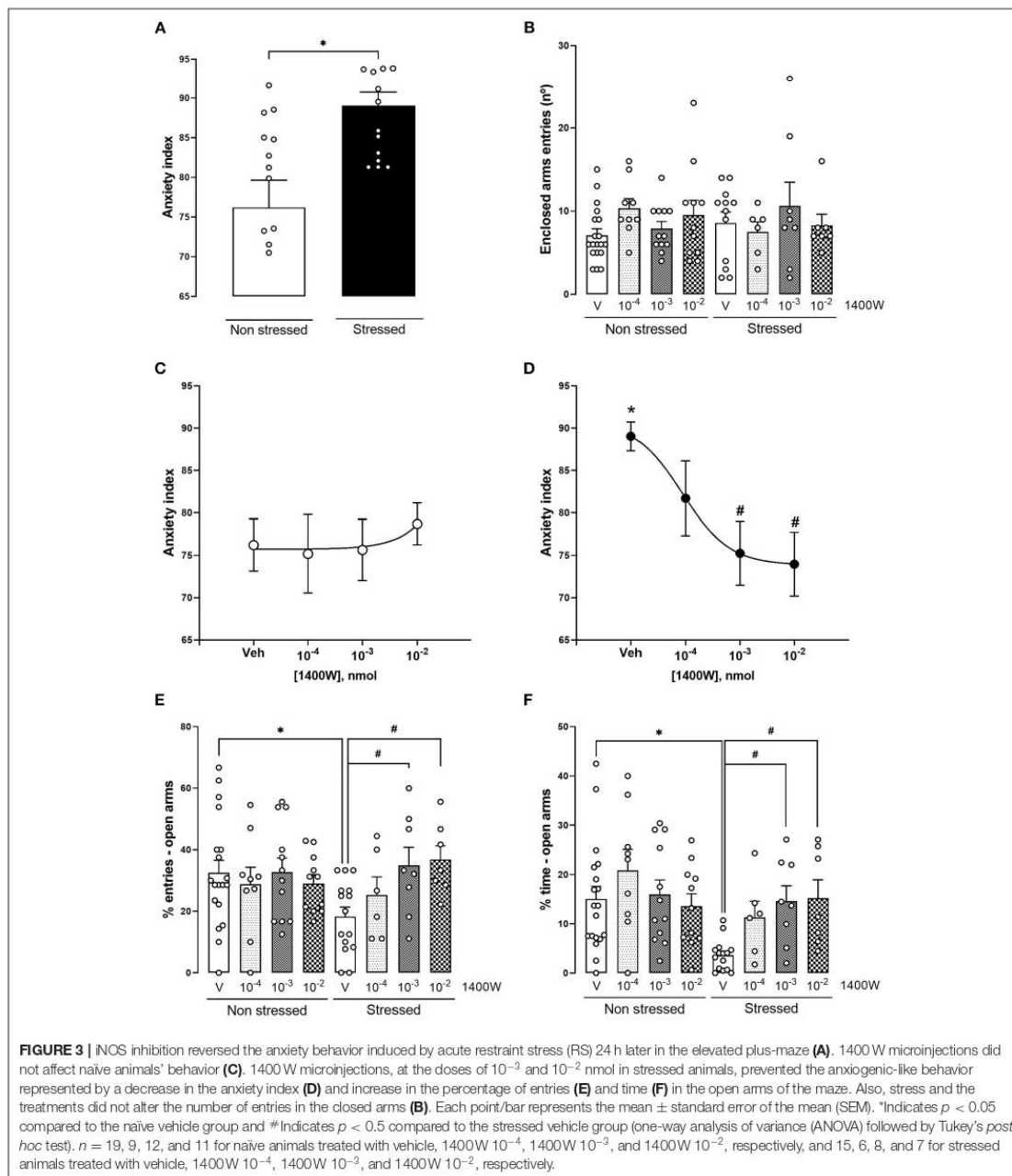
Similar conclusions were reached from the analysis of the percentage of entries and time in the open arms of the maze individually. RS increased the percentage of entries [ $t_{(20)} = 2.148, p = 0.044$ ] and tended to increase the percentage of time [ $t_{(20)} = 2.075, p = 0.051$ ] in the open arms of the EPM. The one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment in stressed animals [%entries:  $F_{(3,35)} = 5.004, p = 0.005$ ; %time:  $F_{(3,35)} = 3.686, p = 0.020$ ]. 1400 W reversed the stress-induced anxiogenic-like effect (%entries:  $p = 0.008$ ; %time:  $p = 0.030$ , Tukey's *post hoc*). The previous administration of AM251 blocked 1400 W effect (%entries:  $p = 0.997$ ; %time:  $p > 0.999$ , Tukey's *post hoc*). AM251 had no effect *per se* (%entries:  $p = 0.957$ ; %time:  $p = 0.930$ , Tukey's *post hoc*) (Figures 4C,D).

## DISCUSSION

Our study confirms previous data showing that acute RS in rats induced anxiogenic-like behavior (23, 46–48). The administration of the selective inhibitor of iNOS 1400 W into the PL-mPFC reversed this anxiogenic effect but did not affect unstressed animals, suggesting that iNOS was activated by stress. Furthermore, we observed that the anti-stress effect of 1400 W is blocked by the antagonist AM251, indicating that it depends on the endocannabinoid signaling, particularly CB<sub>1</sub> receptors.

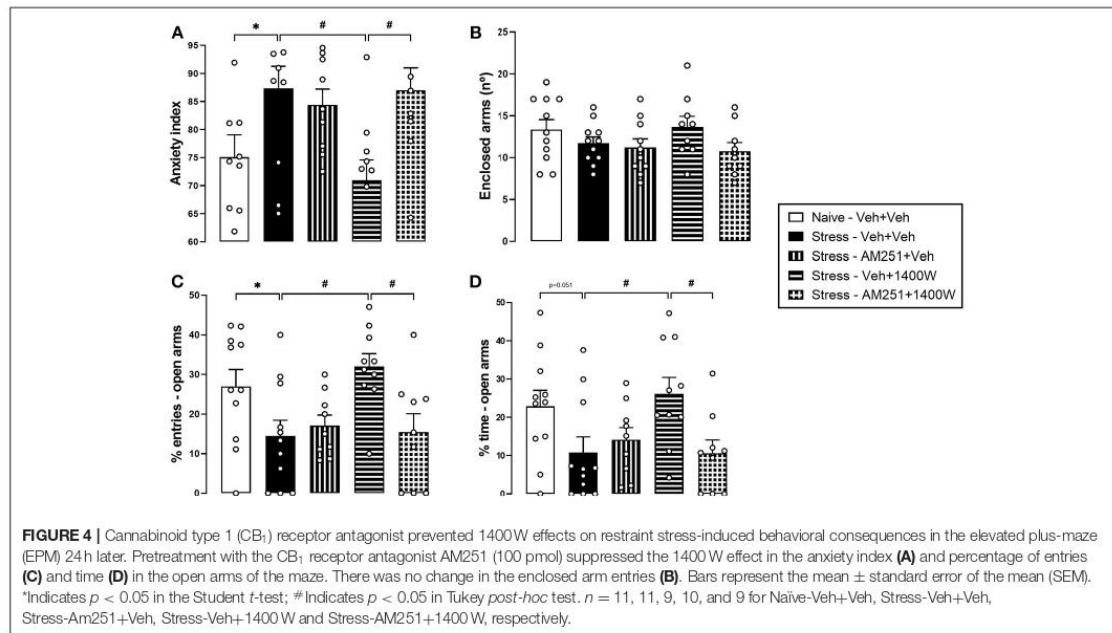
RS induces several neurotransmitter changes. It increases glutamate levels (17, 48), alters the release of corticosterone (49, 50), and changes proinflammatory cytokines levels by activating NF- $\kappa$ B (51, 52). In addition, depending on the duration and the number of episodes, stress induces behavioral changes, including depressive- (51) and anxious-like (23, 46–48) behaviors. Our results showed that 2-h of RS decreased the exploration of open arms of EPM (percentage of entries and time), increasing the anxiety index. Also, stress did not alter the number of entries in the closed arms of EPM, suggesting that this was not a motor effect.

The PFC is connected to several brain areas and promotes the integration between stimuli, playing a pivotal role in decision making, goal-directed behaviors, and working memory (53, 54). However, the precise role of each of its subdivisions in these processes is still under debate. The PL-mPFC projects to the "stress circuit areas," such as the basolateral amygdala (54, 55). It seems to be involved with stress response control and anxiety-related behaviors (55, 56). Stress exposure can promote plastic changes in the PL-mPFC (57, 58), increasing the expression of c-fos protein (59) or the firing rate of local neurons during acute stress (60), for example. Furthermore, stress increases monoamines, glutamate, and glucocorticoid release (17, 61, 62) and alters the dendritic morphology of PL (63). Finally,



stressful events increase the expression and activity of iNOS in the mPFC (21, 64, 65). These findings suggest that PL-mPFC hyperactivation in response to stress could influence behavior

and contribute to the anxiogenic effect. Moreover, as observed in the present work with iNOS, modulation of the local changes induced by stress could reverse the behavioral consequences



of stress exposure. Previous studies (66, 67), including from our group (68), showed that systemic administration of iNOS inhibitors could induce anxiolytic-like effects, attenuate stress effects, or induce antidepressant-like effects. Altogether, the present results suggest that the mPFC could be a possible target of these drugs.

NO modulates several functions in the CNS, such as neurotransmitter release, synaptic plasticity, and neuroprotection (69–71). However, when at high concentrations, it can produce harmful actions (72). Increased NO levels, as observed in stressful situations, positively modulate glutamate release, which could create positive feedback and facilitate excitotoxicity (73, 74). Furthermore, NO can promote S-nitrosylation of cysteine thiol groups of several proteins, interfering with their functions (72, 75, 76). For example, the S-nitrosylation of protein-disulphide isomerase (PDI) in patients with neurodegenerative disorders inhibits its enzymatic activity, leading to the accumulation of polyubiquitinated proteins in the brain (77). Moreover, S-nitrosylation can result in protein misfolding, mitochondrial dysfunction, synaptic damage, and neuronal cell death (77). Overall, these changes induced by NO could negatively impact behavior.

Acute intense stress increased NO metabolites (NO<sub>x</sub>) levels in the PL-mPFC and induced anxiety-like behavior (78). Also, anxiety-like behavior caused by acute restraint stress was reverted by intra-PL-mPFC injection of an nNOS inhibitor (23). Moreover, intra-hippocampal injection of aminoguanidine,

an iNOS inhibitor, prevented depressive behaviors induced by chronic stress (79). As far as we know, this is the first study demonstrating that, similarly to the latter study, inhibition of the iNOS enzyme directly in the PL-mPFC reverses the stress-induced anxiogenic-like effect. Considering previous evidence observed with nNOS inhibitors administered into the same brain region (23), the present data adds more complexity to NO's regulatory mechanisms in the mPFC, implicating iNOS involvement in the anxiogenic-like effect induced by stress. It is worth mentioning that the calculated dose of 1400W was based on its *K<sub>i</sub>* values, which is almost 300 times lower to inhibit iNOS than for inhibiting nNOS. Therefore, considering 1400W high selectivity for iNOS, it is unlikely that the doses used promote nNOS inhibition, strengthening the involvement of iNOS in the present study. The complexity of NO signaling could be attributed in part to the expression of NOS isoforms by different cell types, but also by several mechanisms by which NO can affect proteins and systems function (80). For future studies, it would be interesting to perform a combination of subeffective doses of the different isoform inhibitors to evaluate the possible attenuation of the stress effect.

The effect of 1400W in the PL-mPFC was only observed in stressed rats, suggesting that even if iNOS is constitutively expressed in some brain areas in the healthy brain (81), stress exposure increases its expression or activity, which would be necessary to observe the behavioral changes. Therefore, the 1400W effect is dependent on stress-induced molecular alterations.

