



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**A participação de diferentes sistemas neuromodulatórios no hipocampo,  
núcleo basolateral da amígdala e córtex pré-frontal ventromedial, na extinção de  
memórias aversivas**

Natália Gindri Fiorenza

PORTO ALEGRE/RS

2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**A participação de diferentes sistemas neuromodulatórios no hipocampo,  
núcleo basolateral da amígdala e córtex pré-frontal ventromedial, na extinção de  
memórias aversivas**

Natália Gindri Fiorenza

Orientador: Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Doutor.

### CIP - Catalogação na Publicação

Fiorenza, Natália Gindri

A participação de diferentes sistemas neuromodulatórios no hipocampo, núcleo basolateral da amígdala e córtex pré-frontal ventromedial na extinção de memórias aversivas / Natália Gindri Fiorenza. -- 2012.

53 f.

Orientador: Ivan Antonio Izquierdo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Neurociências. 2. Memória. 3. Neuromoduladores. 4. Extinção. 5. Hipocampo. I. Izquierdo, Ivan Antonio, orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha filha,  
um serzinho ainda tão pequeno,  
mas cheio de muito amor!

## AGRADECIMENTOS

À minha nova família que vem tornando minha vida cada dia mais feliz: meu namorado **Rochan**, sempre tão carinhoso, companheiro e dedicado, e minha filha, que ainda está dentro de mim, sentindo todas as minhas inseguranças, meus nervosismos, mas principalmente, todo o meu amor.

À minha eterna família, em particular meus pais, **Eni e Irineu**, pelo exemplo, pelas lições de vida, palavras de carinho e bons conselhos que me guiaram nesta jornada. Aos meus irmãos **Alexei e Rodrigo**, amigos e companheiros de todas as horas, que sempre participaram incondicionalmente de todos os momentos da minha vida.

Ao Mestre **Ivan Izquierdo**, pelos ensinamentos de ciências e de vida, por sua atenção com todo seu profissionalismo e por acolher-me em seu valioso grupo de pesquisa.

À nossa professora **Jociane**, co-responsável por meus primeiros passos na ciência, e que me ajudou a ter força, a acreditar em mim e a ser uma pesquisadora.

Aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório **Fernando, Cristiane e Jéssica** pela ajuda, dicas, risadas e principalmente pela amizade. À **Jéssica** e à **Jociane**, um muito obrigado especial por me ajudarem na realização dos experimentos, naqueles dias intermináveis de *fear conditioning*, sempre muito dispostas e engajadas no trabalho. Também agradeço aos nossos sempre prestativos “ICs” **Milene, Bianca, Guilherme e Bruna**, que me ajudaram na reta final dos experimentos.

Aos ex-colegas de trabalho que estiveram ao meu lado me incentivando, me apoiando e trocando experiências.

A todos os meus amigos, verdadeiros tesouros da minha vida.

E a todos os demais que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração desta tese ou em outros momentos da minha vida.

À CAPES, pelo financiamento da minha bolsa nestes últimos dois anos.

**Natália Gindri Fiorenza**

## 1 RESUMO

A extinção é uma forma de aprendizado inibitório que se origina na omissão do reforço ou estímulo incondicionado, inibindo a evocação de uma resposta ou comportamento aprendido anteriormente. Muitas formas de aprendizado são moduladas por receptores  $\beta$ -noradrenérgicos, D1-dopaminérgicos e H2-histaminérgicos no córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC), no complexo basolateral da amígdala (BLA) e no hipocampo dorsal (DH). Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a modulação da extinção de memória aversiva nestas três regiões cerebrais. Para isso, utilizamos ratos machos Wistar, que foram submetidos ao paradigma de esquiva inibitória (EI) ou condicionamento contextual ao medo (CCM). As diferentes drogas utilizadas foram infundidas através das cânulas guias implantadas estereotaxicamente no DH, BLA ou vmPFC imediatamente após a sessão de extinção e seus efeitos sobre a extinção foram avaliados em uma sessão de teste realizada 24 h depois. A D-Serina (50  $\mu\text{g/lado}$ ), modulador positivo do receptor NMDA, e o SKF9188 (12.5  $\mu\text{g/lado}$ ), inibidor da enzima histamina metil-transferase, melhoraram a consolidação da memória de extinção nas tarefas de EI e CCM. Entretanto, o AP5 (5  $\mu\text{g/lado}$ ), antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, e a ranitidina (17.5  $\mu\text{g/lado}$ ), antagonista do receptor histaminérgico H2, prejudicaram a extinção em ambos os paradigmas, indicando que os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA estão envolvidos na consolidação dos dois paradigmas utilizados, e que os receptores histaminérgicos H2 modulam a extinção nas três estruturas estudadas. A noradrenalina (1  $\mu\text{g/lado}$ ), o antagonista  $\beta$ -adrenoreceptor, timolol (1  $\mu\text{g/lado}$ ), o agonista dos receptores D1, SKF38393 (12.5  $\mu\text{g/lado}$ ) e o antagonista dos receptores D1, SCH23390 (1.5  $\mu\text{g/lado}$ ) também afetam a extinção nas duas tarefas, porém, seus efeitos são variados dependendo da tarefa e do local da infusão, sugerindo que a modulação da extinção pelos receptores  $\beta$ - e D1 é mais complexa. Nossos resultados mostram que as três estruturas

são ativadas durante o processo de extinção da memória e que os sistemas neuromodulatórios atuam de formas distintas nessas tarefas.

**PALAVRAS-CHAVE:** memória, extinção, sistemas neuromodulatórios, condicionamento contextual ao medo.

## 2 ABSTRACT

Extinction consists of the learned inhibition of retrieval of previously acquired memory. Many forms of learning are modulated by  $\beta$ -noradrenergic, D1-dopaminergic and H2-histaminergic receptors on ventromedial prefrontal cortex (vmPFC), basolateral amygdala (BLA) and dorsal hippocampus. Therefore, the aim of this work was investigated the modulation of aversive memory extinction in these brain structures. Male Wistar rats were submitted to inhibitory avoidance paradigm (EI) or contextual fear conditioning (CCM). The drugs were infused through cannulae implanted into the DH, BLA or vmPFC immediately after the extinction session and their effects were evaluated 24 h later. D-serine (50  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a NMDA receptor stimulant, and SKF9188 (12.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a histamine methyl-transferase inhibitor, enhanced the consolidation of the extinction memory in EI and CCM tasks. However, AP5 (5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a NMDA-antagonist, and ranitidine (17.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a H2-histaminergic antagonist, impaired the extinction of both tasks, indicated that NMDA receptors are involved in the consolidation of extinction of both tasks, and histamine H2 receptors modulate that process in all areas studied. Noradrenaline (1  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), timolol (1  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a  $\beta$ -adrenergic antagonist, SKF38393 (12.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ) and SCH23390 (1.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), D1 agonist and antagonist receptor, respectively, also affected the extinction, but their effects varied with the task and with the site of infusion, suggesting that extinction modulation by  $\beta$ - and D1 is more complex. In conclusion, the three structures investigated are activated in the aversive memory extinction and the neuromodulatory systems act of different forms in these structures.

**KEYWORDS:** memory, extinction, neuromodulatory systems, contextual fear conditioning.



### 3 LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> As estruturas cerebrais estudadas. _____	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> O receptor NMDA. _____	<b>17</b>
<b>Figura 3</b> Neuromoduladores e suas projeções no SNC. _____	<b>22</b>

#### 4 LISTA DE ABREVIATURAS

Ach – acetilcolina; do inglês *acetylcholine*

AMPA – ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico; do inglês  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

AP5 – ácido D(-)-2-amino-5-fosfonopentanóico; do inglês *D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid*

BLA – núcleo basolateral da amígdala; do inglês *basolateral amygdala*

CA1 – subregião hipocámpal, corno de Amon 1

CCA – córtex cíngulado anterior

CCM – condicionamento contextual ao medo

CE – córtex entorrinal

CP – córtex parietal

DA – dopamina

DH – hipocampo dorsal; do inglês *dorsal hippocampus*

D-SER – D-serina (ácido (R)-2-amino-3-hidróxiopropanóico); do inglês *(R)-2-amino-3-hydroxypropanoic acid*

EI – esquivas inibitórias

Fig. - figura

GABA – ácido gama-aminobutírico; do inglês  *$\gamma$ -aminobutyric acid*

HI – histamina

HIP – hipocampo

LTM – memória de longa duração; do inglês *long-term memory*

NA – noradrenalina

NMDA – ácido n-metil-d-aspartato; do inglês *n-methyl-d-aspartic acid*

SCH – hidrocloreto de R(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina; do inglês *R(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride*

SE – serotonina

SKF – hidrocloreto de (±)-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-(1H)-3-benzazepina-7,8-diol; do inglês *(±)-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-(1H)-3-benzazepine-7,8-diol hydrochloride*

STM – memória de curta duração; do inglês *short-term memory*

VTA – área tegmental ventral; do inglês *ventral tegmental area*

vmPFC - córtex pré-frontal ventro-medial; do inglês *ventromedial prefrontal cortex*

## SUMÁRIO

1	<i>RESUMO</i> .....	12
2	<i>ABSTRACT</i> .....	14
3	<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	15
4	<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i> .....	16
5	<i>DESCRIÇÃO</i> .....	12
5.1	<i>Introdução e revisão da literatura</i> .....	12
5.2	<i>Justificativa</i> .....	23
6	<i>OBJETIVOS</i> .....	24
6.1	<i>Objetivo principal</i> .....	24
6.2	<i>Objetivos secundários</i> .....	24
7	<i>ANEXO 1</i> .....	25
8	<i>CONCLUSÕES</i> .....	44
9	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	45

## 5 DESCRIÇÃO

### 5.1 Introdução e revisão da literatura

A memória é um processo essencial para a experiência humana e pode ser caracterizada como a capacidade que um indivíduo tem de armazenar dados ou conhecimentos para assim, modificar o próprio comportamento. Através da interação com o meio ambiente, adquirimos informações acerca do mundo e aprendemos a associar estímulos externos e respostas internas. A memória pode ser caracterizada então, como um registro das nossas percepções e um produto dos nossos sentidos (Baddeley, 1999).

A memória é usualmente dividida em diferentes estágios. Num primeiro momento ocorre a aquisição da informação através da exposição ao estímulo. Esta etapa de aquisição corresponde à aprendizagem. A informação é então, processada pelos sistemas sensoriais e retida temporariamente (minutos, horas) como memória de curta duração (STM; sigla do inglês *short-term memory*). Se for útil para o nosso desenvolvimento e sobrevivência, ela será armazenada em um sistema de memória mais estável, de longa duração (LTM; sigla do inglês *long-term memory*), por meio de um processo chamado consolidação (McGaugh, 1966; 2000). Uma vez armazenada a informação pode ser recuperada ou evocada sempre que necessário. Neste estágio, o traço mnemônico poderá ser fortalecido ou enfraquecido, dependendo da relevância da informação (Izquierdo, 2002).

De todas as informações processadas pelo sistema nervoso, apenas algumas são de fato retidas por longos períodos (REF). A maioria nem sequer é adquirida, sendo filtrada por mecanismos atencionais e emocionais. Apenas as informações mais relevantes para a cognição, mais marcantes emocionalmente ou mais fortes sensorialmente, perduram por mais tempo. Além disso, com o passar do tempo, mesmo as informações consolidadas podem desaparecer: trata-se do esquecimento, um processo que literalmente “apaga” as memórias,

através do enfraquecimento das sinapses por elas ativadas (REF). Apesar de seus efeitos negativos óbvios, é importante ter em mente que, em níveis normais, o esquecimento desempenha um papel crucial como mecanismo de prevenção da sobrecarga nos sistemas cerebrais de memorização (Izquierdo, 2002).

