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

**"Histamina intra-amídala modula a memória aversiva de camundongos submetidos
à Esquiva Inibitória, mas não à reexposição no Labirinto em Cruz Elevado"**

FERNANDA DAHER PITTA

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

FERNANDA DAHER PITTA

“Histamina intra-amídala modula a memória aversiva de camundongos submetidos à
Esquiva Inibitória, mas não à reexposição no Labirinto em Cruz Elevado”

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosana Mattioli

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

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

Daher, Fernanda Pitta

Histamina intra-amídala modula a memória aversiva de camundongos submetidos à Esquiva Inibitória, mas não à reexposição no Labirinto em Cruz Elevado. Ribeirão Preto, 2013.

75 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Mattioli, Rosana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Daher Pitta

Histamina intra-amídala modula a memória aversiva de camundongos submetidos à Esquiva Inibitória, mas não à reexposição no Labirinto em Cruz Elevado.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: Psicobiologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Rosana Mattioli pela oportunidade concedida desde a Iniciação científica, pela confiança, pelo conhecimento construído mutuamente, pela amizade e por ter me dedicado sua “maternidade acadêmica” durante minha formação profissional.

À banca examinadora pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Aos meus pais, em especial minha mãe Elena pelo exemplo de determinação, apoio incondicional e pelo amor dedicado sempre!

À minha irmã Cota pela amizade, parceria, pela arte e criatividade.

Aos meus amigos e colegas das Neurociências Kelly, Carol, Lucas, Jorge, Nadiesca e Diogo pelos momentos compartilhados de apoio, pelas sugestões, pelos conselhos, pela descontração e risadas sempre bem vindas.

À Teresa pelo auxílio técnico e experiência compartilhada.

Aos amigos que conquistei desde minha vinda a São Carlos, aqueles que dividem comigo as alegrias e as amarguras da vida acadêmica, os que dividem comigo o gosto pela Biologia, aqueles que me acompanham lado a lado desfrutando as boas experiências da vida. Os levarei por toda minha existência!

À Silmary por me devolver o ponto de equilíbrio nos momentos decisivos e por me mostrar que “Tudo é uma questão de manter a mente quieta, a espinha ereta e o coração tranquilo”.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) pela companhia e apoio.

À Prof^a Azair pela parceria e por compartilhar a infraestrutura do LPA sempre que necessário.

À Renata V. Del Moro pelo suporte e auxílio em dúvidas sobre as normas do Programa de Pós em Psicobiologia.

Aos funcionários do DFisio pela manutenção das nossas boas condições de trabalho.

À **FAPESP** (Proc. 2010/13362-0) e CNPq pelos auxílios financeiros concedidos durante os dois anos de mestrado.

“Like the entomologist in search of brightly colored butterflies, my attention hunted, in the garden of the gray matter, cells with delicate and elegant forms, the mysterious butterflies of the soul”.

Santiago Ramón y Cajal (1937)

RESUMO

DAHER, F.P. **Histamina Intra-amídala Modula a Memória Aversiva de Camundongos Submetidos à Esquiva Inibitória, mas não à Reexposição no Labirinto em Cruz Elevado.** 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O Sistema Neural Histaminérgico tem importante papel na memória emocional, ansiedade e medo, processos com mediação pela amídala. O presente estudo investigou os efeitos da histamina (HA) microinjetada na amídala pré-exposição/teste de aquisição e/ou pré-reexposição/teste de retenção sobre os comportamentos de camundongos submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) ou à caixa de Esquiva Inibitória (EI). Para tanto, os animais passaram por cirurgia para implantação bilateral de cânulas-guia 1 mm acima da amídala. Após recuperação, eles receberam infusões centrais bilaterais pré-testes (LCE) ou pré-sessões (EI) de salina (SAL) ou HA nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 µg em volume de 0,1 µl. Os testes no LCE consistiram na exposição dos camundongos ao aparato (T1) e, após 24 h, na sua reexposição (T2). O número de entradas e tempo total nos braços abertos e suas porcentagens (EBA, TBA, %EBA, %TBA, respectivamente) em T1 foram considerados medidas para inferir ansiedade e em T2 para inferência da memória. As sessões na caixa de EI se iniciaram com a habituação. Após 30 min, os camundongos passaram pelo treino 1, com choque nas patas quando da presença do animal no ambiente escuro. Depois de 2 min, houve o treino 2 e, após 24 h, o teste de retenção com ausência de choque. As latências de transição em direção ao ambiente escuro foram registradas. Ao final, para cada modelo experimental e dose, quatro grupos foram formados: SAL-SAL, SAL-HA, HA-SAL e HA-HA. A análise estatística incluiu a ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Duncan. Para distribuições não homogêneas foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. No LCE, houve uma diminuição da %EBA e %TBA durante T2 em relação a T1 para todos os grupos tratados. Na comparação entre grupos em T1, a exploração dos braços abertos não mostrou alterações significativas, indicando que não houve alteração sobre o estado de ansiedade. Na caixa de EI, não houve aumento na latência de transição durante o teste de retenção para os grupos SAL-HA das doses de 0,5 e 1,0 µg, em relação aos treinos 1 e 2; porém, no grupo HA-HA essa latência apresentou-se elevada. Para o LCE, houve ausência de efeito da HA intra-amídala sobre a memória emocional. Para a tarefa de EI, a HA nas doses de 0,5 e 1,0 µg induziu prejuízo da evocação da memória emocional mediada pela amídala e evocação estado-dependente para os animais tratados com HA nos dois dias de sessões.

Palavras-chave: Histamina. Amídala. Esquiva Inibitória. Labirinto em Cruz Elevado. Memória Emocional.

ABSTRACT

DAHHER, F.P. **Histamine Intra-amygdala Modulation on Aversive Memory for Mice-subjected Inhibitory Avoidance Task while not in the Elevated Plus-maze.** 2013. 75 f. Dissertation (Master's degree) – Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

There is evidence that histamine (HA) modulates learning and memory in different types of behavioral tasks, but the exact course of modulation and its mechanisms are controversial. Well known that the amygdala plays an important role in modulation of emotions. That is able to influence mnemonic processes. The goal of this research was to compare HA microinjected into the amygdala of mice subjected to elevated plus-maze (EPM) or inhibitory avoidance task (IAT) in effects on anxiety-related behavior and emotional memory. For this purpose, male Swiss mice, weighing from 25 and 35g, were bilaterally implanted with guide cannulas. The recovery took from three to five days after surgery, then behavioral tests in the EPM or IAT were performed on two consecutive days. In the first experiment, the animals received microinjections before Trial 1 of saline (SAL) or HA in the amygdala (0.1; 0.5 and 1.0 μg by 0.1 μl /side volume) and were exposed to EPM for 5 min. 24h later the same protocol was repeated (Trial 2). The second experiment consisted of four sessions in the IAT: Habituation, Training 1 and 2 (interval of 2min between the two; footshock; 0.5mA/3sec) and Test (24h later; without footshock). Mice were microinjected before Training 1 and Test with SAL or HA at the same dose mentioned. The animals were assigned into four groups for each experiment: SAL-SAL, SAL-HA, HA-SAL and HA-HA. The data was analyzed using two-way ANOVA and Duncan's tests to the homogeneous data, and Kruskal-Wallis and Wilcoxon to the inhomogeneous distributions. For the tests in the EPM, the percentage of open arm entries (%OAE) were reduced in Trial 2 relative to Trial 1 for SAL-HA and HA-SAL and the percentage of time spent in the open arms (%OAT) also decreased in all groups at the doses of 0.5 and 1.0 μg . No significant changes were observed in that measures in Trial 1 compared all groups, an EPM index of anxiety. For the sessions in the IAT, the step-through latency increased in SAL-SAL, HA-SAL and HA-HA on the test day relative to training day, and no statistical differences were observed to SAL-HA group. The latency were increased with HA infusions pre-trial and pré-test as a condition. Based on our results, the HA intra-amygdala of mice at the doses studied is not involved on the anxiety-like behaviors and mnemonic process in the EPM, but impairs the emotional memory retrieval in the IAT at the doses of 0.5 and 1.0 μg . HA intra-amygdala also induces state-dependent emotional memory in those doses for HA-HA group. We suggest that HA is distinctly involved at pathways that mediates anxiety and fear.

