

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

EDUARDO SILVA DE ASSIS BRASIL

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT_{5A},
5-HT₆ E 5-HT₇ NA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Eduardo Silva de Assis Brasil

**Investigação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e
5-HT₇ na extinção da memória de medo condicionado ao contexto**

Porto Alegre

2019

EDUARDO SILVA DE ASSIS BRASIL

Investigação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ na extinção da memória de medo condicionado ao contexto

Tese de doutorado apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo
Coorientadora: Prof. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw

Porto Alegre

2019

Ficha Catalográfica

D278i de Assis Brasil, Eduardo Silva

Investigação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 na extinção da memória de medo condicionada ao contexto / Eduardo Silva de Assis Brasil . – 2019.

54.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw.

1. Memória. 2. Medo condicionado ao contexto. 3. Extinção. 4. Serotonina. I. Izquierdo, Ivan. II. Myskiw, Jociane de Carvalho. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Saete Maria Sartori CRB-10/1363

EDUARDO SILVA DE ASSIS BRASIL

Investigação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 na extinção da memória de medo condicionado ao contexto

Tese de doutorado apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Faculdade de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 26 de Fevereiro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Carolina Garrido Zinn – Centro Universitário da Serra Gaúcha

Dr. Regis Gemerasca Mestriner – PUCRS

Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira – PUCRS

Dra. Renata Kochhann – PUCRS

Dra. Zaquer Suzana Munhoz Costa Ferro – PUCRS - Suplente

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Ricardo e Susimari, que sempre estiveram ao meu lado e me deram todo o apoio do mundo durante a minha vida pessoal e acadêmica. Vocês são a razão de todas as minhas conquistas. Muito obrigado por serem exemplos de pessoas e profissionais pra mim. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Douglas e Diogo por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos e estarem ao meu lado.

As minhas cunhadas, Carolinne e Laura, que são como irmãs pra mim e também sempre me deram apoio.

A minha dinda, Silvia, que sempre me incentivou a fazer pesquisa e seguir a área acadêmica.

Ao meu orientador, professor Iván Izquierdo, por ter me dado a oportunidade de ser seu orientando e ter me recebido tão bem no laboratório. Foi uma honra ser seu aluno. Você é um exemplo de professor e pessoa pra mim.

A minha co-orientadora, professora Jociane de Carvalho Myskiw, por todo apoio do mundo durante essa jornada, com certeza sem a sua ajuda não teria conseguido alcançar essa conquista. Muito obrigado por tudo o que me ensinaste e por acreditar em mim.

A professora Cristiane R. G. Furini, você foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal, sem a sua ajuda e apoio esse trabalho não teria sido possível. Muito obrigado por tudo.

Aos colegas que fizeram ou ainda fazem parte do Centro de Memória e que foram essências para o desenvolvimento desse trabalho, Scheila Schmidt, Fernanda da Silva Rodrigues, Eduarda Godfried Nachtigall, Jonny Anderson Kielbovicz Behling, Bruna Freitas Saenger, Rodrigo, Letícia Buhler, Lucas Marcondes, Clarissa Penha Fariase e demais colaboradores, muito obrigado pela amizade e companheirismo. O auxílio de vocês foi fundamental nesta jornada.

RESUMO

As memórias de medo podem levar a comportamentos defensivos exagerados em resposta a ameaças, como ocorre no Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT). A extinção, novo aprendizado que se sobrepõe à memória original e inibe sua evocação, pode ser útil para restringir a expressão das memórias de medo a situações adequadas. O hipocampo e a amígdala basolateral (ABL) são estruturas essenciais para que ocorra a extinção. Esse processo pode ser modulado por diferentes fármacos e neurotransmissores, como por exemplo, a serotonina. O sistema serotoninérgico possui receptores localizados em diversas áreas no cérebro e seu papel é bem documentado em diversas tarefas comportamentais. Sabe-se que os receptores mais recentemente descritos 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 estão relacionados com a formação de alguns tipos de memória, entretanto nada se sabe sobre a participação desses receptores no processo de extinção da memória de medo. Portanto este estudo visa investigar o papel dos receptores 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 na extinção da memória de medo condicionada ao contexto. Para isso, ratos *Wistar* machos com cânulas implantadas na região de CA1 do hipocampo ou ABL foram submetidos ao protocolo de extinção da memória de medo condicionado ao contexto e receberam infusões de agonistas e antagonistas dos receptores 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 imediatamente ou 3h após a extinção e testados 24h depois. Quando os fármacos foram infundidos em CA1 imediatamente ou 3h após a extinção, os animais não apresentaram diferença em relação ao grupo controle. Entretanto, quando os antagonistas dos receptores 5-HT5A e 5-HT7 foram infundidos imediatamente ou 3h após a extinção na ABL foi visto uma facilitação no processo de extinção, esse efeito também foi visto quando infundido o antagonista 5-HT6 apenas imediatamente após a extinção na ABL, já os grupos que receberam os agonistas desses receptores não foram diferentes do grupo controle. Concluindo, o bloqueio dos receptores 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 na ABL, mas não na região CA1 do hipocampo, foi capaz de facilitar a consolidação da extinção.

Palavras chaves: Memória, Medo condicionado ao contexto, Extinção, Serotonina, Hipocampo, Amígdala.

ABSTRACT

Fear memories can lead to exaggerated defensive behavior in response to threats, such as Post Traumatic Stress Disorder (PTSD). Extinction is the learned inhibition of retrieval, it may be useful in restricting the expression of fear memories to appropriate situations. The hippocampus and basolateral amygdala (ABL) are essential for extinction to occur. This process can be modulated by different drugs and neurotransmitters, for example, serotonin. The serotonergic system has receptors located in several areas in the brain and its role is well documented in various behavioral tasks. It is known that the most recently described receptors 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ are related to the formation of some types of memory, however the role of these receptors in the process of extinction of fear memory remains unknown. Therefore, this study aims to investigate the role of 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors in the extinction of context-conditioned fear memory. For this, male Wistar rats with cannulas implanted in the CA1 region of the hippocampus or ABL were submitted to the context-dependent fear memory extinction protocol and received infusions of agonists and antagonists of the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors immediately or 3 hours after extinction and tested 24 hours later. When the drugs were infused in CA1 immediately or 3 h after extinction training, the animals did not present difference in relation to the control group. However, when 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptor antagonists were infused immediately or 3 h after extinction training in the ABL, the process of extinction was facilitated, this effect was also seen when infused 5-HT₆ antagonist only immediately after extinction training in the ABL, the groups that received the agonists of these receptors did not differ from the control group. In summary, the antagonists of the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors in the ABL, but not in the CA1 region of the hippocampus, was able to facilitate de extinction consolidation.

Keywords: Memory, Conditioned fear, Extinction, Serotonin, Hippocampus, Amygdala.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Foto representativa do aparato experimental utilizado para a tarefa de medo condicionado ao contexto	23
Figura 2: Representação do protocolo experimental.....	24
Figura 3 – Participação dos receptores 5-HT5A na extinção da memória de medo condicionado ao contexto	27
Figura 4 – Participação dos receptores 5-HT6 na extinção da memória de medo condicionado ao contexto	29
Figura 5 – Participação dos receptores 5-HT7 na extinção da memória de medo condicionado ao contexto.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 MEMÓRIA	13
2.1.1 CONDICIONAMENTO CLÁSSICO E EXTINÇÃO	15
2.2 ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS ENVOLVIDAS NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS	16
2.3 SISTEMA SEROTONINÉRGICO	16
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 MÉTODOS	21
4.1 ANIMAIS.....	21
4.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	21
4.3 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS.....	21
4.4 INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS	22
4.5 TAREFAS COMPORTAMENTAIS	22
4.5.1 MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO	22
4.5.1.1 PROTOCOLO DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO	23
4.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REGIÃO ESTUDADA	24
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	25
5 RESULTADOS	26
5.1. O ANTAGONISTA DO RECEPTOR 5-HT _{5A} FACILITA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO SOMENTE NA ABL IMEDIATAMENTE E 3 H APÓS A EXTINÇÃO	26
5.2. O ANTAGONISTA DO RECEPTOR 5-HT ₆ FACILITA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO SOMENTE NA ABL IMEDIATAMENTE APÓS A EXTINÇÃO	28
5.3. O ANTAGONISTA DO RECEPTOR 5-HT ₇ FACILITA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO SOMENTE NA ABL IMEDIATAMENTE E 3H APÓS A EXTINÇÃO	30
6 DISCUSSÃO	32

REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA	49
ANEXO 2 – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	50
ANEXO 3 – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	51
ANEXO 4 – ARTIGO.....	53

1 INTRODUÇÃO

A memória é a capacidade do cérebro em adquirir, armazenar e evocar informações (IZQUIERDO, 2011; KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014). Dentre as diferentes estruturas encefálicas envolvidas no processamento das memórias merecem destaque o hipocampo, a amígdala basolateral (ABL) e o córtex pré-frontal (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Estas regiões também estão envolvidas na extinção da memória de medo (VIANNA; COITINHO; IZQUIERDO, 2004; FIORENZA et al., 2012; ORSINI; MAREN, 2012; ORSINI; YAN; MAREN, 2013; PARSONS; RESSLER, 2013;).

O medo excessivo é uma das marcas de diversas patologias psiquiátricas, como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT), fobias e ansiedade. O TEPT por exemplo é uma doença que o indivíduo pode desenvolver quando exposto a um evento traumático, como abuso sexual, agressão física ou psicológica, guerra ou acidente automobilístico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Nos Estados Unidos, cerca de 3,5% dos adultos têm TEPT, e 9% das pessoas irão desenvolvê-lo em algum momento de sua vida (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Os sintomas podem incluir pensamentos perturbadores, sentimentos ou sonhos relacionados ao evento, ansiedade, tentativas de evitar situações relacionadas ao trauma, alterações no modo como a pessoa pensa e sente e aumento da resposta de luta ou fuga (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Os antidepressivos que agem como inibidores seletivos da recaptção da serotonina são os medicamentos de primeira linha para o tratamento do TEPT (BERGER et al., 2009). A extinção, um novo aprendizado, clinicamente chamada de terapia de exposição é considerada uma das principais formas de tratamento para o TEPT e outros distúrbios de ansiedade (RESCORLA, 2001; 2004; PONNUSAMY 2016). Existem, porém, vários efeitos secundários desse tratamento, como a ansiedade às vezes causada pela evocação do episódio traumático durante a terapia (RESCORLA, 2001; 2004). Além disso, não está claro se o uso de medicamentos e terapia em conjunto tem maior benefício (HETRICK et al., 2010; BISSON et al., 2015). Uma vez que a terapia de exposição ainda é uma importante ferramenta terapêutica pro tratamento de diversas patologias como TEPT, fobias e ansiedade, é clara a necessidade de um melhor entendimento sobre os processos celulares e moleculares

envolvidos na formação dessa memória de extinção e o desenvolvimento de estratégias comportamentais ou farmacológicas que possam facilitar este processo.

Neste contexto, existem vários fatores que podem modular a extinção da memória, como por exemplo, estado de ânimo, uso de drogas, exposição a uma novidade e a atividade de neurotransmissores (FIORENZA et al., 2012; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014, 2015).

Dentre os sistemas de neurotransmissores que estão envolvidos na extinção da memória de medo, encontra-se o sistema serotoninérgico (5-HT), que é posicionado para modular o circuito de extinção através de projeções ascendentes de 5-HT surgindo dos núcleos da rafe que inervam certas estruturas cerebrais incluindo o ABL, o hipocampo e o córtex pré-frontal (BURGHARDT & BAUER, 2013). As pesquisas concentraram-se principalmente no papel dos receptores serotoninérgicos 5-HT1A, 5-HT2 e 5-HT3 na extinção da memória de medo (SINGEWALD, SCHMUCKERMAIR, WHITTLE, HOLMES, & RESSLER, 2014). No entanto, o papel de outros receptores 5-HT na extinção não tem sido amplamente explorado. Por exemplo, os receptores serotoninérgicos 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 afetam diferentes mecanismos de memória em várias tarefas comportamentais, como o labirinto aquático, o reconhecimento de objetos, o labirinto em T e o medo condicionado ao contexto (CFC) (HIRST et al., 2006; GONZÁLEZ, CHÁVEZ-PASCACIO E MENESES, 2013; LIU ET AL., 2016; TAKEDA, TSUJI, MIYAGAWA E TAKEDA, 2017; YAMAZAKI et al., 2014; YAMAZAKI, OKABE, YAMAMOTO, YARIMIZU , & HARADA, 2015; ZAREIFOPOULOS & PAPTHEODOROPOULOS, 2016). Entretanto, seus papéis na extinção de CFC não foram estudados até o momento. Além disso, estudos recentes demonstraram um envolvimento desses receptores em processos fisiopatológicos envolvidos na doença de Alzheimer e esquizofrenia, evidenciando assim suas possibilidades terapêuticas (DE BRUIN ET AL., 2016; GONZÁLEZ-VERA ET AL., 2017; KASSAI et al., 2012; QUIEDEVILLE ET AL., 2014; THOMAS, 2006; YAMAZAKI et al., 2014, 2015; ZAREIFOPOULOS & PAPTHEODOROPOULOS, 2016).

A aplicação clínica da extinção reforça a necessidade de compreender melhor seus processos, especialmente aqueles relacionados à sua modulação por agentes farmacológicos (FIORENZA et al., 2012; FURINI et al., 2017; MILAD & QUIRK, 2012; SINGEWALD et al., 2014). Portanto, aqui investigamos se os receptores serotoninérgicos mais recentemente descritos, 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 na

região CA1 do hipocampo e do ABL participam da consolidação da extinção do CFC, através da administração local de agonistas e antagonistas destes receptores. Dois momentos diferentes de infusão foram escolhidos para investigar o tempo de ação desses receptores na consolidação da extinção. Os momentos de infusão foram escolhidos com base em dois trabalhos de Izquierdo et al. (2006 a, b) que mostraram que a formação de memória e a produção cAMP do hipocampo de ratos na consolidação da tarefa de esquiva inibitória foram detectadas imediatamente e 3 horas após o treinamento (IZQUIERDO et al., 2006a, b) e o recente trabalho de Schmidt e colaboradores mostrando que esses três receptores serotoninérgicos na região CA1 do hipocampo estão envolvidos na consolidação e/ou reconsolidação da memória CFC quando agonistas ou antagonistas foram infundidos imediatamente ou 3 horas após a consolidação ou reconsolidação da memória CFC (SCHMIDT et al., 2017).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MEMÓRIA

A memória pode ser definida como a retenção de uma informação aprendida (BEAR, 2002), resultante da capacidade de lembrarmos experiências e aprendizados previamente adquiridos e armazenados (KOLB; WHISHAW, 2002; IZQUIERDO, 2011). A memória é o que nos permite saber quem somos e onde estamos, por exemplo. Todo o nosso conhecimento sobre o mundo, a nossa identidade, a forma como nos relacionamos com outras pessoas, são consequências da formação de memórias (SQUIRE et al., 2003; IZQUIERDO, 2011). As memórias podem ser classificadas pelo seu conteúdo ou pelo seu tempo de duração.

Quanto à natureza de seu conteúdo, elas podem ser divididas em memórias explícitas ou declarativas, e memórias implícitas ou não declarativas (BEAR, 2002; SQUIRE et al., 2003; IZQUIERDO, 2011). As memórias explícitas ou declarativas dependem do hipocampo e estruturas relacionadas ao lobo temporal (IZQUIERDO et al., 2006) e podem ser subdivididas em episódica e semântica. As memórias episódicas nos permitem lembrar detalhes sobre eventos ocorridos no passado, como por exemplo, assistir ao nascimento de um filho (BURIANOVA; MCINTOSH; GRADY, 2010; IZQUIERDO, 2011; RENOULT et al., 2012). A memória semântica se refere a conhecimentos em geral que não tenham referências espacial ou temporal, como a língua inglesa e o significado das palavras (DICKERSON; EICHENBAUM, 2009; BURIANOVA; MCINTOSH; GRADY, 2010; IZQUIERDO, 2011; RENOULT et al., 2012).

As memórias implícitas ou não declarativas dependem do estriado e suas conexões (IZQUIERDO et al., 2006). Essas memórias são responsáveis pelas habilidades motoras, capacidade de se habituar, o *priming*, que é evocar uma memória através de uma dica. As memórias implícitas também são as memórias de treinamento em tarefas de condicionamento clássico (BEAR, 2002; IZQUIERDO, 2011).

Já em relação ao tempo de duração e função, as memórias podem ser divididas em: memória de trabalho, memórias de curta duração e memórias de longa duração. A memória de trabalho depende do córtex pré-frontal (IZQUIERDO, 2011; ZANTO et al., 2011). Quando escutamos a uma palestra, não conseguimos recordar exatamente

de todas as palavras ditas, mas a memória de trabalho nos permite, em poucos segundos, lembrar a informação proveniente da frase dita. É este tipo de memória que determina se a informação é nova para o indivíduo e se deve ou não ser armazenada. A memória de trabalho tem como única função analisar as informações provenientes do ambiente, e não perdura mais do que 1 a 3 minutos (BADDELEY, 1992; D'ESPOSITO et al., 1995; IZQUIERDO, 2011).

As memórias de curta duração armazenam poucas informações por um período de 3 a 6 horas. Formamos continuamente essas memórias e as usamos para lembrar do que aconteceu há algumas horas e darmos continuidade ao nosso dia a dia (SQUIRE et al., 2003; IZQUIERDO, 2011). Já as memórias de longa duração são armazenadas durante um longo período de tempo, podem durar dias, meses ou anos (IZQUIERDO et al., 1999; QUEVEDO et al., 2002). A sua formação envolve a ocorrência de eventos bioquímicos, como a síntese de novas proteínas, na região CA1 do hipocampo dorsal e em suas projeções (IZQUIERDO et al., 1999), originando novas conexões sinápticas (IZQUIERDO et al., 1999; QUEVEDO et al., 2003; ROSSATO et al., 2007; IZQUIERDO, 2011; KANDEL, 2014).