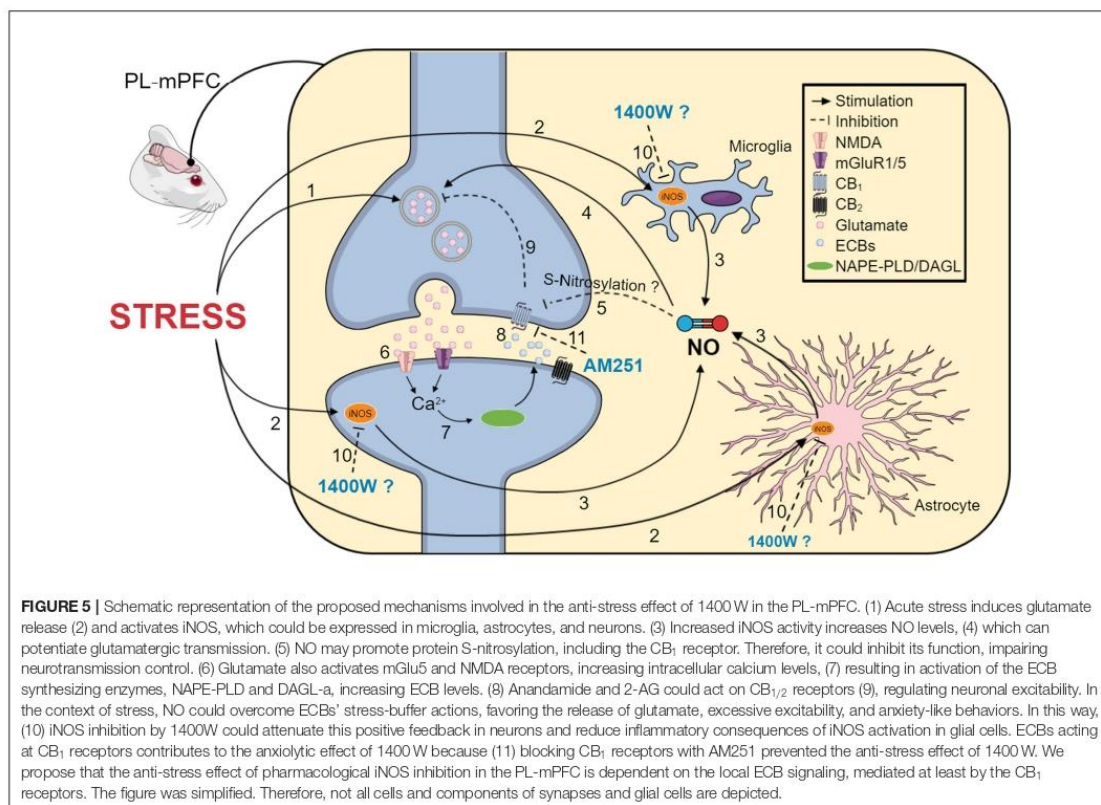
The NO signaling can regulate and be regulated by the ECB system (33–35, 74, 80, 82). For example, it is well-established that CB<sub>1</sub> receptor activation reduces glutamatergic neurotransmission, which could be important to avoid the previously mentioned excitotoxicity induced by NO and glutamate (74). Moreover, activation of CB receptors by anandamide in microglia attenuates iNOS activation via activation of the MAPK phosphatase-1 (MKP-1) (83). In addition, the overexpression of CB<sub>1</sub> receptors in the spinal cord reduced the expression of NF- $\kappa$ B, TLR4, and IL-17 in this region (84). On the other hand, NO can regulate the activity of G protein-coupled receptors via S-nitrosylation of cysteine residues (75, 76). It was shown in a study with brain slices that after treatment with S-nitrosothiols, CB<sub>1</sub> receptor agonists had reduced efficacy in <sup>35</sup>S GTP Binding Assay (85). Therefore, we speculate that stress-induced iNOS activation and increase in NO levels could S-nitrosylate CB<sub>1</sub> receptors, impairing its signaling in the mPFC. This possibility, however, still needs to be addressed.

The CB<sub>1</sub> receptor is expressed in the mPFC (40, 86), and its activation usually attenuates anxiety-like behaviors in stressful conditions (38, 40). Moreover, a CB<sub>1</sub> agonist decreased stress-induced iNOS expression in the cortex of mice (87). Finally, CB<sub>1</sub> KO mice have increased NOS activity in the hippocampus

(37). Together, these results suggest that the nitergic and endocannabinoid systems could play opposite roles in regulating stress-induced anxiety behavior in the PL-mPFC. Corroborating this proposal, we found that the anti-stress effect of 1400 W in this region was blocked by the previous administration of the CB<sub>1</sub> antagonist AM251.

iNOS is constitutively expressed in neurons in some brain regions (81) and astrocytes in cortical tissue (88). However, its expression increases significantly in microglia after inflammatory stimuli (81). Psychological stressors activate microglia (89) and increase iNOS expression in the brain, particularly in the PFC (64). Increased NO production is involved in stress response (23, 29, 78). Therefore, it is possible that the anti-stress effect of 1400 W results from inhibition of iNOS activity and NO production in microglial cells, reducing the neuronal impact of stress. However, we cannot exclude that iNOS inhibition also occurs in neurons.

Microglia cells synthesize and release ECBs (90, 91), and stress activates the ECB system (98). Then, iNOS inhibition may facilitate the ECB signaling, buffering the stress response. Accordingly, AM251 reversed the anti-stress effect of 1400 W. Considering that CB<sub>1</sub> receptors are predominantly expressed by neurons in the brain and that a CB<sub>1</sub> antagonist reversed



the 1400W effect, we suggest that, in the presence of an iNOS inhibition, local ECBs could regulate neuronal excitability through CB<sub>1</sub> receptors and prevent the manifestation of the stress response in the EPM.

In conclusion, our results indicate that the iNOS in the PL-mPFC is also involved in the behavioral consequences of acute stress exposure. Moreover, the present data strengthens the proposal that there is a crosstalk between the nitric and endocannabinoid systems, particularly CB<sub>1</sub> receptors, in modulating stress and anxiety behaviors. As summarized in **Figure 5**, we propose that the behavioral effects after restraint stress may be caused by increased glutamate release, which is potentiated by NO synthesis from iNOS. NO could promote S-nitrosylation of several proteins, including CB<sub>1</sub>. In this case, it could inhibit CB<sub>1</sub> function, impairing neurotransmission control. Under homeostatic conditions, the activation of the endocannabinoid system, resulting in the release of anandamide and 2-AG, could be able to counteract the stress effects. However, when this signaling is impaired, the anxiogenic effect prevails. By inhibiting iNOS, we can attenuate the positive feedback mentioned before, allowing the endocannabinoid activity to regulate the synaptic neurotransmission, resulting in an anxiolytic effect.

## NOMENCLATURE

Resource Identification Initiative ANY-maze  
(RRID: SCR\_014289).

## REFERENCES

- Farah C, Michel LYM, Balligand JL. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol.* (2018) 15:292–316. doi: 10.1038/nrcardio.2017.224
- Ptaschinski C, Lukacs NW. "Acute and chronic inflammation induces disease pathogenesis," in *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease*. Elsevier Inc. (2018). p. 25–43 doi: 10.1016/B978-0-12-802761-5.00002-X
- Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology.* (2012) 37:137–62. doi: 10.1038/npp.2011.205
- Miller AH, Haroon E, Felger JC. Therapeutic implications of brain-immune interactions: treatment in translation. *Neuropsychopharmacology.* (2017) 42:334–59. doi: 10.1038/npp.2016.167
- Jones KA, Thomsen C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Mol Cell Neurosci.* (2013) 53:52–62. doi: 10.1016/j.mcn.2012.10.002
- Beumer W, Gibney SM, Drexhage RC, Pont-Lezica L, Doorduyn J, Klein HC, et al. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J Leukoc Biol.* (2012) 92:959–75. doi: 10.1189/jlb.0212100
- Leonard BE. Inflammation, depression and dementia: are they connected? *Neurochem Res.* (2007) 32:1749–56. doi: 10.1007/s11064-007-9385-y
- Leonard BE. Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major depression: an insight into the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (2014) 48:261–7. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.10.018
- Leonard BE, Schwarz M, Myint AM. The metabolic syndrome in schizophrenia: is inflammation a contributing cause? *J Psychopharmacol.* (2012) 26:33–41. doi: 10.1177/0269881111431622

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Ethical Review Committee, Ribeirão Preto Medical School (protocol no. 224/2017).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SL and FG designed the study. AC, CV-V, AS, DU, and LB performed the experiments and developed the data analysis. AC and CV-V wrote the manuscript. All authors approved the final version.

## FUNDING

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Grant numbers: 2017/24304-0 and 2017/19731-6), CAPES (PROEX) and CNPq.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Miriam Contim Melo and Marcos Antônio de Carvalho for technical assistance.

- Na KS, Jung HY, Kim YK. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (2014) 48:277–86. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.10.022
- Rohleder N, Joksimovic L, Wolf JM, Kirschbaum C. Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry.* (2004) 55:745–51. doi: 10.1016/j.biopsych.2003.11.018
- Franklin TC, Xu C, Duman RS. Depression and sterile inflammation: essential role of danger associated molecular patterns. *Brain Behav Immun.* (2018) 72:2–13. doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.025
- Troubat R, Barone P, Leman S, Desmidt T, Cressant A, Atanasova B, et al. Neuroinflammation and depression: a review. *Eur J Neurosci.* (2021) 53:151–71. doi: 10.1111/ejn.14720
- Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J. Dealing with danger in the CNS: the response of the immune system to injury. *Neuron.* (2015) 87:47–62. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.019
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* (2004) 75:639–53. doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.042
- Zlatković J, Filipović D. Bax and B-cell-lymphoma 2 mediate proapoptotic signaling following chronic isolation stress in rat brain. *Neuroscience.* (2012) 223:238–45. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.005
- Moghaddam B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.* (1993) 60:1650–7. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb13387.x
- Moghaddam B, Bolinao ML, Stein-Behrens B, Sapolsky R. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.* (1994) 655:251–4. doi: 10.1016/0006-8993(94)91622-5
- Bagley J, Moghaddam B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects



- of pretreatment with saline or diazepam: *Neuroscience*. (1997) 77:65–73. doi: 10.1016/S0306-4522(96)00435-6
20. Madrigal JLM, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castellano A, Boscá L, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor  $\kappa$ B-mediated mechanisms. *J Neurochem*. (2001) 76:532–8. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00108.x
  21. Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JLM, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, et al. Stress-induced neuroinflammation: role of the toll-like receptor-4 pathway. *Biol Psychiatry*. (2013) 73:32–43. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.07.005
  22. Montezuma K, Bijoone C, Lisboa SF, Cunha FQ, Guimarães FS, Joca SRL. Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacology*. (2012) 62:485–91. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.09.004
  23. Vila-Verde C, Marinho ALZ, Lisboa SF, Guimarães FS. Nitric oxide in the prefrontal medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. *Neuroscience*. (2016) 320:30–42. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.040
  24. Riebe CJ, Wojtak CT. Endocannabinoids and stress. *Stress*. (2011) 14:384–97. doi: 10.3109/10253890.2011.586753
  25. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. (2020) 16:9–29. doi: 10.1038/s41582-019-0284-z
  26. Hillard CJ. Stress regulates endocannabinoid-CB1 receptor signaling. *Semin Immunol*. (2014) 26:380–8. doi: 10.1016/j.smim.2014.04.001
  27. Komorowska-Müller JA, Schmöle AC. CB2 receptor in microglia: the guardian of self-control. *Int J Mol Sci*. (2021) 22:19. doi: 10.3390/ijms22010019
  28. Yin AQ, Wang F, Zhang X. Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression. *Acta Pharmacol Sin*. (2019) 40:336–41. doi: 10.1038/s41401-018-0051-5
  29. Lisboa SF, Gomes FV, Guimarães FS, Campos AC. Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. *Front Neurol*. (2016) 7:5. doi: 10.3389/fneur.2016.00005
  30. Lisboa SF, Gomes FV, Silva AL, Uliana DL, Camargo LHA, Guimarães FS, et al. Increased contextual fear conditioning in inos knockout mice: additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol*. (2015) 18:pyv005. doi: 10.1093/ijnp/pyv005
  31. Zoppi S, Madrigal JL, Caso JR, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Leza JC, et al. Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. *Br J Pharmacol*. (2014) 171:2814–26. doi: 10.1111/bph.12607
  32. Lisboa SF, Niraula A, Resstel LB, Guimarães FS, Godbout JP, Sheridan JF. Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN5,521-2. *Neuropsychopharmacology*. (2018) 43:1924–33. doi: 10.1038/s41386-018-0064-2
  33. Lisboa SF, Guimarães FS. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology*. (2012) 62:2455–62. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.02.008
  34. Lisboa SF, Magesto AC, Aguiar JC, Resstel LBM, Guimarães FS. Complex interaction between anandamide and the nitric system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. *Neuropharmacology*. (2013) 75:86–94. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.07.008
  35. Lisboa SF, Camargo LHA, Magesto AC, Resstel LBM, Guimarães FS. Cannabinoid modulation of predator fear: involvement of the dorsolateral periaqueductal gray. *Int J Neuropsychopharmacol*. (2014) 17:1193–206. doi: 10.1017/S1461145713001788
  36. Uliana DL, Antero LS, Borges-Assis AB, Rosa J, Vila-Verde C, Lisboa SF, et al. Differential modulation of the contextual conditioned emotional response by CB1 and TRPV1 receptors in the ventromedial prefrontal cortex: possible involvement of NMDA/nitric oxide-related mechanisms. *J Psychopharmacol*. (2020) 34:1043–55. doi: 10.1177/0269881120928201
  37. Sun HK, Seok JW, Xiao OM, Ledent C, Jin K, Greenberg DA. Role for neuronal nitric-oxide synthase in cannabinoid-induced neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*. (2006) 319:150–4. doi: 10.1124/jpet.106.107698
  38. Zoppi S, Pérez Nievas BG, Madrigal JLM, Manzanares J, Leza JC, García-Bueno B. Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*. (2011) 36:805–18. doi: 10.1038/npp.2010.214
  39. Pereira VS, Romano A, Wegener G, Joca SRL. Antidepressant-like effects induced by NMDA receptor blockade and NO synthesis inhibition in the ventral medial prefrontal cortex of rats exposed to the forced swim test. *Psychopharmacology*. (2015) 232:2263–73. doi: 10.1007/s00213-014-3853-2
  40. Lisboa SF, Reis DG, da Silva AL, Corrêa FMA, Guimarães FS, Resstel LBM. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int J Neuropsychopharmacol*. (2010) 13:1163–73. doi: 10.1017/S1461145710000684
  41. Lisboa SF, Borges AA, Nejo P, Fassini A, Guimarães FS, Resstel LB. Cannabinoid CB1 receptors in the dorsal hippocampus and prefrontal medial prefrontal cortex modulate anxiety-like behavior in rats: additional evidence. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (2015) 59:76–83. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.01.005
  42. Lisboa SF, Resstel LBM, Aguiar DC, Guimarães FS. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Eur J Pharmacol*. (2008) 593:73–8. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.07.032
  43. Resstel LBM, Lisboa SF, Aguiar DC, Corrêa FMA, Guimarães FS. Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. *Psychopharmacology*. (2008) 198:405–11. doi: 10.1007/s00213-008-1156-1
  44. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. San Diego, CA: Academic Press (2006).
  45. Mazar A, Matar MA, Kaplan Z, Kozlovsky N, Zohar J, Cohen H. Gender-related qualitative differences in baseline and post-stress anxiety responses are not reflected in the incidence of criterion-based PTSD-like behaviour patterns. *World J Biol Psychiatry*. (2009) 10:856–69. doi: 10.1080/15622970701561383
  46. Resstel LBM, Tavares RF, Lisboa SF, Joca SRL, Corrêa FMA, Guimarães FS. 5-HT<sub>1A</sub> receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol*. (2009) 156:181–8. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00046.x
  47. Padovan CM, del Bel EA, Guimarães FS. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav*. (2000) 67:325–30. doi: 10.1016/S0091-3057(00)00361-0
  48. Orellana JA, Moraga-Amaro R, Diaz-Galarce R, Rojas S, Maturana CJ, Stehberg J, et al. Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Front Cell Neurosci*. (2015) 9:102. doi: 10.3389/fncel.2015.00102
  49. Busnardo C, Tavares RF, Resstel LBM, Elias LK, Correa FMA. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Auton Neurosci*. (2010) 158:51–7. doi: 10.1016/j.autneu.2010.06.003
  50. Busnardo C, Alves FHF, Crestani CC, Scopinho AA, Resstel LBM, Correa FMA. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. (2013) 23:1611–22. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.11.002
  51. Salehpour F, Farajdokht F, Cassano P, Sadigh-Eteghad S, Erfani M, Hamblin MR, et al. Near-infrared photobiomodulation combined with coenzyme Q10 for depression in a mouse model of restraint stress: reduction in oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis. *Brain Res Bull*. (2019) 144:213–22. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.10.010
  52. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology*. (2016) 233:1637–50. doi: 10.1007/s00213-016-4218-9
  53. Kolb B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res*. (1984) 320:65–98. doi: 10.1016/0165-0173(84)90018-3
  54. Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*. (2004) 51:32–58. doi: 10.1002/syn.10279
  55. Jacobs DS, Moghaddam B. Medial prefrontal cortex encoding of stress and anxiety. *Int Rev Neurobiol*. (2021) 158:29–55. doi: 10.1016/bs.im.2020.11.014
  56. Maaswinkel H, Gispen W-H, Spruijt BM. Effects of an electrolytic lesion of the prelimbic area on anxiety-related and cognitive tasks in the rat. *Behav Brain Res*. (1996) 79:51–9. doi: 10.1016/0166-4328(95)00261-8

57. Holmes A, Wellman CL. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* (2009) 33:773–83. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.11.005
58. Arnsten AFT. Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. *Nat Neurosci.* (2015) 18:1376–85. doi: 10.1038/nn.4087
59. Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience.* (1995) 64:477–505. doi: 10.1016/0306-4522(94)00355-9
60. del Arco A, Park J, Moghaddam B. Unanticipated stressful and rewarding experiences engage the same prefrontal cortex and ventral tegmental area neuronal populations. *eNeuro.* (2020) 7:ENEURO.0029-20.2020. doi: 10.1523/ENEURO.0029-20.2020
61. Ostrander MM, Richtand NM, Herman JP. Stress and amphetamine induce Fos expression in medial prefrontal cortex neurons containing glucocorticoid receptors. *Brain Res.* (2003) 990:209–14. doi: 10.1016/j.brainres.2003.07.001
62. Morrow BA, Elsworth JD, Lee EJK, Roth RH. Divergent effects of putative anxiolytics on stress-induced fos expression in the mesoprefrontal system of the rat. *Synapse.* (2000) 36:143–54. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(200005)36:2<143::AID-SYN7>3.0.CO;2-H
63. Brown SM, Henning S, Wellman CL. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* (2005) 15:1714–22. doi: 10.1093/cercor/bhi048
64. Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JLM, Caso JR, Alou L, Gómez-Lus ML, et al. Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. *J Neuroinflammation.* (2014) 11:8. doi: 10.1186/1742-2094-11-8
65. Zlatković J, Filipović D. Chronic social isolation induces NF- $\kappa$ B activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex. *Neurochem Int.* (2013) 63:172–9. doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.002
66. Amiri S, Haj-Mirzaian A, Rahimi-balaei M, Razmi A, Kordjazy N, Shirzadian A, et al. Co-occurrence of anxiety and depressive-like behaviors following adolescent social isolation in male mice; possible role of nitric oxide system. *Physiol Behav.* (2015) 145:38–44. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.03.032
67. Gilhotra N, Jain H, Dhir D. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on anxiety in unstressed and stressed mice. *Indian J Exp Biol.* (2010) 48:365–72.
68. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* (1991) 43:109–42.
69. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* (2001) 64:51–68. doi: 10.1016/S0301-0082(00)0044-7
70. Garthwaite J. NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status. *Br J Pharmacol.* (2019) 176:197–211. doi: 10.1111/bph.14532
71. Chen HJC, Spiers JG, Sernia C, Lavidis NA. Response of the nitric oxide system to activation of the neuroendocrine stress axis. *Front Neurosci.* (2015) 9:3. doi: 10.3389/fnins.2015.00003
72. Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol.* (2003) 27:325–55. doi: 10.1385/MN:27:3:325
73. Gambino G, Rizzo V, Giglia G, Ferraro G, Sardo P. Cannabinoids, TRPV and nitric oxide: the three ring circus of neuronal excitability. *Brain Struct Funct.* (2020) 225:1–15. doi: 10.1007/s00429-019-01992-9
74. Zareba-Kozioł M, Bartkowiak-Kaczmarek A, Figiel I, Krzysztyniak A, Wojtowicz T, Bijata M, et al. Stress-induced changes in the S-palmitoylation and S-nitrosylation of synaptic proteins. *Mol Cell Proteomics.* (2019) 18:1916–38. doi: 10.1074/mcp.RA119.001581
75. Zhang Y, Deng Y, Yang X, Xue H, Lang Y. The relationship between protein S-Nitrosylation and human diseases: a review. *Neurochem Res.* (2020) 45:2815–27. doi: 10.1007/s11064-020-03136-6
76. Nakamura T, Lipton SA. Protein S-Nitrosylation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci.* (2016) 37:73–84. doi: 10.1016/j.tips.2015.10.002
77. Campos AC, Piorino EM, Ferreira FR, Guimarães FS. Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure. *Behav Brain Res.* (2013) 256:391–7. doi: 10.1016/j.bbr.2013.08.006
78. Wang D, An SC, Zhang X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett.* (2008) 433:59–64. doi: 10.1016/j.neulet.2007.12.041
79. Lipina C, Hundal HS. The endocannabinoid system: “NO” longer anonymous in the control of nitric oxide signalling? *J Mol Cell Biol.* (2017) 9:91–103. doi: 10.1093/jmcb/mjx008
80. Béchade C, Colasse S, Diana MA, Rouault M, Bessis A. NOS2 expression is restricted to neurons in the healthy brain but is triggered in microglia upon inflammation. *GLIA.* (2014) 62:956–63. doi: 10.1002/glia.22652
81. Morris G, Walder K, Berk M, Carvalho AF, Marx W, Bortolasci CC, et al. Intertwined associations between oxidative and nitrosative stress and endocannabinoid system pathways: relevance for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (2022) 114:110481. doi: 10.1016/j.pnpbp.2021.110481
82. Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, et al. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron.* (2006) 49:67–79. doi: 10.1016/j.neuron.2005.11.027
83. Lou ZY, Yu WB, Chen J, Li L, Jiang LS, Xiao BG, et al. Neuroprotective effect is driven through the upregulation of CB1 receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Mol Neurosci.* (2016) 58:193–200. doi: 10.1007/s12031-015-0656-9
84. Kokkola T, Savinainen JR, Mönkkönen KS, Retamal MD, Laitinen JT. S-nitrosothiols modulate G protein-coupled receptor signaling in a reversible and highly receptor-specific manner. *BMC Cell Biol.* (2005) 6:21. doi: 10.1186/1471-2121-6-21
85. Wdżony K, Chocyk A. Cannabinoid CB1 receptors in rat medial prefrontal cortex are colocalized with calbindin- but not parvalbumin- and calretinin-positive GABA-ergic neurons. *Pharmacol Rep.* (2009) 61:1000–7. doi: 10.1016/S1734-1140(09)70161-6
86. Witkin JM, Tzavara ET, Nomikos GG. A role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. *Behav Pharmacol.* (2005) 16:315–31. doi: 10.1097/00008877-200509000-00005
87. Buskila Y, Amitai Y. Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex. *J Neurophysiol.* (2010) 103:1322–8. doi: 10.1152/jn.00676.2009
88. Mondelli V, Vernon AC, Turckheimer F, Dazzan P, Pariante CM. Brain microglia in psychiatric disorders. *Lancet Psychiatry.* (2017) 4:563–72. doi: 10.1016/S2215-0366(17)30101-3
89. Zhou QG, Zhu LJ, Chen C, Wu HY, Luo CX, Chang L, et al. Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. *J Neurosci.* (2011) 31:7579–90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0004-11.2011
90. Duffy SS, Hayes JP, Fiore NT, Moalem-Taylor G. The cannabinoid system and microglia in health and disease. *Neuropharmacology.* (2021) 190:108555. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108555
91. Maldonado R, Cabañero D, Martín-García E. The endocannabinoid system in modulating fear, anxiety, and stress. *Dialogues Clin Neurosci.* (2020) 22:229–39. doi: 10.31887/DCNS.2020.22.3/rmaldonado