Muitas memórias são adquiridas por meio da associação entre dois ou mais estímulos, sendo por isso chamadas de memórias associativas. Quem estabeleceu esse conceito pela primeira vez foi Pavlov, no início do século XX, o qual postulou que o pareamento entre um estímulo novo e neutro, chamado por ele de **estímulo condicionado**, com outro biologicamente significativo (doloroso ou prazeroso), denominado de **estímulo incondicionado**, produz uma **resposta condicionada**, ou seja, a resposta ao primeiro estímulo muda, ficando condicionada ao pareamento (Pavlov, 1927).

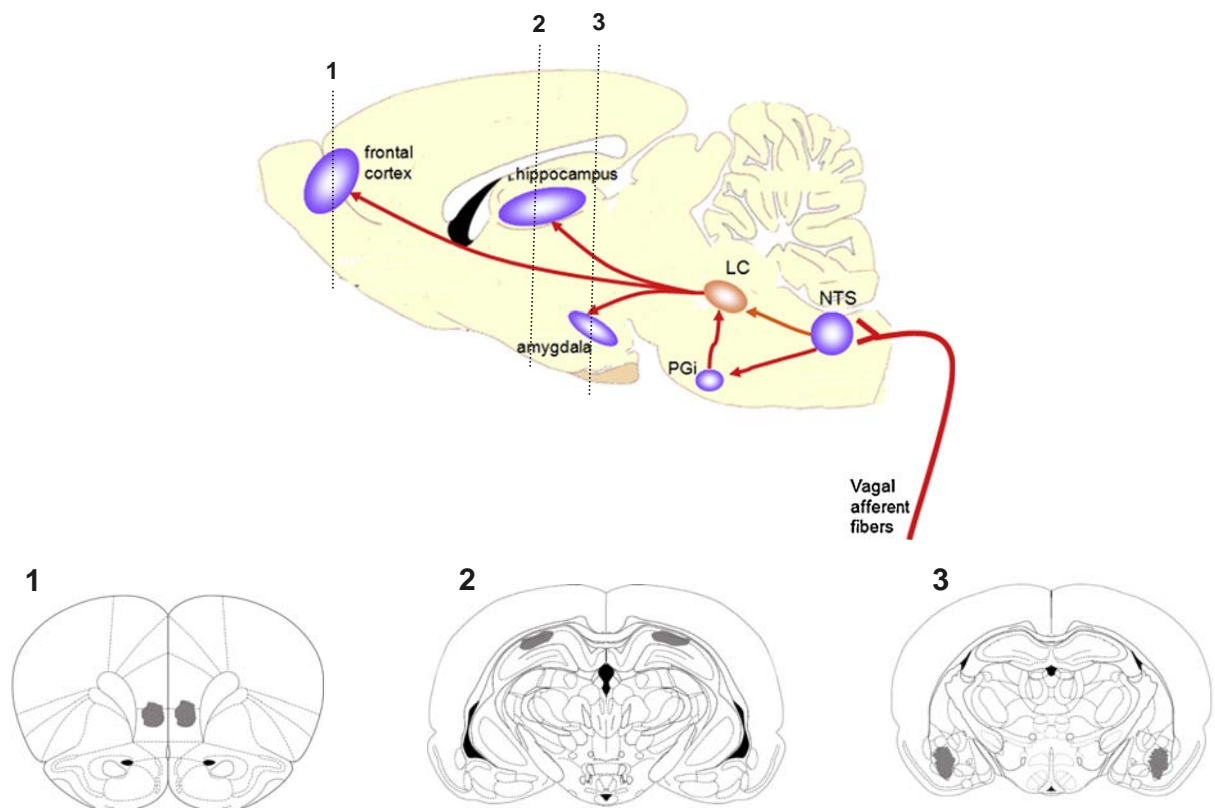
Utilizando a mesma ferramenta experimental, Pavlov descobriu que a apresentação repetida de um estímulo condicionado na ausência de um estímulo incondicionado (reforço), levava a um declínio na frequência da emissão da resposta condicionada e esse processo foi por ele denominado de extinção (Pavlov, 1956). Apesar de representar um desaparecimento “comportamental” da memória original, o processo de extinção não é sinônimo de esquecimento, sendo na verdade, um processo ativo de aprendizagem decorrente da re-exposição à informação/situação na ausência de reforço, a qual leva à formação de uma nova memória que se sobrepõe à original (Myskiw *et al.*, 2011). No caso de memórias aversivas, isto impede que a mesma seja evocada sem necessidade, permitindo assim ao sujeito uma vida normal (Izquierdo *et al.*, 1965; Rescorla, 2001).

Por tratar-se de um novo aprendizado, o processo de extinção envolve substratos neuroanatômicos, celulares e moleculares, similares aqueles inicialmente recrutados para a consolidação da memória original (Vianna *et al.*, 2001; Szapiro *et al.*, 2003). As estruturas e os mecanismos bioquímicos envolvidos variam conforme a tarefa, mas estudos sugerem que

tanto a amígdala e o hipocampo, quanto os córtex pré-frontal e entorrinal, entre outras áreas, desempenham um papel fundamental nesse processo (Santini *et al.*, 2004; Cammarota *et al.*, 2007). O hipocampo (HIP; Fig. 1) é uma estrutura encefálica localizada bilateralmente no lobo temporal e é um importante componente do sistema límbico. Ele desempenha um papel central na formação de memórias declarativas (Izquierdo *et al.*, 1998), e diferentes áreas cerebrais interagem com ele para regular a aquisição e o armazenamento de novas informações (Izquierdo *et al.*, 1997). Além disso, o HIP é fundamental para o processamento da informação contextual durante o condicionamento ao medo (Maren *et al.*, 1997), e estudos do nosso laboratório demonstraram que ele participa da consolidação e evocação da extinção da memória aversiva, na tarefa de esQUIVA inibitória de uma via (EI; Vianna *et al.*, 2001; Szapiro *et al.*, 2003; Cammarota *et al.*, 2005).

A amígdala (AMI; Fig. 1) é uma estrutura composta por mais de 10 sub-regiões, ou núcleos, funcional e anatomicamente heterogêneos. Dentre esses estão o núcleo central e os núcleos lateral e basal (juntos conhecidos como complexo basolateral da amígdala - BLA), os quais apresentam conexões entre si e com diversas regiões cerebrais. Vários estudos (Cahill *et al.*, 1995; Hamann *et al.*, 1999; Cahill *et al.*, 2000; Tomaz *et al.*, 2003) relacionam a amígdala, e principalmente o complexo basolateral, com os processos de modulação da memória, já que ele integra as informações sensoriais com as nociceptivas, além de coordenar sistemas neuro-humorais que facilitam ou inibem o aprendizado, através de suas conexões com outras áreas cerebrais, como o hipocampo e o córtex pré-frontal (Johansson, *et al.*, 2004). Ela também desempenha um papel fundamental na extinção da memória aversiva (Falls *et al.*, 1992; Aggleton, 2000, Lu *et al.*, 2001; Myers e Davis, 2007), agindo diretamente na consolidação ou indiretamente através da ativação de sistemas neuromodulatórios no HIP (Kaplan e Moore, 2011), tais como os sistemas noradrenérgico e colinérgico (Izquierdo, 2002).

A região ventromedial do córtex pré-frontal (vmPFC; Fig. 1) abrange em roedores, a parte mais dorsal do córtex cingulado anterior, a área pré-límbica e a área infra-límbica mais ventralmente (Öngur e Price, 2000; Nieuwenhuis e Takashima, 2011). Juntamente com o hipocampo e a amígdala, essa estrutura é essencial para a aquisição, consolidação e evocação da memória de extinção do medo (Kim e Jung, 2006; Quirk, 2003; 2006; Quirk e Mueller, 2008; Kaplan e Moore, 2011). Alguns estudos sugerem que o vmPFC modula as memórias de medo através de suas projeções para os núcleos basal e lateral da amígdala (Sores-Bayon *et al.*, 2006) e para os inter-neurônios GABAérgicos, situados entre esse núcleos (Vertes, 2004; Peters *et al.*, 2009). Porém, a complexidade das conexões entre essas duas estruturas tem gerado discussões com relação à influência do córtex pré-frontal (CPF) sobre a AMI (excitatória x inibitória) (Pape e Pare, 2010).



**Figura 1** As estruturas cerebrais estudadas. Esquema representativo do encéfalo de rato, mostrando a localização do HIP, AMI e CPF (retirado de McIntyre *et al.*, 2011).



Apesar das diversas similaridades entre a consolidação da memória original e a consolidação da memória de extinção, existem algumas diferenças entre esses dois processos (Bahar *et al.*, 2003) e a anatomo-fisiologia da extinção ainda não é totalmente compreendida.

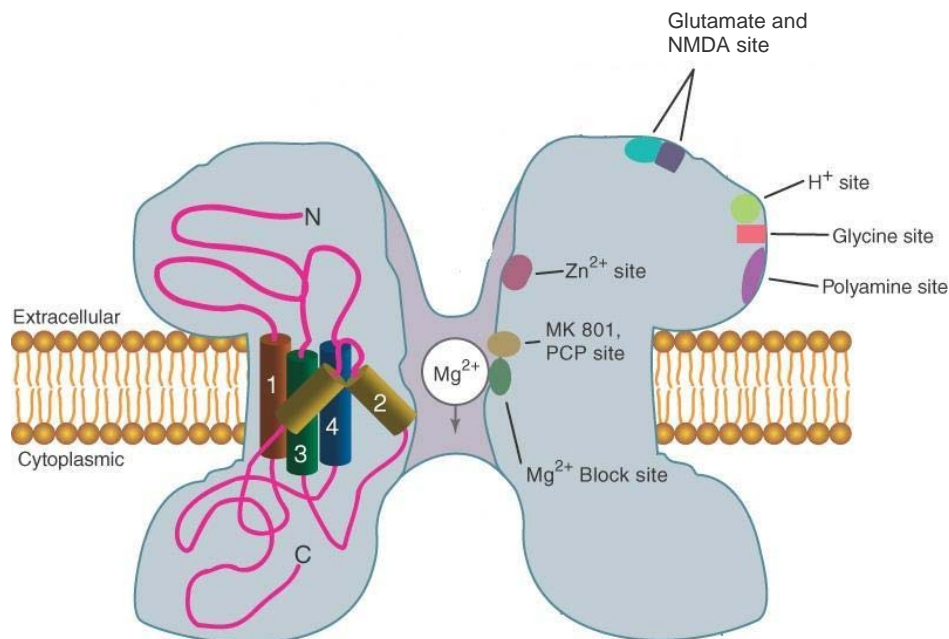
### **O sistema glutamatérgico**

O glutamato é o principal transmissor excitatório do sistema nervoso central e se liga em 2 tipos de receptores: os ionotrópicos, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato; e os metabotrópicos (Riedel *et al.*, 2003). O NMDA (Fig. 2) é um receptor pós-sináptico densamente distribuído no cérebro, que possui uma série de sítios de ligação para diversas substâncias, e tem sua ação modulada por tais ligantes. Dentre esses está o sítio de ligação para o glutamato, principal ativador do receptor, o sítio do zinco ( $Zn^{2+}$ ) e o sítio de ligação da glicina.

Numerosas evidências apontam um papel-chave dos receptores NMDA em muitas formas de aprendizado e memória (Izquierdo *et al.*, 1998), e na extinção em diferentes tarefas (Bevilaqua *et al.*, 2006; Myers & Davis, 2007).