Keywords: Histamine. Amygdala. Inhibitory Avoidance. Elevated Plus-maze. Emotional Memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais projeções histaminérgicas e distribuição dos seus receptores no encéfalo de ratos. As formas indicam as regiões onde se localizam cada subtipo de receptor e o maior tamanho de uma forma indica a predominância do receptor específico. Acc: núcleo acumbens; Amy: amígdala; Hipot: hipotálamo; Str: estriado; SN: substância negra (KOHLE et al., 2011).....	15
Figura 2 – Núcleos do complexo amidoide de rato em um esquema de secção coronal. Áreas em azul formam parte do grupo basolateral (BLA), áreas em amarelo compõem o grupo cortical e as áreas em verde formam o grupo centro medial. ABmc, subdivisão magnocelular basal; ABpc, subdivisão parvicelular basal acessória; Bpc, subdivisão do núcleo basal magnocelular; e.c., capsula externa; Ladl e Lam, subdivisão medial da amígdala lateral; Lavl, subdivisão ventrolateral da amígdala lateral; Mcd, subdivisão dorsal da amígdala medial; Mcv, subdivisão ventral da amígdala medial; Pir, córtex piriforme (SAH et al., 2003).....	17
Figura 3 - Camundongos machos da linhagem Suíço Albino.....	23
Figura 4 - Labirinto em Cruz Elevado	27
Figura 5 - Delineamento experimental do experimento 1 em dois dias consecutivos.....	28
Figura 6 - Caixa de esquiiva inibitória com piso formado por barras de aço inoxidável (visto no detalhe).....	30
Figura 7 - Delineamento experimental do experimento 2.....	31
Figura 8 - Ilustrações esquemáticas das secções coronais do encéfalo de camundongo mostrando a localização aproximada dos sítios de microinjeção (círculos preenchidos) dos experimentos. Os núcleos mais atingidos foram o basolateral e central do complexo amidoide. Os números indicam as coordenadas anteroposteriores relativas ao bregma (adaptado de PAXINOS e FRANKLIN, 2001).....	35
Figura 9 - Médias e Erro Padrão da Média (+E.P.M.) da frequência de entradas nos braços fechados (EBF) para os grupos microinjetados i.c. pré-testes com salina e/ou histamina (0,1; 0,5 ou 1,0 µg), sendo eles: SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,1 (n=10), HA 0,1-SAL (n=7) e HA-HA 0,1 (n=7)/ SAL-SAL (n=10), SAL-HA 0,5 (n=9), HA 0,5-SAL (n=9) e HA-HA 0,5 (n=8)/ SAL-SAL (n=9), SAL-HA 1,0 (n=8), HA 1,0-SAL (n=6) e HA-HA 1,0 (n=7), respectivamente, durante exposição (T1) e reexposição (T2) ao LCE. *p≤0,05 (diferença entre T1 e T2 pelo teste de Duncan).....	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 10** - Médias e Erro Padrão da Média (+E.P.M.) da frequência de entradas nos braços abertos em porcentagem (%EBA) para os grupos microinjetados i.c. pré-testes com salina e/ou histamina (0,1; 0,5 ou 1,0 µg), sendo eles: SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,1 (n=10), HA 0,1-SAL (n=7) e HA-HA 0,1 (n=7)/ SAL-SAL (n=10), SAL-HA 0,5 (n=9), HA 0,5-SAL (n=9) e HA-HA 0,5 (n=8)/ SAL-SAL (n=9), SAL-HA 1,0 (n=8), HA 1,0-SAL (n=6) e HA-HA 1,0 (n=7), respectivamente, durante exposição (T1) e reexposição (T2) ao LCE. *p≤0,05 (diferença entre T1 e T2 pelo teste de Wilcoxon ou Duncan)..... 39
- Figura 11** - Médias e Erro Padrão da Média (+E.P.M.) do tempo gasto nos braços abertos em porcentagem (%TBA) para os grupos microinjetados i.c. pré-testes com salina e/ou histamina (0,1; 0,5 ou 1,0 µg), sendo eles: SAL-SAL (n=9), SAL-HA0,1 (n=10), HA0,1-SAL (n=7) e HA-HA0,1 (n=7)/ SAL-SAL (n=10), SAL-HA0,5 (n=9), HA0,5-SAL (n=9) e HA-HA0,5 (n=8)/ SAL-SAL (n=9), SAL-HA1,0 (n=8), HA1,0-SAL (n=6) e HA-HA1,0 (n=7), respectivamente, durante exposição (T1) e reexposição (T2) ao LCE. *p≤0,05 (diferença entre T1 e T2 pelo teste de Wilcoxon ou Duncan)..... 41
- Figura 12** - Médias e Erro Padrão da Média (+E.P.M.) das latências de transição dos camundongos em direção ao compartimento escuro para os grupos microinjetados intra-amídala pré-treino 1 e pré-teste de retenção com salina e/ou histamina (0,1; 0,5 ou 1,0 µg), sendo eles: SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,1 (n=10), HA 0,1-SAL (n=8) e HA-HA 0,1 (n=9)/ SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,5 (n=10), HA 0,5-SAL (n=10) e HA-HA 0,5 (n=9)/ SAL-SAL (n=8), SAL-HA 1,0 (n=8), HA 1,0 -SAL (n=8) e HA-HA 1,0 (n=7) submetidos à caixa de EI. As setas indicam o momento da microinjeção.*p≤0,05 (diferença entre treino 1 e teste; *post hoc* de Duncan). #p≤0,05 (diferença entre treino 2 e teste; Duncan). **p≤0,05 (diferença entre treinos 1 e 2; Duncan)..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamento farmacológico pré-T1/treino de aquisição (1º dia) e pré-T2/teste de retenção (2º dia) com microinjeção de SAL ou HA intra-amídala (doses de 0,1; 0,5 e 1,0 µg). Tamanho da amostra de cada grupo experimental realizado no LCE e na EI.....	26
Tabela 2 - Medidas convencionais e etológicas dos camundongos expostos e reexpostos ao LCE de acordo com o tratamento farmacológico utilizado: microinjeção central pré-T1 e pré-T2 de SAL e/ou HA na dose de 0,1 µg (grupo controle; SAL-HA 0,1; HA 0,1-SAL e HA-HA 0,1).....	43
Tabela 3 - Medidas convencionais e etológicas dos camundongos expostos e reexpostos ao LCE de acordo com o tratamento farmacológico utilizado: microinjeção central pré-T1 e pré-T2 de SAL e/ou HA na dose de 0,5 µg (grupo controle; SAL-HA 0,5; HA 0,5-SAL e HA-HA 0,5).....	45
Tabela 4 - Medidas convencionais e etológicas dos camundongos expostos e reexpostos ao LCE de acordo com o tratamento farmacológico utilizado: microinjeção central pré-T1 e pré-T2 de SAL e/ou HA na dose de 1,0 µg (grupo controle; SAL-HA 1,0; HA 1,0-SAL e HA-HA 1,0).....	47
Tabela 5 - Latências (em segundos) para o cruzamento entre compartimentos durante a habituação dos grupos experimentais controle e tratados nas três diferentes doses de HA e submetidos ao modelo de EI.....	48
Tabela 6 - Justificativas para a exclusão dos 251 camundongos de um total de 455 animais utilizados ao longo de todo o período. 204 camundongos tiveram seus sítios de microinjeção bilateralmente confirmados e seus dados considerados nas análises finais.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA: área amidaloide anterior
BLA: núcleo basolateral da amígdala
BMA: núcleo basomedial da amígdala
BLA: complexo basolateral da amígdala
BA: núcleo basolateral da amígdala
CEA: núcleo central da amígdala
CEL: amígdala central lateral
CELC: região capsular da amígdala central
CEM: amígdala central medial
CPA: clorfeniramina
EBA: frequência de entradas nos braços abertos
EBF: frequência de entradas nos braços fechados
EI: Esquiva inibitória
E.P.M.: erro padrão da média
GABA: ácido gama-aminobutírico
GLU: glutamato
HA: histamina
IA: núcleo intercalado da amígdala
i.c.: intra-cerebral
i.p.: intraperitoneal
LA: núcleo lateral do complexo amidaloide
LCE: Labirinto em Cruz Elevado
LH: L-histidina
NLOT: núcleo do trato olfatório lateral da amígdala
NTM: núcleo tuberomamilar do hipotálamo
PA: núcleo posterior da amígdala
PAA: área amidalopiriforme
SAL: salina
SNC: sistema nervoso central
SNH: sistema neural histaminérgico
TBA: tempo gasto nos braços abertos

TBF: tempo gasto nos braços fechados

TC: tempo gasto no centro

TE: total de entradas

Total Est: total de esticadas

Total Lev: total de levantamentos

Total Merg: total de imobilidade

TT Imob: tempo total de imobilidade

T1: exposição ou teste 1

T2: reexposição ou teste 2

%EBA: porcentagem da frequência de entradas nos braços abertos

%EBF: porcentagem da frequência de entradas nos braços fechados

%Est Prot: porcentagem de esticadas protegidas

%Merg Prot: porcentagem de mergulhos protegidos

%TBA: porcentagem do tempo gasto nos braços abertos

%TBF: porcentagem do tempo gasto nos braços fechados

%TC: porcentagem do tempo gasto no centro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 O Sistema Neural Histaminérgico	14
1.2 Os Receptores Histaminérgicos	14
1.3 A Histamina e a Amídala	16
1.4 Participação do SNH na Ansiedade, Medo, Aprendizagem e Memória Emocional.....	18
1.4.1 Ansiedade e Medo.....	18
1.4.2 Aprendizagem e Memória Emocional	19
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Sujeitos Experimentais	23
3.2 Cirurgia e Microinjeção	24
3.3 Drogas	25
3.4 Tratamento Farmacológico	25
3.5 Experimento 1: Efeitos da HA administrada i.c. pré-T1 em camundongos no LCE	26
3.5.1 Labirinto em Cruz Elevado	26
3.5.2 Desenho experimental no LCE	27
3.5.3 Teste comportamental	28
3.6 Experimento 2: Efeitos da HA administrada i.c. pré-treino de aquisição em camundongos na caixa de esquivas inibitória	29
3.6.1 Caixa de esquivas inibitória	29
3.6.2 Desenho experimental na caixa de esquivas	30
3.7 Análise histológica	31
3.8 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Verificação dos sítios de microinjeção	34
4.2 HA intra-amídala administrada pré-testes não tem efeitos sobre os comportamentos defensivos e a memória emocional de camundongos no Labirinto em Cruz Elevado.....	36
4.3 HA intra-amídala administrada pré-teste prejudica a evocação da memória de medo em camundongos submetidos à tarefa de EI	48
5 DISCUSSÃO	53
5.1 HA intra-amídala administrada pré-testes não tem efeitos sobre os comportamentos defensivos e a memória emocional de camundongos no Labirinto em Cruz Elevado.....	54
5.2 HA intra-amídala administrada pré-teste prejudica a evocação da memória de medo em camundongos submetidos à tarefa de EI	59
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE A – Animais excluídos das análises e as justificativas.....	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Sistema Neural Histaminérgico

O Sistema Neural Histaminérgico (SNH) compõe-se de grupos difusos de neurônios presentes no cérebro de vertebrados desde os animais filogeneticamente basais até os derivados (HAAS; PANULA, 2003). Os neurônios histaminérgicos estão confinados na área hipotalâmica posterior de mamíferos, pequena região denominada núcleo tuberomamilar (NTM), apresentando projeções para grande parte do Sistema Nervoso Central (SNC) (BROWN; STEVENS; HAAS, 2001; WATANABE et al., 1984).

Uma via ascendente de fibras histaminérgicas segue do NTM pela superfície ventral do hipotálamo para o septo e bulbo olfatório, enquanto as vias que partem dorsalmente do NTM percorrem ao longo do terceiro ventrículo em direção ao tálamo, gânglio basal e amígdala. Tanto a projeção ventral como as dorsais suprem hipocampo e córtex. Já a eferência descendente associa-se ao fascículo longitudinal medeial e garante tronco encefálico e medula espinal (BROWN; STEVENS; HAAS, 2001; YANAI; TASHIRO, 2007). Tais neurônios caracterizam-se pela síntese e liberação da histamina (HA) à qual se atribui muitas funções fisiológicas através dos seus receptores H_1 , H_2 , H_3 e H_4 (HAAS; PANULA, 2003).

1.2 Os Receptores Histaminérgicos

Existem quatro subtipos de receptores histaminérgicos descritos. São receptores metabotrópicos que diferem entre si quanto à localização, processos farmacológicos e de transdução celular (HAAS; PANULA, 2003). No cérebro de roedores e de humanos, estudos imunohistoquímicos, farmacológicos e genéticos têm estabelecido a existência de dois receptores pós-sinápticos para HA (H_1 e H_2) e dois receptores pré-sinápticos (H_3 e H_4) (HILL, 1990; STRAKHOVA et al., 2009).

Os receptores H_1 , H_2 e H_3 são predominantemente expressos em neurônios e células gliais do SNC (HILL, 1990) (Figura 1). Já o receptor H_4 é detectado periféricamente, respondendo por processos inflamatórios (LIM et al., 2005), e em regiões do SNC de ratos e humanos (STRAKHOVA et al., 2009).

Figura 1 - Principais projeções histaminérgicas e distribuição dos seus receptores no encéfalo de ratos. As formas indicam as regiões onde se localizam cada subtipo de receptor e o maior tamanho de uma forma indica a predominância do receptor específico. Acc: núcleo acumbens; Amy: amígdala; Hipot: hipotálamo; Str: estriado; SN: substância negra (KOHLER et al., 2011).

Os receptores de tipo H_1 e H_2 medeiam ações excitatórias na atividade de diversas regiões cerebrais (HAAS et al., 2008; BROWN; STEVENS; HAAS, 2001). A síntese e liberação de HA estão restritas ao controle do auto e heterorreceptor inibitório H_3 localizado no soma, dendritos e terminais axônicos dos neurônios histaminérgicos (HAAS; PANULA, 2003). O receptor H_4 exibe similaridades molecular e farmacológica ao H_3 (GBAHOU et al., 2006), embora seu estudo seja ainda recente.

A estimulação desses receptores desencadeia cascatas de sinalização intracelular que implicam na plasticidade neuronal e seu concomitante funcional e estrutural (DERE et al., 2010). Dentre as várias funções da HA destacam-se as seguintes: modulação do ritmo circadiano (BURNS et al., 2003); estado de

despertar; atividade locomotora; alimentação (YOSHIMATSU, 2008); nocicepção (MOBARAKEH et al., 2000); neuroproteção (BRAVO et al., 2008); plasticidade e recuperação funcional (FAGANELLO; MATTIOLI, 2007; PIRATELLO; MATTIOLI, 2007). Esse neurotransmissor também está envolvido nos comportamentos relacionados à ansiedade (ZARRINDAST et al., 2008), aprendizagem e memória (DAI et al., 2007; MEDALHA et al., 2000), processos especialmente influenciados pelo componente emocional.

1.3 A Histamina e a Amígdala

A amígdala consiste de vários núcleos distintos funcional e anatomicamente (Figura 2) (EHLISH et al., 2009). Uma classificação baseada na localização anatômica, origem do desenvolvimento e arquitetura do circuito local segrega o complexo amigdaloide em *divisão cortical*: núcleo cortical (COA), núcleo basolateral (BLA), núcleo basomedial (BMA) e núcleo lateral (LA); *divisão estriatal*: núcleo medial (MEA) e núcleo central (CEA) (SWANSON; PETROVICH, 1998). A descrição de outros subgrupos específicos - núcleo posterior (PA), núcleo área amigdaloide anterior (AAA), área amigdalopiriforme (PAA), núcleo intercalado (IA) e núcleo do trato olfatório lateral (NLOT) – também é encontrada na literatura (SWANSON, 1992).