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Coelho, Vila-Verde, Sartim, Uliana, Braga, Guimarães and Lisboa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### 9.2.3. Anexo D: Decoding the neurobiological mechanisms associated with resilience and vulnerability to depression and PTSD with a novel gene-environment animal model (Preprint)

#### **Decoding the neurobiological mechanisms associated with resilience and vulnerability to depression and PTSD with a novel gene-environment animal model.**

Lia P. Iglesias<sup>1</sup>, Arthur Alves Coelho<sup>1,2</sup>, Nicole Rodrigues da Silva<sup>1,3</sup>, Heidi K. Müller<sup>1</sup>, Fabricio A. Moreira<sup>4</sup>, Sabrina F. Lisboa<sup>2</sup>, Gregers Wegener<sup>1\*</sup>, Sâmia Joca<sup>1,3\*</sup>.

<sup>1</sup> *Translational Neuropsychiatry Unit, Department of Clinical Medicine, Aarhus University, 8000 Aarhus C, Denmark*

<sup>2</sup> *Department of Biomolecular Science, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FCFRP/USP)*

<sup>3</sup> *Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus Denmark*

<sup>4</sup> *Neuropsychopharmacology laboratory, Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*

\*Corresponding authors:

Gregers Wegener (TNU, Department of Clinical Medicine, Aarhus University, email: [wegener@clin.au.dk](mailto:wegener@clin.au.dk))

Sâmia Joca (Department of Biomedicine, Aarhus University, [sjoca@biomed.au.dk](mailto:sjoca@biomed.au.dk))

**Key words:** Flinders Sensitive/Resistant Line Rats, hippocampus, fear, memory, depression, PTSD, FKBP51, corticosterone.

## ABSTRACT

Post-traumatic stress disorder (PTSD) and co-morbid depression is a challenging psychiatric condition due to symptom severity, treatment resistance and poor prognosis. Although impaired memory processing has been described in PTSD and depression, the underlying biological mechanisms of this comorbidity remain poorly understood, hindering the development of effective treatments. Herein, we aimed to establish a new rodent model and to study the mechanisms determining resilience and vulnerability to PTSD and depression. We assessed the behavioural profile of a genetic-based model of depression vulnerability, the Flinders Sensitive Line (FSL), upon trauma-like exposure. In parallel, we investigated the Flinders Resistant Line (FRL), used as FSL controls, and the Sprague Dawley (SD), from which both strains were originally derived. Male FSL, SD and FRL rats were submitted to a set of behavioural tests to evaluate hippocampal-dependent and fear-related memory, depression, and anxiety parameters. Subsequently, the hippocampus was assessed for changes in neurotransmitter and protein neuroendocrine signalling and neuroplastic alterations. An *in silico* prediction analysis was performed to further evaluate the interference of the observed molecular and morphological changes in the observed behavioural alterations in the different rat strains. FSL rats were characterized by depressive-like behaviours, cognitive deficits, and impaired fear memory extinction, while FRL exhibited a resilient phenotype in these tests, when compared to SD. Strain differences in hippocampal plasticity or in the neurochemical milieu could not account for their phenotypic alterations. Notably, a dysfunctional signalling by glucocorticoid receptors (GR) and FKBP51-52 in the hippocampus, along with abnormal neuroendocrine response to trauma, was able to predict resilience and vulnerability after a traumatic-like experience. The *in-silico* analysis indicated that these elements are sufficient to predict the distinct behavioural phenotypes among the strains. Pre-existing abnormalities in hippocampal GR-FKBP5 associated signalling and the neuroendocrine response to stress may determine vulnerability to trauma-induced emotional outcomes.

## **Introduction**

On average, 70% of people will experience a traumatic event at some point in their life (1, 2). Although most people will fully recover after the initial stress response, 3.9% will develop an aberrant representation of aversive memory. This construct is characterised by over-consolidation, memory generalisation and impaired extinction, resulting in persistent reminding of the traumatic experience and emotional consequences associated with post-traumatic stress disorder (PTSD) (3). PTSD patients have a higher risk of developing other psychiatric disorders, among which Major Depressive Disorder (MDD) (4-7) is the most prevalent, with 50-70% of the patients presenting this comorbidity (4-6). PTSD and co-morbid MDD is a clinical condition distinguished by severe symptoms, poor response to treatment and worse prognosis (8-10). It is, however, unclear whether MDD is a consequence of experiencing PTSD or an independent risk factor for developing PTSD following trauma exposure (7). Unfortunately, the neurobiological basis of PTSD-MDD comorbidity remains poorly understood, partly due to the lack of appropriate animal models, which hinders the development of better treatment options.

Both PTSD and MDD patients present mal-adaptative expression of fear memory, cognitive deficits and increased negative bias (11-15), suggesting a common neurobiological substrate. The hippocampus (HPC) is part of a brain network involved in memory processing and has a central role in terminating the endocrine response to stress and promoting behavioural adaptation (16, 17). Interestingly, both PTSD and MDD patients present hippocampal dysfunctions, characterised by atrophy and synaptic loss (18-20), impaired neurogenesis (14, 21, 22), and impaired synaptic plasticity (23-25). A recent meta-analysis of human studies suggested that the neuroplastic changes in the HPC are associated with impaired hippocampal-dependent tasks and constitute a vulnerability factor associated with PTSD and MDD development (26). Accordingly, a malfunctioning HPC has also been linked to the neuroendocrine dysregulations observed in PTSD and MDD (blunted or exacerbated hypothalamic-pituitary-adrenal axis – HPA- reactivity, respectively) and to increased risk of disease development (27, 28). This suggests that the exposure to trauma is not sufficient, despite being necessary to trigger PTSD development (29). Instead, pre-existing cognitive and neurobiological factors will moderate the susceptibility of some individuals to developing emotional outcomes following trauma exposure.

The study of aversive memory processing and fear conditioning processes in rodent models have provided important understanding about PTSD neurobiology. However, important

translational limitations with such models have compromised the identification of neurobiological factors associated with disease vulnerability and the development of more effective treatments (29, 30). Of note, the inability to detect resilient subgroups and behavioural comorbidities, which are “more a rule than an exception” for PTSD, are crucial disadvantages of the current rodent models (29, 30). Therefore, the study of the behavioural/emotional responses to traumatic-like events in animals that display specific endophenotypic characteristics of resilience or susceptibility to stress can provide valuable information about the neurobiology of PTSD and PTSD-MDD comorbidity.

The Flinders Sensitive Line (FSL), and its counterpart, the Flinders Resistant Line (FRL) rats, are inbred lines obtained by selective breeding from Sprague-Dawley (SD) rats, originally separated based on their response to anticholinesterase agents (31). Years of research have demonstrated that FSL display increased emotional reactivity upon stress exposure and emotional consequences associated to depressive-like behaviours, thus being considered a valid model to study gene x environment interactions in MDD (31). For instance, FSL presents increased immobility in the forced swimming test (FST), anhedonia (32, 33), increased rapid-eye-movement (REM) sleep (34, 35), cognitive deficits (36-41) and impaired hippocampal structural plasticity (42). In addition to those features, FSL rats also present amygdala hyperreactivity against threats (43) and compromised response to treatment after stress exposure (44), which are also common in PTSD. Despite that, little is known regarding the performance of FSL animals in behavioural tests that assess traumatic-like memory or neuroendocrine responses in stressful and traumatic-like events. Much less is known about the FRL, which is widely used as a house-breeding control and considered similar to the original strain, SD (45). The study of these two endophenotypes derived from the same rat strain, which differ primarily in their reactivity to stress, could provide valuable information about the neurobiological mechanisms associated with resilience and susceptibility to the emotional consequences of trauma, as well as disease vulnerability. Therefore, to investigate if FSL, FRL, SD could represent individual subsets associated with PTSD and MDD vulnerability, we studied a set of behavioural tests to assess: fear memory (the contextual fear conditioning paradigm, CFC, and the delay auditory fear conditioning, AFC), recognition memory (object recognition), depression (FST and anhedonia), innate anxiety (elevated plus-maze) and the neuroendocrine responses underlying the behavioural changes in the named tests.

## **Material and Methods**

### *Animals*

Ninety-two male rats of nine to eleven-weeks-old were used in the experiments. The FRL and FSL rats were kept in the breeding colonies at the Translational Neuropsychiatric Unit (TNU), Aarhus University, Denmark, originally derived from the FSL/FRL colonies at the University of North Carolina at Chapel Hill, USA, and Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Sprague-Dawley breeding pairs were obtained from Taconic Denmark A/S and bred at TNU alongside FSL and FRL rats. The animals were housed in pairs in Eurostandard Type IIIH cages with raised lids, shelter and nesting material, with free access to food and tap water. The cages were kept in a temperature-controlled room ( $21\pm 1^\circ\text{C}$ ) with a standard dark-light cycle of 12/12h (lights on 06:00), and all the experiments were performed during the light phase of the cycle. All the procedures performed were approved by the Danish National Committee for Animal Experimentation per the EU Directive 2010/63/EU and the Danish Law (LBK nr 1107 af 01/07/2022).

### *Drugs and treatment*

Hydrocortisone (Sigma) was diluted in saline and 2% tween-80 (46). A 40 mg/kg/mL dose was intraperitoneally administered 90 min before the behavioural procedure (46).

### *Behavioural Task*

Different animal cohorts were used to evaluate fear memory, recognition memory, depressive-like behaviours and innate anxiety. For fear memory, both contextual fear conditioning (CFC) and delay-auditory fear conditioning (AFC) were used. The novel object recognition test (NOR) was used for assessing the recognition memory. Innate anxiety was evaluated in the elevated plus maze (EPM) and depressive-like behaviours were assessed in the FST and saccharine preference test. A detailed description of the protocols used can be found in Supplement 1.

### *Molecular and histology procedures*

The animals were taken to a separate room and euthanised by decapitation, i) immediately after the reinstatement in the CFC (for dendritic spine analysis and neurotransmitters quantification), ii) 30 min after the conditioning in the CFC (for protein and corticosterone quantification) or iii) 30 min after the FST (for corticosterone quantification).

The neurotransmitter quantification in the HPC was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC), as previously described by us (47). The morphological analysis of

the HPC was performed as described by the manufacturer using a Golgi-cox kit and the IMARIS software for neuronal reconstruction, as previously describe by our group (48). Western Blot was used to quantify hippocampal levels of GR, FKBP-51 and 52, PSD-95, ERK1-2 and p-ERK1-2, mTOR and p-mTOR, BDNF and pro-BDNF, p-eEF2, CaMKII and p-CaMKII, GluR1 and p-GluR1. For quantification of plasma, corticosterone and hippocampal TrkB/p-TrkB was used ELISA. A detailed description of the protocols can be found in Supplement 1.