A D-serina (ácido (R)-2-amino-3-hidróxiopropanóico; D-SER) é um aminoácido produzido principalmente pelas células gliais (Schell *et al.*, 1995), que age como co-agonista endógeno dos receptores NMDA, através de sua ligação ao sítio da glicina. Ela é encontrada em altas concentrações no sistema nervoso de mamíferos (Hashimoto *et al.*, 1992), sendo particularmente abundante no córtex cerebral, hipocampo, núcleo olfatório anterior, tubérculo olfatório e amígdala (Schell *et al.*, 1995; Henneberger *et al.*, 2012). Evidências experimentais demonstram que a D-SER é capaz de induzir a plasticidade sináptica dependente da ativação de receptores NMDA em cultura de células (Mothet *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003), a qual é inibida por AP5, um antagonista seletivo desse receptor (Yang *et al.*, 2003).

Muitos estudos relacionam o bloqueio do receptor NMDA a déficits na consolidação e na extinção de diferentes tipos de memória no HIP (Morris *et al.*, 1986; Szapiro *et al.*, 2003; Roesler *et al.*, 2003; 2005) e na AMI (Falls *et al.*, 1992; Roesler *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). Além disso, estudos mostram que a ativação desse receptor facilita a consolidação da memória (Izquierdo *et al.*, 1992; Berleze *et al.*, 2005) e que a D-cicloserina, um análogo da D-serina, facilita a extinção da memória em animais e em humanos (Walker *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2006). Sendo assim, pode-se esperar que a ativação desse receptor, através da D-SER, module positivamente a extinção da memória.



**Figura 2 O receptor NMDA.** Desenho representativo do receptor glutamatérgico NMDA. (Carlston, 1998)

### A modulação da memória

É consenso que acontecimentos com forte carga emocional são mais bem lembrados do que os emocionalmente neutros. Isso porque um evento emocional vivenciado desencadeia uma série de alterações fisiológicas, tais como a secreção periférica de hormônios e a ativação

de sistemas neuromodulatórios (Ferry *et al.*, 1999). Esses sistemas consistem de diversos conjuntos de fibras que terminam de modo difuso em vastas áreas do sistema nervoso central. Essas fibras se originam de núcleos localizados no tronco encefálico, no diencéfalo e no prosencéfalo basal e atuam por meio de neurotransmissores bem conhecidos. O **Quadro 1** apresenta uma síntese dos principais sistemas neuromoduladores e qual a sua influência na formação e na evocação de memórias (Cahill e McGaugh, 1998; Izquierdo e McGaugh, 2000; Barros *et al.*, 2001; Izquierdo, 2002; Köhler *et al.*, 2011).

**Quadro 1:** Os principais sistemas neuromodulatórios na formação da memória

(Izquierdo, 2002; Köhler *et al.*, 2011).

Neuro-transmissor	Localização dos corpos neuronais de origem	Projeção	Função geral	Envolvimento na modulação da memória
Noradrenalina (NA)	<i>Locus ceruleus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Principalmente HIP, AMI e neocórtex.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulação da excitabilidade cortical e subcortical;</li> <li>• Regulação do ciclo sono-vigília.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitação da formação de LTM, agindo sobre CA1, CE e CP, imediatamente após a aquisição, e 3-6 horas mais tarde;</li> <li>• Facilitação da evocação, agindo simultaneamente sobre CA1, CE, CP e CCA.</li> </ul>
Dopamina (DA)	Substância Negra e área tegmental ventral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Principalmente núcleos da base, regiões límbicas (HIP, hipotálamo e AMI) e lobo frontal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coordenação motora;</li> <li>• Modulação emocional;</li> <li>• Comportamentos motivados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitação da memória operacional, agindo sobre o CPF;</li> <li>• Facilitação da formação de LTM, agindo sobre CA1, CE e CP, durante as primeiras 6 horas após a aquisição;</li> <li>• Facilitação da evocação, agindo simultaneamente sobre CA1, CE, CP e CCA.</li> </ul>
Serotonina (SE)	Núcleos da rafe pontina e mesencefálica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ascendem para o córtex cerebral, sistema límbico e gânglios da base e descendem até a medula.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulação da excitabilidade cortical e subcortical.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição da formação de LTM, agindo sobre CA1, CP, e CE, durante as primeiras 6 horas após a aquisição;</li> <li>• Inibição da evocação, agindo simultaneamente sobre CA1, CE, CP e CCA.</li> </ul>
Acetilcolina (Ach)	Núcleo basal de Meynert, área septal, núcleos da banda diagonal, núcleos pontinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Principalmente HIP, hipotálamo lateral e córtex cerebral.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulação da excitabilidade cortical;</li> <li>• Manutenção da vigília;</li> <li>• Iniciação do sono</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitação da memória operacional, agindo sobre o CPF;</li> <li>• Facilitação da formação de LTM, agindo sobre CA1, CE</li> </ul>

	rostrais e formação reticular mesencefálica.		paradoxal.	e CP nos momentos iniciais de sua formação; • Facilitação da evocação, agindo sobre CA1, CE, CP e CCA.
Histamina (HI)	Núcleo túbero-mamilar do hipotálamo posterior	• Todo o SNC, principalmente CC,AMI, substância nigra, hipotálamo e HIP.	• Manutenção da vigília; • Controle do estado de alerta e de processos comportamentais.	• Efeitos diferentes, dependendo da tarefa, do tipo de memória e do receptor; • Estimula a liberação de Ach no HIP e na AMI;

Abreviações: AMI – amígdala; CA1 – corno de Amon; CE – córtex entorrinal; CC – córtex cerebral; CCA – córtex cingulado anterior; CP – córtex parietal; CPF – córtex pré-frontal; HIP – hipocampo; LTM – sigla do inglês *long-term memory*; SNC – sistema nervoso central.

A hipótese de que os sistemas neuromodulatórios desempenham um papel no aprendizado e memória emergiu algumas décadas atrás com estudos de Kety (1972), que sugeriam que processos cerebrais associados a estados afetivos, como por exemplo, a liberação de amins biogênicas (adrenalina, histamina, noradrenalina, dopamina e serotonina), poderia modular mecanismos sinápticos recentemente ativados. Ou seja, sinapses ativadas pelo aprendizado de eventos emocionalmente fortes, seriam fortalecidas pela liberação de determinadas substâncias. Em concordância, estudos mais recentes utilizando técnicas de microdiálise, observaram um aumento nos níveis de diversos neuromoduladores durante o aprendizado emocional, tais como a serotonina (Kawahara *et al.*, 1993), a dopamina (Hori *et al.*, 1993) e a noradrenalina (Tanaka *et al.*, 1991).

A noradrenalina (NA), juntamente com a dopamina e a adrenalina, é um neurotransmissor derivado do aminoácido tirosina (Purves *et al.*, 2005). O sistema noradrenérgico é um dos principais sistemas neuro-humorais envolvidos na modulação de funções cognitivo-comportamentais, atuando sobre os processos de atenção, cognição e adaptação a mudanças ambientais (Sara e Segal, 1991; Bouret e Sara, 2005). Neurônios noradrenérgicos localizados no *Locus Coeruleus* enviam fibras eferentes para diversas áreas do encéfalo, dentre elas o hipocampo e os núcleos central e basolateral da amígdala, onde acentua a transmissão glutamatérgica, essencial para a formação da memória (Roosendaal *et*

*al.*, 2008; Fig. 3). Além disso, muitos agentes liberados periféricamente, tais como a adrenalina e os glicocorticóides, estimulam a memória através de sua interação com o sistema noradrenérgico na AMI (Gallagher, *et al.*, 1977; McGaugh, 1989; McIntyre *et al.*, 2011) que por sua vez ativa o hipocampo através de conexões diretas e indiretas (Hyman *et al.*, 1990; Kaplan e Moore, 2011).

Em pesquisas desenvolvidas por Gold e van Buskirk (1978), ratos treinados na EI apresentaram diminuição dos níveis de NA sobre condições que resultaram em boa retenção da memória, sugerindo que ocorra um aumento na liberação deste neuromodulador durante o treino nesta tarefa (Gold e van Buskirk, 1978). Outros estudos sugerem que o efeito da NA sobre a memória se deve a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Gallagher *et al.*, 1977; Hatfield *et al.*, 1999) e que a administração intra-hipocampal de timolol, um antagonista deste receptor, causa prejuízo na consolidação da memória na tarefa de EI (Bevilaqua *et al.*, 1997). O efeito da NA na extinção da memória tem sido estudado mais recentemente através da modulação dos receptores  $\alpha_2$  e  $\beta$ -noradrenérgicos no HIP, BLA e CPF, porém os resultados ainda são bastante controversos (Cain *et al.*, 2004; Berlau e McGaugh, 2006; Muller e Cahill, 2010).

A dopamina (DA), assim como as outras aminas biogênicas, exerce suas ações via modulação da neurotransmissão rápida mediada por glutamato ou GABA (ácido gama-aminobutírico). A inervação dopaminérgica é a mais proeminente dentre os neuromoduladores no cérebro, sendo que seus corpos celulares estão na sua maioria localizados na área tegmental ventral (VTA; do inglês *ventral tegmental area*). Estas células projetam-se para o núcleo accumbens, AMI, HIP e para os córtex cingulado, entorrinal e pré-frontal, entre outros (Anden *et al.*, 1964; Fig. 3), afetando funções como a motivação, atenção, recompensa, sono, aprendizado e memória. A DA atua em dois grupos de receptores

metabotrópicos: a família D1, que abrange os receptores D1 e D5; e a família D2, a qual pertence os receptores D2, D3 e D4.

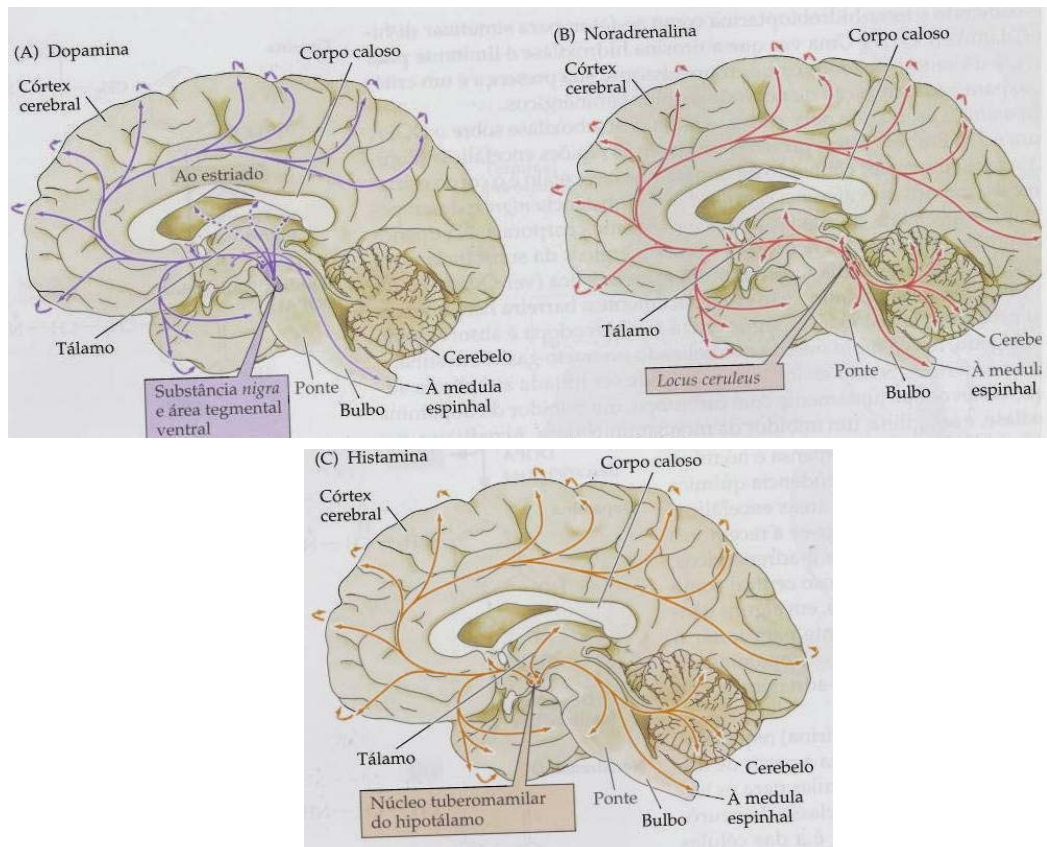
Já em 1977, Haycock e colaboradores demonstraram que a infusão intracerebroventricular de DA imediatamente após o treino, facilita a retenção da memória na EI (Haycock *et al.*, 1977). Estudos mais recentes mostram que o bloqueio do receptor D1 na BLA piora a retenção da memória na mesma tarefa (Lalumiere *et al.*, 2004), confirmando assim, a participação deste sistema na consolidação de memórias aversivas.

