UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**“Participação do sistema histaminérgico em estruturas límbicas sobre
a memória de esquia inibitória em camundongos”**

LUCAS CANTO DE SOUZA

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Psicobiologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Participação do sistema histaminérgico em estruturas límbicas sobre a
memória de esquia inibitória em camundongos**

LUCAS CANTO DE SOUZA

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Psicobiologia.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Mattioli

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Canto de Souza, Lucas

Participação do sistema histaminérgico em estruturas límbicas sobre a memória de esquiva inibitória em camundongos

122p. : il. ; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Mattioli, Rosana

1.amídala. 2. córtex pré-frontal medial. 3. esquiva inibitória. 4. hipocampo dorsal. 5. Histamina. 6. memória emocional. 7. RT-PCR

Dedico este trabalho aos meus amores Daniela e Arthur

AGRADECIMENTOS

À professora Dr.a Rosana Mattioli, por ter me orientado nesses últimos dez anos, pela sua dedicação, paciência e pela amizade;

Aos professores da banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho;

Aos professores Patrizio Blandina e Beatrice Passani, por me proporcionarem uma rica experiência em seu laboratório da **Università degli Studi di Firenze**;

Às amigas formadas durante o estágio na Itália, Gustavo Provensi, Hayato Umehara e Roberta Fabbri;

Aos professores Dr.a Raquel Vecchio Fornari, Dr. Silvio Morato de Carvalho e Dr. Marcus Lira Brandão, que participaram do exame de qualificação, pela leitura crítica e sugestões que muito contribuíram para aprimorar este trabalho.

Aos meus pais, Ricardo e Azair, pela educação, amor, amizade, pelos conselhos e inúmeras conversas;

À Daniela, minha companheira, amiga, conselheira, pelas sugestões, carinho e muita paciência;

Às técnicas do laboratório de farmacologia da FCFar/UNESP, Rosana F.P. Silva e Elisabete Z.P. Lepera, pela alegria, amizade, prontidão e competência em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado por tudo!

À Paula Bianchi, pela ajuda na condução do RT-PCR;

Aos meus irmãos, Felipe e Marina, pela amizade e carinho;

Ao meu primo, amigo e especialista em memória, Rimenez Rodrigues de Souza, por colaborar nas discussões deste trabalho;

Aos amigos do laboratório de Neurociências, Kelly, Carol, Fernanda, Carlos e Bruna;

À Teresa pela ajuda técnica que é de extrema importância no laboratório;

Aos amigos do LPA e aos amigos da psicobiologia;

À Renata Vicentini, por sempre ter me ajudado com as minhas dúvidas sobre as normas do programa e pela amizade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo;

À Comissão organizadora pela Menção Honrosa obtida na “X REUNIÃO ANUAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA e VIII REUNIÃO ANUAL DO INeC”, promovida pelo Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, nos dias 16 e 17 de setembro de 2015.

Aos auxílios fornecidos pela CAPES/PROEX durante esse período;

Ao auxílio fornecido pelo CNPq (160893/2011-9) durante o primeiro mês de doutorado;

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, processo No 2011/19472-4, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho, e pela Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior-BEPE (No 2012/05838-0) fornecida no período 01/09/2012 à 31/08/2013.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

“Sabemos de forma geral quais sistemas no encéfalo são importantes para os diferentes tipos de memória, porém não sabemos onde os vários componentes necessários para o armazenamento da memória estão de fato localizados e como interagem.”

Larry Squire e Eric Kandel, 2003

Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
Introdução.....	12
Memória.....	12
Sistema histaminérgico	19
Objetivos.....	25
Experimento 1: Envolvimento da amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial na consolidação da memória emocional	25
Experimento 2: Participação da neurotransmissão histaminérgica, presente na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial, na modulação da memória emocional.....	25
Ética.....	26
Experimento 1: Envolvimento da amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial na consolidação da memória emocional	27
Material e método.....	27
Sujeitos.....	27
Droga.....	27
Cirurgia e microinjeção.....	28
Teste de esQUIVA inibitória do tipo “step-down”	29
Caixa de “step-down”.....	29
Teste de esQUIVA	30
Histologia.....	30
Análise estatística.....	31
Resultados.....	31
Infusão de anisomicina na amígdala: estímulo aversivo moderado.....	32
Infusão de anisomicina na amígdala: estímulo aversivo intenso	33
Infusão de anisomicina no hipocampo dorsal: estímulo aversivo moderado	34
Infusão de anisomicina no hipocampo dorsal: estímulo aversivo intenso	34
Infusão de anisomicina no córtex pré-frontal medial: estímulo aversivo moderado ..	35
Infusão de anisomicina no córtex pré-frontal medial: estímulo aversivo intenso	36
Discussão	37
Experimento 2: Participação da neurotransmissão histaminérgica, presente na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial, na modulação da memória emocional ..	44

Sujeitos.....	44
Teste de esQUIVA inibit6ria	45
Rea76o de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR).....	45
Dissec76o das 6reas encef6licas	45
Extra76o do RNA total	46
Determina76o da concentra76o do RNA total	47
Transcri76o reversa de RNA	47
Ensaio inventariados da TaqMan® (TaqMan® Gene Expression Inventoried Assay).....	47
RT-PCR.....	48
An6lise dos resultados	48
An6lise estatística	49
Resultados.....	50
Resultados comportamentais	50
An6lise da express6o do gene HDC (histidina descarboxilase) na am6dala, hipocampo dorsal e c6rtex pr6-frontal medial de camundongos	51
An6lise da express6o do gene Hrh1 na am6dala, hipocampo dorsal e c6rtex pr6-frontal medial de camundongos.....	53
An6lise da express6o do gene Hrh2 na am6dala, hipocampo dorsal e c6rtex pr6-frontal medial de camundongos.....	56
An6lise da express6o do gene Hrh3 na am6dala, hipocampo dorsal e c6rtex pr6-frontal medial de camundongos.....	58
Discuss6o	64
Conclus6es.....	73
Refer6ncias bibliogr6ficas	74
Anexo.....	101

RESUMO

CANTO-DE-SOUZA, L. **Participação do sistema histaminérgico em estruturas límbicas sobre a memória de esQUIVA inibitória em camundongos**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Vários estudos utilizando modelos animais têm demonstrado que estruturas límbicas como amígdala (AMD), hipocampo dorsal (HD) e córtex pré-frontal medial (CPFm) participam na consolidação da memória associada às emoções. Considerando que a síntese de novas proteínas é necessária para o processo de consolidação de memórias, e que a combinação entre o uso de inibidores de síntese proteica e diferentes intensidades de estímulo incondicionado têm gerado respostas comportamentais distintas com relação à consolidação da memória emocional, o presente trabalho se propôs a investigar a hipótese de a consolidação da memória aversiva na AMD, no HD e no CPFm, associada a síntese proteica, ocorre de maneira diferenciada nessas três estruturas, de acordo com a intensidade do estímulo aversivo, bem como se a expressão de genes envolvidos na transmissão histaminérgica seria modificada ao longo das fases da memória emocional aversiva. O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da síntese proteica na AMD, HD e CPFm no processo de consolidação de uma memória aversiva baseada em condicionamento aversivo moderado ou intenso; investigar a expressão de genes ligados a transmissão histaminérgica na AMD, HD e CPFm após o condicionamento aversivo intenso. Para este fim dois experimentos foram realizados: No experimento 1 a anisomicina (ANI) foi microinjetada bilateralmente na AMD ou HD ou CPFm de camundongos antes de serem submetidos a tarefa de esQUIVA inibitória do tipo “step-down” utilizando duas intensidades de estímulo incondicionado: moderada ou intensa. No experimento 2, as variações da expressão dos genes da enzima HDC (histidina descarboxilase – responsável pela síntese de histamina) e dos receptores H1, H2 e H3 foram analisadas em diferentes espaços temporais através da reação de polimerase em cadeia em tempo real. Os resultados do experimento 1 demonstram que microinjeção de ANI no CPFm prejudica a consolidação da memória de esQUIVA inibitória com estímulo incondicionado moderado ou intenso, porém quando administrada intra-AMD e intra-HD, a ANI só prejudica a consolidação da memória de esQUIVA inibitória com estímulo incondicionado intenso. No experimento 2 demonstra que durante a consolidação da memória aversiva intensa há diminuição nos níveis de expressão dos genes: HDC no HD, Hrh3 na AMD, Hrh1 e Hrh3 no CPFm. Já na fase de evocação, na AMD há aumento e diminuição na expressão dos genes HDC e Hrh3, respectivamente; no HD há aumento na expressão dos genes Hrh2 e Hrh3 e no CPFm há aumento na expressão do gene HDC e diminuição nos genes Hrh1 e Hrh3. Durante a reconsolidação há diminuição na expressão dos genes HDC e Hrh3 e aumento do gene Hrh1 na AMD. No DH há aumento com relação ao gene Hrh1, e no CPFm há aumento do gene HDC e diminuição na expressão dos genes Hrh1 e Hrh3. No presente estudo conclui-se que em situações com moderado grau de aversividade, a consolidação dessa experiência não dependerá de síntese proteica na AMD e no HD, mas sim no CPFm. No entanto, em situações com elevado grau de aversividade, a síntese proteica na AMD, HD e CPFm é essencial para a consolidação de tal experiência. Além disso, os genes HDC, Hrh1, Hrh2 e Hrh3 se expressam distintamente na AMD, HD e CPFm ao longo da escala temporal da consolidação, evocação e reconsolidação da formação de memórias de medo.

Palavras-chave: amígdala, córtex pré-frontal medial, esquiva inibitória, hipocampo dorsal, histamina, memória emocional, RT-PCR.

ABSTRACT

CANTO-DE-SOUZA, L. **Involvement of histaminergic system in limbic structures on the memory of inhibitory avoidance in mice.** 2015. 122 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Several studies using animal models have shown that limbic structures like the amygdala (AMG), dorsal hippocampus (DH) and medial prefrontal cortex (mPFC) are involved in emotional memory consolidation. Whereas the synthesis of new proteins is necessary for memory consolidation process, and that opposite results related to the interaction of protein synthesis inhibitors and foot-shock intensity on memory consolidation have been reported, the present study aims to investigate the hypothesis of protein synthesis in AMG, the DH and mPFC associated with the consolidation of aversive memory occurs differently in these three structures, according to the intensity of the aversive stimulus and the expression of proteins involved in histaminergic transmission would be modified during the process of consolidation and emotional expression of aversive memory. The aim of this study was to evaluate the role of protein synthesis in AMG, DH and mPFC in consolidation of aversive memory based on moderate and intense conditioning; to investigate the expression of proteins related to histaminergic transmission in AMG, DH and mPFC after intense aversive conditioning. For this purpose two experiments were performed: in experiment 1 the anisomycin (ANI) was bilaterally microinjected into AMG or DH or mPFC of mice before being submitted the step-down inhibitory avoidance task using two unconditioned stimulus intensities: moderate or intense. In experiment 2, the variations in the gene expression of HDC enzyme (histidine decarboxylase - responsible for histamine synthesis) and the H1, H2 and H3 receptors were analyzed at different temporal spaces by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The results of the first experiment demonstrate that microinjection of ANI in mPFC impairs the consolidation of inhibitory avoidance memory with moderate or intense unconditioned stimulus, however when administered intra-AMG and intra DH, ANI only impairs the consolidation of inhibitory avoidance memory under an intensive unconditioned stimulus. The experiment 2 demonstrates that during the consolidation of intense aversive memory there is a decrease of the genes expression levels: HDC in the dorsal hippocampus, Hrh3, Hrh1 in the amygdala, and Hrh3 in the medial prefrontal cortex. During retrieval the HDC and Hrh3 genes expression levels are increased and decreased, respectively in the AMG; the Hrh2 and Hrh3 genes expression levels are increased in the DH, and in the mPFC the HDC gene expression level is increased, and the Hrh1 and Hrh3 are decreased. During reconsolidation the amygdala's HDC and Hrh3 genes expression levels are decreased and the Hrh1 gene is increased. In the DH the Hrh1 gene levels are elevated and in the mPFC the HDC gene expression level is increased and the Hrh1 and Hrh3 are decreased. In the current study we conclude that under moderate aversiveness situations, the consolidation of this experience does not depend on protein synthesis in the AMG and in the DH, but in the mPFC. However, in situations with a high level of adversity, protein synthesis in this three structures are essential for the consolidation of such experience. In addition, the histaminergic genes are distinctly expressed in the AMG, DH and mPFC along the time scale of consolidation, retrieval and reconsolidation of the formation of fear memories.

Keywords: amygdala, dorsal hippocampus, emotional memory, histamine, inhibitory avoidance, medial prefrontal cortex, RT-PCR.

Introdução

Memória

Desde a antiguidade o homem procura desvendar os segredos envolvidos na memória. Apesar do conceito sobre a memória já existir há milhares de anos, os primeiros estudos sistemáticos sobre este tema foram realizados no final do século 19 pelo filósofo alemão Hermann Ebbinghaus (Lewis; Haviland-Jones e Barrett, 2008). Ebbinghaus foi responsável por desenvolver a “Curva de Retenção de Ebbinghaus”, que consistia na tarefa de memorizar uma lista de sílabas sem sentido. Assim, ele demonstrou que quanto maior o tempo dedicado em aprender a informação nova, mais a retemos (Corrêa, 2010). Os avanços nos estudos sobre esse tema conduziram para um atual consenso no meio científico de que a memória é fundamental para a nossa identidade como indivíduos, e para a infinidade de maneiras em que usamos a nossa experiência do passado para interpretar e agir de acordo com a nossa experiência presente (Curran e Mintzer, 2006).

A palavra "memória" é em si um termo abrangente que inclui diferentes sistemas, funções e/ou processos (Curran e Mintzer, 2006). Sendo assim, em relação ao tempo/duração ela pode ser classificada em memórias de curto e longo prazo. A primeira, também conhecida como memória de trabalho, nos permite manipular e armazenar temporariamente uma informação (Baddeley, 2000), podendo esta ser espacial e verbal. A segunda pode ser classificada como memória implícita (também

chamada de não declarativa ou de procedimentos) ou explícita (declarativa) (Graf e Schacter, 1985; Kandel; Dudai e Mayford, 2014).

A memória implícita é uma forma inconsciente de memória adquirida durante a aprendizagem de habilidades motoras e durante os condicionamentos clássico e operante. Por outro lado, a forma consciente da memória que armazena informações sobre fatos e eventos, pessoas, lugares, objetos, é denominada como explícita (Kandel; Dudai e Mayford, 2014). Esta pode ainda ser classificada em episódica e semântica. A memória episódica nos permite adquirir e recuperar experiências pessoais nos contextos em que eles aconteceram e com isso nos permite “viajar mentalmente” no tempo através de nossa autobiografia mental. A memória semântica se refere ao nosso conhecimento geral sobre o mundo, incluindo conceitos, vocabulário e fatos (Tulving, 2002; Curran e Mintzer, 2006).

Estudos clínicos e em animais têm fornecido evidências de que memórias associadas a eventos emocionais tendem a ser mais facilmente recordadas (Christianson, 1992). Experiências pessoais agradáveis (o dia do aniversário, nascimento de um filho, casamento) e desagradáveis (acidente automobilístico, perda de um ente querido, uma tragédia mundial como os atentados de 11 de setembro de 2001) tendem a levar a formação de memórias mais duradouras. Estudos desenvolvidos com intuito de investigar esse assunto demonstraram que as pessoas costumam recordar com certa precisão de onde estavam e o que estavam fazendo no momento em que presenciaram um terremoto (Neisser et al., 1996) ou testemunharam um acidente (Bohannon, 1988). Ratos e camundongos também são capazes de lembrar em qual contexto estavam quando foram surpreendidos por um estímulo aversivo, como um choque elétrico nas patas (Vazdarjanova e McGaugh, 1998; Ledoux, 2000; McGaugh, 2000; Li e McNally, 2014).

A memória de longo prazo pode ser dividida em diferentes fases, incluindo aquisição, consolidação e evocação (Mcgaugh, 1966; Abel e Lattal, 2001). A evocação de uma determinada memória pode dar início a outras duas fases: reconsolidação e extinção (Nader; Schafe e Ledoux, 2000; Nader, 2003; Baldi e Bucherelli, 2015).

Essas diferentes fases da memória podem ser inferidas nos animais devido a alterações comportamentais que estes apresentam após passarem por uma tarefa que envolva aprendizagem (Abel e Lattal, 2001). Por exemplo, muitos dos estudos presentes na literatura envolvem a avaliação de uma tarefa de aprendizagem associada ao medo condicionado ao contexto, no qual um estímulo condicionado neutro (tom, luz ou odor) é apresentado imediatamente antes de um estímulo incondicionado (choque nas patas) (Abel e Lattal, 2001; Baldi e Bucherelli, 2015). Nesse sentido, a fase de aquisição da memória ocorre quando o animal aprende a associação entre o contexto e o choque.

Logo após a aquisição inicia-se a consolidação. Esta pode durar minutos a dias, e sofre uma transição de um estado lábil para um fixo. Durante o período de consolidação, para que a informação recém-aprendida durante a fase de aquisição seja transformada em modificações estáveis, é necessário que ocorra síntese proteica (Nakayama et al., 2013). A evocação ocorre quando o animal retorna ao mesmo contexto onde houve o pareamento com o estímulo aversivo (Abel e Lattal, 2001).

Na reconsolidação, a memória de medo recuperada transitoriamente retorna a um estado lábil e necessita de um novo ciclo de consolidação para ser preservada (Baldi e Bucherelli, 2015). Foi proposto que a reconsolidação permite a integração de novas informações no traço mnemônico original, permitindo assim a atualização da memória, culminado no fortalecimento ou enfraquecimento da mesma (Alberini, 2005; Alberini e Ledoux, 2013). Por outro lado, se durante a fase da evocação, sucessivas reexposições ao estímulo condicionado forem feitas na ausência do estímulo incondicionado, o

processo de extinção é desencadeado, resultando na redução da expressão da resposta condicionada ao medo. É importante ressaltar que a extinção não modifica a memória original, mas induz a formação de uma nova associação do contexto na ausência do estímulo incondicionado. Nesse sentido, a extinção implica em novas aprendizagens (Baldi e Bucherelli, 2015).

Uma das estratégias utilizadas para investigação de processos mnemônicos envolve o uso de diferentes ferramentas farmacológicas como bloqueadores de canais de sódio dependentes de voltagem (lidocaína e tetrodotoxina) (Tehovnik e Sommer, 1997; Choudhary et al., 2003; Quiroz et al., 2003; Noack; Murau e Engelmann, 2015) e inibidores de síntese proteica como a cicloheximida (Diaz-Trujillo et al., 2009) e anisomicina (ANI) (Rosenblum; Meiri e Dudai, 1993; Bourtchouladze et al., 1998; Nader; Schafe e Le Doux, 2000; Naghdi; Majlessi e Bozorgmehr, 2003; Lattal e Abel, 2004; Bekinschtein et al., 2007; Canal; Chang e Gold, 2007; Cai et al., 2012; Nakayama et al., 2013).

A ANI é uma substância, que foi isolada de colônias da bactéria *Streptomyces griseolus*, que ao se ligar a maior subunidade dos ribossomos eucarióticos, bloqueia a ação da enzima peptidiltransferase (Barbacid e Vazquez, 1974) culminado na inibição da síntese proteica, e consequente amnésia, uma vez que a consolidação de memórias de longo prazo depende da síntese de novas proteínas (Wanisch e Wotjak, 2008).

Com base em sua atividade inibitória sobre a síntese proteica, a ANI tem sido amplamente empregada na investigação da participação de estruturas encefálicas em tarefas de aprendizagem aversiva, como a esQUIVA inibitória do tipo step-down (Vianna et al., 2001; Cammarota et al., 2004; Canal; Chang e Gold, 2007; Canal e Gold, 2007; Monleon Verdu et al., 2008; Qi e Gold, 2009).

A esquiva inibitória do tipo step-down envolve uma tarefa de aprendizagem motivada pelo medo, em que roedores devem associar a descida de uma plataforma a um estímulo incondicionado aversivo, como um choque elétrico nas patas (Fig. 3) (Gold, 1986). Em consequência, os animais desenvolvem uma resposta condicionada, que consiste em evitar descer da plataforma (Vianna et al., 2001). Embora a resposta comportamental ligada a aprendizagem da esquiva inibitória seja geralmente consistente na maioria dos estudos utilizando este modelo, a combinação entre inibidores de síntese proteica e diferentes intensidades de estímulo incondicionado tem produzido resultados discrepantes em relação a consolidação da memória em animais submetidos a este teste. Neste sentido, alguns autores demonstraram que ratos apresentaram prejuízo na consolidação da memória induzida por inibidores de síntese proteica somente quando submetidos ao protocolo de condicionamento com intensidade moderada (e não elevada) de choque nas patas (Diaz-Trujillo et al., 2009; Gonzalez-Salinas et al., 2015), enquanto que Gold e Wrenn (2012) descreveram que camundongos apresentaram amnésia induzida por inibidores de síntese proteica somente quando a intensidade do choque nas patas foi elevada.