O processo de formação e armazenamento da memória de longa duração envolve diferentes fases. A aquisição, que constitui a fase em que ocorre a aprendizagem. Logo após, vem a fase de consolidação, processo em que as memórias são armazenadas de forma estável (MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000; IZQUIERDO et al., 2006; IZQUIERDO, 2011). As memórias consolidadas podem ser evocadas, esse processo comprova que o aprendizado realmente gerou uma memória (IZQUIERDO, 2011). A memória, quando evocada torna-se instável (IZQUIERDO et al., 2006), entretanto estudos recentes demonstram que a evocação não é obrigatória para que a memória se torne instável (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016) e possa seguir um dos dois processos: reconsolidação e extinção. A reconsolidação permite que novas informações sejam inseridas ao conteúdo de uma memória já existente (AKIRAV; MAROUN, 2012; ALBERINI; LEDOUX, 2013). Já o processo de extinção consiste em um novo aprendizado que se sobrepõe ao aprendizado original, ou seja, uma nova memória que inibe a evocação de uma memória previamente consolidada (FIORENZA et al., 2011, 2012; FURINI et al., 2013; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). Tanto a reconsolidação quanto a extinção dependem da síntese de novas proteínas

(LEDOUX, 2000; VIANNA et al., 2001; MAMIYA et al., 2009; NADER; SCHAFE; BAILEY; BALSAM, 2013).

2.1.1 CONDICIONAMENTO CLÁSSICO E EXTINÇÃO

O processo de extinção foi documentado pela primeira vez em 1927 pelo cientista russo Ivan Pavlov. Ele observou que ao apresentar um pedaço de carne para cães, os mesmo salivavam (resposta incondicionada). Em seu experimento pareou diversas vezes um som (estímulo neutro; condicionado) com a apresentação da carne (estímulo incondicionado), e percebeu que ao apresentar somente o som sem a presença da carne, os cães emitiam uma resposta condicionada de salivação. Este processo denomina-se condicionamento Pavloviano ou condicionamento clássico. Pavlov também observou que a repetida apresentação do som (estímulo condicionado) na ausência da carne (estímulo incondicionado) acarretava numa gradual diminuição da salivação (resposta condicionada), este processo recebeu o nome de extinção (RESCORLA, 2004; MUELLER; CAHILL, 2010; ORSINI; MAREN, 2012; FURINI et al., 2013; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

O tempo de exposição ao estímulo condicionado é importante para que o processo de extinção ocorra, se a exposição for muito breve, ela não será suficiente para formar a memória de extinção (MALDONADO, 2003; SUZUKI et al., 2004; MUELLER; CAHILL, 2010). Outro fator importante, a extinção não é uma forma de esquecimento, visto que não ocorre a perda da memória, mas sim um decréscimo da resposta condicionada (MONFILS et al., 2009; PIZZORUSSO, 2009; FIORENZA et al., 2011; KAPLAN; MOORE, 2011; ORSINI; MAREN, 2012; BENTZ et al., 2013). No esquecimento verdadeiro, as memórias desaparecem pela ausência prolongada de sua evocação, por atrofia sináptica (IZQUIERDO et al., 2006) ou por patologias, como na doença de Alzheimer (EL HAJ; KESSELS, 2013).

Uma vez que a memória de extinção é um novo aprendizado ela necessita ser consolidada e esse processo requer a participação de diferentes sistemas de neurotransmissores e estruturas encefálicas, como por exemplo o hipocampo e a amígdala (FIORENZA et al., 2012; KAPLAN; MOORE, 2011; ORSINI; MAREN, 2012).

Diferentes neurotransmissores são capazes de modular a extinção da memória. O sistema serotoninérgico, por exemplo, possui um papel importante em diversos aspectos fisiológicos e cognitivos (MOHAMMAD; MOSES; GWALTNEY, 2008). Entre

esses processos, encontra-se a extinção da memória de medo (STEIN et al., 2000; WELLMAN et al., 2007; HARTLEY et al., 2012; PARK; WILLIAMS, 2012; ZHANG et al., 2013), principalmente através dos receptores 5-HT1A, 5-HT2A e 5-HT3 (QUARTERMAIN; CLEMENTE; SHEMER, 1993; KONDO et al., 2013; ZHANG; STACKMAN, 2015).

2.2 ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS ENVOLVIDAS NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS

O hipocampo e a amígdala desempenham um papel crucial na consolidação de memória aversiva (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000), e também participam do processo de evocação juntamente com o Córtex Pré-frontal (BARROS et al., 2001; RISIUS et al., 2013). Estas mesmas estruturas também são essenciais para o processo de extinção (VIANNA; COITINHO; IZQUIERDO, 2004; FIORENZA et al., 2012; ORSINI; MAREN, 2012; ORSINI et al., 2013; PARSONS; RESSLER, 2013;).

O hipocampo é uma estrutura em forma de um “C” situado na parte caudal do cérebro, e é dividido em três sub-regiões: o giro denteado, o subículo e o hipocampo, que consiste das regiões CA1, CA2 e CA3. Das três regiões, a CA1A é a área que parece realmente estar mais envolvida com a extinção de memória (FIORENZA et al., 2012; ORSINI; MAREN, 2012).

Outra importante estrutura para a formação de memórias é amígdala, uma estrutura em forma de amêndoa, bem delimitada, localizada no lobo temporal. Consiste de aproximadamente 12 diferentes regiões que são divididas em sub-regiões, sendo a basolateral a que parece estar mais envolvida com a extinção de memórias (FIORENZA et al., 2012; ORSINI; MAREN, 2012).

2.3 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

A serotonina é uma monoamina biogênica sintetizada a partir do aminoácido triptofano, pela enzima triptofano hidroxilase, que converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano. A seguir, a L-aminoácido aromático descarboxilase converte o 5-hidroxitriptofano no neurotransmissor serotonina (MOHAMMAD et al., 2008). Os neurônios serotoninérgicos têm origem nos núcleos da rafe no sistema nervoso

central, e seus axônios chegam em diferentes estruturas cerebrais, incluindo a amígdala e o hipocampo (CAREYA; DAMIANOPOULOS, 2015).

O sistema serotoninérgico exerce a sua ação através de quatorze receptores diferentes que estão agrupados em sete famílias: 5-HT1 (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E e 5-HT1F), 5-HT2 (5-HT2A, 5-HT2B e 5-HT2C), 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5 (5-HT5A, 5-HT5B), 5-HT6 e 5-HT7, sendo que 13 desses receptores são metabotrópicos acoplados a proteínas G e apenas o receptor 5-HT3 é ionotrópico (GÖTHERT, 2013; MENESES, 2015; PITHADIA; JAIN, 2009). A serotonina exerce um papel importante sobre o sistema motor, ciclo sono-vigília, estabilidade respiratória e desenvolvimento embrionário (MOHAMMAD et al., 2008). Além disso, esse neurotransmissor está relacionado com diferentes aspectos cognitivos e distúrbios psiquiátricos (MOHAMMAD, 2008; BONAVENTURE et al., 2011; COWEN; SHERWOOD, 2013; HARRELL; ALLAN, 2003; MENESES 1999; WILLIAMS et al., 2002). A 5-HT também é capaz de modular o estado de ansiedade, agressividade e impulsividade (YOKOYAMA et al., 2015).

Estudos prévios demonstraram a participação de diferentes receptores serotoninérgicos nos processos de consolidação, reconsolidação e extinção de memória de medo condicionado ao contexto (WELLMAN et al., 2007; HOMBERG, 2012; QUARTERMAIN; CLEMENT; SHEMER, 2013; KONDO et al., 2013; ZHANG et al., 2013; SCHMIDT et al., 2016).

Entre os vários receptores de serotonina, os receptores 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 foram os mais recentemente descritos (BARD et al., 1993; RUAT et al., 1993; MATTHES et al., 1993). Esses receptores parecem estar relacionados com diferentes processos envolvidos na formação de memórias, que serão discutidos posteriormente neste trabalho (WOOLLEY et al., 2001; WOOLLEY et al., 2003; ERIKSON et al., 2012; WOODS et al., 2012; GONZALEZ; CHÁVEZ-PASCACIO; MENESES 2013; RAMÍREZ, 2013; QUIEDEVILLE et al., 2014; STIEDL et al., 2015; MENESES; GASBARRI, 2016), entretanto as suas participações na extinção da memória de medo condicionada ao contexto ainda não foram descritas.

O receptor 5-HT5A é um receptor metabotrópico acoplado a proteína G, Carson et al. demonstrou em 1996 uma relação negativa entre a ativação desse receptor e a atividade da adenilato ciclase, diminuindo a adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Vários outros pesquisadores confirmaram que a ativação do receptor 5-HT5A inibiu a atividade da adenilato ciclase e suprimiu a acumulação de AMPc (VOLK et al., 2010).

Em 2003, Noda et al. demonstrou que os receptores 5-HT₅ diminuiu a adenosina difosfato cíclico ribose (cADPR) e inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃). A diminuição de cADPR reduz o Ca²⁺ intracelular segundo mensageiro. Estudos imunohistoquímicos de localização de RNA mensageiro (mRNA) demonstraram que os receptores 5-HT_{5A} são amplamente expressos no sistema nervoso central, especialmente nos núcleos da rafe e em outras áreas do cérebro, como o córtex cerebral, o hipocampo e a amígdala (OLIVER, KINSEY, WAINWRIGHT E SIRINATHSINGHJI, 2000). Esta informação fornece suporte adicional que os receptores 5-HT_{5A} estão distribuídos nas áreas do cérebro envolvidas na aprendizagem e memória (THOMAS, 2006).

O receptor 5-HT_{6R} também é metabotrópico e acoplado à proteína G, que nesse caso, estimula positivamente a atividade da adenilato ciclase. Essa estimulação resulta em um aumento da liberação de AMPc, que ativa proteína quinase A (PKA), levando a fosforização proteica. Entretanto, o 5-HT_{6R} também tem sido associado a várias outras vias de sinalização celular, incluindo a Fyn-tirosina quinase e canais de K⁺. Mais recentemente, três vias independentes da proteína G estavam envolvidas na sinalização do receptor 5-HT₆: quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1 / 2), que desempenha um papel importante na proliferação das células, sobrevivência celular e morte celular; um segundo caminho levando à ativação do Jun; e mais recentemente, via alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que desempenha um papel importante no neurodesenvolvimento (KARILA et al, 2015). O receptor 5-HT₆ é principalmente localizado no sistema nervoso central, o que indica seu importante papel na regulação de várias atividades cerebrais, como a cognição e a memória (LIU et al., 2016; WILKINSON, WINDFELD, & COLDING -JORGENSEN, 2014).

O receptor 5-HT₇ também é acoplado a proteína G e propaga o seu sinal através de uma via que inclui a ativação da adenilato ciclase e aumenta a produção de AMPc e ativando a PKA. Uma das primeiras cascatas de sinalização a ser associada ao 5-HT₇ foi a ativação da cascata por proteína mitógeno quinase (MAP). Também foi visto na cultura de hipocampus de ratos a sinalização extracelular (ERK1 / 2) via 5-HT₇. Estudos simultâneos e subsequentes demonstraram que a sinalização 5-HT₇ é muito mais complexa e envolve mudanças nas concentrações de Ca²⁺ intracelular bem como mecanismos independentes de PKA (BLATTNER et al., 2018). O mRNA 5-HT₇ e a proteína receptora são amplamente expressos em várias regiões cerebrais e, particularmente, no córtex cerebral, no hipocampo, no tálamo, na amígdala e no hipotálamo (ROBERTS & HEDLUND, 2011; TAKEDA, TSUJI, MIYAGAWA E

TAKEDA, 2017). A expressão e distribuição similares de mRNA e proteínas para os receptores 5-HT7 nas estruturas límbicas sugerem que esse receptor desempenha um papel na regulação de funções como humor, processamento de memória e a associação emocional com a memória (MENESES, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação dos receptores serotoninérgico 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ na extinção da memória de medo condicionado ao contexto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a participação do receptor 5-HT_{5A}, da região CA1 do hipocampo e da amígdala basolateral, na extinção da memória de medo condicionado ao contexto.

Investigar a participação do receptor 5-HT₆, da região CA1 do hipocampo e da amígdala basolateral, na extinção da memória de medo condicionado ao contexto.

Investigar a participação do receptor 5-HT₇, da região CA1 do hipocampo e da amígdala basolateral, na extinção da memória de medo condicionado ao contexto.

4 MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos CrlCembe: *Wistar* machos (N= 384), de aproximadamente três meses de idade, pesando em média 300-330 g, provenientes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE), os mesmos foram alojados no biotério do Centro de Memória localizado no prédio 64 da PUCRS. Os animais foram mantidos em grupos de quatro por caixa moradia, com água e comida a vontade, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luz a partir das 07:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas), com temperatura ambiente constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As caixas moradias foram trocadas três vezes por semana pela equipe altamente treinada do CeMBE. Todos os procedimentos foram realizados somente após a aprovação da Comissão de Ética e Uso de Animais da PUCRS.

4.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais alojados no biotério foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas à 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (A -4,2; $L \pm 3,0$; V -1,8 mm) ou da amígdala basolateral (A -2,4; $L \pm 5,1$; V -7,5mm), segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com Ketamina (75 mg/Kg) juntamente com Xilazina (10 mg/Kg), ambos administrados intraperitonealmente (i.p.). Como cuidado pós cirúrgico os animais receberam Meloxicam administrado via subcutânea de 12 em 12 horas nas primeiras 48 horas. Os animais tiveram 7 dias de recuperação após o procedimento cirúrgico antes de qualquer manipulação.

4.3 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS

Com o objetivo de evitar que os animais ficassem ansiosos e/ou estressados quando manejados, eles foram submetidos a sessões de manipulação 2 vezes ao dia por 3 dias consecutivos. Durante cada sessão, os mesmos foram levados da sala de alojamento até a sala onde os experimentos foram realizados, retirados da caixa

moradia e manuseados. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos procedimentos comportamentais.

4.4 INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS

Para o tratamento farmacológico foi utilizado uma micro-seringa Hamilton® acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). As drogas ou o veículo foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo (1,0 µl/lado) ou na amígdala basolateral (0,5 µl/lado). Ao término, as agulhas de infusão foram mantidas no interior das cânulas-guia por mais 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido. As drogas e as doses utilizadas (tabela 1) foram baseadas em estudos prévios já publicados do laboratório (SCHMIDT et al., 2016).

Tabela 1: Dose das drogas utilizadas

Drogas	Mecanismo de ação	Doses
SB-699551	Antagonista do receptor 5-HT5A	10 µg/lado
WAY-208466	Agonista do receptor 5-HT6	0,04 µg/lado
SB-271046A	Antagonista do receptor 5-HT6	10 µg/lado
AS-19	Agonista do receptor 5-HT7	5 µg/lado
SB-269950	Antagonista do receptor 5-HT7	5 µg/lado

4.5 TAREFAS COMPORTAMENTAIS

4.5.1 MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

O aparato utilizado consiste de uma caixa de condicionamento (Figura 1) (35 x 35 x 35 cm), com a parte frontal em acrílico transparente, com um piso constituído por barras paralelas metálicas, espaçadas 0,8 mm entre elas (Panlab®). Essas barras são

capazes de conduzir corrente elétrica. Esta caixa encontra-se dentro de outra caixa maior, que possui paredes com isolante acústico. Nesta tarefa foi medido o tempo total de imobilidade (*freezing*) do animal como resposta condicionada durante todas as sessões comportamentais (FIORENZA et al., 2012; SCHMIDT et al., 2016). O tempo de imobilidade foi medido com o auxílio de um cronometro digital, por um avaliador experiente. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera digital da marca GoPro®, em caso de qualquer eventualidade as imagens poderiam ser reavaliadas.

Figura 1: Foto representativa do aparato experimental utilizado para a tarefa de medo condicionado ao contexto



Fonte: domínio público

4.5.1.1 PROTOCOLO DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

No dia 1 foi realizado a sessão de treino do medo condicionado ao contexto, na qual os animais foram individualmente colocados na caixa de condicionamento e após 120 segundos receberam 3 estímulos elétricos de 0,5 mA por 2 segundos nas patas, com intervalo de 30 segundos entre cada estímulo. Os animais foram recolocados na caixa moradia 30 segundos após o último estímulo elétrico. Vinte quatro horas depois (dia 2), os animais foram submetidos a uma sessão treino de extinção, na qual foram recolocados na mesma caixa de condicionamento por 20 minutos, na ausência do estímulo elétrico. Para avaliação da memória de longa duração os animais foram submetidos a uma sessão de teste 24 horas depois da seção de extinção, com duração de 180 segundos, na ausência de estímulo elétrico. O comportamento de imobilidade foi avaliado durante os primeiros 120 segundos da sessão de treino e

durante toda a sessão de extinção, entretando apenas os primeiros e os últimos 3 min foram utilizados na análise, e teste de retenção (Figura 2)

Os animais receberam as infusões farmacológicas (intra-CA1 ou intra-ABL) imediatamente ou 3 horas após à sessão de extinção (SCHMIDT et al., 2016).

Figura 2: Representação do protocolo experimental



Fonte: autor

4.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REGIÃO ESTUDADA

Após o término dos experimentos comportamentais, os animais previamente operados, foram avaliados histologicamente quanto à posição de suas cânulas guias nas regiões cerebrais estudadas, visando assim garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a administração correta das drogas foram incluídos na análise estatística final. Para este procedimento histológico, os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas guia; quinze minutos depois eutanasiados (Tiopental sódico 100 mg/Kg; i.p.) e então decapitados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, a partir disso ocorreu a análise histológica, considerando somente os animais com a infusão de azul de metileno dentro de 2 mm² dos locais alvos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em uma tabela do programa *Microsoft Office Excel* (versão 2013) para o cálculo da porcentagem de tempo de freezing. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.1*. Os dados

foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de teste de comparações múltiplas *Bonferroni* ou test t não pareado. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados com o máximo de cuidado para evitar o desconforto e o sofrimento dos animais. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Estado do Rio Grande do Sul e, apenas após a sua aprovação foram iniciados os procedimentos experimentais, os quais estão de acordo com as normas regidas por esta instituição. SIPESQ 8010.