O BLA é ativado frente a experiências emocionais que nós percebemos como ansiedade, medo, estresse, raiva e prazer, via projeções aferentes corticais e subcorticais (KANDEL et al., 2003; ROGAN; LEDOUX, 1996). Aproximadamente 80% do BLA é composto por neurônios piramidais que contém glutamato (GLU). Esses neurônios formam sinapses com outros neurônios do BLA e formam a maioria das conexões com áreas externas à BLA, como o CEA e hipocampo. Os restantes 20% consistem de interneurônios GABAérgicos, que compõe a maior parte dos circuitos locais dentro do BLA (SAH et al., 2003).

O CEA consiste da amígdala central lateral (CEL), amígdala central medial (CEM) e região capsular da amígdala central (CELC). Esse núcleo é primordialmente composto de interneurônios GABAérgicos que estão ligados aos neurônios da região estriadopalidal ventral e dorsal do cérebro. Os neurônios do

CEA se projetam extensivamente para estruturas extrínsecas, tais como hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (DAVIS; RAINNIE; CASSELL, 1994; SAH et al., 2003).

Figura 2 – Núcleos do complexo amigdalóide de rato em um esquema de secção coronal. Áreas em azul formam parte do grupo basolateral (BLA), áreas em amarelo compõem o grupo cortical e as áreas em verde formam o grupo centro medial. ABmc, subdivisão magnocelular basal; ABpc, subdivisão parvicelular basal acessória; Bpc, subdivisão do núcleo basal magnocelular; e.c., capsula externa; Ladi e Lam, subdivisão medeial da amígdala lateral; Lavi, subdivisão ventrolateral da amígdala lateral; Mcd e Mcv, subdivisões dorsal e ventral, respectivamente, da amígdala medial; Pir, córtex piriforme (SAH et al., 2003).

Sabe-se também que densidades moderadas de fibras histaminérgicas são encontradas na amígdala (HAAS et al., 2008; WATANABE et al., 1984) e que os receptores para HA são muito expressos no sistema límbico, do qual faz parte essa estrutura (BROWN; STEVENS; HAAS, 2001). Evidências indicam que a amígdala cumpre papel central na modulação da ansiedade, onde sua inibição diminui e a excitação aumenta comportamentos relacionados a este estado (TRUITT et al., 2009). Tais aspectos emocionais são capazes de influenciar a aprendizagem e memória (DERE et al., 2010; PACKARD, 2009).

1.4 Participação do SNH na Ansiedade, Medo, Aprendizagem e Memória emocional

1.4.1 Ansiedade e Medo

As emoções estão entre os mais importantes aspectos da vida mental e do comportamento, assim como a percepção e a cognição. Seus diversos tipos são mediados por sistemas neurais distintos que se mantêm fundamentalmente preservados ao longo da história evolutiva (PANKSEPP, 2011).

De acordo com McNaughton e Corr (2004), existe uma distinção funcional, comportamental e farmacológica entre medo e ansiedade, emoções de caráter aversivo. O medo teria a função de afastar o animal para longe do perigo; ele abrange os comportamentos de luta, fuga, congelamento e se mostra insensível a drogas ansiolíticas. Já em uma situação de conflito entre aproximação e esquiva, a ansiedade tem a função de mobilizar o animal em direção à fonte de ameaça; nela ocorre inibição de comportamentos prepotentes, aumento do acesso de risco e quiescência defensiva. Essas manifestações do estado de ansiedade são sensíveis a drogas ansiolíticas.

A ansiedade é vista como sendo frequentemente originada da ativação equivalente e concorrente do *Sistema Cerebral Aversivo*, cuja resposta representativa é a de medo (ou frustração), e de *Sistemas de Aproximação*. De modo importante, há a participação paralela do *Sistema de Inibição Comportamental* para exibição de comportamentos como acesso de risco e aumento da aversão em situações de conflito (MCNAUGHTON; CORR, 2004).

Esta resposta adaptativa de defesa (BLANCHARD et al., 2008) pode ser regulada pela HA cerebral. Evidências revelaram que a ansiedade avaliada em modelo de claro/escuro para camundongos, induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de tioperamida (antagonista- H_3) combinada com injeção central de mepiramina (antagonista- H_1), pode ser mediada pelo receptor H_1 (YUZURIHARA et al., 2000).

Moghaddam e colaboradores (2008) mostraram o efeito ansiogênico da HA nas doses de 0.1 e 0.5 μ g microinfundida na BLA, verificado em modelo de labirinto em cruz elevado (LCE). Esse efeito ansiogênico pode ser revertido pela

ação do antagonista H_1 , pirilamina, mas não pelo antagonista H_2 , cimetidina (ZARRINDAST et al., 2005). Esses estudos em LCE indicam a atuação do receptor H_1 na modulação da ansiedade.

Estudos sobre as bases biológicas da ansiedade utilizam amplamente o LCE, além de investigações acerca da memória (RODGERS et al., 1996). Esse modelo etológico se fundamenta no conflito entre a preferência dos roedores pelas áreas protegidas e sua motivação inata em explorar novos ambientes (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; ESPEJO, 1997).

1.4.2 Aprendizagem e Memória Emocional

Aprendizagem é a aquisição de novas informações, enquanto memória é o processo pelo qual as informações aprendidas são codificadas, retidas e, posteriormente, recuperadas (BEAR et al., 2001; KANDEL et al., 2003). Evidências acumuladas nos últimos anos fornecem suporte para o envolvimento da HA e seus receptores nos mecanismos fisiológicos da aprendizagem e memória (ALVAREZ; RUARTE, 2002; SPIELER et al., 1999; FLOOD et al., 1998). Tendo camundongos como sujeitos, estudo em nosso laboratório demonstrou que a clorfeniramina (CPA), antagonista dos receptores H_1 , intra-amídala (0,16 nmol) prejudicou *per se* a memória emocional avaliada no LCE. Os efeitos da administração i.p. prévia do precursor L-histidina (LH) também foram de inibição da evocação, indicando uma possível interação entre o SNH e de outros neurotransmissores, como o colinérgico (SERAFIM et al., 2012).

Foi visto que a HA microinjetada na amídala e no núcleo acumbente diminui a exploração e aumenta o conflito emocional em experimentos de esQUIVA inibitória (ALVAREZ, 2009). Através de infusões na amídala e hipocampo de ratos treinados em mesmo modelo foi possível constatar que a aquisição da memória foi efetivamente inibida por uma dose de 9 nmol de HA (ALVAREZ; RUARTE, 2002).

Em outro estudo, ratos submetidos à tarefa de esQUIVA em *step-down* associada à eletrochoque nas patas tiveram a consolidação da memória aversiva facilitada quando receberam infusão de HA no hipocampo dorsal (DA SILVA, 2006). Entretanto, Zarrindast e colaboradores (2006) relataram que a administração

intracerebroventricular (i.c.v.) apenas pré-treino de HA induziu prejuízo da recuperação da memória em camundongos testados ao *step-down*, evidenciando a influência inibitória da HA sobre a memória.

Os contrastes nos efeitos histaminérgicos sobre a memória podem ser explicados pelas diferentes regiões do cérebro envolvidas (PASSANI, 2000), rotas de injeção, drogas utilizadas e abordagens experimentais (ALVAREZ; RUARTE, 2002). Sabe-se, por exemplo, que diferentes versões da aprendizagem de esquiva (ativa, passiva e inibitória) têm sido utilizadas nos estudos de associação entre HA, memória e reforço (FRISCH et al., 1998; HUSTON et al., 1997). Entretanto, as conclusões desses estudos ainda são contraditórias.

As mudanças comportamentais indicativas de aprendizagem aversiva também são notadas na reexposição ao LCE (RODGERS et al., 1996). Estudos propõem que o teste-reteste de roedores ao LCE resulta em mudanças qualitativas no estado emocional, determinada pelas respostas de medo aprendidas verificadas na reexposição e que também são susceptíveis a efeitos de drogas (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000; RODGERS et al., 1996). Deste modo, o presente estudo usará os dois modelos comportamentais citados: esquiva inibitória e LCE.

Assim, considerando o papel central da amígdala na emocionalidade e na modulação da aprendizagem e memória (DERE et al., 2010; ROGAN; LEDOUX, 1996), e tendo em vista que o papel do SNH nessa região cerebral não está elucidado, este trabalho auxiliará a esclarecer a função histaminérgica nesta estrutura. Para tanto, o estudo se fundamenta no efeito da HA exógena sobre a ansiedade, aquisição e evocação da memória emocional de camundongos submetidos ao LCE e à esquiva inibitória.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo investigou os efeitos da histamina microinjetada no complexo amigdaloide de camundongos sobre seus comportamentos relacionados à ansiedade e/ou medo e memória emocional. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Avaliar os efeitos da histamina intra-amídala sobre a ansiedade e memória aversiva de camundongos submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE).
- Analisar a influência da histamina intra-amídala sobre a memória de medo condicionado em camundongos submetidos à tarefa de Esquiva Inibitória (EI).
- Comparar os efeitos da histamina microinjetada no complexo amigdaloide sobre a memória emocional avaliada nos dois modelos experimentais citados - EI e LCE.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos Experimentais

Foram utilizados 455 camundongos, dos quais 204 chegaram ao final dos experimentos tendo o sítio de microinjeção confirmado e seus dados utilizados nas análises finais (**APÊNDICE A**). Todos os camundongos utilizados foram machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Suíço Albino, pesando entre 25 e 35 g e com idade entre 5 e 7 semanas (Figura 3). Os animais provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) foram aclimatados no biotério próprio do Laboratório de Neurociências, situado no Departamento de Fisioterapia da mesma Universidade.

Figura 3 - Camundongos machos da linhagem Suíço Albino.

Os sujeitos experimentais permaneceram alojados em gaiolas (28×18×11 cm) com capacidade para 5 indivíduos e foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($24\pm1^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm5\%$), além de um ciclo de claro-escuro de 12/12 h (luzes acesas às 07:00). Água e comida estiveram disponíveis *ad libitum* aos animais durante todo o estudo, exceto nos breves períodos de testes. Os camundongos eram experimentalmente ingênuos e os procedimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo, no período compreendido de 8:00 à 14:00, a

fim de minimizar a variabilidade dada pela influência do ritmo circadiano nas respostas comportamentais.

O experimento recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar), parecer nº 028/2011 e protocolo de registro nº 018/2011. Os preceitos especificados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) foram respeitados.

3.2 Cirurgia e Microinjeção

Os camundongos receberam implantação bilateral de cânulas-guia de aço com 7 mm de comprimento (25 gauge) 1 mm acima da amígdala sob anestesia composta por xilasina (5 mg/kg) e cloridrato de quetamina (50 mg/kg) (NASEHI et al., 2011) diluídas em salina a 0,9%. A solução anestésica foi injetada intraperitonealmente (i.p.) em um volume de 10 ml/kg de massa corporal do animal. O procedimento cirúrgico foi conduzido em aparelho estereotático (Insight Ltda., Ribeirão Preto - SP, Brasil) e as coordenadas para localização específica do complexo amígdaloide teve por base os valores padrões: -0,8 mm posteriormente ao bregma, $\pm 2,7$ mm lateralmente à sutura sagital e 3,5 mm ventralmente à superfície craniana (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). A coordenada ventral foi ajustada devido à variação anatômica da linhagem de camundongo utilizada em relação à descrita no atlas referenciado.

As cânulas-guia foram fixadas no crânio com uso de acrílico dentário (Acrílico Auto-Polimerizante e Líquido Acrílico Auto-Polimerizante JET, Artigos Odontológicos Clássico - SP, Brasil). Os mandris (7 mm) foram inseridos nas cânulas logo após a cirurgia para reduzir a incidência de oclusão e contaminação. A analgesia pós-operatória foi feita com injeção i.p. de flunixinina meglumina (Banamine) na dose 2,5 mg/kg e volume de injeção de 1 ml/kg (GUIA TERAPÊUTICO VETERINÁRIO, 2003).

