

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

EDUARDA GODFRIED NACHTIGALL

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H<sub>2</sub> HISTAMINÉRGICO, 5-HT<sub>1A</sub> SEROTONINÉRGICOS  
E  $\beta$ -ADRENÉRGICO, DO HIPOCAMPO, NA FACILITAÇÃO DA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA  
DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO PELA EXPOSIÇÃO A UMA NOVIDADE**

Porto Alegre  
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

EDUARDA GODFRIED NACHTIGALL

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H<sub>2</sub> HISTAMINÉRGICO, 5-HT<sub>1A</sub>  
SEROTONINÉRGICOS E  $\beta$ -ADRENÉRGICO, DO HIPOCAMPO, NA  
FACILITAÇÃO DA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO  
CONTEXTO PELA EXPOSIÇÃO A UMA NOVIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Gerontologia Biomédica.

**Orientadora:** Prof. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw  
**Linha de pesquisa:** Aspectos biológicos no envelhecimento

Porto Alegre

2018

## Ficha Catalográfica

N124p Nachtigall, Eduarda Godfried

Participação dos receptores H2 histaminérgicos, 5-HT1A serotoninérgicos e  $\beta$ -adrenérgico, do hipocampo, na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade / Eduarda Godfried Nachtigall . – 2018.

68 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw.

1. Extinção. 2. Medo Condicionado ao Contexto. 3. Hipocampo. 4. Sistema modulatório. 5. Novidade. I. Myskiw, Jociane de Carvalho. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

EDUARDA GODFRIED NACHTIGALL

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H<sub>2</sub> HISTAMINÉRGICO, 5-HT<sub>1A</sub>  
SEROTONINÉRGICOS E β-ADRENÉRGICO, DO HIPOCAMPO, NA  
FACILITAÇÃO DA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO  
CONTEXTO PELA EXPOSIÇÃO A UMA NOVIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Gerontologia Biomédica.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Carolina Garrido Zinn – UFRGS

---

Profa. Dra. Irani Iracema de Lima Argimon – IGG/PUCRS

---

Profa. Dra. Carla H. A. Schwanke – IGG/PUCRS (suplente)

Porto Alegre

2018

## **Agradecimentos**

A minha Família, obrigada por me apoiar em todos os aspectos da minha vida. Pai e Mãe agradeço pelo incentivo na incansável busca pelo conhecimento, pela dedicação, por me inspirarem e acreditarem em mim, sou eternamente grata. Amo muito muitíssimo muito vocês;

Agradeço à Deus por me acompanhar em todos os momentos, guiando e iluminando meus caminhos;

A CAPES por proporcionar a bolsa parcial para a realização do mestrado;

Agradeço ao Centro de memória em especial ao “mestre” Ivan Izquierdo pela oportunidade de fazer parte do Centro de Memória, por me receber de braços abertos e com muito carinho. E por ser uma grande inspiração e exemplo de caráter científico e pessoal;

Agradeço imensamente a minha orientadora professora Dra. Jociane de Carvalho Myskiw por todo apoio, horas de dedicação, empenho, pela confiança a mim depositada e pelos conhecimentos compartilhados;

Agradeço a professora Dra. Cristiane Furini, obrigada pelo auxílio, paciência e aprendizados;

A todos meus colegas e amigos do Centro de memória, a querida Clarissa Penha Farias pela parceria ao decorrer do mestrado. Ao Jonny Anderson por todo apoio na realização da minha pesquisa. E aos demais colegas: Dra. Carolina Zinn, Ms. Scheila Schmidt, Ms. Rodrigo Narvaes, Ms. Lorena Cavalcanti, Ms. Flávia Ferreira, Fernanda Rodrigues, Eduardo de Assis Brasil, Bruna Saenger, Rafael Sommer, Vitória D’ávila, Ana Luiza Siqueira e Letícia Bühler obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pelo incentivo e trocas de conhecimento. Desejo muito sucesso e felicidade para todos vocês!

A Carla técnica do CeMBE , obrigada pela parceria e pela ótima companhia;

A PUCRS por me proporcionar a infraestrutura necessária para o desenvolvimento da minha formação;

Obrigada a todos os professores e equipe de funcionários do Instituto de Geriatria e Gerontologia (IGG) e do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica.

As minhas colegas do mestrado, pelos momentos que dividimos juntas e as amigas que vou lembrar sempre;

Ao meu namorado Naferson por me incentivar, pela paciência e força para continuar sempre;

As minhas amigas Thaís, Verônica e Taíse por sempre me apoiarem;

Aos professores que aceitaram fazer parte da comissão examinadora e contribuir para o enriquecimento desta dissertação.

## Resumo

As memórias de medo podem levar a comportamentos defensivos em resposta a ameaças, as quais podem ser moduladas por diferentes drogas ou exposição a uma novidade, por exemplo. O sistema histaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico possuem receptores localizados em diversas áreas do cérebro, e estes participam no processo de extinção da memória. Recentemente, nosso grupo demonstrou que animais expostos a uma novidade 1 e 2 h antes ou 1 h após uma sessão fraca de extinção que não expressavam a memória de extinção passavam a expressar. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a participação dos receptores H<sub>2</sub> histaminérgicos, 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos, do hipocampo, na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade. Para isso, ratos *Wistar* machos (300-330 gramas) foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implante bilateral de cânulas guia na região CA1 do hipocampo. Após 7 dias de recuperação, os animais foram submetidos aos protocolos experimentais (medo condicionado ao contexto com ou sem exposição a uma novidade). Verificou-se que as infusões intra-CA1 imediatamente após a exposição a novidade ou após sessão de extinção, do agonista Dimaprit (2,3  $\mu$ g/lado) ou antagonista Ranitidina (17,5  $\mu$ g/lado) dos receptores H<sub>2</sub> histaminérgicos não afetaram a facilitação da extinção pela exposição a novidade, sugerindo que este receptor não é necessário neste processo. Observou-se também que quando administrado o agonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgico, 8-OH-DPAT (6,25 $\mu$ g/lado) e quando bloqueado o receptor  $\beta$ -adrenérgico pelo antagonista Timolol (1,0  $\mu$ g/lado) houve um prejuízo da facilitação da formação da memória de extinção pela exposição a uma novidade, sugerindo assim que esses receptores estão envolvidos no processo de formação da extinção da memória de medo condicionada ao contexto. Assim, os resultados obtidos sugerem que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos, mas não os H<sub>2</sub> histaminérgicos, participam na facilitação da formação da extinção da memória de medo condicionada ao contexto pela exposição a uma novidade, indicando uma regulação complexa do efeito novidade por alguns, mas não todos, importantes sistemas de neurotransmissores.

**Palavras chaves:** Extinção, Medo condicionado ao contexto, Hipocampo, Sistema modulatório, novidade, *Behavioral tagging*.

## Abstract

Fear memories can lead to defensive behavior in response to threats, which can be modulated by different drugs or exposure to a novelty, for example. The histaminergic, serotonergic and adrenergic systems have receptors located in several areas in the brain, which are involved in the process of extinction memory. It is known that different processes can modulate the extinction memory, among them is the exposure to a novelty, which facilitates the formation of extinction memory. Here we investigate the participation of the H<sub>2</sub>-histaminergic, 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic and  $\beta$ -adrenergic receptors of the hippocampus on the enhancement of extinction of fear memory by exposure to novelty. For this, male *Wistar* rats (300-330 g) were submitted to a stereotaxic surgery to implant guide cannula into the CA1 region of hippocampus. After 7 days of recovery, the animals were submitted to the experimental protocols (contextual fear conditioning with or without exposure to a novelty). The intra-CA1 infusion immediately after exposure to novelty or after extinction of the histaminergic H<sub>2</sub> receptors agonist, Dimaprit (2,3  $\mu$ g per side) or the antagonist, Ranitidine (17,5  $\mu$ g per side) had no effect on the facilitation of extinction by exposure to novelty, suggesting that this receptor is not necessary in this process. It was also observed that the administration of 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptor agonist, 8-OH-DPAT (6.25  $\mu$ g per side) and of the blocker of  $\beta$ -adrenergic receptor, Timolol (1.0  $\mu$ g per side) impaired the enhancement of the extinction memory induced by exposure to a novelty, thus suggesting that these receptors are involved in the process of facilitation of extinction by exposure to novelty. Thus, the results suggest that the 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic and  $\beta$ -adrenergic receptors, but not H<sub>2</sub>-histaminergic receptors, play a role in the enhancement of extinction induced by novelty, indicating a complex regulation of the novelty effect by some, but not all, important neurotransmitter systems.

**Keywords:** Extinction; fear conditioning; hippocampus; modulatory systems; novelty; *Behavioral tagging*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Desenho ilustrativo do cérebro de rato mostrando sombreada a região CA1 do hipocampo dorsal, onde posteriormente é realizada a implantação das cânulas guias .....	28
<b>Figura 2:</b> Equipamento estereotáxico usado para a cirurgia. ....	28
<b>Figura 3:</b> Aparato utilizado para medo condicionado ao contexto.....	30
<b>Figura 4:</b> Desenho representativo do protocolo experimental 1.....	31
<b>Figura 5:</b> Desenho representativo do protocolo experimental 2 .....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dose das drogas .....	29
<b>Tabela 2:</b> Grupos experimentais .....	34

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 ENVELHECIMENTO.....	14
2.2 MEMÓRIA.....	15
2.3 MODULAÇÃO DA MEMÓRIA .....	20
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	28
4.2 ANIMAIS .....	28
4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA .....	28
4.4 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS .....	30
4.5 INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS .....	30
4.6 MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO .....	31
4.6.1 PROTOCOLO DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO.....	31
4.6.2 PROTOCOLO DA FACILITAÇÃO DA EXTINÇÃO PELA EXPOSIÇÃO A UMA NOVIDADE.....	32
4.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	34
4.8 CONTROLE HISTOLÓGICO .....	35
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4.10 ASPECTOS ÉTICOS .....	35
<b>5 ARTIGO CIENTÍFICO PRONTO PARA SUBMISSÃO .....</b>	<b>36</b>
5.1 ARTIGO ORIGINAL.....	36
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>67</b>
<b>SUBMISSÃO NA NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Squire e Kandel (2000), o envelhecimento pode ser caracterizado pela diminuição progressiva da capacidade funcional, acarretando limitações de ordem física, psicológica e social que afetam a qualidade de vida do idoso. Dentre os diferentes processos que diminuem com o envelhecimento, está a capacidade de aquisição e manutenção de memórias que, segundo Izquierdo (2011), pode ser definida como a aquisição, a consolidação e a conservação de informações (IZQUIERDO, 2011). Dentre as diferentes estruturas encefálicas envolvidas no processamento das memórias merecem destaque o hipocampo, a amígdala basolateral e o córtex pré-frontal (BENETTI et al., 2015). Estas regiões estão envolvidas também na extinção da memória de medo (IZQUIERDO et al., 2016).

Considerada como um novo aprendizado, a extinção, ou, como é clinicamente chamada, terapia de exposição, é considerada uma das principais formas de tratamento para distúrbios de ansiedade e transtorno de estresse pós-traumático (PONNUSAMY 2016; IZQUIERDO et al., 1965; RESCORLA, 2001; 2004). Existem, porém, vários efeitos secundários desse tratamento, o mais notável desses é a angústia às vezes causada pela evocação do episódio traumático no processo (RESCORLA, 2001, 2004), tornando-se clara a necessidade de um melhor entendimento sobre os processos celulares e moleculares envolvidos na formação dessa memória de extinção, bem como, o desenvolvimento de estratégias comportamentais ou farmacológicas que possam facilitar a extinção.

Neste contexto, existem vários fatores que podem modular a extinção da memória, como por exemplo, neurotransmissores (histamina, noradrenalina, dopamina), estado de ânimo, uso de drogas e exposição a uma novidade (FIORENZA et al., 2012; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; de CARVALHO MYSKIW et al., 2014; de CARVALHO MYSKIW et al., 2015; IZQUIERDO et al., 2016). A facilitação da extinção pela exposição a uma novidade foi demonstrada pela primeira vez em roedores por De Carvalho Myskiw et al., (2013 e 2014) e posteriormente, em humanos por Dunsmoor et al., (2015). Entretanto, mesmo tendo uma clara aplicabilidade clínica, devido a sua recente descoberta, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nessa facilitação.

Dentre os possíveis mecanismos que podem estar envolvidos nessa facilitação da extinção pela exposição a uma novidade, encontra-se o sistema histaminérgico. A histamina atua como um neurotransmissor no cérebro (PASSANI et al., 2000), controlando diversas funções neurobiológicas e comportamentais, tais como o ciclo sono-vigília, o consumo de água, a atividade motora e a nocicepção (BROWN et al., 2001; HAAS; PANULA, 2003).

Ainda, esta amina está envolvida na consolidação e na extinção da memória de medo (Da SILVA et al., 2006; BONINI et al., 2011; FABRI ET al., 2016; IZQUIERDO et al, 2016; BONINI et al., 2011). Outro possível sistema é o serotoninérgico, em particular, através dos receptores da família 5-HT<sub>1</sub>, que tem se destacado no meio das pesquisas, isto pode ser devido à alta densidade de expressão destes receptores em áreas relacionadas à memória (OGREN et al., 2008; CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013; COWEN; SHERWOOD, 2013). Apesar disso, o papel do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, nas diferentes fases da memória de extinção e reconsolidação ainda não está bem explorado (STIEDL et al., 2015). Outro importante neurotransmissor envolvido com a formação de diferentes tipos de memória é a noradrenalina uma amina biogênica que exerce a sua ação através de duas famílias de receptores divididas ainda em subtipos:  $\alpha$  e  $\beta$ . Dentre esses, os receptores  $\beta$ -adrenérgicos desempenham um importante papel na aprendizagem e na memória (CAHILL et al., 1994; COTECCHIA et al., 2012).

Assim, baseado no texto supracitado a presente pesquisa teve como objetivo investigar participação dos receptores H<sub>2</sub> histaminérgicos, 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos, da região CA1 do hipocampo dorsal, na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ENVELHECIMENTO

A nível biológico, o envelhecimento está associado ao acúmulo de uma grande variedade de danos moleculares e celulares. Com o decorrer do envelhecimento, esses danos podem levar a uma perda gradual das reservas fisiológicas, incluindo o sistema imunológico, conseqüentemente aumentando o risco de doenças, ocorrendo assim, um declínio geral da capacidade intrínseca do indivíduo, resultando, em última instância, na morte (OMS, 2015).

A população mundial encontra-se em um processo de reestruturação demográfica que se caracteriza pela redução das taxas de fecundidade com conseqüente aumento da expectativa de vida (CLASS, SCHWANKE, 2012). Este fenômeno mundial ocorre principalmente em países em desenvolvimento, demonstrando melhorias das condições de vida. Atualmente, existe uma estimativa de que aproximadamente 10,7% da população mundial é formada por pessoas com 60 anos ou mais. Estudos apontam que 1 em cada 4 latino-americanos e caribenhos será idoso em 2025. Ainda, as pessoas com 65 anos representavam 5,9% da população em 2000 e aumentaram para 7,4% em 2010. De acordo com as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2013) no Brasil, a população idosa irá quadruplicar até 2060, representando assim 26,7% da população.