5 RESULTADOS

5.1. O ANTAGONISTA DO RECEPTOR 5-HT5A FACILITA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO SOMENTE NA ABL IMEDIATAMENTE E 3 H APÓS A EXTINÇÃO

Os animais que receberam a infusão do antagonista do receptor 5-HT5A, SB-699551 (10 µg/lado), na região CA1 do hipocampo imediatamente, SB-699551-Veh $t_{(10)} = 1.583$, $p > 0.5$ (Fig. 3A), ou 3 h, SB-699551-Veh $t_{(11)} = 0.267$, $p > 0.5$ (Fig. 3B), após a extinção, exibiram níveis semelhantes de freezing aos do grupo controle durante o teste. Por outro lado, animais que receberam infusão de SB-699551 (10 µg/lado) na região ABL imediatamente, SB-699551-Veh $t_{(16)} = 6.206$, $p < 0.001$ (Fig. 3C), ou 3 h, SB-699551-Veh $t_{(14)} = 4.738$, $p < 0.001$ (Fig. 3D), após a extinção, exibiram níveis mais baixos de freezing do que o grupo controle durante o teste. Estes resultados sugerem que o antagonista do receptor 5-HT5A modula a extinção da memória de medo condicionado ao contexto através da ABL, mas não da região CA1 do hipocampo, facilitando a memória de extinção.

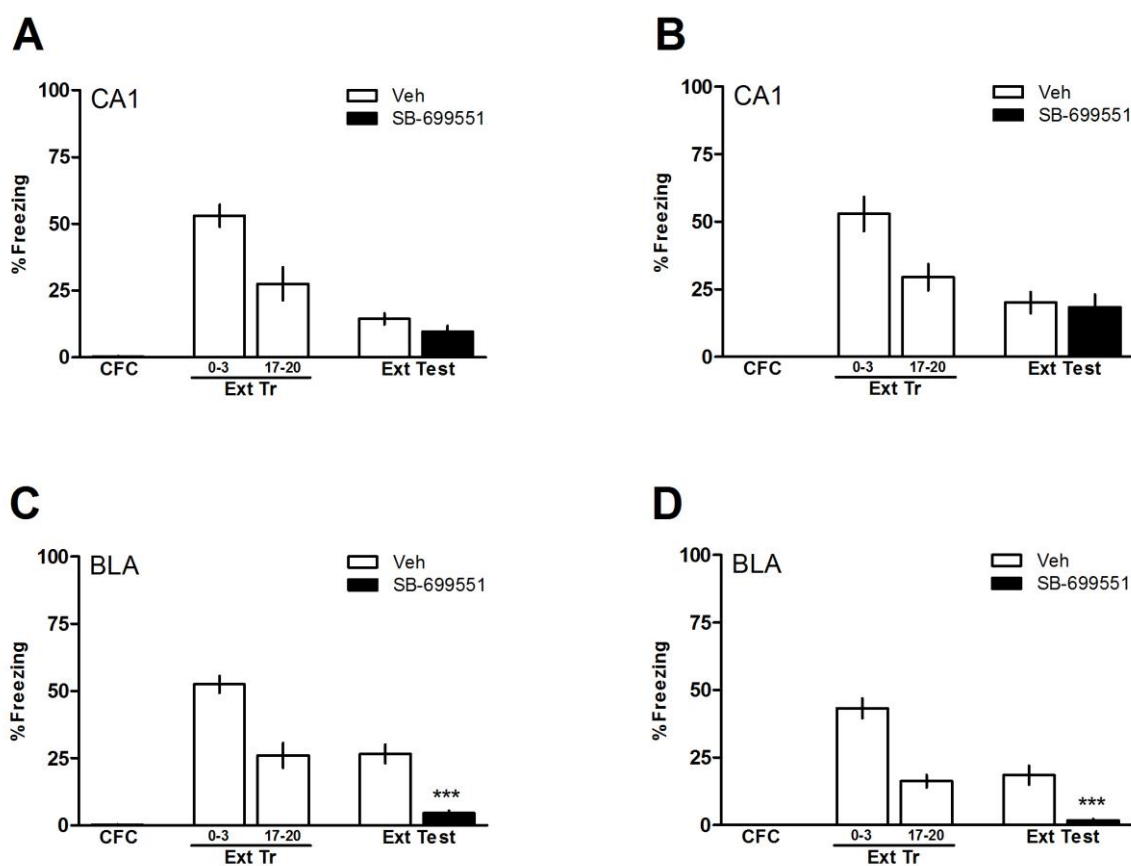


Figura 3 – Participação dos receptores 5-HT5A na extinção da memória de medo condicionado ao contexto. Os animais foram submetidos ao protocolo de extinção e imediatamente (A) ou 3 h depois (B) receberam infusão intra-CA1 ou imediatamente (C) ou 3 h depois (D) após a extinção intra-ABL de Veh ou SB-699551 (10 µg/lado), e 24 h depois foram submetidos a um teste de 3 min. Os animais que receberam SB-699551 imediatamente e 3h após a extinção intra-ABL expressaram menos freezing em comparação com os animais tratados com Veh durante o teste. Todos os demais grupos apresentaram níveis semelhantes de freezing durante o teste comparado ao controle. A figura mostra a porcentagem de tempo gasto em freezing durante o treino CFC, nos primeiros e últimos 3 minutos da sessão de extinção e no teste. Os dados são expressos como média ± EMP (n = 6–9 animais por grupo). *** p < 0,001 SB-699551 vs. Veh no teste, teste t não pareado.

5.2. O ANTAGONISTA DO RECEPTOR 5-HT6 FACILITA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO SOMENTE NA ABL IMEDIATAMENTE APÓS A EXTINÇÃO

Os animais que receberam o agonista do receptor 5-HT6, WAY-208466 (0,04 µg/lado) e o antagonista do receptor 5-HT6, SB-271046 (10 µg/lado) intra-CA1 imediatamente, Fig. 4A: one-way ANOVA, $F_{(2,15)} = 1.075$, Veh-WAY-208466 ($p > 0.05$), Veh-SB-271046 ($p > 0.05$), ou 3 h, Fig. 4B: one-way ANOVA, $F_{(2,18)} = 0.04851$, Veh-WAY-208466 ($p > 0.05$), Veh-SB-271046 ($p > 0.05$) após a extinção exibiram níveis semelhantes de freezing aos do grupo controle durante o teste. Os animais que receberam o agonista do receptor 5-HT6, WAY-208466 (0,04 µg/lado), intra-ABL imediatamente, Fig. 4C: one-way ANOVA, $F_{(2,19)} = 16.11$, Veh-WAY-208466 ($p > 0.05$), ou 3 h, Fig. 4D: one-way ANOVA, $F_{(2,16)} = 0.774$, Veh-WAY-208466 ($p > 0.05$), após a extinção também exibiram níveis semelhantes de freezing aos do grupo controle durante o teste. No entanto, animais que receberam o antagonista do receptor 5-HT6, SB-271046 (10 µg/lado), na região ABL, imediatamente após a extinção, Fig. 4C: one-way ANOVA, $F_{(2,19)} = 16.11$, Veh-SB-271046 ($p < 0.001$), exibiram níveis mais baixos de freezing do que o grupo controle durante o teste, mas não quando infundido 3 h após a extinção, Fig. 4D: one-way ANOVA, $F_{(2,16)} = 0.774$, Veh-SB-271046 ($p > 0.05$). Estes resultados sugerem que o antagonista do receptor 5-HT6 modula a extinção da memória de medo condicionado ao contexto através da ABL, mas não da região CA1 do hipocampo, facilitando a memória de extinção.

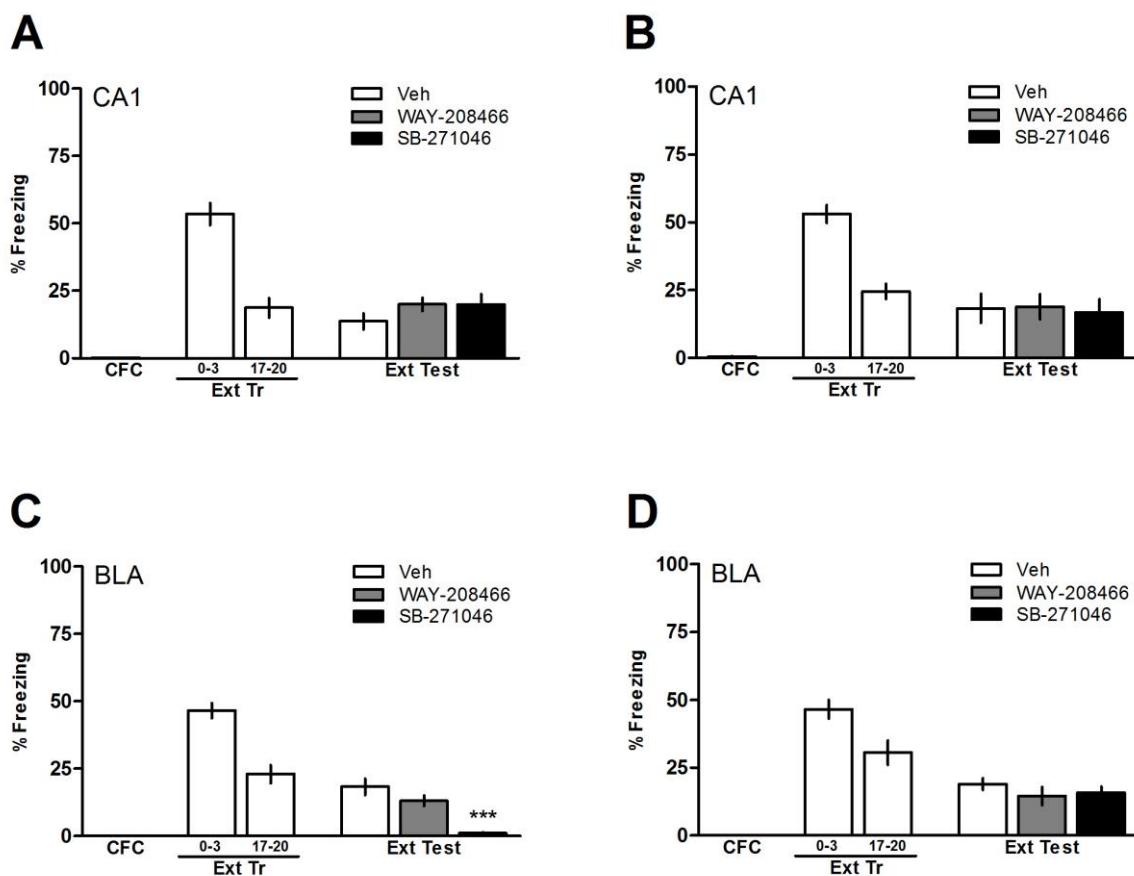


Figura 4 – Participação dos receptores 5-HT₆ na extinção da memória de medo condicionado ao contexto. Os animais foram submetidos ao protocolo de extinção e imediatamente (A) ou 3 h depois (B) receberam infusão intra-CA1 ou imediatamente (C) ou 3h (D) após a extinção intra-ABL de Veh ou WAY-208466 (0,04 µg/lado) ou SB-271046 (10 µg/lado), e 24 h depois foram submetidos a um teste de 3 min. Os animais que receberam SB-271046 imediatamente após a extinção intra-ABL expressaram menos freezing em comparação com os animais tratados com Veh durante o teste. Todos os demais grupos apresentaram níveis semelhantes de freezing durante o teste comparado ao controle. A figura mostra a porcentagem de tempo gasto em freezing durante o treino CFC, nos primeiros e últimos 3 minutos da sessão de extinção e no teste. Os dados são expressos como média ± EMP (n = 5–8 animais por grupo). *** p < 0,001 SB-271046 vs. Veh no teste, one-way ANOVA seguido de *Bonferroni*.

5.3. O ANTAGONISTA DO RECEPTOR 5-HT7 FACILITA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO SOMENTE NA ABL IMEDIATAMENTE E 3H APÓS A EXTINÇÃO

Os animais que receberam o agonista do receptor 5-HT7, AS-19 (5 µg/lado) e o antagonista do receptor 5-HT7, SB-269970 (5 µg/lado) intra-CA1 imediatamente, Fig. 5A: one-way ANOVA, $F_{(2,19)} = 0.02506$, Veh-AS-19 ($p > 0.05$), Veh-SB-269970 ($p > 0.05$), ou 3 h, Fig. 5B: one-way ANOVA, $F_{(2,22)} = 1.036$, Veh-AS-19 ($p > 0.05$), Veh-SB-269970 ($p > 0.05$), após a extinção exibiram níveis semelhantes de freezing aos do grupo controle durante o teste. Os animais que receberam o agonista do receptor 5-HT7, AS-19 (5 µg/lado), intra-ABL imediatamente, Fig. 5C: one-way ANOVA, $F_{(2,21)} = 9.501$, Veh-AS-19 ($p > 0.05$), ou 3h após, Fig. 5D: one-way ANOVA, $F_{(2,20)} = 7.589$, Veh-AS-19 ($p > 0.05$), a extinção também exibiram níveis semelhantes de freezing aos do grupo controle durante o teste. No entanto, animais que receberam o antagonista do receptor 5-HT7, SB-269970 (5 µg/lado), na região ABL, imediatamente, Fig. 5C: one-way ANOVA, $F_{(2,21)} = 9.501$, Veh-SB-269970 ($p < 0.001$), ou 3h após, Fig. 5D: one-way ANOVA, $F_{(2,20)} = 7.589$, Veh-SB-269970 ($p < 0.01$), a extinção exibiram níveis mais baixos de freezing do que o grupo controle durante o teste. Estes resultados sugerem que o antagonista do receptor 5-HT7 modula a extinção da memória de medo condicionado ao contexto através da ABL, mas não da região CA1 do hipocampo, facilitando a memória de extinção.

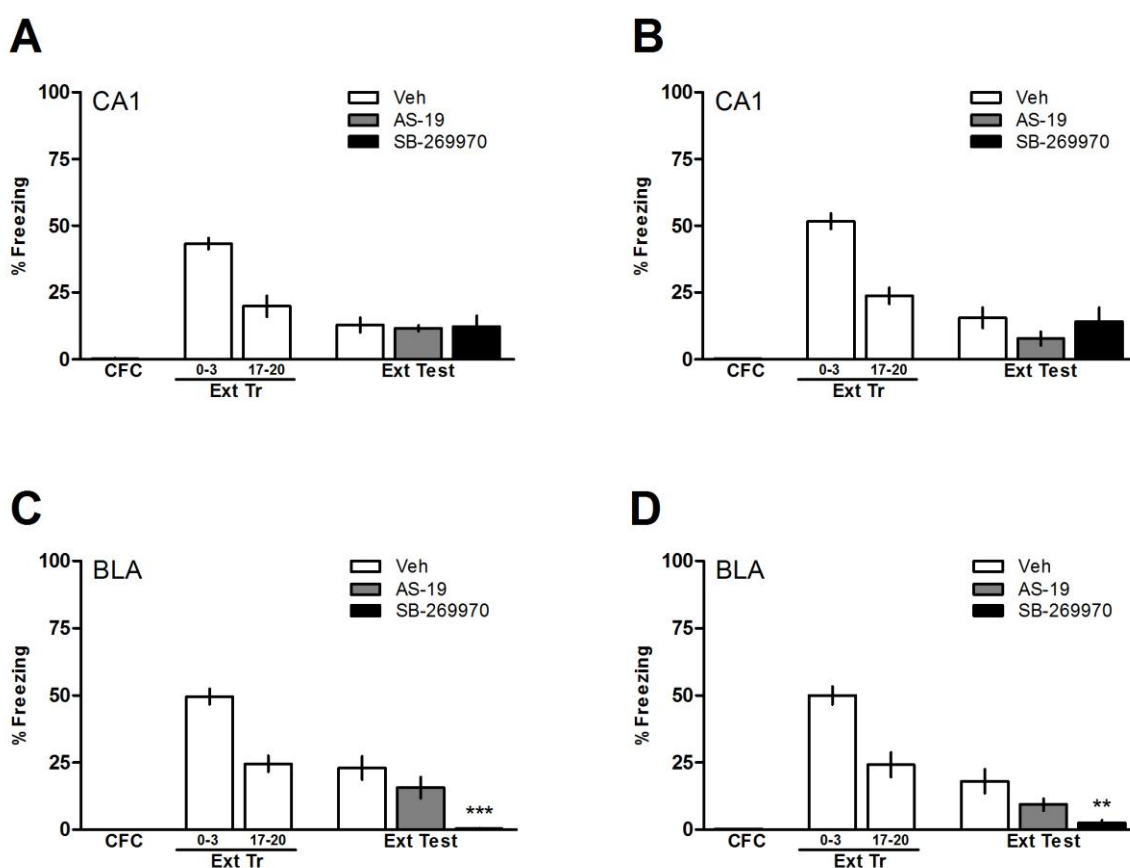


Figura 5 – Participação dos receptores 5-HT7 na extinção da memória de medo condicionado ao contexto. Os animais foram submetidos ao protocolo de extinção e imediatamente (A) ou 3 h depois (B) receberam infusão intra-CA1 ou imediatamente (C) ou 3h (D) após a extinção intra-ABL de Veh ou AS-19 (5 µg/lado) ou SB-269970 (5 µg/lado), e 24 h depois foram submetidos a um teste de 3 min. Os animais que receberam SB-271046 imediatamente ou 3h após a extinção intra-ABL expressaram menos freezing em comparação com os animais tratados com Veh durante o teste. Todos os demais grupos apresentaram níveis semelhantes de freezing durante o teste comparado ao controle. A figura mostra a porcentagem de tempo gasto em freezing durante o treino CFC, nos primeiros e últimos 3 minutos da sessão de extinção e no teste. Os dados são expressos como média ± EMP (n = 5–9 animais por grupo). **p < 0.01 e ***p < 0.001 for SB-269970 vs. Veh no teste, one-way ANOVA seguido de *Bonferroni*.

6 DISCUSSÃO

Demonstramos aqui que o bloqueio dos receptores 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ na ABL, mas não na região CA1 do hipocampo, foi capaz de facilitar a memória de extinção do CFC. A ABL é uma estrutura cerebral crucial no processamento de memórias e extinção (IZQUIERDO, FURINI, & MYSKIW, 2016). Modulação e armazenamento de memórias não são necessariamente funções mutuamente exclusivas, e muitos estudos acreditam que o ABL exerce ambos (HERMANS et al., 2014; IZQUIERDO et al., 2006; SUI et al., 2014). Ela opera em paralelo com a região CA1 do hipocampo no processamento de memórias (IZQUIERDO, FURINI, & MYSKIW, 2016; QUILLFELDT et al., 1996). Há evidências de que a ABL promove a aprendizagem de esQUIVA inibitória independentemente do hipocampo, aumentando o valor emocional do treinamento de esQUIVA inibitória (Benetti et al., 2015).