Após três a cinco dias de recuperação, os animais foram cuidadosamente contidos e a solução de salina (SAL) ou histamina (HA) foi administrada na amígdala através de uma agulha, cujo comprimento ultrapassou 1

mm da extremidade final da cânula, presa a um tubo de polietileno (PE-10), que por sua vez estava conectado a uma seringa Hamilton de 5 µL. A microinjeção bilateral da substância foi controlada por uma bomba de infusão (Insight BI 2000 - Equipamentos Científicos Ltda., Ribeirão Preto – SP, Brasil) programada para injetar um volume de 0,1 µl/lateral durante 60 s. Uma bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e após a infusão confirmou o fluxo da solução. A agulha foi mantida *in situ* por cerca de 60 s a fim de facilitar a dispersão do veículo ou droga e evitar seu refluxo. As sessões de teste realizaram-se 5 min depois da injeção intracerebral (i.c.) na amígdala dos animais (ZARRINDAST et al., 2005).

3.3 Drogas

Dicloridrato de histamina (HA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), $C_5H_9N_3 \cdot 2ClH$ (PM: 184,07 g/mol), foi diluído em solução salina 0,9% estéril (SAL) para resultar nas seguintes doses e volume:

- HA em infusões bilaterais na amígdala nas doses de 0,1; 0,5 ou 1,0 µg e em volume de 0,1 µl (ou 0,54; 2,72 e 5,43 nmol).

A dose é baseada em estudos prévios com ratos (MOGHADDAM et al, 2008; HASENÖRL et al., 2001) e em estudo piloto realizado em nosso laboratório. Os animais controle foram microinjetados com veículo (SAL) em mesmo volume de HA. Os tubos *ependorf* contendo as soluções foram mantidos em refrigeração e tiveram sua identificação desconhecida pelo experimentador tanto no momento do teste como durante a análise comportamental.

3.4 Tratamento Farmacológico

Cada experimento (LCE e EI) foi composto por quatro grupos dispostos do seguinte modo: um grupo controle (SAL-SAL); três grupos tratados com HA nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 µg/lado, administrada pré-exposição/treino de aquisição (HA 0,1-SAL; HA 0,5-SAL e HA 1,0-SAL) e/ou pré-reexposição/teste de retenção (HA-HA

0,1; HA-HA 0,5; HA-HA 1,0; SAL-HA 0,1; SAL-HA 0,5; SAL-HA 1,0) (Tabela 1). Os grupos HA-HA nas diferentes doses foi realizado para controle de efeito de estado-dependência. Os animais foram selecionados de maneira randômica no primeiro dia de teste/sessão e pelo menos um sujeito de cada grupo foi testado em cada um dos experimentos realizados.

Tabela 1 - Tratamento farmacológico pré-T1/treino de aquisição (1º dia) e pré-T2/teste de retenção (2º dia) com microinjeção de SAL ou HA intra-amídala (doses de 0,1; 0,5 e 1,0 µg/lado). Tamanho da amostra de cada grupo experimental realizado no LCE e na EI.

Grupo	N*						Tratamento Farmacológico			
	Dose 0,1		Dose 0,5		Dose 1,0		LCE		EI	
	LCE	EI	LCE	EI	LCE	EI	T1	T2	Treino 1	Teste de Retenção
SAL-SAL	9	9	10	9	9	8	SAL	SAL	SAL	SAL
SAL-HA	10	10	9	10	8	8	SAL	HA	SAL	HA
HA-SAL	7	8	9	10	6	8	HA	SAL	HA	SAL
HA-HA	7	9	8	9	7	7	HA	HA	HA	HA

*N representa o número de sujeitos.

3.5 Experimento 1: Efeitos da HA administrada i.c. pré-T1 e pré-T2 em camundongos no Labirinto em Cruz Elevado

3.5.1 Labirinto em Cruz Elevado

O LCE foi originalmente proposto para ratos (PELLOW et al.,1985) e sofreu modificações que o validaram para camundongos Suíços (LISTER, 1987). Seu uso tem sido cada vez mais difundido para estudos da ansiedade e memória emocional. Constituído de acrílico cinza claro, o equipamento consiste em dois braços abertos (30×5×0,25 cm) e dois braços fechados com paredes opacas (30×5×15,5 cm), todos eles unidos a uma plataforma central (5 cm×5 cm), e elevado a uma altura de 38,5 cm do solo por um suporte (Figura 4). Ao longo de todo perímetro dos braços abertos existe uma fina borda de espessura 0,25 cm.

Figura 4 - Labirinto em Cruz Elevado.

Com o objetivo de evitar que os animais tivessem dicas visuais do ambiente, ao redor do LCE foi colocada uma cortina preta e opaca que ficava presa a um suporte posicionado acima do aparato. A luminosidade presente no centro do LCE era de 48 lux.

3.5.2 Desenho experimental no LCE

O experimento realizou-se em dois dias consecutivos, teste 1 (T1) e teste 2 (T2). No primeiro dia (T1), os animais foram levados do biotério para a sala de procedimentos, onde permaneceram em suas gaiolas durante 1h para habituação ao local (HOLMES et al., 2000). Em seguida, eles receberam microinfusão de SAL ou HA (pré-teste), e foram deixados isoladamente em uma gaiola por 5 min para redução do estresse de manipulação. Levados então ao LCE, cada camundongo foi colocado no centro do labirinto com a face voltada para o braço aberto, tendo 5 min de livre exploração. No segundo dia (T2), 24 h depois da exposição, os animais foram reexpostos ao LCE sob as mesmas condições descritas em T1, com microinjeção pré-reexposição de SAL ou HA (Figura 5). Entre os testes foi efetuada a limpeza do equipamento com álcool a 5%.

Figura 5 - Delineamento experimental do experimento 1 em dois dias consecutivos.

Em ambos os dias as sessões no LCE foram registradas por um sistema de gravação (GeoVision GV-600 System), com câmera posicionada sobre o equipamento iluminado e conectada ao computador localizado em sala adjacente, para posterior análise das medidas convencionais e etológicas observadas.

3.5.3 Teste comportamental

Os registros comportamentais foram analisados através do programa computacional X-Plot-Rat (GARCIA et al, 2005). As medidas convencionais registradas foram: número de entradas e tempo total nos braços abertos e fechados (EBA, EBF, TBA e TBF); tempo total na plataforma central (TC); total de entradas (TE) (LISTER, 1987). Esses dados foram utilizados para o cálculo das porcentagens de entradas [%EBA, %EBF = (entradas nos braços abertos ou fechados/ TE) × 100] e de tempo nos braços e no centro [%TBA, %TBF, %TC = (tempo nos braços abertos, fechados ou centro/ 300) × 100]. As entradas foram consideradas quando o animal tinha suas quatro patas no braço ou na plataforma central.

Quanto às medidas etológicas, foi verificada a frequência das posturas: esticadas; mergulhos; levantamentos e imobilidade. O ato de esticar refere-se à alongação da cabeça e dos ombros como postura exploratória seguida por retração à posição original do animal. O mergulho é um movimento exploratório de cabeça e ombros sobre as laterais do LCE em direção ao solo. O levantamento é considerado uma postura ereta do roedor, com as patas anteriores movendo-se verticalmente e amparadas contra a parede da área cercada. A imobilidade é definida pela ausência

de todos os movimentos corporais exceto para respiração (RODGERS; JOHNSON, 1995).

Tendo em vista a importância das pistas tigmotáticas para os padrões de exploração do LCE, mergulhos e esticadas foram diferenciados de acordo com a área do labirinto em que eles foram exibidos. Os braços fechados e a plataforma central foram considerados juntos áreas protegidas (que oferecem relativa segurança), enquanto que os braços abertos foram designados áreas desprotegidas (HOLMES; RODGERS, 1998; RODGERS; JOHNSON, 1995).

Em T1, as medidas clássicas de tempo e frequência nos braços abertos, bem como suas porcentagens, indicaram o nível de ansiedade. A atividade locomotora foi representada pelos dados relativos às EBF e TE (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995). Em T2, a diminuição das entradas e do tempo nos braços abertos foi definida como medida para inferir memória emocional (BERTOGLIO et al., 2006; DÁL-COL et al., 2003).

3.6 Experimento 2: Efeitos da HA administrada i.c. pré-treino de aquisição e pré-teste de retenção em camundongos na caixa de Esquiva Inibitória

3.6.1 Caixa de Esquiva Inibitória

Foi utilizada uma caixa de esquiva confeccionada em acrílico (48x27x30 cm) e composta por dois compartimentos: um claro (de acrílico cristal, 24x13,5x15 cm), iluminado pela lâmpada de led da própria caixa, além das lâmpadas fluorescente (40 W) da sala de testes e da luminária posicionada sobre a parte clara (9 W) (luminosidade total de 456 lux); um escuro (acrílico preto, 24x13,5x15 cm), dotado de tampa (Figura 6). O paradigma da EI é baseado na inibição da fotofobia natural presente em roedores (DETRAIT et al., 2009).

Uma abertura (7x7 cm) na forma de porta guilhotina de 27 x 30cm (base x altura) localiza-se ao nível do piso e no centro da divisão dos dois ambientes; seu acionamento se dá através do programa instalado em computador em resposta aos sensores de infravermelho. O piso do compartimento escuro é

formado por barras de aço inoxidável (2,5 mm de diâmetro) distanciadas 1 cm entre si. O choque elétrico contínuo com intensidade de 0,5 mA e duração de 3 s (KIM et al., 2010) foi gerado por um estimulador isolado e distribuído pela grade que compõe o piso.

Figura 6 - Caixa de esquiva inibitória com piso formado por barras de aço inoxidável (visto no detalhe).

3.6.2 Desenho experimental na caixa de EI

O experimento foi realizado em dois dias consecutivos. Todos os animais foram habituados à sala de experimento durante 1h antes da sessão (HOLMES et al., 2000). Em seguida, os camundongos foram habituados ao equipamento. Cada animal foi gentilmente colocado no compartimento claro com a face voltada para porta guilhotina e, seguidos 6 s, a porta elevou-se (Figura 7). Os animais que demoraram mais de 100 s para atravessar o limite entre compartimentos foram eliminados do experimento. Tendo cruzado com as quatro patas o limite, a porta fechou-se e o camundongo foi levado do ambiente escuro para gaiola.

Após 30 min desta habituação, os animais receberam microinfusão de SAL ou HA (pré-treino 1), e foram deixados isoladamente em uma gaiola por 5 min para redução do estresse de manipulação. Cada animal foi levado à caixa de esquiva para o primeiro treino de aquisição e, imediatamente depois de entrar no compartimento escuro, a porta-guilhotina fechou-se e o choque elétrico foi acionado.

Após 20 s, o camundongo foi levado para gaiola. Um segundo treino de aquisição foi realizado após um intervalo de 2 min seguindo as mesmas condições do primeiro. No segundo treino, a aquisição da esquiwa é considerada bem sucedida se o animal não entrar no compartimento escuro em até 120 s (ZARRINDAST et al., 2002).

Decorridas 24 h dos treinos, um teste de retenção foi executado. Foi administrado SAL ou HA i.c. pré-teste e, após 5 min, os animais foram submetidos às mesmas condições dos treinos, mas nenhum choque elétrico foi aplicado. O teste terminou quando o animal entrou no compartimento escuro ou permaneceu no ambiente claro por 300 s – critério para retenção (ZARRINDAST et al., 2002).

Figura 7 - Delineamento experimental do experimento 2.

A latência para transição do animal em direção ao compartimento escuro foi registrada com cronômetro a partir do momento de abertura da porta nas sessões de habituação, treinos de aquisição 1 e 2, e teste de retenção. Em ambos os dias as sessões na caixa de esquiwa foram registradas pelo sistema de gravação (GeoVision GV-600 System), com câmera posicionada sobre o equipamento.