Com relação ao papel da DA na extinção, Quirk e colaboradores (2006) sugerem que esse processo é modulado positivamente pela estimulação de vias dopaminérgicas no CPF (Quirk *et al.*, 2006). Além disso, Hikind e Maroun (2008) demonstraram que a infusão de um antagonista do receptor D1 na área infralímbica do CPF causou prejuízo na extinção da memória de condicionamento ao medo ao som, enquanto que o mesmo não foi observado na BLA (Hikind e Maroun, 2008). Em outro estudo, utilizando camundongos, Dubrovina e Zinov'eva (2008) demonstraram que a administração de um agonista e um antagonista D1 não tem efeito na extinção da memória na tarefa de esquiva passiva (Dubrovina e Zinov'eva, 2008).

A histamina (HI) por sua vez, controla uma ampla variedade de funções neurobiológicas e comportamentais, incluindo o ciclo sono-vigília, o consumo de água, a atividade motora e processos cognitivos no HIP (Brown *et al.*, 2001; Haas e Panula, 2003). É sintetizada exclusivamente por neurônios localizados no núcleo tuberomamilar do hipotálamo, que enviam projeções para todo o encéfalo (Wada *et al.*, 1991; Fig.3) exercendo seus efeitos através da ligação com 4 tipos de receptores: H1, H2, H3, os quais são expressos no tecido nervoso; e H4, expresso apenas periféricamente (Haas e Panula, 2003).

A participação do sistema histaminérgico na consolidação da memória de medo tem sido confirmada através de diversos trabalhos (Zarrindast *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2006;

Passani *et al.*, 2007). Estudos de nosso laboratório têm demonstrado que a administração intra-hipocampal de histamina ou de um agonista do receptor H<sub>2</sub>, melhora a memória por si só e reverte o déficit cognitivo ocasionado pela privação materna, na tarefa de EI (Benetti *et al.*, 2012). Além disso, a ativação desse receptor no HIP é importante para a consolidação da memória de extinção na mesma tarefa (Bonini *et al.*, 2011). Porém, os efeitos deste neuromodulador sobre os processos mnemônicos variam conforme a tarefa, a estrutura em análise e o receptor à qual se liga, sendo por isso, necessários mais estudos para investigar seu papel sobre as diferentes fases da memória.



**Figura 3** Neuromoduladores e suas projeções no SNC. As projeções encefálicas dos sistemas dopaminérgico (A), noradrenérgico (B) e histaminérgico (C) (Purves, *et al.*, 2005).

## 5.2 Justificativa

Mesmo que a memória seja importante para muitos dos aspectos positivos da experiência humana, também pode causar muitos problemas psicológicos e emocionais ao indivíduo. Memórias com forte conteúdo emocional tendem a ser armazenadas de forma mais intensa e duradoura, porém dificuldades em extinguir essas memórias é a base das desordens psiquiátricas relacionadas ao medo e à agonia.

A elucidação dos mecanismos neurofisiológicos envolvidos na extinção dessas memórias tem enorme relevância científica, pois nos permite intervir farmacológica e bioquimicamente nesse processo a fim de criarmos ferramentas que facilitem o bloqueio das memórias perturbadoras e indesejáveis. Além disso, a nível clínico, a identificação de processos-chave que desencadeiam a extinção e sua manipulação, pode auxiliar na terapêutica dessas síndromes e doenças psiquiátricas produzidas pela persistência exacerbada de lembranças desagradáveis e limitantes, tais como as fobias, a síndrome do pânico e o transtorno de estresse pós-traumático.



## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo principal**

Investigar o papel do receptor glutamatérgico NMDA e o envolvimento dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e histaminérgico, na modulação da extinção em diferentes estruturas, nas tarefas de condicionamento contextual ao medo e esquiva inibitória.

### **6.2 Objetivos secundários**

1) Verificar o papel do receptor glutamatérgico NMDA no hipocampo dorsal, núcleo basolateral da amígdala e área ventromedial do córtex pré-frontal, na extinção da memória nas tarefas de condicionamento contextual ao medo e esquiva inibitória;

2) Verificar o envolvimento do receptor D1-dopaminérgico na modulação da extinção da memória nas tarefas de condicionamento contextual ao medo e esquiva inibitória no hipocampo dorsal, núcleo basolateral da amígdala e área ventromedial do córtex pré-frontal;

3) Investigar a participação do receptor  $\beta$ -adrenérgico na modulação da extinção da memória nas tarefas de condicionamento contextual ao medo e esquiva inibitória no hipocampo dorsal, núcleo basolateral da amígdala e área ventromedial do córtex pré-frontal;

4) Investigar a participação do receptor H2-histaminérgico na modulação da extinção da memória nas tarefas de condicionamento contextual ao medo e esquiva inibitória no hipocampo dorsal, núcleo basolateral da amígdala e área ventromedial do córtex pré-frontal.

**7 ANEXO 1** - Artigo publicado na revista *Behavioral Brain Research* 232  
(2012) 210-216.

MODULATORY INFLUENCES ON EXTINCTION OF TWO DIFFERENT FEAR-MOTIVATED  
TASKS IN THREE SEPARATE BRAIN AREAS.

Natalia Gindri Fiorenza\*, Jessica Rosa\*, Jociane C. Myskiw\* and Ivan Izquierdo\*

\* Centro de Memoria, Instituto do Cerebro, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul,  
90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil and Instituto Nacional de Neurociência Translacional, Conselho  
Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil.

---

N.G.F., J.R. and J.C.M. designed and performed the experiments, I.I. helped with the design and  
wrote the paper; all authors participated in the discussion of the data.

## Abstract

Extinction consists of the learned inhibition of retrieval of previously acquired memory. Many forms of learning are modulated by  $\beta$ -noradrenergic, D1-dopaminergic and H2-histaminergic receptors on ventromedial prefrontal cortex (vmPFC), basolateral amygdala (BLA) and dorsal hippocampus. Therefore, the aim of this work was investigated the modulation of aversive memory extinction in these brain structures. Male Wistar rats were submitted to inhibitory avoidance paradigm (EI) or contextual fear conditioning (CCM). The drugs were infused through cannulae implanted into the DH, BLA or vmPFC immediately after the extinction session and their effects were evaluated 24 h later. D-serine (50  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a NMDA receptor stimulant, and SKF9188 (12.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a histamine methyl-transferase inhibitor, enhanced the consolidation of the extinction memory in EI and CCM tasks. However, AP5 (5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a NMDA-antagonist, and ranitidine (17.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a H2-histaminergic antagonist, impaired the extinction of both tasks, indicated that NMDA receptors are involved in the consolidation of extinction of both tasks, and histamine H2 receptors modulate that process in all areas studied. Noradrenaline (1  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), timolol 1  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), a  $\beta$ -adrenergic antagonist, SKF38393 (12.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ) and SCH23390 (1.5  $\mu\text{g}/\text{side}$ ), D1 agonist and antagonist receptor, respectively, also affected the extinction, but their effects varied with the task and with the site of infusion, suggesting that extinction modulation by  $\beta$ - and D1 is more complex. In conclusion, the three structures investigated are activated in the aversive memory extinction and the neuromodulatory systems act of different forms in these structures.

**Keywords:** memory, extinction, neuromodulatory systems, contextual fear conditioning.

## Introduction

Extinction consists on the learned inhibition of the expression of a previously learned response<sup>1,2</sup>. Like other forms of learning it has a definable post-training consolidation period<sup>3,4,5</sup>. It is used in the psychotherapy of learned fear, often under the name of exposure therapy<sup>6,7,8</sup>.

Most forms of learning in mammals are modulated by  $\beta$ -noradrenergic, D1-dopaminergic and H2-histaminergic receptors in hippocampus or basolateral amygdala<sup>3,4,7,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20</sup>. The aminoacid D-serine, normally produced by glial cells, modulates glutamate NMDA receptors at the glycine site and enhances local LTP and memory processes<sup>21,22,23</sup>. Its analog, D-cycloserine, has been used for years to facilitate extinction in animals and humans<sup>24</sup>. Dopamine, norepinephrine, histamine and D-serine and their receptors mentioned above are found in all these areas, and they have been suggested to play physiological roles in them<sup>25,26,27,28</sup>. The extinction of fear-motivated learning requires the hippocampus<sup>29,30</sup>, the basolateral amygdala<sup>3,31</sup>, the entorhinal cortex that interconnects both<sup>32</sup> and the vm PFC<sup>8,33,34,35,36</sup>. It can be modified by a variety of drugs given into these structures shortly before or after it is initiated, i.e. during its purported consolidation period<sup>5</sup>. The influence of modulatory systems upon extinction has been so far studied sporadically<sup>3,18</sup>.

Here we study extinction of two different but related fear-motivated tasks, inhibitory avoidance (IA)<sup>13,29,30,32</sup> and contextual fear conditioning (CFC)<sup>3,10,37,38,39</sup>, and its modulation by agonists and antagonists of the neurotransmitter systems mentioned above microinfused into the basolateral amygdala (BLA), the dorsal hippocampus (DH), and the infralimbic vmPFC of rats. Some findings suggest a differential role for the dorsal and the ventral hippocampus in contextual fear conditioning (Czerniawski et al., 2011) or of the pre- and infralimbic portions of the vmPFC in its extinction<sup>41</sup>. Here we concentrate on the BLA, the DH and the infralimbic vmPFC, and on whether there is evidence for a role of NMDA glutamate receptors in the generation of extinction of both CFC and IA in these areas, on its modulation by D-serine, and on whether D1 dopaminergic,  $\beta$ -noradrenergic and histamine H2 agonist and antagonist drugs given into these structures also modulate extinction

of the two tasks. The drugs used here were given at doses previously found to exert clear effects in the modulation of other forms of learning in rats<sup>12,18,19,20,23,29,30,32,42,43,44</sup>.

## **Material and Methods.**

**Subjects.** Male Wistar rats (2.5-3 months old/230-270 g) were used. They were purchased from the State Center for Production and Research in the Health Sciences (CREAL) of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). They were housed 5 to a cage with water and food (Purina lab pellets) ad lib., under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The procedures followed the guidelines of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Bioethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

**Surgery.** No less than 7 days after arrival to the laboratory, the animals were implanted under ketamine (König), 75 mg/Kg/xylazine (Coopers), 10 mg/Kg anesthesia with bilateral 22-g guide cannulae in the vmPFC (A -2.9, L  $\pm$ 2.0, V -5.1 mm), the pyramidal cell layer of the dorsal CA1 area of the hippocampus (A -4.3, L  $\pm$ 4.0, V -3.4 mm), or the basolateral complex of the amygdala (A -2.8, L  $\pm$ 4.7, V -9.5 mm) (Figure 1). The coordinates are from the atlas of Paxinos and Watson (1986)<sup>51</sup>.