A amígdala também é uma estrutura crucial para a ansiedade e a liberação de 5-HT está aumentada na amígdala na expressão do medo condicionado (KAWAHARA et al., 1993; ZANOVELI et al., 2009). Animais que foram tratados com 5,7-dihydroxytryptamine (um agente depletor de serotonina) injetados na ABL mostraram aumento do tempo de interação social, sugestivo de redução do comportamento de ansiedade, eles também apresentaram redução da aquisição de medo condicionado e redução da evocação do medo (JOHNSON et al. 2015).

Os camundongos knockout do transportador 5-HT (5-HTTKO) tem os níveis extracelulares de 5-HT aumentados (JENNINGS, LESCH, SHARP, & CRAGG, 2010; MATHEWS et al., 2004) e um prejuízo na evocação da extinção do medo em comparação aos controles (WELLMAN et al., 2007). Além disso, os camundongos 5-HTTKO apresentaram densidade anômala da espinha dendrítica nos principais neurônios da ABL (WELLMAN et al., 2007). Por outro lado, camundongos superexpressando 5-HTT (5-HTTOE) tem níveis extracelulares de 5-HT diminuídos em relação aos controles (JENNINGS et al., 2010) e exibiram prejuízo da aprendizagem do medo (BOCCHIO et al., 2015; LINE et al., 2014; MCHUGH et al., 2015; SANTANA, BULLIDO, RECUERO, VALDIVIESO, & ALDUDO, 2012). Em resumo, estes resultados suportam uma correlação negativa entre níveis de 5-HT e extinção, mas uma correlação positiva com a aprendizagem das memórias de medo, provavelmente através da ação de 5-HT fisiologicamente liberada na ABL (BOCCHIO, MCHUGH, BANNERMAN, SHARP, & CAPOGNA, 2016).

Lesões nos terminais serotoninérgicos na amígdala induzidas por injeção local de 5,7-dihydroxytryptamine atenuaram a expressão da memória de medo avaliado pelo medo condicionado ao contexto e aumentaram a evocação da memória de extinção, no entanto, uma lesão serotoninérgica no córtex pré-frontal medial não mostrou quaisquer alterações comportamentais (IZUMI et al., 2012). Estes resultados estão de acordo com os nossos resultados, mostrando que os antagonistas dos receptores serotoninérgicos, 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7, quando infundidos no BLA, foram capazes de facilitar a consolidação da extinção.

Apesar da região CA1 do hipocampo desempenhar papel importante na consolidação da extinção (FIORENZA, ROSA, IZQUIERDO, & MYSKIW, 2012; IZQUIERDO, FURINI, & MYSKIW, 2016), a infusão dos agonistas e antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 não tiveram nenhum efeito na consolidação da extinção, pelo menos não nas doses e nos momentos de infusão utilizados neste trabalho. Mais estudos devem ser realizados para melhor elucidar o papel desses receptores serotoninérgico na região CA1 e até mesmo em outras regiões do hipocampo durante a consolidação da extinção.

O receptor 5-HT5A provavelmente desempenha um papel inibitório, uma vez que a deleção genética desse receptor resulta em um aumento inesperado nas correntes inibidoras do receptor 5-HT1A (GOODFELLOW, BAILEY, & LAMBE, 2012). Segundo Kassai et al. (2012), SB-699551-A, um antagonista do receptor 5-HT5A, apresentou um papel ansiolítico no comportamento, enquanto A-843277, outro antagonista de 5-HT5A, mostrou uma propriedade semelhante a um antidepressivo (KASSAI et al., 2012). Além disso, Yamazaki demonstrou que os antagonistas de 5-HT5A poderiam melhorar o déficit de memória e cognitivo associados à idade e o déficit de memória induzido por escopolamina em modelos animais de esquizofrenia (YAMAZAKI et al., 2014, 2015). Também foi descrito que a administração sistêmica do antagonista de 5-HT5A prejudicava a memória de curto e longo prazo em uma tarefa de aprendizagem associativa (GONZALEZ, CHÁVEZ-PASCACIO, & MENESES, 2013). Schmidt e colaboradores (SCHMIDT et al., 2017) verificaram recentemente que o bloqueio do 5-HT5A causou um prejuízo na reconsolidação da memória CFC quando infundido 3h pós-reativação na região CA1 do hipocampo.

Aqui, demonstramos que a administração do antagonista de 5-HT5A na ABL imediatamente ou 3 horas após a sessão de extinção leva a uma melhora da memória de extinção do CFC. É importante ressaltar que a consolidação, reconsolidação e

extinção têm algumas semelhanças, mas o curso do tempo, as estruturas cerebrais e os mecanismos moleculares envolvidos podem ser diferentes (IZQUIERDO, FURINI, & MYSKIW, 2016). Considerando que não há agonistas seletivos dos receptores 5-HT5A, mais estudos com compostos seletivos do 5-HT5A em tarefas comportamentais são necessários (VOLK et al., 2010).

Nossos resultados demonstram que a administração do antagonista 5-HT6 no ABL imediatamente após a sessão de extinção levou a uma melhora na memória de extinção, o que corrobora com trabalhos recentes que demonstraram que os antagonistas do receptor 5-HT6 melhoraram a cognição em diferentes tarefas de memória em ratos idosos (HIRST et al., 2006; MENESES, 2001) e ratos com déficits induzidos por escopolamina (DA SILVA COSTA-AZE, QUIEDEVILLE, BOULOUARD, & DAUPHIN, 2012; KING et al., 2004; MENESES, 2001; SCHREIBER et al., 2007; WOODS, CLARKE, LAYFIELD, & FONE, 2012). Também pode ser um poderoso candidato a drogas para o tratamento da doença de Alzheimer (RAMÍREZ, 2013) e da esquizofrenia (KIKUCHI, 2006).

No entanto, existem alguns resultados discrepantes na literatura relacionados ao receptor 5-HT6 e à memória (GRAVIUS et al., 2011; LINDNER, 2003; RUSSELL E DIAS, 2002; SCHMIDT et al., 2017). Uma das possíveis explicações para os efeitos paradoxais dos agonistas e antagonistas do receptor 5-HT6 é que os agonistas atuam nos poucos receptores 5-HT6 localizados diretamente nos neurônios colinérgicos e glutamatérgicos, recebendo apenas um pequeno estímulo serotoninérgico, enquanto os antagonistas podem atuar sobre o receptor 5-HT6 localizado nos interneurônios gabaérgicos inibitórios, aumentando a entrada de 5-HT que desinibe a liberação de acetilcolina e glutamato (WOODS et al., 2012). Também é importante considerar que essas diferenças podem estar relacionadas ao uso de diferentes antagonistas, condições experimentais e instrumentos para medir o comportamento (MENESES, 2013). Além disso, o antagonista do receptor 5-HT6 tem o seu impacto mais limitado pelo tempo do que os antagonistas dos receptores 5-HT5A e 5-HT7.

O receptor 5-HT7 é um dos subtipos de receptores mais recentemente descobertos para o 5-HT. Schmidt et al. Verificaram recentemente que o bloqueio dos receptores 5-HT7 facilitou a consolidação e a reconsolidação da memória CFC (SCHMIDT et al., 2017). Além disso, Takeda mostrou que tanto o condicionamento do medo dependente do contexto quanto do tom são modulados pelos receptores 5-HT7 (TAKEDA et al., 2017).

No presente estudo, os achados dos receptores 5-HT7 foram semelhantes aos apresentados aqui para 5-HT5A e 5-HT6. Estes resultados indicam que o antagonista dos receptores 5-HT7 modula a extinção da memória CFC no ABL, mas não na região CA1 do hipocampo, facilitando a memória de extinção. Tem sido sugerido que a amígdala pode ser uma importante interface sensório-motora para ambos os tipos de condicionamento do medo (TAKEDA et al., 2017) e é consistente com a hipótese de que os ligantes do receptor 5-HT7 também podem melhorar a aprendizagem contextual e a memória através de um mecanismo independente do hipocampo (ZAREIFOPOULOS & PAPTAEODOROPOULOS, 2016). Anatomicamente, foi demonstrado que o receptor 5-HT7 está presente em todas as partes do hipocampo (BONAVENTURE et al., 2004). Curiosamente, as maiores densidades foram observadas na região CA3 do hipocampo e no giro denteado, regiões do hipocampo que se mostraram envolvidas na resposta a mudanças no ambiente (GOODRICH-HUNSAKER, HUNSAKER, & KESNER, 2008; HUNSAKER, ROSENBERG E KESNER, 2008). A ativação do receptor 5-HT7 na área CA3 aumenta a corrente de cátions induzida pela hiperpolarização (OHMURA et al., 2016), que diminui os potenciais pós-sinápticos excitatórios, reduzindo a excitabilidade neuronal. O bloqueio deste efeito inibitório do receptor 5-HT7 pode explicar os efeitos benéficos dos antagonistas de 5-HT7 na cognição e memória (CIRANNA & CATANIA, 2014). Sua ampla densidade na região CA3 também reforça a necessidade de estudar seu papel em outras regiões do hipocampo.

Várias revisões (MENESES, 2015; ZAREIFOPOULOS & PAPTAEODOROPOULOS, 2016), têm sido publicadas recentemente sobre o papel dos receptores 5-HT7, com grande ênfase no seu papel modulatório em relação à memória e outras funções cognitivas superiores. Eles resumem estudos em animais, observando os resultados inconclusivos e muitas vezes conflitantes, um vez que os mesmos abordam o paradoxo de que tanto os agonistas quanto os antagonistas do receptor 5-HT7 têm efeitos pró-aminésicos e pró-cognitivos (MENESES, 2015).

Existem algumas explicações possíveis para isso. Uma é que os receptores 5-HT7 podem interagir funcionalmente com outros receptores 5-HT e alterar a valência de suas ações comportamentais. Stiedl et al. descreveram interações entre os receptores 5-HT7 e 5-HT1A, incluindo os autoreceptores 5-HT1A, que podem alterar a função de ambos (STIEDL, 2015). Além disso, a infusão hipocampal de 8-OH-DPAT, agonista duplo do receptor 5-HT1A e 5-HT7, impediu o aprendizado de esquiva

inibitória através da ativação do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo, enquanto o receptor 5-HT₇ parece facilitar os processos de memória principalmente através do córtex e outras estruturas pertencentes ao sistema límbico, e não apenas do hipocampo (ERIKSSON et al., 2012).

Como mostrado aqui, o agonista do receptor 5-HT₇ não teve efeito nas duas estruturas estudadas. Uma explicação para isso pode ser o fato de que os estudos sobre as funções dos receptores 5-HT₇ foram principalmente prejudicados pela falta de ligantes seletivos, especialmente agonistas. Os agonistas de 5-HT₇, AS-19 e LP-44 parecem ter baixas potências agonistas in vivo (ERIKSSON et al., 2012; ROBERTS & HEDLUND, 2011).

Concluindo, o bloqueio dos receptores 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ na ABL, mas não na região CA1 do hipocampo, foi capaz de facilitar a consolidação da extinção da memória do medo condicionado ao contexto, logo, um novo papel desses receptores foi descrito aqui. Levando em conta suas possíveis aplicações terapêuticas, estudos adicionais devem ser conduzidos para melhor elucidar seu papel nos processos de memória. Em resumo, os receptores serotoninérgicos 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ exercem um importante papel na ABL durante a extinção, o que nos leva a uma nova perspectiva sobre esse mecanismo de memória, fornecendo novas evidências na pesquisa sobre essa vasta área de conhecimento e estimulando novas linhas de investigação.

REFERÊNCIAS

- AKIRAV, I.; MAROUN, M. Stress modulation of reconsolidation. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 4, p. 747–761, 6 out. 2012.
- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. R746–R750, set. 2013.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.). **American Psychiatric Publishing**, pp. 271–280. 2013.
- BADDELEY, A. Working memory. **Science**, v. 255, n. 5044, p. 556–559, 31 jan. 1992.
- BAILEY, M. R.; BALSAM, P. D. Memory Reconsolidation: Time to Change Your Mind. **Current Biology**, v. 23, n. 6, p. R243–R245, mar. 2013.
- BARD JA, ZGOMBICK J, ADHAM N, VAYSSE P, BRANCHEK TA, WEINSHANK RL. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**. 268 (31): 23422–6. 1993.
- BARROS, D. M. et al. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behavioural brain research**, v. 124, n. 1, p. 1–7, 28 set. 2001.
- BEAR, M. F. Neurociencias: desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre: **Artmed**, 2002.
- BENETTI, F., FURINI, C.R.G., DE CARVALHO MYSKIW, J., PROVENSÍ, G., PASSANI, M.B., BALDI, E., BUCHERELLI, C., MUNARI, L., IZQUIERDO, I., BLANDINA, P., 2015. Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 112, E2536–E2542.
- BENTZ, D. et al. Influence of stress on fear memory processes in an aversive differential conditioning paradigm in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 7, p. 1186–1197, jul. 2013.
- BERGER, W; MENDLOWICZ, MV; MARQUES-PORTELLA, C; KINRYS, G; FONTENELLE, LF; MARMAR, CR; FIGUEIRA, I. Pharmacologic alternatives to antidepressants in posttraumatic stress disorder: a systematic review. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, 33 (2): 169–80. 2009.
- BISSON, JI; COSGROVE, S; LEWIS, C; ROBERT, NP. Post-traumatic stress disorder. **BMJ (Clinical research ed.)**. 351: h6161. 2015.
- BLATTNER, K. M., CANNEY, D. J., PIPPIN, D. A., & BLASS, B. E. Pharmacology and Therapeutic Potential of the 5-HT7 receptor. **ACS Chemical Neuroscience**. 10, 89–119. 2019

BOCCHIO, M., FUCSINA, G., OIKONOMIDIS, L., MCHUGH, S.B., BANNERMAN, D.M., SHARP, T., CAPOGNA, M., Increased Serotonin Transporter Expression Reduces Fear and Recruitment of Parvalbumin Interneurons of the Amygdala. **Neuropsychopharmacology**. 2015.

BOCCHIO, M., MCHUGH, S.B., BANNERMAN, D.M., SHARP, T., CAPOGNA, M., Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle. **Front. Neural Circuits**. 2016.

BONAVENTURE P, ALUISIO L, SHOBLOCK J, BOGGS JD, FRASER IC, LORD B, LOVENBERG TW, GALICI R. Pharmacological blockade of serotonin 5-HT₇ receptor reverses working memory deficits in rats by normalizing cortical glutamate neurotransmission. **PLoS One**. 6(6):e20210. 2011.

BONAVENTURE, P., NEPOMUCENO, D., HEIN, L., SUTCLIFFE, J.G., LOVENBERG, T., HEDLUND, P.B., Radioligand binding analysis of knockout mice reveals 5-hydroxytryptamine₇ receptor distribution and uncovers 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin interaction with α 2adrenergic receptors. **Neuroscience**. 2004.

BURGHARDT, N.S., BAUER, E.P., Acute and chronic effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on fear conditioning: Implications for underlying fear circuits. **Neuroscience**. 2013.

BURIANOVA, H.; MCINTOSH, A. R.; GRADY, C. L. A common functional brain network for autobiographical, episodic, and semantic memory retrieval. **NeuroImage**, v. 49, n. 1, p. 865–874, jan. 2010.

CANLI, T., LESCH, K.P. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. **Nat Neurosci**. v.10, n.9, p.1103-1109, 2007.

CAREYA, R.J. e DAMIANOPOULOS, E. N. Serotonin and conditioning: Focus on Pavlovian psychostimulant drug conditioning. **Behavioural Brain Research**, n. 282, p.227–236, 2015.

CARSON, M. J.; THOMAS, E. A.; DANIELSON, P. E.; SUTCLIFFE, J. G. The 5-HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: A mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. **Glia**, 17, 317- 326. 1996.

CELADA, P., PUIG, M.V., ARTIGAS, F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. **Front Integr Neurosci**. 19;7:25., 2013.

CIRANNA, L., CATANIA, M.V., 5-HT₇ receptors as modulators of neuronal excitability, synaptic transmission and plasticity: physiological role and possible implications in autism spectrum disorders. **Front. Cell. Neurosci**. 2014.

COWEN P, SHERWOOD AC. The role of serotonin in cognitive function: evidence from recent studies and implications for understanding depression. **J Psychopharmacol**. 27(7):575-83. 2013.

D'ESPOSITO, M. et al. The neural basis of the central executive system of working memory. **Nature**, v. 378, n. 6554, p. 279–281, 16 nov. 1995.

DA SILVA COSTA-AZE, V., QUIEDEVILLE, A., BOULOUARD, M., DAUPHIN, F., 5-HT6 receptor blockade differentially affects scopolamine-induced deficits of working memory, recognition memory and aversive learning in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. 2012.

DE BRUIN, N.M.W.J., VAN LOEVEZIJN, A., WICKE, K.M., DE HAAN, M., VENHORST, J., LANGE, J.H.M., DE GROOTE, L., VAN DER NEUT, M.A.W., PRICKAERTS, J., ANDRIAMBELOSON, E., FOLEY, A.G., VAN DRIMMELEN, M., VAN DER WETERING, M., KRUSE, C.G., The selective 5-HT6receptor antagonist SLV has putative cognitive- and social interaction enhancing properties in rodent models of cognitive impairment. **Neurobiol. Learn. Mem.** 2016.

de CARVALHO MYSKIW, J., FURINI, C. R. G., SCHMIDT, B., FERREIRA, F., IZQUIERDO, I. Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n.2, p. E230–E233, 2015.

de CARVALHO MYSKIW, J.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Behavioral tagging of extinction learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.3, p. 1071-1076, 2013.

de CARVALHO MYSKIW, J.; FURINI, C. R. G.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n.12, p. 4572-4577, 2014.

DICKERSON, B. C.; EICHENBAUM, H. The Episodic Memory System: Neurocircuitry and Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 86–104, 23 set. 2009.

EL HAJ, M.; KESSELS, R. P. C. Context memory in Alzheimer's disease. **Dementia and geriatric cognitive disorders extra**, v. 3, n. 1, p. 342–350, 2013.