3.7 Análise Histológica

Ao final dos testes no segundo dia, os animais foram profundamente anestesiados com sobredose da solução composta por xilasina e cloridrato de quetamina (aproximadamente o triplo da dose recomendada: 15 mg/kg de xilasina e 150 mg/kg de quetamina) diluídas em salina a 0,9%. Em seguida, os camundongos foram eutanasiados através de deslocamento cervical. Foi realizada infusão de 0,1 µl de azul de metileno a 1% de acordo com o procedimento de microinjeção descrito

no subitem **3.2 Cirurgia e Microinjeção**. Os camundongos foram decapitados, seus encéfalos removidos e fixados em formalina a 10% por no mínimo três dias.

Dois dias antes da secção, os cérebros permaneceram em solução de sacarose 20% por 24 h em refrigeração. Em seguida, a solução foi trocada por outra de maior concentração (30%) e o material levado novamente à geladeira por mais 24 h. Só então as secções coronais de 80 µm de espessura foram feitas, ao longo da cânula-guia, em micrótomo-criostato (ANCAP 300). As lâminas foram verificadas no microscópio (Olimpus B202) e a dispersão do azul de metileno indicou os sítios das injeções. Os dados dos animais com microinjeções que não atingiram a amídala bilateralmente foram excluídos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi verificada a homogeneidade de variância dos dados coletados através do Teste de Levene. Em seguida, foi realizado o teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas (**Experimento 1**: Fator 1 - tratamento farmacológico e Fator 2 - exposição e reexposição; **Experimento 2**: Fator 1 - tratamento farmacológico e Fator 2 - sessões). Quando apropriado foi efetuado o *post hoc* de Duncan para comparações múltiplas.

Para os dados da menor dose (0,1 µg) no LCE, que não foram homogeneamente distribuídos, aplicou-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (para diferença entre grupos) e Wilcoxon para amostras pareadas (diferença entre exposição e reexposição).

O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. As análises foram feitas através do software Statistica 8.0 (Stat Soft. Inc.).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados descritos a seguir referem-se aos grupos experimentais SAL-SAL, SAL-HA, HA-SAL e HA-HA, para as três diferentes doses de HA, submetidos a dois paradigmas comportamentais distintos: LCE e EI. Foram utilizados 455 camundongos no período de setembro/2011 a março/2013, dos quais 248 tiveram seu sítio de microinjeção bilateralmente confirmado, porém destes apenas 204 animais tiveram seus dados utilizados nas análises finais (**APÊNDICE A**).

4.1 Verificação dos sítios de microinjeção

De acordo com as análises histológicas, as divisões do complexo amigdalóide mais atingidas bilateralmente foram o Complexo Basolateral (BLA) e Núcleo Central (CeA) (Figura 8). Devido ao tamanho reduzido das subdivisões da amígdala em camundongos, não foi possível especificar as respostas comportamentais observadas segundo os subnúcleos amigdalóides.

Figura 8 - Ilustrações esquemáticas das secções coronais do encéfalo de camundongo mostrando a localização aproximada dos sítios de microinjeção (círculos preenchidos) dos experimentos. Os núcleos mais atingidos foram o basolateral e central do complexo amigdalóide. Os números indicam as coordenadas anteroposteriores relativas ao bregma (adaptado de PAXINOS e FRANKLIN, 2001).

4.2 HA intra-amídala administrada pré-testes não tem efeitos sobre os comportamentos defensivos e a memória emocional de camundongos no Labirinto em Cruz Elevado

A Figura 9 apresenta os resultados da medida convencional **EBF**, que não apresentou diferença estatisticamente significativa em T1 na análise entre os grupos para os animais tratados com HA nas doses de 0,1 µg ($p=0,94$; teste de Kruskal-Wallis), 0,5 µg ($p=0,08$; ANOVA) e 1,0 µg ($p=0,31$; ANOVA). Essa ausência de diferença sugere que não houve alteração na atividade locomotora dos sujeitos experimentais para cada dose de HA testada e seus respectivos controles.

Figura 9 - Médias e Erro Padrão da Média (+E.P.M.) da frequência de entradas nos braços fechados (EBF) para os grupos microinjetados i.c. pré-testes com salina e/ou histamina (0,1; 0,5 ou 1,0 µg), sendo eles: SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,1 (n=10), HA 0,1-SAL (n=7) e HA-HA0,1 (n=7)/ SAL-SAL (n=10), SAL-HA 0,5 (n=9), HA 0,5-SAL (n=9) e HA-HA 0,5 (n=8)/ SAL-SAL (n=9), SAL-HA 1,0 (n=8), HA 1,0-SAL (n=6) e HA-HA 1,0 (n=7), respectivamente, durante exposição (T1) e reexposição (T2) ao LCE. * $p \leq 0,05$ (diferença entre T1 e T2 pelo teste de Duncan).

Com relação à **EBA em porcentagem** (Figura 10), o teste de Wilcoxon para HA na dose de 0,1 µg ($p < 0,05$) e a ANOVA de duas vias para as doses de 0,5 µg ($F_{(1,35)} = 21,66$; $p < 0,01$) e 1,0 µg ($F_{(1,29)} = 5,52$; $p = 0,03$) explicitaram diferenças significativas entre T1 e T2. A redução significativa da **%EBA** na reexposição comparada à exposição foi identificada para os grupos SAL-SAL ($p = 0,02$), SAL-HA 0,1 ($p = 0,04$) e HA 0,1-SAL ($p = 0,02$), na dose menor testada. Essa diminuição entre os dias de teste foi indicada pelo teste de Duncan para o grupo HA 0,5-SAL ($p = 0,01$), porém o mesmo *post hoc* não identificou os grupos da dose mais alta nos quais ela aparece.

Não houve diferenças significativas para **%EBA** em T1 na análise entre os grupos das doses de 0,1 µg ($p = 0,61$), indicado pelo teste de Kruskal-Wallis, de 0,5 µg ($F_{(3,35)} = 0,55$; $p = 0,65$) e 1,0 µg ($F_{(3,29)} = 0,32$; $p = 0,81$) de acordo com a ANOVA.

Figura 10 - Médias e Erro Padrão da Média (+E.P.M.) da frequência de entradas nos braços abertos em porcentagem (%EBA) para os grupos microinjetados i.c. pré-testes com salina e/ou histamina (0,1; 0,5 ou 1,0 µg), sendo eles: SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,1 (n=10), HA 0,1-SAL (n=7) e HA-HA 0,1 (n=7)/ SAL-SAL (n=10), SAL-HA 0,5 (n=9), HA 0,5-SAL (n=9) e HA-HA 0,5 (n=8)/ SAL-SAL (n=9), SAL-HA 1,0 (n=8), HA 1,0-SAL (n=6) e HA-HA 1,0 (n=7), respectivamente, durante exposição (T1) e reexposição (T2) ao LCE. *p<0,05 (diferença entre T1 e T2 pelo teste de Wilcoxon ou Duncan).

Para a dose de 0,1 µg, as **porcentagens de TBA** reduziram significativamente entre T1 e T2 para todos os grupos: SAL-SAL ($p=0,05$), SAL-HA ($p=0,03$), HA-SAL ($p=0,02$) e HA-HA ($p=0,03$), de acordo com o teste de Wilcoxon (Figura 11). Diferenças estatisticamente significativas nas doses de 0,5 e 1,0 µg também foram identificadas pela ANOVA ($F_{(1,35)}=106,65$; $p<0,01$ e $F_{(1,29)}=75,35$; $p<0,01$; respectivamente), sendo que a diminuição da **%TBA** durante a reexposição ocorreu nos grupos SAL-HA 0,5 ($p<0,01$), HA 0,5-SAL ($p<0,01$), HA-HA 0,5 ($p<0,01$) e seu controle ($p<0,01$); SAL-HA 1,0 ($p<0,01$), HA 1,0-SAL ($p<0,01$), HA-HA 1,0 ($p<0,01$) e seu controle ($p<0,01$), segundo o *post hoc* de Duncan.

A ANOVA de duas vias indicou interação entre os fatores 1, tratamento, e 2, dias de testes, para **TBA** (Tabela 4) e **%TBA** dos animais microinjetados com HA 0,5 µg ($F_{(3,35)}=3,94$; $p=0,02$).

Não houve diferenças significativas na análise entre **%TBA** das exposições entre os grupos experimentais da menor dose ($p=0,39$; teste de Kruskal-Wallis) e de acordo com a ANOVA para as doses de 0,5 µg ($F_{(3,35)}=1,49$; $p=0,24$) e 1,0 µg ($F_{(3,29)}=0,25$; $p=0,86$). Essa ausência de diferença para **%EBA** e **%TBA** sugere que não houve alteração nos comportamentos relativos à ansiedade dos sujeitos para cada dose de HA testada.

Figura 11 - Médias e Erro Padrão da Média (+E.P.M.) do tempo gasto nos braços abertos em porcentagem (%TBA) para os grupos microinjetados i.c. pré-testes com salina e/ou histamina (0,1; 0,5 ou 1,0 µg), sendo eles: SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,1 (n=10), HA 0,1-SAL (n=7) e HA-HA 0,1 (n=7)/ SAL-SAL (n=10), SAL-HA 0,5 (n=9), HA 0,5-SAL (n=9) e HA-HA 0,5 (n=8)/ SAL-SAL (n=9), SAL-HA 1,0 (n=8), HA 1,0-SAL (n=6) e HA-HA 1,0 (n=7), respectivamente, durante exposição (T1) e reexposição (T2) ao LCE. *p≤0,05 (diferença entre T1 e T2 pelo teste de Wilcoxon ou Duncan).

As demais medidas convencionais e as medidas etológicas registradas constam nas Tabelas 3, 4 e 5. A Tabela 3 apresenta as medidas relativas aos grupos microinjetados com HA na dose de 0,1µg. Nela é possível notar reduções estatisticamente significativas de acordo com o teste de Wilcoxon nas reexposições de SAL-SAL para **EBA** ($p=0,05$); dos quatro grupos para **TBA** (SAL-SAL, $p=0,05$; SAL-HA, $p=0,03$; HA-SAL, $p=0,02$; HA-HA, $p=0,03$); de SAL-SAL e HA-HA para **TC** e para **%TC** ($p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente).

Já os animais controle ($p=0,02$), SAL-HA 0,1 ($p=0,05$) e HA 0,1-SAL ($p=0,02$) tiveram a **porcentagem de EBF** significativamente elevada em T2 comparada à T1 (teste de Wilcoxon). **TBF** e suas porcentagens também aumentaram de modo significativo durante a reexposição para grupos experimentais SAL-SAL ($p=0,01$), HA 0,1-SAL ($p=0,02$) e HA-HA 0,1 ($p=0,02$) (Tabela 3).

Tabela 2 - Medidas convencionais e etológicas dos camundongos expostos e reexpostos ao LCE de acordo com o tratamento farmacológico utilizado: microinjeção central pré-T1 e pré-T2 de SAL e/ou HA na dose de 0,1 µg (grupo controle; SAL-HA 0,1; HA 0,1-SAL e HA-HA 0,1).