After recovery from surgery, animals were handled once a day for 2 days and then trained in either the IA procedure or in the contextual fear conditioning procedure (CFC) between 8:00 and 11:00 a.m. as described<sup>18</sup>. Animals were trained and then extinguished in each procedure; rats were first exposed to one of the two tasks and 7 days after their extinction in that task they were exposed to the other one.

**Inhibitory Avoidance (IA).** Training in the IA task was as follows. A 50 x 25 x 25 cm plexiglass box with a 5-cm-high, 7-cm-wide and 25-cm-long formica platform on the left end of a series of 0.3-cm-caliber bronze bars spaced 1.0 cm apart that made up the floor of the box. The animals were placed on the platform facing the rear left corner of the training box. When they

stepped down and placed their four paws on the grid they received a 2-sec 0.5 mA scrambled footshock. Following this training session, 24 and 48 h later they were again placed on the platform as described, and allowed to explore the box freely without receiving a footshock when they stepped down. Step-down latency was measured in the training session and in the two extinction sessions with an automatic device. Drug and vehicle treatments were administered immediately after the first extinction session<sup>18</sup>. A cut-off point at 300 sec was introduced at the first test or extinction session as is customary in this task<sup>12,18,29,30,31</sup>.

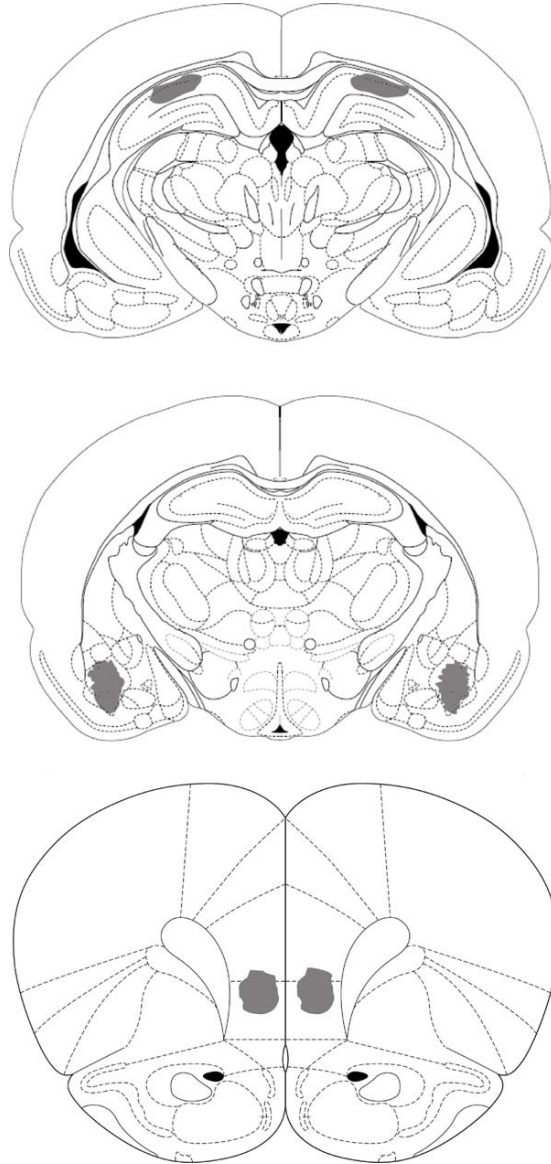
**Contextual fear conditioning (CFC).** The training apparatus was a 35 x 35 x 35 cm aluminum box with a floor similar to that of the IA apparatus. The CFC training box was within another, larger box made of soundproof walls so as to attenuate external sounds. On the training day the animals were allowed to explore the apparatus freely for 2 min, after which they received two 2-sec 0.5 mA scrambled footshocks with a 30 sec interval between them. On the next 2 days, 24 and 48 h after training, the animals were placed again in the training chamber. In all sessions, the percentage of time spent freezing (i.e., with no movement) was measured with an automatic device<sup>37</sup>. Drug and vehicle treatments were administered immediately after the first extinction session.

**Drug treatments.** The following drugs were used, at the doses stated in each case: the glutamate N-methyl-D-aspartate receptor blocker, AP5 (2-amino-5-phosphonopentanoic acid, Sigma-Aldrich), 5 µg/side; the agonist at the NMDA receptor glycine site, D-Ser (D-serine, Sigma-Aldrich), 50 µg/side; the agonist at dopamine D1 receptors, SKFd (SKF38393, Sigma-Aldrich), 12.5 µg/side; the antagonist at dopamine D1 receptors, SCH23390 (Sigma-Aldrich), 1.5 µg/side; NA (norepinephrine HCl, Sigma), 1.0 µg/side; the antagonist at β-adrenoceptors, TIM (timolol HCl, Tocris), 1.0 µg/side; the inhibitor of histamine N-methyl transferase SKFh (SKF91488, Tocris), 12.5 µg/side; and the histamine H2 receptor antagonist, Ran (ranitidine HCl, Tocris), 17.5 µg/side. The doses used had been described to have clear-cut effects on the consolidation or extinction of

avoidance behavior in rats<sup>18,19,20,23</sup>. Drugs were dissolved in 2% dimethylsulfoxide (DMSO) in water in all cases, to an infusion volume of 0.5  $\mu$ l. Control animals received 0.5  $\mu$ l of the vehicle. The infusion cannulae were fitted into the guide cannulae and infusions were carried out over 30 sec, and the infusion cannula was left in place for an additional 30 sec, so as to avoid backflow.

**Cannula placement control.** Two to 4 h after the last behavioral test the infusion sites were infused with 0.5  $\mu$ l of 4% methylene blue also at the rate of 0.5  $\mu$ l/30 sec and then, after 30 min, sacrificed by decapitation. The brains were withdrawn and placed in 10% formalina for histological determination of the diffusion of the injected dye 4 days later. Only data from animals in which this infusion was within 1.0 mm<sup>3</sup> of the intended infusion sites were used for statistical purposes.

**Statistics.** Data from CFC extinction were submitted to one-way ANOVA and comparisons between groups were by Duncan multiple range tests. Data from IA extinction were analyzed by Kruskal-Wallis ANOVA followed by individual Mann-Whitney U tests. This was because latencies in the first extinction session of this task did not follow a normal distribution .inasmuch as we introduced a 300-sec cut-off point for step-down latencies in the first extinction session<sup>12,18,19,29,30,31</sup>.



**Fig. 1** Areas reached by the infusions in DH (upper), BLA (middle) and vmPFC (lower) in planes A-4.2, -2.8 and 2.9 respectively of the atlas by Paxinos and Watson<sup>39</sup>. - See text.

## Results

The results obtained on extinction of the two tasks with the various treatments given into the dorsal hippocampus (DH), the basolateral amygdala (BLA) and the vmPFC are shown in Figures 2 3 and 4 respectively. In the CFC task there were signs of extinction within the first session of extinction: in all groups the percentage of time spent freezing decreased significantly from the first 3 to the last 3 min of permanence in the training box in that session. Freezing in the second extinction



session in that task in all groups was closer to the value of the last 3 min of the preceding session than to those of the first 3 min.

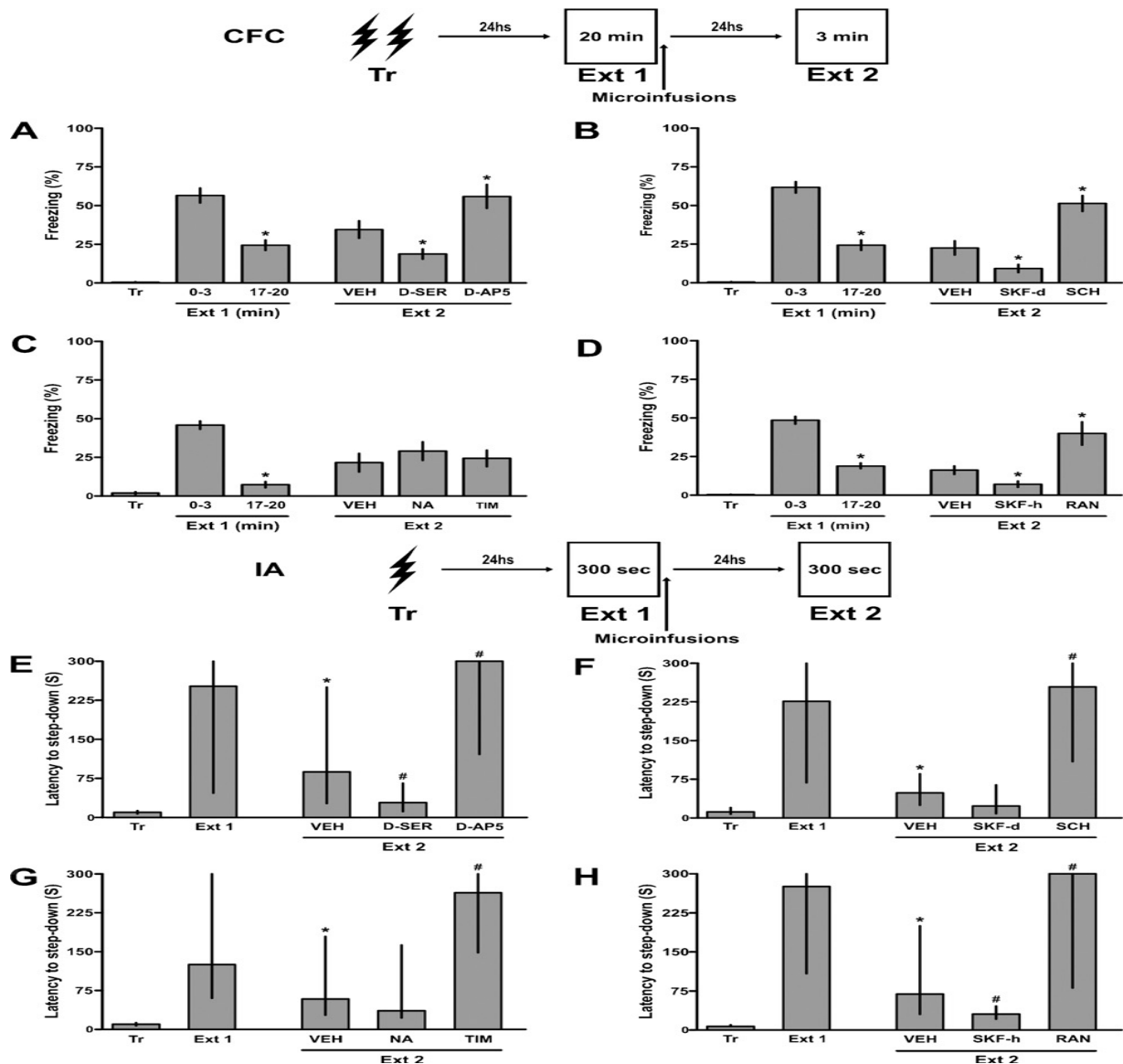
In the IA task, there was a significant decrease of step-down latency between the first and the second session of extinction in the control animals in all groups, which shows that acquisition of extinction took place also in the first session.

As can be seen, at the doses tested, AP5, D-serine, ranitidine and SKF91488 had similar effects on the two types of extinction of the two tasks in all the brain areas studied. For the other treatments, there were several task and task/brain area differences, so there were no identical overall patterns for both tasks in any of the brain areas studied.