Segundo Burlá e colaboradores (2013), o aumento da expectativa de vida é uma conseqüência da diminuição das taxas de mortalidade por doenças infectocontagiosas e crônicas em todas as idades, devido às melhoras das condições de vida em geral, do avanço da medicina e de um maior acesso aos serviços de saúde (BURLÁ et al., 2013).

Dentre as modificações biológicas que ocorrem no processo do envelhecimento, destaca-se o declínio das funções cognitivas, tais como, aprendizagem, memória, atenção, vigilância, raciocínio e solução de problemas (BISHOP, 2010). Esses declínios funcionais podem ser decorrentes de diferentes fatores, tais como, a atrofia cerebral com dilatação dos sulcos e ventrículos, perda de neurônios, a presença de emaranhados neurofibrilares e a formação de corpos de Lewy, dentre outros (NORDOM et al., 2009; RAZ et al., 2007; MORRISON, BAXTER, 2012; ANDREWS et al., 2007).

Além disso, esquecimentos e queixas constantes de prejuízos de memória são bastante comuns entre os idosos. O envelhecimento cerebral, mesmo na ausência de doença,

está relacionado com declínio das funções cognitivas, incluindo a memória. Esses prejuízos estão vinculados, não a uma perda do número de neurônios, mas a mudanças sinápticas específicas e sutis em duas estruturas cerebrais envolvidas com a memória, que são o hipocampo e o córtex pré-frontal (MORRISON, 2012)

## 2.2 MEMÓRIA

A memória caracteriza-se pela capacidade que o cérebro tem de adquirir, consolidar e conservar informações, que persistem ao longo do tempo e que podem ser recuperadas para posteriormente utilizá-las (IZQUIERDO, 2011). Além disso, a memória também é fundamental para a adaptação ao meio, modificação dos comportamentos, resoluções de problemas, tomadas de decisões. Ainda, são essenciais para a construção da personalidade, do caráter e das interações sociais, uma vez que o acervo de nossas memórias, adquiridos através das experiências, nos torna seres únicos (ALBERINI; LEDOUX, 2013).

A aquisição de informações é também chamada de aprendizagem, e a evocação de lembrança ou recordação, que caracteriza que o aprendizado de fato formou uma memória. Dentre as muitas funções da memória, encontra-se a capacidade de recordar o passado e planejar o futuro (SCHACTER, ADDIS 2007; STERN, ALBERINI, 2013).

O arcabouço de memórias pode ser subdividido quanto ao tempo em que perduram e quanto ao seu conteúdo. Quanto ao tempo de duração, as memórias podem ser classificadas em memória de curta ou de longa duração. As memórias de curta duração (MCD) permanecem armazenadas por apenas alguns minutos ou poucas horas, podendo perdurar por no máximo 6 horas. Entretanto, as memórias de longa duração (MLD) podem permanecer armazenadas por muitas horas, dias, meses, anos ou mesmo, pela vida toda (denominadas de memórias remotas) (IZQUIERDO et al., 1998, 1999).

Do ponto de vista funcional, existe um tipo de memória que é crucial no momento da aquisição e da evocação de toda e qualquer informação, denominada memória de trabalho, usada para entender e contextualizar a realidade a nossa volta, permitindo que o indivíduo compreenda o ambiente externo que lhe cerca e o que está fazendo. Este tipo de memória permite tomar decisões rápidas sobre quais informações deve ser armazenadas ou evocadas e o que fazer com ela. Esta memória não forma traços e não é seguida de alterações bioquímicas muito importantes, e perdura por milissegundos, segundos ou no máximo dois ou três minutos (IZQUIERDO, 2011).

Referente ao seu conteúdo, as memórias podem ser classificadas em: declarativas ou não declarativas. As memórias declarativas referem-se à capacidade de recordação consciente sobre fatos, eventos ou acontecimentos. Essas são compostas de três componentes da informação: onde, quando e como elas foram adquiridas. Já as memórias não declarativas, são aquelas que o indivíduo não percebe de forma clara que está aprendendo. São caracterizadas como as capacidades ou habilidades motoras e sensoriais: o indivíduo tem a capacidade de, por exemplo, extrair progressivamente os elementos comuns a partir de uma série de eventos separados (ALBERINI et al., 1999; SQUIRE 2004; IZQUIERDO, 2011).

As memórias são formadas pelos neurônios e, acredita-se que permanecem armazenadas em redes neuronais e, posteriormente são evocadas pelas mesmas redes neuronais ou por outras (IZQUIERDO 2011). O hipocampo desempenha um papel fundamental na formação de memórias de curto e longo prazo, especialmente a subárea CA1 (Izquierdo et al., 1998a), sendo que diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com esta estrutura para regular a aquisição e o armazenamento de novas informações (Izquierdo et al., 1998b), entre elas os córtices entorrinal, perirrinal e pré-frontal medial (CPFm).

O estabelecimento de uma memória requer modificações plásticas na força das conexões sinápticas. Um fenômeno conhecido capaz de aumentar a eficácia sináptica é a Potenciação de Longa Duração (LTP sigla do inglês *Long-Term Potentiation*), este compartilha muitas propriedades com os processos de aprendizado e memória, como por exemplo vias moleculares e estruturas como o hipocampo. Além disso, na LTP, assim como na memória, pode-se distinguir, pelo menos, duas fases de armazenamento: um estágio inicial, independente de síntese proteica, e, de curta duração (LTP precoce e MCD), e um estágio mais tardio, dependente de síntese proteica e de expressão gênica, e, de longa duração (LTP tardia e MLD) (LEDOUX, 2004; MARTIN, GRIMWOOD, MORRIS, 2000).

Neste contexto, a memória passa por diferentes processos fundamentais, dentre eles está à consolidação e a extinção de memória. O processo que ocorre logo depois do aprendizado denomina-se de **consolidação**. A consolidação é o processo de armazenamento e estabilização da informação recém-adquirida (BALDI; BUCHERELLI, 2014). Dentre as diversas estruturas encefálicas envolvidas no processo de consolidação da memória merecem destaque o hipocampo, a amígdala basolateral e o córtex pré-frontal (IZQUIERDO, FURINI, MYSKIW, 2016).

O processo de consolidação leva à formação da memória de Longa Duração (MLD), e é bastante complexo, dependente de diferentes mecanismos celulares e moleculares como,



por exemplo, a transcrição gênica e a síntese de novas proteínas e dependente da síntese de proteínas relacionadas à plasticidade (PRP) (ARTINIAN et al., 2008). Este processo ainda pode ser modulado por situações de estresse, ansiedade e estado de alerta do indivíduo ocorrendo essencialmente em algumas regiões do cérebro, como na amígdala basolateral e no hipocampo dorsal (AGREN, 2014; ARTINIAN et al., 2008; IZQUIERDO, FURINI, MYSKIW, 2016).

Enquanto as memórias estão sendo consolidadas ou quando são evocadas, estas se encontram em um estado lábil e são sensíveis a novas interferências como inibidores de síntese proteica, eventos traumáticos ou à incorporação de novas informações (IZQUIERDO; BEVILAQUA; CAMMAROTA, 2006) podendo levar a dois processos distintos: a reconsolidação ou a extinção. No processo de reconsolidação, novas informações podem ser agregadas ao conteúdo da memória já existente, permitindo assim a sua modificação (ALBERINI; LEDOUX, 2013; CURRAN; ROBBINS, 2013; SANDRINI et al., 2013). E a evocação de uma memória previamente consolidada pode ser inibida pela extinção.

Descrita pela primeira vez por Pavlov em 1927, a extinção consiste na inibição da evocação de uma memória previamente adquirida (IZQUIERDO, 2011; de CARVALHO MYSKIW et al., 2013). Apesar de representar um “desaparecimento comportamental”, a extinção não é sinônimo de esquecimento, mas sim um processo ativo de aprendizagem decorrente da reexposição à informação/situação na ausência do seu reforço, o qual leva a formação de uma nova memória que se sobrepõe a original. Comportamentalmente é verificada pela diminuição da resposta condicionada devido à apresentação do estímulo condicionado na ausência do estímulo incondicionado, desvinculado de recompensas ou punição (FIORENZA et al., 2011, 2012; FURINI et al., 2013). Por se tratar de um novo aprendizado, o processo de extinção envolve substratos neuroanatômicos, celulares e moleculares, similares àqueles inicialmente recrutados para a consolidação da memória original, envolvendo também síntese proteica (SZAPIRO et al., 2003; VIANNA et al., 2001).

Acredita-se que o processo de formação das memórias envolva alterações na rede neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre os neurônios e que o hipocampo dorsal é uma estrutura essencial para a aquisição da memória do medo condicionado ao contexto (DUDAI et al., 1989; FIORENZA 2012). Assim como a consolidação da memória original, a extinção também necessita da participação de diferentes neurotransmissores capazes de modular diversos processos mnemônicos, inclusive a extinção da memória. Diferentes estudos têm demonstrado que a formação da memória de extinção requer a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato), e

pode ser modulada pelos receptores dopaminérgicos, podendo ser modulada pelos receptores H2 histaminérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos no hipocampo (principalmente a região CA1), amígdala basolateral e córtex pré-frontal ventromedial, além de necessitar de síntese de proteínas nestas três estruturas logo após a sua aquisição (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014; FIORENZA et al., 2012). As memórias aversivas são essenciais para a sobrevivência, entretanto quando são evocadas fora do contexto podem desencadear desordens psiquiátricas tais como distúrbios de ansiedade, síndrome do pânico e estresse pós-traumático, e a extinção é utilizada na clínica como terapia de exposição (FIORENZA et al., 2012; MILAD, QUIRK, 2012)

O paradigma de medo condicionado ao contexto é o mais utilizado em roedores para estudar as memórias de medo e de extinção. É um condicionamento clássico que foi proposto por Pavlov no início do século vinte, este condicionamento consiste na apresentação de um estímulo inicialmente neutro (estímulo condicionado - CS; do inglês: *conditioned stimulus*), seguido da apresentação de um estímulo significativo (estímulo incondicionado - US, do inglês: *unconditioned stimulus*). A apresentação desse pareamento por diversas vezes gera uma resposta condicionada (CR, do inglês: *conditioned response*), a qual evidencia que a associação entre o CS e o US foi aprendida (PAVLOV, 1927; IZQUIERDO, 2011; IZQUIERDO, FURINI, MYSKIW, 2016). A apresentação do estímulo condicionado sozinho sem o seu reforço (quando a memória da tarefa já está consolidada), ou seja, sem o estímulo incondicionado, é o que desencadeia o processo de extinção da memória. Desta forma, acredita-se que a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de extinção das memórias aversivas pode resultar em melhorias no tratamento das desordens psiquiátricas. (FURINI; MYSKIW; IZQUIERDO, 2014; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

Sabe-se que, animais expostos previamente a um ambiente novo, apresentam uma facilitação da aprendizagem da extinção da memória de medo (de CARVALHO MYSKIW et al., 2013; de CARVALHO MYSKIW et al., 2014). Esta facilitação pode ser explicada por um mecanismo de plasticidade proposto pela primeira vez pelos pesquisadores Frey e Morris em 1997, e atualmente conhecido como Marcação e captura sináptica (STC, do inglês *Synaptic Tagging and Capture*). A hipótese do STC propõe que quando uma determinada via sináptica é estimulada, dois eventos dissociáveis ocorrem: primeiro há a expressão da LTP precoce e a marcação dessa sinapse por um *tag*, que irá sinalizar essa atividade sináptica de forma específica. Paralelamente, se o estímulo for forte o suficiente, haverá a síntese das proteínas relacionadas à plasticidade, chamados coletivamente de PRPs, que serão posteriormente

capturadas apenas pelas sinapses marcadas pelo *tag*, e não atuarão nas demais que não foram marcadas e, portanto, não foram estimuladas. A ação das PRPs propicia a sustentação desse estado potenciado e a formação da LTP tardia. Sem a disponibilidade das PRPs, a sinapse gradualmente retorna ao seu estado basal, não potenciado e não-marcado. Desta forma, a *tag* marca a sinapse de forma temporária, ou seja, há uma janela de tempo no qual a sinapse estará acessível à ação das PRPs e, assim, suscetível a modificações duradouras (BARCO et al., 2008; REDONDO e MORRIS, 2011).

Comportamentalmente, a facilitação da formação de uma memória pela exposição a uma novidade foi observada pelos pesquisadores argentinos Moncada e colaboradores em 2007, que o denominaram de *Behavioral tagging*, demonstraram que um protocolo fraco da tarefa de Esquiva Inibitória (EI), foi capaz de induzir a formação de uma memória de curta (MCD), mas não de longa duração (MLD) em roedores. Mas com a exploração de um ambiente novo (novidade - uma experiência forte capaz de induzir síntese proteica), 1 hora antes ou depois do treino fraco da EI, observou-se a formação da MLD. Por outro lado, neste estudo também foi observado que se a novidade era exposta em outros momentos (2 horas antes ou depois do treino fraco da EI), ou se a síntese de proteínas fosse inibida pela administração de Anisomicina imediatamente após a novidade, ou ainda, se o ambiente já fosse familiar para os animais, o efeito de associação não ocorria. Além do mais, o efeito amnésico da Anisomicina sobre um treino forte da EI podia ser prevenido se os animais fossem expostos a uma novidade 1 hora antes da sessão de treino. Moncada e colaboradores em 2011 demonstraram a participação de algumas proteínas relacionadas a plasticidade, tais como PKA (proteína quinase dependente de AMP cíclico), PKC (proteína quinase C) e CaMKII (proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina), além dos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e noradrenérgico nesse processo, demonstrando assim que é possível modular o processo de marcação através de agonistas e antagonistas específicos para cada sistema modulatório (MONCADA et al., 2011).

Ainda, de Carvalho Myskiw e colaboradores (2013, 2014) mostraram, pela primeira vez, que esse mesmo mecanismo de plasticidade sináptica ocorre também durante a formação da memória de extinção em uma determinada janela de tempo; a exposição a uma novidade 2 ou 1 hora antes ou 1 hora depois da sessão fraca de extinção (10 minutos). Como novidade os animais foram submetidos a uma caixa de campo aberto (OF; do inglês *Open field*). Foi observado que o mecanismo STC requer síntese proteica ribossomal e é dependente do sistema mTOR (do inglês *mammalian target of rapamycin*). Além disso, foi observado um efeito positivo da novidade sobre a formação da memória de extinção, e que envolve

diferentes mecanismos moleculares hipocampais, como: receptores NMDA, canais de cálcio do tipo L voltagem dependente, proteínas cálcio/calmodulina quinase II e o turnover de proteínas sinápticas (de Carvalho Myskiw et al., 2013, 2014).

Menezes e colaboradores (2015) verificaram o efeito da novidade na facilitação da formação da memória de extinção na tarefa de EI, para isso no primeiro dia os animais foram colocados em uma plataforma e quando o mesmo descia recebiam estímulo elétrico (0,5 mA, 2 segundos) e imediatamente eram retirados do aparato. Vinte e quatro horas após os animais foram colocados novamente na plataforma, e quando desciam era deixado que explorassem o aparato por 300 segundos. Para a extinção o procedimento, foi repetido 3 vezes, em intervalos de 90 minutos. No terceiro dia, os animais foram submetidos a um teste de retenção, o qual avaliou o tempo de latência. A exposição à novidade 30 minutos antes do treino da extinção, essa novidade é uma caixa de campo aberto. Foi observado que a facilitação da formação da memória de extinção é dependente dos receptores D1 do sistema dopaminérgico, mas não dos receptores D5 no hipocampo (MENEZES et al., 2015).