A participação de estruturas límbicas em processos de consolidação e evocação de memórias emocionais do tipo esquiva inibitória tem sido relatada por diversos estudos (Fanselow, 1994; Taubenfeld et al., 1999; Ledoux, 2000; McGaugh, 2004; Canal e Gold, 2007; Zhang; Fukushima e Kida, 2011). Décadas de pesquisas tem demonstrado que a amígdala é um importante sítio para a aquisição, armazenamento e expressão de memórias aversivas (Fanselow, 1994; Ledoux, 2000; McGaugh, 2004; Wilensky et al., 2006; Ehrlich et al., 2009; Ledoux, 2012).

Essa estrutura, que possui um formato de amêndoa, está localizada na porção ântero-medial de cada lobo temporal e é formada por um complexo de núcleos que se

distinguem anatomicamente e funcionalmente, incluindo o lateral (LA) e o basal (BA) (que juntos formam o complexo basolateral - BLA), e o central (CEA) (Krettek e Price, 1978; Ehrlich et al., 2009; Herry e Johansen, 2014). Este último pode ainda ser dividido em porções lateral (CEl) e medial (CEm) (McDonald, 1982). Os núcleos BLA e CEA da amígdala estão distintamente envolvidos nos processos que envolvem o medo condicionado (Maren, 2003; Orsini e Maren, 2012).

O complexo BLA, juntamente com outras vias aferentes corticais e subcorticais, participa no processamento de experiências emocionais que envolvam ansiedade, medo, estresse e raiva (Rogan e Ledoux, 1996). Já o núcleo CEA está envolvido na origem da memória aversiva (Zimmerman e Maren, 2010; Orsini e Maren, 2012), no processamento da associação entre os estímulos condicionados e incondicionados e na plasticidade envolvida no medo condicionado (Maren, 2008). Os neurônios provenientes deste núcleo se projetam para estruturas como o hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (Davis; Rainnie e Cassell, 1994; Sah e Lopez De Armentia, 2003). Além disso, a amígdala é capaz de modular as memórias adquiridas após experiências emocionais em outras áreas do cérebro como o córtex e o hipocampo (Roozendaal e McGaugh, 1997; Roozendaal et al., 1999; Kim et al., 2001; Pare, 2003; McGaugh, 2004; Herry e Johansen, 2014).

A atribuição ao hipocampo como sendo uma estrutura encefálica fundamental no processamento das memórias não é recente (Turner, 1969). Há diversas evidências de que o hipocampo participa no processamento das memórias avaliadas em testes comportamentais que apresentem componentes espaciais, como no labirinto aquático de Morris (Dunbar et al., 1993), no labirinto radial (Nelson; Bawa e Finger, 1992), na tarefa de reconhecimento de objetos (Soule et al., 2008), e também no medo condicionado ao

contexto, como na esQUIVA inibitória (Phillips e Ledoux, 1992; Kim;Rison e Fanselow, 1993; Logue;Paylor e Wehner, 1997; Taubenfeld et al., 1999; Matus-Amat et al., 2004).

Em roedores, o hipocampo está estruturalmente dividido em várias sub-regiões, dentre elas o giro denteado, no qual está presente a *fascia dentata* e o *Hilus*, e o *cornu ammonis*. A região do *cornu ammonis* é dividida em CA1, CA2 e CA3 (Miki et al., 2005). Ainda considera-se que essa estrutura possa ser dividida em porção dorsal (HD) e ventral (HV), onde o HD estaria envolvido principalmente nos processos cognitivos da aprendizagem e memória associada à navegação, exploração e locomoção, enquanto que o HV estaria associado com o comportamento motivacional e emocional (Moser e Moser, 1998; Fanselow e Dong, 2010).

Embora o hipocampo também seja relacionado à aquisição e evocação de memórias (Abel e Lattal, 2001; Fanselow e Dong, 2010), especial atenção é dada às implicações do HD sobre a etapa de consolidação. Nesse sentido, estudos demonstraram que, quando o bloqueio da síntese proteica nessa estrutura ocorre imediatamente após o período de treino, a consolidação da memória da tarefa de esQUIVA inibitória é prejudicada (Taubenfeld et al., 1999; Canal e Gold, 2007).

Outra estrutura encefálica que possui importante participação na regulação ou modulação de memórias aversivas é o córtex pré-frontal medial (CPFm) (Frankland et al., 2004; Santini et al., 2004; Zhao et al., 2005; Quirk;Garcia e Gonzalez-Lima, 2006; Zhang;Fukushima e Kida, 2011). Esta estrutura faz parte do córtex pré-frontal (CPF) que nos roedores é anatomicamente e funcionalmente dividido em CPFm e córtex orbito-frontal (Uylings;Groenewegen e Kolb, 2003; Moghaddam e Homayoun, 2008). O CPFm pode ainda ser subdivido em infra-límbico (IL), pré-límbico (PrL), e córtex cingulado anterior (Krettek e Price, 1977).

Evidências sugerem que comportamentos relacionados ao aumento ou a diminuição da expressão do medo são regulados respectivamente pelo PrL e IL (Sotres-Bayon; Cain e Ledoux, 2006; Quirk e Mueller, 2008; Sotres-Bayon e Quirk, 2010; Sierra-Mercado; Padilla-Coreano e Quirk, 2011; Courtin et al., 2013). Em um estudo realizado por Corcoran e Quirk (2007) os autores demonstraram que a inativação da área PrL do CPFm prejudica a evocação (mas não a aquisição) da memória de medo aprendido no dia anterior. Por outro lado, o IL participa da consolidação da extinção do medo condicionado, mas não da evocação desse tipo de memória (Do-Monte et al., 2015). Além disso, a formação da memória de esQUIVA inibitória depende de “genes de expressão imediata” (do termo em inglês: immediate-early genes - IEGs) presentes no CPFm, sugerindo que essa estrutura é essencial para a formação desse tipo de memória (Zhang; Fukushima e Kida, 2011). Outros estudos tem enfatizado o papel dessa estrutura cortical na consolidação de memórias em diversas tarefas, como por exemplo, em tarefas em que é feito o pareamento de uma recompensa (alimento) com um determinado odor (Tronel e Sara, 2003). Resumindo, há diversas evidências de que o CPFm possui importante papel sobre os diferentes estágios da memória avaliados numa ampla gama de tarefas (Euston; Gruber e McNaughton, 2012).

Sistema histaminérgico

Os neurônios que sintetizam e liberam histamina estão exclusivamente localizados no núcleo tuberomamilar do hipotálamo posterior (Fig. 1) (Haas e Panula, 2003). Este núcleo recebe majoritariamente aferências provenientes de áreas límbicas como área pré-óptica do hipotálamo, septo, córtex pré-frontal, subículo e tegumento dorsal (Wada et al., 1991), enquanto projeta eferências difusas para diversas áreas do

sistema nervoso central, como medula espinal, tronco cerebral, tálamo, hipotálamo, núcleos da base, septo, bulbo olfatório, amígdala, hipocampo e córtex (Wada et al., 1991).

Figura 1: O sistema histaminérgico no encéfalo humano: origem e projeções. Modificado de Haas e Panula (2003).

Sintetizada a partir da descarboxilação oxidativa do aminoácido histidina, através da enzima histidina-decarboxilase (HDC) (Fig. 2), a molécula de histamina é então armazenada em vesículas sinápticas e liberada na fenda sináptica de maneira cálcio-dependente. No meio extracelular, esse neurotransmissor é metabolizado em tele-metilhistamina pela enzima histamina metiltransferase. A tele-metilhistamina é degradada pela ação da monoamina oxidase em ácido t-metil-imidazolacético (Haas e Panula, 2003; Haas; Sergeeva e Selbach, 2008).

Figura: Síntese e metabolização da histamina. Modificado de Haas e Panula (2003).

Estudos farmacológicos, de imuno-histoquímica e de genética molecular realizados em roedores estabeleceram a existência de quatro tipos de receptores histaminérgicos. Os receptores H_1 e H_2 são pós-sinápticos, enquanto o receptor H_3 é pré-sináptico. Este último tem características de auto/hetero-receptor, regulando a síntese e liberação de histamina neural e de outros neurotransmissores, como acetilcolina, norepinefrina, dopamina, serotonina, glutamato e GABA (ácido gama-aminobutírico) (Esbenshade et al., 2008; Haas; Sergeeva e Selbach, 2008; Panula e Nuutinen, 2013). O receptor H_4 está relacionado ao sistema imunológico e recentemente tem sido verificado a sua presença em várias regiões do SNC de humanos e ratos (Connelly et al., 2009; Strakhova et al., 2009; Karlstedt; Jin e Panula, 2013), embora sua atividade no SNC seja pouco conhecida.

Todos os receptores histaminérgicos conhecidos são do tipo metabotrópico acoplado a proteína G e diferem entre si com relação à farmacologia, localização e os processos de transdução celular (Haas e Panula, 2003). Os receptores H_1 estão localizados no córtex, hipocampo, amígdala, hipotálamo, tálamo, corpo estriado e no cerebelo (Lintunen et al., 1998). A estimulação destes receptores ativa a enzima fosfolipase C que resulta na formação dos segundos mensageiros 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG) promovendo aumento dos níveis de cálcio

intracelular. A ativação de receptores H_1 também induz a produção de mensageiros retrógrados, como ácido araquidônico e óxido nítrico (Brown;Stevens e Haas, 2001; Haas e Panula, 2003; Haas;Sergeeva e Selbach, 2008; Panula e Nuutinen, 2013).

Os receptores H_2 estão presentes nos núcleos da base, amígdala, hipocampo, córtex e cerebelo. A estimulação deste receptor ativa a adenilato ciclase que induz aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), o qual, por sua vez, ativa a proteína cinase A (PKA) resultando na transcrição de genes e tradução de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) em proteínas (Brown;Stevens e Haas, 2001; Haas e Panula, 2003; Haas;Sergeeva e Selbach, 2008; Panula e Nuutinen, 2013). Já os receptores H_3 são encontrados nos dendritos e terminais dos neurônios localizados no núcleo acumbente, núcleo estriado, substância negra, hipocampo, amígdala, córtex e cerebelo. A estimulação desses receptores leva a inibição da ativação do adenilato ciclase e consequente diminuição da produção do segundo mensageiro AMPC (Brown;Stevens e Haas, 2001; Haas e Panula, 2003; Haas;Sergeeva e Selbach, 2008; Panula e Nuutinen, 2013).

Devido a sua ampla distribuição no sistema nervoso central, a neurotransmissão histaminérgica está envolvida em várias funções cerebrais. Dentre elas estão o ritmo circadiano e sono, mecanismos homeostáticos (equilíbrio hídrico, ingestão alimentar, regulação da temperatura, controle cardiovascular), percepção da dor, estresse, ansiedade, e na aprendizagem e memória (Brown;Stevens e Haas, 2001; Haas e Panula, 2003). Esta influência do sistema histaminérgico na modulação da aprendizagem e memória foi demonstrada por alguns autores através de intervenções farmacológicas ou lesões do núcleo tuberomamilar (Netto e Izquierdo, 1985; Klapdor;Hasenohrl e Huston, 1994; Onodera et al., 1994) e de outras regiões encefálicas como amígdala, hipocampo e cerebelo (Da Silva et al., 2006; Passani et al., 2007; Alvarez e Alvarez, 2008; Serafim et

al., 2010; Gianlorenco et al., 2012; Serafim et al., 2012; Costa et al., 2013; Serafim et al., 2013; Gianlorenco et al., 2014; Canto-De-Souza et al., 2015).

Um aspecto instigante da histamina é que ela pode apresentar tanto efeitos inibitórios quanto facilitatórios na aprendizagem e memória. Por exemplo, o bloqueio crônico da enzima sintetizadora da histamina induz tanto a facilitação como a inibição da aquisição da esQUIVA ativa em ratos (Cacabelos e Alvarez, 1991; Kamei;Okumura e Tasaka, 1993). Em peixes, a administração i.p. de clorfeniramina (CPA), um antagonista do receptor H_1 , acelera o processo de recuperação funcional após lesão vestibular, (Piratello e Mattioli, 2004) e facilita a aprendizagem com reforço positivo, melhorando a consolidação da memória de longa duração (Spieler et al., 1999). Porém, este mesmo antagonista prejudica a recuperação funcional após a ablação telencefálica (Garção et al., 2009). De Almeida e Izquierdo (1986) demonstraram o efeito facilitador da histamina sobre a memória emocional, após injeção intracerebroventricular em ratos no teste de esQUIVA ativa. Já camundongos tratados com L-histidina (i.p.), precursor da histamina, antes do teste ou antes do reteste ao labirinto em cruz elevado, apresentaram déficit na evocação da memória emocional dependente de estado (Serafim et al., 2010; Gianlorenço;Canto-De-Souza e Mattioli, 2011). Aparentemente estas evidências divergentes podem ser explicadas devido ao uso de diferentes espécies de animais como também de diferentes modelos utilizados na avaliação da aprendizagem e memória (Brown;Stevens e Haas, 2001).

Diversos estudos utilizando modelos animais que permitem a investigação do envolvimento de memórias aversivas têm demonstrado que estruturas límbicas como amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial participam da consolidação da memória associada às emoções. Considerando que a síntese de novas proteínas é necessária para o processo de consolidação de memórias, e que a combinação entre o

uso de inibidores de síntese proteica e diferentes intensidades de estímulo incondicionado têm gerado respostas comportamentais distintas com relação à consolidação da memória emocional, o presente trabalho se propõe a investigar a hipótese de a síntese proteica na AMD, no HD e no CPFm associada a consolidação da memória aversiva ocorre de maneira diferenciada nessas três estruturas, de acordo com a intensidade do estímulo aversivo, bem como a expressão de genes envolvidos na transmissão histaminérgica seria modificada ao longo do processo de consolidação e expressão da memória emocional aversiva.

Objetivos

Conforme as hipóteses levantadas acima, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da síntese proteica na AMD, HD e CPFm no processo de consolidação de uma memória aversiva baseada em condicionamento moderado e intenso; investigar a expressão de genes ligados a transmissão histaminérgica na AMD, HD e CPFm após o condicionamento aversivo intenso.

Para este fim dois experimentos foram realizados:

Experimento 1: Envolvimento da amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial na consolidação da memória emocional

Neste experimento a anisomicina foi microinjetada bilateralmente na AMD ou HD ou CPFm de camundongos antes de serem submetidos a tarefa de esquiva inibitória do tipo “step-down” utilizando duas intensidades de estímulo incondicionado: moderada ou intensa.

Experimento 2: Participação da neurotransmissão histaminérgica, presente na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial, na modulação da memória emocional

Neste experimento as variações da expressão dos genes da enzima HDC (histidina descarboxilase – responsável pela síntese de histamina) e dos receptores H₁, H₂ e H₃ foram analisadas em diferentes espaços temporais através da reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR).

Ética

Os experimentos realizados para elaboração desta Tese foram conduzidos seguindo os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar (processo 040/2011).

Experimento 1: Envolvimento da amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial na consolidação da memória emocional

Material e método

Sujeitos

Foram utilizados camundongos machos (Suíço-Albino), pesando entre 27 e 37 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram agrupados em cinco por caixa (31×20×13 cm), mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo claro escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 e apagadas às 19:00 horas) com intensidade luminosa de aproximadamente 100 Lux e livre acesso ao alimento e água (exceto durante os testes comportamentais). Todos os animais eram experimentalmente ingênuos, e os testes comportamentais foram realizados na fase clara do ciclo (11:00 – 15:00 h).

Droga

A anisomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi dissolvida e diluída em solução estéril de salina 0,9% acrescentada de HCl 1M. O pH foi ajustado para próximo de 7 através da adição de NaOH 1M (ANI, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). A solução utilizada para preparar a ANI foi usada como controle experimental (veículo). As substâncias foram codificadas e seus códigos eram desconhecidos pelo experimentador no momento dos testes e análise comportamental. A dose de ANI utilizada foi baseada no estudo de Wanisch e Wotjak (2008) que demonstraram que essa dose bloqueia a síntese proteica neural, permitindo assim, uma abordagem sobre a contribuição da síntese de proteínas

para os aspectos temporais e regionais da consolidação da memória. Os autores também demonstraram que seus efeitos são observados por até 9 h após a injeção.

Cirurgia e microinjeção

Após serem anestesiados (i.p.) com uma solução de cloridrato de cetamina (100mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), os animais passaram por um procedimento cirúrgico para a implantação intracraniana de duas cânulas-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento direcionadas a AMD, HD e CPFm. As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico (JET resina e líquido polimerizante). A implantação das cânulas-guia foi realizada utilizando um equipamento estereotáxico (Insight EFF-333 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) seguindo as coordenadas definidas pelo atlas de Paxinos e Franklin (2004) (AMD: AP -1,4; L $\pm$ 2,7; V -2,0; HD: AP -1,8; L $\pm$ 1,6; V -1,0; mPFC: AP +1,7; L $\pm$ 0,35; V -2,0). Ao término da fixação das cânulas-guia, mandris foram inseridos dentro das mesmas, para evitar obstrução e reduzir a contaminação, e estes foram removidos durante o procedimento de injeção. Após a cirurgia os animais foram tratados por via intramuscular com analgésico com atividade antiinflamatória, a flunixinina meglumina (Banamine: 2,5 mg/Kg). Um período de 4-5 dias de recuperação foi aguardado antes do início dos testes comportamentais.

Uma hora antes do treino, agulhas de injeção com 8mm de comprimento (33-gauge) foram inseridas dentro das cânulas-guia para a injeção de soluções na AMD, HD e CPFm. As agulhas foram previamente conectadas, por meio de tubos de polietileno (PE-10), a microseringas Hamilton (5 μ l). Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar bilateralmente 0,5 μ l de solução durante um período de 60 s. O procedimento de microinjeção consistiu na

remoção dos mandris, inserção das agulhas de injeção, infusão das soluções por 60 s, permanência das agulhas de injeção por 90 s após o término das injeções e reinserção dos mandris enquanto o animal era contido manualmente pelo examinador. O movimento de uma pequena bolha de ar nos tubos de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmaram o fluxo da solução.

Teste de esquiiva inibitória do tipo “step-down”

Caixa de “step-down”

Uma caixa de acrílico de 23 x 23 x 24 cm (comprimento x profundidade x altura) com a parte frontal feita de acrílico transparente foi utilizada. O assoalho do aparelho foi constituído por barras paralelas de aço inoxidável, com 3 mm de diâmetro e afastadas 1 cm umas das outras. A intensidade luminosa no centro da caixa era de 280 lux. Uma plataforma feita de madeira (22,5 x 5 x 3 cm) e revestida por uma lâmina de plástico estava posicionada no canto direito da caixa (Fig. 3). O aparato foi conectado a um computador que permitia ao experimentador ter controle sobre a intensidade do choque elétrico ao qual cada animal foi submetido. O registro dos comportamentos foi feito por uma câmera posicionada a frente do aparato e acoplada a um computador que possuía um software para captura e armazenamento de vídeos (GeoVision GV-600 System).

Figura 3: Caixa de esquiva inibitória do tipo “step-down”.

Teste de esquiva

Os experimentos foram realizados em dois dias consecutivos, o treino e o teste. No treino, cada animal foi colocado sobre a plataforma. Ao descer da plataforma com as quatro patas, o animal recebeu choque nas patas de intensidade moderada (0,5 mA - 10 s) ou intensa (1,5 mA - 2 s). A latência (medida em segundos) de descida da plataforma foi registrada.

No dia do teste, 24 horas após o treino, os animais foram novamente colocados individualmente sobre a plataforma e a latência de descida foi registrada. Durante o teste, não foram aplicados choques nas patas. Entre a exposição de cada animal durante os treinos e testes o aparato foi limpo com solução de álcool a 5%.

Histologia

Após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados (i.p.) com uma solução de cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e em seguida foram submetidos a uma microinjeção bilateral de 0,5 µl de uma solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o procedimento descrito para a microinjeção de drogas. Na sequência, os sujeitos passaram pelos procedimentos de deslocamento cervical e

decapitação para remoção do encéfalo, que posteriormente foi seccionado coronalmente para verificação dos sítios de injeção de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2004).