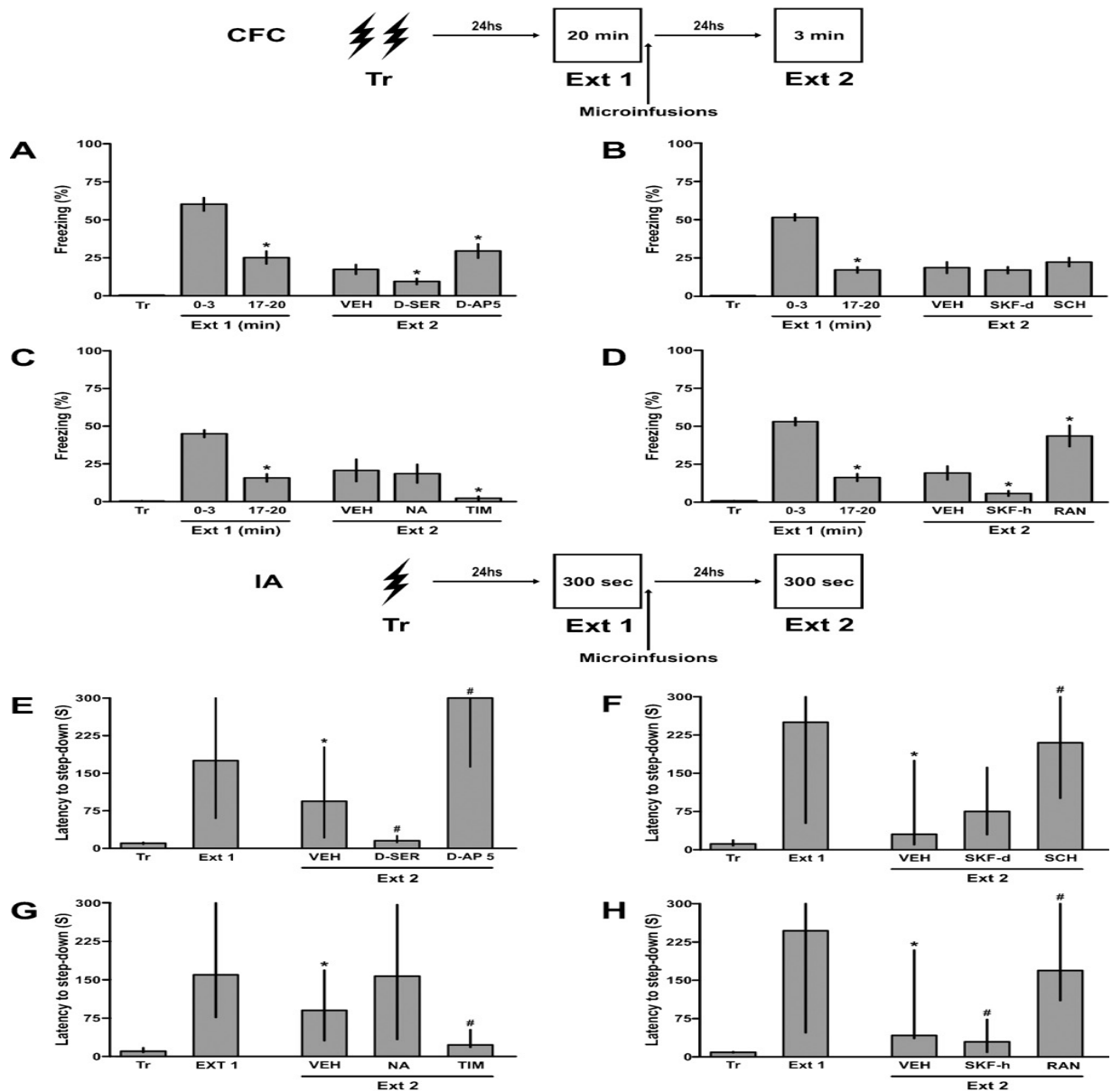
**Treatments given in the CA1 region of DH.** When given bilaterally into CA1, AP5, ranitidine and SCH23390 impaired the extinction of CFC, and that of IA was impaired in addition by timolol. Extinction of both tasks was improved by D-serine, SKF38395 and by the H2 histaminergic mimetic, SKF91488. (Figure 2).

**Treatments given into the BLA.** When given bilaterally into the BLA, SCH23390 and norepinephrine impaired extinction of the inhibitory avoidance task, and AP5 and ranitidine impaired, and D-serine, timolol and SKF91488 enhanced, extinction of the two tasks (Figure 3).

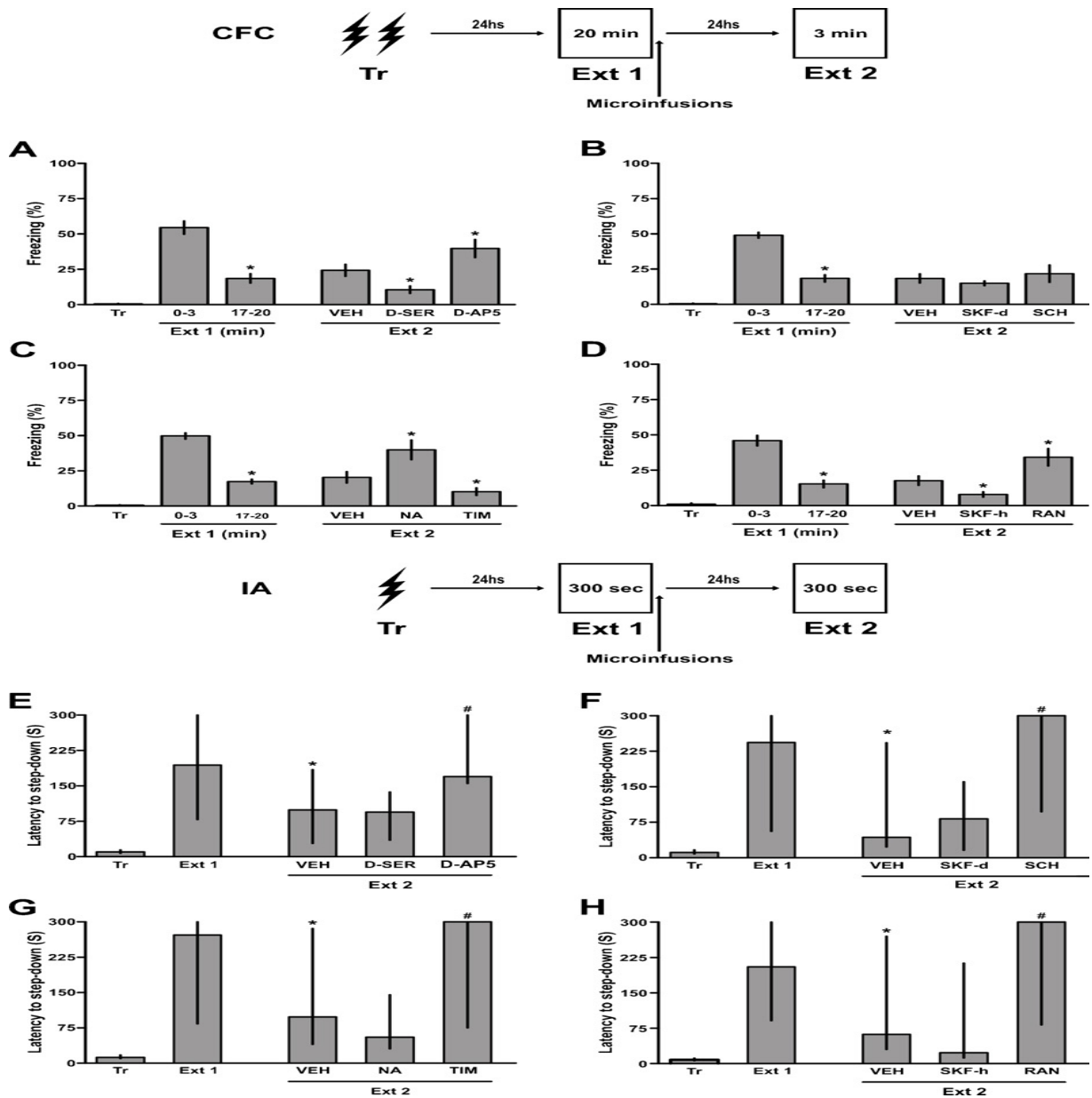
**Treatments given into the vmPFC.** When given bilaterally into the vmPFC, AP5, ranitidine and norepinephrine impaired extinction of the CFC paradigm and AP5, ranitidine, SCH23390 and timolol impaired extinction of IA. Inversely, in the CFC task, D-serine, SKF91488 and timolol enhanced extinction and in the IA task, no drug was found to enhance extinction (Figure 4).



**Fig. 2 Different modulatory system in CA1 are involved in the extinction of the contextual fear (A-D) and inhibitory avoidance memory (E-H).** In A-D, Animals were trained in a CFC task using two 0.5 mA, 2-sec scrambled footshocks 30 sec apart. Twenty four h later they were re-exposed to the CFC apparatus with no reinforcement (first extinction session). Immediately after this session, animals received bilateral microinfusions of one of the following treatments given bilaterally into CA1: AP5, dose, D-serine (D-Ser), dose, SCH 23390 (SCH); dose, ranitidine (Ran; 50mM), the dopamine D-1 receptor agonist SKF 38393 (SKF-d), dose, the histamine enhancer, SKF 91488 (SKF-h; 50mM), dimaprit (DIM), dose, noradrenaline (NA), dose, timolol (TIM), dose, or vehicle (2% DMSO in water), 0.5 microl. The animals were tested once more for extinction on the next day, at 48 h from training (second extinction session). Data presented as means  $\pm$  s.e.m., and analyzed using a one-way ANOVA followed by Duncan multiple range tests. \*, significant difference from controls at  $p < 0.05$  level; # same, at  $p < 0.01$  level. AP5, SCH and Ran impaired, and D-Ser, SKF-d and SKF-h enhanced extinction of the CFC task. The remaining treatments had no effect. **E-H:** Animals were trained in a step-down inhibitory avoidance (IA; one 0.5 mA, 2-sec, scrambled footshock). They were exposed to the apparatus with no reinforcement 24 and again 48 h after training (first and second extinction session). Immediately after the first extinction session they received the same treatments listed above. Again, AP5, Ran and SCH impaired, and D-Ser and SKF-d enhanced extinction.  $N = 10-11$  per group.



**Fig. 3** Different modulatory systems in BLA are involved in the extinction of contextual fear (A-D) and inhibitory avoidance memory (E-H). Same as Fig. 1, only that the treatments were here given bilaterally into the basolateral amygdala (BLA). A-D) Animals trained in CFC and exposed to two extinction sessions, one 24 and the other 48 h after training. Post-extinction infusions were given into the BLA following the first extinction session. AP5 and Ran hindered extinction of this task, SKF-h and timolol enhanced it, and the remaining treatments had no effect. Significant differences from controls as in Fig. 1. E-H, same, but for extinction of the IA task. IA extinction was impaired by AP5, Ran, SCH and NA, and enhanced by D-Ser and TIM; all other treatments had no effect. N= 10-11 per group.



**Fig. 4** Different modulatory systems in vmPFC are involved in the extinction of contextual fear (A-D) and inhibitory avoidance memory (E-H). Same as Figs. 1 and 2, but for treatments given into the vmPFC. **A-D:** AP5, Ran and NA impaired, and D-Ser, TIM and SKF-h enhanced CFC extinction. All other treatments had no effect. **E-H:** In the IA task, AP5, Ran, SCH and TIM impaired extinction, and the other treatments had no effect. Note the opposite effect of TIM on extinction of the two tasks. Significance levels as in Fig. 1. N= 10-11 per group.