Um estudo de Moncada (2017) forneceu evidências de que a Área Tegmental Ventral (VTA – do inglês: *ventral tegmental area*) é uma das estruturas cerebrais responsáveis por controlar a síntese de PRPs necessárias para a consolidação da memória, atuando através dos receptores D1/D5 no hipocampo. E ainda demonstrou que o Locus Coeruleus pode ser uma segunda estrutura com função semelhante, atuando tanto de forma independente quanto complementar ao VTA, através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos também do hipocampo (MONCADA, 2017).

De acordo com Ballarini e colaboradores (2009) e de Carvalho Myskiw et al. (2013), os efeitos da exposição a uma novidade sobre a aprendizagem tanto na EI quanto na facilitação da extinção na tarefa de medo condicionado ao contexto, respectivamente, dependem da nova natureza do estímulo, uma vez que a exposição a um ambiente familiar não produziu efeitos (BALLARINI et al., 2009; de CARVALHO MYSKIW et al., 2013).

Assim se fazem necessários mais estudos sobre a facilitação da formação da memória de extinção pela exposição a uma novidade, e os mecanismos envolvidos no mesmo.

### 2.3 MODULAÇÃO DA MEMÓRIA

Os estudos envolvendo a modulação da formação da memória iniciaram com a investigação da ação de drogas sobre os processos de aprendizagem. Diversos pesquisadores

têm dedicado esforços para investigar a neurofisiologia da modulação da memória, que conceitualmente refere-se à influência de drogas, neurotransmissores ou hormônios sobre as fases de formação e conservação da memória (CAHILL; MCGAUGH, 1996; MCGAUGH, 2004; QUEVEDO et al., 2003; ROESLER; SCHRÖDER, 2011; TULLY; BOLSHAKOV, 2010).

Com os avanços do conhecimento descobriu-se que durante a formação das memórias, além da participação de diferentes estruturas cerebrais (hipocampo, amígdala basolateral, córtex pré frontal, córtex insular, dentre outros), também é necessário o envolvimento de diversos neurotransmissores. Dentre estes, estão o glutamato, a dopamina, a histamina a noradrenalina e a serotonina que estão entre os principais neurotransmissores envolvidos com o processamento de memória (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO, 2011).

Entre os neurotransmissores que regulam a plasticidade sináptica e a formação da memória está a histamina. Foi descrita pela primeira vez por Kwiatkowski em 1941 e atua como um neurotransmissor no cérebro (PASSANI et al., 2000), controlando diversas funções neurobiológicas e comportamentais, tais como o ciclo sono-vigília, o consumo de água, a atividade motora e a nocicepção (BROWN et al., 2001; HAAS E PANULA, 2003). A liberação de histamina demonstra uma clara periodicidade, seguindo um ritmo circadiano paralelo à mudança de padrão de disparo dos neurônios histaminérgicos, que ocorre durante o ciclo sono-vigília (MOCHIZUKI et al., 1992). Esta amina também está envolvida na evocação, consolidação e extinção de memórias aversivas e no controle de ansiedade (DA SILVA et al., 2006; BONINI et al., 2011; FABBRI et al., 2016).

Nos vertebrados, os neurônios produtores da histamina localizam-se no núcleo tuberomamilar (NTM) do hipotálamo (HAAS, PANULA, 2003; HAAS et al., 2008). As principais terminações nervosas das projeções histaminérgicas diferem levemente entre as espécies, mas elas cobrem essencialmente todas as áreas do sistema nervoso central (SNC), havendo inervação de moderada a densa do córtex cerebral, amígdala, hipocampo, substância negra, estriado (PANULA E PIRVOLA, 1989, 1990).

A síntese da histamina ocorre nos neurônios do NTM a partir do aminoácido L-histidina, que é transportada para o neurônio pelo transportador de L-aminoácidos presente na membrana celular. Uma vez no citoplasma, a L-histidina é descarboxilada pela enzima histidina descarboxilase, originando então a histamina. Esta amina recém formada é transportada para vesículas de armazenamento pela enzima vesicular transportadora de monoaminas (VMAT-2). Quando a vesícula se funde com a membrana pré-sináptica após a

chegada de um potencial de ação, ocorre liberação de histamina pela terminação axônica. No espaço extracelular, a histamina é metilada pela enzima histamina metil-transferase, localizada nas regiões pós-sinápticas e na glia. Desta metilação resulta a tele-metil-histamina, um metabólito sem atividade biológica conhecida. A velocidade de renovação da histamina neuronal é bastante alta, e sua meia-vida, que normalmente gira em torno de 30 minutos, pode mudar rapidamente dependendo da atividade neuronal. Por exemplo, em situações estressantes, como imobilização forçada ou choque nas patas de ratos, a velocidade de renovação de histamina neuronal aumenta (ERICSON, KÖHLER, BLOMQVIST, 1991). A taxa de liberação da histamina, ao contrário de outras aminas biogênicas, é determinada pela biodisponibilidade do seu precursor histidina (HAAS et al., 2008).

As diferentes ações da histamina no SNC são mediadas pelos receptores H1, H2, H3 e H4 que estão acoplados a proteínas G e diversos segundo-mensageiros. Os receptores H1, H2 e H3 são expressos de forma abundante no cérebro, enquanto o receptor H4, descoberto por Nguyen et al. em 2001, é expresso principalmente nos tecidos periféricos, como por exemplo, na medula óssea e nos leucócitos (HAAS et al., 2008).

O receptor H1 é encontrado em altas densidades em regiões do cérebro e está relacionado ao controle do estado nutricional, comportamental e neuroendócrino, como o hipotálamo, núcleos colinérgicos e aminérgicos do cerebelo, tálamo e córtex. A histamina, através dos receptores H1, consegue excitar neurônios em várias regiões do cérebro incluindo hipotálamo, amígdala, hipocampo e córtex cerebral (HAAS ET al., 2008). Mesmo sendo bem conhecido pelo seu efeito sedativo e anti-alérgico produz um declínio na cognição humana através do bloqueio do receptor H1 o seu efeito tanto na facilidade quanto na inibição do aprendizado e da memória tem sido estudado em animais (YANAI et al., 1995).

A distribuição do receptor H2 no cérebro de roedores é generalizada, porém mais consistente do que as projeções histaminérgicas do receptor H1, indicando que o receptor H2 controla um amplo número de ações pós-sinápticas da histamina. No entanto, a co-localização dos receptores H1 e H2 em algumas áreas, pode ser responsável pelas interações sinérgicas entre esses subtipos de receptores (HAAS et al., 2008). Camundongos deficientes do receptor H2 exibiram seletivo déficit cognitivo junto com dano de potenciação de longa duração hipocampal (DAI et al., 2007). Os receptores H3 são autoreceptores pré-sinápticos encontrados no soma e nos terminais axônicos que regulam a síntese e inibem a liberação de histamina dos neurônios histaminérgicos de ratos (ARRANG et al., 1983). Sabe-se que os receptores H3 podem funcionar como heteroreceptores (VAN DER, TIMMERMAN, 1989) e podem regular a inibição induzida pela histamina de neurotransmissores como serotonina,

noradrenalina, dopamina e acetilcolina de regiões do cérebro que são cruciais para a manutenção do estado de alerta e de estoques de informação (BROWN et al., 2001). Tem-se relatado o papel do receptor H3 na cognição e este mecanismo pode estar associado à interação dos sistemas histaminérgico e colinérgico (PASSANI et al., 2000).

O efeito na melhora da memória pela histamina tem sido sustentado pela administração de histidina, um precursor da histamina, no déficit na memória induzido pela escopolamina em ratos na tarefa de labirinto em cruz elevado (MIYAZAKI et al., 1995).

Experimentos utilizando a tarefa de esquivas inibitórias mostram que a histamina, quando administrada na região CA1 do hipocampo após sessão de evocação sem reforço, facilita a extinção de memórias. Este efeito é reproduzido pelo aumento dos níveis de histamina endógenos através da inibição da enzima histidina N-metiltransferase, pela administração de dimaprit, um agonista do receptor H2 (BONINI et al., 2011).

Outro importante neurotransmissor envolvido com a formação de diferentes tipos de memória é a serotonina. A serotonina (5-HT) é uma monoamina biogênica sintetizada a partir do aminoácido triptofano, pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), que converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano. A seguir, a L-aminoácido aromático descarboxilase converte o 5-hidroxitriptofano no neurotransmissor serotonina (MOHAMMAD et al., 2008). Os neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central têm origem nos núcleos de rafe, e seus axônios chegam a diversas estruturas cerebrais, incluindo medula espinhal, cerebelo, córtex frontal, hipotálamo, estriado e, especialmente, o hipocampo. Os potenciais de ação que viajam ao longo destes axônios liberam a 5-HT, que atua sobre os receptores pré e pós-sinápticos, acoplados a diferentes mecanismos de transdução de sinal (CAREYA, DAMIANOPOULOS, 2015).

Este sistema exerce a sua ação através de quatorze receptores e sub-receptores que estão agrupados em sete famílias: 5-HT1 a 7. Ainda possui subtipos, como o 5-HT1(A-F) e de 5-HT2(A-C) (UPHOUSE, 1997). Os receptores 5-HT1 são acoplados a proteína G, possuem ações inibitórias e se localizam principalmente no SNC, sendo que 13 desses receptores (5-HT1) são acoplados a proteínas G possuindo ações inibitórias e se localizam principalmente no SNC (RANG; DALE, 2012; UPHOUSE, 1997) e apenas o 5HT3 é um receptor ionotrópico (GÖTHERT, 2013; MENESES, 2015; PITHADIA, JAIN, 2009; MOYER et al., 1999; CELADA et al., 2013).

Em particular, os receptores da família 5-HT1 são o que tem se destacado no meio das pesquisas, devido à alta densidade de expressão destes receptores em áreas relacionadas à memória (OGREN et al., 2008; CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013; COWEN; SHERWOOD,

2013). E dentre os subtipos da família 5-HT1 o receptor 5-HT<sub>1A</sub> é um autorreceptor e o mais abundante expresso em encéfalo de mamíferos, e está envolvido na inibição da "descarga" de neurônios e na regulação da produção de vários neurotransmissores, incluindo a dopamina, o glutamato, o GABA (*Gamma-Amino Butyric Acid*) e a acetilcolina (CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013). Acredita-se que esses receptores sejam o principal alvo de fármacos para o tratamento de desordens psiquiátricas (RANG; DALE, 2012; MATTHIESSEN et al., 1993). Apesar disso, o papel do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, nas diferentes fases da memória de extinção e reconsolidação ainda não está bem explorado (STIEDL et al., 2015).

O agonista do 5-HT<sub>1A</sub>, o 8-OH-DPAT, foi o primeiro agonista completo desenvolvido e atualmente ainda é o mais utilizado para estudar o papel funcional do 5-HT<sub>1A</sub> em tarefas comportamentais (ARVIDSSON et al., 1981; GOZLAN et al., 1983; BARNES E SHARP, 1999).

Um estudo realizado com camundongos knockout, desprovidos de receptores 5HT1, demonstrou que, em muitas condições experimentais, os animais em questão apresentavam um aumento da resposta de medo, fato este que sugere um possível envolvimento deste receptor em distúrbios motivados pelo medo (KLEMENHAGEN et al., 2006). Ainda Souza e colaboradores (2001) verificaram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> do Cortex Insular de ratos prejudica a consolidação da memória na tarefa de esQUIVA inibitória, quando infundido o agonista (8-OH-DPAT) desse receptor, imediatamente após o aprendizado (SOUZA et al., 2001).

O estudo de Schmidt e colaboradores (2017), demonstrou que os receptores 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> participam dos processos de estabilização da memória de medo no hipocampo, bem como na reconsolidação da memória de medo condicionado ao contexto 3 horas pós-reativação. Além disso, os receptores 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> do hipocampo também participam da consolidação da memória de medo condicionado ao contexto (SCHMIDT et al., 2017).

Além dos neurotransmissores apresentados acima, encontra-se o sistema noradrenérgico que também está envolvido no processo de formação da memória. A noradrenalina é uma amina biogênica que exerce a sua ação através de duas famílias de receptores divididas ainda em subtipos:  $\alpha$  ( $\alpha_1 - \alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$ ;  $\alpha_2 - \alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$ ) e  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ), ambos receptores acoplados a proteína G. Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos desempenham um importante papel na aprendizagem e na memória (CAHILL et al., 1994; COTECCHIA et al., 2012). Neurônios noradrenérgicos localizados no Locus Coeruleus enviam fibras eferentes para diferentes áreas, dentre elas o hipocampo e os núcleos central e basolateral da amígdala,



onde acentuam a transmissão glutamatérgica, essencial para a formação da memória (ROOZENDAAL et al., 2008).

O estudo de Miranda e colaboradores (2011) verificou a importância da participação do receptor  $\beta$ -adrenérgico do Córtex Insular e concluíram que são necessários os receptores  $\beta$ -adrenérgicos nesta região para a aquisição de memória aversiva. Fitzgerald e colaboradores (2015) demonstraram que a noradrenalina liberada durante um evento aversivo facilita a consolidação da memória aversiva por alterar o padrão de atividade elétrica do Córtex pré-frontal medial. A aplicação de estímulo elétrico nas patas em uma sessão de condicionamento de medo, além de aumentar a resposta comportamental de medo condicionado, promove um aumento ou diminuição da taxa de disparos de neurônios no CPFm, efeitos atenuados pela administração sistêmica do antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos propranolol. Além disso, demonstraram também que o propranolol pode ser eficaz para facilitar o aprendizado da extinção. (FITZGERALD et al., 2015).

Um estudo utilizando tarefas de medo condicionado ao contexto (MCC) e esQUIVA inibitória (EI) para avaliar a extinção em diferentes regiões do cérebro demonstrou que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos da região CA1 do hipocampo parecem não estar envolvidos na extinção no MCC em CA1. Também observou-se que ocorreu uma inibição da extinção da MCC e na EI quando verificado na amígdala basolateral (FIORENZA et al., 2012). Outro estudo evidenciou que receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos do CPFm de ratos submetidos à infusão local de prazosina, imediatamente após a reativação de uma memória aversiva condicionada ao odor, é suficiente para prejudicar a sua reconsolidação e expressão (DO MONTE et al., 2013), demonstrando a importância da modulação noradrenérgica no CPFm na manutenção das informações do evento aversivo. Os receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos também são necessários para a extinção de uma memória de medo, visto que o antagonista prazosina prejudicou a extinção do medo condicionado ao contexto (DO-MONTE; ALLENSWORTH; CAROBREZ, 2010). De maneira semelhante, já foi demonstrado que a infusão local intra-CPFm de isoproterenol, agonista  $\beta$ -adrenérgico, facilita a extinção de uma memória de medo condicionado ao contexto, ao passo que o propranolol, antagonista seletivo dos receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos, impede esse efeito, prejudicando a aquisição e a consolidação da memória de extinção. Assim, confirmando que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos têm influência na aquisição e consolidação da extinção em ratos submetidos ao paradigma medo condicionado ao contexto (DO-MONTE et al., 2010).