ERIKSSON, T. M., HOLST, S., STAN, T. L., HAGER, T., SJÖGREN, B., OGREN, S. Ö., STIEDL, O. 5-HT1A and 5-HT7 receptor crosstalk in the regulation of emotional memory: Implications for effects of selective serotonin reuptake inhibitors. **Neuropharmacology**, 63(6), 1150–1160. 2012.

FEARING, F., PAVLOV, I.P., ANREP, G. V., Conditioned Reflexes. An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex. **J. Am. Inst. Crim. Law Criminol.** 1929

FIORENZA, N. G. et al. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 210–216, jun. 2012.

FIORENZA, N. G.; SARTOR, D.; MYSKIW, J. C.; IZQUIERDO, I. Treatment of fear memories: interactions between extinction and reconsolidation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, n. 4, p. 1363-1372, 2011.

FURINI, C. R. G. et al. New frontiers in the study of memory mechanisms. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. 2, p. 173–177, abr. 2013.

FURINI, C.R.G., BEHLING, J.A.K., ZINN, C.G., ZANINI, M.L., ASSIS BRASIL, E., PEREIRA, L.D., IZQUIERDO, I., DE CARVALHO MYSKIW, J., Extinction memory is facilitated by methylphenidate and regulated by dopamine and noradrenaline receptors. **Behav. Brain Res.** 2017.

GONZALEZ, R., CHÁVEZ-PASCACIO, K., & MENESES, A. Role of 5-HT_{5A} receptors in the consolidation of memory. **Behavioural Brain Research**, 252, 246–251. 2013.

GONZÁLEZ-VERA, J.A., MEDINA, R.A., MARTÍN-FONTECHA, M., GONZALEZ, A., DE LA FUENTE, T., VÁZQUEZ-VILLA, H., GARCÍA-CÁRCELES, J., BOTTA, J., MCCORMICK, P.J., BENHAMÚ, B., PARDO, L., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.L., A new serotonin 5-HT₆ receptor antagonist with procognitive activity - Importance of a halogen bond interaction to stabilize the binding. **Sci. Rep.** 2017.

GOODFELLOW, N.M., BAILEY, C.D.C., LAMBE, E.K., The Native Serotonin 5-HT_{5A} Receptor: Electrophysiological Characterization in Rodent Cortex and 5-HT_{1A}-Mediated Compensatory Plasticity in the Knock-Out Mouse. **J. Neurosci.** 2012.

GOODRICH-HUNSAKER, N.J., HUNSAKER, M.R., KESNER, R.P., The Interactions and Dissociations of the Dorsal Hippocampus Subregions: How the Dentate Gyrus, CA3, and CA1 Process Spatial Information. **Behav. Neurosci.** 2008.

GÖTHERT, M. Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part I. General background and discovery of serotonin as a basis for 5-HT receptor identification. **Pharmacol Rep.** v. 65, n. 4, p. 771- 786, 2013.

GRAVIUS, A., LASZY, J., PIETRASZEK, M., SÁGHY, K., NAGEL, J., CHAMBON, C., WEGENER, N., VALASTRO, B., DANYSZ, W., GYERTYÁN, I., Effects of 5-HT₆ antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in tests used for the detection of cognitive enhancement and antipsychotic-like activity. **Behav. Pharmacol.** 2011

HARRELL AV, ALLAN AM. Improvements in hippocampal-dependent learning and decremental attention in 5-HT₃ receptor overexpressing mice. **Learn Mem.** 10(5):410-9. 2003.

HARTLEY, C.A., MCKENNA, M.C., SALMAN, R., HOLMES, A., CASEY, B.J., PHELPS, E.A., et al. Serotonin transporter polyadenylation polymorphism modulates the retention of fear extinction memory. **Proc Natl Acad Sci U S A** 109, 5493–5498. 2012.

HETRICK, SE; PURCELL, R; GARNER, B; PARSLow, R. Combined pharmacotherapy and psychological therapies for post traumatic stress disorder (PTSD). **The Cochrane database of systematic reviews.** (7): CD007316. 2010.

HIRST, W.D., STEAN, T.O., ROGERS, D.C., SUNTER, D., PUGH, P., MOSS, S.F., BROMIDGE, S.M., RILEY, G., SMITH, D.R., BARTLETT, S., HEIDBREder, C.A., ATKINS, A.R., LACROIX, L.P., DAWSON, L.A., FOLEY, A.G., REGAN, C.M., UPTON, N., SB-399885 is a potent, selective 5-HT₆receptor antagonist with cognitive

enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models. **Eur. J. Pharmacol.** 2006.

HOMBERG, J.R. Serotonergic modulation of conditioned fear. **Scientifica (Cairo)**. 2012:821549. 2012.

HUNSAKER, M.R., ROSENBERG, J.S., KESNER, R.P., The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. **Hippocampus**. 2008.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural brain research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, ago. 1999.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: **Artmed**; 2011.

IZQUIERDO, I., BEVILAQUA, L.R.M., ROSSATO, J.I., BONINI, J.S., DA SILVA, W.C., MEDINA, J.H., CAMMAROTA, M., THE CONNECTION BETWEEN THE HIPPOCAMPAL AND THE STRIATAL MEMORY SYSTEMS OF THE BRAIN: A REVIEW OF RECENT FINDINGS. **NEUROTOX. RES.** 2006.

IZQUIERDO, I., BEVILAQUA, L.R.M., ROSSATO, J.I., BONINI, J.S., MEDINA, J.H., CAMMAROTA, M., DIFFERENT MOLECULAR CASCADES IN DIFFERENT SITES OF THE BRAIN CONTROL MEMORY CONSOLIDATION. **TRENDS NEUROSCI.** 2006.

IZQUIERDO, I., FURINI, C.R., MYSKIW, J.C., Fear Memory. **Physiological Reviews**, 96, 2, 695-750, 2016.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. **Trends in Neurosciences**, (29): 496-505. 2006.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, nov. 1997.

JENNINGS, K.A., Increased Expression of the 5-HT Transporter Confers a Low-Anxiety Phenotype Linked to Decreased 5-HT Transmission. **J. Neurosci.** 2006.

JENNINGS, K.A., LESCH, K.P., SHARP, T., CRAGG, S.J., Non-linear relationship between 5-HT transporter gene expression and frequency sensitivity of 5-HT signals. **J. Neurochem.** 2010.

JOHNSON, P.L., MOLOSH, A., FITZ, S.D., ARENDT, D., DEEHAN, G.A., FEDERICI, L.M., BERNABE, C., ENGLEMAN, E.A., RODD, Z.A., LOWRY, C.A., SHEKHAR, A., Pharmacological depletion of serotonin in the basolateral amygdala complex reduces anxiety and disrupts fear conditioning. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 2015.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The Molecular and Systems Biology of Memory. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 163–186, mar. 2014.

KAPLAN, G. B.; MOORE, K. A. The use of cognitive enhancers in animal models of fear extinction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 2, p. 217–228, ago. 2011.

KARILA, D., FRERET, T., BOUET, V., BOULOUARD, M., DALLEMAGNE, P., & ROCHAIS, C. Therapeutic Potential of 5-HT₆ Receptor Agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, 58(20), 7901–7912. 2015.

KASSAI, F., SCHLUMBERGER, C., KEDVES, R., PIETRASZEK, M., JATZKE, C., LENDVAI, B., GYERTYÁN, I., DANYSZ, W., Effect of 5-HT_{5A} antagonists in animal models of schizophrenia, anxiety and depression. **Behav. Pharmacol.** 2012.

KAWAHARA, H., YOSHIDA, M., YOKOO, H., NISHI, M., TANAKA, M., Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. **Neurosci. Lett.** 1993.

KING, M. V., SLEIGHT, A.J., WOOLLEY, M.L., TOPHAM, I.A., MARSDEN, C.A., FONE, K.C.F., 5-HT₆ receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing consolidation - An effect sensitive to NMDA receptor antagonism. **Neuropharmacology**. 2004.

KOLB, B.; WHISHAW, I. Q. **Neurociência do comportamento**. Barueri: Manole, 2002.

KONDO, M., NAKAMURA, Y., ISHIDA, Y., YAMADA, T., SHIMADA, S. The 5-HT_{3A} receptor is essential for fear extinction. **Learn Mem.** 16;21(1):1-4. 2013.

LINDNER, M.D., An Assessment of the Effects of Serotonin 6 (5-HT₆) Receptor Antagonists in Rodent Models of Learning. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 2003.

LINE, S.J., BARKUS, C., RAWLINGS, N., JENNINGS, K., MCHUGH, S., SHARP, T., BANNERMAN, D.M., Reduced sensitivity to both positive and negative reinforcement in mice over-expressing the 5-hydroxytryptamine transporter. **Eur. J. Neurosci.** 2014.

LIU, K.C., LI, J.Y., XIE, W., LI, L.B., ZHANG, J., DU, C.X., ZHANG, Y.M., TAN, H.H., WANG, H.S., ZHANG, L., Activation and blockade of serotonin₆receptors in the dorsal hippocampus enhance T maze and hole-board performance in a unilateral 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **Brain Res.** 2016.

MAMIYA, N. et al. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 402–413, 14 jan. 2009.

MATHEWS, T.A., FEDELE, D.E., COPPELLI, F.M., AVILA, A.M., MURPHY, D.L., ANDREWS, A.M., Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression, in: **Journal of Neuroscience Methods** .2004.

MATTHES H, BOSCHERT U, AMLAIKY N, GRAILHE R, PLASSAT JL, MUSCATELLI F, MATTEI MG, HEN R. Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. **Molecular Pharmacology**. 43 (3): 313–9. 1993.

MATTHIESSEN L, KIA HK, DAVAL G, RIAD M, HAMON M, VERGÉ D. Immunocytochemical localization of 5-HT_{1A} receptors in the rat immature cerebellum. **Neuroreport**. 4(6):763-6. 1993.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, n. 6, p. 208–210, jun. 2000.

MCHUGH, S.B., BARKUS, C., LIMA, J., GLOVER, L.R., SHARP, T., BANNERMAN, D.M., SERT and uncertainty: Serotonin transporter expression influences information processing biases for ambiguous aversive cues in mice. **Genes, Brain Behav**. 2015.

MENESES A. 5-HT system and cognition. **Neurosci Biobehav Rev.**;23(8):1111-25. 1999.

MENESES, A. Serotonin, neural markers, and memory. **Front Pharmacol**. v.6, n. 143, 2015.

MENESES, A., & GASBARRI, B. Editorial: Serotonin and memory. **Frontiers in Pharmacology**, 7, 8. 2016.

MENESES, A., Role of 5-HT₆ receptors in memory formation. **Drug News Perspect**. 2001.

MENESES, A., 5-HT systems: Emergent targets for memory formation and memory alterations. **Rev. Neurosci**. 2013.

MENESES, A., Memory formation and memory alterations: 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors, novel alternative. **Rev. Neurosci**. 2014.

MILAD, M.R., QUIRK, G.J., Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress, **SSRN**. 2012.

MILAD, M.R., ROSENBAUM, B.L., SIMON, N.M., Neuroscience of fear extinction: Implications for assessment and treatment of fear-based and anxiety related disorders. **Behav. Res. Ther**. 2014.

MITCHELL, E.S., SEXTON, T., NEUMAIER, J.F.,. Increased expression of 5-HT₆ receptors in the rat dorsomedial striatum impairs instrumental learning. **Neuropsychopharmacology**. 2007

MOHAMMAD,Z., MOSES. L., GWALTNEY, B., S. M. Serotonin: a review. **J. Pharmacol. Therap**. n. 31, p. 187–199, 2008.

MONFILS, M.H. et al. Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 951–955, 1 abr. 2009.

MOROZOVA, M.A., LEPILKINA, T.A., RUPCHEV, G.E., BENIASHVILY, A.G., BURMINSKIY, D.S., POTANIN, S.S., BONDARENKO, E. V., KAZEY, V.I., LAVROVSKY, Y., IVACHTCHENKO, A. V. Add-on clinical effects of selective antagonist of 5HT6 receptors AVN-211 (CD-008-0173) in patients with schizophrenia stabilized on antipsychotic treatment: Pilot study. **CNS Spectr.** , 2014.

MUELLER, D.; CAHILL, S. P. Noradrenergic modulation of extinction learning and exposure therapy. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 1–11, mar. 2010.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 17 ago. 2000.

NODA, M.; YASUDA, S.; OKADA, M.; HIGASHIDA, H.; SHIMADA, A.; IWATA, N.; OZAKI, N.; NISHIKAWA, K.; SHIRASAWA, S.; UCHIDA, M.; AOKI, S.; WADA, K. Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. **J. Neurochem**, 84, 222-232. 2003.

OHMURA, Y., YOSHIDA, T., KONNO, K., MINAMI, M., WATANABE, M., YOSHIOKA, M., Serotonin 5-HT7 receptor in the ventral hippocampus modulates the retrieval of fear memory and stress-induced defecation. **Int. J. Neuropsychopharmacol.** 2016.

ORSINI, C. A.; MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1773–1802, ago. 2012.

ORSINI, C. A.; YAN, C.; MAREN, S. Ensemble coding of context-dependent fear memory in the amygdala. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, p. 199, 2013.

PARK, S.M., & WILLIAMS, C.L. Contribution of serotonin type 3 receptors in the successful extinction of cued or contextual fear conditioned responses: Interactions with GABAergic signaling. **Rev Neurosci** 23, 555–569. 2012.

PARSONS, R. G.; RESSLER, K. J. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 146–153, fev. 2013.

PEDREIRA, M. E.; MALDONADO, H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. **Neuron**, v. 38, n. 6, p. 863–869, 19 jun. 2003.

PITHADIA, A.B., JAIN, S.M. 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes and their Modulators with Therapeutic Potentials. **J Clin Med Res.** v.1, n.2, p. 72- 80, 2009.

PIZZORUSSO, T. Neuroscience. Erasing fear memories. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5945, p. 1214–1215, 4 set. 2009.

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

QUARTERMAIN, D., CLEMENTE, J., SHEMER, A. 5-HT_{1A} agonists disrupt memory of fear conditioning in mice. **Biol Psychiatry**. 15;33(4):247-54. 1993.

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

QUIEDEVILLE, A., BOULOUARD, M., DA SILVA COSTA-AZE, V., DAUPHIN, F., BOUET, V., & FRERET, T. 5-HT₆ receptor antagonists as treatment for age-related cognitive decline. **Reviews in the Neurosciences**, 25(3), 417–427. 2014.

RAMÍREZ, M. J. 5-HT₆ receptors and Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, 5(2), 15. 2013.

RENOULT, L. et al. Personal semantics: at the crossroads of semantic and episodic memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 11, p. 550–558, nov. 2012.

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

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

RISIUS, U.-M. et al. Retrieval, monitoring, and control processes: a 7 tesla fMRI approach to memory accuracy. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, p. 24, 2013.

ROBERTS, A.J., HEDLUND, P.B., The 5-HT₇receptor in learning and memory. **Hippocampus**. 2012.

ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 36–46, fev. 2007.

RUAT M, TRAIFFORT E, ARRANG JM, TARDIVEL-LACOMBE J, DIAZ J, LEURS R, SCHWARTZ JC. A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 193 (1): 268–76. 1993.

RUSSELL, M.G.N., DIAS, R., Memories are made of this (perhaps): a review of serotonin {5-HT₆} receptor ligands and their biological functions. **Curr. Top. Med. Chem**. 2002

SACCHETTI, B., BALDI, E., LORENZINI, C.A., BUCHERELLI, C., Cerebellar role in fear-conditioning consolidation. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 2002.

SANTANA, S., BULLIDO, M.J., RECUERO, M., VALDIVIESO, F., ALDUDO, J., Herpes simplex virus type i induces an incomplete autophagic response in human neuroblastoma cells. **J. Alzheimer's Dis**. 2012.

SCHMIDT, S.D., FURINI, C.R., ZINN, C.G., CAVALCANTE, L.E., FERREIRA, F.F., BEHLING, J.A., MYSKIW, J.C., IZQUIERDO, I. Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus. **Neurobiol Learn Mem**, 27. pii: S1074-7427(16)30422-1. 2016.

SCHREIBER, R., VIVIAN, J., HEDLEY, L., SZCZEPANSKI, K., SECCHI, R.L., ZUZOW, M., VAN LAARHOVEN, S., MOREAU, J.L., MARTIN, J.R., SIK, A., BLOKLAND, A. Effects of the novel 5-HT₆ receptor antagonist RO4368554 in rat models for cognition and sensorimotor gating. **Eur. Neuropsychopharmacol**. 2007.

SINGEWALD, N., SCHMUCKERMAIR, C., WHITTLE, N., HOLMES, A., RESSLER, K.J., Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. **Pharmacol. Ther.** 2015.

SQUIRE, L. R. et al. **Memória** . Porto Alegre: Artmed, 2003.

STEIN, M.B., RON NORTON, G., WALKER, J.R., CHARTIER, M.J., & GRAHAM, R. Do selective serotonin re-uptake inhibitors enhance the efficacy of very brief cognitive behavioral therapy for panic disorder? A pilot study. **Psychiatry Res** 94, 191–200. 2000.

STIEDL, O., PAPPA, E., KONRADSSON-GEUKEN, Å., & ÖGREN, S. O. The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT_{1A} and 5-HT₇ and its interaction in emotional learning and memory. **Frontiers in Pharmacology**, 6, 162. 2015.

SUI, L., HUANG, S., PENG, B., REN, J., TIAN, F., WANG, Y. Deep brain stimulation of the amygdala alleviates fear conditioning-induced alterations in synaptic plasticity in the cortical-amygdala pathway and fear memory. **J. Neural Transm.** 2014

SUZUKI, A. et al. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 20, p. 4787–4795, 19 maio 2004.

TAKEDA, K., TSUJI, M., MIYAGAWA, K., TAKEDA, H., 5-HT₇receptor-mediated fear conditioning and possible involvement of extracellular signal-regulated kinase. **Neurosci. Lett.** 2017.

THOMAS, D.R., 5-HT_{5A} receptors as a therapeutic target. **Pharmacol. Ther.** 2006.

VIANNA, M. R. et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12251–12254, 9 out. 2001.

VIANNA, M. R.; COITINHO, A. S.; IZQUIERDO, I. Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning. **Current neurovascular research**, v. 1, n. 1, p. 55–60, jan. 2004.