MEDIDAS	SAL-SAL		SAL-HA 0,1		HA 0,1-SAL		HA-HA 0,1	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
EBA	6,00±1,26	3,89±1,70*	5,20±0,84	3,70±0,45	6,86±1,75	6,29±2,04	5,00±0,62	3,71±0,75
TE	13,56±2,96	11,11±2,87	12,20±1,84	11,60±0,76	15,00±2,62	15,57±3,84	12,43±1,09	10,86±1,16
%EBF	46,81±8,70	75,00±6,91*	55,48±5,16	67,98±3,30*	57,78±7,38	67,15±6,75*	60,27±2,62	68,28±3,86
TBA	60,80±14,49	45,77±14,67*	69,71±14,16	30,76±5,27*	112,94±28,40	54,91±18,04*	71,17±11,28	32,43±6,17*
TBF	132,69±30,26	207,75±18,91*	190,40±15,28	230,80±10,33	146,74±28,54	210,48±23,61*	164,92±15,67	245,65±9,99*
TC	106,51±27,80	46,48±11,08*	39,88±7,42	38,45±9,07	40,32±8,26	34,60±7,65	63,91±10,53	21,91±5,10*
%TBF	44,23±10,09	69,25±6,30*	63,47±5,09	76,93±3,44	48,91±9,51	70,16±7,87*	54,97±5,22	81,88±3,33*
%TC	35,50±9,27	15,49±3,69*	13,29±2,47	12,82±3,02	13,44±2,75	11,53±2,55	21,30±3,51	7,30±1,70*
%Est Prot	56,11±14,40	41,96±11,85	59,40±12,38	48,00±11,31	37,00±17,85	24,49±16,11	66,59±8,56	84,01±7,93
Total Est	6,44±2,77	4,44±1,14	3,20±0,79	3,40±0,72	2,57±1,78	1,86±0,96	5,86±0,99	5,29±1,21
%Merg Prot	50,46±15,60	33,33±16,67	28,33±13,16	36,67±15,28	45,24±17,33	26,19±17,00	38,10±15,73	14,29±14,29
Total Merg	2,67±0,88	0,44±0,18*	0,90±0,41	0,70±0,33	2,00±0,69	1,14±0,83	2,14±0,86	0,57±0,30
Total Lev	2,67±1,31	1,44±0,58	2,30±0,72	3,20±0,71	2,43±1,34	2,00±0,72	1,86±0,86	1,71±0,68
TT Imob	13,36±8,49	7,78±7,34	4,80±2,90	1,29±0,85	3,71±2,65	3,66±3,66	2,87±2,87	0,00

Valores representam a Média ± Erro Padrão da Média. EBA, entradas nos braços abertos; TE, total de entradas; %EBF, entradas nos braços fechados em porcentagem; TBA, tempo nos braços abertos; TBF, tempo nos braços fechados; TC, tempo no centro; %TBF, TBF em porcentagem; %TC, TC em porcentagem; %Est Prot, esticadas protegidas em porcentagem; Total Est, total de esticadas; %Merg Prot, mergulhos protegidos em porcentagem; Total Merg, total de mergulhos; Total Lev, total de levantamentos; TT Imob, tempo total de imobilidade. *p≤0,05 (diferença entre T1 e T2; Wilcoxon).

A Tabela 4 mostra as diferenças significativas para os grupos tratados com HA 0,5 µg na comparação entre dias de testes. A medida **EBA** diminui em T2, como indicado pela ANOVA ($F_{(1,35)}=22,44$; $p<0,01$), apenas para os camundongos SAL-SAL ($p<0,01$) e SAL-HA ($p<0,01$) de acordo com o teste de Duncan. Já a redução de **TBA** ($F_{(1,35)}=106,65$; $p<0,01$; ANOVA) durante a reexposição ocorre em todos os grupos: SAL-SAL ($p<0,01$); SAL-HA ($p<0,01$); HA-SAL ($p<0,01$) e HA-HA ($p<0,01$), evidenciado pelo teste de Duncan. Apenas o grupo SAL-HA ($p=0,03$; teste de Duncan) teve uma diminuição significativa do **TE** ($F_{(1,35)}=4,37$; $p=0,04$; ANOVA) e somente os animais HA-HA ($p=0,03$, teste de Duncan) tiveram **TC** e **%TC** reduzidas em T2 de acordo com a ANOVA ($F_{(1,35)}=4,43$; $p=0,04$).

A **porcentagem de EBF** aumenta significativamente ($F_{(1,35)}=21,66$; $p<0,01$; ANOVA) apenas no grupo HA0,5-SAL ($p=0,01$; teste de Duncan) (Tabela 4). Houve um aumento de **TBF** e de **suas porcentagens** em T2 comparado a T1 ($F_{(1,35)}=114,99$; $p<0,01$, ANOVA) para os quatro grupos experimentais: SAL-SAL ($p<0,01$), SAL-HA ($p<0,01$), HA-SAL ($p<0,01$) e HA-HA ($p<0,01$); teste de Duncan.

Na análise das medidas etológicas, as **esticadas protegidas em porcentagem** (%Est Prot) aumentaram significativamente em T2 ($F_{(1,35)}=10,49$; $p<0,01$; ANOVA) apenas para o grupo SAL-SAL ($p=0,03$; teste de Duncan). Já a **frequência total de mergulhos** (Total Merg) teve uma destacada redução na reexposição ($F_{(1,35)}=31,09$; $p<0,01$; ANOVA) para os grupos SAL-SAL ($p=0,04$), SAL-HA ($p<0,01$) e HA-SAL ($p=0,05$), de acordo com o teste de Duncan.

Tabela 3 - Medidas convencionais e etológicas dos camundongos expostos e reexpostos ao LCE de acordo com o tratamento farmacológico utilizado: microinjeção central pré-T1 e pré-T2 de SAL e/ou HA na dose de 0,5 µg (grupo controle; SAL-HA 0,5; HA 0,5-SAL e HA-HA 0,5).

MEDIDAS	SAL-SAL		SAL-HA 0,5		HA 0,5-SAL		HA-HA 0,5	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
EBA	8,00±1,04	4,70±1,11*	7,00±0,88	3,67±0,97*	6,67±1,39	4,56±0,85	5,50±0,46	4,25±1,15
TE	17,20±1,12	14,00±2,46	15,56±1,66	10,56±1,84*	11,89±2,19	12,89±2,03	11,38±0,96	10,25±2,44
%EBF	54,80±3,55	68,33±3,67	55,92±4,22	65,25±6,23	46,67±5,35	66,10±3,49*	50,62±3,69	63,21±5,94
TBA	99,13±16,67	47,76±11,32*	104,55±10,87	41,93±13,33*	159,15±10,11	42,55±7,49*	120,75±19,74	40,09±10,67*
TBF	145,77±16,52	210,28±17,33*	140,12±10,83	217,69±16,98*	91,97±9,94	199,24±16,70*	128,69±14,78	227,96±15,21*
TC	55,10±3,70	41,96±7,70	55,33±6,24	40,38±9,83	48,88±6,27	58,21±15,91	50,56±11,55	22,95±6,63*
%TBF	48,59±5,51	70,09±5,78*	46,71±3,61	72,56±5,66*	30,66±3,31	66,41±5,57*	42,90±4,93	75,99±5,07*
%TC	18,37±1,23	13,99±2,57	18,44±2,08	13,46±3,28	16,29±2,09	19,40±5,30	16,85±3,85	7,65±2,21*
%Est Prot	28,22±5,59	70,12±10,22*	32,54±7,77	51,42±13,81	34,52±13,64	59,26±11,49	35,83±15,18	55,21±16,74
Total Est	7,80±1,87	3,80±0,98	5,22±0,55	4,67±1,57	5,00±1,77	2,67±0,44	2,88±0,79	1,38±0,50
%Merg Prot	42,38±11,80	31,43±15,03	35,38±6,95	33,33±14,43	23,15±9,99	44,44±17,57	27,08±12,57	25,00±16,37
Total Merg	4,00±1,37	1,40±0,65*	6,22±1,22	0,89±0,39*	3,44±1,67	1,00±0,44*	2,13±0,48	0,25±0,16
Total Lev	2,90±0,82	1,80±1,37	2,11±0,63	1,78±0,68	0,89±0,51	2,11±1,10	2,50±1,00	0,50±0,38
TT Imob	3,56±2,60	0,71±0,71	0,13±0,13	28,97±19,56	11,59±4,36	3,92±3,06	1,61±1,17	31,86±15,52

Valores representam a Média ± Erro Padrão da Média. EBA, entradas nos braços abertos; TE, total de entradas; %EBF, entradas nos braços fechados em porcentagem; TBA, tempo nos braços abertos; TBF, tempo nos braços fechados; TC, tempo no centro; %TBF, TBF em porcentagem; %TC, TC em porcentagem; %Est Prot, esticadas protegidas em porcentagem; Total Est, total de esticadas; %Merg Prot, mergulhos protegidos em porcentagem; Total Merg, total de mergulhos; Total Lev, total de levantamentos; TT Imob, tempo total de imobilidade. *p≤0,05 (diferença entre T1 e T2; ANOVA).

Referente à maior dose de HA, 1,0 µg, as medidas que se mostraram significativamente reduzidas em T2 (Tabela 5) foram: **EBA** ($F_{(1,29)}=25,63$; $p<0,01$) para os grupos SAL-SAL ($p=0,01$), SAL-HA ($p<0,01$) e HA-HA ($p=0,02$) e **TE** ($F_{(1,29)}=21,83$; $p<0,01$) para os grupos SAL-SAL ($p=0,03$), SAL-HA ($p<0,01$) e HA-HA ($p=0,02$); **TBA** ($F_{(1,29)}=75,35$; $p<0,01$) para todos os grupos testados, SAL-SAL ($p<0,01$), SAL-HA ($p<0,01$), HA-SAL ($p<0,01$) e HA-HA ($p<0,01$). A ANOVA apontou diferenças significativas para **TBF** e **%TBF** ($F_{(1,29)}=77,47$; $p<0,01$), identificadas pelo teste *post hoc* para os quatro grupos: SAL-SAL ($p<0,01$), SAL-HA ($p<0,01$), HA-SAL ($p<0,01$) e HA-HA ($p<0,01$); teste de Duncan.

Referente às medidas etológicas, a ANOVA identificou diferenças para **%Est Prot** ($F_{(1,29)}=8,30$; $p<0,01$), um aumento significativo apenas para o grupo HA-SAL ($p=0,01$; teste de Duncan). O **Total Merg** apresentou uma redução significativa ($F_{(1,29)}=9,13$; $p<0,01$, ANOVA) para o grupo HA-HA ($p<0,01$, teste de Duncan).

Com exceção do TBA em segundos e em porcentagem na dose de 0,5 µg de HA, não houve interação entre fatores para as demais medidas convencionais e etológicas analisadas nas diferentes doses da droga ($p>0,05$; ANOVA).

Tabela 4 - Medidas convencionais e etológicas dos camundongos expostos e reexpostos ao LCE de acordo com o tratamento farmacológico utilizado: microinjeção central pré-T1 e pré-T2 de SAL e/ou HA na dose de 1,0 µg (grupo controle; SAL-HA 1,0; HA 1,0-SAL e HA-HA 1,0).