#### *Statistical Analysis*

The results were analysed by the student's t-test or simple and repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni posthoc test, when appropriate. Correlation analyses were performed using Pearson's. The data was analysed for potential outliers using ROUT. Data can be found at figshare.com (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.24271765.v1>). The statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The data are presented as mean and s.e.m. The modelling of the data was performed by linear discriminant analysis and hierarchical clustering k-means in RStudio (Supplement 1).

## **Results**

### *The behavioural phenotype of FSL/FRL rats and their neuroendocrine response*

To confirm the depressive-like behaviour of the FSL/FRL, we used the saccharine preference test as a surrogate of anhedonic behaviour (Figure 1A). During habituation (day 0), FSL presented a drastically lower consumption of saccharine when compared to FRL (Supplementary figure 1A). The differences in consumption between the two strains were consistent over days (day 1-3) (Supplementary figure 1B-E). Regarding saccharine preference, FSL presented a lower preference than FRL in day one and a tendency in the last day, suggesting an anhedonic trait in FSL figure 1B-E.

To evaluate if the reactivity to acute stressors triggers depressive-like phenotype of FSL rats, we evaluated whether the injection of the stress hormone (hydrocortisone) would accentuate their anhedonic behaviour. However, no differences in saccharine preference were detected between FSL and FRL animals treated with hydrocortisone or vehicle (Figure 1F). Similarly, no differences were observed between the strains in the anxiety-related behaviours evaluated in the EPM (Figure 1G and Supplementary figure 1F, G).



In the FST, FSL presented higher immobility time and lower swimming time than FRL (Figure 1H, I). These parameters were not affected by the treatment with hydrocortisone, 24h earlier (*data not shown*). After FST exposure, corticosterone levels were lower in FSL in comparison to FRL (Figure 1J), while in animals treated with hydrocortisone the day before, the corticosterone levels were blunted regardless of the strain (Figure 1J). Thus, the corticosterone levels did not correlate with swimming or immobility (Supplementary figure 1H).

#### *Fear memory and basal behaviour*

To investigate if differences in depressive-like behaviour would be accompanied by differences in the processing of fear memories, we compared the performance of FSL and FRL with a control strain, SD, in the CFC (Figure 2A-B). FRL animals presented lower freezing levels during the test when compared to SD or FSL. Although FSL did not differ from SD during the test, it presented impairments in fear memory extinction (Figure 2B). Lastly, in the reinstatement test, the freezing levels were similar between FSL and SD, while FRL kept a lower conditioned response (Figure 2B).

In order to discard potential bias factors in the analysis of memory in the CFC, we evaluated the basal behaviour of the three strains (Figure 2A). We did not observe differences among strains regarding distance travelled (Figure 2C), mean velocity (Supplementary figure 2A), rearing (Supplementary figure 2B), jumping (Supplementary figure 2C), and basal freezing (Supplementary figure 2E). However, the grooming was significantly attenuated in FRL compared to SD rats (Supplementary figure 2D). We also evaluated the movement pattern during habituation to assess innate anxiety-like behaviour. We found that FSL spent more time in the inner zone (Figure 2D) and less time in the outer zone (Supplementary figure 2F).

Since shock perception could determine performance, we evaluated whether the fear response against the shock differed among the strains during the intertrial interval. The freezing during the conditioning phase was significantly modulated by time but not by strain (Figure 2E).

Considering that contextual fear memory processing depends on the integrity of hippocampal-dependent memory system, we evaluated the performance of the animals in the NOR, which is also hippocampal-dependent (49). Both SD and FRL could recognise the novel object, but not the FSL rats (Figure 2F).

Finally, to further investigate the behaviour of FSL/FRL in fear-conditioned models, we performed the delay auditory fear conditioning, a task independent of the HPC (50). During the conditioning phase, FSL presented higher freezing levels than FRL in response to

tone+shock (Supplementary figure 2G). During the tone test, the response was modulated by time and strain (Figure 2G), and higher freezing levels were again observed in FSL. However, no differences were noticed among strains in freezing levels during the contextual background test (Supplementary Figure 2H).

#### *Hippocampal morphology and neurotransmission after the CFC*

Representative IMARIS neuronal reconstruction from Golgi-cox staining can be seen in Figure 3A. In most parameters evaluated, there were no major differences between the strains, except for the number of spines, which were slightly reduced in SD (Figure 3D): dendrite area, dendrite length, spine density, number of filopodia spines, number of long-thin spines, number of mushroom spines and number of stubby spines (Figure 3B, C, E-I). The sholl analysis showed that the number of intersections was moderated by radius and strain, with FRL and FSL presenting higher complexity than SD (Figure 3J).

In the neurochemical analysis, FRL significantly differed from SD in the levels of glutamate (Supplementary figure 3A), noradrenaline (Supplementary figure 3B), dopamine turnover (Supplementary figure 3D) and serotonin (Supplementary figure 3E) but not in the 5-HT turnover (Supplementary figure 3F) or levels of dopamine (Supplementary figure 3C).

#### *Molecular pathways potentially involved in the FSL performance in the CFC*

CFC increased corticosterone levels in the three strains, higher levels were found in FSL and FRL (Figure 4A). Conversely, GR levels were only modulated by the strain, with FRL showing significantly lower levels in the hippocampus (Figure 4B). Given the key role proposed for FK506-binding protein 51 (FKBP-51 and 52) in regulating the endocrine and emotional responses to stress (51), we investigated if these proteins could be associated with the neuroendocrine and behavioural abnormalities observed in the FSL and FRL animals. Interestingly, FSL animals presented higher levels of FKBP-51 and FKBP-52, regardless of the conditioning protocol (Figure 4C-D).

To discard other significant contributors to the phenotype, we analysed several plasticity pathways involved in memory consolidation (Supplementary figure 4). We did not observe any significant differences in the levels of BDNF, pro-BDNF, BDNF/pro-BDNF ratio, p-TrkB, pERK1/2, pCaMKII, pGluR1, PSD95 or p-mTOR. However, the total amount of TrkB and p-eEF2 were higher and lower, respectively, despite the conditioning procedure.

#### *In silico strain-prediction using the neuroendocrine profile*

To further test the hypothesis that differences in CORT, GR, FKBP51 and FKBP52 levels in FSL, FRL and SD would be good predictors of their endophenotypes, we performed a Linear Discriminant Analysis (LDA). The *in silico* data demonstrated that CORT, GR, FKBP51 and FKBP52 are predictors of the phenotype (Figure 4F). We also applied an unsupervised learning algorithm, hierarchical clustering analysis by k-means. Again, our variables were able to separate the strains (Figure 4G) with few exceptions (Figure 4G - red).

#### **Discussion**

Our main finding is that FSL presents a behavioural phenotype that fits with a model of vulnerability to PTSD-MDD comorbidity while FRL presented behavioural and molecular characteristics relevant for studying mechanisms of resilience to stress/trauma. These behavioural patterns were associated with specific changes in hippocampal molecular components involved with the neuroendocrine response to stress.

Contrasting with previous reports, we observed anhedonia-traits in naïve FSL animals (33, 52). This was in line with their widely reported depressive-like phenotype in the FST (53), as also observed by us in the present study. We did not, however, detect the presence of anxiety-like behaviours in FSL animals exposed to the EPM (54). Earlier reports showed that acute stress exposure might accentuate anhedonic behaviour in FSL, depending on the type of stimulus (55). To further confirm our initial finding, we mimicked the physiological effects of stress with hydrocortisone administration but failed to observe any significant effect of this challenge in FSL/FRL behaviour. However, regardless of the strain, hydrocortisone administration significantly reduced corticosterone release after the FST, demonstrating that the negative feedback to the HPA-axis activation is preserved in both strains. Moreover, the results agree with human data showing similarities in the negative feedback in PTSD, comorbid patients and resilient individuals after trauma (56).

PTSD symptoms include cognitive deficits and alterations in mood, arousal and REM sleep, characteristics previously described in the FSL (53). However, a pivotal element in PTSD is the presence of a traumatic experience leading to an aberrant representation of aversive memory constructs characterised by over-consolidation, memory generalisation and impaired extinction (3). Little is known about the FSL performance in this domain, and while it was previously found that the FSL show impairments in the active and passive avoidance tasks (57,

58), here we show that the FSL have intact fear memory acquisition and expression, but poor extinction in the CFC. In agreement with previous reports, we also found poor performance of FSL in non-emotionally load memory tasks (NOR) (59-61). Inversely, the FRL animals showed preserved cognition, but impairments in the CFC. These data, together with the lack of differences in dendritic spines density, suggests that the impairment in the FRL is not sustained by alterations in hippocampal structural plasticity. Regarding FSL, preliminary data from our group show that naïve FSL animals have synaptic atrophy, expressed as lower spine density, and a decrease in mushroom and long-thin spines in CA1 (62). However, we found no differences among strains in these parameters after our CFC protocol, which may suggest that despite the basal synaptic atrophy in FSL, there is a normalisation of CA1 spines after fear-learning.

Even though FSL have impaired learning and memory in tests such NOR, they present preserved or exacerbated processing of fear related memories, as detected in the CFC protocols. This implies the possibility that a dysbalanced in the fear-related neurocircuitry may be compensating for the general impairments in overall memory. In the same way, since the FRL memory seems to be preserved in tests evaluating hippocampal-dependent memories, but had low levels of freezing along all the CFC protocols, we suggest that a protective mechanism may be working to attenuate the fear-memory processing or promote adaptation to its emotional consequences. Since we noticed that the levels of corticosterone failed to correlate with depressive-like behaviours, it is unlikely that corticosterone level alone is a good predictor of the different behavioural phenotypes. Importantly, a systematic review and meta-analysis evaluating if changes in the HPA parameters could be associated with PTSD symptoms in patients failed to detect significant associations of the symptoms with cortisol levels (63).

Considering that the problem could be detected downstream in the neuroendocrine axis, we evaluated members of the stress response system, such as GR, FKBP-51 and FKBP-52. These parameters were evaluated after a conditioning session in the CFC, during the early consolidation of fear memories, in animals either submitted to the foot shock or exposed only to the context. Surprisingly, the FRL and FSL rats displayed an increased release of corticosterone compared to SD. Interestingly, lower levels of cortisol after acute stress or immediately after trauma exposure have been associated with compromised resilience and a higher risk of developing PTSD in humans (64-66). Moreover, high hippocampal GR expression is related to a higher risk of PTSD and worse symptomatology in humans (67, 68). Increased GR signalling in the hippocampus can thus blunt the appropriate neuroendocrine

response during/following the trauma, which might be required to promote further adaptation. In line with the human data, we observed higher expression of hippocampal GR in vulnerable animals (FSL) compared to resilient (FRL).

Our results also demonstrate that FKBP-51, a co-chaperone of the GR receptor, was remarkably high in the hippocampus of FSL animals, in comparison to both SD and FRL. Indeed, previous data has linked high hippocampal expression of FKBP-51 with poor coping mechanisms and deficits in fear extinction (69). Furthermore, inhibition or depletion of FKBP-51 attenuated the effects induced by chronic stress and promoted resilience (51, 69, 70), although this effect was not mediated by the direct regulation of the HPA-axis and implies other possible mechanisms (51).

In addition to GR receptors, FKBP-51 binds to other steroid hormone receptors and intracellular signalling proteins, such as its co-chaperone HSP90, with several possible downstream consequences, including the regulation of Akt, Gsk3, and autophagy processes (71, 72).