Dessa forma, baseado nos argumentos supracitados a presente pesquisa teve como objetivo investigar a participação dos receptores H2 histaminérgico, 5-HT1A serotoninérgicos

e  $\beta$ -adrenérgicos, da região CA1 do hipocampo, na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a participação dos receptores H2 histaminérgico, 5-HT1A serotoninérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos, do hipocampo, na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Investigar a participação dos receptores H2 histaminérgico, da região CA1 do hipocampo, na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade.

Investigar a participação do receptor 5-HT1A, da região CA1 do hipocampo, na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade.

Investigar a participação do receptor  $\beta$ -Adrenérgico, da região CA1 do hipocampo, na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de pesquisa experimental em roedores. Este projeto visa dar continuidade a linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pela professora Dra. Jociane de Carvalho Myskiw do Instituto de Geriatria e Gerontologia, no Centro de Memória, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, a qual tem como objetivo principal investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na facilitação da extinção da memória de medo pela exposição a uma novidade (DE CARVALHO MYSKIW, 2013, 2014).

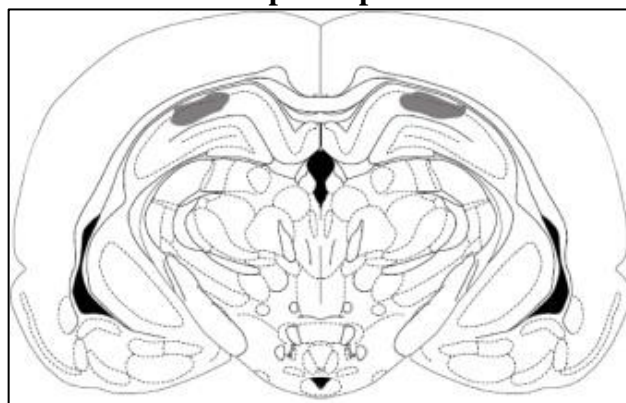
### 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos adultos CrlCembe: *Wistar*, de aproximadamente três meses de idade, pesando entre 300 e 330 gramas, provenientes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS. Os animais foram alojados no biotério do Centro de Memória, localizado no prédio 64 desta instituição, e mantidos em grupos de quatro por caixa moradia, com água e comida a vontade, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (ligada a partir das 07:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas) e a uma temperatura ambiente constante de  $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ . As caixas moradia foram trocadas e higienizadas três vezes por semana pela equipe altamente treinada e capacitada do CeMBE. Todos os procedimentos deste trabalho foram realizados somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCRS sob registro: 7478 (ANEXO B).

### 4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas guia de 0,2 mm de calibre, posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (A -4.2, L $\pm$  3.0, V -1.8 mm), segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

**Figura 1: Desenho ilustrativo do cérebro de rato, mostrando sombreada a região CA1 do hipocampo dorsal**



Fonte: Fiorenza et al., 2012

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com Ketamina (75 mg/Kg) junto com Xilazina (10 mg/Kg), ambas administradas intraperitonealmente (i.p.). Durante o período pós-operatório, 24 horas e 48 horas após a cirurgia, os animais receberam Meloxicam 0,2%, administrado via subcutânea, na dose de 2 mg/Kg. Antes de qualquer manipulação, os animais tiveram 7 dias de recuperação após o procedimento cirúrgico.

**Figura 2: Equipamento estereotáxico usado para a cirurgia.**



Fonte: Domínio público

#### 4.4 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS

Com objetivo de evitar que os animais ficassem ansiosos e/ou estressados quando manejado, os animais foram submetidos a sessões de manipulação, durante 5 dias sucessivos. Durante cada sessão, os mesmos foram levados da sala de alojamento até a sala onde os experimentos foram realizados, retirados da caixa moradia e manuseados por aproximadamente 3 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

#### 4.5 INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS

Para o tratamento farmacológico foi utilizado uma micro-seringa Hamilton<sup>®</sup> acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). As drogas e seu respectivo veículo serão infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo (1,0 µl/lado). Ao término da infusão, as agulhas serão mantidas no interior das cânulas-guia por mais 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido e garantir a perfusão da droga. As drogas e as doses (tabela 1) utilizadas neste trabalho foram escolhidas com base em estudos prévios (BENETTI, IZQUIERDO, 2013; da SILVEIRA et al, 2013; FABBRI et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2017; GARIDO ZINN et al., 2016). O tratamento farmacológico será realizado imediatamente após a exposição à novidade ou imediatamente após a sessão de treino de extinção.

**Tabela 1: Dose das drogas**

<b>Composto farmacológico</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Doses</b>
Solução Salina	Veículo	0,9%/lado
Dimaprit	Agonista do receptor H2	2,3 µg /lado
Ranitidina	Antagonista do receptor H2	17,5 µg /lado
8-OH-DPAT	Agonista do receptor 5-HT1A	1,25 µg/lado
NAN-190	Antagonista do receptor 5-HT1A	6,25 µg/lado
Isoproterenol	Agonista do receptor β-adrenérgico	10,0 µg/lado
Timolol	Antagonista do receptor β-adrenérgico	1,0 µg/lado

## 4.6 MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

O aparato utilizado (Fig. 3) para estudar o medo condicionado ao contexto consiste de uma caixa de condicionamento (35 x 35 x 35 cm) formada de alumínio, cujo assoalho é constituído por barras metálicas que são capazes de conduzir corrente elétrica, e a parte frontal em acrílico transparente (Panlab®, Espanha). Esta caixa encontra-se dentro de outra caixa maior, que possui paredes à prova de som, atenuando os sons externos.

O tempo total de imobilidade do animal (resposta condicionada) foi medido por um avaliador treinado e experiente, com o auxílio de um cronômetro digital. Todos os testes comportamentais foram gravados com o auxílio de uma câmera digital GoPro e, em caso de dúvida ou eventualidade as imagens poderão ser reavaliadas.

**Figura 3: Aparato utilizado para o protocolo de medo condicionado ao contexto**



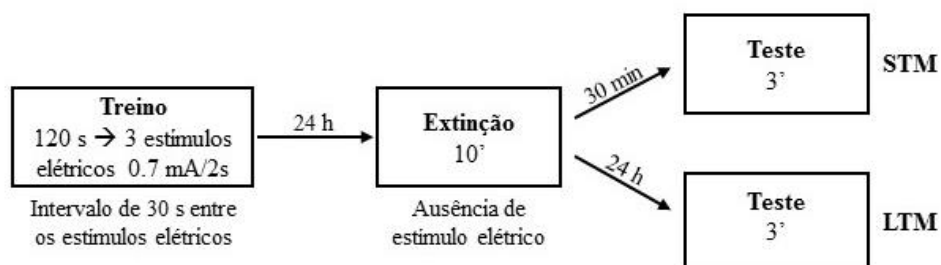
Fonte: Domínio público

### 4.6.1 PROTOCOLO DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

No dia 1 (sessão de treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 segundos foram apresentados 3 estímulos elétricos (0,7 mA, 2 s) em intervalos de 30 segundos. Os animais foram recolocados na caixa moradia 30 segundos após o último estímulo elétrico. Vinte e quatro horas depois (dia 2; sessão fraca de extinção), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento por 10 minutos, na ausência do estímulo elétrico. Para avaliação da memória de curta duração (STM; do inglês *Short-Term Memory*) ou de longa duração (LTM; do inglês *Long-Term Memory*), os animais foram submetidos a uma sessão de teste 30 minutos ou 24 horas (Fig. 3), respectivamente, na qual eram recolocados na caixa de condicionamento por 180 segundos, na ausência do estímulo

elétrico. Mediu-se o tempo total de imobilidade (*freezing*) como resposta condicionada durante todas as sessões (FIORENZA et al., 2012; de CARVALHO MYSKIW et al., 2013, 2014).

**Figura 4: Desenho representativo do protocolo experimental 1**



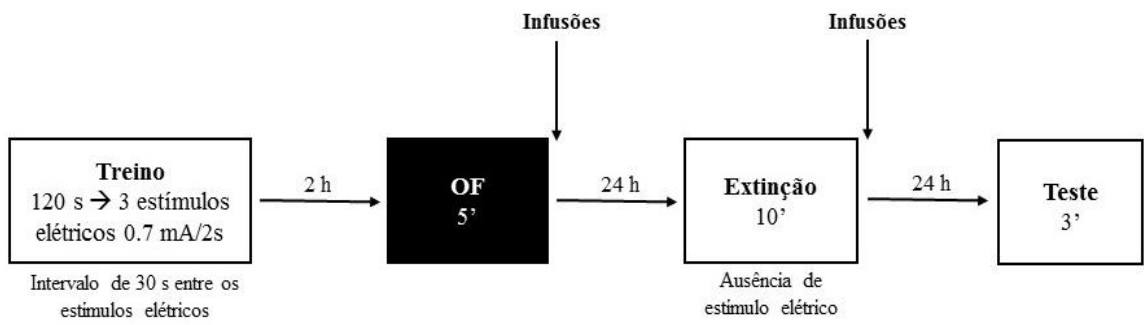
#### **4.6.2 PROTOCOLO DA FACILITAÇÃO DA EXTINÇÃO PELA EXPOSIÇÃO A UMA NOVIDADE**

Para a realização da tarefa de medo condicionado ao contexto foi utilizado o mesmo aparato descrito acima e, como novidade foi utilizado uma caixa retangular de campo aberto, confeccionada em acrílico preto (60 x 40 x 50 cm) (de CARVALHO MYSKIW et al., 2013; 2014).

No dia 1 (sessão de treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 seg. foram apresentados a 3 estímulos elétricos (0,7 mA, 2 s) em intervalos de 30 s. Os animais foram recolocados na caixa moradia 30 s após o último estímulo elétrico. Vinte e quatro horas depois (dia 2), os animais foram colocados individualmente no campo aberto e após 5 minutos de livre exploração retornaram para a sua caixa moradia. Duas horas depois (sessão de treino da extinção), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento por 10 minutos, na ausência do estímulo elétrico. No dia 3 (sessão de teste) os animais foram recolocados na caixa de condicionamento por 180 segundos, na ausência do estímulo elétrico (Fig. 5). Mediu-se o tempo total de imobilidade (*freezing*) como resposta condicionada durante todas as sessões (FIORENZA et al., 2012; de CARVALHO MYSKIW et al., 2013, 2014). Os animais receberam infusões intra-CA1 dos diferentes tratamentos farmacológicos, imediatamente após a exposição ao OF (novidade) ou após a sessão de extinção.



**Figura 5: Desenho representativo do protocolo experimental 2**



#### 4.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais estão apresentados na tabela abaixo. O número de animais para cada grupo foi escolhido com base nos estudos anteriores (de CARVALHO MYSKIW et al., 2013, 2014; MONCADA, 2016)

**Tabela 2: Grupos experimentais**

GRUPOS	Infusão após a exposição ao campo aberto	Infusão após a sessão de extinção
	CA1	CA1
<b>Veículo</b>	12	12
<b>Memória de Curta Duração</b>	12	12
<b>Memória de longa Duração</b>	12	12
<b>Exposição ao OF</b>	12	12
<b>Veículo</b>	12	12
<b>Agonista H2</b>	12	12
<b>Antagonista H2</b>	12	12
<b>Veículo</b>	12	12
<b>Agonista 5-HT1A</b>	12	12
<b>Antagonista 5-HT1A</b>	12	12
<b>Veículo</b>	12	12
<b>Agonista <math>\beta</math>-adrenérgico</b>	12	12
<b>Antagonista <math>\beta</math>-adrenérgico</b>	12	12
<b>Total por grupo</b>	156	156
<b>Total</b>	312	

#### 4.8 CONTROLE HISTOLÓGICO

Ao término dos experimentos comportamentais, os animais previamente operados, foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas guias na região cerebral alvo, visando assim garantir que apenas os dados comportamentais dos animais que efetivamente receberam a administração correta das drogas serão incluídos na análise estatística final. Para este procedimento histológico, os animais receberam uma infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas guia; quinze minutos depois foram eutanasiados (Tiopental sódico 100 mg/Kg; i.p.) e então decapitados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 dias, a partir disso procedeu-se a análise histológica, considerando somente os animais com a infusão de azul de metileno dentro de 2 mm do local alvo.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram colocados no *software Microsoft Office Excel* para reversão dos dados. A análise estatística será realizada utilizando o *software Graph-Pad Prisma 5.1*. Os dados foram analisados mediante estatística não paramétrica por ANOVA de uma via seguido do teste de *Newman-Keuls*. Os dados foram expressos como media  $\pm$  erro padrão. Para todos os dados os valores de  $p < 0,05$  foi considerados estatisticamente significativos.

#### 4.10 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados com o máximo de cuidado para evitar o desconforto e o sofrimento dos animais. Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Estado do Rio Grande do Sul e teve sua aprovação sob registro nº 7478 (ANEXO B) e, apenas após a sua aprovação foram iniciados os procedimentos experimentais, os quais estão de acordo com as normas regidas por esta instituição.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo foi submetido na revista *Neurobiology of Learning and Memory*, com Qualis na área interdisciplinar A1.

### 5.1 ARTIGO ORIGINAL

#### **Facilitation of fear extinction by novelty is regulated by $\beta$ -adrenergic and 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors in hippocampus**

Nachtigall, E. G.<sup>a</sup>; Furini, C. R. G.<sup>a,b</sup>; Behling, J. A. K.<sup>a</sup>; Farias, C. P.<sup>a,b</sup>; Izquierdo, I.<sup>a,b,\*</sup>; Myskiw, J. de C.<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 – 2<sup>nd</sup> Floor, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>National Institute of Translational Neuroscience (INNT), National Research Council of Brazil, Brazil

\*Corresponding author:

Jociane de Carvalho Myskiw and Ivan Izquierdo

Address: Av. Ipiranga, 6690 - 2nd floor, HSL - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), 90610-000, Porto Alegre - RS, Brazil.

Phone number: +(55) 51-3320-3336.

Fax number: +(55) 51-3320-3312.

E-mail addresses: [jociane\\_carvalho@hotmail.com](mailto:jociane_carvalho@hotmail.com) (J. de Carvalho Myskiw); [izquier@terra.com](mailto:izquier@terra.com) (I. Izquierdo)

## Abstract

Extinction is the learned inhibition of retrieval of a previously acquired memory and is a major component of exposure therapy, which has attracted much attention because of the use in the treatment of drug addiction, phobias and particularly fear disorders such as post-traumatic stress disorder (PTSD). Exposure to a novel environment before or after extinction training can enhance the extinction of contextual fear conditioning, however the cellular and molecular substrates are still unclear. Here, we investigated the participation of H<sub>2</sub>-histaminergic,  $\beta$ -adrenergic and 5-HT<sub>1A</sub>-serotonergic receptors of the hippocampus on the enhancement of extinction memory caused by novelty. The infusion into the CA1 region of the serotonin 5-HT<sub>1A</sub>-receptor agonist, 8-OH-DPAT and the  $\beta$ -adrenergic blocker, Timolol, after the exposure to the novelty hindered the enhancement of extinction by novelty, while Timolol also hindered when infused post-extinction. These impairments were abolished by the coinfusion of 8-OH-DPAT plus the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, NAN-190 and Timolol plus  $\beta$ -adrenergic agonist, Isoproterenol. The histamine H<sub>2</sub> receptors have no influence on either of variables. Here we elucidated some of the molecular mechanisms that are involved on the enhancement of extinction by novelty, demonstrating that the  $\beta$ -adrenoreceptors and 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors participate on this process alongside with dopaminergic D1 receptors previously described, while histamine H<sub>2</sub> receptors, so ubiquitous in learning-related functions in hippocampus are not involved.