VOLK, B., NAGY, B.J., VAS, S., KOSTYALIK, D., SIMIG, G., BAGDY, G., Medicinal chemistry of 5-HT_{5A} receptor ligands: a receptor subtype with unique therapeutical potential. **Curr.Top.Med Chem.** 2010.

WELLMAN, C.L., IZQUIERDO, A., GARRETT, J.E., MARTIN, K.P., CARROLL, J., MILLSTEIN, R., et al. Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice. **J Neurosci** 27, 684–691. 2007.

WILKINSON, D., WINDFELD, K., COLDING-JØRGENSEN, E., Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT₆receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. **Lancet Neurol.** 2014.

WILLIAMS RB, MARCHUK DA, GADDE KM, BAREFOOT JC, GRICHNIK K, HELMS MJ, KUHN CM, LEWIS JG, SCHANBERG SM, STAFFORD-SMITH M, SUAREZ EC, CLARY GL, SVENSON IK, SIEGLER IC. Serotonin-related gene polymorphisms and central nervous system serotonin function. **Neuropsychopharmacology.** 28(3):533-41. 2003.

WOODS, S., CLARKE, N., LAYFIELD, R., & FONE, K. 5-HT₆ receptor agonists and antagonists enhance learning and memory in a conditioned emotion response paradigm by modulation of cholinergic and glutamatergic mechanisms: 5-HT₆ receptor effects on associative learning. **British Journal of Pharmacology**, 167(2), 436–449. 2012.

WOOLLEY, M. L., BENTLEY, J. C., SLEIGHT, A. J., MARSDEN, C. A., & FONE, K. C. A role for 5-HT₆ receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. **Neuropharmacology**, 41(2), 210–219. 2001.

WOOLLEY, M. L., MARSDEN, C. A., SLEIGHT, A. J., & FONE, K. C. F. Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT₆ receptor antagonist, Ro 04-6790. **Psychopharmacology (Berl)**, 170(4), 358–367. 2003.

YAMAZAKI, M., HARADA, K., YAMAMOTO, N., YARIMIZU, J., OKABE, M., SHIMADA, T., NI, K., MATSUOKA, N., ASP5736, a novel 5-HT_{5A}receptor antagonist, ameliorates positive symptoms and cognitive impairment in animal models of schizophrenia. **Eur. Neuropsychopharmacol.** 2014.

YAMAZAKI, M., OKABE, M., YAMAMOTO, N., YARIMIZU, J., HARADA, K., Novel 5-HT_{5A} receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced working memory deficit in mice and reference memory impairment in aged rats. **J. Pharmacol. Sci.** 2015.

YOKOYAMA, J.S., et al. The 5-HTTLPR variant in the serotonin transporter gene modifies degeneration of brain regions important foremotion in behavioral variant frontotemporal dementia. **Neuroimage Clin.** V.18, n. 9, p.283-290, 2015.

ZANOVELI, J.M., CARVALHO, M.C., CUNHA, J.M., BRANDÃO, M.L., Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal

gray under unconditioned and conditioned fear states: An in vivo microdialysis study. **Brain Res.** 2009.

ZANTO, T. P. et al. Causal role of the prefrontal cortex in top-down modulation of visual processing and working memory. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 656–661, 27 mar. 2011.

ZAREIFOPOULOS, N., PAPTAEODOROPOULOS, C., Effects of 5-HT-7 receptor ligands on memory and cognition. **Neurobiol. Learn. Mem.** 2016.

ZHANG G, STACKMAN RW. The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition. **Front Pharmacol.** 6:225. 2015.

ZHANG, G., ASGEIRSDOTTIR, H.N., COHEN, S.J., MUNCHOW, A.H., BARRERA, M.P., & STACKMAN, R.W., Stimulation of serotonin 2A receptors facilitates consolidation and extinction of fear memory in C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, 64, 403–413. 2013.

VOLK, B., NAGY, B.J, VAS, S., KOSTYALIK, D., SIMIG, G., BAGDY, G., Chemistry of 5-HT_{5A} Receptor Ligands: A Receptor Subtype with Unique Therapeutical Potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 10, 554-578, 2010.

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8010

Porto Alegre, 29 de maio de 2017.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da ESCOLA DE MEDICINA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Investigação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 na extinção da memória de medo condicionada ao contexto". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da ESCOLA DE MEDICINA

ANEXO 2 – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8010

Porto Alegre, 20 de julho de 2017

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Investigação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT5A, 5-HT6 e 5-HT7 na extinção da memória de medo condicionada ao contexto" coordenado por IVAN ANTONIO IZQUIERDO.

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

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

Duração do Projeto: 20/07/2017 - 20/07/2020

Nº de Animais	Espécie
1152	Ratos
Total de Animais: 1152	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO 3 – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Porto Alegre, March 18th, 2019.

To
The Editors,
Behavioral Brain Research

Dear Sirs,

I am pleased in submitting a manuscript by Eduardo Silva de Assis Brasil, Cristiane R. G. Furini, Eduarda Godfried Nachtigall, Jonny Anderson Kielbovicz Behling, Bruna Freitas Saenger, Fernanda da Silva Rodrigues, Clarissa Penha Farias, Ivan Izquierdo and myself entitled “The blockade of the serotonergic receptors 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ on the basolateral amygdala, but not on the CA1 region of the hippocampus facilitate the extinction of fear memory”. In the present manuscript, we show that the infusion of the antagonists of the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ serotonergic receptors in the basolateral amygdala, but not in the CA1 region of the hippocampus facilitates the extinction of contextual fear conditioning memory. This finding may lead to a better understanding of the brain mechanisms involved in the extinction fear memories, and in therapies for disorders related to dysfunctional fear memories.

With best regards,

Dr. Jociane de Carvalho
Myskiw
Memory Center
Brain Institute of Rio Grande do
Sul
Pontifical Catholic University of
Rio Grande do Sul
Av. Ipiranga, 6690 – 2nd floor,
90610-000 Porto Alegre, RS,
Brazil.

Porto Alegre, March 18th, 2019.

To
The Editors,
Behavioral Brain Research

Dear Sirs,

I am pleased in submitting a manuscript by Eduardo Silva de Assis Brasil, Cristiane R.G. Furini, Eduarda Godfried Nachtigall, Jonny Anderson Kielbovycz Behling, Bruna Freitas Saenger, Fernanda da Silva Rodrigues, Clarissa Penha Farias, Ivan Izquierdo and myself entitled "The blockade of the serotonergic receptors 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ on the basolateral amygdala, but not on the CA1 region of the hippocampus facilitate the extinction of fear memory". In the present manuscript, we show that the infusion of the antagonists of the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ serotonergic receptors in the basolateral amygdala, but not in the CA1 region of the hippocampus facilitates the extinction of contextual fear conditioning memory. This finding may lead to a better understanding of the brain mechanisms involved in the extinction fear memories, and in therapies for disorders related to dysfunctional fear memories.

With best regards,

Dr. Jociane de Carvalho Myskiw

Memory Center Brain Institute of Rio Grande do Sul
Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul
Av. Ipiranga, 6690 – 2nd floor, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

ANEXO 4 – ARTIGO**The blockade of the serotonergic receptors 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ on the basolateral amygdala, but not on the hippocampus facilitate the extinction of fear memory**

Eduardo Silva de Assis Brasil^a, Cristiane Regina Guerino Furini^{a,b}, Fernanda da Silva Rodrigues^a, Eduarda Godfried Nachtigall^a, Jonny Anderson Kielbovicz Behling^a, Bruna Freitas Saenger^a, Clarissa Penha Farias^{a,b}, Jociane de Carvalho Myskiw^{a,b*}, Ivan Izquierdo^{a,b*}.

^aMemory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil; ^bNational Institute of Translational Neuroscience (INNT), National Research Council of Brazil, Brazil.

*Corresponding authors:

Jociane de Carvalho Myskiw and Ivan Izquierdo

E-mail: jociane_carvalho@hotmail.com; izquier@terra.com.br

Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 – 2nd floor, phone (+55 51) 3320 3336; 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

Extinction is the learned inhibition of retrieval. It is the mainstay of exposure therapy, which is widely used to treat drug addiction, phobias and fear-related pathologies such as post-traumatic stress disorder. The serotonin (5-HT) system is positioned to modulate the extinction circuitry via ascending 5-HT projections that innervate certain brain structures including the hippocampus and the basolateral amygdala (BLA). The most recently described serotonergic receptors 5-HT_{5A}, 5-HT₆, 5-HT₇ affect different memory processes and so are putative therapeutic targets for disorders related to cognition; however, their role in the extinction of contextual fear conditioning (CFC) has not been studied yet. Here we investigate the role of these receptors in the CA1 region of the hippocampus and the BLA in the extinction of CFC. For this, male rats were implanted with cannulae in the CA1 or in the BLA region through which they received immediately or 3 h after extinction training of CFC infusions of SB699551 (10 µg/side), 5-HT_{5A} antagonist; WAY-208466 (0.04 µg/side), 5-HT₆ agonist; SB-271046A (10 µg/side), 5-HT₆ antagonist; AS-19 (5 µg/side), 5-HT₇ agonist; SB-269950 (5 µg/side), 5-HT₇ antagonist. After 24 h, animals were submitted to a 3 min extinction test. Results show that the infusion immediately after extinction training of 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ antagonists, and 3 h after extinction training of 5-HT_{5A} and 5-HT₇ antagonists in the BLA region, but not in CA1, facilitates the extinction of CFC memory.

Key words: extinction; 5-HT_{5A}; 5-HT₆; 5-HT₇; hippocampus; basolateral amygdala

Highlights

- The serotonergic receptors modulate extinction of CFC in BLA but not in CA1.
- 5-HT_{5A} antagonists facilitate extinction of CFC immediately and 3 h after session.
- 5-HT₆ antagonists facilitate extinction of CFC immediately after session.
- 5-HT₇ antagonists facilitate extinction of CFC immediately and 3 h after session.
- 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ agonists have no effects on extinction of CFC.

Introduction

Fear memories are essential to survival. However, their expression out of context can lead to anxiety, phobias or to the incapacitating condition known as post-traumatic stress disorder (PTSD) [1]. One of the main options of treatment for these disorders is exposure therapy, which is based on the extinction learning of fear memories [2,3].

Extinction is the inhibition of retrieval of a previously acquired memory through overlapping of a new memory [4]. One way to study the extinction memory is through the Pavlovian fear conditioning in which subjects are presented to a neutral conditioned stimulus (CS), paired with an aversive unconditioned stimulus (US), leading to a conditioned fear response (CR). The continuous presentation of the CS without the US will lead to the gradual decrease, or extinction, of the CR [2,3]. It is well documented that fear extinction process requires the CA1 region of the hippocampus and the basolateral amygdala (BLA) [5–7].

The serotonin (5-HT) system is positioned to modulate the extinction circuitry via ascending 5-HT projections arising from midbrain raphe nuclei that innervate certain brain structures including the BLA, the hippocampus, the medial prefrontal cortex and the bed nucleus of the stria terminalis [8]. Research has largely focused on the role of 5-HT_{1A}, 5-HT₂ and 5-HT₃ serotonergic receptors on fear extinction [9]. However, the role of other 5-HT receptors on the extinction have not been broadly explored. For example, the most recently described serotonergic receptors 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ affect different mechanisms of memory in several behavioral tasks, such as water maze, novel object recognition, T-maze, hole-board and fear conditioning [10–13], however, their roles on the extinction of contextual fear conditioning (CFC) have not been studied so far. Furthermore, recent studies have demonstrated an involvement of these receptors in pathophysiological processes, such as Alzheimer's disease and schizophrenia, thus highlighting their therapeutic possibilities [14–21].

The clinical application of extinction reinforces the need to better understand its processes, especially those related to its modulation by pharmacological agents [2,5,9,22]. Serotonergic dysfunctions are known to be implicated in the pathogenesis of anxiety related pathologies [23] and there is a general endorsement by clinical practice guidelines of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) as first-line

agents in treating these disorders [24], howsoever, the mechanisms through which the therapeutic effect takes place and if it is related to extinction have not been properly explored.

Therefore, here we investigate whether the most recently described serotonergic receptors, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ in the CA1 region of the hippocampus and in the BLA participate on the consolidation of extinction of CFC, through local administration of agonists and antagonists of these receptors. Two different time points of infusion were chosen in order to investigate the time of action of these receptors in the consolidation of extinction. The time points of infusion were chosen based on previous works which have shown that memory formation and cAMP rat hippocampal production in passive avoidance learning task have been detected immediately or 3 hours following training [25] and that these three serotonergic receptors in the CA1 region of the hippocampus are involved in the consolidation and/or reconsolidation of CFC memory when agonists or antagonists were infused immediately or 3 hours after consolidation or reconsolidation of CFC memory [26].

Materials and Methods

Animals

Male *Wistar* rats (CrI/Cembe:WI; 3 months-old, 300–330 g) purchased from Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, were housed four to a cage and kept with free access to food and water, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and temperature of the animals' room maintained at 22–23°C. All experimental procedures were performed in accordance with Animal Committee on Ethics in the Care and Use of Laboratory Animals of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

Surgery

Under deep anesthesia (75 mg/kg ketamine plus 10 mg/kg xylazine; intraperitoneally) animals were bilaterally implanted with stainless steel 22gauge guide cannulae aimed 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus (anterior, –4.2 mm; lateral, ±3.0 mm; ventral, –1.8 mm; from bregma) or the BLA (anterior, –2.4 mm;

lateral, ± 5.1 mm; ventral, -7.5 mm; from bregma) and fixed to the skull with dental acrylic [27]. Animals were allowed to recover from surgery for 7 days and then were handled once a day for 3 consecutive days before experimental procedures.

Contextual fear conditioning apparatus

The CFC apparatus was a chamber within a ventilated sound-attenuating box (Panlab®, Barcelona, Spain) with aluminum walls (35 × 35 × 35 cm), a transparent plastic front lid and a floor of parallel stainless-steel grid bars connected to a device to deliver the footshocks. The chamber was cleaned with 70% ethanol and completely dried between the sessions for each animal. Freezing behavior (defined as the absence of all visible movement except for respiratory-related movements) was scored and converted into a percentage of time.

Behavioral procedure

On Day 1 (CFC training session), animals were placed into the conditioning chamber for 2 min. Then three electrical footshocks (0.5 mA, 2 s) were delivered with a 30 s interval between them. Animals were removed from the conditioning chamber 30 s after the last footshock and placed back in their home cages. On Day 2, animals were placed in the same conditioning chamber for a 20 min CFC extinction training (Ext Tr), without the footshocks. On Day 3, animals were placed once more in the same apparatus for a 3 min extinction test (Ext Test) without footshocks. After Ext Tr, animals were randomly divided in vehicle (Veh) or drug groups. Drug administration into the CA1 region of the hippocampus or into the BLA occurred immediately or 3 hours after the extinction session.

Pharmacological treatments

The animals were gently restrained by hand, and an infusion needle (30 gauge) was fitted tightly into the guides, extending 1 mm from the tip of the guide cannulae. The infusion needle was attached to a polyethylene tubing (PE10, Plastics One) connected to a 10 μ l Hamilton syringe, and infusion was performed at a rate of 1.0 μ l/60 s. The infusion needle was left in place for one additional minute after the infusion in order to minimize backflow, and then carefully withdrawn and placed on the other side. All treatments were bilateral. The drugs were freshly dissolved in sterile saline

0.9% and the drugs and doses used were SB-699551 (10 µg/side), 5-HT5A antagonist; WAY-208466 (0.04 µg/side), 5-HT6 agonist; SB-271046A (10 µg/side), 5-HT6 antagonist; AS-19 (5 µg/side), 5-HT7 agonist; SB-269950 (5 µg/side), 5-HT7 antagonist, infused in a volume of 1.0 µl per side into the CA1 region and 0.5 µl per side into the BLA. The doses were based on a previous paper from our group [26].

Cannulae placements

Correct cannulae placements were verified 2 to 4 days after the end of the last behavioral procedure. Animals were infused with a 4% methylene blue solution over 30 s into the CA1 region of the dorsal hippocampus (1.0 µl/side) and BLA (0.5 µl/side) at the coordinates mentioned above. After 30 min, the animals were sacrificed by excess anesthesia and the brains were removed and kept in 10% formalin. The extension of the spread of the dye was considered to represent an estimation of the amount of drug infused. Cannulae placement was considered correct when the spread was ≤ 1 mm from the intended infusion site; this occurred in 98% of the animals.

Statistical analysis

The obtained data were expressed as mean \pm SEM and analyzed statistically by unpaired t-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni test using GraphPad Prism software. Differences between groups below $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Participation of the 5-HT5A receptors on the extinction of the contextual fear conditioning memory

As shown in Fig. 1, animals that received the antagonist of the 5-HT5A receptors, SB-699551 (10 µg/side), into the CA1 region of the hippocampus immediately (Fig. 1A) or 3h (Fig. 1B) after the extinction training (Ext Tr), exhibited similar levels of freezing to the Veh group during the extinction test (Ext Test) (unpaired *t*-test: Fig. 1A, SB-699551-Veh $t_{(10)} = 1.583$, $p > 0.5$; Fig. 1B, SB-699551-Veh $t_{(11)} = 0.267$, $p > 0.5$). On the other hand, animals that received infusions of SB-699551 (10 µg/side) into the BLA immediately (Fig. 1C) or 3h (Fig. 1D) after the Ext

Tr, exhibited lower levels of freezing than the Veh group during the Ext Test (unpaired *t*-test: Fig. 1C, SB-699551-Veh $t_{(16)} = 6.206$, $p < 0.001$; Fig. 1D, SB-699551-Veh $t_{(14)} = 4.738$, $p < 0.001$). These results indicate that the blockade of 5-HT_{5A} receptors in the BLA but not in the CA1 region of the hippocampus modulates the extinction of the CFC memory facilitating this process.