MEDIDAS	SAL-SAL		SAL-HA1,0		HA1,0-SAL		HA-HA1,0	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
EBA	8,56±0,90	5,11±1,33*	6,88±0,69	2,88±0,58*	5,17±0,83	4,50±1,89	5,29±1,48	2,29±0,57*
TE	16,11±1,20	11,33±2,03*	14,25±1,16	6,88±1,49*	9,33±1,93	9,00±3,41	11,71±2,17	6,29±1,54*
%EBF	45,51±5,29	62,28±7,12	51,74±2,58	55,95±8,50	41,59±5,28	58,34±8,42	56,08±5,29	60,60±11,74
TBA	117,21±12,86	50,29±12,58*	100,97±10,70	41,72±10,45*	123,47±11,65	45,86±18,80*	120,07±24,36	64,45±39,35*
TBF	125,44±8,31	211,46±18,56*	138,48±9,57	217,85±14,64*	113,61±21,91	222,11±19,02*	129,89±19,86	222,15±37,72*
TC	57,35±9,29	38,25±8,83	60,55±12,17	40,43±12,90	62,92±25,05	32,03±15,47	50,05±11,39	13,40±3,42
%TBF	41,81±2,77	70,49±6,19*	46,16±3,19	72,62±4,88*	37,87±7,30	74,04±6,34*	43,30±6,62	74,05±12,57*
%TC	19,12±3,10	12,75±2,94	20,18±4,06	13,48±4,30	20,97±8,35	10,68±5,16	16,68±3,80	4,47±1,14
%Est Prot	27,86±10,19	32,28±11,79	17,71±9,21	40,63±14,89	11,11±11,11	52,78±18,47*	36,04±11,84	46,88±15,26
Total Est	5,22±1,26	2,56±0,77	4,38±1,24	2,63±0,94	1,00±0,52	1,50±0,43	4,50±1,34	1,63±0,53
%Merg Prot	42,59±14,73	25,93±14,46	32,29±15,47	20,83±14,00	32,22±16,81	4,17±4,17	67,65±16,41	0,00
Total Merg	1,89±0,63	0,89±0,65	1,38±0,50	0,50±0,38	1,67±0,80	0,67±0,67	4,00±1,90	0,00*
Total Lev	1,78±1,02	2,00±1,07	1,25±0,56	1,25±0,45	0,67±0,33	1,50±0,96	2,13±0,58	0,63±0,50
TT Imob	0,00	0,52±0,52	1,94±1,94	18,28±11,00	9,45±6,28	9,19±5,92	12,71±12,34	31,14±22,35

Valores representam a Média ± Erro Padrão da Média. EBA, entradas nos braços abertos; TE, total de entradas; %EBF, entradas nos braços fechados em porcentagem; TBA, tempo nos braços abertos; TBF, tempo nos braços fechados; TC, tempo no centro; %TBF, TBF em porcentagem; %TC, TC em porcentagem; %Est Prot, esticadas protegidas em porcentagem; Total Est, total de esticadas; %Merg Prot, mergulhos protegidos em porcentagem; Total Merg, total de mergulhos; Total Lev, total de levantamentos; TT Imob, tempo total de imobilidade. *p≤0,05 (diferença entre T1 e T2; ANOVA).

4.3 HA intra-amídala administrada pré-teste prejudica a evocação da memória de medo em camundongos submetidos à tarefa de Esquiva Inibitória

A Tabela 6 apresenta as latências de transição dos camundongos do compartimento claro em direção ao compartimento escuro da caixa de EI durante a sessão de habituação.

Tabela 5 - Latências (em segundos) para o cruzamento entre compartimentos durante a habituação dos grupos experimentais controle e tratados nas três diferentes doses de HA e submetidos ao modelo de EI.

Dose de HA	SAL-SAL	SAL-HA	HA-SAL	HA-HA
0,1 µg	25,22±4,12	31,60±5,58	27,63±6,55	28,56±5,10
0,5 µg	33,56±7,34	25,30±4,08	16,20±1,21	16,44±1,70
1,0 µg	27,50±6,63	22,25±6,60	36,63±7,97	22,29±6,27

Valores representam Média ± Erro Padrão da Média.

A Figura 12 mostra os resultados da comparação entre latências registradas durante o treino de aquisição 1, treino de aquisição 2 e teste de retenção nos diferentes grupos experimentais submetidos à caixa de EI, tratados ou não com HA nas três distintas doses propostas. Nas análises realizadas para os grupos tratados com HA na sua dose mais baixa (0,1 µg), a ANOVA de duas vias indicou diferença significativa entre sessões da tarefa de EI ($F_{(2,35)}=26,53$; $p<0,01$), identificada pelo teste de Duncan como estando entre treino 1 e teste para todos os quatro grupos testados: SAL-SAL ($p<0,01$), SAL-HA 0,1 ($p<0,01$), HA 0,1- SAL ($p<0,01$) e HA-HA 0,1 ($p<0,01$) (Figura 11). Os camundongos apresentaram um aumento significativo da latência durante o teste de retenção em relação àquela registrada no treino 1.

Nas análises dessa mesma dose de HA, o grupo HA-HA 0,1 ($p<0,01$; teste de Duncan) apresentou diferença significativa entre as sessões de treinos 1 e 2. A latência do treino de aquisição 2 teve um aumento estatisticamente significativo quando comparada à latência do treino 1 para os animais HA-HA 0,1. Houve uma tendência ao aumento significativo da latência no treino 2 para o grupo HA 0,1-SAL ($p=0,06$). Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores 1 (tratamento farmacológico) e 2 (sessões) para essa dose ($F_{(2,35)}=0,36$; $p=0,90$; ANOVA).

Figura 12 - Médias e Erro Padrão da Média (+E.P.M.) das latências de transição dos camundongos em direção ao compartimento escuro para os grupos microinjetados intra-amídala pré-treino 1 e pré-teste de retenção com salina e/ou histamina (0,1; 0,5 ou 1,0 µg), sendo eles: SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,1 (n=10), HA 0,1-SAL (n=8) e HA-HA 0,1 (n=9)/ SAL-SAL (n=9), SAL-HA 0,5 (n=10), HA 0,5-SAL (n=10) e HA-HA 0,5 (n=9)/ SAL-SAL (n=8), SAL-HA 1,0 (n=8), HA 1,0 -SAL (n=8) e HA-HA 1,0 (n=7) submetidos à caixa de EI. As setas indicam o momento da microinjeção. * $p \leq 0,05$ (diferença entre treino 1 e teste; *post hoc* de Duncan). # $p \leq 0,05$ (diferença entre treino 2 e teste; Duncan). ** $p \leq 0,05$ (diferença entre treinos 1 e 2; Duncan).

Diferenças estatisticamente significativas para os grupos experimentais de HA na dose de 0,5 µg foram indicadas pela ANOVA de duas vias entre sessões na caixa de EI ($F_{(2,37)} = 33,88$; $p < 0,01$) e para interação entre os fatores 1 (tratamento) e 2 (sessões) ($F_{(2,37)} = 2,78$; $p = 0,02$). Os grupos SAL-SAL ($p < 0,01$), HA 0,5-SAL ($p < 0,01$) e HA-HA 0,5 ($p < 0,01$) (Figura 11) tiveram aumento significativo da latência durante o teste quando comparado ao treino 1 (diferenças apontadas pelo teste de Duncan).

As latências do treino 2 e teste diferiram entre si de acordo com a ANOVA, indicada pelo *post hoc* como sendo para os mesmos grupos citados [SAL-SAL ($p < 0,01$), HA 0,5-SAL ($p = 0,01$) e HA-HA 0,5 ($p < 0,01$)]. Esses animais também apresentaram latências para transição no teste de retenção maiores quando comparadas ao tempo registrado durante o treino 2. A ANOVA apontou interação estatisticamente significativa entre os fatores 1 (tratamento farmacológico) e 2 (sessões) para essa dose ($F_{(6,37)} = 2,78$; $p = 0,02$).

Para o tratamento com a dose de 1,0 µg de HA, pode-se observar na Figura 11 que os grupos SAL-SAL ($p < 0,01$), HA 1,0-SAL ($p < 0,01$) e HA-HA 1,0 ($p < 0,01$), evidenciados pelo teste de Duncan, diferiram significativamente entre sessões na caixa de EI ($F_{(2,30)} = 22,78$; $p < 0,01$, ANOVA). Suas latências durante o teste estão elevadas em relação ao respectivo treino de aquisição 1.

Na comparação entre as latências do treino 2 e teste de retenção, a ANOVA também indicou diferença significativa. O aumento do tempo de latência durante a retenção foi identificada pelo teste de Duncan para os mesmos grupos citados – SAL-SAL ($p = 0,02$), HA 1,0-SAL ($p = 0,01$) e HA-HA 0,1 ($p = 0,02$). A ANOVA não indicou interação significativa entre os fatores 1 (tratamento) e 2 (sessões) para a dose mais alta ($F_{(2,30)} = 1,57$; $p = 0,17$).

Os grupos SAL-HA 0,5 e SAL-HA 1,0 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as latências das diferentes sessões da tarefa de EI ($p > 0,05$; Duncan). Portanto, os camundongos microinjetados com veículo pré-treino 1 e HA, nas suas doses intermediária e alta, previamente ao teste têm suas latências de retenção reduzidas em comparação às aquelas observadas nos grupos controle e não se elevam em relação aos respectivos treinos de aquisição da EI.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A inspeção das secções histológicas dos cérebros dos camundongos revelou que os sítios de microinjeção bilaterais estavam localizados dentro da amígdala. Todavia, não foi possível distinguir se as respostas comportamentais observadas podem ser atribuídas à excitação específica de subnúcleos ou porções anteroposteriores delimitados da amígdala, e isso se deve à grande proximidade das suas divisões neuronais e ao raio de difusão da droga.

Os resultados do presente estudo podem ser interpretados como consequências da estimulação ou inibição química dos neurônios no complexo amidoide, destacadamente do núcleo central (CEA) e complexo basolateral (BLA) da amígdala. O CEA é considerado um circuito neural mediador das eferências (*outputs*) comuns à amígdala (ORSINI; MAREN, 2012). Já as redes neuronais do BLA têm funções associativas para estímulos externos relacionados a situações ameaçadoras ou aprendizagem sob condições estressantes (MCGAUGH, 2004; ORSINI; MAREN, 2012).

Existem evidências indicando que o CEA, ao invés de ser apenas uma região de retransmissão passiva das informações para estruturas geradoras do medo, está envolvido na formação da memória aversiva (ORSINI; MAREN, 2012). O CEA exibe plasticidade subjacente ao condicionamento ao medo (MAREN, 2008) necessária para a formação das memórias de medo contextual e auditiva (ZIMMERMAN; MAREN, 2010). Então, a informação aversiva pode ser processada tanto no BLA como no CEA, os principais locais onde a HA foi infundida nos camundongos utilizados nesse atual estudo.

O intervalo de tempo entre microinjeção e testes no LCE ou sessões na caixa de EI foram apropriados para estimular a atividade neuronal da amígdala. As respostas comportamentais exibidas durante os treinos e testes estavam sob a estimulação química da HA exógena, uma vez que a meia-vida aparente do neurotransmissor/neuromodulador no cérebro de camundongos é de aproximadamente 20 min (SCHWARTZ; GARBARG; POLLARD, 1986).

Finalmente, a neurotransmissão histaminérgica no cérebro também tem participação nos processos mnemônicos e nas emoções (DERE et al., 2010), cuja mediação se dá pela amígdala (ALVAREZ; RUARTE, 2002; MCGAUGH, 2004;

ROGAN; LEDOUX, 1996). Nesse contexto, os dados comportamentais aqui interpretados corroboram as evidências de que atividade neuronal da amígdala modulada pela HA resulta em respostas emocionais exibidas pelos roedores frente a estímulos ameaçadores, especialmente a esquiva inibitória.

5.1 HA intra-amígdala administrada pré-testes não tem efeitos sobre os comportamentos defensivos e a memória emocional de camundongos no Labirinto em Cruz Elevado

Evidências têm confirmado que a experiência prévia ao LCE altera reações subsequentes dos roedores a este teste (HOLMES; RODGERS, 1998; RODGERS, 1995). Ocorre, portanto, uma mudança qualitativa nos estados emocionais de uma forma incondicionada (T1) para uma forma aprendida (T2) de resposta de ansiedade e/ou medo (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000).

EBA, TBA e suas porcentagens durante a exposição ao LCE são consideradas medidas convencionais para inferir ansiedade (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995). As comparações entre os quatro grupos experimentais em T1, realizadas para cada uma das doses testadas, revelaram não ter havido diferenças significativas nas medidas acima citadas, indicando que a HA nas três doses testadas não teve efeito sobre os comportamentos relacionados à ansiedade. Esse resultado não teve influência de alterações na atividade locomotora dos camundongos, a qual não foi prejudicada pelos tratamentos uma vez que as análises comparativas das EBF em T1 não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

Essa ausência de efeito corrobora estudos prévios em nosso laboratório que também não descreveram influência do tratamento envolvendo o SNH sobre a ansiedade. Injeções i.p. combinadas do precursor histaminérgico LH e do antagonista-H₁ clorfeniramina (LH-SAL, LH-CPA e SAL-CPA), ambas pré-teste, não alteraram as medidas convencionais para se avaliar ansiedade durante a exposição dos camundongos ao LCE (GIANLORENÇO et al., 2010). A administração simples periférica de LH também não teve resultados sobre a

ansiedade desses animais submetidos ao mesmo modelo experimental (SERAFIM et al., 2010).