**Keywords:** Hippocampus; extinction; fear conditioning; behavioral tagging; modulatory systems

## Highlights

- The H<sub>2</sub> histamine receptors of the CA1 region of the hippocampus are not involved on the enhancement of extinction by novelty.
- The  $\beta$ -adrenoreceptors of the CA1 are involved on the enhancement of extinction by novelty.
- The 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors of the CA1 are involved on the enhancement of extinction by novelty.

## Introduction

Extinction is the learned inhibition of retrieval of a previously acquired memory (Fiorenza, Rosa, Izquierdo, & Myskiw, 2012; Izquierdo, Furini, & Myskiw, 2016; Pavlov, 1927) and can involve neuroanatomical, cellular and molecular substrates similar to those initially recruited for the consolidation of the original memory, besides protein synthesis to stabilize the memory trace again (Szapiro, Vianna, McGaugh, Medina, & Izquierdo, 2003; Vianna, Szapiro, McGaugh, Medina, & Izquierdo, 2001). Pavlovian classical conditioning is the paradigm most used to study extinction memory, where the absence of reinforcement results in a decline or even disappearance of the conditioned response (Furini, Myskiw, & Izquierdo, 2014; Furini et al., 2017; Izquierdo et al., 2016; Pavlov, 1927).

Extinction is a major component of exposure therapy and has attracted much attention because of the use of the latter in the treatment of drug addiction, phobias and particularly fear disorders such as post-traumatic stress disorder (PTSD) (Milad & Quirk, 2012; Milad, Rosenbaum, & Simon, 2014). However, the conventional extinction protocols applied to exposure therapy are not entirely satisfactory (Singewald, Schmuckermair, Whittle, Holmes, & Ressler, 2015), so the improvement of these procedures by behavioral or pharmacological means is important. Recently, our group has shown that exposure to a novel environment at 1 or 2 h before or 1 h after extinction training enhanced contextual fear extinction (de Carvalho Myskiw, Benetti, & Izquierdo, 2013; de Carvalho Myskiw, Furini, Benetti, & Izquierdo, 2014), which opens a new approach to strengthening extinction learning and opens a potential clinical application, since it makes use of simple procedures.

The enhancement of extinction induced by novelty can be explained by the synaptic tagging and capture hypothesis (Ballarini, Moncada, Martinez, Alen, & Viola, 2009; de Carvalho Myskiw et al., 2013; Moncada & Viola, 2007), whose application to behavior became known as behavioral tagging (Almaguer-Melian et al., 2012; de Carvalho Myskiw et al., 2013; Moncada, Ballarini, Martinez, Frey, & Viola, 2011), and depends on plasticity-related proteins (PRPs) in the hippocampus. The synaptic tagging and capture process was first described by Frey and Morris in 1997 (Frey & Morris, 1997). It takes place in the hippocampus and relies on a mechanism whereby relatively “weak” hippocampal long-term potentiation (LTP) or long-term depression (LTD) lasting only a few minutes can “tag” the synapses involved with PRPs synthesized *ad hoc*, so that other PRPs produced at other sets of synapses by other LTPs or LTDs can be captured by the tagged synapses and strengthen their activity to promote longer-lasting LTPs or LTDs lasting hours or days (Frey & Morris, 1998; Frey & Morris, 1997).

As with synaptic tagging, behavioral tagging requires *de novo* protein synthesis, dopamine D1/D5 receptor activation, and the occurrence of two different events within a temporal time window (Moncada & Viola, 2007). It is known that classical modulatory neurotransmitters play an important role on both consolidation and extinction memory. Histaminergic, serotonergic and adrenergic receptors have been widely studied on hippocampal processes related to learning and memory (Fiorenza et al., 2012; Izquierdo & McGaugh, 2000; Zhang & Stackman, 2015). However, the molecular mechanisms of the tagging-and-capture process on the extinction memory have only recently begun to be studied. Evidence suggests the participation of H2-histaminergic,  $\beta$ -adrenergic and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the regulation of learning processes in the hippocampus (Bauer, 2015; Ivan Izquierdo et al., 2016; Passani et al., 2017); therefore it seems reasonable to investigate whether those systems could participate in hippocampal processes of tagging-and-capture mediated enhancement of fear extinction by novelty (de Carvalho Myskiw, Furini, Benetti, & Izquierdo, 2014; Singewald et al., 2015). Thus here we investigate the participation of these three classes of monoamine receptors of the CA1 region of the hippocampus in novelty-induced enhancement of contextual fear extinction.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Male Wistar rats (CrI:Cembe:WI; 3 months-old; 300-330 g) purchased from the Centro de Modelos Biológicos e Experimentais (CeMBE) of this university were used. The animals were housed four to a cage with water and food *ad libitum*, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and temperature maintained at 22–24°C. All experimental procedures were approved by the Animal Committee on Ethics for the Care and Use of Laboratory Animals of PUCRS, in compliance with National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

### **Surgery**

Under deep anesthesia (75 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine - both administered intraperitoneally) the animals underwent stereotaxic surgery for implantation of bilateral stainless steel 22-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus (anterior, -4.2 mm; lateral,  $\pm$ 3.0 mm; ventral, -1.8 mm from Bregma) according to the atlas of Paxinos & Watson (1986). After 7 days of surgery, the animals were handled

once daily for 5 consecutive days and after 24 hours of the last session of manipulation the animals were submitted to the behavioral paradigms.

### **Contextual fear conditioning**

The Contextual Fear Conditioning (CFC) task was performed in a conditioning box with aluminum walls (35 × 35 × 35 cm) with a floor made of parallel bronze bars spaced 0.8 mm between them and connected to a shock source for the delivery of foot shock. This training box was placed within another larger box with soundproof walls to attenuate external sounds. The box was cleaned with 70% ethanol before and after each use. To the training session the animals were allowed to explore the apparatus and after two minutes three electrical foot shocks 0.7mA/2s separated by 30s intervals were delivered. After 24 h, animals were placed in the same apparatus for 10 min to the weak extinction training session, without any electrical stimulation. The 3-min retention test occurred 24 h later. The percentage of time that the animals spent freezing (i.e., with no movement) in the apparatus was measured in all sessions.

### **Exposure to an open field (OF)**

The OF was a 50 × 50 × 40 cm black acrylic box. The animals were exposed to it for 5 min, 2 h before the extinction training session. Because the animals had never seen the apparatus before, this represented an exposure to a novel environment (de Carvalho Myskiw et al., 2013; de Carvalho Myskiw, Furini, Benetti, & Izquierdo, 2014; Singewald et al., 2015).

### **Pharmacological treatments**

The drug administration occurred immediately after the exposure to the OF or the extinction training session. To this, a Hamilton micro-syringe coupled to a polyethylene tube with an infusion needle (0.05 mm diameter) was used. Drugs and their respective vehicle were infused bilaterally into the CA1 region of the hippocampus (1.0 µl per side). At the end of the infusion, the needles were held inside the guide cannulae for another 60 seconds in order to prevent reflux of liquid and ensure the perfusion of the drug. The drugs used were H<sub>2</sub>-receptor antagonist, Ranitidine (Rani; 17.5 µg per side), H<sub>2</sub>-receptor agonist Dimaprit (Dima; 2.3 µg per side), 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor antagonist, NAN-190 (Nan; 1.25 µg per side), 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor agonist, 8-OH-DPAT (8-OH; 6.25 µg per side), β-adrenergic receptor antagonist, Timolol (Tim; 1.0 µg per side) and β-adrenergic receptor agonist, Isoproterenol (Iso; 200 µg per side). The doses were chosen among those found to be effective in previous



papers from our group or others (Benetti et al., 2015; Cavalcante et al., 2017; Garrido Zinn et al., 2016).

### **Correct Cannula Placements**

Correct cannula placement was verified by infusing a 4% (wt/vol) methylene blue solution over 30 s into the CA1 region of the dorsal hippocampus (1  $\mu$ l per side) at the coordinates mentioned above at 2 d after the last behavioral procedure. The spread of the dye was taken as an estimate of that of the drug infusions in the same animals. Placements were considered correct when the spread was 1 mm<sup>3</sup> or less from the intended infusion sites (de Carvalho Myskiw et al., 2013; Fiorenza et al., 2012).

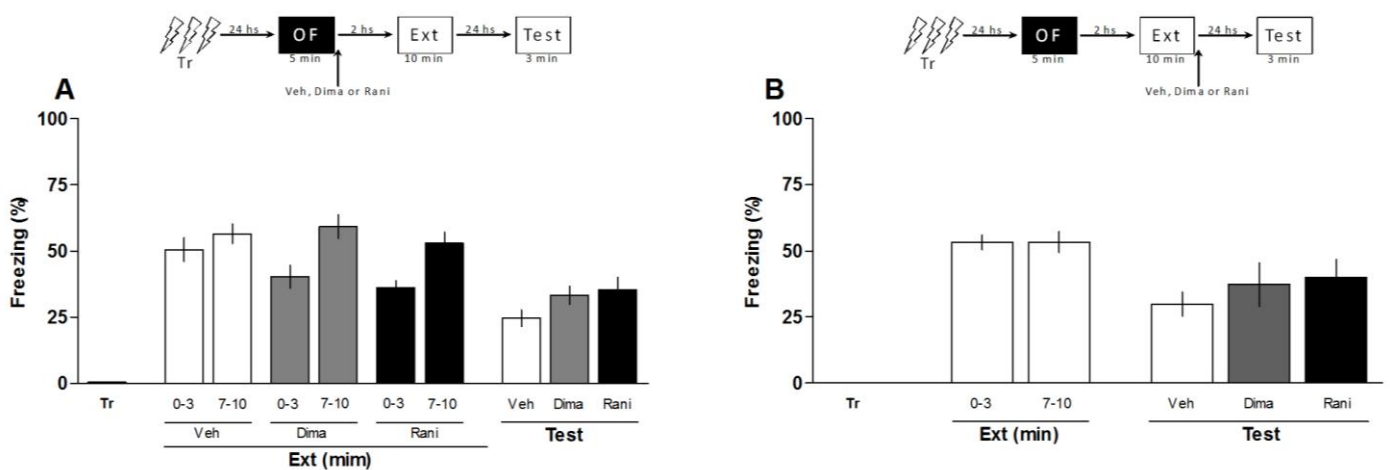
### **Statistics**

GraphPad Prism software was used for statistical analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test, expressed as mean  $\pm$  standard error. For all data the values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

### **Results**

#### **Effect of H2 histamine receptor agonist and antagonist given into the CA1 region of the hippocampus on the enhancement of fear extinction by exposure to novelty.**

Animals with guide cannulae implanted into the CA1 region of the hippocampus were trained in CFC task using three 2-s, 0.7-mA scrambled foot shocks given every 30 s. Twenty-four hours later, the animals were exposed to the OF for 5 min and two hours later underwent a 10-min weak extinction training session (Ext). After another 24 h, the animals performed a 3-min retention test (Test). The intra-CA1 infusions occurred immediately after exposure to the OF or after the Ext session. As can be seen in Figure 1, animals that received intra-CA1 infusions of Vehicle (Veh), H2 histamine receptor agonist Dimaprit (Dima, 2.3  $\mu$ g per side) or H2 histamine receptor antagonist Ranitidine (Rani, 17.5  $\mu$ g per side) immediately after the exposure to the OF (Fig. 1A) or after the Ext session (Fig. 1B) exhibited similar levels of freezing during the extinction retention test. One-way ANOVA performed at the retention test did not showed a significant difference between groups; Fig. 1A:  $F_{(2,31)} = 2.449$ ;  $P = 0.1029$ ; Fig. 1B:  $F_{(2,19)} = 0.5554$ ;  $P=0.5829$ . These results suggest that H2 histamine receptors, in the CA1 region of the hippocampus, are not involved in the enhancement effect of OF on extinction learning and in the consolidation of extinction.

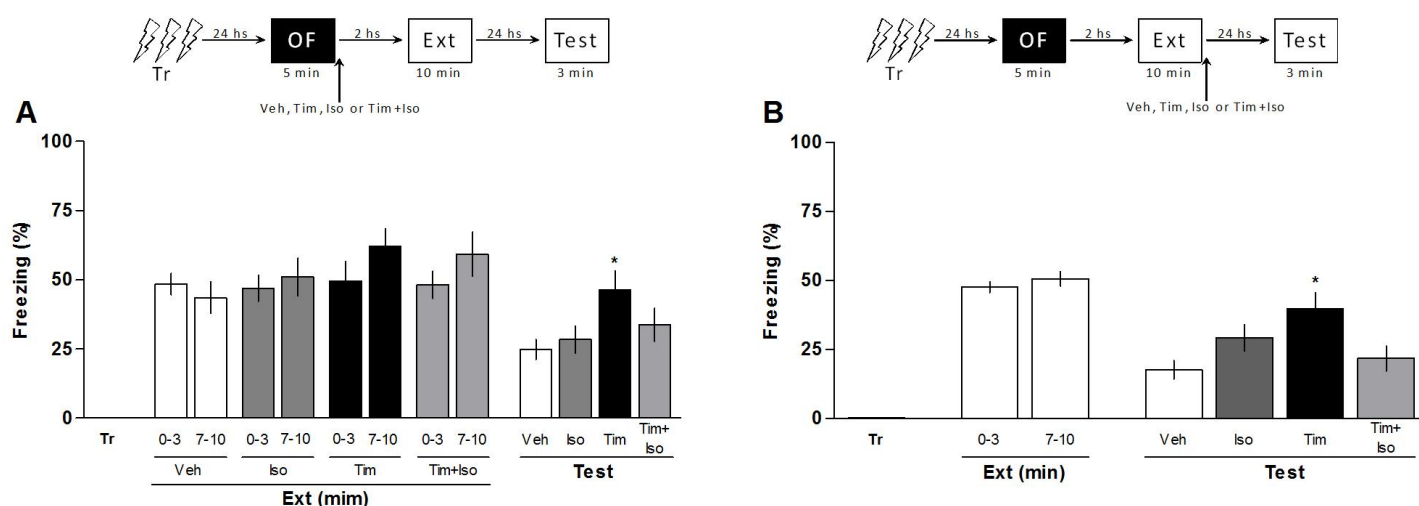


**Fig. 1. Effect of H2 histamine receptor agonist and antagonist given into the hippocampus in the enhancement of fear extinction by exposure to novelty.** Animals with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained in a CFC task (Tr; three 2-s/0.7-mA scrambled foot shocks separated by 30-s intervals). After 24 h, they received intra-CA1 infusions of vehicle (Veh), Dimaprit (Dima; 2.3  $\mu\text{g}/\text{side}$ ) or Ranitidine (Rani; 17.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ) immediately after a 5-min exposure to a novel OF (A) or immediately after a weak extinction training session (Ext) (B). After another 24 h, the animals were subjected to a 3-min retention test (Test). When given into the hippocampus Rani and Dima (A and B) had no effect on the Ext facilitation caused by the OF and on the consolidation of the extinction. The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the Tr, in the first 3 min and last 3 min of the Ext, and in the Test. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of the percentage of time spent freezing.  $n = 10-12$  (A) and  $7-8$  (B) animals per group. (*Upper*) Schematic representation of the behavioral protocol used.