Participation of the 5-HT₆ receptors in the extinction of the contextual fear conditioning memory

As shown in Fig. 2, animals that received the agonist of the 5-HT₆ receptors, WAY-208466 (0.04 µg/side) or the antagonist of the 5-HT₆ receptors, SB271046 (10 µg/side), intra-CA1 immediately (Fig. 2A) or 3 h (Fig. 2B) after the Ext Tr exhibited similar levels of freezing as the Veh group during the Ext Test (one-way ANOVA: Fig. 2A, $F_{(2,15)} = 1.075$, Veh-WAY-208466 ($p > 0.05$), Veh-SB-271046 ($p > 0.05$); Fig. 2B, $F_{(2,18)} = 0.04851$, Veh-WAY-208466 ($p > 0.05$), Veh-SB-271046 ($p > 0.05$)). Likewise, animals that received WAY-208466 (0.04 µg/side) intra-BLA immediately (Fig. 2C) or 3 h (Fig. 2D) after the Ext Tr exhibited similar levels of freezing as the Veh group during the Ext Test (oneway ANOVA: Fig. 2C, $F_{(2,19)} = 16.11$, Veh-WAY-208466 ($p > 0.05$); Fig. 2D, $F_{(2,16)} = 0.774$, Veh-WAY-208466 ($p > 0.05$)). Although, animals that received SB-271046 (10 µg/side), into the BLA, immediately (Fig. 2C) after the Ext Tr exhibited lower levels of freezing than the Veh group during the Ext Test (oneway ANOVA: Fig. 2C, $F_{(2,19)} = 16.11$, Veh-SB-271046 ($p < 0.001$)). When the SB-271046 (10 µg/side) was infused 3 h after the extinction training (Fig. 2D) the animals exhibited similar levels of freezing as the Veh group during the Ext Test (one-way ANOVA: Fig. 2D, $F_{(2,16)} = 0.774$, Veh-SB-271046 ($p > 0.05$)). These results indicate that the blockade of 5-HT₆ receptors in the BLA but not in the CA1 region of the hippocampus modulates the extinction of the CFC memory facilitating this process.

Participation of the 5-HT₇ receptors in the extinction of the contextual fear conditioning memory

As demonstrated in Fig. 3, animals that received the agonist of the 5-HT₇ receptors, AS-19 (5 µg/side) or the antagonist of the 5-HT₇ receptors, SB269970 (5 µg/side), intra-CA1 immediately (Fig. 3A) or 3 h (Fig. 3B) after the Ext Tr exhibited similar levels of freezing as the Veh group during the Ext Test (one-way ANOVA: Fig.

3A, $F_{(2,19)} = 0.02506$, Veh-AS-19 ($p > 0.05$), Veh-SB269970 ($p > 0.05$); Fig. 3B, $F_{(2,22)} = 1.036$, Veh-AS-19 ($p > 0.05$), Veh-SB-269970 ($p > 0.05$). Likewise, animals that received AS-19 (5 $\mu\text{g}/\text{side}$), intra-BLA immediately (Fig. 3C) or 3 h (Fig. 3D) after the Ext Tr exhibited similar levels of freezing as the Veh group during the Ext Test (one-way ANOVA: Fig. 3C, $F_{(2,21)} = 9.501$, Veh-AS-19 ($p > 0.05$); Fig. 3D, $F_{(2,20)} = 7.589$, Veh-AS-19 ($p > 0.05$)). However, animals that received the SB-269970 (5 $\mu\text{g}/\text{side}$), into the BLA, immediately (Fig. 3C) or 3 h (Fig. 3D) after the Ext Tr exhibited lower levels of freezing than the Veh group during the Ext Test (one-way ANOVA: Fig. 3C, $F_{(2,21)} = 9.501$, Veh-SB-269970 ($p < 0.001$); Fig. 3D, $F_{(2,20)} = 7.589$, Veh-SB269970 ($p < 0.01$)).

These results indicate that the blockade of 5-HT₇ receptors in the BLA but not in the CA1 region of the hippocampus modulates the extinction of the CFC memory facilitating this process.

Discussion

Concerning whether the CA1 and BLA serotonergic 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors play a role in extinction of CFC memory, our findings show that the blockade of these receptors in the BLA but not in the CA1 region of the hippocampus subserves the consolidation of extinction of CFC memory in different time frames. The BLA is a crucial brain structure in processing aversive memory and extinction [1]. Modulation and storage are not necessarily mutually exclusive functions, and many studies believe that the BLA exerts both [25,28,29]. It operates to a certain extent in parallel with the CA1 region in memory processing [1,30], but there is evidence that BLA promotes learning, such as inhibitory avoidance, independently of hippocampus by increasing the emotional value of the training [31]. Animals treated 5,7-dihydroxytryptamine (a serotonin-depleting agent) injected into the BLA shown increased duration of social interaction time, suggestive of reduced anxiety-like behavior, reduced acquisition of fear during conditioning and reduced fear retrieval [32].

5-HT transporter knockout (5-HTTKO) mice have increased extracellular 5-HT levels and an impairment on retrieval of fear extinction in comparison to wild-type controls [33,34]. In addition, 5-HTTKO mice shown anomalous dendritic spine density in the principal neurons of the BLA [35]. Furthermore, serotonergic terminal lesions in the amygdala induced by local injection of 5,7-dihydroxytryptamine attenuated memory-dependent fear assessed by conditioned fear and enhanced the retrieval of

extinction memory [36]. In summary, these studies support the negative correlation between 5-HT levels and consolidation of extinction seen in our results, seeing that the infusion of 5-HT5A, 5-HT6 and 5HT7 antagonists in the BLA was able to reduce freezing expression, thus facilitating the consolidation of extinction.

Despite the important role played by the CA1 region of the hippocampus in the consolidation of extinction [1,5] and the substantial expression of 5-HT5A, 5-HT6 and 5-HT7 receptors in this region [13,37–39], the infusion of both agonist and antagonist of these receptors do not affect this process, at least not at the doses and time points shown in this paper. This could be an indication that these receptors might hold an influence on many emotional-related memories but is not specifically related to the consolidation of extinction memory itself. Withal, more studies should be conducted to better elucidate the function of the 5-HT5A, 5-HT6 and 5-HT7 serotonergic receptors in the CA1 region and perhaps other hippocampal regions during extinction consolidation.

The 5-HT5A receptor is supposed to hold an inhibitory role, since the deletion of this receptor's gene results in an unexpected increase in inhibitory 5-HT1A currents [40]. According to Kassai and collaborators, SB-699551-A, a 5HT5A antagonist, presented an anxiolytic-like influence in behavior, while A843277, another 5-HT5A antagonist, has shown an antidepressant-like property [16]. Also, Yamazaki demonstrated that 5-HT5A antagonists could ameliorate memory and cognitive impairments associated with age and scopolamine-induced memory deficit in animal models of schizophrenia [19,20]. It was also described that the systemic administration of 5-HT5A antagonist impaired short- and long-term memory in an associative learning task [10]. Here we demonstrate that the administration of a 5-HT5A antagonist in the BLA immediately or 3 hours after extinction session leads to an improvement of extinction memory of CFC, unlike what is seen in reconsolidation and in CA1 region of the hippocampus, for instance, in which the blockade of 5-HT5A caused an impairment in the reconsolidation of CFC memory [26]. This pattern highlights the fact that consolidation, reconsolidation and extinction have some similarities but the time course, the brain structures and molecular mechanisms involved might differ [1]. Still, considering that so far there are no selective 5-HT5A receptors agonists, further studies with selective 5-HT5A compounds in behavioral tasks are necessary [41].

The 5-HT6 receptor is almost exclusively located in the central nervous system, which is a significant indicator of their important role in the regulation of several brain

activities, such as cognition and memory [12,42]. Our results demonstrate that the administration of 5-HT6 antagonist in the BLA immediately after extinction session led to an improvement on extinction memory, which corroborates with previous works showing that 5-HT6 receptor antagonists enhanced cognitive properties in different memories tasks in aged rat [11] and with scopolamine-induced deficits [43–47]. It also broadens interesting possibilities of drug development for the treatment of Alzheimer's disease [48] and schizophrenia [49]. However, there is some discrepant results in the literature related to the 5-HT6 receptor and memory [26,50–52]. One of the possible explanation to the paradoxical effects of 5-HT6 receptor agonists and antagonists is that the agonists act on the few 5-HT6 receptors located directly on the cholinergic and glutamatergic neurons, receiving only a little tonic serotonergic input, whereas the antagonists may act on the 5-HT6 receptor located in the upstream inhibitory GABAergic interneurons, receiving 5-HT input that disinhibits acetylcholine and glutamate release [47]. It is also important to consider that these differences could be related to the use of different antagonists, experimental conditions and instruments for measuring behavior [53]. Furthermore, the 5-HT6 receptor antagonist has its impact more time-limited than the 5-HT5A and 5-HT7 receptors antagonists.

The 5-HT7 receptor is one of the most recently discovered receptor subtypes for 5-HT. The similar expression and distribution of mRNA and proteins for 5-HT7 receptors in the limbic structures supports the notion that they play a role in the regulation of functions like mood, memory processing, and emotional association with memory [54]. Indeed, Schmidt and collaborators verified that the blockade of 5-HT7 receptors facilitated the consolidation and reconsolidation of CFC memory [26]. In the present study, the findings of 5-HT7 receptors were similar to those shown here for 5-HT5A, indicating that the antagonism of 5-HT7 receptors improves the extinction of the CFC memory on the BLA but not the CA1 region of the hippocampus. It has been suggested that the amygdala may be an important sensorimotor interface for both context- and tone-dependent fear conditioning [13] and is consistent with the hypothesis that the 5-HT7 receptor ligands can also improve contextual learning and memory through a mechanism independent of the hippocampus [21]. Furthermore, the highest density of this receptor in the hippocampus was observed in the CA3 region and the dentate gyrus, areas known to be involved in the response to changes in the environment [55]. 5-HT7 activation in the CA3 area enhances hyperpolarization induced cation current [56], which decreases excitatory post-synaptic potentials thus

reducing neuronal excitability. The blockade of this inhibitory effect of the 5-HT7 receptor may explain the beneficial effects of its antagonists on cognition and memory [57]. Another possible explanation is that the 5-HT7 receptors may interact functionally with other 5-HT receptors and change the valence of their behavioral actions. Stiedl and collaborators described interactions between 5-HT7 and 5-HT1A receptors, including 5-HT1A autoreceptors, which may alter the function of both [58]. In addition, hippocampal infusion of 8-OHDPAT, a dual 5-HT1A and 5-HT7 receptor agonist, impaired passive avoidance through hippocampal 5-HT1A receptor activation, while 5-HT7 receptor appears to facilitate memory processes in a broader cortico-limbic network and not the hippocampus alone [59].

Further research is clearly necessary to better explore the manipulation of the serotonergic system, once studies on 5-HT receptors are still hampered by the lack of selective binders, especially agonists. The 5-HT5A receptor still lacks an acknowledged agonist, while 5-HT7 agonists such as AS-19 used in this experiment appear to have low *in vivo* agonist potencies [39,59]. This might explain the absence of agonist responses in both structures in this study.

Conclusion

The antagonism of 5-HT5A, 5-HT6 and 5-HT7 receptors in BLA is beneficial for the consolidation of extinction memory in different time-points, an effect not seen in the CA1 region of the dorsal hippocampus. Specific time-related effects of serotonin on extinction unfold new prospects regarding the operation of this system and widens the range of possible therapeutic approaches, begetting new evidences in memory research that encourage new lines of investigation.

References

- [1] I. Izquierdo, C.R.G. Furini, J.C. Myskiw, Fear Memory, *Physiological Reviews*. 96 (2016) 695–750. doi:10.1152/physrev.00018.2015.
- [2] M.R. Milad, G.J. Quirk, Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress, *Annual Review of Psychology*. 63 (2012) 129–151. doi:10.1146/annurev.psych.121208.131631.

- [3] M.R. Milad, B.L. Rosenbaum, N.M. Simon, Neuroscience of fear extinction: Implications for assessment and treatment of fear-based and anxiety related disorders, *Behaviour Research and Therapy*. 62 (2014) 17–23. doi:10.1016/j.brat.2014.08.006.
- [4] F. Fearing, I.P. Pavlov, G.V. Anrep, Conditioned Reflexes. An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex, *Journal of the American Institute of Criminal Law and Criminology*. 20 (1929) 153. doi:10.2307/1134737.
- [5] N.G. Fiorenza, J. Rosa, I. Izquierdo, J.C. Myskiw, Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas, *Behavioural Brain Research*. 232 (2012) 210–216. doi:10.1016/j.bbr.2012.04.015.
- [6] G.B. Kaplan, K.A. Moore, The use of cognitive enhancers in animal models of fear extinction, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 99 (2011) 217–228. doi:10.1016/j.pbb.2011.01.009.
- [7] C.A. Orsini, S. Maren, Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 36 (2012) 1773–1802. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.12.014.
- [8] N.S. Burghardt, E.P. Bauer, Acute and chronic effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on fear conditioning: Implications for underlying fear circuits, *Neuroscience*. 247 (2013) 253–272. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.05.050.
- [9] N. Singewald, C. Schmuckermair, N. Whittle, A. Holmes, K.J. Ressler, Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders, *Pharmacology & Therapeutics*. 149 (2015) 150–190. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.12.004.
- [10] R. Gonzalez, K. Chávez-Pascacio, A. Meneses, Role of 5-HT_{5A} receptors in the consolidation of memory, *Behavioural Brain Research*. 252 (2013) 246–251. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.051.
- [11] W.D. Hirst, T.O. Stean, D.C. Rogers, D. Sunter, P. Pugh, S.F. Moss, S.M. Bromidge, G. Riley, D.R. Smith, S. Bartlett, C.A. Heidbreder, A.R. Atkins, L.P. Lacroix, L.A. Dawson, A.G. Foley, C.M. Regan, N. Upton, SB-399885 is a potent, selective 5-HT₆ receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models, *European Journal of Pharmacology*. 553 (2006) 109–119. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.049.
- [12] K.C. Liu, J.Y. Li, W. Xie, L.B. Li, J. Zhang, C.X. Du, Y.M. Zhang, H.H. Tan, H.S. Wang, L. Zhang, Activation and blockade of serotonin₆ receptors in the dorsal hippocampus enhance T maze and hole-board performance in a unilateral 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease, *Brain Research*. 1650 (2016) 184–195. doi:10.1016/j.brainres.2016.09.009.
- [13] K. Takeda, M. Tsuji, K. Miyagawa, H. Takeda, 5-HT₇ receptor-mediated fear conditioning and possible involvement of extracellular signal-regulated kinase, *Neuroscience Letters*. 638 (2017) 69–75. doi:10.1016/j.neulet.2016.11.065.
- [14] N.M.W.J. de Bruin, A. van Loevezijn, K.M. Wicke, M. de Haan, J. Venhorst, J.H.M. Lange, L. de Groote, M.A.W. van der Neut, J. Prickaerts, E. Andriambeloson, A.G. Foley, M. van Drimmelen, M. van der Wetering, C.G. Kruse, The selective 5-HT₆ receptor antagonist SLV has putative cognitive-

and social interaction enhancing properties in rodent models of cognitive impairment, *Neurobiology of Learning and Memory*. 133 (2016) 100–117. doi:10.1016/j.nlm.2016.06.020.

[15] J.A. González-Vera, R.A. Medina, M. Martín-Fontecha, A. Gonzalez, T. de la Fuente, H. Vázquez-Villa, J. García-Cárceles, J. Botta, P.J. McCormick, B. Benhamú, L. Pardo, M.L. López-Rodríguez, A new serotonin 5-HT₆ receptor antagonist with procognitive activity – Importance of a halogen bond interaction to stabilize the binding, *Scientific Reports*. 7 (2017). doi:10.1038/srep41293.

[16] F. Kassai, C. Schlumberger, R. Kedves, M. Pietraszek, C. Jatzke, B. Lendvai, I. Gyertyán, W. Danysz, Effect of 5-HT_{5A} antagonists in animal models of schizophrenia, anxiety and depression, *Behavioural Pharmacology*. 23 (2012) 397–406. doi:10.1097/FBP.0b013e3283565248.

[17] A. Quiedeville, M. Boulouard, V. Da Silva Costa-Aze, F. Dauphin, V. Bouet, T. Freret, 5-HT₆ receptor antagonists as treatment for age-related cognitive decline, *Reviews in the Neurosciences*. 25 (2014). doi:10.1515/revneuro-2014-0013.

[18] D. Thomas, 5-HT_{5A} receptors as a therapeutic target, *Pharmacology & Therapeutics*. 111 (2006) 707–714. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.12.006.

[19] M. Yamazaki, K. Harada, N. Yamamoto, J. Yarimizu, M. Okabe, T. Shimada, K. Ni, N. Matsuoka, ASP5736, a novel 5-HT_{5A} receptor antagonist, ameliorates positive symptoms and cognitive impairment in animal models of schizophrenia, *European Neuropsychopharmacology*. 24 (2014) 1698–1708. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.07.009.

[20] M. Yamazaki, M. Okabe, N. Yamamoto, J. Yarimizu, K. Harada, Novel 5-HT_{5A} receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced working memory deficit in mice and reference memory impairment in aged rats, *Journal of Pharmacological Sciences*. 127 (2015) 362–369. doi:10.1016/j.jphs.2015.02.006.

[21] N. Zareifopoulos, C. Papatheodoropoulos, Effects of 5-HT₇ receptor ligands on memory and cognition, *Neurobiology of Learning and Memory*. 136 (2016) 204–209. doi:10.1016/j.nlm.2016.10.011.

[22] C.R.G. Furini, J.A.K. Behling, C.G. Zinn, M.L. Zanini, E. Assis Brasil, L.D. Pereira, I. Izquierdo, J. de Carvalho Myskiw, Extinction memory is facilitated by methylphenidate and regulated by dopamine and noradrenaline receptors, *Behavioural Brain Research*. 326 (2017) 303–306. doi:10.1016/j.bbr.2017.03.027.

[23] J.W. Murrough, The Effect of Early Trauma Exposure on Serotonin Type 1B Receptor Expression Revealed by Reduced Selective Radioligand Binding, *Archives of General Psychiatry*. 68 (2011) 892. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.91.

[24] J.C. Ipser, D.J. Stein, Evidence-based pharmacotherapy of post-traumatic stress disorder (PTSD), *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 15 (2012) 825–840. doi:10.1017/S1461145711001209.