## Discussion

The data on AP5 and D-serine suggest that glutamate NMDA receptors are important in the three areas studied for the generation of extinction, and the findings with SKF91488 and ranitidine suggest that histamine H2 receptor modulate this process in all areas. The data on SKF38393 and SCH23390 suggest that dopamine D1 receptors in CA1 modulate extinction of both tasks, and that endogenous dopamine acting at D1 receptors may be involved in the onset of extinction of IA. The findings are less clear in relation to the influence of  $\beta$ -noradrenergic receptors: these seem to play no role in the modulation of the extinction of CFC in CA1, to inhibit CFC extinction in the BLA and vmPFC and IA extinction in the BLA, but to facilitate IA extinction in vmPFC. The possible role of  $\beta$ -noradrenergic receptors in extinction in the BLA was reported as enhancing by Belau and McGaugh (2006)<sup>3</sup>, and deserves further study in relation to endogenous brain and blood NA levels, which vary along with the sensitivity to the drug across tasks and species. Histaminergic neurons are all in one restricted region of the brain, from where their axons project to many different areas, including those studied here. Dopaminergic and noradrenergic neurons are somewhat more dispersed<sup>45</sup>. These are possible anatomic reasons why histaminergic modulation of extinction is more homogeneous than catecholaminergic modulation: one message to the infundibulomammillary histaminergic neuron conglomerate somehow informing that extinction has just begun or is about to begin would suffice to turn all neurons there on; whereas several messages should be needed for catecholaminergic neurons, and these messages would not necessarily be equal.

The effects of AP5 and D-serine on extinction suggest a key role of glutamate NMDA receptors in all three structures in the consolidation of both forms of extinction, by analogy of what has been postulated for many other forms of learning<sup>42,46</sup>; the activation of NMDA receptors is taken as the hallmark and as the necessary initial step of memory formation. Further, in agreement with previous suggestions from the literature<sup>5,31,42</sup>, extinction depends on the concomitant activation of hippocampus, amygdala and vmPFC, with no clear indication as to which of the three structures

leads the process<sup>5</sup>. This fits with the concept of multiple sites for memory consolidation in general<sup>47,48</sup>, and specifically as postulated for the consolidation of extinction learning by Gabriele and Packard (2006)<sup>49</sup>.

The various differences observed among treatment/infusion site combinations and/or between tasks strongly suggest a specificity of the modulatory influence of dopaminergic and noradrenergic systems in each region depending on the task. The extinction enhancing effects of the dopamine D1 receptor agonist, SKF38393 and the depressant effect on extinction of the D1 antagonist, SCH23390 when given into the hippocampus (Fig. 2) but not elsewhere (Figs. 1 and 3), is consistent with data in the literature on other forms of extinction obtained with systemic injections of SCH23390<sup>50</sup> and might indicate a general regulatory mechanism of extinction by dopamine D1 receptors in CA1.

It is probably pointless at this stage to discuss in detail the various mechanistic possibilities, including the eventual discrepancy with one or other result in the literature<sup>3</sup> on CFC extinction enhancement by 1.0µg of NA given into the right but not left BLA ). Differences in rat strain or task sensitivity to drugs are common, and the main point here is not whether one particular treatment had an effect here or there. The main points of the present article are that the drugs tested did have effects, and that some of these effects were similar and others were different across sites or tasks. The present results do suggest modulation of the extinction process of the two tasks by specific actions of the drugs tested on the DH, the BLA and the vmPFC. This suggests that pharmacological treatments and perhaps psychotherapy<sup>6,7</sup>, which presumably should influence brain modulatory systems inasmuch as its effects are to an extent mimicked by drugs acting on these systems, may influence exposure treatments differentially depending on the nature of the memory being extinguished and the brain systems recruited in each case. There clearly is not just *one* brain system for extinction and just *one or a few* systems involved in the modulation of that type of learning, and often the same system(s) may act differently on the modulation of extinction of different tasks, as attested by the present findings.

**Acknowledgements.** This work was supported by grants and fellowships from the National Research Council of Brazil to the four authors.

## References

1. Pavlov IP (1927) Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Oxford University Press*, London.
2. Rescorla RA (2001) Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 27:115-124.
3. Berlau DJ, McGaugh JL (2006) Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem.* 86:123-132.
4. Hikind N, Maroun M (2008) Microinfusion of the D1 receptor antagonist, SCH23390 into the IL but not the BLA impairs consolidation of extinction of auditory fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem.* 90:217-222.
5. Bevilaqua LR, Cammarota M, Medina JH, Izquierdo I. Extinction of fear conditioning: relevance of recent findings for the treatment of post-traumatic stress disorder. In: *N Scher, J Vilens (ed.), Posttraumatic stress disorder*, Nova, New York, 2010.
6. Beckett WS (2002) Post-traumatic stress disorder. *New Eng J Med* 346:130-132.
7. Rothbaum BO. (2008) Critical parameters for D-cycloserine enhancement of cognitive-behavioral therapy for obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry.* 165(3):293-6.
8. Milad MR, Quirk GJ (2012) Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol.* 63:129-51.
9. Gasbarri A, Sulli A, Innocenzi R, Pacitti C, Brioni JD (1996) .Spatial memory impairment induced by lesion of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. *Neuroscience* 74:1037-44.

10. Fernández-Espejo E (2003) Prefrontocortical dopamine loss in rats delays long-term extinction of contextual cpnditioned fear, and reduces social interaction without affecting short-term social interaction memory. *Neuropsychopharmacol.* 28:490-498.
11. Akirav I, Segev A, Montanis H, Maroun M (2009) D-cycloserine into the BLA reverses the impairing effects of exposure to stress on the extinction of contextual fear, but not conditioned taste aversion. *Learn Mem.* 16 :682-686.
12. Da Silva WC, Bonini JS, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M. (2006) Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. *Neurobiol Learn Mem* 86: 100-106.
13. Dubrovina NI, Zinovéva DV (2010) Effects of activation and blockade of dopamine receptors on the extinction of a passive avoidance reaction in mice with a depressive-like state. *Neurosci Behav Physiol.* 40 :55-59.
14. Janak PH, Corbit LH (2010) Deepened extinction following compound stimulus presentation : noradrenergic modulation. *Learn Mem.* 18 :1-10.
15. Gong YX, Shou WT, Feng B, Zhang WP, Wang HJ, et al. (2010) Ameliorating effect of histamine on impairment of cued fear extinction induced by morphine withdrawal in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Acta Pharmacol Sin.* 31 :1431-1437.
16. Holahan MR, Clarke MJ, Hines DD (2010) Dopamine-mediated MK-801-induced elevation in food-based extinction responding in rats and associated changes in region-specific phosphorylated ERK. *Psychopharmacol.* 212 :393-403.
17. Debiec J, Ledoux JE, Nader R (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron.* 36:527-531.
18. Bonini JS, Da Silva WC, Da Silveira CK, Köhler CA, Izquierdo I, Cammarota M. (2011) Histamine facilitates consolidation of fear extinction. *Int J Neuropsychopharmacol.* 14 :1209-1217.



19. Benetti F, Silveira CK, Silva WC, Cammarota M, Izquierdo I (2012) Histamine reverses a memory deficit induced in rats by early postnatal maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem.* 97:54-58.
20. De Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Scalco FS, Roesler R, Garcia VA, Schröder N.(2011). Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 95(3):305-10.
21. Mothet JP, Rouaud E, Sinet PM, Potier B, Jouvenceau A, et al. (2006) A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5:267-274.
22. Kelamangath L, Seymour CM, Wagner JJ (2009) D-serine facilitates the effects of extinction to reduce cocaine-primed reinstatement of drug-seeking behavior. *Neurobiol Learn Mem.* 92 :544-551.
23. Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232-236.
24. Myers KM, Davis M (2007) Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiat.* 12 :120-150.
25. Vezina P, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP (1994) Blockade of D1 dopamine receptors in the medial prefrontal cortex produces delayed effects on pre- and postsynaptic indices of dopamine function in the nucleus accumbens. *Synapse.* 16:104-112.
26. Boyce PJ, Finlay JM (2009) Extracellular dopamine and norepinephrine in the developing rat prefrontal cortex : transient effects of early partial loss of dopamine. *Brains Res Bull.* 79 :104-110.
27. Yanai K, Ryu JH, Watanabe T, Iwata R, Ido T, et al. (1995) Histamine H1 receptor occupancy in human brains after single oral doses of histamine H1 antagonists measured by positron emission tomography. *Br J Pharmacol.* 116 :1649-1655.

28. Nishikawa T (2011) Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 879 :3169-3183.
29. Vianna MRM, Szapiro G, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Nat Acad Sci USA.* 98:12251-12254.
30. Szapiro G, Vianna MR, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2003) The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus.* 13 :53-58.
31. Vianna MR, Coitinho AS, Izquierdo I (2004) Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning. *Curr Neurovasc Res.* 1:55-60.
32. Bevilaqua LR, Bonini JS, rossato JI, Izquierdo LA, Cammarota M, Izquierdo I (2006) The entorhinal cortex plays a role in extinction. *Neurobiol Learn Mem.* 85:192-197.
33. Santini E, Muller RU, Quirk GJ (2001) Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci.* 21:9009-9017.
34. Akirav I, Maroun M (2007) The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast.* 2007:30873. Epub 2007 Jan 16.
35. Laurent V, Westbrook RF (2008) Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. *Learn Mem.* 15:657-666.
36. Mueller D, Porter JT, Quirk GJ (2008) Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *J Neurosci.* 28:369-375.
37. Alvares LO, Genro BP, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA (2008) Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neurosci.* 154 :1648-1655.

38. Do Monte FH, Kincheski GC, Pavesi E, Sordi R, Assreuy J, Carobrez AP (2010) Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 94 :318-328.
39. Debiec J, Bush DE, LeDoux JE (2011) Noradrenergic enhancement of reconsolidation in the amygdala impairs extinction of conditioned fear in rats- a possible mechanism for the persistence of traumatic memories in PTSD. *Depress Anxiety.* 28 :186-193 .
40. Czerniawski J, Ree F, Chia C, Otto T (2011) Dorsal versus ventral hippocampal contributions to trace and contextual conditioning: Differential effects of regionally selective nmda receptor antagonism on acquisition and expression. *Hippocampus* [Epub ahead of print].
41. Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 36:529-538.
42. Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. *Trends in Neurosci* 29:496-505.
43. Myskiw JC, Fiorenza NG, Izquierdo LA, Izquierdo I (2010) Molecular mechanisms in the hippocampus and amygdala but not in posterior parietal or cingulate cortex are involved in extinction. *Neurobiol Learn Mem* 94:285-91.
44. Matsuda S, Matsuzawa D, Nakazawa K, Sutoh C, Ohtsuka H, et al. (2010) D-serine enhances extinction of auditory cued fear conditioning via ERK1/2 phosphorylation in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:895-902.
45. Izquierdo I, Cammarota M, Medina JH, Bevilaqua LR (2004) Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: a general view. *Neural Plast* 11:159-189.
46. Kandel ER, Squire LR (2000) Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science.* 290:1113-1120.

47. Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Medina JH (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amígdala, medial septum and hippocampus of the rat. *Behav Neur Biol.* 58:16-26.
48. Brioni JD (1993) Nicotinic receptor agonist facilitate retention of avoidanca training: participation of dopaminergic mechanisms. *Behav Neural Biol.* 59:57-62.
49. Gabriele A, Packard MG (2006) Evidence of a role for multiple memory systems in behavioral extinction. *Neurobiol Learn Mem.* 85:289-299.
50. Fricks-Gleason AN, Khalaj AJ, Marshall JF (2012) Dopamine D1 receptor antagonism impairs extinction of cocaine-cue memories. *Behav Brain Res.* 226:357-360.
51. Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. *San Diego: Academic Press.*

## 8 CONCLUSÕES

1) A extinção da memória requer a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA no HIP, BLA e vmPFC nas tarefas de condicionamento contextual ao medo e esquiva inibitória;

2) O receptor D1-dopaminérgico modula a extinção da memória de condicionamento contextual ao medo apenas no HIP, enquanto participa da modulação da memória de esquiva inibitória no HIP, BLA e vmPFC.

3) O receptor  $\beta$ -adrenérgico modula a extinção da memória de condicionamento contextual ao medo na BLA e vmPFC, enquanto apresenta efeitos distintos sobre a extinção da memória de esquiva inibitória no HIP, BLA e vmPFC.