Análise estatística

Uma vez que foi imposto um limite máximo de 180 segundos para as latências de descida no dia de teste e esta variável não seguiu uma distribuição normal e nem cumpriu a suposição de homocedasticidade, os dados foram analisados através de testes estatísticos não-paramétricos (*Mann-Whitney U e Wilcoxon Matched Pairs*). Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

Resultados

A análise histológica confirmou que no total 101 camundongos apresentaram canulação bilateral positiva na AMD ou HD ou CPFm (Fig. 4). Os animais que não tiveram confirmados os sítios de injeção bilateralmente foram excluídos do estudo. Neste sentido, o número amostral para cada grupo foi:

- **Choque moderado (0,5 mA – 10 s):**
 - ✓ AMD: veículo (n=7) e ANI (n=6)
 - ✓ HD: veículo (n=7) e ANI (n=8)
 - ✓ CPFm: veículo (n=9) e ANI (n=8)

- **Choque intenso (1,5 mA – 2 s):**
 - ✓ AMD: veículo (n=10) e ANI (n=10)
 - ✓ HD: veículo (n=11) e ANI (n=9)
 - ✓ CPFm: veículo (n=8) e ANI (n=8)

Figura 4: Representação esquemática dos sítios de microinjeção no CPFm, AMD e HD de camundongos (adaptado do Atlas Paxinos e Franklin, 2004). As secções estão entre +1,78 e -1,94 mm a partir do bregma.

Infusão de anisomicina na amígdala: estímulo aversivo moderado

A Figura 5A representa os efeitos do veículo e da anisomicina injetada na AMD. Em ambos os grupos não foi observada diferença significativa com relação às latências de descida da plataforma durante a sessão de treino (Mann–Whitney U test, $p > 0,05$). No entanto, os animais dos dois grupos apresentaram aumento na latência de descida no dia

do teste (Wilcoxon Matched Pairs test, $p \leq 0,05$), caracterizando que estes animais foram capazes de se lembrar da experiência aversiva e que a ANI não prejudicou a consolidação da memória aversiva moderada.

Infusão de anisomicina na amígdala: estímulo aversivo intenso

Não houve diferença significativa entre os dois grupos (Fig. 5B), com relação às latências de descida da plataforma durante o treino (Mann–Whitney U test, $p > 0,05$). No entanto, diferença significativa entre treino e teste foi observada somente no grupo controle (Wilcoxon Matched Pairs test, $p \leq 0,05$). A administração de ANI na AMD prejudicou a consolidação da experiência aversiva intensa (Wilcoxon Matched Pairs test, $p > 0,05$).

Figura 5: Microinjeção de anisomicina (ANI) na amígdala de camundongos submetidos ao teste de esquiva inibitória do tipo “step-down”. (A) Choque moderado. (B) Choque intenso. As barras representam as médias (+ EPM) da latência de descida da plataforma, $n = 6-10$. Estatística não-paramétrica * $p \leq 0,05$ vs. Treino do seu respectivo grupo (Wilcoxon Matched Pairs Test). ANI= anisomicina; AMD= amígdala.

Infusão de anisomicina no hipocampo dorsal: estímulo aversivo moderado

As latências de descida da plataforma dos animais tratados com veículo ou ANI estão representadas na Figura 6A. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação às latências de descida da plataforma durante a sessão de treino (Mann–Whitney U test, $p > 0,05$). No entanto, houve diferenças nas latências de descida no dia do teste em relação ao dia do treino (Wilcoxon Matched Pairs test, $p \leq 0,05$). Nesse sentido, os animais de ambos os grupos foram capazes de se lembrar da experiência aversiva, e a ANI não prejudicou a consolidação da memória aversiva moderada.

Infusão de anisomicina no hipocampo dorsal: estímulo aversivo intenso

A Figura 6B representa os efeitos da ANI microinjetada no HD. Durante o treino não foi observada diferença significativa entre os grupos com relação às latências de descida da plataforma (Mann–Whitney U test, $p > 0,05$). No entanto, diferença significativa entre treino e teste foi observada somente no grupo controle (Wilcoxon Matched Pairs test, $p \leq 0,05$). A administração de ANI no HD prejudicou a consolidação da experiência aversiva intensa (Wilcoxon Matched Pairs test, $p > 0,05$).

Figura 6: Microinjeção de anisomicina (ANI) no hipocampo dorsal de camundongos submetidos ao teste de esquiiva inibitória do tipo “step-down”. (A) Choque moderado. (B) Choque intenso. As barras representam as médias (+ EPM) da latência de descida da plataforma, $n = 7-11$. Estatística não-paramétrica $*p \leq 0,05$ vs. Treino do seu respectivo grupo (Wilcoxon Matched Pairs Test). ANI= anisomicina; HD= hipocampo dorsal.

Infusão de anisomicina no córtex pré-frontal medial: estímulo aversivo moderado

Os dados referentes às latências de descida da plataforma de camundongos que receberam microinjeção de veículo ou anisomicina no córtex pré-frontal medial estão representados na Figura 7A. Em ambos os grupos não foram observadas diferenças significativas com relação às latências de descida da plataforma durante a sessão de treino (Mann–Whitney U test, $p > 0,05$). No entanto, diferença significativa entre treino e teste foi observada somente no grupo controle (Wilcoxon Matched Pairs test, $p \leq 0,05$). A administração de ANI no CPFm prejudicou a consolidação da memória aversiva moderada.

Infusão de anisomicina no córtex pré-frontal medial: estímulo aversivo intenso

A análise estatística não-paramétrica (Mann–Whitney U test) revelou que não houve diferenças significativas entre os tratamentos durante a sessão de treino ($p > 0,05$). No entanto, diferença significativa entre treino e teste foi observada somente no grupo controle (Wilcoxon Matched Pairs test, $p \leq 0,05$). Como o ocorrido na situação em que o estímulo aversivo foi moderado, a ANI no CPFm prejudicou a consolidação da memória aversiva intensa (Fig. 7B).

Figura 7: Microinjeção de anisomicina (ANI) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de esquila inibitória do tipo “step-down”. (A) Choque moderado. (B) Choque intenso. As barras representam as médias (+ EPM) da latência de descida da plataforma, $n = 8-9$. Estatística não-paramétrica $*p \leq 0,05$ vs. Treino do seu respectivo grupo (Wilcoxon Matched Pairs Test). ANI= anisomicina; CPFm= córtex pré-frontal medial.

Discussão

Neste primeiro experimento nós avaliamos o envolvimento da amígdala, do hipocampo dorsal e do córtex pré-frontal medial de camundongos na consolidação da memória referente a duas experiências aversivas distintas, uma moderada e a outra intensa. Nós encontramos que a consolidação em ambas as situações são dependentes de síntese proteica no CPFm. De maneira distinta, a síntese proteica na AMD e no HD são essenciais apenas para a consolidação da experiência aversiva intensa. Apesar da ANI ter sido administrada 1h antes do treino, nós não consideramos que esta droga tenha interferido na fase de aquisição da memória, uma vez que diferentes estudos já demonstraram que inibidores de síntese proteica não alteram a memória de curto prazo (Berman;Kesner e Partlow, 1978; Meiri e Rosenblum, 1998; Schafe e Ledoux, 2000).

O medo aprendido pode ser eliciado através da exposição a estímulos ambientais ou contextuais que foram previamente associados a um estímulo aversivo (Gross e Canteras, 2012). Para os roedores, a fonte desse estímulo aversivo pode ser um predador, um co-específico, ou até mesmo um estímulo nocivo, como o choque nas patas. Essas três diferentes fontes de medo são processadas por três vias neurais independentes, nas quais participam diferentes subnúcleos da amígdala, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (ver revisão Gross e Canteras, 2012). O condicionamento ao medo contextual para estímulos aversivos, como o choque nas patas, requer tanto a participação da amígdala, do hipocampo (Burwell et al., 2004; Johansen et al., 2010) bem como do córtex pré-frontal medial (Cenquizca e Swanson, 2007; Corcoran e Quirk, 2007). Evidências sugerem que o processamento do medo aprendido relacionado à estímulos aversivos, também requer projeções da matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral através do tálamo para áreas de associação corticais

que estariam envolvidas no processamento de pistas contextuais (Gross e Canteras, 2012).

Na esquia inibitória do tipo “step-down”, roedores associam a descida da plataforma com a presença de um estímulo incondicionado (choque nas patas) durante o treino. A resposta condicionada ocorre quando o animal evita descer da plataforma durante a sessão de teste (Gold, 1986; Vianna et al., 2001; Cammarota et al., 2005). No presente estudo, nós demonstramos que independente da intensidade da experiência aversiva, os animais que receberam a solução controle foram capazes de preservar a resposta condicionada 24 h após o treino, o que caracteriza o modelo como uma interessante ferramenta para se inferir memória emocional de medo em camundongos.

Uma visão dominante sobre as bases moleculares da memória é que, para que uma informação recentemente aprendida seja transformada em modificações estáveis, é necessário que ocorra a síntese de novas proteínas (Davis e Squire, 1984; Mcgaugh, 2000; Kandel, 2001; Dudai, 2002; Nader, 2003; Alberini, 2008). Essa visão é fundamentada por numerosos estudos que demonstraram que a inibição da síntese proteica próximo ao período do treino prejudica diferentes tipos de memórias em diferentes tarefas e espécies (Agranoff; Davis e Brink, 1966; Flexner e Flexner, 1966; Barondes e Cohen, 1968; Freeman; Rose e Scholey, 1995; Abel e Kandel, 1998; Bourtchouladze et al., 1998; Fulton et al., 2005). No presente estudo, a microinjeção de ANI na AMD prejudicou a retenção da esquia inibitória somente quando o estímulo aversivo foi intenso. Por outro lado, quando a intensidade do choque nas patas foi moderado, esses animais mantiveram a resposta condicionada, sugerindo que a síntese de proteínas na AMD não é essencial para que ocorra a consolidação da experiência emocional moderada.

Embora resultados opostos tenham sido propostos sobre o papel da amígdala na consolidação do medo condicionado Pavloviano e na memória de esquiva inibitória (Schafe e Ledoux, 2000; Wilensky;Schafe e Ledoux, 2000), Wilensky e colaboradores (2006) demonstraram que a AMD participa da circuitaria do medo condicionado Pavloviano. Pesquisas anteriores mostraram que a AMD é uma importante estrutura encefálica envolvida na aprendizagem de memórias aversivas, e na formação e expressão de memórias emocionais através das muitas projeções para outras regiões do encéfalo que também estão envolvidas no armazenamento da informação recém-adquirida (Jerusalinsky et al., 1992; Cahill e Mcgaugh, 1998; Izquierdo et al., 1998; Ambrogio Lorenzini et al., 1999; Fanselow e Ledoux, 1999; Ledoux, 2000; Mcgaugh, 2004; Wilensky et al., 2006; Moscarello e Ledoux, 2014). Além disso, já foi demonstrado que a infusão de ANI na AMD de roedores prejudica tanto a consolidação quanto a reconsolidação de memórias de medo contextual (Nader;Schafe e Le Doux, 2000; Schafe e Ledoux, 2000; Parsons et al., 2006; Wilensky et al., 2006; Nakayama et al., 2013). Nesse sentido, nosso presente estudo corrobora com os achados anteriores que mostram que esta estrutura límbica é importante para a consolidação de memórias de esquiva inibitória (Wilensky;Schafe e Ledoux, 2000). No entanto, baseado nos nossos achados, a consolidação nessa estrutura pode estar restrita a experiências aversivas intensas.

No mesmo sentido dos dados obtidos com a AMD, a administração de ANI no HD prejudicou a retenção da esquiva inibitória apenas na situação em que o estímulo aversivo foi intenso. Além disso, os camundongos que foram submetidos à experiência aversiva moderada se comportaram de maneira semelhante ao grupo controle, sugerindo que a síntese proteica no HD não é essencial para a consolidação de informações emocionais moderadas.

Diversos estudos demonstram que a consolidação das memórias de medo contextual e de esquiva inibitória são hipocampo-dependentes (Phillips e Ledoux, 1992; Kim; Rison e Fanselow, 1993; Logue; Paylor e Wehner, 1997; Taubenfeld et al., 1999; Matus-Amat et al., 2004; Cammarota et al., 2005). Além disso, ao inibir a síntese proteica nessa estrutura próxima ao período do treino, a consolidação da memória de esquiva inibitória pode ser prejudicada (Taubenfeld et al., 1999; Canal e Gold, 2007; Qi e Gold, 2009). Os dados do presente estudo corroboram com os achados anteriores mostrando que o hipocampo é importante para a consolidação da memória de esquiva inibitória. No entanto, a consolidação nesta estrutura límbica, tal qual ocorre no complexo amigdaloide, pode estar restrita a experiências aversivas intensas.

Evidências na literatura têm proposto que o CPFm desempenha importante participação nos aspectos "o quê", "onde" e "quando" da memória episódica (Barker et al., 2007; Devito e Eichenbaum, 2010; Li; Hsiao e Chen, 2011; Martinez et al., 2014) e que esta estrutura encefálica está relacionada com a consolidação de uma vasta gama de memórias (Euston; Gruber e McNaughton, 2012). Por exemplo, a consolidação do medo condicionado ao contexto depende do CPFm (Zhao et al., 2005), e a interferência na plasticidade dessa estrutura imediatamente após o treino de esquiva inibitória, resulta no prejuízo da retenção desse tipo de memória (Holloway e McIntyre, 2011; Zhang; Fukushima e Kida, 2011). Na mesma linha dos achados descritos acima, nossos dados demonstram que a consolidação da memória aversiva tanto moderada quanto intensa depende da síntese proteica no CPFm.

Embora alguns trabalhos já tenham demonstrado que a aplicação direta de ANI no encéfalo pode produzir poucos efeitos colaterais (Davis e Squire, 1984; Hernandez e Abel, 2008), o histórico de uso de inibidores da síntese de proteica em pesquisas sobre os processos mnemônicos é carregado de controvérsia. Canal e colaboradores (2007) e

Qi e Gold (2009) demonstraram que a infusão local de ANI leva ao aumento rápido e “catastrófico” (entre 15 e 30 minutos) nos níveis extracelulares de neuromoduladores endógenos como a norepinefrina, dopamina e serotonina, o que justificaria o prejuízo da função neural causado por esse inibidor de síntese proteica. Com base nesses dados, duas visões distintas sobre o papel dos inibidores de síntese proteica têm sido sugeridas: *a necessidade da síntese de novas proteínas para a formação da memória* vs *a modulação da memória por essas drogas*. Uma vez que no presente trabalho a ANI foi microinjetada uma hora antes do treino, ou seja, meia hora após a janela de liberação dos neuromoduladores endógenos citados acima, e que os efeitos inibitórios de síntese proteica da ANI são mantidos por até 9 h após a injeção (Wanisch e Wotjak, 2008), nós sugerimos que o prejuízo mnemônico promovido pela ANI foi devido a sua propriedade em inibir a síntese proteica.

Os resultados obtidos no nosso estudo são opostos aos obtidos por Diaz-Trujillo e colaboradores (2009). Esses autores reportaram que altas intensidades de choque anularam os efeitos da cicloheximida (inibidor de síntese proteica) sobre a memória aversiva de ratos. De maneira similar, outros estudos demonstram que a cicloheximida tem seus efeitos amnésicos diminuídos com o aumento da intensidade do choque (Flood et al., 1972; Gonzalez-Salinas et al., 2015). Juntos, esses achados sugerem que o prejuízo na memória causado pela cicloheximida é evidente somente quando a intensidade do choque é moderada, e não intensa. Em contraponto, nossos resultados são similares aos obtidos por Gold e Wrenn (2012), que demonstraram que os efeitos amnésicos obtidos com a cicloheximida só foram observados quando a intensidade do choque nas patas de camundongos foi elevado. Uma possível explicação para estes resultados contrastantes é a de que os estudos descritos acima investigaram o envolvimento da cicloheximida administrada sistemicamente (via intraperitoneal).

Portanto, uma comparação direta desses resultados com os nossos torna-se inviável, uma vez que no presente estudo nós investigamos a participação específica da AMD, HD e CPFm.

Não é novidade na literatura de que as drogas podem apresentar diferentes efeitos sobre as respostas comportamentais de roedores dependendo da intensidade do estímulo incondicionado (Gold e Van Buskirk, 1976; Lalumiere; Buen e Mcgaugh, 2003). Quiroz e colaboradores (2003) demonstraram que a administração de tetrodoxina no hipocampo de ratos, logo após terem sido submetidos a um treino com baixas intensidades de choque nas patas, foi capaz de induzir amnésia. No entanto, esses apresentaram melhor desempenho na tarefa mnemônica quando foram treinados com choque de maior intensidade. Outro estudo similar também demonstrou que o aumento da intensidade do choque diminuiu os efeitos amnésicos da tetrodoxina injetada no HD de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória (Garin-Aguilar et al., 2014). É importante destacar que a ferramenta amnésica utilizada nos estudos relatados acima foi a tetrodoxina, uma droga bloqueadora de canais de sódio voltagem dependente. Nesse sentido, essa substância impede o início e a propagação dos potenciais de ação (Choudhary et al., 2003), possivelmente bloqueando a aquisição da memória ligada ao estímulo aversivo, um mecanismo diferente da ANI que impede a síntese de novas proteínas que são necessárias para o fortalecimento do potencial de longa duração, não interferindo diretamente na neurotransmissão em si.

No presente trabalho, a retenção da memória de esquiva inibitória moderada não foi prejudicada em camundongos microinjetados com anisomicina na AMD ou HD. Sabe-se que o protocolo de esquiva inibitória é uma tarefa de aprendizagem dependente da amígdala e do hipocampo (Bourtchouladze et al., 1998; Izquierdo et al., 1999; Maren, 2001; Cammarota et al., 2005). Nesse sentido, o recrutamento de outras estruturas

encefálicas parece permitir o armazenamento desse tipo de informação. Assim, de acordo com os nossos dados, o CPFm pode ser responsável pela consolidação da experiência moderada, uma vez que os camundongos tratados com ANI no CPFm apresentaram prejuízo na retenção da esQUIVA inibitória após um estímulo aversivo moderado. No entanto, para os camundongos que foram submetidos à experiência aversiva intensa, o processo de consolidação na AMD, HD e CPFm é necessário para a manutenção da resposta condicionada. Assim, estímulos mais elevados podem ser necessários para a AMD e o HD modularem a consolidação da memória no CPFm; estímulos mais baixos, no entanto podem ativar a plasticidade dependente de síntese proteica na AMD e no HD, mas não o suficiente para consolidar esse tipo de memória. Portanto, AMD e HD são cruciais para o armazenamento de memórias de longo prazo no CPFm em situações em que o estímulo nocivo possa trazer risco a integridade e/ou a vida do indivíduo, mas não em situações com menor característica aversiva.

Nesse sentido, considerando os resultados obtidos no primeiro experimento, nós concluímos que diante de situações aversivas moderadas, a consolidação dessa experiência, provavelmente, não depende de síntese proteica na amígdala e no hipocampo dorsal, mas sim no córtex pré-frontal medial. Portanto, o CPFm pode contribuir para a memória episódica de uma experiência ambiental (onde) desagradável (o que). No entanto, durante situações que recrutem respostas emocionais mais intensas, os circuitos envolvendo essas três estruturas límbicas são essenciais para a consolidação de tal experiência.

Experimento 2: Participação da neurotransmissão histaminérgica, na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial, na modulação da memória emocional

Sujeitos

Foram utilizados camundongos machos (Suíço-Albino), pesando entre 27 e 40 g e provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram agrupados e mantidos sob as mesmas condições descritas no experimento 1.

Os animais foram distribuídos em cinco grupos com o intuito de investigar a participação do sistema histaminérgico nas fases de consolidação, evocação e pós-evocação/reconsolidação da memória emocional. Os grupos formados foram:

- **Controle:** animais que não foram expostos ao aparato experimental, portanto, não passaram pela experiência aversiva de treino;
- **9 horas pós-treino:** animais sacrificados 9 h após a sessão de treino;
- **24 horas pós-treino:** animais sacrificados 24h após a sessão de treino;
- **26 horas pós-treino:** animais sacrificados 26h após a sessão de treino;
- **2 horas pós-teste:** animais sacrificados 2h após a sessão de teste;

Enquanto o grupo 9h representa a fase de consolidação da memória, o grupo 24h pós-treino simularia como estaria a neurotransmissão histaminérgica no momento em que o animal retorna ao ambiente onde ocorreu a sessão de treino. Já o grupo 26h pós-treino foi adotado como o “controle” do grupo 2 h pós-teste, pois fortalece que eventual

alteração observada na expressão gênica neste último grupo ocorreu devido ao retorno ao mesmo contexto da experiência aversiva do teste.

Teste de esquiva inibitória

O aparato utilizado foi o mesmo descrito no primeiro experimento. No entanto, a intensidade do estímulo incondicionado adotado neste estudo foi de 1,5 mA (2 s). Portanto, os animais foram submetidos a uma experiência aversiva intensa. Além disso, é importante ressaltar que os animais que foram submetidos ao teste de esquiva inibitória foram imediatamente retornados a caixa moradia ao final de cada sessão experimental, onde permaneceram até o momento da retirada dos encéfalos.

Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)

Dissecção das áreas encefálicas

Os animais foram sacrificados por translocação cervical e em seguida decapitados. Os encéfalos foram removidos e imediatamente congelados por imersão em 2-metilbutano previamente resfriado em gelo seco e armazenados à -80°C. No dia da dissecação das estruturas alvo, os encéfalos foram seccionados em criostato (Leica CM 1850) e a AMD, HD e CPFm foram dissecados com auxílio de uma agulha de 15 Gauge, utilizando-se para isso as coordenadas do Atlas de Paxinos e Franklin (2004). As amostras de cada área foram transferidas para tubos de polipropileno e armazenadas à -80°C.

Extração do RNA total

A extração de RNA total de tecido foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi adicionado 100µl de Trizol nos tubos contendo o tecido para que se fosse feita a maceração com o uso de um pistilo. Em seguida foram adicionados 900 µl de Trizol e feita a homogeneização com as mãos por 15 segundos. As amostras foram então incubadas em gelo por 3 minutos. Na sequência, foi adicionado 200 µl de clorofórmio e feita a homogeneização com as mãos por 15 segundos. Novamente as amostras foram incubadas em gelo por 10 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados (12.500 rpm 4°C por 15 minutos). Terminada a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um eppendorf esterilizado e foi adicionado em cada tubo 460 µl de isopropanol e 40 µl de acrilamida (5mg/ml), sendo então homogeneizados com as mãos por 15 segundos e incubados no gelo por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (12.500 rpm 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante descartado. Iniciou-se então a lavagem do RNA, na qual 950 µl etanol 75% (diluído com água DEPC - dietilpirocarbonato inibidor de RNAase) foi adicionado aos tubos para homogeneização do pellet e, em seguida, as amostras foram vortexadas e centrifugadas (10.000 rpm 4°C por 5 minutos). Novamente foi descartado o sobrenadante e repetido o procedimento de lavagem do RNA. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida o pellet foi ressuspenso em 40 µl de água DEPC desativada, vortexado e colocado em banho Maria a 55°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas num freezer -80°C.

Determinação da concentração do RNA total

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm utilizando o Thermo Scientific NanoDrop®, e a relação entre as absorbâncias a 260/280 nm foi analisada.

Transcrição reversa de RNA

Para a transcrição reversa de RNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 1 µg de RNA total diluídos em água livre de RNases foram utilizados para a síntese do DNA complementar (cDNA). Em cada reação foi adicionado ao RNA das amostras: 1 µl 10x DNase I Reaction Buffer; 1 µl DNase I, Amp Grade, 1U/1 µl; 1 µl de 25 mM EDTA; 2 µl 10x RT buffer; 0,8 µl 25X dNTP (100mM); 4 µl 10X RT random primer; 1 µl reverse transcriptase e 8,2 µl de água livre de RNases. Esse material foi colocado num termociclador (Applied Biosystems (ABI) - GeneAmp Thermal Cycler 9700) na seguinte configuração: 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 segundos e 4 °C ∞. O cDNA sintetizado foi armazenado à -20 °C.

Ensaios inventariados da TaqMan® (TaqMan® Gene Expression Inventoried Assay)

Os ensaios utilizados foram:

- GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase): Mm99999915_g1; este foi utilizado como controle interno;

- HDC (histidina descarboxilase): Mm00456104_m1;
- Hrh1 (receptor histaminérgico H₁): Mm00627039_m1;
- Hrh2 (receptor histaminérgico H₂): Mm01337447_m1;
- Hrh3 (receptor histaminérgico H₃): Mm00446706_m1

RT-PCR

Para cada amostra preparada [foi preparado uma reação para correr em “quadruplicata” – triplicata da amostra, mais o branco (não contem cDNA) - de 20 µl cada] para reação de PCR foi utilizado, 5 µl 20× TaqMan® Gene Expression Assay; 50 µl 2× TaqMan® Gene Expression Master Mix; 20 µl de cDNA e 25 µl de água livre de RNAase. As amostras foram então pipetadas numa placa de 96 poços (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate) e seladas com MicroAmp® Optical Adhesive Film e em seguida a placa foi centrifugada por 1 min./1000xg/4°C. Na sequência a placa foi colocada no aparelho de RT-PCR (Applied Biosystems Real-Time PCR 7500 System) e configurada na seguinte maneira: 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Análise dos resultados

A análise da expressão gênica foi semiquantitativa (método delta delta CT) como descrito por Livak e Schmittgen (2001). O valor de CT (threshold cycle) representou o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra foi detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (background). O

resultado foi expresso em unidades arbitrárias. O modelo utilizado para a obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

1. Subtração do valor de CT do gene de interesse pelo CT do GAPDH (ΔCT);
2. Média do ΔCT das amostras;
3. ΔCT de cada amostra – média do ΔCT do grupo controle ($\Delta\Delta CT$);
4. Elevação negativa do $\Delta\Delta CT$ na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Análise estatística

Os resultados referentes à latência de descida da plataforma foram analisados através do teste T para amostras dependentes. Já os resultados referentes à análise da expressão gênica foram analisados através da ANOVA de uma via e, quando apropriado, seguidos pelo *Post hoc* de Newman-Keuls. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

Resultados

Resultados comportamentais

A Figura 8 representa as latências (em segundos) de descida da plataforma no treino e no teste dos animais do grupo sacrificado 2 horas após o teste (n=5). Ao aplicarmos o teste T para amostras dependentes podemos confirmar a diferença significativa da média de latência de descida da plataforma na sessão de teste em relação ao treino [$t(1,8) = -10,39$; $p \leq 0,005$]. Neste sentido, os animais foram capazes de manter a resposta condicionada.

Figura 8: Médias (+EPM) da latência (s) de descida da plataforma dos animais do grupo sacrificado 2 horas após o teste. * $p \leq 0,05$ em relação ao Treino.

Análise da expressão do gene HDC (histidina descarboxilase) na amídala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial de camundongos

A análise semiquantitativa ou relativa da expressão do gene HDC na AMD, HD e CPFm de camundongos submetidos ou não (grupo controle) a tarefa de esQUIVA inibitória do tipo “step-down” está representada nas Figuras 9-11.

Com relação à análise da expressão do gene HDC na AMD (Fig. 9), a ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os grupos $F(4,20)=7,33$, $p\leq 0,05$. O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou aumento significativo na expressão do gene HDC nos animais sacrificados 24 h após o treino ($p\leq 0,05$); diminuição significativa na expressão desse gene nos animais do grupo sacrificado 2 horas após o teste ($p\leq 0,05$), sendo que esta diminuição é diferente dos animais do grupo 26 h pós-treino.

Figura 9: Valor da expressão gênica da enzima histidina descarboxilase (HDC) na amídala (AMD). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador dessa enzima em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esQUIVA inibitória do tipo step-down. * $p\leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p\leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-6$.

Na Figura 10 estão representados os dados referentes à análise da expressão do gene HDC no HD. A ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os

grupos $F(4,19)=6,56$, $p\leq 0,05$. O teste de Newman-Keuls revelou diminuição significativa na expressão do gene HDC nos animais do grupo sacrificado 9 horas após o treino ($p\leq 0,05$). Ainda é possível observar que há uma tendência para diminuição na expressão desse gene nos animais do grupo 26 h pós-treino ($p=0,06$), mas que o fato do animal retornar ao ambiente onde ocorreu a experiência aversiva reverte essa tendência.

Com relação à análise relativa da expressão do gene HDC no CPFm (Fig. 11), a ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os grupos $F(4,16)=12,64$, $p\leq 0,05$. O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou aumento significativo na expressão desse gene nos animais do grupo sacrificado 24 horas após o treino e do grupo sacrificado 2 horas após o teste, quando comparados ao grupo controle ($p\leq 0,05$). Além disso, a análise estatística revelou que o grupo 2 h pós-teste é diferente do grupo 26 h pós-treino ($p\leq 0,05$).

Figura 10: Valor da expressão gênica da enzima histidina descarboxilase (HDC) no hipocampo dorsal (HD). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador dessa enzima em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esquia inibitória do tipo step-down. * $p\leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p\leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-6$.

Figura 11: Valor da expressão gênica da enzima histidina descarboxilase (HDC) no córtex pré-frontal medial (CPFm). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador dessa enzima em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esQUIVA inibitória do tipo step-down. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-5$.

Análise da expressão do gene *Hrh1* na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial de camundongos

As Figuras 12-14 representam a análise semiquantitativa ou relativa da expressão do gene *Hrh1* na AMD, HD e CPFm de camundongos submetidos ou não (grupo controle) a tarefa de esQUIVA inibitória do tipo “step-down”.

Com relação à análise da expressão do gene *Hrh1* na AMD (Fig. 12), a ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os grupos $F(4,19)=8,23$, $p \leq 0,05$. O teste post hoc de Newman-Keuls revelou diminuição significativa na média de expressão do gene histaminérgico nos animais do grupo 9 h pós-treino e aumento significativo na expressão deste mesmo gene nos animais sacrificados 2 h pós-teste ($p \leq 0,05$), sendo este aumento significativamente diferente dos animais do grupo 26 h pós-treino.

Figura 12: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H_1 na amígdala (AMD). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esquia inibitória do tipo step-down. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-6$.

Na Figura 13 estão representados os dados referentes à análise da expressão do gene *Hrh1* no HD. A ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os grupos $F(4,20)=8,12$, $p \leq 0,05$. O teste post hoc de Newman-Keuls revelou aumento significativo na expressão do gene *Hrh1* nos animais do grupo sacrificado 2 horas após o treino ($p \leq 0,05$). Ainda é possível observar que este grupo é significativamente diferente do grupo 26 h pós-treino ($p \leq 0,05$).

Figura 13: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H_1 no hipocampo dorsal (HD). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esQUIVA inibitória do tipo step-down. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-6$.

Já à análise relativa da expressão do gene *Hrh1* no CPFm (Fig. 14), a ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os grupos $F(4,18)=7,15$, $p \leq 0,05$. O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou diminuição significativa na expressão do gene *Hrh1* nos grupos 9 e 24 h pós-treino e do grupo sacrificado 2 horas após o teste, quando comparados ao grupo controle ($p \leq 0,05$). Além disso, a análise estatística revelou que o grupo 2 h pós-teste é diferente do grupo 26 h pós-treino ($p \leq 0,05$).

Figura 14: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H_1 no córtex pré-frontal medial (CPFm). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esquila inibitória do tipo step-down. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-6$.

Análise da expressão do gene Hrh2 na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial de camundongos

A análise semiquantitativa ou relativa da expressão do gene Hrh2 na AMD, HD e CPFm de camundongos submetidos ou não (grupo controle) a tarefa de esquila inibitória do tipo “step-down” estão representadas nas Figuras 15-17.

Na Figura 15 estão representados os dados referentes à análise da expressão do gene Hrh2 na AMD. A ANOVA de uma via revelou que não houve diferença significativa entre os grupos $F(4,19)=1,28$, $p=0,31$.

Figura 15: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H₂ na amígdala (AMD). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esquia inibitória do tipo step-down. n=4-6.

Com relação à análise da expressão do gene Hrh2 no HD (Fig. 16), a ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os grupos $F(4,22)=11,64$, $p \leq 0,05$. O teste post hoc de Newman-Keuls revelou aumento significativo na média de expressão desse gene histaminérgico nos animais do grupo 24 h pós-treino ($p \leq 0,05$).

Figura 16: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H₂ no hipocampo dorsal (HD). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esquia inibitória do tipo step-down. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle, n=4-6.

No CPFm, a análise relativa da expressão do gene *Hrh2* está representada pela Figura 17. A ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os grupos $F(4,18)=7,78$, $p\leq 0,05$. O teste de Newman-Keuls revelou aumento significativo na expressão do gene *Hrh2* no grupo 26 h pós-treino ($p\leq 0,05$). Além disso, a análise estatística revelou que o grupo 2 h pós-teste é diferente do grupo 26 h pós-treino ($p\leq 0,05$).

Figura 17: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H_2 no córtex pré-frontal medial (CPFm). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esquia inibitória do tipo step-down. * $p\leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p\leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-6$.

Análise da expressão do gene *Hrh3* na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial de camundongos

As Figuras 18-20 representam a análise semiquantitativa ou relativa da expressão do gene *Hrh3* na AMD, HD e CPFm de camundongos submetidos ou não (grupo controle) a tarefa de esquia inibitória do tipo “step-down”.

Com relação à análise da expressão do gene *Hrh3* na AMD (Fig. 18), a ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os grupos $F(4,21)=10,39$, $p \leq 0,05$. O teste post hoc de Newman-Keuls revelou diminuição significativa na expressão do gene *Hrh3* nos animais dos grupos 9 e 24 h pós-treino ($p \leq 0,05$); diminuição significativa na expressão deste mesmo gene nos animais do grupo sacrificado 2 horas após o teste ($p \leq 0,05$), sendo que esta diminuição é diferente dos animais do grupo 26 h pós-treino.

Figura 18: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H_3 na amígdala (AMD). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esQUIVA inibitória do tipo step-down. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-6$.

Na Figura 19 estão representados os dados referentes à análise da expressão do gene *Hrh3* no HD. A ANOVA de uma via apontou para diferença significativa entre os grupos $F(4,21)=22,92$, $p \leq 0,05$. O teste de Newman-Keuls revelou aumento significativo na expressão do gene *Hrh3* nos animais do grupo sacrificado 24 horas após o treino ($p \leq 0,05$).

Figura 19: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H_3 no hipocampo dorsal (HD). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esquila inibitória do tipo step-down. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle, $n=4-6$.

Já à análise relativa da expressão do gene *Hrh3* no CPFm (Fig. 20), a ANOVA revelou que houve diferença significativa entre os grupos $F(4,21)=5,53$, $p \leq 0,05$. O teste Newman-Keuls revelou diminuição significativa na expressão do gene *Hrh3* nos grupos 9 e 24 h pós-treino e do grupo sacrificado 2 horas após o teste, quando comparados ao grupo controle ($p \leq 0,05$). Além disso, a análise estatística revelou que o grupo 2 h pós-teste é diferente do grupo 26 h pós-treino ($p \leq 0,05$).

Figura 20: Valor da expressão gênica do receptor histaminérgico H_3 no córtex pré-frontal medial (CPFm). RT-PCR foi usado para medir os níveis de RNAm do gene codificador desse receptor em amostras de animais submetidos ou não ao modelo de esquila inibitória do tipo step-down. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 26h pós-treino, $n=4-6$.

As Tabelas 1 e 2 representam a síntese dos resultados obtidos no segundo experimento. Na Tabela 1 é possível observar que na fase de consolidação houve redução da expressão do gene HDC no HD; redução da expressão dos genes Hrh1 e Hrh3 no CPFm; e redução da expressão do gene Hrh3 na AMD. Já no período referente à evocação, houve aumento na expressão do gene HDC acompanhado pela diminuição da expressão do gene Hrh3 tanto na AMD como no CPFm; diminuição da expressão do gene Hrh1 no CPFm; e aumento na expressão dos genes Hrh2 e Hrh3 no HD.

Os dados postados na Tabela 2 resumem como estavam os níveis de expressão dos genes abordados neste estudo 2 horas após a evocação da memória emocional. É importante ressaltar que o símbolo “*” indica que o nível de expressão neste grupo é diferente do grupo 26 h pós-treino. Ou seja, a alteração observada ocorreu porque o animal retornou ao ambiente no qual havia tido uma experiência aversiva intensa.

Tabela 1. Resumo dos resultados referentes à expressão gênica na fase da consolidação e evocação da memória aversiva intensa

	CONSOLIDAÇÃO (9 h)				EVOCAÇÃO (24 h)			
	HDC	Hrh1	Hrh2	Hrh3	HDC	Hrh1	Hrh2	Hrh3
AMD	—	—	—	↓	↑	—	—	↓
HD	↓	—	—	—	—	—	↑	↑
CPFm	—	↓	—	↓	↑	↓	—	↓

— : sem alteração na expressão gênica quando comparado ao grupo controle;

↑ : aumento da expressão gênica quando comparado ao grupo controle;

↓ : diminuição da expressão gênica quando comparado ao grupo controle;

Nota-se que o gene HDC se expressou de maneira distinta nas três estruturas, diminuindo na AMD, aumentando no CPFm e não se alterando em relação ao grupo controle no HD. Já o gene Hrh1 teve seus níveis de expressão aumentados na AMD e HD e diminuídos no CPFm. O gene responsável pela formação de receptores H₃ teve seus níveis de expressão reduzidos na AMD e CPFm.

Tabela 2. Resumo dos resultados referentes à expressão gênica na fase pós-evocação/reconsolidação da memória aversiva intensa

PÓS-EVOCAÇÃO/RECONSOLIDAÇÃO				
	HDC	Hrh1	Hrh2	Hrh3
AMD	↓*	↑*	—	↓*
HD	—*	↑*	—	—
CPFm	↑*	↓*	—*	↓*

- : sem alteração na expressão gênica quando comparado ao grupo controle;
↑ : aumento da expressão gênica quando comparado ao grupo controle;
↓ : diminuição da expressão gênica quando comparado ao grupo controle;
***** : significativamente diferente do grupo 26 h pós-treino;

Discussão

No teste de esquiwa inibitória do tipo step-down roedores fazem a associação entre descer de uma plataforma e receber choque nas patas (estímulo incondicionado). A resposta condicionada está em evitar a descida da plataforma (Gold, 1986; Vianna et al., 2001). Os dados do experimento 2 demonstraram que esta resposta condicionada foi observada nos animais do grupo 2h pós-teste, o que confirma dados prévios da literatura e também os achados do experimento 1. No presente estudo, também foi observado que a expressão gênica da histidina descarboxilase (HDC) e dos receptores histaminérgicos H1-H3 na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial de camundongos submetidos a uma experiência aversiva intensa se expressam de maneira distinta ao longo das diferentes fases da memória.

A administração de histamina, após uma sessão de treino, em diferentes regiões do encéfalo facilita a consolidação da memória em diferentes tarefas de aprendizagem. Almeida e Izquierdo (1986) foram os primeiros em descrever um efeito facilitador da histamina (i.c.v) sobre a consolidação da memória de esquiwa inibitória. Desde então, diferentes tipos de memória foram investigadas através do uso da própria histamina, ou de agonistas e antagonistas histaminérgicos administrados em diferentes estruturas encefálicas. No entanto, embora a maioria dos estudos aponte que a histamina facilita a consolidação de memórias, trabalhos relatando que a ativação dos receptores de histamina prejudica a formação de memórias também são observados ao longo do estudo deste neurotransmissor (Cacabelos e Alvarez, 1991; Spieler et al., 1999; Alvarez e Alvarez, 2008; Benetti e Izquierdo, 2013; Serafim et al., 2013; Gianlorenco et al., 2014; Benetti et al., 2015).

Durante a fase de consolidação ocorreu diminuição nos níveis de expressão do gene envolvido na síntese do receptor H_3 na AMD. Sabe-se que este tipo de receptor é classificado como auto-receptor, portanto regula a síntese e liberação de histamina neural, mas também é classificado como hetero-receptor, atuando assim como regulador da liberação de outros neurotransmissores, como acetilcolina (Esbenshade et al., 2008; Haas; Sergeeva e Selbach, 2008; Panula e Nuutinen, 2013). Assim, a ativação do hetero-receptor pela histamina culminaria no bloqueio da liberação desse neurotransmissor (Esbenshade et al., 2008). Essa atribuição dada aos receptores H_3 se deu após diferentes estudos mostrando que antagonistas desse tipo de receptor quando administrados sistemicamente ou localmente no núcleo tuberomamilar, resultaram no aumento expressivo na liberação de histamina e acetilcolina tanto no próprio núcleo tuberomamilar, como no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos (Blandina et al., 1996; Fox et al., 2005; Munari et al., 2013).

No entanto, o envolvimento dos hetero-receptores H_3 presentes na amígdala de ratos ocorre de maneira distinta. A administração de agonistas H_3 na amígdala resulta no aumento local de liberação de acetilcolina melhorando a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto (Cangioli et al., 2002), enquanto que antagonistas de H_3 , injetados nessa mesma estrutura, resultaram na diminuição da liberação de acetilcolina, e prejuízo na consolidação desse mesmo tipo de memória (Passani et al., 2001). Além disso, já foi demonstrado que a infusão de histamina diretamente na amígdala facilita a consolidação da memória de esquiva inibitória (Benetti e Izquierdo, 2013; Benetti et al., 2015), e que essa facilitação é bloqueada por antagonista de receptor H_3 (Benetti e Izquierdo, 2013).