- [25] I. Izquierdo, L.R.M. Bevilaqua, J.I. Rossato, J.S. Bonini, J.H. Medina, M. Cammarota, Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation, *Trends in Neurosciences*. 29 (2006) 496–505. doi:10.1016/j.tins.2006.07.005.
- [26] S.D. Schmidt, C.R.G. Furini, C.G. Zinn, L.E. Cavalcante, F.F. Ferreira, J.A.K. Behling, J.C. Myskiw, I. Izquierdo, Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus, *Neurobiology of Learning and Memory*. 142 (2017) 48–54. doi:10.1016/j.nlm.2016.12.017.
- [27] G. Paxinos, C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed, Academic Press/Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2007.
- [28] E.J. Hermans, F.P. Battaglia, P. Atsak, L.D. de Voogd, G. Fernández, B. Roozendaal, How the amygdala affects emotional memory by altering brain network properties, *Neurobiology of Learning and Memory*. 112 (2014) 2–16. doi:10.1016/j.nlm.2014.02.005.
- [29] L. Sui, S. Huang, B. Peng, J. Ren, F. Tian, Y. Wang, Deep brain stimulation of the amygdala alleviates fear conditioning-induced alterations in synaptic plasticity in the cortical–amygdala pathway and fear memory, *Journal of Neural Transmission*. 121 (2014) 773–782. doi:10.1007/s00702-014-1183-5.
- [30] J.A. Quillfeldt, M.S. Zanatta, P.K. Schmitz, J. Quevedo, E. Schaeffer, J.B.D. Lima, J.H. Medina, I. Izquierdo, Different Brain Areas Are Involved in Memory Expression at Different Times from Training, *Neurobiology of Learning and Memory*. 66 (1996) 97–101. doi:10.1006/nlme.1996.0050.
- [31] F. Benetti, C.R.G. Furini, J. de Carvalho Myskiw, G. Provensi, M.B. Passani, E. Baldi, C. Bucherelli, L. Munari, I. Izquierdo, P. Blandina, Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112 (2015) E2536–E2542. doi:10.1073/pnas.1506109112.
- [32] P.L. Johnson, A. Molosh, S.D. Fitz, D. Arendt, G.A. Deehan, L.M. Federici, C. Bernabe, E.A. Engleman, Z.A. Rodd, C.A. Lowry, A. Shekhar, Pharmacological depletion of serotonin in the basolateral amygdala complex reduces anxiety and disrupts fear conditioning, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 138 (2015) 174–179. doi:10.1016/j.pbb.2015.09.021.
- [33] K.A. Jennings, K.-P. Lesch, T. Sharp, S.J. Cragg, Non-linear relationship between 5-HT transporter gene expression and frequency sensitivity of 5-HT signals: 5-HTT expression governs 5-HT transmission, *Journal of Neurochemistry*. 115 (2010) 965–973. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07001.x.
- [34] T.A. Mathews, D.E. Fedele, F.M. Coppelli, A.M. Avila, D.L. Murphy, A.M. Andrews, Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression, *Journal of Neuroscience Methods*. 140 (2004) 169–181. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.05.017.
- [35] C.L. Wellman, A. Izquierdo, J.E. Garrett, K.P. Martin, J. Carroll, R. Millstein, K.-P. Lesch, D.L. Murphy, A. Holmes, Impaired Stress-Coping and Fear Extinction and Abnormal Corticolimbic

- Morphology in Serotonin Transporter Knock-Out Mice, *Journal of Neuroscience*. 27 (2007) 684–691. doi:10.1523/JNEUROSCI.4595-06.2007.
- [36] T. Izumi, Y. Ohmura, Y. Futami, H. Matsuzaki, Y. Kubo, T. Yoshida, M. Yoshioka, Effects of serotonergic terminal lesion in the amygdala on conditioned fear and innate fear in rats, *European Journal of Pharmacology*. 696 (2012) 89–95. doi:10.1016/j.ejphar.2012.09.028.
- [37] L.C. Berumen, A. Rodríguez, R. Miledi, G. García-Alcocer, Serotonin Receptors in Hippocampus, *The Scientific World Journal*. 2012 (2012) 1–15. doi:10.1100/2012/823493.
- [38] K. Oliver, A. Kinsey, A. Wainwright, D.J. Sirinathsinghji, Localization of 5-HT_{5A} receptor-like immunoreactivity in the rat brain, *Brain Research*. 867 (2000) 131–142. doi:10.1016/S0006-8993(00)02273-3.
- [39] A.J. Roberts, P.B. Hedlund, The 5-HT₇ receptor in learning and memory, *Hippocampus*. 22 (2012) 762–771. doi:10.1002/hipo.20938.
- [40] N.M. Goodfellow, C.D.C. Bailey, E.K. Lambe, The Native Serotonin 5-HT_{5A} Receptor: Electrophysiological Characterization in Rodent Cortex and 5-HT_{1A}-Mediated Compensatory Plasticity in the Knock-Out Mouse, *Journal of Neuroscience*. 32 (2012) 5804–5809. doi:10.1523/JNEUROSCI.4849-11.2012.
- [41] B. Volk, B.J. Nagy, S. Vas, D. Kostyalik, G. Simig, G. Bagdy, Medicinal Chemistry of 5-HT_{5A} Receptor Ligands: A Receptor Subtype with Unique Therapeutic Potential, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 10 (2010) 554–578. doi:10.2174/156802610791111588.
- [42] D. Wilkinson, K. Windfeld, E. Colding-Jørgensen, Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT₆ receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial, *The Lancet Neurology*. 13 (2014) 1092–1099. doi:10.1016/S1474-4422(14)70198-X.
- [43] V. Da Silva Costa-Aze, A. Quiedeville, M. Boulouard, F. Dauphin, 5-HT₆ receptor blockade differentially affects scopolamine-induced deficits of working memory, recognition memory and aversive learning in mice, *Psychopharmacology*. 222 (2012) 99–115. doi:10.1007/s00213-011-2627-3.
- [44] M. King, A. Sleight, M. Woolley, I. Topham, C. Marsden, K.C. Fone, 5-HT₆ receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing consolidation—an effect sensitive to NMDA receptor antagonism, *Neuropharmacology*. 47 (2004) 195–204. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.03.012.
- [45] A. Meneses, Role of 5-HT₆ receptors in memory formation, *Drug News & Perspectives*. 14 (2001) 396. doi:10.1358/dnp.2001.14.7.660941.
- [46] R. Schreiber, J. Vivian, L. Hedley, K. Szczepanski, R.L. Secchi, M. Zuzow, S. van Laarhoven, J.-L. Moreau, J.R. Martin, A. Sik, A. Blokland, Effects of the novel 5-HT₆ receptor antagonist RO4368554 in rat models for cognition and sensorimotor gating, *European Neuropsychopharmacology*. 17 (2007) 277–288. doi:10.1016/j.euroneuro.2006.06.009.

- [47] S. Woods, N. Clarke, R. Layfield, K. Fone, 5-HT₆ receptor agonists and antagonists enhance learning and memory in a conditioned emotion response paradigm by modulation of cholinergic and glutamatergic mechanisms: 5-HT₆ receptor effects on associative learning, *British Journal of Pharmacology*. 167 (2012) 436–449. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02022.x.
- [48] M.J. Ramírez, 5-HT₆ receptors and Alzheimer's disease, (2013) 8.
- [49] M.A. Morozova, T.A. Lepilkina, G.E. Rupchev, A.G. Beniashvily, D.S. Burminskiy, S.S. Potanin, E.V. Bondarenko, V.I. Kazey, Y. Lavrovsky, A.V. Ivachtchenko, Add-on clinical effects of selective antagonist of 5HT₆ receptors AVN-211 (CD-008-0173) in patients with schizophrenia stabilized on antipsychotic treatment: pilot study, *CNS Spectrums*. 19 (2014) 316–323. doi:10.1017/S1092852913000394.
- [50] A. Gravius, J. Laszy, M. Pietraszek, K. Sághy, J. Nagel, C. Chambon, N. Wegener, B. Valastro, W. Danysz, I. Gyertyán, Effects of 5-HT₆ antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in tests used for the detection of cognitive enhancement and antipsychotic-like activity:, *Behavioural Pharmacology*. 22 (2011) 122–135. doi:10.1097/FBP.0b013e328343d804.
- [51] M.D. Lindner, An Assessment of the Effects of Serotonin 6 (5-HT₆) Receptor Antagonists in Rodent Models of Learning, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 307 (2003) 682–691. doi:10.1124/jpet.103.056002.
- [52] M. Russell, R. Dias, Memories are Made of This (Perhaps): A Review of Serotonin 5-HT₆ Receptor Ligands and Their Biological Functions, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2 (2002) 643–654. doi:10.2174/1568026023393877.
- [53] A. Meneses, 5-HT systems: emergent targets for memory formation and memory alterations, *Reviews in the Neurosciences*. 24 (2013). doi:10.1515/revneuro-2013-0026.
- [54] A. Meneses, Memory formation and memory alterations: 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors, novel alternative, *Reviews in the Neurosciences*. 25 (2014). doi:10.1515/revneuro-2014-0001.
- [55] M.R. Hunsaker, J.S. Rosenberg, R.P. Kesner, The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty, *Hippocampus*. 18 (2008) 1064–1073. doi:10.1002/hipo.20464.
- [56] Y. Ohmura, T. Yoshida, K. Konno, M. Minami, M. Watanabe, M. Yoshioka, Serotonin 5-HT₇ Receptor in the Ventral Hippocampus Modulates the Retrieval of Fear Memory and Stress-Induced Defecation, *International Journal of Neuropsychopharmacology*. (2015) pyv131. doi:10.1093/ijnp/pyv131.
- [57] L. Ciranna, M.V. Catania, 5-HT₇ receptors as modulators of neuronal excitability, synaptic transmission and plasticity: physiological role and possible implications in autism spectrum disorders, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8 (2014). doi:10.3389/fncel.2014.00250.
- [58] O. Stiedl, E. Pappa, Å. Konradsson-Geuken, S.O. Ågren, The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT_{1A} and 5-HT₇ and its interaction in emotional learning and memory, *Frontiers in Pharmacology*. 6 (2015). doi:10.3389/fphar.2015.00162.

[59] T.M. Eriksson, S. Holst, T.L. Stan, T. Hager, B. Sjögren, S.O. Ögren, P. Svenningsson, O. Stiedl, 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor crosstalk in the regulation of emotional memory: Implications for effects of selective serotonin reuptake inhibitors, *Neuropharmacology*. 63 (2012) 1150–1160. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.06.061.

Figures captions

Fig. 1. Participation of the 5-HT_{5A} receptors of the CA1 region of the hippocampus and BLA on the extinction of CFC.

Animals were trained in the CFC task. After 24 h, animals were submitted to an extinction training session (Ext Tr) and received bilateral intra-CA1 infusion immediately (A) or 3 h (B) later or intra-BLA infusion immediately (C) or 3 h (D) later of Veh (saline 0.9%) or SB-699551 (10 µg/side). Twenty-four hours later, animals were subjected to a 3-min Ext Test. The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the CFC, in the first 3 min and last 3 min of the Ext Tr and in the Ext Test. Data are presented as mean ± SEM of the percentage of time spent freezing. *** $p < 0.001$ for SB-699551 vs. Veh group on the extinction test. Unpaired *t*-test; $n = 6 - 9$ animals per group.

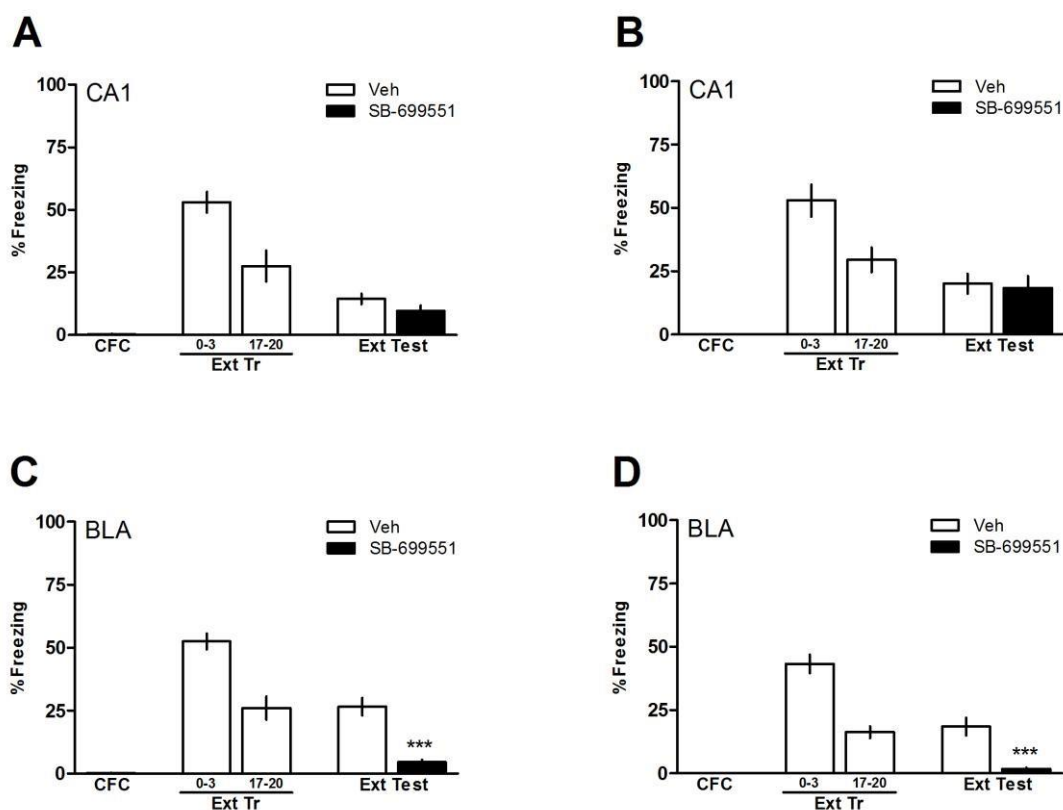


Fig. 2. Participation of the 5-HT6 receptors of the CA1 region of the hippocampus and BLA on the extinction of CFC. Animals were trained in the CFC task. After 24 h, animals were submitted to an extinction training session (Ext Tr) and received bilateral intra-CA1 infusion immediately (A) or 3 h (B) later or intra-BLA infusion immediately (C) or 3 h (D) later of Veh (saline 0.9%), WAY-208466 (0.04 $\mu\text{g}/\text{side}$) or SB-271046 (10 $\mu\text{g}/\text{side}$). Twenty-four hours later, animals were subjected to a 3-min Ext Test. The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the CFC, in the first 3 min and last 3 min of the Ext Tr and in the Ext Test. Data are presented as mean \pm SEM of the percentage of time spent freezing. *** $p < 0.001$ for SB-271046 vs. Veh group on the extinction test. Bonferroni-test after one-way ANOVA; $n = 5 - 8$ animals per group.

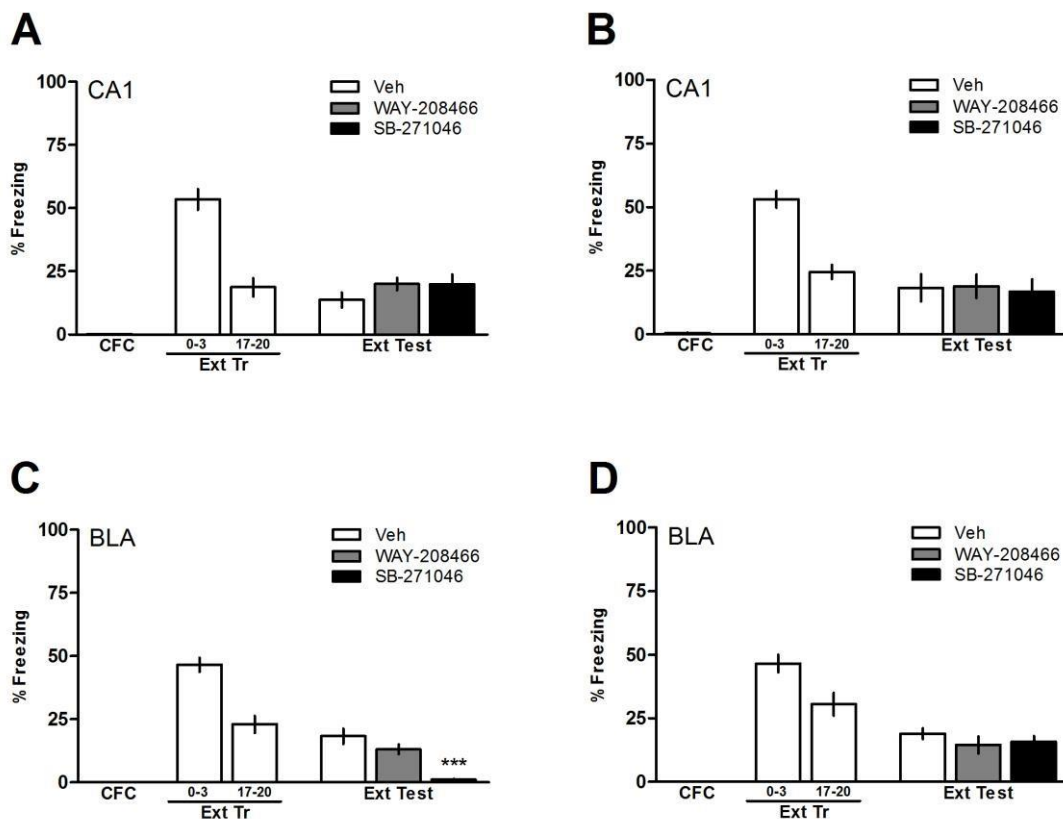


Fig. 3. Participation of the 5-HT7 receptors of the CA1 region of the hippocampus and BLA on the extinction of CFC. Animals were trained in the CFC task. After 24 h, animals were submitted to an extinction training session (Ext Tr) and received bilateral intra-CA1 infusion immediately (A) or 3 h (B) later or intra-BLA infusion immediately (C) or 3 h (D) later of Veh (saline 0.9%) or AS-19 (5 $\mu\text{g}/\text{side}$) or SB-269970 (5 $\mu\text{g}/\text{side}$). Twenty-four hours later, animals were subjected to a 3-min Ext Test. The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the CFC, in the first 3 min and last 3 min of the Ext Tr and in the Ext Test. Data are presented as mean \pm SEM of the percentage of time spent freezing. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ for SB-269970 vs. Veh group on the extinction test. Bonferroni-test after one-way ANOVA; $n = 5 - 9$ animals per group.