Several other molecular pathways related to plasticity were evaluated, with no significant differences among strains, except for the phosphorylation of eEF2, which was considerably lower in FSL. eEF2 has already been linked to the action of antidepressants (73), as well as FKBP5-induced autophagy priming (74). Regardless of the precise interacting mechanism involved in determined the endophenotypes in FSL and FRL animals, which remain to be investigated, our *in-silico* analysis shows that the players of the stress-response system analysed herein conform a unique molecular fingerprint predicting vulnerability and resilience in these rat strains.

Some important limitations of our study have to be considered, especially use of only male animals to test our hypothesis. Further experimental validation using female FSL, FRL and SD could provide further confirmation to our findings and valuable insights regarding sex influences in the resilience and vulnerability to stress. Moreover, the lack of a causal link between the behavioural and molecular findings weakens our conclusions on pointing to FKBP5 as a target to overcome vulnerability to stress. However, it is in the line with previous reports showing FKBP5 as a potential biomarker of vulnerability to PTSD and MDD.

In conclusion, our findings suggest that FSL/FRL are suitable models for studying the neurobiological mechanisms associated with vulnerability and resilience to stress-related disorders, specially PTSD-MDD comorbidity. Although human studies are necessary to

confirm whether our data have a translational nature, putting together the elements of the neuroendocrine system could be a powerful tool to predict and confirm vulnerability/resilience in humans.

#### Acknowledgment

"F. A. Moreira thanks to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES): O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001" - "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001", International Brain Research Organization (IBRO), and The São Paulo Research Foundation-FAPESP (grants 2021/13878-0 to ACC and 2017/19731-6 to SFL).

1. Atwoli L, Stein DJ, Koenen KC, McLaughlin KA. Epidemiology of posttraumatic stress disorder: prevalence, correlates and consequences. *Current opinion in psychiatry*2015. p. 307-11.
2. Benjet C, Bromet E, Karam EG, Kessler RC, McLaughlin KA, Ruscio AM, et al. The epidemiology of traumatic event exposure worldwide: results from the World Mental Health Survey Consortium. *Psychological medicine*2016. p. 327-43.
3. Koenen KC, Ratanatharathorn A, Ng L, McLaughlin KA, Bromet EJ, Stein DJ, et al. Posttraumatic stress disorder in the World Mental Health Surveys. *Psychological medicine*2017. p. 2260-74.
4. Chiu S, Niles JK, Webber MP, Zeig-Owens R, Gustave J, Lee R, et al. Evaluating risk factors and possible mediation effects in posttraumatic depression and posttraumatic stress disorder comorbidity. *Public health reports (Washington, DC : 1974)*2011. p. 201-9.
5. Hatch R, Young D, Barber V, Griffiths J, Harrison DA, Watkinson P. Anxiety, Depression and Post Traumatic Stress Disorder after critical illness: a UK-wide prospective cohort study. *Critical care (London, England)*2018. p. 310.
6. Rytwinski NK, Scur MD, Feeny NC, Youngstrom EA. The co-occurrence of major depressive disorder among individuals with posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *Journal of traumatic stress*2013. p. 299-309.
7. Qassem T, Aly-ElGabry D, Alzarouni A, Abdel-Aziz K, Arnone D. Psychiatric Co-Morbidities in Post-Traumatic Stress Disorder: Detailed Findings from the Adult Psychiatric Morbidity Survey in the English Population. *Psychiatr Q.* 2021;*92*(1):321-30.
8. Angelakis S, Nixon RDV. The comorbidity of PTSD and MDD: Implications for clinical practice and future research. *Behaviour Change*2015. p. 1-25.
9. Flory JD, Yehuda R. Comorbidity between post-traumatic stress disorder and major depressive disorder: Alternative explanations and treatment considerations. *Dialogues in Clinical Neuroscience*2015. p. 141-50.
10. Klein Hofmeijer-Sevink M, Batelaan NM, Van Megen HJGM, Penninx BW, Cath DC, Van Den Hout MA, et al. Clinical relevance of comorbidity in anxiety disorders: A

report from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *Journal of Affective Disorders*: Elsevier B.V.; 2012. p. 106-12.

11. Ruhe HG, Mocking RJT, Figueroa CA, Seeverens PWJ, Ikani N, Tyborowska A, et al. Emotional Biases and Recurrence in Major Depressive Disorder. Results of 2.5 Years Follow-Up of Drug-Free Cohort Vulnerable for Recurrence. *Frontiers in psychiatry* 2019. p. 145.
12. Conoscenti MA, Fanselow MS. Dissociation in Effective Treatment and Behavioral Phenotype Between Stress-Enhanced Fear Learning and Learned Helplessness. *Frontiers in behavioral neuroscience* 2019. p. 104.
13. Foa EB, Steketee G, Rothbaum BO. Behavioral/cognitive conceptualizations of post-traumatic stress disorder. *Behavior Therapy*. 1989;20(2):155-76.
14. Besnard A, Sahay A. Adult Hippocampal Neurogenesis, Fear Generalization, and Stress. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(1):24-44.
15. Surget A, Belzung C. Adult hippocampal neurogenesis shapes adaptation and improves stress response: a mechanistic and integrative perspective. *Mol Psychiatry*. 2022;27(1):403-21.
16. Jankord R, Herman JP. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1148:64-73.
17. Finsterwald C, Alberini CM. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol Learn Mem*. 2014;112:17-29.
18. Cole J, Costafreda SG, McGuffin P, Fu CH. Hippocampal atrophy in first episode depression: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *J Affect Disord*. 2011;134(1-3):483-7.
19. Price RB, Duman R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. *Mol Psychiatry*. 2020;25(3):530-43.
20. Kunimatsu A, Yasaka K, Akai H, Kunimatsu N, Abe O. MRI findings in posttraumatic stress disorder. *J Magn Reson Imaging*. 2020;52(2):380-96.
21. Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience*. 2007;10(9):1110-5.
22. Schoenfeld TJ, Rhee D, Martin L, Smith JA, Sonti AN, Padmanaban V, et al. New neurons restore structural and behavioral abnormalities in a rat model of PTSD. *Hippocampus*. 2019;29(9):848-61.
23. Sherin JE, Nemeroff CB. Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13(3):263-78.
24. Pittenger C, Duman RS. Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):88-109.
25. Hanson ND, Owens MJ, Nemeroff CB. Depression, Antidepressants, and Neurogenesis: A Critical Reappraisal. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(13):2589-602.
26. Lambert HK, McLaughlin KA. Impaired hippocampus-dependent associative learning as a mechanism underlying PTSD: A meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019;107:729-49.
27. Spencer-Segal JL, Akil H. Glucocorticoids and resilience. *Horm Behav*. 2019;111:131-4.
28. Reul JM, Collins A, Saliba RS, Mifsud KR, Carter SD, Gutierrez-Mecinas M, et al. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. *Neurobiol Stress*. 2015;1:44-59.
29. Richter-Levin G, Stork O, Schmidt MV. Animal models of PTSD: a challenge to be met. *Mol Psychiatry*. 2019;24(8):1135-56.
30. Verbitsky A, Dopfel D, Zhang N. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. *Translational Psychiatry*. 2020;10(1):132.

31. Overstreet DH, Wegener G. The flinders sensitive line rat model of depression-- 25 years and still producing. *Pharmacol Rev.* 2013;65(1):143-55.
32. Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiology & behavior* 1995. p. 165-9.
33. Pucilowski O, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Chronic mild stress-induced anhedonia: Greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiology & Behavior.* 1993;54(6):1215-20.
34. Shiromani PJ, Overstreet D, Levy D, Goodrich CA, Campbell SS, Gillin JC. Increased REM sleep in rats selectively bred for cholinergic hyperactivity. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 1988. p. 127-33.
35. Shiromani PJ, Velazquez-Moctezuma J, Overstreet D, Shalauta M, Lucero S, Floyd C. Effects of sleep deprivation on sleepiness and increased REM sleep in rats selectively bred for cholinergic hyperactivity. *Sleep* 1991. p. 116-20.
36. Abildgaard A, Solskov L, Volke V, Harvey BH, Lund S, Wegener G. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology* 2011. p. 623-33.
37. De Bundel D, Femenía T, DuPont CM, Konradsson-Geuken Å, Feltmann K, Schilström B, et al. Hippocampal and prefrontal dopamine D1/5 receptor involvement in the memory-enhancing effect of reboxetine. *The international journal of neuropsychopharmacology* 2013. p. 2041-51.
38. du Jardin KG, Liebenberg N, Müller HK, Elfving B, Sanchez C, Wegener G. Differential interaction with the serotonin system by S-ketamine, vortioxetine, and fluoxetine in a genetic rat model of depression. *Psychopharmacology* 2016. p. 2813-25.
39. Gómez-Galán M, De Bundel D, Van Eeckhaut A, Smolders I, Lindskog M. Dysfunctional astrocytic regulation of glutamate transmission in a rat model of depression. *Mol Psychiatry* 2013. p. 582-94.
40. Oberholzer I, Möller M, Holland B, Dean OM, Berk M, Harvey BH. *Garcinia mangostana* Linn displays antidepressant-like and pro-cognitive effects in a genetic animal model of depression: a bio-behavioral study in the Flinders Sensitive Line rat. *Metabolic brain disease* 2018. p. 467-80.
41. Uys MM, Shahid M, Sallinen J, Harvey BH. The  $\alpha 2C$ -adrenoceptor antagonist, ORM-10921, exerts antidepressant-like effects in the Flinders Sensitive Line rat. *Behavioural pharmacology* 2017. p. 9-18.
42. Ardalan M, Wegener G, Polsinelli B, Madsen TM, Nyengaard JR. Neurovascular plasticity of the hippocampus one week after a single dose of ketamine in genetic rat model of depression. *Hippocampus* 2016. p. 1414-23.
43. Huang W, Heffernan ME, Li Z, Zhang N, Overstreet DH, King JA. Fear induced neuronal alterations in a genetic model of depression: an fMRI study on awake animals. *Neuroscience letters* 2011. p. 74-8.
44. Brand SJ, Harvey BH. Exploring a post-traumatic stress disorder paradigm in Flinders sensitive line rats to model treatment-resistant depression I: bio-behavioural validation and response to imipramine. *Acta neuropsychiatrica* 2017. p. 193-206.
45. Lillethorup TP, Iversen P, Wegener G, Doudet DJ, Landau AM.  $\alpha 2$ -adrenoceptor binding in Flinders-sensitive line compared with Flinders-resistant line and Sprague-Dawley rats. *Acta Neuropsychiatr.* 2015;27(6):345-52.
46. Johnson SA, Fournier NM, Kalynchuk LE. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behavioural Brain Research.* 2006;168(2):280-8.