Nesse sentido, sugerimos que durante a consolidação da memória aversiva a liberação de histamina endógena estaria aumentada, provavelmente devido à diminuição

da síntese dos auto-receptores H_3 , e assim, sua ação seria através da ativação dos hetero-receptores H_3 , uma vez que em situações em que há aumento drástico nos níveis de histamina, como no caso demonstrado no estudo de Benetti e Izquierdo (2013), esse neurotransmissor provavelmente atua nos hetero-receptores H_3 resultando no aumento na liberação de acetilcolina, facilitando a consolidação da memória de esquila inibitória. Assim, com os dados obtidos no presente estudo, sugere-se que o aumento da neurotransmissão histaminérgica na AMD é importante para a consolidação da experiência aversiva via ação colinérgica. No entanto, futuros experimentos são necessários para confirmação desta hipótese.

Ainda com relação ao período de consolidação, nós observamos diminuição na expressão do gene HDC no hipocampo dorsal, o que nos permite inferir que houve diminuição na síntese de histamina nessa estrutura, uma vez que a enzima histidina descarboxilase é responsável pela síntese do aminoácido L-histidina em histamina (Haas; Sergeeva e Selbach, 2008; Panula e Nuutinen, 2013).

Aparentemente, de acordo com a região do hipocampo a histamina exógena produz efeitos diversos sobre a consolidação de memórias de medo. Alvarez e Banzan (2008) demonstraram que a histamina prejudicou a consolidação da memória quando infundida no hipocampo ventral de ratos submetidos a uma tarefa de esquila ativa. No entanto, já foi demonstrado que a administração de agonistas de receptores H_2 e H_3 no hipocampo dorsal de ratos facilita a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto (Giovannini et al., 2003). Além disso, a própria histamina também produz efeitos facilitatórios quando microinjetada no hipocampo dorsal de ratos imediatamente após o treino de uma tarefa de esquila inibitória (Da Silva et al., 2006). Esses autores também sugerem que a histamina facilita a consolidação da memória através de um mecanismo que envolve a ativação dos receptores H_2 . Neste sentido, os nossos

resultados não significam que neurotransmissão histaminérgica no HD não participa da consolidação da memória aversiva, mas que há uma reorganização na maquinaria intracelular que pode desencadear na diminuição nos níveis de histamina.

O CPFm apresenta importante participação na consolidação de diferentes tipos de memória (Euston; Gruber e McNaughton, 2012). Porém, estudos envolvendo a neurotransmissão histaminérgica nesta região são raros. Sabe-se que projeções que partem do núcleo tuberomamilar chegam à região infra-límbica e assim regulam o comportamento alimentar (Valdes et al., 2006; Riveros; Forray e Torrealba, 2015).

Até onde se sabe, nossos dados são os primeiros a demonstrar um possível aumento na síntese de histamina (aumento na expressão do gene HDC) acompanhado da diminuição da expressão dos genes *Hrh1* e *Hrh3* na consolidação da experiência aversiva intensa nessa área. Como esses dois genes tiveram seus níveis de expressão reduzidos, é possível que a histamina atue em receptores H_2 , favorecendo a consolidação da memória. Diante disso, sugerimos que durante esta fase da memória a densidade de histamina sendo liberada esteja elevada devido ao aumento da expressão de HDC e à diminuição na expressão de *Hrh3*. Além disso, a possível diminuição na densidade de receptores H_3 pode resultar na facilitação da neurotransmissão colinérgica, uma vez que o bloqueio desses receptores resulta no aumento da liberação dessa amina no córtex pré-frontal (Blandina et al., 1996; Munari et al., 2013). Neste sentido, este mecanismo parece ser necessário para que ocorra a retenção da resposta condicionada, uma vez que os animais foram capazes de recordar do evento aversivo. Porém, futuros experimentos com análises imunohistoquímicas são necessários para confirmação desta hipótese.

A neurotransmissão histaminérgica também está envolvida na evocação de memórias aversivas. Kamei e Tasaka (1993) demonstraram que a administração de

histamina (i.c.v) em ratos idosos submetidos à tarefa de esQUIVA ativa facilitou a evocação da memória via ativação de receptores H_1 . Além disso, a administração (i.c.v.) repetida de histamina em camundongos submetidos à esQUIVA inibitória do tipo “step-down” facilitou a evocação deste tipo de memória (Zarrindast; Parsaei e Ahmadi, 2008).

Neste segundo experimento, nós observamos que os níveis de expressão do gene HDC e *Hrh3* estavam aumentados e diminuídos respectivamente na AMD 24 após o evento aversivo. Como já abordado anteriormente, é possível que durante o período de evocação, a liberação de histamina esteja elevada, uma vez que a síntese da enzima HDC está aumentada e a do receptor H_3 está diminuída. Um estudo recentemente realizado em nosso laboratório por Daher e Mattioli (2015) revelou que a elevação nos níveis de histamina na AMD resultou no prejuízo da evocação da memória de esQUIVA inibitória. No entanto este comportamento não foi observado nos animais controle e nos animais que receberam a menor dose de histamina. Como a AMD possui altas concentrações de neurônios glutamatérgicos (Sah e Lopez De Armentia, 2003), as autoras sugeriram que o prejuízo observado na evocação da memória possa ter ocorrido devido à ativação de receptores H_3 localizados em neurônios glutamatérgicos, resultando na diminuição da atividade glutamatérgica. Nesse sentido, com base nos nossos resultados e nos obtidos por Daher e Mattioli (2015), é possível sugerir que a neurotransmissão histaminérgica presente na AMD participa da evocação de memórias aversivas.

Diferente do que foi observado na AMD, os níveis de expressão dos genes *Hrh2* e *Hrh3* estavam elevados no HD nos animais do grupo 24h pós-treino. Enquanto que a maioria dos estudos farmacológicos envolvendo a neurotransmissão histaminérgica presente no hipocampo está voltada para os processos mnemônicos de aquisição e consolidação, pouco tem sido feito para se investigar o papel desse neurotransmissor e

seus receptores na evocação de memórias. Por exemplo, num estudo feito com ratos, foi observado que um antagonista de receptor H_3 melhorou a evocação da memória de reconhecimento de um co-específico (Fox et al., 2005). Por outro lado, microinjeção de histamina no hipocampo ventral de ratos resultou no prejuízo da evocação de uma tarefa de esquiva ativa (Alvarez e Banzan, 1995; 1996), e esse prejuízo na evocação seria mediado pelos receptores H_1 , e não H_2 (Alvarez e Banzan, 1996). Sendo assim, nossos dados sugerem que o aumento da expressão do gene *Hrh3* possa ter resultado na diminuição dos níveis de histamina liberada na fenda sináptica, processo este que deve ser importante para a evocação da memória, uma vez que, se a ação da histamina no HD for similar a do hipocampo ventral, esta em níveis elevados poderia dificultar a evocação da experiência aversiva.

Ainda com relação ao período referente à fase de evocação, nós observamos que no CPFm houve aumento na expressão do gene *HDC* acompanhado pela diminuição da expressão dos genes *HRh1* e *HRh3*. Seguindo a mesma linha de raciocínio utilizada para interpretar os dados referentes à AMD, nós sugerimos que durante a evocação os níveis de histamina sendo liberada nesta estrutura estavam elevados, pois, além do aumento na expressão do gene *HDC* - o que pode resultar no aumento da síntese de histamina - houve diminuição na síntese do auto/hetero-receptor H_3 . Provavelmente, a histamina liberada deve ter atividade predominante sobre os receptores H_2 , que os receptores H_1 e H_3 apresentaram redução na fase de evocação.

É importante ressaltar que as interpretações com relação aos dados do CPFm são hipóteses levantadas acerca do funcionamento da neurotransmissão histaminérgica na fase de evocação de uma memória aversiva intensa. Até o presente momento, não há dados na literatura que possam fortalecer ou não essas hipóteses. Nesse sentido, nosso

estudo fornece evidências para que novos estudos sejam feitos a fim de ampliar os conhecimentos sobre a neurotransmissão histaminérgica no CPFm.

No presente estudo, nós também analisamos as variações nos níveis de expressão gênica num período pós-evocação da memória (grupo sacrificado 2h após o teste). Sabe-se que a evocação de uma determinada memória pode resultar no início da fase de reconsolidação ou extinção (Baldi e Bucherelli, 2015). Na reconsolidação, a memória de aversiva recém-evocada retorna a um estado lábil e necessita de um novo ciclo de consolidação para ser preservada (Baldi e Bucherelli, 2015). Nesse sentido, o período de reconsolidação permite a integração de novas informações na memória original, permitindo assim a atualização dessa memória (Alberini, 2005; Alberini e Ledoux, 2013). No entanto, se durante a fase da evocação forem feitas sucessivas reexposições ao mesmo ambiente onde ocorreu experiência aversiva, na ausência do estímulo aversivo incondicionado, o processo de extinção é desencadeado (Baldi e Bucherelli, 2015). De acordo com essas diferenças entre reconsolidação e extinção, nós sugerimos que a fase mnemônica em que os animais sacrificados 2h após o teste estavam era a de reconsolidação, pois imediatamente após a descida da plataforma (período inferior a 180 s), que não foi acompanhada de choque nas patas, esses animais foram retornados a caixa moradia.

Assim, segundo os nossos resultados, o retorno ao ambiente onde o animal passou por uma experiência aversiva intensa possivelmente resultou em mecanismos de neuroplasticidade, caracterizados pelos diferentes níveis de expressão gênica nas três estruturas límbicas. Na AMD houve diminuição da expressão dos genes HDC e Hrh3 e aumento da expressão do gene Hrh1. Este gene também esteve aumentado no HD. Já no CPFm houve aumento na expressão do gene HDC e diminuição dos genes Hrh1 e Hrh3. É importante ressaltar que estas alterações ocorreram após os animais retornarem ao

mesmo ambiente do dia anterior, pois todas essas variações foram significativamente diferentes dos animais do grupo 26 h pós-treino.

O papel da neurotransmissão histaminérgica nos processos de reconsolidação de memórias é praticamente desconhecido (Brabant;Charlier e Tirelli, 2013). O que se conhece até o momento é que a administração sistêmica (Charlier e Tirelli, 2011; Brabant;Charlier e Tirelli, 2013) ou intra-amígdala (Bucherelli et al., 2006) de antagonistas/agonistas inverso de receptores H_3 não tem efeito sobre a reconsolidação do medo condicionado de camundongos e ratos. Nesse sentido, nossos resultados sugerem que enquanto na AMD pode ter ocorrido uma atenuação da neurotransmissão histaminérgica, no HD a histamina pode ter auxiliado na reconsolidação atuando nos receptores H_1 . Já no CPFm possivelmente a reconsolidação pode ter sido influenciada pelos altos níveis de histamina sendo liberada, uma vez que a expressão dos genes HDC apresentou-se aumentada. Assim, sugerimos que a histamina pode ter sua ação sobre a reconsolidação via receptor H_2 , pois houve diminuição na expressão dos genes *Hrh1* e *Hrh3*. Porém, futuros trabalhos precisam ser realizados para testar a influência da histamina nessas estruturas límbicas sobre a reconsolidação de memórias aversivas.

Até o momento não há estudos na literatura que mostrem as variações nos níveis de expressão de genes relacionados ao sistema histaminérgico de animais que passaram por uma experiência aversiva intensa. Assim, este estudo abre oportunidades para se investigar com mais riqueza de detalhes como a neurotransmissão histaminérgica é recrutada fisiologicamente diante de experiências emocionais intensas. Ferramentas de quantificação de proteínas (Western-Blotting), bem como de expressão histológica dos receptores de histamina em neurônios ativos de subnúcleos da amígdala, do hipocampo e do córtex pré-frontal medial durante as diferentes fases das memórias de medo, poderão confirmar se as variações dos níveis de expressão gênica correlacionam ou não

aumento ou diminuição do produto final, e consequentemente da resposta comportamental. Além disso, abordagens farmacológicas, como o uso de agonistas e antagonistas específicos, também auxiliarão no esclarecimento sobre os resultados obtidos.

Conclusões

Embora tenhamos adotado diferentes estratégias para se investigar o envolvimento de estruturas límbicas e da neurotransmissão histaminérgica presente nas mesmas, os resultados obtidos nos dois experimentos realizados neste estudo nos fornecem evidências de que a síntese proteica na AMD, HD e CPFm é necessária para a consolidação da memória aversiva intensa, e que entre as diferentes neurotransmissões presentes nessas regiões encefálicas, fisiologicamente a neurotransmissão histaminérgica possui importante participação nesse processo de consolidação.

Desta forma, especificamente cada experimento nos permitiu concluir que:

- ✓ Em situações com moderado grau de aversividade, a consolidação dessa experiência não dependerá de síntese proteica na amígdala e no hipocampo dorsal, mas sim no córtex pré-frontal medial.
- ✓ No entanto, em situações com elevado grau de aversividade, a síntese proteica na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial é essencial para a consolidação de tal experiência.
- ✓ Os genes HDC, Hrh1, Hrh2 e Hrh3 se expressam distintamente na amígdala, hipocampo dorsal e córtex pré-frontal medial ao longo da escala temporal da consolidação, da evocação e reconsolidação da formação de memórias de medo.

Referências bibliográficas

ABEL, T.; KANDEL, E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 26, n. 2-3, p. 360-78, May 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651552> >.

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, v. 11, n. 2, p. 180-7, Apr 2001. ISSN 0959-4388 (Print)0959-4388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301237> >.

AGRANOFF, B. W.; DAVIS, R. E.; BRINK, J. J. Chemical studies on memory fixation in goldfish. *Brain Res*, v. 1, n. 3, p. 303-9, Mar-Apr 1966. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5955961> >.

ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci*, v. 28, n. 1, p. 51-6, Jan 2005. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626497> >.

ALBERINI, C. M. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiol Learn Mem*, v. 89, n. 3, p. 234-46, Mar 2008. ISSN 1095-9564 (Electronic)1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928243> >.

ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. *Curr Biol*, v. 23, n. 17, p. R746-50, Sep 9 2013. ISSN 1879-0445 (Electronic) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24028957> >.

ALVAREZ, E. O.; ALVAREZ, P. A. Motivated exploratory behaviour in the rat: the role of hippocampus and the histaminergic neurotransmission. *Behav Brain Res*, v. 186, n. 1, p. 118-25, Jan 10 2008. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825439> >.

ALVAREZ, E. O.; BANZAN, A. M. Effects of localized histamine microinjections into the hippocampal formation on the retrieval of a one-way active avoidance response in rats. *J Neural Transm Gen Sect*, v. 101, n. 1-3, p. 201-11, 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8695050> >.

ALVAREZ, E. O.; BANZAN, A. M. Hippocampal histamine receptors: possible role on the mechanisms of memory in the rat, II. *J Neural Transm (Vienna)*, v. 103, n. 1-2, p. 147-56, 1996. ISSN 0300-9564 (Print) 0300-9564 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9026368> >.

ALVAREZ, E. O.; BANZAN, A. M. The activation of histamine-sensitive sites of the ventral hippocampus modulates the consolidation of a learned active avoidance response in rats. *Behav Brain Res*, v. 189, n. 1, p. 92-9, May 16 2008. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282618> >.

AMBROGI LORENZINI, C. G. et al. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem*, v. 71, n. 1, p. 1-18, Jan 1999. ISSN 1074-7427 (Print) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9889069> >.

BADDELEY, A. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci*, v. 4, n. 11, p. 417-423, Nov 1 2000. ISSN 1879-307X (Electronic) 1364-6613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058819> >.

BALDI, E.; BUCHERELLI, C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 53, p. 160-90, Jun 2015. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887284> >.

BARBACID, M.; VAZQUEZ, D. (3H)anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. *J Mol Biol*, v. 84, n. 4, p. 603-23, Apr 25 1974. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4601392> >.

BARKER, G. R. et al. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci*, v. 27, n. 11, p. 2948-57, Mar 14 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360918> >.

BARONDES, S. H.; COHEN, H. D. Memory impairment after subcutaneous injection of acetoxycycloheximide. *Science*, v. 160, n. 3827, p. 556-7, May 3 1968. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5689416> >.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, v. 53, n. 2, p. 261-77, Jan 18 2007. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17224407> >.

BENETTI, F. et al. Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 112, n. 19, p. E2536-42, May 12 2015. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25918368> >.

BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 16, n. 7, p. 1539-45, Aug 2013. ISSN 1469-5111 (Electronic) 1461-1457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308396> >.

BERMAN, R. F.; KESNER, R. P.; PARTLOW, L. M. Passive avoidance impairment in rats following cycloheximide injection into the amygdala. *Brain Res*, v. 158, n. 1, p. 171-88, Dec 8 1978. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348359> >.

BLANDINA, P. et al. Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H3 receptor activation in rats. *Br J Pharmacol*, v. 119, n. 8, p. 1656-64, Dec 1996. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982515> >.

BOHANNON, J. N., 3RD. Flashbulb memories for the space shuttle disaster: a tale of two theories. *Cognition*, v. 29, n. 2, p. 179-96, Jul 1988. ISSN 0010-0277 (Print) 0010-0277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3168421> >.

BOURTCHOULADZE, R. et al. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem*, v. 5, n. 4-5, p. 365-74, Sep-Oct 1998. ISSN 1072-0502 (Print) 1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454361> >.

BRABANT, C.; CHARLIER, Y.; TIRELLI, E. The histamine H(3)-receptor inverse agonist pitolisant improves fear memory in mice. *Behav Brain Res*, v. 243, p. 199-204, Apr 15 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327739> >.

BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HAAS, H. L. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol*, v. 63, n. 6, p. 637-72, Apr 2001. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164999> >.

BUCHERELLI, C. et al. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learn Mem*, v. 13, n. 4, p. 426-30, Jul-Aug 2006. ISSN 1072-0502 (Print) 1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882859> >.

BURWELL, R. D. et al. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci*, v. 24, n. 15, p. 3826-36, Apr 14 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084664> >.

CACABELOS, R.; ALVAREZ, X. A. Histidine decarboxylase inhibition induced by alpha-fluoromethylhistidine provokes learning-related hypokinetic activity. *Agents Actions*, v. 33, n. 1-2, p. 131-4, May 1991. ISSN 0065-4299 (Print) 0065-4299 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1897430> >.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*, v. 21, n. 7, p. 294-9, Jul 1998. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683321> >.

CAI, D. et al. Reconsolidation of long-term memory in *Aplysia*. *Curr Biol*, v. 22, n. 19, p. 1783-8, Oct 9 2012. ISSN 1879-0445 (Electronic) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885063> >.

CAMMAROTA, M. et al. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem*, v. 11, n. 5, p. 572-8, Sep-Oct 2004. ISSN 1072-0502 (Print) 1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466311> >.

CAMMAROTA, M. et al. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol Learn Mem*, v. 84, n. 1, p. 25-32, Jul 2005. ISSN 1074-7427 (Print) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936680> >.

CANAL, C. E.; CHANG, Q.; GOLD, P. E. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 30, p. 12500-5, Jul 24 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640910> >.

CANAL, C. E.; GOLD, P. E. Different temporal profiles of amnesia after intra-hippocampus and intra-amygdala infusions of anisomycin. *Behav Neurosci*, v. 121, n. 4, p. 732-41, Aug 2007. ISSN 0735-7044 (Print) 0735-7044 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17663598> >.

CANGIOLI, I. et al. Activation of histaminergic H3 receptors in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. *Eur J Neurosci*, v. 16, n. 3, p. 521-8, Aug 2002. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193196> >.

CANTO-DE-SOUZA, L. et al. Dorsal hippocampal microinjection of chlorpheniramine reverses the anxiolytic-like effects of l-histidine and impairs emotional memory in mice. *Neurosci Lett*, v. 587, p. 11-6, Feb 5 2015. ISSN 1872-7972 (Electronic) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25524405> >.

CENQUIZCA, L. A.; SWANSON, L. W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev*, v. 56, n. 1, p. 1-26, Nov 2007. ISSN 0165-0173 (Print) 0165-0173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559940> >.

CHARLIER, Y.; TIRELLI, E. Differential effects of histamine H(3) receptor inverse agonist thioperamide, given alone or in combination with the N-methyl-d-aspartate receptor antagonist dizocilpine, on reconsolidation and consolidation of a contextual fear memory in mice. *Neuroscience*, v. 193, p. 132-42, Oct 13 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802497> >.

CHOUDHARY, G. et al. Interactions of the C-11 hydroxyl of tetrodotoxin with the sodium channel outer vestibule. *Biophys J*, v. 84, n. 1, p. 287-94, Jan 2003. ISSN 0006-3495 (Print) 0006-3495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524282> >.

CHRISTIANSON, S. A. Emotional stress and eyewitness memory: a critical review. *Psychol Bull*, v. 112, n. 2, p. 284-309, Sep 1992. ISSN 0033-2909 (Print) 0033-2909 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1454896> >.

CONNELLY, W. M. et al. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br J Pharmacol*, v. 157, n. 1, p. 55-63, May 2009. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19413571> >.

CORCORAN, K. A.; QUIRK, G. J. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci*, v. 27, n. 4, p. 840-4, Jan 24 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251424> >.