**Effect of  $\beta$ -adrenoreceptor agonist and antagonist given into the CA1 region of the hippocampus in the enhancement of fear extinction by exposure to novelty.**

Animals received intra-CA1 infusions of Veh,  $\beta$ -adrenoreceptors agonist Isoproterenol (Iso, 10  $\mu\text{g}$  per side),  $\beta$ -adrenergic receptors antagonist Timolol (Tim, 1.0  $\mu\text{g}$  per side) or coinfusion of Timolol plus Isoproterenol (Tim+Iso) immediately after the exposure to the OF (Fig. 2A) or after the Ext session (Fig. 2B). As shown in Fig 2, animals that received intra-CA infusions of Veh or Iso immediately after the exposure to the OF (Fig. 2A) or after the Ext session (Fig. 2B) exhibited similar levels of freezing during the retention test. However, animals that received Tim into the CA1 region immediately after the exposure to the OF (Fig. 2A) or immediately

after the Ext session (Fig. 2B) expressed higher levels of freezing behavior than the Veh group during the retention test. One-way ANOVA performed at the retention test showed a significant difference between groups (Fig. 2A:  $F_{(3,41)} = 3.192$ ;  $P < 0.05$ ; Fig. 2B:  $F_{(3,36)} = 4.291$ ;  $P < 0.05$ ), and Newman-Keuls test revealed significant difference between groups Veh *vs.* Tim ( $P < 0.05$ ). This effect was abolished by the coinfusion of Tim plus Iso into the CA1 immediately after the exposure to the OF (Fig. 2A) or after the Ext session (Fig. 2B). These results suggest that  $\beta$ -adrenoreceptors in the CA1 region are involved in the enhancement effect of OF on extinction learning and in the consolidation of extinction.



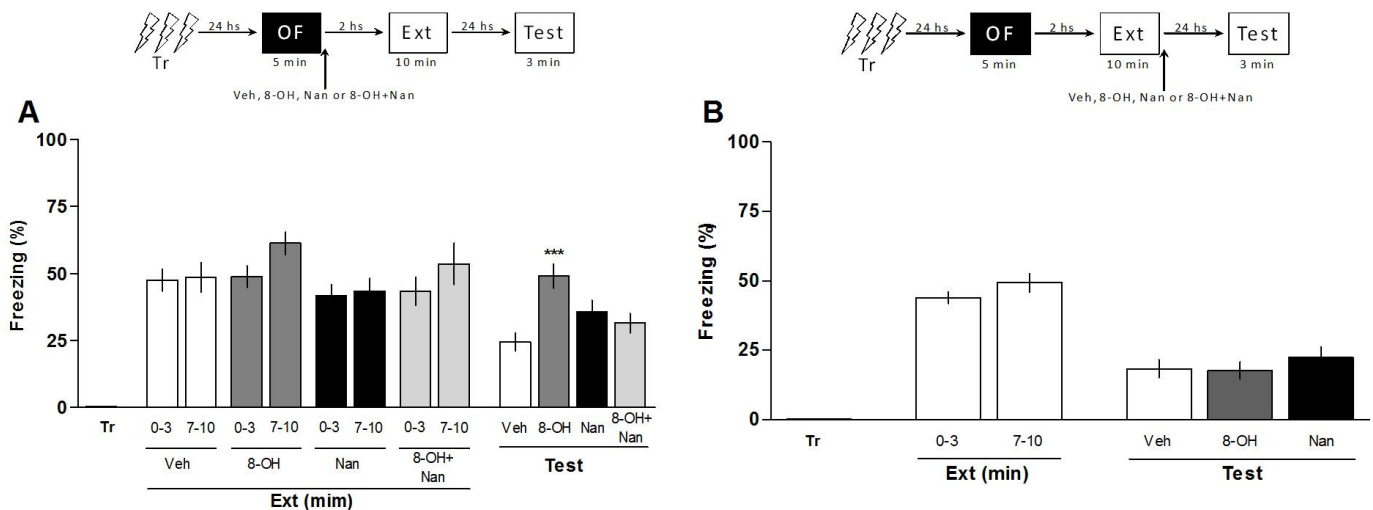
**Fig. 2. Effect of  $\beta$ -adrenoreceptor agonist and antagonist given into the hippocampus in the enhancement of fear extinction by exposure to novelty.**

Animals with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained in a CFC task (Tr; three 2-s/0.7-mA scrambled foot shocks separated by 30-s intervals). After 24 h, they received intra-CA1 infusions of vehicle (Veh), Isoproterenol (Iso; 200  $\mu\text{g}/\text{side}$ ) or Timolol (Tim; 1.0  $\mu\text{g}/\text{side}$ ) or coinfusion of Tim plus Iso (Tim+Iso) immediately after a 5-min exposure to a novel OF (A) or immediately after a weak extinction training session (Ext) (B). When given immediately after novel OF into the hippocampus, Tim (A) blocked the Ext enhancement caused by the OF, but only Tim impaired the effect of OF on the consolidation of extinction (B). In contrast, the effect caused by Tim was blocked when coinfused with Iso on both variables (A and B). The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the Tr, in the first 3 min and last 3 min of the Ext, and in the Test. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of the percentage of time spent freezing. \* $P < 0.05$  and *vs.* control groups in the

retention test, Newman–Keuls test after one-way ANOVA;  $n = 9-12$  (A) and 10 (B) animals per group. (*Upper*) Schematic representation of the behavioral protocol used.

**Effect of 5-HT<sub>1A</sub>-serotonergic receptor agonist and antagonist given into the CA1 region of the hippocampus in the enhancement of fear extinction by exposure to novelty.**

Animals received intra-CA1 infusions of Veh or of an agonist and antagonist of the 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor, 8-OH-DPAT (8-OH, 6.25 µg per side), NAN-190 (Nan, 1.25 µg per side), respectively, immediately after the exposure to the OF (Fig. 3A) or after the Ext session (Fig. 3B). As shown in Fig 3, animals that received intra-CA infusions of 8-OH immediately after the exposure to the OF (Fig. 3A) expressed higher levels of freezing behavior than the Veh group during the retention test. One-way ANOVA performed at the retention test showed a significant difference between groups ( $F_{(3,40)} = 7.046$ ;  $P < 0.001$ ), and Newman-Keuls test revealed significant difference between groups Veh vs. 8-OH ( $P < 0.0001$ ). However, when animals received coinfusion of 8-OH plus NAN-190 (8-OH + Nan) intra-CA1 immediately after the exposure to the OF (Fig. 3A) expressed levels of freezing behavior similar to those of the Veh groups. Additionally, animals that received intra-CA1 infusions of NAN-190 immediately after the exposure to the OF (Fig. 3A) or after the Ext session (Fig. 3B) expressed similar levels of freezing behavior in the retention Test as the Veh group and, the same effect was seen in the group of animals that received 8-OH immediately after the Ext session (Fig. 3B). One-way ANOVA performed at the retention test did not showed a significant difference between groups ( $F_{(2,30)} = 0.6144$ ;  $P=0.5476$ ). These results suggest that 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor in the CA1 region are involved in the enhancement effect of OF on extinction learning but not in the consolidation of extinction.



**Fig. 3. Effect of 5-HT<sub>1A</sub>-serotonergic receptor agonist and antagonist given into the hippocampus in the enhancement of fear extinction by exposure to novelty.**

Rats with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained in a CFC task (Tr; three 2-s/0.7-mA scrambled foot shocks separated by 30-s intervals). After 24 h, they received intra-CA1 infusions of vehicle (Veh), 8-OH-DPAT (8-OH; 6.25 µg/side) or NAN-190 (Nan; 1.25 µg/side), immediately after a 5-min exposure to a novel OF (A) or immediately after a weak extinction training session (Ext) (B). After another 24 h, the animals were subjected to a 3-min retention test (Test). When given immediately after novel OF into the hippocampus, 8-OH (A) blocked the Ext enhancement caused by the OF. In contrast, the 8-OH effect was blocked when coinfused with Nan (A and B). The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the Tr, in the first 3 min and last 3 min of the Ext, and in the Test. Data are presented as mean ± SEM of the percentage of time spent freezing. \*\*\*P < 0.0001 vs. control group in the retention test, Newman-Keuls test after one-way ANOVA; n = 10-12 animals per group. (*Upper*) Schematic representation of the behavioral protocol used.

## Discussion

The present findings enlighten the understanding of the molecular mechanisms that regulate the behavioral tagging process of extinction memory, demonstrating that the enhancement of extinction by novelty is hindered by the activation in the hippocampus of serotonin-5-HT<sub>1A</sub> receptors and by the blockade of β-adrenergic receptors and unaffected by drugs acting on H2

histamine receptors.

Synaptic plasticity is a physiological phenomenon whereby specific patterns of neural activity lead to changes in synaptic efficacy and neural excitability. This is required for initial encoding and memory trace establishment (Martin, Grimwood, & Morris, 2000). Events that occur before or after stimuli that induce memory formation may influence synaptic plasticity and memory storage (Govindarajan, Kelleher, & Tonegawa, 2006; Diego Moncada, Ballarini, & Viola, 2015). The theory of synaptic tagging and capture (STC) predicts that a weak stimulus may activate synapses and define a “tag” that subsequently captures the PRPS synthesized from a strong stimulus in a given period of time (Frey & Morris, 1998; Frey & Morris, 1997). Studies have shown that behavioral tasks that initially depend on weak stimulus unable to induce learning, with the exposure to a novelty, such as, an open field, can induce synthesis of PRPS that will be used by the tag and induce a strong learning (Ballarini et al., 2009; de Carvalho Myskiw et al., 2013, 2014; Menezes et al., 2015; Moncada & Viola, 2007). As corroborated here, the exposure to novelty facilitates the formation of extinction memory of CFC and this can be explained by the STC hypothesis. This result indicates that the weak extinction session was not able to form a LTM, however, when animals are exposed to the OF for 5 min, 2 hours before the extinction session, they are able to express a LTM. This probably occurs because exposure to OF induced PRP synthesis that was later captured and, endorses the results of de Carvalho Myskiw and collaborators (de Carvalho Myskiw et al., 2013; 2014) who demonstrated for the first time that the synaptic tagging process occurs on the extinction memory.

Some of the signaling pathways that were already demonstrated to be involved on the enhancement of extinction by novelty are the D1 dopamine receptors, NMDA receptors, Src kinases, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and L-voltage dependent calcium channels (de Carvalho Myskiw et al., 2014; Menezes et al., 2015; Wang et al., 2016).

Here we demonstrated that the H2-histaminergic receptors are not necessary to the extinction memory induced by novelty. The histaminergic system has been connected to the regulation of different aversive and non-aversive memories (Benetti et al., 2015; Benetti & Izquierdo, 2013; Bonini et al., 2011; Cavalcante et al., 2017; da Silveira, Furini, Benetti, Monteiro, & Izquierdo, 2013; Fabbri et al., 2016; Fiorenza et al., 2012; Garrido Zinn et al., 2016). Indeed, post-training intra-CA1 (da Silva, Bonini, Bevilaqua, Izquierdo, & Cammarota, 2006) infusion of histamine and H2 receptor agonist, dimaprit, was found to enhance the memory consolidation of step-down inhibitory avoidance (IA) and the effect of intra-hippocampal infusion of histamine, was reversed by an H2 antagonist (da Silva et al., 2006).

When given into the CA1 following the first extinction session, histamine and H2 receptor agonist, dimaprit, facilitated the consolidation of extinction (Bonini et al., 2011), and the blockade of H2 receptors of CA1 region impaired the extinction of CFC and IA memory (Fiorenza et al., 2012). Also, the histaminergic system is necessary for retrieval of IA memory (Fabbri et al., 2016), rats depleted of histamine through injections in the lateral ventricles of  $\alpha$ -fluoromethylhistidine, a suicide inhibitor of histidine decarboxylase, displayed impaired IA memory, and this impairment was restored by the intra-CA1 infusion of histamine 10 min before the retention test. Intra-CA1 infusions of selective H1 or H2 receptor agonists showed that histamine exerted its retrieval-restoring effect by activating hippocampal H1 receptors, but not by the H2 receptors (Fabbri et al., 2016). So, despite the extensive involvement of histaminergic system on memory processes, the regulation of extinction memory induced by novelty seems not to be regulated by the H2 receptors, as occurs to the retrieval of IA memory. More studies, related to other histamine receptors may help to elucidate in more details the involvement of this modulatory system on behavioral tagging of extinction learning.

In general, serotonin (5-HT) receptors have different effects on behavior depending on the receptor subtypes present and the behavioral tests used. In the present study the enhancement of extinction by novelty, was hindered by the agonist of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, 8-OH-DPAT. Several studies have shown that 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists impair CFC when given systemically (Li, Lindenberger, & Sikström, 2001; Nakamura & Kurasawa, 2001), the impairment is also seen with the intra-hippocampal infusion of 8-OH-DPAT pre-training (Stiedl, Misane, Spiess, & Ögren, 2000) or pre-testing on the CFC as well as fear-potentiated startle (Almada, Borelli, Albrechet-Souza, & Brandão, 2009). This effect is observed in other forebrain structures, amygdala, insular cortex, prefrontal cortex and different memories, such as, social recognition and IA memory (Bauer, 2015; Borelli, Gárgaro, Santos, & Brandão, 2005; Cavalcante et al., 2017; Garrido Zinn et al., 2016; Gomes da Silva et al., 2012; Li et al., 2001; Mello e Souza et al., 2001). These inhibitory effects may be explained by the fact that activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors inhibits neuronal activity, since they are mainly located in inhibitory interneurons (Corradetti, Ballerini, Pugliese, & Pepeu, 1992; Tada, Kasamo, Suzuki, Matsuzaki, & Kojima, 2004).

Moreover, we demonstrated that the  $\beta$ -adrenoreceptors of the CA1 region of the dorsal hippocampus are necessary to the learning of extinction memory induced by novelty. Noradrenaline and the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors, respectively, were reported to be crucial to the enhancement of LTP and memory by emotional arousal (Cahill & McGaugh, 1998; Griffin & Taylor, 1995; Seidenbecher, Reymann, & Balschun, 1997), in addition; the  $\beta$ -

adrenergic-receptor antagonist, propranolol, blocked the novelty-induced LTP reinforcement and application of the  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol 30 min before LTP induction was sufficient to transform early- into late-LTP (Straube, Korz, Balschun, & Uta Frey, 2003). Moncada et al. (Moncada et al., 2011) demonstrated that the promoting effect of novelty on consolidation of IA-LTM is prevented by intra-hippocampal administration of propranolol around the time of the OF exposure and that systemic administration of a  $\beta$ -adrenergic receptor agonist, dobutamine, mimics the action of novelty. Also, the infusion of propranolol into the CA1 before the OF, in a protocol with an effective extinction session, inhibited the enhancement of extinction by novelty (Liu et al., 2015). Noradrenergic neurons of the *Locus Coeruleus* (LC) have been shown to fire in bursts upon exposure of a rat or a mouse to a novel OF as the used in behavioral tagging experiments (Roullet & Sara, 1998; Takeuchi et al., 2016; Vankov, Hervé-Minvielle, & Sara, 1995) and, LC stimulation promotes IA-LTM through a mechanism dependent on noradrenaline release and synthesis of PRPs in the hippocampus (Moncada, 2017). So, as occurs at LTP and memory consolidation, the results obtained here, demonstrate that  $\beta$ -adrenergic receptors are also necessary to the enhancement of extinction memory induced by novelty.