47. Liebenberg N, Jensen E, Larsen ER, Kousholt BS, Pereira VS, Fischer CW, et al. A Preclinical Study of Casein Glycomacropeptide as a Dietary Intervention for Acute Mania. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018;21(5):473-84.
48. Chen F, Polsinelli B, Nava N, Treccani G, Elfving B, Müller HK, et al. Structural Plasticity and Molecular Markers in Hippocampus of Male Rats after Acute Stress. *Neuroscience.* 2020;438:100-15.
49. Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem.* 2010;17(1):5-11.
50. Marks WD, Yokose J, Kitamura T, Ogawa SK. Neuronal Ensembles Organize Activity to Generate Contextual Memory. *Front Behav Neurosci.* 2022;16:805132.
51. Codagnone MG, Kara N, Ratsika A, Levone BR, van de Wouw M, Tan LA, et al. Inhibition of FKBP51 induces stress resilience and alters hippocampal neurogenesis. *Mol Psychiatry.* 2022;27(12):4928-38.
52. Sanchez C, El Khoury A, Hassan M, Wegener G, Mathé AA. Sex-dependent behavior, neuropeptide profile and antidepressant response in rat model of depression. *Behavioural brain research*2018. p. 93-103.
53. Overstreet DH, Wegener G. The Flinders Sensitive Line Rat Model of Depression — 25 Years and Still Producing. 2013. p. 143-55.
54. Wegener G, Finger BC, Elfving B, Keller K, Liebenberg N, Fischer CW, et al. Neuropeptide S alters anxiety, but not depression-like behaviour in Flinders Sensitive Line rats: a genetic animal model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012;15(3):375-87.
55. Pucilowski O, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiology & behavior*1993. p. 1215-20.
56. Morris MC, Compas BE, Garber J. Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Psychology Review.* 2012;32(4):301-15.
57. Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Impaired active avoidance responding in rats selectively bred for increased cholinergic function. *Physiology & behavior*1990. p. 787-8.
58. Eriksson TM, Delagrance P, Spedding M, Popoli M, Mathé AA, Ögren SO, et al. Emotional memory impairments in a genetic rat model of depression: involvement of 5-HT/MEK/Arc signaling in restoration. *Mol Psychiatry*2012. p. 173-84.
59. Cook A, Pfeiffer L-M, Thiele S, Coenen VA, Döbrössy MD. Olfactory discrimination and memory deficits in the Flinders Sensitive Line rodent model of depression. *Behavioural processes*2017. p. 25-9.
60. Bushnell PJ, Levin ED, Overstreet DH. Spatial working and reference memory in rats bred for autonomic sensitivity to cholinergic stimulation: acquisition, accuracy, speed, and effects of cholinergic drugs. *Neurobiology of learning and memory*1995. p. 116-32.
61. Abildgaard A, Solskov L, Volke V, Harvey BH, Lund S, Wegener G. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36(5):623-33.
62. Treccani G, Ardan M, Chen F, Musazzi L, Popoli M, Wegener G, et al. S-Ketamine Reverses Hippocampal Dendritic Spine Deficits in Flinders Sensitive Line Rats Within 1 h of Administration. *Molecular Neurobiology.* 2019;56(11):7368-79.
63. Morris MC, Hellman N, Abelson JL, Rao U. Cortisol, heart rate, and blood pressure as early markers of PTSD risk: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Psychology Review.* 2016;49:79-91.
64. Galatzer-Levy IR, Steenkamp MM, Brown AD, Qian M, Inslicht S, Henn-Haase C, et al. Cortisol response to an experimental stress paradigm prospectively predicts long-term

- distress and resilience trajectories in response to active police service. *Journal of Psychiatric Research*. 2014;56:36-42.
65. Steudte-Schmiedgen S, Stalder T, Schönfeld S, Wittchen H-U, Trautmann S, Alexander N, et al. Hair cortisol concentrations and cortisol stress reactivity predict PTSD symptom increase after trauma exposure during military deployment. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;59:123-33.
66. Dunlop BW, Wong A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in PTSD: Pathophysiology and treatment interventions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019;89:361-79.
67. van Zuiden M, Geuze E, Willemen HLDM, Vermetten E, Maas M, Amarouchi K, et al. Glucocorticoid Receptor Pathway Components Predict Posttraumatic Stress Disorder Symptom Development: A Prospective Study. *Biological Psychiatry*. 2012;71(4):309-16.
68. Labonté B, Azoulay N, Yerko V, Turecki G, Brunet A. Epigenetic modulation of glucocorticoid receptors in posttraumatic stress disorder. *Transl Psychiatry*. 2014;4(3):e368.
69. Matosin N, Halldorsdottir T, Binder EB. Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model. *Biol Psychiatry*. 2018;83(10):821-30.
70. Touma C, Gassen NC, Herrmann L, Cheung-Flynn J, Büll DR, Ionescu IA, et al. FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Biol Psychiatry*. 2011;70(10):928-36.
71. Zannas AS, Wiechmann T, Gassen NC, Binder EB. Gene–Stress–Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(1):261-74.
72. Hähle A, Merz S, Meyners C, Hausch F. The Many Faces of FKBP51. *Biomolecules*. 2019;9(1).
73. Zanos P, Gould TD. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry*. 2018;23(4):801-11.
74. Gassen NC, Hartmann J, Zschocke J, Stepan J, Hafner K, Zellner A, et al. Association of FKBP51 with priming of autophagy pathways and mediation of antidepressant treatment response: evidence in cells, mice, and humans. *PLoS Med*. 2014;11(11):e1001755.

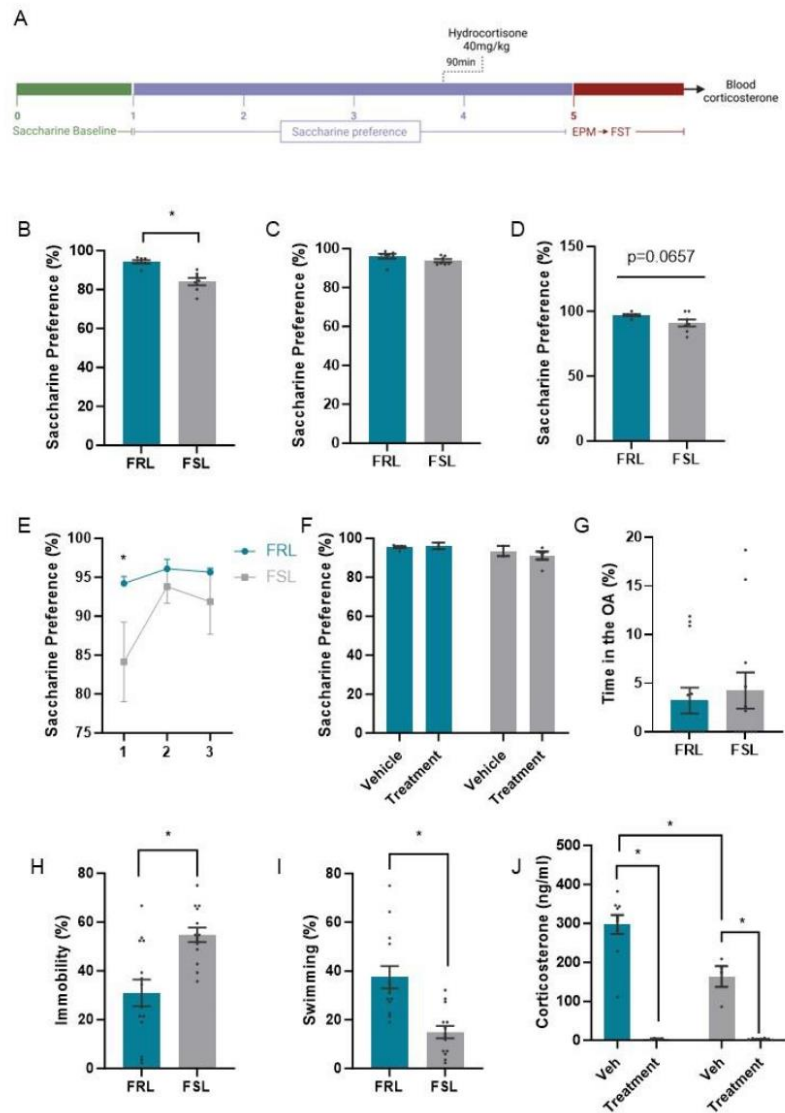


Figure 1. Further characterization of depressive and anxiety-like behaviours in the flinders and the effect of chemical-induced stress. A) Experimental design. B) Saccharine preference day 1 (n=7), t-test [t(12)=4.752, p<0.0001]. C) Saccharine preference day 2 (n=7), t-test [t(12)=1.592, p=0.1373]. D) Saccharine preference day 3 (n=7), t-test [t(12)=2.025, p=0.0657]. E) Daily saccharine preference (n=7), two-way ANOVA [Strain: F (1, 36) = 27.91, p<0.001; Day: F (2, 36) = 11.86, p=0.0001; Interaction: F (2, 36) = 5.452, p=0.0085]. F) Effect of acute hydrocortisone treatment on saccharine preference in flinders (n=2-5 box), two-way ANOVA [Strain: F (1, 10) = 3.095, p=0.1090; Treatment: F (1, 10) = 0.1904, p=0.6719; Interaction: F (1, 10) = 0.5840, p=0.4624]. G) Percentage of time in the open arms of the EPM (n=12-13), t-student [t(23)=0.4502, p=0.6568]. H) Percentage of time immobile (n=14), t-student [t(26)=3.822, p=0.0007]. I) Percentage of time swimming (n=14), t-student [t(26)=4.354, p=0.0002]. J) Levels of corticosterone after the FST (n=4-10), two-way ANOVA [Strain: F (1, 22) = 8.657, p=0.0075; Treatment: F (1, 22) = 100.5, p<0.0001; Interaction: F (1, 22) = 8.648, p=0.0076]. \*p<0.05.

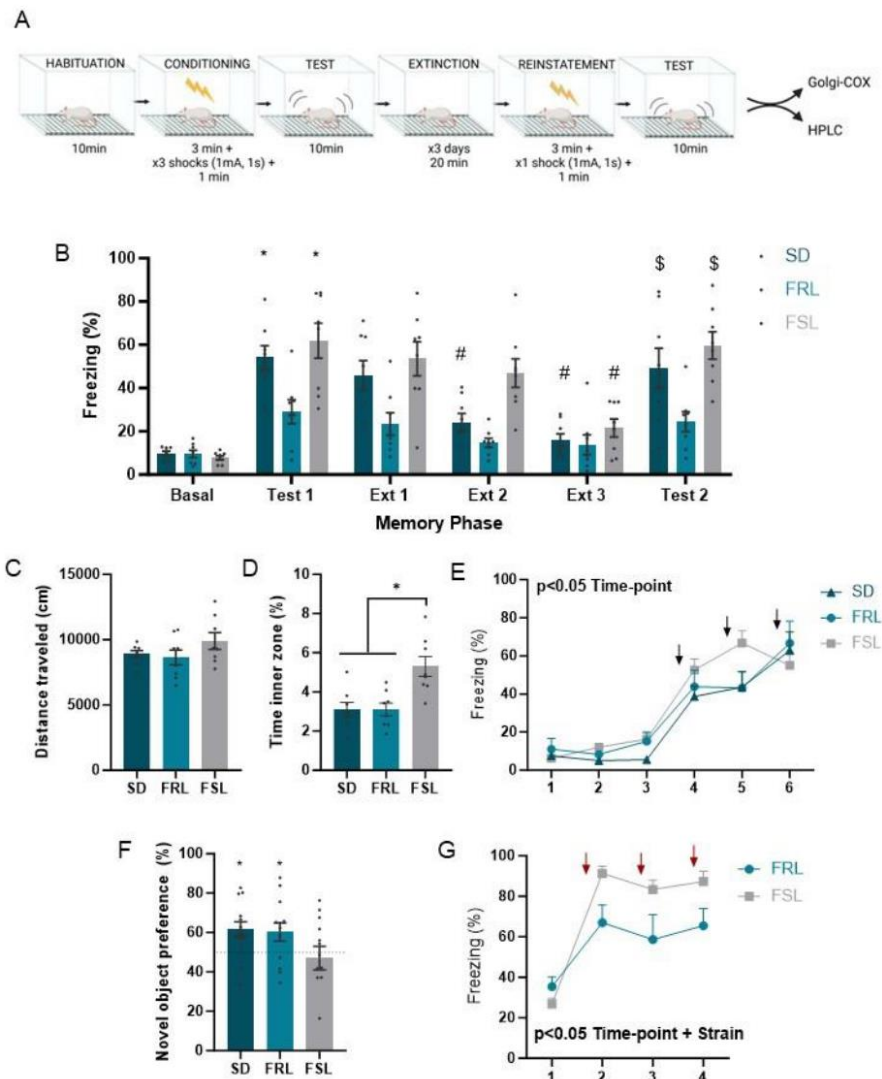


Figure 2: Behavioral characterization of SD, FSL and FRL. A) Experimental design of the CFC. B) Percentage of freezing displayed in different phases of the CFC (n=8), repeated measures two-way ANOVA followed by Bonferroni [Strain:  $F(2, 21) = 10.46, p=0.0007$ ; Phase:  $F(3.856, 80.97) = 38.43, p<0.0001$ ; Interaction:  $F(10, 105) = 3.755, p=0.0002$ ] \* $p<0.05$  compared to basal # $p<0.05$  compared to test \$  $p<0.05$  compared to last extinction session. C) Distance travelled (n=8), t-student [ $F(2, 21) = 1.629, p=0.2199$ ]. D) Percentage of time spent in the inner zone of the apparatus (n=8) during habituation, t-student [ $F(2, 21) = 9.685, p=0.0010$ ]. E) Percentage of freezing minute by minute displayed during conditioning (n=8), two-way ANOVA followed by Bonferroni [Strain:  $F(2, 126) = 2.336, p=0.1009$ ; Time:  $F(5, 126) = 46.40, p<0.0001$ ; Interaction:  $F(10, 126) = 1.237, p=0.2739$ ]. F) Percentage of time spent exploring the novel object (n=13-14), one-sample t-test for SD [ $t(13)=3.161, p=0.0075$ ], FRL [ $t(12)=2.241, df=12, p=0.0447$ ] and FSL [ $t(12)=0.5080, p=0.6206$ ]. G) Percentage of freezing displayed during test in the AFC [Strain:  $F(1, 52) = 8.956, p=0.0042$ ; Time:  $F(3, 52) = 18.61, p<0.0001$ ; Interaction:  $F(3, 52) = 2.412, p=0.0772$ ]. Black arrows represent shock, red arrows represent tone. \* $p<0.05$ .