CORRÊA, A. C. D. O. Memória, aprendizagem e esquecimento: a memória através das neurociências cognitivas. São Paulo: Atheneu, 2010.

COSTA, J. N. et al. Low-dose thioperamide injected into the cerebellar vermis of mice immediately after exposure to the elevated plus-maze impairs their avoidance behavior on re-exposure to the apparatus. *Braz J Med Biol Res*, v. 46, n. 11, p. 943-948, Nov 6 2013. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270913> >.

COURTIN, J. et al. Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. *Neuroscience*, v. 240, p. 219-42, Jun 14 2013. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500092> >.

CURRAN, H. V.; MINTZER, M. Z. Psychopharmacology of memory. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 188, n. 4, p. 393-6, Nov 2006. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17058106> >.

DA SILVA, W. C. et al. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. *Neurobiol Learn Mem*, v. 86, n. 1, p. 100-6, Jul 2006. ISSN 1074-7427 (Print) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16488163> >.

DAHER, F.; MATTIOLI, R. Impairment in the aversive memory of mice in the inhibitory avoidance task but not in the elevated plus maze through intra-amygdala injections of histamine. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 135, p. 237-45, Aug 2015. ISSN 1873-5177 (Electronic) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26079070> >.

DAVIS, H. P.; SQUIRE, L. R. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*, v. 96, n. 3, p. 518-59, Nov 1984. ISSN 0033-2909 (Print) 0033-2909 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6096908> >.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci*, v. 17, n. 5, p. 208-14, May 1994. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520203> >.

DE ALMEIDA, M. A.; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. Arch Int Pharmacodyn Ther, v. 283, n. 2, p. 193-8, Oct 1986. ISSN 0003-9780 (Print) 0003-9780 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3789882> >.

DEVITO, L. M.; EICHENBAUM, H. Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the "what-where-when" components of episodic-like memory in mice. Behav Brain Res, v. 215, n. 2, p. 318-25, Dec 31 2010. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766146> >.

DIAZ-TRUJILLO, A. et al. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. Neurobiol Learn Mem, v. 91, n. 3, p. 310-4, Mar 2009. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010429> >.

DO-MONTE, F. H. et al. Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. J Neurosci, v. 35, n. 8, p. 3607-15, Feb 25 2015. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25716859> >.

DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. Curr Opin Neurobiol, v. 12, n. 2, p. 211-6, Apr 2002. ISSN 0959-4388 (Print) 0959-4388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015239> >.

DUNBAR, G. L. et al. Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats. Brain Res, v. 604, n. 1-2, p. 266-72, Feb 26 1993. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8457854> >.

EHRLICH, I. et al. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. Neuron, v. 62, n. 6, p. 757-71, Jun 25 2009. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19555645> >.

ESBENSHADE, T. A. et al. The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol*, v. 154, n. 6, p. 1166-81, Jul 2008. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18469850> >.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, v. 76, n. 6, p. 1057-70, Dec 20 2012. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23259943> >.

FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev*, v. 1, n. 4, p. 429-38, Dec 1994. ISSN 1069-9384 (Print) 1069-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24203551> >.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, v. 65, n. 1, p. 7-19, Jan 14 2010. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152109> >.

FANSELOW, M. S.; LEDOUX, J. E. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, v. 23, n. 2, p. 229-32, Jun 1999. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399930> >.

FLEXNER, L. B.; FLEXNER, J. B. Effect of acetoxycycloheximide and of an acetoxycycloheximide-puromycin mixture on cerebral protein synthesis and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 55, n. 2, p. 369-74, Feb 1966. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5220953> >.

FLOOD, J. F. et al. Influence of training strength on amnesia induced by pretraining injections of cycloheximide. *Physiol Behav*, v. 9, n. 4, p. 589-600, Oct 1972. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4677622> >.

FOX, G. B. et al. Pharmacological properties of ABT-239 [4-(2-{2-[(2R)-2-Methylpyrrolidinyl]ethyl}-benzofuran-5-yl)benzonitrile]: II. Neurophysiological characterization and broad preclinical efficacy in cognition and schizophrenia of a potent and selective histamine H3 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 313, n. 1, p. 176-90, Apr 2005. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608077> >.

FRANKLAND, P. W. et al. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, v. 304, n. 5672, p. 881-3, May 7 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131309> >.

FREEMAN, F. M.; ROSE, S. P.; SCHOLEY, A. B. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem*, v. 63, n. 3, p. 291-5, May 1995. ISSN 1074-7427 (Print) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7670843> >.

FULTON, D. et al. A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur J Neurosci*, v. 21, n. 5, p. 1347-58, Mar 2005. ISSN 0953-816X (Print) 953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15813944> >.

GARÇÃO, D. C. et al. Chlorpheniramine impairs functional recovery in *Carassius auratus* after telencephalic ablation. *Braz J Med Biol Res*, v. 42, n. 4, p. 375-9, Apr 2009. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19330266> >.

GARIN-AGUILAR, M. E. et al. Intense aversive training protects memory from the amnestic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, v. 24, n. 1, p. 102-12, Jan 2014. ISSN 1098-1063 (Electronic) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24123595> >.

GIANLORENÇO, A. C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. L-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H(1) receptor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 35, n. 1, p. 91-5, Jan 15 2011. ISSN 1878-4216 (Electronic) 0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20850492> >.

GIANLORENCO, A. C. et al. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H1 but not H2 receptors. *Brain Res Bull*, v. 89, n. 5-6, p. 197-202, Dec 1 2012. ISSN 1873-2747 (Electronic) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986235> >.

_____. Effect of histamine H1 and H2 receptor antagonists, microinjected into cerebellar vermis, on emotional memory consolidation in mice. *Braz J Med Biol Res*, v. 47, n. 2, p. 135-43, Feb 2014. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24519129> >.

GIOVANNINI, M. G. et al. Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *J Neurosci*, v. 23, n. 27, p. 9016-23, Oct 8 2003. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534235> >.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav Neural Biol*, v. 46, n. 1, p. 87-98, Jul 1986. ISSN 0163-1047 (Print) 0163-1047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3015121> >.

GOLD, P. E.; VAN BUSKIRK, R. Enhancement and impairment of memory processes with post-trial injections of adrenocorticotrophic hormone. *Behav Biol*, v. 16, n. 4, p. 387-400, Apr 1976. ISSN 0091-6773 (Print) 0091-6773 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/183641> >.

GOLD, P. E.; WRENN, S. M. Cycloheximide impairs and enhances memory depending on dose and footshock intensity. *Behav Brain Res*, v. 233, n. 2, p. 293-7, Aug 1 2012. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610049> >.

GONZALEZ-SALINAS, S. et al. Protein synthesis is not required for acquisition, consolidation, and extinction of high foot-shock active avoidance training. *Behav Brain Res*, v. 287, p. 8-14, Jul 1 2015. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25813750> >.

GRAF, P.; SCHACTER, D. L. Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*, v. 11, n. 3, p. 501-18, Jul 1985. ISSN 0278-7393 (Print) 0278-7393 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3160813> >.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci*, v. 13, n. 9, p. 651-8, Sep 2012. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850830> >.

HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n. 2, p. 121-30, Feb 2003. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563283> >.

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev*, v. 88, n. 3, p. 1183-241, Jul 2008. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18626069> >.

HERNANDEZ, P. J.; ABEL, T. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem*, v. 89, n. 3, p. 293-311, Mar 2008. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053752> >.

HERRY, C.; JOHANSEN, J. P. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat Neurosci*, v. 17, n. 12, p. 1644-54, Dec 2014. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25413091> >.

HOLLOWAY, C. M.; MCINTYRE, C. K. Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. *Neurobiol Learn Mem*, v. 95, n. 4, p. 425-32, May 2011. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315825> >.

IZQUIERDO, I. et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol*, v. 9, n. 5-6, p. 421-7, Sep 1998. ISSN 0955-8810 (Print) 0955-8810 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832927> >.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*, v. 103, n. 1, p. 1-11, Aug 1999. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10475159> >.

JERUSALINSKY, D. et al. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol*, v. 58, n. 1, p. 76-80, Jul 1992. ISSN 0163-1047 (Print) 0163-1047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1417675> >.

JOHANSEN, J. P. et al. Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nat Neurosci*, v. 13, n. 8, p. 979-86, Aug 2010. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601946> >.

KAMEI, C.; OKUMURA, Y.; TASAKA, K. Influence of histamine depletion on learning and memory recollection in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 111, n. 3, p. 376-82, 1993. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7870977> >.

KAMEI, C.; TASAKA, K. Effect of histamine on memory retrieval in old rats. *Biol Pharm Bull*, v. 16, n. 2, p. 128-32, Feb 1993. ISSN 0918-6158 (Print) 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8364447> >.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, v. 294, n. 5544, p. 1030-8, Nov 2 2001. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691980> >.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The molecular and systems biology of memory. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 163-86, Mar 27 2014. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24679534> >.

KARLSTEDT, K.; JIN, C.; PANULA, P. Expression of histamine receptor genes *Hrh3* and *Hrh4* in rat brain endothelial cells. *Br J Pharmacol*, v. 170, n. 1, p. 58-66, Sep 2013. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23488566> >.

KIM, J. J. et al. Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J Neurosci*, v. 21, n. 14, p. 5222-8, Jul 15 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438597> >.

KIM, J. J.; RISON, R. A.; FANSELOW, M. S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav Neurosci*, v. 107, n. 6, p. 1093-8, Dec 1993. ISSN 0735-7044 (Print) 0735-7044 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136063> >.

KLAPDOR, K.; HASENOHRL, R. U.; HUSTON, J. P. Facilitation of learning in adult and aged rats following bilateral lesions of the tuberomammillary nucleus region. *Behav Brain Res*, v. 61, n. 1, p. 113-6, Mar 31 1994. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8031492> >.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, v. 171, n. 2, p. 157-91, Jan 15 1977. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/64477> >.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol*, v. 178, n. 2, p. 255-80, Mar 15 1978. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/627626> >.

LALUMIERE, R. T.; BUEN, T. V.; MCGAUGH, J. L. Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. *J Neurosci*, v. 23, n. 17, p. 6754-8, Jul 30 2003. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12890768> >.

LATTAL, K. M.; ABEL, T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 13, p. 4667-72, Mar 30 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15070775> >.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, v. 23, p. 155-84, 2000. ISSN 0147-006X (Print) 0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845062> >.

LEDOUX, J. E. Evolution of human emotion: a view through fear. *Prog Brain Res*, v. 195, p. 431-42, 2012. ISSN 1875-7855 (Electronic) 0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230640> >.

LEWIS, M.; HAVILAND-JONES, J. M.; BARRETT, L. F. *Handbook of emotions*. 3rd. New York, N.Y. ; London: Guilford Press, 2008. xvi, 848 p. ISBN 9781609180447 (pbk.) 1609180445 (pbk.).

LI, J. S.; HSIAO, K. Y.; CHEN, W. M. Effects of medial prefrontal cortex lesions in rats on the what-where-when memory of a fear conditioning event. *Behav Brain Res*, v. 218, n. 1, p. 94-8, Mar 17 2011. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115067> >.

LI, S. S.; MCNALLY, G. P. The conditions that promote fear learning: prediction error and Pavlovian fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*, v. 108, p. 14-21, Feb 2014. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684989> >.

LINTUNEN, M. et al. Postnatal expression of H1-receptor mRNA in the rat brain: correlation to L-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. *Eur J Neurosci*, v. 10, n. 7, p. 2287-301, Jul 1998. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749757> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LOGUE, S. F.; PAYLOR, R.; WEHNER, J. M. Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci*, v. 111, n. 1, p. 104-13, Feb 1997. ISSN 0735-7044 (Print) 0735-7044 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9109628> >.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci*, v. 24, p. 897-931, 2001. ISSN 0147-006X (Print) 0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520922> >.

MAREN, S. The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. *Ann N Y Acad Sci*, v. 985, p. 106-13, Apr 2003. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724152> >.

MAREN, S. Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur J Neurosci*, v. 28, n. 8, p. 1661-6, Oct 2008. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973583> >.

MARTINEZ, M. C. et al. Retroactive interference of object-in-context long-term memory: role of dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*, v. 24, n. 12, p. 1482-92, Dec 2014. ISSN 1098-1063 (Electronic) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044872> >.

MATUS-AMAT, P. et al. The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci*, v. 24, n. 10, p. 2431-9, Mar 10 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15014118> >.

MCDONALD, A. J. Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. *J Comp Neurol*, v. 208, n. 4, p. 401-18, Jul 10 1982. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7119168> >.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, v. 153, n. 3742, p. 1351-8, Sep 16 1966. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5917768> >.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science*, v. 287, n. 5451, p. 248-51, Jan 14 2000. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634773> >.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci*, v. 27, p. 1-28, 2004. ISSN 0147-006X (Print) 0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217324> >.

MEIRI, N.; ROSENBLUM, K. Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res*, v. 789, n. 1, p. 48-55, Apr 6 1998. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9602054> >.

MIKI, T. et al. Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus. *Anat Sci Int*, v. 80, n. 3, p. 153-62, Sep 2005. ISSN 1447-6959 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158978> >.

MOGHADDAM, B.; HOMAYOUN, H. Divergent plasticity of prefrontal cortex networks. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 42-55, Jan 2008. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17912252> >.

MONLEON VERDU, S. et al. Effects of anisomycin on inhibitory avoidance in male and female CD1 mice. *Psicothema*, v. 20, n. 3, p. 456-9, Aug 2008. ISSN 0214-9915 (Print) 0214-9915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674443> >.

MOSCARELLO, J. M.; LEDOUX, J. Diverse Effects of Conditioned Threat Stimuli on Behavior. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 79, p. 11-9, 2014. ISSN 1943-4456 (Electronic) 0091-7451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25699986> >.

MOSER, M. B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, v. 8, n. 6, p. 608-19, 1998. ISSN 1050-9631 (Print) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882018> >.

MUNARI, L. et al. Selective brain region activation by histamine H(3) receptor antagonist/inverse agonist ABT-239 enhances acetylcholine and histamine release and increases c-Fos expression. *Neuropharmacology*, v. 70, p. 131-40, Jul 2013. ISSN 1873-7064 (Electronic) 0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23380305> >.

NADER, K. Memory traces unbound. Trends Neurosci, v. 26, n. 2, p. 65-72, Feb 2003. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12536129> >.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature, v. 406, n. 6797, p. 722-6, Aug 17 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963596> >.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. The labile nature of consolidation theory. Nat Rev Neurosci, v. 1, n. 3, p. 216-9, Dec 2000. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257912> >.

NAGHDI, N.; MAJLESSI, N.; BOZORGMEHR, T. The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. Behav Brain Res, v. 139, n. 1-2, p. 69-73, Feb 17 2003. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642177> >.

NAKAYAMA, D. et al. Post-retrieval late process contributes to persistence of reactivated fear memory. Learn Mem, v. 20, n. 6, p. 307-10, Jun 2013. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685762> >.

NEISSER, U. et al. Remembering the earthquake: direct experience vs. hearing the news. Memory, v. 4, n. 4, p. 337-57, Jul 1996. ISSN 0965-8211 (Print) 0965-8211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8817459> >.

NELSON, C.; BAWA, J.; FINGER, S. Radial maze performance after hippocampal lesions: beneficial effects of nimodipine. Restor Neurol Neurosci, v. 4, n. 1, p. 33-40, Jan 1 1992. ISSN 0922-6028 (Print) 0922-6028 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551651> >.

NETTO, C. A.; IZQUIERDO, I. Posterior hypothalamic deafferentation abolishes the amnestic effect of electroconvulsive shock in rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 10, n. 2, p. 159-63, 1985. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2930863> >.

NOACK, J.; MURAU, R.; ENGELMANN, M. Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice. *Front Neurosci*, v. 9, p. 152, 2015. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972782> >.

ONODERA, K. et al. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Prog Neurobiol*, v. 42, n. 6, p. 685-702, Apr 1994. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7938544> >.

ORSINI, C. A.; MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 36, n. 7, p. 1773-802, Aug 2012. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230704> >.

PANULA, P.; NUUTINEN, S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 14, n. 7, p. 472-87, Jul 2013. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23783198> >.

PARE, D. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Prog Neurobiol*, v. 70, n. 5, p. 409-20, Aug 2003. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511699> >.

PARSONS, R. G. et al. Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *Eur J Neurosci*, v. 23, n. 7, p. 1853-9, Apr 2006. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16623842> >.

PASSANI, M. B. et al. Histamine H3 receptor-mediated impairment of contextual fear conditioning and in-vivo inhibition of cholinergic transmission in the rat basolateral amygdala. *Eur J Neurosci*, v. 14, n. 9, p. 1522-32, Nov 2001. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722614> >.

PASSANI, M. B. et al. Histamine in the brain: beyond sleep and memory. *Biochem Pharmacol*, v. 73, n. 8, p. 1113-22, Apr 15 2007. ISSN 0006-2952 (Print) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241615> >.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Compact 2nd. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 012547640X (alk. paper). Disponível em: < <http://www.loc.gov/catdir/description/els041/2003113435.html>.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, v. 106, n. 2, p. 274-85, Apr 1992. ISSN 0735-7044 (Print) 0735-7044 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1590953> >.

PIRATELLO, A. C.; MATTIOLI, R. Effects of Chlorpheniramine and L-histidine on vestibular compensation in goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci Lett*, v. 367, n. 2, p. 160-3, Sep 2 2004. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331143> >.

QI, Z.; GOLD, P. E. Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. *Learn Mem*, v. 16, n. 5, p. 308-14, May 2009. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403793> >.

QUIRK, G. J.; GARCIA, R.; GONZALEZ-LIMA, F. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry*, v. 60, n. 4, p. 337-43, Aug 15 2006. ISSN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16712801> >.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 56-72, Jan 2008. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882236> >.

QUIROZ, C. et al. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Exp Brain Res*, v. 153, n. 3, p. 400-2, Dec 2003. ISSN 0014-4819 (Print) 0014-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557914> >.

RIVEROS, M. E.; FORRAY, M. I.; TORREALBA, F. Infralimbic cortex activation and motivated arousal induce histamine release. *Behav Pharmacol*, v. 26, n. 4, p. 338-44, Jun 2015. ISSN 1473-5849 (Electronic) 0955-8810 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25746330> >.

ROGAN, M. T.; LEDOUX, J. E. Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell*, v. 85, n. 4, p. 469-75, May 17 1996. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8653782> >.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci*, v. 9, n. 1, p. 76-83, Jan 1997. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9042571> >.

ROOZENDAAL, B. et al. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 20, p. 11642-7, Sep 28 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500230> >.

ROSENBLUM, K.; MEIRI, N.; DUDAI, Y. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol*, v. 59, n. 1, p. 49-56, Jan 1993. ISSN 0163-1047 (Print) 0163-1047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8442732> >.

SAH, P.; LOPEZ DE ARMENTIA, M. Excitatory synaptic transmission in the lateral and central amygdala. *Ann N Y Acad Sci*, v. 985, p. 67-77, Apr 2003. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724149> >.

SANTINI, E. et al. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*, v. 24, n. 25, p. 5704-10, Jun 23 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215292> >.

SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci*, v. 20, n. 18, p. RC96, Sep 15 2000. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974093> >.

SERAFIM, K. R. et al. H1-histamine receptors in the amygdala are involved in emotional memory but do not mediate anxiety-related behaviors in mice submitted to EPM testing. *Brain Res Bull*, v. 89, n. 1-2, p. 1-7, Oct 1 2012. ISSN 1873-2747 (Electronic) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772356> >.

SERAFIM, K. R. et al. L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*, v. 43, n. 1, p. 100-6, Jan 2010. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967260> >.

SERAFIM, K. R. et al. H(1) but not H(2) histamine antagonist receptors mediate anxiety-related behaviors and emotional memory deficit in mice subjected to elevated plus-maze testing. *Braz J Med Biol Res*, v. 46, n. 5, p. 440-6, May 2013. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598647> >.

SIERRA-MERCADO, D.; PADILLA-COREANO, N.; QUIRK, G. J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, v. 36, n. 2, p. 529-38, Jan 2011. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962768> >.

SOTRES-BAYON, F.; CAIN, C. K.; LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*, v. 60, n. 4, p. 329-36, Aug 15 2006. ISSN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412988> >.

SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol*, v. 20, n. 2, p. 231-5, Apr 2010. ISSN 1873-6882 (Electronic) 0959-4388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303254> >.

SOULE, J. et al. Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. *Neural Plast*, v. 2008, p. 269097, 2008. ISSN 1687-5443 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190776> >.

SPIELER, R. E. et al. Post-trial administration of H1 histamine receptor blocker improves appetitive reversal learning and memory in goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci Lett*, v. 277, n. 1, p. 5-8, Dec 17 1999. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643884> >.