Here we elucidated some of the molecular mechanisms that are involved on the enhancement of extinction by novelty, demonstrating that the  $\beta$ -adrenoreceptors and 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors participate on this process alongside with dopaminergic D1 receptors previously described (Menezes et al., 2015), while histamine H2 receptors, so ubiquitous in learning-related functions in hippocampus (Passani et al., 2017) are not involved. These data provide important information to the knowledge of modulation of extinction, which is important in the treatment of fear disorders and memories, such as those of post-traumatic stress disorder, since the treatments of choice for such conditions are based on extinction procedures.

To summarize, these data, together with others (Menezes et al., 2015) indicate that the enhancement of fear extinction by novelty, previously described (de Carvalho Myskiw et al., 2013; Moncada & Viola, 2007; Myskiw, Furini, & Izquierdo, 2017) and indeed recently reproduced in humans (Dunsmoor, Murty, Davachi, & Phelps, 2015), and potentially useful in its application to exposure therapy, involves the modulatory influence of at least three major monoamine sets of synapses in the hippocampus: 5-HT<sub>1A</sub>-serotonergic and  $\beta$ -adrenergic, as shown here, and D1-dopaminergic, as shown elsewhere (Menezes et al., 2015).



## Acknowledgments

Work supported by the National Research Council of Brazil (CNPq) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES; Brasil) – Finance Code 001 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

- Almada, R. C., Borelli, K. G., Albrechet-Souza, L., & Brandão, M. L. (2009). Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus–dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. *Behavioural Brain Research*, *203*(2), 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.017>
- Almaguer-Melian, W., Bergado-Rosado, J., Pavon-Fuentes, N., Alberti-Amador, E., Merceron-Martinez, D., & Frey, J. U. (2012). Novelty exposure overcomes foot shock-induced spatial-memory impairment by processes of synaptic-tagging in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(3), 953–958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114198109>
- Ballarini, F., Moncada, D., Martinez, M. C., Alen, N., & Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(34), 14599–14604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907078106>
- Bauer, E. P. (2015). Serotonin in fear conditioning processes. *Behavioural Brain Research*, *277*, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.028>
- Benetti, F., Furini, C. R. G., de Carvalho Myskiw, J., Provensi, G., Passani, M. B., Baldi, E., ... Blandina, P. (2015). Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(19), E2536–E2542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506109112>
- Benetti, F., & Izquierdo, I. (2013). Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(07), 1539–1545. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001514>
- Bonini, J. S., Da Silva, W. C., Da Silveira, C. K. B., Köhler, C. A., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2011). Histamine facilitates consolidation of fear extinction. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *14*(09), 1209–1217. <https://doi.org/10.1017/S1461145710001501>

- Borelli, K. G., Gárgaro, A. C., Santos, J. M. dos, & Brandão, M. L. (2005). Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. *Neuroscience Letters*, *387*(2), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.07.031>
- Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosciences*, *21*(7), 294–299. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01214-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01214-9)
- Cavalcante, L. E. S., Zinn, C. G., Schmidt, S. D., Saenger, B. F., Ferreira, F. F., Furini, C. R. G., ... Izquierdo, I. (2017). Modulation of the storage of social recognition memory by neurotransmitter systems in the insular cortex. *Behavioural Brain Research*, *334*, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.044>
- Corradetti, R., Ballerini, L., Pugliese, A. M., & Pepeu, G. (1992). Serotonin blocks the long-term potentiation induced by primed burst stimulation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience*, *46*(3), 511–518. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90140-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90140-W)
- Da Silva, W. C., Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. *Neurobiology of Learning and Memory*, *86*(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.01.001>
- Da Silveira, C. K. B., Furini, C. R. G., Benetti, F., Monteiro, S. da C., & Izquierdo, I. (2013). The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *103*, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.04.001>
- De Carvalho Myskiw, J., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2013). Behavioral tagging of extinction learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(3), 1071–1076. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220875110>
- De Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2014). Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(12), 4572–4577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400423111>

- Dunsmoor, J. E., Murty, V. P., Davachi, L., & Phelps, E. A. (2015). Emotional learning selectively and retroactively strengthens memories for related events. *Nature*, *520*(7547), 345–348. <https://doi.org/10.1038/nature14106>
- Fabbri, R., Furini, C. R. G., Passani, M. B., Provensi, G., Baldi, E., Bucherelli, C., ... Blandina, P. (2016). Memory retrieval of inhibitory avoidance requires histamine H<sub>1</sub> receptor activation in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(19), E2714–E2720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604841113>
- Fiorenza, N. G., Rosa, J., Izquierdo, I., & Myskiw, J. C. (2012). Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behavioural Brain Research*, *232*(1), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.015>
- Frey, U., & Morris, R. G. . (1998). Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology*, *37*(4-5), 545–552. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00040-9)
- Frey, U., & Morris, R. G. M. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, *385*(6616), 533–536. <https://doi.org/10.1038/385533a0>
- Furini, C., Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2014). The learning of fear extinction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *47*, 670–683. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.016>
- Furini, C. R. G., Behling, J. A. K., Zinn, C. G., Zanini, M. L., Assis Brasil, E., Pereira, L. D., ... de Carvalho Myskiw, J. (2017). Extinction memory is facilitated by methylphenidate and regulated by dopamine and noradrenaline receptors. *Behavioural Brain Research*, *326*, 303–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.027>
- Garrido Zinn, C., Clairis, N., Silva Cavalcante, L. E., Furini, C. R. G., de Carvalho Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2016). Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(33), E4914–E4919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609883113>
- Gomes da Silva, S., Unsain, N., Mascó, D. H., Toscano-Silva, M., de Amorim, H. A., Silva Araújo, B. H., ... Arida, R. M. (2012). Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. *Hippocampus*, *22*(2), 347–358. <https://doi.org/10.1002/hipo.20903>

- Govindarajan, A., Kelleher, R. J., & Tonegawa, S. (2006). A clustered plasticity model of long-term memory engrams. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(7), 575–583. <https://doi.org/10.1038/nrn1937>
- Griffin, M. G., & Taylor, G. T. (1995). Norepinephrine modulation of social memory: Evidence for a time-dependent functional recovery of behavior. *Behavioral Neuroscience*, 109(3), 466–473. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.109.3.466>
- Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
- Izquierdo, I., & McGaugh, J. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation, 11.
- Li, S.-C., Lindenberger, U., & Sikström, S. (2001). Aging cognition: from neuromodulation to representation. *Trends in Cognitive Sciences*, 5(11), 479–486. [https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(00\)01769-1](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(00)01769-1)
- Liu, J.-F., Yang, C., Deng, J.-H., Yan, W., Wang, H.-M., Luo, Y.-X., ... Lu, L. (2015). Role of Hippocampal -Adrenergic and Glucocorticoid Receptors in the Novelty-Induced Enhancement of Fear Extinction. *Journal of Neuroscience*, 35(21), 8308–8321. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0005-15.2015>
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1), 649–711. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>
- Mello e Souza, T., Rodrigues, C., Souza, M., Vinadé, E., Coitinho, A., Choi, H., & Izquierdo, I. (2001). Involvement of the serotonergic type 1A (5-HT 1A ) receptor in the agranular insular cortex in the consolidation of memory for inhibitory avoidance in rats.
- Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., de Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., ... Mello-Carpes, P. B. (2015). Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13), E1652–E1658. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502295112>

- Milad, M. R., & Quirk, G. J. (2012). Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress. *Annual Review of Psychology*, *63*(1), 129–151. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.121208.131631>
- Milad, M. R., Rosenbaum, B. L., & Simon, N. M. (2014). Neuroscience of fear extinction: Implications for assessment and treatment of fear-based and anxiety related disorders. *Behaviour Research and Therapy*, *62*, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2014.08.006>
- Moncada, D. (2017). Evidence of VTA and LC control of protein synthesis required for the behavioral tagging process. *Neurobiology of Learning and Memory*, *138*, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.003>
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(31), 12931–12936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104495108>
- Moncada, D., Ballarini, F., & Viola, H. (2015). Behavioral Tagging: A Translation of the Synaptic Tagging and Capture Hypothesis. *Neural Plasticity*, *2015*, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2015/650780>
- Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of Long-Term Memory by Exposure to Novelty Requires Protein Synthesis: Evidence for a Behavioral Tagging. *Journal of Neuroscience*, *27*(28), 7476–7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007>
- Myskiw, J. C., Furini, C. R. G., & Izquierdo, I. (2017). Behaviorally Induced Synaptic Tagging. In *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (pp. 611–619). Elsevier. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012809324521122X>
- Nakamura, K., & Kurasawa, M. (2001). Anxiolytic effects of aniracetam in three different mouse models of anxiety and the underlying mechanism. *European Journal of Pharmacology*, *420*(1), 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01005-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01005-6)
- Passani, M. B., Benetti, F., Blandina, P., Furini, C. R. G., de Carvalho Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2017). Histamine regulates memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *145*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.08.007>

- Pavlov, Ivan. (1927). Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Roulet, P., & Sara, S. (1998). Consolidation of Memory After its Reactivation: Involvement of  $\beta$  Noradrenergic Receptors in the Late Phase. *Neural Plasticity*, 6(3), 63–68. <https://doi.org/10.1155/NP.1998.63>
- Seidenbecher, T., Reymann, K. G., & Balschun, D. (1997). A post-tetanic time window for the reinforcement of long-term potentiation by appetitive and aversive stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1494–1499. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1494>
- Singewald, N., Schmuckermair, C., Whittle, N., Holmes, A., & Ressler, K. J. (2015). Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 149, 150–190. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.004>
- Stiedl, O., Misane, I., Spiess, J., & Ögren, S. O. (2000). Involvement of the 5-HT<sub>1A</sub> Receptors in Classical Fear Conditioning in C57BL/6J Mice. *The Journal of Neuroscience*, 20(22), 8515–8527. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08515.2000>
- Straube, T., Korz, V., Balschun, D., & Uta Frey, J. (2003). Requirement of  $\beta$ -adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. *The Journal of Physiology*, 552(3), 953–960. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049452>
- Szapiro, G., Vianna, M. R. M., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*, 13(1), 53–58. <https://doi.org/10.1002/hipo.10043>
- Tada, K., Kasamo, K., Suzuki, T., Matsuzaki, Y., & Kojima, T. (2004). Endogenous 5-HT inhibits firing activity of hippocampal CA1 pyramidal neurons during conditioned fear stress-induced freezing behavior through stimulating 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Hippocampus*, 14(2), 143–147. <https://doi.org/10.1002/hipo.10178>

- Takeuchi, T., Duszkiewicz, A. J., Sonneborn, A., Spooner, P. A., Yamasaki, M., Watanabe, M., ... Morris, R. G. M. (2016). Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature*, *537*(7620), 357–362. <https://doi.org/10.1038/nature19325>
- Vankov, A., Hervé-Minvielle, A., & Sara, S. J. (1995). Response to Novelty and its Rapid Habituation in Locus Coeruleus Neurons of the Freely Exploring Rat. *European Journal of Neuroscience*, *7*(6), 1180–1187. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01108.x>
- Vianna, M. R. M., Szapiro, G., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(21), 12251–12254. <https://doi.org/10.1073/pnas.211433298>
- Wang, B., Liang, R.-C., Liu, Z.-S., Luo, B., Ding, Y., Chen, Z.-X., ... Wang, X.-G. (2016). Hippocampal Src kinase is required for novelty-induced enhancement of contextual fear extinction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *472*(4), 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.125>
- Zhang, G., & Stackman, R. W. (2015). The role of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in memory and cognition. *Frontiers in Pharmacology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00225>

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta dissertação de mestrado indicam que:

- Os animais submetidos a uma sessão fraca de extinção são capazes de formar memória de curta duração, mas não de longa duração. Entretanto, quando expostos a uma novidade a memória de extinção é consolidada.
- Os receptores H<sub>2</sub> histaminérgicos, da região CA1 do hipocampo, não são necessários na facilitação da exposição a uma novidade na formação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto.
- Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos, da região CA1 do hipocampo, participam na facilitação da exposição a uma novidade na formação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto.

Portanto, o presente trabalho constitui um importante complemento para o conhecimento da modulação extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade. Além disso, os resultados aqui apresentados contribuem para elucidar melhor os mecanismos moleculares envolvidos no processo de *Behavioral tagging*.



## REFERENCIAS

- AGREN, T. Human reconsolidation: A reactivation and update. **Brain Research Bulletin**, v. 105, p. 70–82, 2014.
- ALBERINI, C. M. Genes to remember. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. Pt 21, p. 2887–2891, 1999.
- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. R746–R750, 2013.
- ANDREWS, H., et al. Disruption of Large-Scale Brain Systems in Advanced Aging. **Neuron**. v.56, n.5, p.924-935, 2007.
- ARRANG, J-M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J-C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. **Nature**, v. 302, n. 5911, p. 832-837, 1983.
- ARTINIAN, J. et al. Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 3009–3019, 2008
- ARVIDSSON, L. E. et al. 8-Hydroxy-2-(dipropylamino) tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 921-923, 1981.
- BALDI, E.; BUCHERELLI, C. Entorhinal cortex contribution to contextual fear conditioning extinction and reconsolidation in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 110, p. 64–71, 2014.
- BALLARINI, F. et al. Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 34, p. 14599-14604, 2009.
- BARCO, A.; de ARMENTIA, M. L.; ALARCON, J. M. Synapse-specific stabilization of plasticity processes: the synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 4, p. 831-851, 2008.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083-1152, 1999.
- BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.16, n. 7, p. 1539-1545, 2013
- BENETTI, F.; FURINI, C.R.; DE CARVALHO MYSKIW, J.; PROVENSÍ, G.; PASSANI, M. B.; BALDI, E.; BUCJERELLI, C.; MUNATI, L.; IZQUIERDO, I.; BLANDINHA, P. Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of

- hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n.19, p. E2536-E2542, 2015
- BISHOP, N. P.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanism of aging and cognitive decline. **Nature**, v.464, n.7288, p. 529-35, 2010.
- BLANDINA, Patrizio., EFOUDEBE, Marcel., CENNI, Gabriele, MANNAIONI, Pierfrancesco., PASSANI, Maria B. Acetylcholine, histamine, and cognition: two sides of the same coin. **Learning & Memory**. v. 11, n.1, p. 1-8, 2004
- BLANDINHA, P. Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n.19, p. E2536-E2542, 2015
- BONINI, J.; DA SILVA, W C.; DA SILVEIRA, C K B.; KOHLER, C A.; IZQUIERDO, I; CAMMAROTA, M. Histamine facilitates consolidation of fear extinction. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.14, n.7, p. 1-9, 2011.
- BROWN, R.E.; STEVENS, D.R.; HAAS, H.L. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**. v.63, p. 637-672, 2001.
- BURLA, C.; et al. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Ciências. Saúde Coletiva** . v.18, n.10, p.2949-2956, 2013
- CAHILL, L; MCGAUGH, J L. Modulation of memory storage. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 6, n. 2, p. 237-242, 1996
- CAHILL, L. et al. B-adrenergic activation and memory for emotional events. **Nature**. v. 371, n. 6499, p. 702-704, 1994
- CAREYA, R.J. e DAMIANOPOULOS, E. N. Serotonin and conditioning: Focus on Pavlovian psychostimulant drug conditioning. **Behavioural Brain Research**. n. 282, p. 227-236, 2015.
- CAVALCANTE, L. E, et al. Modulation of the storage of social recognition memory by neurotransmitter systems in the insular cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 334, p. 129-134, 2017.
- CELADA, P.; PUIG, M. V.; ARTIGAS, F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 7, 2013.
- CLOSS, V. E.; SCHWANKE, C. H. A.. A evolução do índice de envelhecimento no Brasil, nas suas regiões e unidades federativas no período de 1970 a 2010. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. v.15, n.3 ,p. 443-458, 2012
- CURRAN, H. V.; ROBBINS, T. W. Special issue on consolidation, reconsolidation and extinction. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 4, p. 627-629, 14 mar. 2013.
- COWEN, P.; SHERWOOD, A. C. The role of serotonin in cognitive function: evidence from recent studies and implications for understanding depression. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 7, p. 575-583, 2013.