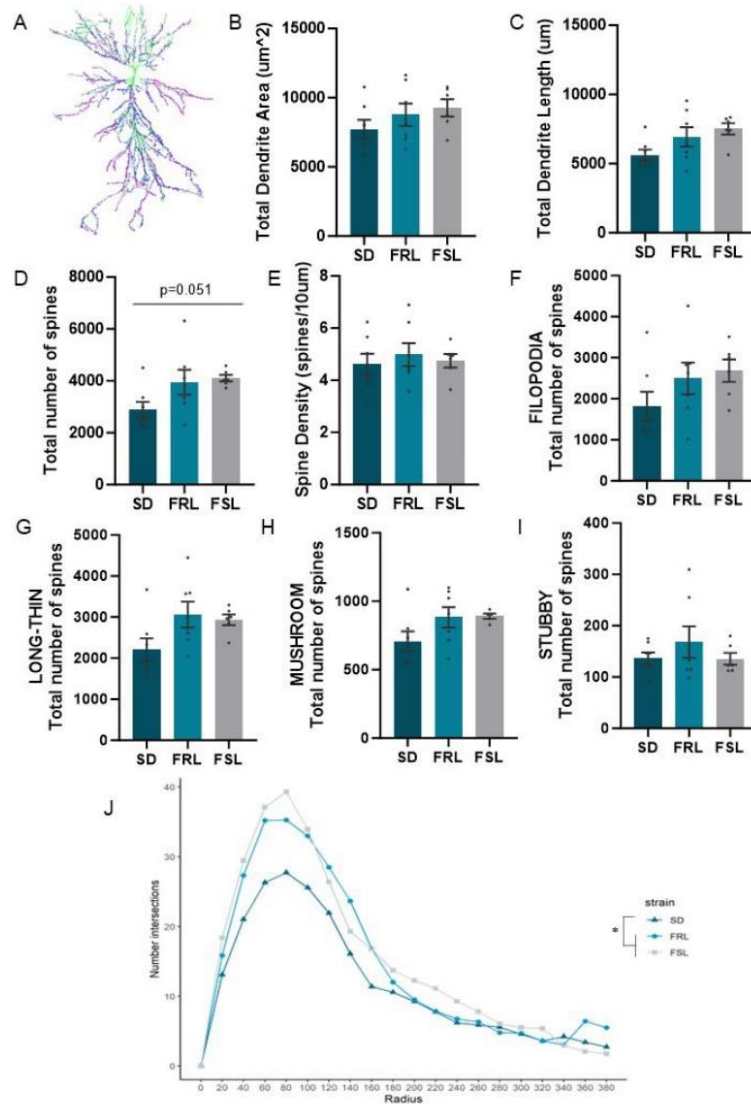


Figure 3: Morphological analysis of dorsal hippocampal CA1 neurons after CFC. A) Representative image from IMARIS 3D reconstruction. B) Total dendrite area (n=6-7), one-way ANOVA followed by Bonferroni [F (2, 17) = 1.195, p=0.3268]. C) Total dendrite length (n=7-8), one-way ANOVA followed by Bonferroni [F (2, 17) = 3.218, p=0.0653]. D) Total number of spines (n=7-8), one-way ANOVA followed by Bonferroni [F (2,17) = 3.560, p=0.0511], E) Spine density (n=7-8), one-way ANOVA followed by Bonferroni [F (2,17) = 0.2486, p=0.7827]. F) Number of filopodia spines (n=7-8), one-way ANOVA followed by Bonferroni [F (2, 17) = 1.722, p=0.2084]. G) Number of long-thin spines (n=7-8), one-way ANOVA followed by Bonferroni [F (2,17) = 3.164, p=0.0679]. H) Number of mushroom spines (n=7-8), one-way ANOVA followed by Bonferroni [F (2,16) = 2.449, p=0.1181]. I) Number of stubby spines (n=7-8), one-way ANOVA followed by Bonferroni [F (2, 17) = 0.8268, p=0.2920]. J) Sholl analysis (n=6-7), two-way ANOVA followed by Bonferroni [Strain: F(2,372) = 5.771, p=0.003; Radius F(1,372) = 191.542, p<0.001; Interaction: F(2,372) = 2.476, p=0.0850]. \*p<0.05

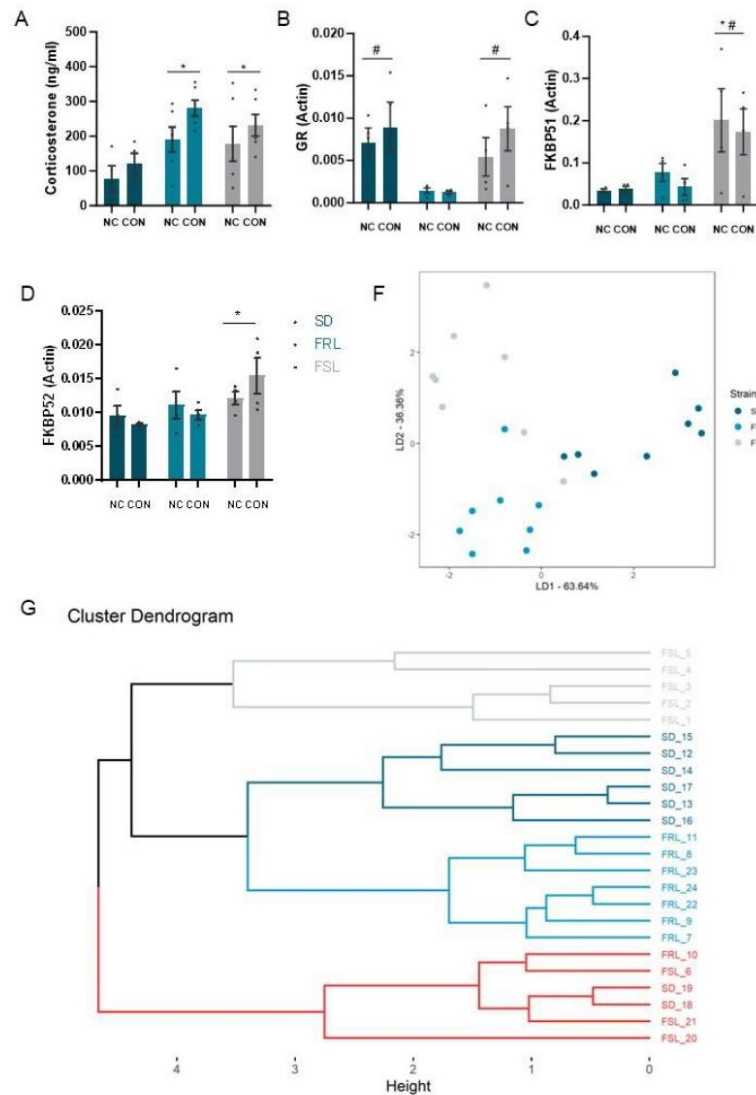


Figure 4: Stress-response during consolidation of fearmemory. A) Levels of corticosterone in serum (n=4-6), two-way ANOVA followed by Bonferroni [Strain:  $F(2, 26) = 6.562, p=0.0049$ ; Conditioning:  $F(1, 26) = 4.265, p=0.0490$ ; Interaction:  $F(2, 26) = 0.2221, p=0.8023$ ]. B) Hippocampal expression of GR (n=4), two-way ANOVA followed by Bonferroni [Strain:  $F(2, 18) = 6.566, p=0.0072$ ; Conditioning:  $F(1, 18) = 0.9988, p=0.3308$ ; Interaction:  $F(2, 18) = 0.3854, p=0.6856$ ]. C) Hippocampal expression of FKBP51 (n=3-4), two-way ANOVA followed by Bonferroni [Strain:  $F(2, 18) = 8.340, p=0.0027$ ; Conditioning:  $F(1, 18) = 0.3360, p=0.5693$ ; Interaction:  $F(2, 18) = 0.1412, p=0.8692$ ]. D) Hippocampal expression of FKBP52 (n=4), two-way ANOVA followed by Bonferroni [Strain:  $F(2, 17) = 4.646, p=0.0246$ ; Conditioning:  $F(1, 17) = 0.02538, p=0.8753$ ; Interaction:  $F(2, 17) = 1.377, p=0.2791$ ]. E) Linear discriminant analysis of the three strains based on alterations in the stress-response during consolidation. F) Hierarchical clustering analysis by k-means. Not-conditioned (NC), conditioned (CON). \* $p < 0.05$  compare to SD, # $p < 0.05$  compare to FRL

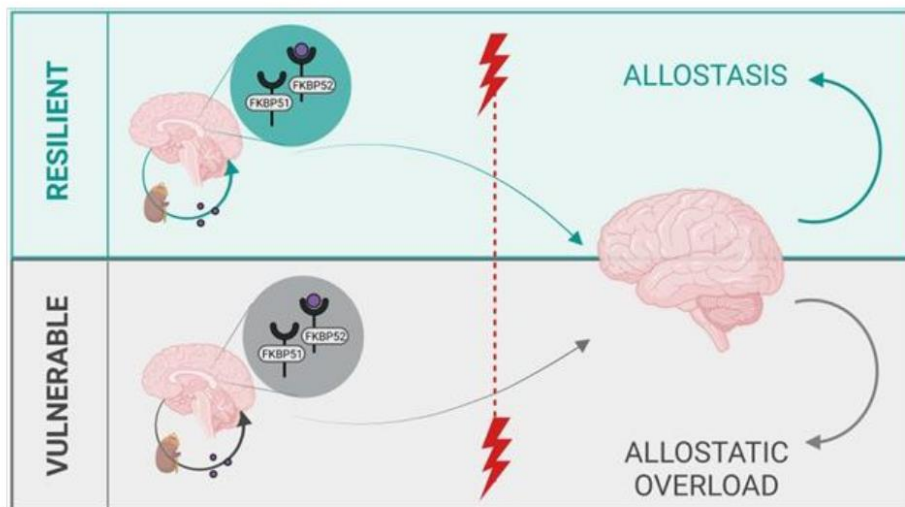


Figure 5: Previous configuration of the stress response system including basal and responsive corticosterone, GR expression and FKBP51 and 52, determine vulnerability and resilience after exposition to trauma or stress.