STRAKHOVA, M. I. et al. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Res*, v. 1250, p. 41-8, Jan 23 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046950> >.

TAUBENFELD, S. M. et al. A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nat Neurosci*, v. 2, n. 4, p. 309-10, Apr 1999. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204535> >.

TEHOVNIK, E. J.; SOMMER, M. A. Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. *J Neurosci Methods*, v. 74, n. 1, p. 17-26, Jun 6 1997. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9210571> >.

TRONEL, S.; SARA, S. J. Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *J Neurosci*, v. 23, n. 13, p. 5472-6, Jul 2 2003. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843246> >.

TULVING, E. Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol*, v. 53, p. 1-25, 2002. ISSN 0066-4308 (Print) 0066-4308 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752477> >.

TURNER, E. Hippocampus and memory. *Lancet*, v. 2, n. 7630, p. 1123-6, Nov 22 1969. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4187005> >.

UYLINGS, H. B. M.; GROENEWEGER, H. J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, v. 146, n. 1-2, p. 3-17, 2003. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432803003346> >.

VALDES, J. L. et al. The infralimbic cortical area commands the behavioral and vegetative arousal during appetitive behavior in the rat. *Eur J Neurosci*, v. 23, n. 5, p. 1352-64, Mar 2006. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16553796> >.

VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 25, p. 15003-7, Dec 8 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9844005> >.

VIANNA, M. R. et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 21, p. 12251-4, Oct 9 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572949> >.

WADA, H. et al. Histaminergic neuron system in the brain: distribution and possible functions. *Brain Res Bull*, v. 27, n. 3-4, p. 367-70, Sep-Oct 1991. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1959031> >.

WANISCH, K.; WOTJAK, C. T. Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol Learn Mem*, v. 90, n. 3, p. 485-94, Oct 2008. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395476> >.

WILENSKY, A. E. et al. Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci*, v. 26, n. 48, p. 12387-96, Nov 29 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17135400> >.

WILENSKY, A. E.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J Neurosci*, v. 20, n. 18, p. 7059-66, Sep 15 2000. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10995852> >.

ZARRINDAST, M. R.; PARSAEI, L.; AHMADI, S. Repeated administration of histamine improves memory retrieval of inhibitory avoidance by lithium in mice. *Pharmacology*, v. 81, n. 2, p. 187-94, 2008. ISSN 1423-0313 (Electronic) 0031-7012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043010> >.

ZHANG, Y.; FUKUSHIMA, H.; KIDA, S. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain*, v. 4, p. 4, 2011. ISSN 1756-6606 (Electronic) 1756-6606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21244716> >.

ZHAO, M. G. et al. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*, v. 47, n. 6, p. 859-72, Sep 15 2005. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157280> >.

ZIMMERMAN, J. M.; MAREN, S. NMDA receptor antagonism in the basolateral but not central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats. *Eur J Neurosci*, v. 31, n. 9, p. 1664-70, May 2010. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525079> >.

Anexo

Artigo aceito para ser publicado na revista Neurobiology of Learning and Memory

DOI: 10.1016/j.nlm.2016.01.012

Title Page

“The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: the involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex”

Canto-de-Souza, L.^{a,b,c,*}, Mattioli, R.^{a,b}

^aLaboratório de Neurociências, Departamento de Fisioterapia, Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luis, Km 235, 13565-905, São Carlos, Brasil;

^aEmail address: mattioli@ufscar.br

^bPrograma de Pós-Graduação em Psicobiologia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Psicologia, Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^cINeC, Instituto de Neurociências e Comportamento, Avenida Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brasil

***Corresponding author**

Lucas Canto de Souza

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900

CEP: 14040-901

Ribeirão Preto – SP – Brazil

Phone number: +55 16 3397-9025

Email address: lucascanto@gmail.com;

Abstract

Several studies using inhibitory avoidance models have demonstrated the importance of limbic structures, such as the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, in the consolidation of emotional memory. However, we aimed to investigate the role of the amygdala (AMG), dorsal hippocampus (DH) and medial prefrontal cortex (mPFC) of mice in the consolidation of step-down inhibitory avoidance and whether this avoidance would be conditioned relative to the intensity of the aversive stimulus. To test this, we bilaterally infused anisomycin (ANI-40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, a protein synthesis inhibitor) into one of these three brain areas in mice. These mice were then exposed to one of two different intensities (moderate: 0.5 mA or intense: 1.5 mA) in a step-down inhibitory avoidance task. We found that consolidation of both of the aversive experiences was mPFC dependent, while the AMG and DH were only required for the consolidation of the intense experience. We suggest that in moderately aversive situations, which do not represent a severe physical risk to the individual, the consolidation of aversive experiences does not depend on protein synthesis in the AMG or the DH, but only the mPFC. However, for intense aversive stimuli all three of these limbic structures are essential for the consolidation of the experience.

Keywords: Emotional memory, anisomycin, medial prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, mice.

1. Introduction

Memory can be inferred through changes in an animal's behavior sometime after a learning task and involves different phases including acquisition, consolidation and retrieval (Abel and Lattal, 2001). Among the different types of memory, such as working and spatial, emotional memory is related to situations with a significant affective character and in which fear/anxiety is felt. The process of memory formation is accompanied by protein synthesis. It has already been demonstrated in various different studies that the formation of long-term memories involving fear can be impaired by inhibiting protein synthesis around the time of learning or shortly afterwards (Bourtchouladze et al., 1998; Johansen et al., 2011; McGaugh, 2000; Rosenblum et al., 1993). Thus, during memory consolidation protein synthesis is required to transform newly learned information, acquired during the acquisition phase, into stable behavioral modifications (Nakayama et al., 2013).

Several studies have made use of amnesic tools, such as sodium channel voltage dependent blockers (lidocaine and tetrodotoxin) (Choudhary et al., 2003; Noack et al., 2015; Quiroz et al., 2003; Tehovnik and Sommer, 1997) and protein synthesis inhibitors such as cycloheximide (Diaz-Trujillo et al., 2009) and anisomycin (ANI), in rodents subjected to various behavioral paradigms (Bekinschtein et al., 2007; Bourtchouladze et al., 1998; Cai et al., 2012; Canal et al., 2007; Lattal and Abel, 2004; Nader et al., 2000; Naghdi et al., 2003; Nakayama et al., 2013; Rosenblum et al., 1993). Anisomycin is isolated from the bacterium *Streptomyces griseolus* and binds to the large subunit of eukaryotic ribosomes (Barbacid and Vazquez, 1974), thereby blocking peptidyl transferase activity and acting as a protein synthesis inhibitor. As a result, ANI can induce amnesia, as protein synthesis is necessary for long-term memory consolidation (Wanisch and Wotjak, 2008).

ANI has been widely used in different fear-motivated learning tasks, such as one-trial inhibitory avoidance tasks (Canal et al., 2007; Canal and Gold, 2007; Monleon Verdu et al., 2008; Qi and Gold, 2009) and one-trial step-down inhibitory avoidance tasks (Camarota et al., 2004; Vianna et al., 2001). In one-trial step-down inhibitory avoidance tasks, rodents associate an elevated platform in a given context with a shock to the foot (US) when they step down from that platform (Gold, 1986). The conditioned response (CR) is to refrain from stepping down. If animals are tested without a shock, that response is then extinguished (Vianna et al., 2001). Paradigms similar to this have been used to investigate the interaction between protein synthesis inhibitors and the intensity of the US on memory consolidation. Some authors found that consolidation impairment induced by protein synthesis inhibitors only occurs with moderate, not high, foot-shocks (Diaz-Trujillo et al., 2009; Gonzalez-Salinas et al., 2015), while Gold and Wrenn (2012) reported an amnesic effect only in the case of high foot-shock intensity. In addition, there is no data in the literature about which brain regions are involved in the modulation of these different responses.

The involvement of limbic structures in the different phases of emotional memory has been reported in several studies (Canal and Gold, 2007; Fanselow, 1994; LeDoux, 2000; McGaugh, 2004; Taubenfeld et al., 1999; Zhang et al., 2011). Decades of research has shown that the rodent amygdala is an important site for the acquisition and storage of aversive memories (Ehrlich et al., 2009; Fanselow, 1994; LeDoux, 2000; 2012; McGaugh, 2004; Wilensky et al., 2006). Furthermore, the amygdala is able to modulate memories of emotional experiences in other brain areas, such as the cortex and the hippocampus (Kim et al., 2001; McGaugh, 2004; Pare, 2003; Roozendaal and McGaugh, 1997; Roozendaal et al., 1999).

The realization that the hippocampus is an important brain structure in processing memory is not a recent one (Turner, 1969). There is ample evidence that the hippocampus participates in processing memories, evaluated using behavioral tests containing spatial components, such as the Morris water maze (Dunbar et al., 1993) and the radial maze (Nelson et al., 1992), object recognition tasks (Soule et al., 2008), and also contextual fear conditioning, such as inhibitory avoidance (Kim et al., 1993; Logue et al., 1997; Matus-Amat et al., 2004; Phillips and LeDoux, 1992; Taubenfeld et al., 1999). Although the hippocampus is related to the acquisition and retrieval of memories (Abel and Lattal, 2001; Fanselow and Dong, 2010), special attention has been given to the dorsal hippocampus when it comes to the consolidation stage of memory. Studies have shown that blocking protein synthesis in this brain area during inhibitory avoidance training can impair memory consolidation (Canal and Gold, 2007; Taubenfeld et al., 1999).

Another brain area that has been demonstrated to have an important role in the regulation or modulation of aversive memories is the medial prefrontal cortex (mPFC) (Frankland et al., 2004; Quirk et al., 2006; Santini et al., 2004; Zhang et al., 2011; Zhao et al., 2005). For example, Corcoran and Quirk (2007) demonstrated that inactivation of the mPFC impairs the recall of fear memories learned the previous day. Further, the formation of inhibitory avoidance memories requires the expression of a gene in the mPFC, suggesting the mPFC is essential in the formation of this type of aversive memory (Zhang et al., 2011). Other studies have emphasized the role of mPFC in the consolidation of memories using diverse tasks, for example the odor–reward association (Tronel and Sara, 2003). In summary, there is evidence that the mPFC plays a critical role in various stages of memory formation over a broad range of tasks (review Euston et al., 2012).

Given that the synthesis of new proteins is necessary for the consolidation of memories and that the combination of protein synthesis inhibitors and different intensities of unconditioned stimulus have generated different behavioral responses regarding the consolidation of emotional memories, we hypothesized that the protein synthesis-dependent plasticity mechanisms aiding the consolidation of memories will vary with brain region and intensity of US. To address this, we investigated the role of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex of mice in the consolidation of step-down inhibitory avoidance under different intensity of US. This was done by bilaterally infusing anisomycin into these brain areas prior to training the mice in the one-trial step-down inhibitory avoidance task.

2. Material and methods

2.1 Animals

Male Swiss mice (Federal University of São Carlos, UFSCar, SP, Brazil), each weighing 27–37 g and aged 7–9 weeks at the time of testing, were housed in polypropylene cages (31×20×13 cm) in groups of five and maintained under a 12 h light cycle (lights on at 7:00 a.m.) in a controlled environment at 23 ± 1 °C. Food and drinking water were provided ad libitum, except during the brief test periods. All mice were experimentally naïve and the experimental sessions were conducted during the light period of the light cycle (11:00–15:00 h).

2.2 Drug

Anisomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted in a sterile 0.9% saline solution and then dissolved in 1 M HCl. The pH was adjusted back to 7 using 1M NaOH (ANI, 40 µg/µl). The vehicle solution consisted of equal amounts of HCl and

NaOH as the anisomycin solution and was used as the experimental control. The substances were coded and the coding was unknown to the experimenter at the time of testing and behavioral analysis. The dose of anisomycin used was based on the work of Wanisch and Wotjak (2008), who demonstrated that this dose of anisomycin was appropriate for influencing the contribution of protein synthesis to the temporal and regional aspects of memory consolidation. The authors also demonstrated that the effects of the ANI reversed 9 h after the injection.

2.3 Experimental procedure

2.3.1 Stereotaxic surgery and microinjections

Mice were anesthetized using an i.p. injection of ketamine hydrochloride (50 mg/kg) plus xylazine (5 mg/kg) and treated, intramuscularly, with flunixin meglumine (Banamine: 2.5 mg/kg) before being placed in a Stoelting stereotaxic instrument (Stoelting Co, Illinois, USA). The stereotaxic coordinates for injection into the amygdala (AMG, -1.4 mm anteroposterior to the bregma (AP), ± 2.7 mm lateral to the midline (L), -2.0 mm ventral to skull surface (V)), dorsal hippocampus (DH, AP -1.8, L ± 1.6 , V -1.5) and medial prefrontal cortex (mPFC, AP +1.7, L ± 0.3 , V -2.0) were taken from Paxinos and Franklin (Paxinos and Franklin, 2004). The stainless steel guide cannula (25-gauge) was implanted bilaterally in the right and left sides of the limbic structures, 1 mm above the injection site. It was then fixed to the skull with acrylic dental cement.

Central injections were performed using an internal cannula (33-gauge), terminating 1 mm below the tip of the guides and connected by polyethylene tubing (PE-10) to a 5- μ l Hamilton syringe. Administration was controlled by an infusion pump (Insight Equipamentos Científicos Ltda, Brazil) programmed to deliver 0.5 μ l over a 90

s period (1 μ l/mouse). The microinjection procedure consisted of gently restraining the animal, inserting the injection unit, infusing the solution, and keeping the injection needle in situ for a further 60 s to avoid reflux. Confirmation of a successful infusion was obtained by monitoring the movement of a small air bubble inside the PE-10 tubing.

2.3.2 Step-down behavioral test

Mice were trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance paradigm (IA) during which stepping-down from a platform presented in a given context (CS) was associated with a foot-shock (US), resulting in an increase in step-down latency (CR). Training was carried out on the fifth day after surgery in a 23x23x24 cm acrylic box (the front wall was made of transparent acrylic) containing a 3 cm high, 5 cm wide and 22.5 cm long wooden platform, coated in plastic laminate, on the right end of a series of 0.3 cm caliber iron bars spaced 1.0 cm apart, which made up the floor of the box (the illumination level in the central area of the box was 280 lux). One hour after the central microinjections (Wanisch and Wotjak, 2008) the mice were placed on the platform facing the rear right corner of the training box. When they stepped down, placing all four paws on the grid floor, they received a moderate (0.5 mA up to 10 s) or intense (1.5 mA for 2 s) scrambled foot-shock and were then withdrawn from the apparatus. Twenty four hours later, they were again placed on the platform as described above and were allowed to move freely without receiving a foot-shock when they stepped down. All procedures were recorded using a digital video camera placed 50 cm in front of the box. The images were analyzed by a highly trained observer and step-down latencies were measured in the training and the test sessions using a chronometer.

2.4 Histology

At the end of testing, all animals received a 0.5 µl infusion of 1% methylene blue via the microinjection procedure described above. The animals then received an anesthetic overdose [ketamine chloridrate (200 mg/Kg) and xylazine (20 mg/kg), i.p.], their brains were removed, and the injection sites were verified histologically according to the atlas of Paxinos and Franklin (2004).

2.5 Statistical analysis

Since a ceiling of 180 s was imposed on the step-down latencies during the retention tests, and this variable neither followed a normal distribution nor fulfilled the assumption of homoscedasticity, the data were analyzed using the Mann–Whitney U test and Wilcoxon Matched Pairs non-parametric test. In all cases a *p*-value of 0.05 or less was required to indicate significance.

2.6 Ethics

The experiments carried out in this study fully complied with the norms of the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), which are based on the US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. In addition, this study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of São Carlos -EAEC/UFSCar (040/2011).

3. Results

Histology confirmed that a total of 101 mice had accurate bilateral cannula placements in the medial prefrontal cortex, amygdala and dorsal hippocampus (Figure 1). The data from animals with injection sites outside the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex were excluded from the study. Therefore, the final sample sizes were as follows: moderate foot-shock (0.5 mA) [AMG (Veh=7,

ANI=6), DH (Veh=7, ANI=8) and mPFC (Veh=9, ANI=8)] and intense foot-shock (1.5 mA) [AMG (Veh=10, ANI=10), DH (Veh=11, ANI=9) and mPFC (Veh=8, ANI=8)].

Fig.1. Schematic representation of the sites of the micro infusions into the mPFC, AMG and DH of the mice (adapted from Paxinos and Franklin, 2004). Sections are between +1.78 and -1.94 mm from the bregma.

3.1 Infusion of anisomycin into the amygdala: moderate foot-shock

Figure 2A represents the effects of anisomycin injected into the amygdala. No significant differences in the step-down latencies were observed between either groups during training (Mann–Whitney U test, $p > 0.05$). However, significant differences between training and test sessions were seen in both groups (Wilcoxon Matched Pairs test, $p < 0.05$). Thus, administration of anisomycin into the amygdala did not impair the consolidation of the moderate aversive stimulus.

3.2 Infusion of anisomycin into the amygdala: intense foot-shock

Data from the vehicle and anisomycin injections into the amygdala are represented in Figure 2B. No significant differences in the step-down latencies were observed between either groups during training (Mann–Whitney U test, $p>0.05$). However, significant differences were seen between training and test sessions in the control group (Wilcoxon Matched Pairs test, $p<0.05$). Administration of anisomycin into the amygdala impaired the consolidation of the intense aversive stimulus on the step-down behavioral task (Wilcoxon Matched Pairs test, $p>0.05$).

Fig.2. Intra AMG microinjection of anisomycin in mice subjected to step-down inhibitory avoidance. (A) Moderate foot-shock–0.5 mA. (B) Intense foot-shock–1.5 mA. Bars represent mean (+SEM) step-down latencies, $n=(6-10)$, nonparametric statistics * $p<0.05$ vs. training of each respective group (Wilcoxon Matched Pairs Test). Veh=vehicle, ANI=anisomycin, AMG=amygdala.

3.3 Infusion of anisomycin into the dorsal hippocampus: moderate foot-shock

The data represented in Figure 3A are the step-down latencies of the mice treated with vehicle or ANI. No significant differences in the step-down latencies were observed between the groups during training (Mann–Whitney U test, $p>0.05$). However, significant differences between training and test sessions were seen in both groups

(Wilcoxon Matched Pairs test, $p < 0.05$). Thus, administration of anisomycin into the DH did not impair the consolidation of the moderate aversive stimulus.

3.4 Infusion of anisomycin into the dorsal hippocampus: intense foot-shock

Figure 3B represents the effects of anisomycin injections into the dorsal hippocampus. No significant differences in the step-down latencies were observed between the groups during training (Mann-Whitney U test, $p > 0.05$). However, significant differences between the training and test sessions were seen in the control group (Wilcoxon Matched Pairs test, $p < 0.05$). Thus, administration of anisomycin into the DH impaired the consolidation of the intense aversive stimulus.

Fig.3. Intra DH microinjections of anisomycin in mice subjected to step-down inhibitory avoidance. (A) Moderate foot-shock–0.5 mA. (B) Intense foot-shock–1.5 mA. Bars represent mean (+SEM) step-down latencies, $n = (7-11)$, nonparametric statistics * $p < 0.05$ vs. training of each respective group (Wilcoxon Matched Pairs Test). Veh=vehicle, ANI=anisomycin, DH=dorsal hippocampus.

3.5 Infusion of anisomycin into the medial prefrontal cortex: moderate foot-shock

Data for the vehicle and anisomycin injections into the medial prefrontal cortex are represented in Figure 4A. No significant differences in the step-down latencies were observed between the groups during training (Mann-Whitney U test, $p>0.05$). However, significant differences between training and test sessions were seen in the control group (Wilcoxon Matched Pairs test, $p<0.05$). Administration of anisomycin into the mPFC impaired the consolidation of the moderate aversive stimulus on the step-down behavioral task

3.6 Infusion of anisomycin into the medial prefrontal cortex: intense foot-shock

A Mann-Whitney U test showed no significant differences between treatments during the training sessions ($p>0.05$). However, significant differences between the training and test sessions were seen in the control group (Wilcoxon Matched Pairs test, $p<0.05$) (Fig. 4B). Thus, administration of anisomycin into the mPFC impaired the consolidation of the intense aversive stimulus.

Fig.4. Intra mPFC microinjections of anisomycin in mice subjected to step-down inhibitory avoidance. (A) Moderate foot-shock–0.5 mA. (B) Intense foot-shock–1.5 mA. Bars represent mean (+SEM) step-down latencies, $n=(8-9)$, nonparametric statistics * $p<0.05$ vs. training of

each respective group (Wilcoxon Matched Pairs Test). Veh=vehicle, ANI=anisomycin, mPFC=medial prefrontal cortex.

4. Discussion

We assessed the involvement of the AMG, DH, and mPFC of mice in the consolidation of two distinct aversive experiences, a moderate one and an intense one. We found that consolidation of both aversive experiences is protein synthesis dependent in mPFC. However, protein synthesis in the AMG and DH are essential only for the consolidation of the intense experience.