- da SILVA WC, BONINI JS, BEVILAQUA LRM, IZQUIERDO I, et al. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Hippocampus**. v.86, p.100-106, 2006
- da SILVEIRA, C. K. B.; FURINI, C. R.; BENETTI, F.; da CRUZ MONTEIRO, S.; IZQUIERDO, I. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.103, p. 64-71, 2013
- de CARVALHO MYSKIW, J.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Behavioral tagging of extinction learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.3, p. 1071-1076, 2013
- de CARVALHO MYSKIW, J.; FURINI, C. R. G.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n.12, p. 4572-4577, 2014
- de CARVALHO MYSKIW, J., FURINI, C. R. G., SCHMIDT, B., FERREIRA, F., & IZQUIERDO, I. Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n.2, p. E230–E233, 2015
- DAI, H., et al. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 2, p. 306-313, 2007.
- DO-MONTE, F.; ALLENSWORTH, M.; CAROBREZ, A. P. Impairment of contextual conditioned fear extinction after microinjection of alpha-1-adrenergic blocker prazosin into the medial prefrontal cortex. **Behavioural Brain research**, v. 211, n. 1, p. 89-95, 2010.
- DO-MONTE, F. et al. Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 3, p. 318-328, 2010.
- DO MONTE, F. et al. Systemic or intra-prelimbic cortex infusion of prazosin impairs fear memory reconsolidation. **Behavioural Brain Research**, v. 244, p. 137-141, 2013.
- DUDAI, Y. The neurobiology of memory: concepts, findings, trends. **Oxford University Press**, 1989.
- DUNSMOOR, J. E. et al. Emotional learning selectively and retroactively strengthens memories for related events. **Nature**, v. 520, n. 7547, p. 345-348, 2015.
- ERICSON, H.; BLOMQVIST, A.; KÖHLER, C. Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**. V.1, p.45-64, 1991.
- FABBRI, R. et al. Memory retrieval of inhibitory avoidance requires histamine H1 receptor activation in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201604841, 2016.

- FIORENZA, N. G. et al. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 210–216, 2012.
- FIORENZA, N. G.; SARTOR, D.; MYSKIW, J. C.; IZQUIERDO, I. Treatment of fear memories: interactions between extinction and reconsolidation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, n. 4, p. 1363-1372, 2011
- FREY, U.; MORRIS, R. G. M. Synaptic tagging and long-term potentiation. **Nature**, v. 385, n.6616, p. 533-536, 1997
- FITZGERALD, P. J.; GIUSTINO, T. F.; SEEMANN, J. R.; MAREN, S. Noradrenergic blockade stabilizes prefrontal activity and enables fear extinction under stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 28, 2015.
- FURINI, C. R. G. et al. D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 212–217, 2014.
- FURINI, C.; MYSKIW, J.; IZQUIERDO, I. The learning of fear extinction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 47C, p. 670–683, 2014.
- GÖTHERT, M. Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part I. General background and discovery of serotonin as a basis for 5-HT receptor identification. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 4, p. 771-786, 2013.
- GOZLAN, H. et al. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. **Nature**, v. 305, n. 5930, p. 140-142, 1983.
- HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Nature Reviews**. v. 4, p.121-130, 2003.
- HAAS, H.; SERGEEVA, O.A.; SELBACH, O. Histamine in the Nervous System. **Physiological Reviews**, v.88, p.1183-1241, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo demográfico 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/resultados.html>>. Acesso em: 05 de jul.2016.
- IZQUIERDO, I. Memória. **Porto Alegre: Artmed**; 2011
- IZQUIERDO, I. et al. Establishment of a trace reflex during natural sleep of cats]. **Actualités Neurophysiologiques**, v. 6, p. 277–296, 1965.
- IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 1998b.
- IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 1999.

- IZQUIERDO, I. et al. Short-and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 69, n. 3, p. 219-224, 1998a
- IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. **Trends in Neurosciences**, v.29, p. 496-505, 2006.
- IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.
- IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behaviour Pharmacology**, 11(78):517-534, 2000.
- KLEMENHAGEN, K. C. et al. Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 1, p. 101, 2006.
- KWIATKOWSKI H. Histamine in nervous tissue. **Journal Physiol.** v. 102: p. 32–41, 1941.
- LAMPRECHT, R., LeDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, n.1, p.45-54, 2004.
- LONOV, I. D.; SEVERTSEV, N. N. Histamine- and haloperidol-induced catalepsy in aged mice: differential responsiveness to l-dopa. **Psychopharmacology**. v. 223, n. 2, p 191-197, 2012
- MCGAUGH, James L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of neuroscience**. v. 27, p. 1–28, 2004
- MARTIN, S. J.; GRIMWOOD, P. D.; MORRIS, R. G. M. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. **Annual review of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 649-711, 2000.
- MENEZES, J. et al. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on d1-subtype dopamine receptors in hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 112, n. 13, p. E1652–E1658, 2015.
- MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. **Annual Review of Psychology**, v. 63, p. 129-151, 2012.
- MILLER DB, AND O'CALLAGHAN JP. The pharmacology of wakefulness. **Metabolism**. v. 55, n., p13 19, 2006
- MIRANDA, M. I. et al.  $\beta$ -Adrenergic receptors in the insular cortex are differentially involved in aversive vs. incidental context memory formation. **Learning & Memory**, v. 18, n. 8, p. 502-507, 2011.
- MOCHIZUKI, T.i et al. Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. **Physiology & Behavior**, v. 51, n. 2, p. 391-394, 1992.

- MOHAMMAD,Z., MOSES. L., GWALTNEY, B., S. M. Serotonin: a review. **J. Pharmacol. Therap.** n. 31, p. 187–199, 2008
- MONCADA, D. Evidence of VTA and LC control protein synthesis required for the behavioral tagging process. **Neurobiology of Learning and Memory.** 2017
- MONCADA, D.; BALLARINI, F.; MARTINEZ, M. C.; FREY, J. U.; VIOLA, H. Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, n. 31, p. 12931-12936, 2011
- MONCADA, D.; VIOLA, H. Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 28, p. 7476-7481, 2007.
- MORRISON, J. H.; BAXTER, M. G. The Aging Cortical Synapse: Hallmarks and Implications for Cognitive Decline. **Nature Reviews. Neuroscience.** v.4, n.13, p. 240–250, 2012
- NGUYEN, T.; SHAPIRO, D.A.; GEORGE, S.R.; SETOLA, V.; LEE, D.K.; CHENG, R.; RAUSER, L.; LEE, S.P.; LYNCH, K.R.; ROTH, B.L.; O'DOWD, B.F. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. **Molecular Pharmacology** v. 59, p. 427-433, 2001
- NORDON, David G. et al. Perda Cognitiva em idosos. **Revista Faculdade. Ciências Médicas de Sorocaba.** v. 11, n. 3, p. 5 -8, 2009
- ÖGREN, S. O. et al. The role of 5-HT 1A receptors in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 54-77, 2008.
- Organização Mundial da Saúde. Relatório Mundial de Envelhecimento e saúde 2015. Disponível em: < <http://sbgg.org.br/wp-content/uploads/2015/10/OMS-ENVELHECIMENTO-2015-port.pdf>>. Acessado em: 04 de jul de 2016
- PARSONS, Mike E., GANELLIN, Robin “Histamine and Its Receptors. **British Journal of Pharmacology.** v.147, p. S127–S135, 2006
- PASSANI, Maria B., BACCIOTTINI, Lucia, MANNAIONI, Pier F., BLANDINA, Patrizio. Central histaminergic system and cognition. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews.** v. 24, n. 1, p. 107-113, 2000
- PASSANI, Maria. B.; BLANDINA, Patrizio. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. **Trends in pharmacological sciences**, v.32, n.4, p. 242-249, 2011
- PAVLOV, I. P. **Conditioned reflexes.** Oxford, England: Oxford University Press, 1927.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2º. ed. ed. **San Diego: Academic. Press**, 1986.
- PITHADIA, A. B.; JAIN, S. M. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes and their modulators with therapeutic potentials. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 1, n. 2, p. 72, 2009.

PONNUSAMY, R.; ZHURAVKA, I.; POULOS, A. M.; SHOBE, J.; MERJANIAN, M., HUANG; J. FANSELOW; M. S. Retrieval and Reconsolidation Accounts of Fear Extinction. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v.10, n.8, p.1-10, 2016.

PROVENSI, G.; COSTA, A.; PASSANI, M. B.; BLANDINA, P. Donepezil, an acetylcholine esterase inhibitor, and ABT-239, a histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist/inverse agonist, require the integrity of brain histamine system to exert biochemical and procognitive effects in the mouse. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 139-147, 2016

QUEVEDO, J. et al. Differential effects of emotional arousal in short- and long-term memory in healthy adults. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, n. 2, p. 132–135, mar. 2003.

RANG, H. P. Rang & Dale Farmacologia. **Rio de Janeiro: Elsevier**, 2012.

RAZ, N.; RODRIGUE, K. M.; HAACKE, E. Brain aging and its modifiers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1097, n. 1, p. 84-93, 2007.

REDONDO, Roger L.; MORRIS, Richard GM. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 17, 2011.

RESCORLA, R. A. Are associative changes in acquisition and extinction negatively accelerated? **Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes**, v. 27, n. 4, p. 307–315, 2001.

RESCORLA, R. A. Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval. **Learning & Behavior**, v. 32, n. 4, p. 401–408, 2004

ROESLER, R.; SCHRÖDER, N. Cognitive enhancers: focus on modulatory signaling influencing memory consolidation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 99, n. 2, p. 155–163, 2011.

ROOZENDAAL, B. et al. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 3, p. 576-579, 2008.

SAMSON, Rachel D., and CAROL A. Barnes. “Impact of Aging Brain Circuits on Cognition.” **The European Journal of Neuroscience**. v.37, n.12, p.1903–1915, 2016.

SANDRINI, M. et al. Causal Role of Prefrontal Cortex in Strengthening of Episodic Memories through Reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, n. 21, p. 2181–2184, 2013.

SCHACTER, D. L.; ADDIS, D. R. The cognitive neuroscience of constructive memory: remembering the past and imagining the future. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v.362, p. 773–786, 2007.

SCHMIDT, S. D. et al. Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 142, p. 48-54, 2017.

SEDEYN, Jonathan C., Wu, Hao, Hobbs, Reilly. D., Levin, Eli C., Nagele, Robert G., Venkataraman, Venkat. Histamine Induces Alzheimer's Disease-Like Blood Brain Barrier Breach and Local Cellular Responses in Mouse Brain Organotypic Cultures. **BioMed Research International**. v. 2015, 2015.

SQUIRE, L.R. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 82, n. 3, p. 171-177, 2004

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. Memória da Mente às Moléculas. **Porto Alegre . Artmed**, 2003.

STERN, S., ALBERINI, C. M., Mechanisms of Memory Enhancement. **Rev Syst Biol Med**. V. 5, n. 1, p. 37-53, 2013.

STIEDL, O. et al. The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 2015.

SZAPIRO, G. et al. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. **Hippocampus**, v. 13, n. 1, p. 53–58, 2003.

SOUZA, T. M. E. et al. Involvement of the serotonergic type 1A (5-HT1A) receptor in the agranular insular cortex in the consolidation of memory for inhibitory avoidance in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 12, n. 5, p. 349-353, 2001.

TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Molecular Brain**. v. 3, n. 1, p. 15, 2010

UPHOUSE, L. Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number?. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 5, p. 679-698, 1997.

VAN DER WERF, J F.; TIMMERMAN, H. The histamine H3 receptor: a general presynaptic histaminergic regulatory system?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 159-162, 1989.

VIANNA, M. R. et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12251–12254, 2001.

ZINN, C.G. et al. Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 33, p. E4914-E4919, 2016.

WATANABE T, TAGUCHI Y, SHIOSAKA S, TANAKA J, KUBOTA H, TERANO Y, TOHYAMA M, WADA H. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. **Brain Res**. v. 295: p.13–25, 1984



YANAI, K. et al. Habitação do receptor Histamina H1 em cérebros humanos após doses orais únicas de antagonistas de histamina H1 medidos por tomografia por emissão de positrão. **British journal of pharmacology** , v. 116, n. 1, p. 1649-1655, 1995.

## ANEXO A



# SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

---

Código SIPESQ: 7478

Porto Alegre, 31 de agosto de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Investigação da participação do sistema histaminérgico na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA

---

## ANEXO B



# SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7478

Porto Alegre, 24 de novembro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Investigação da participação do sistema histaminérgico na facilitação da extinção da memória de medo condicionado ao contexto pela exposição a uma novidade" coordenado por JOCIANE DE CARVALHO MYSKIW.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
528	Ratos	24/11/2016 - 24/01/2018

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

## ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

### Neurobiology of Learning and Memory Submission: Manuscript Number Assigned

NLM (ELS) <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Qua 19/12/2018, 04:12

Para: Jociane\_carvalho@hotmail.com <Jociane\_carvalho@hotmail.com>

Cc: duda\_nachtigall@hotmail.com <duda\_nachtigall@hotmail.com>; clapenha@gmail.com <clapenha@gmail.com>;

izquier@terra.com.br <izquier@terra.com.br>; cristianefurini@hotmail.com <cristianefurini@hotmail.com>;

jonny.anderson@hotmail.com <jonny.anderson@hotmail.com>

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Ms. No.: NLM-18-358

Title: Facilitation of fear extinction by novelty is regulated by <beta>-adrenergic and 5-HT1A serotonergic receptors in hippocampus.

Corresponding Author: Professor jociane de Carvalho Myskiw

Authors: Eduarda Nachtigall; Cristiane Furini; Jonny Behling; Clarissa Farias; Ivan Izquierdo;

Dear Professor de Carvalho Myskiw,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: NLM-18-358

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<https://ees.elsevier.com/ynlme/>

Your username is: Jociane\_carvalho@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/YNLME/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/YNLME/automail_query.asp).

Thank you for submitting your work to Neurobiology of Learning and Memory.

Kind regards,

Bhavani Mutharasan

Journal Manager

Neurobiology of Learning and Memory

Email: nlm@elsevier.com

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)