4) O receptor H2-histaminérgico modula a extinção da memória tanto no condicionamento contextual ao medo, quanto na esquiva inibitória no HIP, BLA e vmPFC.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggleton JP. The amygdala. Oxford: Oxford UP vol 2; 2000.
- Anden *et al.*, 1964
- Baddeley AD. Memória Humana. Teoria e Prática. Mc. Graw Hill Editora Madrid; 1999.
- Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y. The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. **Eur J Neurosci** 2003; 17: 1527-30.
- Barros DM, Mello e Souza T, De David T, Choi H, Aguzzoli A, Madche C, Ardenghi P, Medina JH, Izquierdo I. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1° and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behav Brain Res** 2001; 124: 1-7.
- Benetti F, da Silveira CK, da Silva, WC, Cammarota M, Izquierdo I. Histamine reverses a memory defici induced in rats by early postnatal maternal deprivation. **Neurobiol Learn Mem** 2012; 97: 54-8.
- Berlau DJ, McGaugh JL. Enhacement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. **Neurobiol Learn Mem** 2006; 86: 123-32.
- Berleze DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA. Tima-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiol Learn Mem** 2005; 83: 48-53.
- Bevilaqua L, Ardenghi P, Schröder N, Bromberg E, Schmitz PK, Schaeffer E, Quevedo J, Bianchin M, Walz R, Medina JH, Izquierdo I. Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signaling pathway modulate memory

consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdale. **Behav Pharmacol** 1997; 8: 331-8.

Bevilaqua LR, Bonini JS, Rossato JI, Izquierdo LA, Cammarota M, Izquierdo I. The entorhinal cortex plays a role in extinction. **Neurobiol Learn Mem** 2006; 85: 192-7.

Bonini JS, Sa Silva WC, Da Silveira CK, Köhler CA, Izquierdo I, Cammarota M. Histamine facilitates consolidation of fear extinction. **Int J Neuropsychopharmacol** 2011; 14: 1209-17.

Bouret S, Sara SJ. Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function. **Trends Neurosci** 2005; 28: 574-82.

Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. **Prog Neurobiol** 2001; 63: 637-72.

Cain CK, Blouin AM, Barad M. adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. **Learn Mem** 2004; 11: 179-87.

Cahill L, Babinsky R, Markowitsch HJ, McGaugh JL. The amygdala and emotional memory. **Nature** 1995; 377: 295-6.

Cahill L, McGaugh JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends Neurosci** 1998; 21: 294-9.

Cahill L. Neurobiological mechanisms of emotionally influenced, long-term memory. **Prog Brain Research** 2000; 126: 29-37.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Rossato JI, Ramirez M, Medina JH, Izquierdo I. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. **Neurobiol Learn Mem** 2005; 84: 25-32.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I. The extinction of conditioned fear: structural and molecular basis and therapeutic use. **Rev Bras Psiquiatr** 2007; 29: 80-5.

Carlson NR. *Physiology of Behavior*. Allyn and Bacon, sixth edition, 1998.

Da Silva WC, Bonini JS, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiol Learn Mem** 2006; 86: 100-6.

Davis M, Ressler K, Rothbaum BO, Richardson R. Effects of D-cycloserine on extinction: translation from preclinical to clinical work. **Biol Psychiatry** 2006; 60: 369-75.

Dubrovina NI, Zinov'eva DV. Effects of activation and blockade of dopamine receptors on the extinction of a passive avoidance reaction in mice with a depressive-like state. **Neurosc Behav Physiol** 2010; 40: 55-9.

Falls WA, Miserendino MJ, Davis M. Extinction on fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. **J Neurosci** 1992; 12: 854-63.

Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. **Journal of Neuroscience** 1999; 19: 5119-23.

Gallagher M, Kapp BS, Musty RE, Driscoll PA. Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdala. **Science** 1977; 198: 423-5.

Gold PE, Van Buskirk R. Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. **Behavioral Biology** 1978; 23: 509-20.

Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. **Nat Rev Neurosci** 2003; 4: 121-30.

Hamann SB, Ely TD, Grafton ST, Kilts CD. Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. **Nature Neuroscience** 1999; 2: 289-93.

Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K. The presence of free D-serine in rat brain. **FEBS Lett** 1992; 296: 33-6.



Hatfield T, Mcgaugh JL. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. **Neurobiology of Learning and Memory** 1999; 71: 232–9.

Haycock JW, Van Buskirk R, Ryan JR, Mcgaugh JL. Enhancement of retention with centrally administered catecholamines. **Experimental Neurology** 1977; 54: 199-208.

Henneberger C, Bard L, Rusakov DA. D-serine: a key to synaptic plasticity? **Int J Biochem Cell Biol** 2012; 44: 587-90.

Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. **Nature** 2010; 463: 232-6.

Hikind N, Maroun M. Microinfusion of the D1 receptor antagonist, SCH23390 into the IL but not the BLA impairs consolidation of extinction of auditory fear conditioning. **Neurobiol Learn Mem** 2008; 90: 217-22.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. Memory-related neural systems in alzheimer's disease: an anatomic study. **Neurology** 1990; 40: 1721-30.

Hori K, Tanaka J, Nomura M. Effects of discrimination learning on the rat amygdala dopamine release: a microdialysis study. **Brain Research** 1993, 621: 296-300.

Izquierdo I, Wyrwicka W, Sierra G, Segundo JP. Établissement de reflexes conditionnés de trace pendant le sommeil naturel chez le chat. **Actual Neurophysiol** 1965, 6: 277-96.

Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behav Neur Biol** 1992; 58: 16–25.

Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanutta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH. Sequential involvement of the hippocampus and amygdala, the entorhinal cortex, and the

posterior parietal cortex in memory formation and retrieval. **Eur J Neurosc** 1997; 9: 786–793.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. **Nature** 1998; 393: 635-6.

Izquierdo I, McGaugh JL. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav Pharmacol** 2000; 11(7-8): 517-34.

Izquierdo I. Memória. **Artmed Editora S.A.**, 2002; 95p.

Kaplan GB, Moore KA. The use of cognitive enhancers in animal models of fear extinction. **Pharmacol Biochem Behav** 2011; 99(2): 217-28.

Kawahara H, Yoshida M, Yokoo H, Nishi M, Tanaka M. Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. **Neuroscience Letters** 1993; 162: 81-4.

Kety SS. Toward hypotheses for a biochemical component in the vulnerability to schizophrenia. **Semin Psychiatry** 1972; 4: 233-83.

Lalumiere RT, Nguyen LT, McGaugh JL. Post-training intrabasolateral amygdale infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. **Eur J Neurosci** 2004; 20: 2804-10.

Lee JL, Milton AL, Everitt BJ. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. **J Neurosci** 2006; 26: 10051-6.

Lu KT, Walker DL, Davis M. Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. **J Neurosci** 2001; 21: 1–5.

Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behav Brain Res** 2008; 88: 261-74.

McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. **Science** 1966; 153: 1351-8.

McGaugh JL. Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. **Brain Res Bull** 1989; 23: 339-45.

McGaugh JL. Memory – A century of consolidation. **Science** 2000; 287: 248-51.

McIntyre CK, McGaugh JL, Williams CL. Interaction brain systems modulate memory consolidation. **Neurosci Biobehav Rev** 2011; *Epub ahead of print*.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature** 1986; 319: 774-6.

Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO Jr, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. **PNAS** 2000; 97: 4926-31.

Mueller D, Cahill SP. Noradrenergic modulation of extinction learning and exposure therapy. **Behav Brain Res** 2010; 208: 1-11.

Myers KM, Davis M. Mechanisms of fear extinction. **Mol.Psychiat** 2007; 12: 120-50.

Myskiw JC, Fiorenza NG, Izquierdo LA, Izquierdo I. Molecular mechanisms in hippocampus and basolateral amygdala but not in parietal or cingulate cortex are involved in extinction of one-trial avoidance learning. **Neurobiol Learn Mem** 2011; 94: 285-91.

Nieuwenhuis ILC, Takashima A. The role of ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation. **Behav Brain Res** 2011; 218: 325-34.

Öngür D, Price JL. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cerebral Cortex** 2000; 10(3): 206–19.

Pape HC, Pare D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiol Rev** 2010; 90: 419-63.

Passani MB, Giannoni P, Bucherelli C, Baldi E, Blandina P. Histamine in the brain: beyond sleep and memory. **Biochem Pharmacol** 2007; 73: 1113-22.

Pavlov IP. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. London, Oxford University Press; 1927.

Pavlov IP. *Conditioned Reflexes*. New York, Dover; 1956.

Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learn Mem** 2009; 16: 279–88.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM. *Neurociências*. **Artmed Editora S.A.**, 2º ed, 2005; 728p.

Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Pare D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. **J Neurosci** 2003; 23: 8800–7.

Quirk GJ, Beer JS. Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. **Cur Opin Neurobiol** 2006; 16: 723–7.

Quirk GJ, Garcia F, Gonzalez L. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. **Biol Psychiatry** 2006; 60: 337-43.

Quirk GJ, Mueller D. Neural Mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacol** 2008; 33: 56-72.

Rescorla RA. Experimental extinction. In: *Handbook of contemporary learning theories* (Mowrer RR, Klein S, eds), pp119-154; 2001.

Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behav Brain Res** 2003; 140: 1-47.

Roesler R, Schröder N, Vianna MRM, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MBC. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in

contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. **Brain Res** 2003; 975: 207-13.

Roesler R, Reolon GK, Luft T, Martins MR, Schröder N, Vianna MRM, Quevedo J. NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. **Neurochem Res** 2005; 30: 1407-11.

Roosendaal B, Castello NA, Vedana G, Barsegyan A, McGaugh JL. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory** 2008; 90: 573-9.

Santini E, Ge H, Ren K, Peña de Ortiz S, Quirk GJ. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. **J Neurosci** 2004; 24: 5704-10.

Sara SJ, Segal M. Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: implications for cognition. **Prog Brain Research** 1991; 88: 571-85.

Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. **PNAS** 1995; 92: 3948-52.

Sores-Bayon F, Cain CK, LeDoux JE. Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. **Biol Psychiatry** 2006; 60: 329-36.

Szapiro G, Vianna MRM, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. **Hippocampus** 2003; 13: 53-8.

Tanaka T, Yokoo H, Mizoguchi K, Yoshida M, Tsuda A, Tanaka M. Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebral microdialysis. **Brain Research** 1991; 544: 174-6.

Tomaz C, Edith Frank J. Lateralized impairment of the emotional enhancement of verbal memory in patients with amygdala-hippocampus lesion. **Brain Cognition** 2003; 52:v223-30.

Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse** 2004; 51: 32–58.

Vianna MR, Szapiro G, Mcgaugh JL, Medina JH, Izquierdo I. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **PNAS** 2001; 98: 12251-4.

Vianna MR, Muller-Igaz L, Coitinho A, Medina JH, Izquierdo I. Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. **Neurobiol Learn Mem** 2003; 79: 199-203.

Vianna MR, Coitinho AS, Izquierdo I. Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning. **Curr Neurovasc Res** 2004; 1: 55-60.

Wada H, Inagaki N, Itowi N, Yamatodani A. Histaminergic neuron system in the brain: distribution and possible functions. **Brain Res Bul** 1991; 27: 367-70.

Walker DL, Ressler KJ, Lu KT, Davis M. Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusion of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. **J Neurosci** 2002; 22: 2343-51.

Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. **PNAS** 2003; 100: 15194-9.

Zarrindast MR, Ahmadi R, Oryan S, Parivar K, Haeri-Rohani A. Effects of alphaadrenoceptor agonists and antagonists on histamine-induced impairment of memory retention of passive avoidance learning in rats. **Eur J Pharmacol** 2002; 454: 193-8.