Learned fear may be elicited by exposure to environmental cues or contexts that were previously associated with an aversive stimuli (Gross and Canteras, 2012). In rodents, an aversive stimulus may be a predator (fear of predators), a conspecific (fear of aggressive conspecifics) or a harmful stimulus, such as a foot-shock. These different types of fear are processed in three independent neural pathways that include different subnuclei of the amygdala, hypothalamus and periaqueductal grey (PAG) (review Gross and Canteras, 2012). Contextual fear conditioning to aversive stimuli requires the amygdala and hippocampus (Burwell et al., 2004; Johansen et al., 2010), as well as the medial prefrontal cortex (Cenquizca and Swanson, 2007; Corcoran and Quirk, 2007). Evidence suggests that the encoding of learned fear of aversive stimuli requires projections from the ventrolateral periaqueductal grey (vlPAG), via the thalamus, to the cortical association areas that are involved in the higher-order processing of contextual cues (review Gross and Canteras, 2012). The vlPAG responds to aversive stimuli via ascending projections from the spinal cord and is likely to relay expectancy-modulated information to instruct associative plasticity in the hippocampus and amygdala during fear conditioning to aversive stimuli (Johansen et al., 2010).

In step-down inhibitory avoidance (IA), during the training session, rodents associate stepping down from a platform with an unconditioned stimulus (foot-shock). The conditioned response is to avoid stepping down (Cammara et al., 2005; Gold, 1986; Vianna et al., 2001). Unlike mice, this memory task is commonly applied to rats, probably due to the fact that rats (i.e. domesticated rats rather than wild rats) easily express fear behaviors, such as “freezing” and lower risk assessment, when exposed to threat situations (Blanchard et al., 1997). In this study, we demonstrated that vehicle-treated mice, in both aversive conditions, were able to preserve the conditioned response 24 h after the training.

A dominant view of the molecular basis for memory is that during the process of memory consolidation, protein synthesis is required to transform newly learned information into stable modifications (Alberini, 2008; Davis and Squire, 1984; Dudai, 2002; Kandel, 2001; McGaugh, 2000; Nader, 2003). This view is supported by numerous studies showing that inhibiting protein synthesis near the time of training impairs different types of memory in different tasks and species (Abel and Kandel, 1998; Agranoff et al., 1966; Barondes and Cohen, 1968; Bourtchouladze et al., 1998; Flexner and Flexner, 1966; Freeman et al., 1995; Fulton et al., 2005). In the present study, microinjections of ANI into the AMG impaired IA retention only when the aversive stimulus was intense. On the other hand, when the intensity of the foot-shock was moderate these animals maintained the CR, suggesting that protein synthesis in the AMG is not essential for the consolidation of moderate emotional information.

Although opposite results involving the role of the amygdala in the consolidation of Pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance memory have been proposed (Schafe and LeDoux, 2000; Wilensky et al., 2000), Wilensky et al. (2006) demonstrated that the amygdala participates in the Pavlovian fear conditioning circuit. Previous

research has shown that the amygdala is an important brain area related to aversive memories and the formation and expression of emotional memories via projections to many other brain regions involved in storing newly acquired information (Ambrogio Lorenzini et al., 1999; Cahill and McGaugh, 1998; Fanselow and LeDoux, 1999; Izquierdo et al., 1998; Jerusalinsky et al., 1992; LeDoux, 2000; McGaugh, 2004; Moscarello and LeDoux, 2014; Wilensky et al., 2006). Further, it has been demonstrated that the infusion of ANI into the amygdala impairs the consolidation and reconsolidation of fearful memories in rodents (Nader et al., 2000; Nakayama et al., 2013; Parsons et al., 2006; Schafe and LeDoux, 2000; Wilensky et al., 2006). As such, our current research corroborates previous findings showing that this limbic structure is important for the consolidation of inhibitory avoidance memories (Wilensky et al., 2000). However, based on our results, its influence on consolidation might be restricted to intense aversive experiences.

Similar to the data obtained from the AMG, microinjections of ANI into the DH impaired IA retention only when the aversive stimulus was intense. Further, mice that experienced a moderately aversive stimulus showed similar step-down latencies to the control group, suggesting that protein synthesis in the DH is not essential for the consolidation of moderate emotional information. Several studies have demonstrated that consolidation of contextual fear and inhibitory avoidance memories are hippocampus-dependent (Camarota et al., 2005; Kim et al., 1993; Logue et al., 1997; Matus-Amat et al., 2004; Phillips and LeDoux, 1992; Taubenfeld et al., 1999). Further, when protein synthesis is inhibited in this brain area around the time of training the consolidation of the inhibitory avoidance memory might be impaired (Canal and Gold, 2007; Qi and Gold, 2009; Taubenfeld et al., 1999). Our study corroborates these previous findings showing that the hippocampus is important for the consolidation of

inhibitory avoidance memories. However, based on our results, the influence of this limbic structure on consolidation, as in the amygdala, might be restricted to intense aversive experiences.

Several studies have proposed that the mPFC plays an important part in the “what”, “where,” and “when” aspects of episodic-like memory (Barker et al., 2007; DeVito and Eichenbaum, 2010; Li et al., 2011; Martinez et al., 2014) and that this brain structure is related to the consolidation of a wide range of memories (review Euston et al., 2012). For example, the consolidation of contextual fear conditioning depends upon the mPFC (Zhao et al., 2005) and interference with mPFC plasticity immediately after inhibitory avoidance training leads to retention deficits (Holloway and McIntyre, 2011; Zhang et al., 2011). In line with the literature, our data demonstrated that consolidation of a moderate/intense aversive memory depends upon protein synthesis in the mPFC. However, it has been demonstrated that direct intracerebral applications of ANI can have some confounding side effects (Davis and Squire, 1984; Hernandez and Abel, 2008) and the history of the use of protein synthesis inhibitors in memory research has been fraught with controversy. Canal et al. (2007) and Qi and Gold (2009) demonstrated that local infusions of ANI cause a rapid (within 15–30 min) and catastrophic elevation in local extracellular levels of endogenous neuromodulators such as norepinephrine, dopamine, and serotonin. Together, these results suggest an obvious impairment of neural function. Based on this data, two opposing views of the role of protein synthesis inhibitors in memory have been put forward: that new protein synthesis is necessary for memory formation vs. the modulation of memory by these drugs. In the present study, given that the ANI was injected one hour before training and that the effects of ANI are maintained up to 9 h after its injection (Wanisch and Wotjak, 2008), we would suggest

that the impairment promoted by the ANI was due to its protein synthesis inhibitor properties.

The interaction between protein synthesis inhibitors and intensity of foot-shock reported here is the opposite to that previously reported elsewhere (Diaz-Trujillo et al., 2009). In the study of Diaz-Trujillo et al. 2009, higher shock intensities overrode the effects of protein synthesis inhibition (cycloheximide) on memory. Similarly, other studies have demonstrated that the amnesic effects of cycloheximide decrease with increased shock intensity (Flood et al., 1972; Gonzalez-Salinas et al., 2015). Together, these findings suggest that cycloheximide memory impairment is evident only at moderate shock levels but not at high shock levels. However, our data are similar to that of Gold and Wrenn (2012) that showed that the amnesic effects obtained with cycloheximide were only observed when the intensity of the foot-shock was high. A possible explanation for these contrasting results is that the studies described above investigated the involvement of cycloheximide administered systemically (intraperitoneally). Therefore, a direct comparison of these results with our own becomes unfeasible, as we investigated the specific involvement of the AMD, HD and mPFC.

These differential effects of drugs on rodent behavior relative to foot-shock intensity are not novel in the literature (Gold and Van Buskirk, 1976; LaLumiere et al., 2004). Quiroz et al. (2003) demonstrated that the administration of tetrodotoxin, a drug that blocks voltage dependent sodium channels thereby impeding the initiation and propagation of action potentials (Choudhary et al., 2003), into the hippocampus of rats that had been trained with low-intensity foot-shocks caused amnesia. However, rats that had been trained with higher intensity foot-shocks displayed retention scores similar to those of the control rats. A similar study reported that increasing the intensity of the IA

training foot-shock decreases the memory deficits produced when tetrodotoxin is infused into the dorsal hippocampus (Garin-Aguilar et al., 2014). It is worth mentioning that the amnesic tool used in the studies reported above is a drug that blocks voltage dependent sodium channels (tetrodotoxin). Accordingly, this substance prevents the initiation and propagation of action potentials (Choudhary et al., 2003), possibly blocking the acquisition of the memory connected to the aversive stimulus. This is a different mechanism from ANI, which prevents the synthesis of new proteins that are required to strengthen the long-term potential but do not directly interfere with neurotransmission itself.

In the present study, a moderate IA retention was not impaired in mice microinjected with ANI in the AMG or DH. It is known that inhibitory avoidance protocols are amygdala/hippocampal-dependent learning tasks (Bourtchouladze et al., 1998; Cammarota et al., 2005; Izquierdo et al., 1999; Maren, 2001). Therefore, the recruitment of other brain systems appears to enable the storage of such information. Based on our data, the mPFC might be responsible for the storage of moderate information, since mice treated with ANI in the mPFC demonstrated an impairment of IA retention after the moderate aversive stimulus. However, in mice subjected to a strong aversive experience, the AMG, DH, and mPFC were all necessary to maintain the CR. Thus, higher stimuli may be necessary for the AMG and DH to modulate the consolidation of the memory in the mPFC. Lesser stimuli may also activate protein synthesis-dependent plasticity in the AMG and DH, but not enough to consolidate that memory. Therefore, the AMG and DH are crucial for long-term storage of experiences in the mPFC under life-threatening/potential harmful stimuli, but not in situations with lesser aversive characteristics.

In summary, given the results obtained in this study we conclude that in moderately aversive situations the consolidation of such experiences does not depend on protein synthesis in the AMG and DH, but in the mPFC. Therefore, the mPFC might contribute to episodic-like memory for an unpleasant (what) environmental (where) experience. However, in life-threatening situations circuitry involving all three of these limbic structures is essential for the consolidation of such experiences.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza for providing us with the anisomycin and Prof. Dr. Azair Liane Matos do Canto de Souza for allowing us to use her laboratory for the histological analysis. We are grateful for the financial support provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc. 2011/19472-4) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-grant proc.303088/2014-1).

References

- Abel, T., & Kandel, E. (1998). Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev*, 26, 360-378.
- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 180-187.
- Agranoff, B. W., Davis, R. E., & Brink, J. J. (1966). Chemical studies on memory fixation in goldfish. *Brain Res*, 1, 303-309.
- Alberini, C. M. (2008). The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiol Learn Mem*, 89, 234-246.
- Ambrogio Lorenzini, C. G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem*, 71, 1-18.
- Barbacid, M., & Vazquez, D. (1974). (3H)anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. *J Mol Biol*, 84, 603-623.
- Barker, G. R., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci*, 27, 2948-2957.
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1968). Memory impairment after subcutaneous injection of acetoxycycloheximide. *Science*, 160, 556-557.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilacqua, L. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53, 261-277.
- Blanchard, R. J., Griebel, G., Henrie, J. A., & Blanchard, D. C. (1997). Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 783-789.
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., & Kandel, E. R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem*, 5, 365-374.
- Burwell, R. D., Saddoris, M. P., Bucci, D. J., & Wiig, K. A. (2004). Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci*, 24, 3826-3836.
- Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*, 21, 294-299.
- Cai, D., Pearce, K., Chen, S., & Glanzman, D. L. (2012). Reconsolidation of long-term memory in Aplysia. *Curr Biol*, 22, 1783-1788.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Bonini, J. S., Rossatto, J. I., Medina, J. H., & Izquierdo, N. (2004). Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. *Neurotox Res*, 6, 205-212.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Rossatto, J. I., Ramirez, M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol Learn Mem*, 84, 25-32.
- Canal, C. E., Chang, Q., & Gold, P. E. (2007). Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 12500-12505.
- Canal, C. E., & Gold, P. E. (2007). Different temporal profiles of amnesia after intra-hippocampus and intra-amygdala infusions of anisomycin. *Behav Neurosci*, 121, 732-741.

- Cenquizca, L. A., & Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev*, 56, 1-26.
- Choudhary, G., Yotsu-Yamashita, M., Shang, L., Yasumoto, T., & Dudley, S. C., Jr. (2003). Interactions of the C-11 hydroxyl of tetrodotoxin with the sodium channel outer vestibule. *Biophys J*, 84, 287-294.
- Corcoran, K. A., & Quirk, G. J. (2007). Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci*, 27, 840-844.
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*, 96, 518-559.
- DeVito, L. M., & Eichenbaum, H. (2010). Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the "what-where-when" components of episodic-like memory in mice. *Behav Brain Res*, 215, 318-325.
- Diaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcala, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol Learn Mem*, 91, 310-314.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol*, 12, 211-216.
- Dunbar, G. L., Rylett, R. J., Schmidt, B. M., Sinclair, R. C., & Williams, L. R. (1993). Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats. *Brain Res*, 604, 266-272.
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C., & Luthi, A. (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, 62, 757-771.
- Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, 76, 1057-1070.
- Fanselow, M. S. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev*, 1, 429-438.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65, 7-19.
- Fanselow, M. S., & LeDoux, J. E. (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, 23, 229-232.
- Flexner, L. B., & Flexner, J. B. (1966). Effect of acetoxycycloheximide and of an acetoxycycloheximide-puromycin mixture on cerebral protein synthesis and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55, 369-374.
- Flood, J. F., Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R., & Orme, A. E. (1972). Influence of training strength on amnesia induced by pretraining injections of cycloheximide. *Physiol Behav*, 9, 589-600.
- Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L., & Silva, A. J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, 304, 881-883.
- Freeman, F. M., Rose, S. P., & Scholey, A. B. (1995). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem*, 63, 291-295.
- Fulton, D., Kemenes, I., Andrew, R. J., & Benjamin, P. R. (2005). A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur J Neurosci*, 21, 1347-1358.

- Garin-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado-Alcala, R. A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, 24, 102-112.
- Gold, P. E. (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav Neural Biol*, 46, 87-98.
- Gold, P. E., & Van Buskirk, R. (1976). Enhancement and impairment of memory processes with post-trial injections of adrenocorticotrophic hormone. *Behav Biol*, 16, 387-400.
- Gold, P. E., & Wrenn, S. M. (2012). Cycloheximide impairs and enhances memory depending on dose and footshock intensity. *Behav Brain Res*, 233, 293-297.
- Gonzalez-Salinas, S., Medina, A. C., Marin-Vignando, V., Ruiz-Lopez, C. X., Quirarte, G. L., & Prado-Alcala, R. A. (2015). Protein synthesis is not required for acquisition, consolidation, and extinction of high foot-shock active avoidance training. *Behav Brain Res*, 287, 8-14.
- Gross, C. T., & Canteras, N. S. (2012). The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci*, 13, 651-658.
- Hernandez, P. J., & Abel, T. (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem*, 89, 293-311.
- Holloway, C. M., & McIntyre, C. K. (2011). Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. *Neurobiol Learn Mem*, 95, 425-432.
- Izquierdo, I., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Quevedo, J., Rodrigues, C., Sant'Anna, M. K., Madruga, M., & Medina, J. H. (1998). Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol*, 9, 421-427.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*, 103, 1-11.
- Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., Walz, R., Da Silva, R. C., Bianchin, M., Ruschel, A. C., Zanatta, M. S., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1992). Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol*, 58, 76-80.
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147, 509-524.
- Johansen, J. P., Tarpley, J. W., LeDoux, J. E., & Blair, H. T. (2010). Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nat Neurosci*, 13, 979-986.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294, 1030-1038.
- Kim, J. J., Lee, H. J., Han, J. S., & Packard, M. G. (2001). Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J Neurosci*, 21, 5222-5228.
- Kim, J. J., Rison, R. A., & Fanselow, M. S. (1993). Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav Neurosci*, 107, 1093-1098.
- LaLumiere, R. T., Pizano, E., & McGaugh, J. L. (2004). Intra-basolateral amygdala infusions of AP-5 impair or enhance retention of inhibitory avoidance depending on training conditions. *Neurobiol Learn Mem*, 81, 60-66.

- Lattal, K. M., & Abel, T. (2004). Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4667-4672.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 23, 155-184.
- LeDoux, J. E. (2012). Evolution of human emotion: a view through fear. *Prog Brain Res*, 195, 431-442.
- Li, J. S., Hsiao, K. Y., & Chen, W. M. (2011). Effects of medial prefrontal cortex lesions in rats on the what-where-when memory of a fear conditioning event. *Behav Brain Res*, 218, 94-98.
- Logue, S. F., Paylor, R., & Wehner, J. M. (1997). Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci*, 111, 104-113.
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci*, 24, 897-931.
- Martinez, M. C., Villar, M. E., Ballarini, F., & Viola, H. (2014). Retroactive interference of object-in-context long-term memory: role of dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*, 24, 1482-1492.
- Matus-Amat, P., Higgins, E. A., Barrientos, R. M., & Rudy, J. W. (2004). The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci*, 24, 2431-2439.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287, 248-251.
- McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci*, 27, 1-28.
- Monleon Verdu, S., Arenas Fenollar, M. C., Vinader Caerols, C., Ferrer Ano, A., & Parra Guerrero, A. (2008). Effects of anisomycin on inhibitory avoidance in male and female CD1 mice. *Psicothema*, 20, 456-459.
- Moscarello, J. M., & LeDoux, J. (2014). Diverse Effects of Conditioned Threat Stimuli on Behavior. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 79, 11-19.
- Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends Neurosci*, 26, 65-72.
- Nader, K., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406, 722-726.
- Naghdi, N., Majlessi, N., & Bozorgmehr, T. (2003). The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. *Behav Brain Res*, 139, 69-73.
- Nakayama, D., Yamasaki, Y., Matsuki, N., & Nomura, H. (2013). Post-retrieval late process contributes to persistence of reactivated fear memory. *Learn Mem*, 20, 307-310.
- Nelson, C., Bawa, J., & Finger, S. (1992). Radial maze performance after hippocampal lesions: beneficial effects of nimodipine. *Restor Neurol Neurosci*, 4, 33-40.
- Noack, J., Murau, R., & Engelmann, M. (2015). Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice. *Front Neurosci*, 9, 152.
- Pare, D. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Prog Neurobiol*, 70, 409-420.
- Parsons, R. G., Gafford, G. M., Baruch, D. E., Riedner, B. A., & Helmstetter, F. J. (2006). Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *Eur J Neurosci*, 23, 1853-1859.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Compact 2nd ed.). Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.

- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, 106, 274-285.
- Qi, Z., & Gold, P. E. (2009). Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. *Learn Mem*, 16, 308-314.
- Quirk, G. J., Garcia, R., & Gonzalez-Lima, F. (2006). Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry*, 60, 337-343.
- Quiroz, C., Martinez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Diaz-Cintra, S., & Prado-Alcala, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Exp Brain Res*, 153, 400-402.
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci*, 9, 76-83.
- Roozendaal, B., Nguyen, B. T., Power, A. E., & McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11642-11647.
- Rosenblum, K., Meiri, N., & Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol*, 59, 49-56.
- Santini, E., Ge, H., Ren, K., Pena de Ortiz, S., & Quirk, G. J. (2004). Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*, 24, 5704-5710.
- Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci*, 20, RC96.
- Soule, J., Penke, Z., Kanhema, T., Alme, M. N., Laroche, S., & Bramham, C. R. (2008). Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. *Neural Plast*, 2008, 269097.
- Taubenfeld, S. M., Wiig, K. A., Bear, M. F., & Alberini, C. M. (1999). A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nat Neurosci*, 2, 309-310.
- Tehovnik, E. J., & Sommer, M. A. (1997). Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. *J Neurosci Methods*, 74, 17-26.
- Tronel, S., & Sara, S. J. (2003). Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *J Neurosci*, 23, 5472-5476.
- Turner, E. (1969). Hippocampus and memory. *Lancet*, 2, 1123-1126.
- Vianna, M. R., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12251-12254.
- Wanisch, K., & Wotjak, C. T. (2008). Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol Learn Mem*, 90, 485-494.
- Wilensky, A. E., Schafe, G. E., Kristensen, M. P., & LeDoux, J. E. (2006). Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the

- acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci*, 26, 12387-12396.
- Wilensky, A. E., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J Neurosci*, 20, 7059-7066.
- Zhang, Y., Fukushima, H., & Kida, S. (2011). Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain*, 4, 4.
- Zhao, M. G., Toyoda, H., Lee, Y. S., Wu, L. J., Ko, S. W., Zhang, X. H., Jia, Y., Shum, F., Xu, H., Li, B. M., Kaang, B. K., & Zhuo, M. (2005). Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*, 47, 859-872.