Benetti e Izquierdo (2013) também avaliaram o estado de ansiedade em ratos submetidos ao LCE. Os animais receberam infusão intra-BLA de HA, agonistas e antagonistas dos receptores histaminérgicos, 24 h antes do teste, e nenhum dos tratamentos avaliados teve efeito sobre o desempenho dos animais no labirinto.

Outro trabalho do nosso grupo de pesquisa investigou o papel dos receptores H_1 da amígdala na ansiedade e memória emocional de camundongos (SERAFIM et al., 2012). Os animais foram injetados i.p. com LH (500 mg/kg) e, após 2 h, receberam microinjeções intra-amígdala de CPA nas doses de 0,016; 0,052 e 0,16 nmol. As exposições dos diferentes grupos experimentais ao LCE não tiveram diferenças significativas entre si, o que sugere a não implicação dos receptores H_1 dessa estrutura nos comportamentos relativos à ansiedade.

Com protocolo experimental semelhante ao executado por Serafim e colaboradores (2012), Canto-de-Souza e Mattioli (2011, dados ainda não publicados) também demonstraram a ausência de efeito da CPA *per se* microinjetada no hipocampo dorsal de camundongos. Contudo, a LH administrada i.p. resultou em efeito ansiolítico, que foi revertido pela maior dose de CPA (0,16 nmol) nesses animais. Assim, os receptores H_1 do hipocampo dorsal parecem estar envolvidos nas vias mediadoras da ansiedade.

A modulação da ansiedade realizada pela HA via receptores H_1 foi também demonstrada por Zarrindast e coautores (2005) utilizando o LCE. A HA (0,5 μ g/0,5 μ l) coadministrada com pirilamina (10 e 20 μ g) no CEA da amígdala de ratos teve seu efeito ansiogênico revertido por este antagonista- H_1 (ZARRINDAST et al., 2005). Em contraste, não houve indução da ansiedade experimental mediada pela amígdala no presente estudo, sugerindo que o efeito do SNH sobre a ansiedade é dependente do sítio de administração da droga e da espécie analisada.

Evidências acumuladas em anos recentes têm estabelecido claramente o envolvimento da HA e seus receptores na aprendizagem e memória. Numerosos experimentos usando diferentes modelos de aprendizagem, em ratos e outras espécies animais, apontam vários estágios de formação ou recuperação da memória relacionada a tarefas distintas e fornecem suporte para o papel da HA em

mecanismos fisiológicos da memória (ALVAREZ; RUARTE, 2002; ALVAREZ et al., 2001; SPIELER et al., 1999).

A análise da reexposição revela que uma experiência anterior do animal ao LCE leva a redução das atividades nos braços abertos (BERTOGLIO et al., 2006; DÁL-COL et al., 2003), tornando o modelo apto para investigação da memória. De acordo com o paradigma de teste/reteste, os resultados das doses de 0,1; 0,5 e 1,0 µg de HA não indicam efeitos dessa droga sobre a memória emocional mediada pela amígdala dos camundongos no presente estudo.

As EBA reduzidas em T2 para os grupos controle das três diferentes doses de HA, para os grupos tratados pré-T2 com HA 0,5 e 1,0 µg e para o tratados pré-T1 e pré-T2 com HA 1,0 µg já sugerem aprendizagem e memória emocional estabelecidas nestes animais. A mesma diminuição foi observada nas análises da %EBA principalmente para os grupos experimentais da menor dose de HA, e de modo menos evidente para os camundongos das doses intermediária e maior, que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre T1 e T2 (apenas o grupo HA 0,5-SAL apresentou diferença).

Embora as análises comparativas das medidas espaço-temporais EBA e suas porcentagens entre exposição e reexposição tenham sido pouco robustas para concluir-se ausência de efeitos, essa interpretação dos dados torna-se fortalecida ao discutirem-se os demais itens. No que se refere à TBA e %TBA, foram notadas diferenças significativas e reduções acentuadas entre exposição e reexposição nos quatro grupos experimentais de cada uma das doses de HA. Esses resultados representam um aumento da esquia das áreas desprotegidas do LCE pelos animais, tanto controle como tratados, indicando que todos os grupos aprenderam, consolidaram e evocaram a memória emocional relacionada à exploração de áreas potencialmente perigosas do labirinto – os braços abertos (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2005).

Adicionalmente, TC e suas porcentagens também reduziram durante a reexposição dos camundongos microinjetados pré-testes com HA 0,5 e 1,0 µg no segundo dia de teste. A %TC é uma medida de ansiedade em T1, mas pode refletir uma dimensão distinta de tomada de decisão durante o reteste (HOLMES; RODGERS, 1998). Portanto, os camundongos controle e tratados com HA nas doses intermediária e maior passam menos tempo na plataforma central, uma vez

que se movem mais rapidamente em direção ao braço fechado e neste permanecem por mais tempo.

No caso da dose mais baixa de HA, a %TC, a porcentagem de esticadas protegidas e o total de esticadas não se modificam no reteste; a postura de mergulho é considerada exploração motivada e as esticadas são avaliadas como acesso de risco. Embora os camundongos se esquivem dos braços abertos eles ainda continuam motivados a explorá-los, pois ainda exibem movimentos em direção as áreas desprotegidas como em T1 (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000).

Na reexposição, reduções significativas ou tendências a reduções foram observadas para: TE, EBA, %EBA, %TBA, %TC, total de mergulhos e de esticadas, tanto nos animais tratados com HA como nos respectivos controles. Essas alterações foram acompanhadas de aumentos significativos no TBF, %TBF, e na porcentagem de esticadas protegidas. Durante T2, todos os grupos experimentais das três doses de HA, com exceção dos camundongos SAL-HA da menor dose, tiveram os TBF e %TBF aumentados em relação à exposição.

Entretanto, o grupo SAL-HA da dose de 0,1 µg, que não apresentou diferenças em T2 nas medidas de tempo nos braços fechados, exibiu um aumento significativo na %EBF. Como alterações nas EBF e nos TE não foram aparentes entre T1 e T2 para a maioria dos grupos, o perfil comportamental exibido no reteste é mais consistente com a ideia de sensibilização induzida experimentalmente à ansiedade e/ou medo do que com habituação locomotora (HOLMES; RODGERS, 1998; RODGERS, 1995).

Os índices primários de ansiedade no LCE compreendem medidas espaço-temporais de esquiva dos braços abertos, que foram posteriormente complementados por medidas adicionais relacionadas a posturas comportamentais, em particular, aquelas relacionadas aos padrões defensivos de acesso de risco (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS et al., 1992). No presente estudo, as medidas etológicas não apresentaram diferenças na comparação entre grupos para T1, corroborando os resultados espaço-temporais indicativos de ausência de efeito sobre a ansiedade.

As medidas etológicas podem ser pouco sensíveis à ação de drogas em relação às convencionais. Isso pode ser observado na ausência de alterações significativas para o total de levantamentos nas três doses testadas e porcentagem

de mergulhos protegidos na maior dose de HA, ambos referentes à atividade exploratória dos roedores.

Os animais reexpostos ao LCE que passam mais tempo e exibem níveis altos de atividades (como esticadas) nos braços fechados sugerem sua preferência por essa área em detrimento do centro e braços abertos. Isso evidencia uma rápida aprendizagem da distinção entre os espaços protegidos e aversivos, que foi evocada em T2 tanto no grupo controle como nos tratados. Assim, a administração de HA na amígdala desses camundongos não foi efetiva em alterar a esquia das áreas desprotegidas tanto em T1 como em T2.

Nosso grupo de pesquisa tem sugerido uma importante participação do SNH na consolidação e evocação da memória emocional. Referente à fase de retenção, a microinjeção pós-T1 de HA no *vérmis* cerebelar prejudicou a consolidação da memória emocional de camundongos reexpostos ao labirinto, evidenciando uma inibição dose-dependente exercida pela droga (GIANLORENÇO, CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011). Em outro trabalho, Serafim e colaboradores (2010) demonstraram que a LH nas doses de 200 mg/kg e 500 mg/kg quando injetada i.p. pré-testes em camundongos submetidos ao LCE induz déficit da evocação da memória de modo estado-dependente.

Neste estudo, entretanto, a microinjeção intra-amígdala de HA não teve efeito sobre a memória dos animais no paradigma T1/T2. Uma variável que parece interferir nessa ausência de efeito é a utilização da cortina preta e opaca ao redor do LCE, como no caso dos experimentos aqui descritos, de modo a isolar o equipamento de possíveis dicas visuais dos arredores e tornar o ambiente homogêneo.

Essa ideia contrasta com a proposição de Rodgers et al. (1997) de que o reteste no LCE está associado a mudanças comportamentais indicativas de aprendizagem aversiva, sendo independentes da manipulação de pistas extrínsecas ao labirinto. Os presentes resultados corroboram aqueles do trabalho de Canto-de-Souza e Mattioli (2011, dados ainda não publicados) anteriormente citado, cujos camundongos injetados i.p. com LH e reexpostos ao LCE cercado por cortina não apresentaram déficit de memória estado-dependente.

Para a memória espacial formada no hipocampo, essa estrutura límbica armazena dicas visuais; quando não há pistas visuais ele então realiza o mapeamento do ambiente onde o sujeito está inserido (FERBINTEANU;

SHIRVALKAR; SHAPIRO, 2011). O hipocampo é, portanto, responsável pelo componente espacial no processamento da memória emocional. Adicionalmente, existem projeções recíprocas entre amígdala e hipocampo importantes (MCDONALD, 1998) na transmissão de informações sobre estímulos incondicionados e condicionados (SAH et al., 2003).

Assim, sugerimos que o distinto processamento do hipocampo na formação de um mapa egocêntrico na ausência de dicas visuais possa ter interferido na função amidoide relacionada à aversão. A integração dessas informações mnemônicas, juntamente com aquelas das aferências de áreas associativas visuais, auditivas e somatossensoriais na amígdala (MCDONALD, 1998), foi consolidada e a HA não foi capaz de prejudicar a evocação dessa memória. Tais fatores podem justificar a diferença entre os resultados aqui apresentados e os obtidos por Serafim et al. (2010) e Gianlorenço et al. (2011).

Os processos mnemônicos dos camundongos envolvendo a aversão eliciada no LCE não sofreram alterações pelo tratamento. Assim, a HA exógena microinjetada no complexo amidoide não influenciou durante a reexposição as respostas de medo aprendidas nesse modelo.

5.2 HA intra-amígdala administrada pré-teste prejudica a evocação da memória de medo em camundongos submetidos à tarefa de Esquiva Inibitória

Na tarefa de EI, o animal aprende a associar o contexto do equipamento, inicialmente não aversivo, ao recebimento de um choque elétrico (CAHILL; MCGAUGH, 1998). Durante o treino, os animais experimentam o pareamento de um estímulo previamente neutro, o estímulo condicionado (CS) composto pelo contexto e entrada no compartimento escuro, com um estímulo incondicionado (US), o choque nas patas. Então, durante o teste os animais evitam o estímulo aversivo de choque pela inibição de um comportamento inato que é a entrada no compartimento escuro devido à sua preferência por este ambiente (BLAKE; BOCCIA; BARATTI, 2008).

A robustez das respostas de esquiva deve existir devido ao medo e esta evitação tem funções críticas à sobrevivência dos animais, protegendo-os

contra um ambiente potencialmente ameaçador (FENDT; FANSELOW, 1999). Os presentes resultados mostraram que as latências de transição em direção ao ambiente escuro da caixa de EI aumentaram significativamente durante o teste de retenção para todos os grupos testados com HA na dose de 0,1 µg, e para os grupos SAL-SAL, HA-SAL e HA-HA nas doses de 0,5 e 1,0 µg. Esses animais passaram mais tempo no compartimento claro durante a reexposição à caixa em comparação ao tempo observado no primeiro dia de sessões, indicando que foram capazes de aprender, consolidar e evocar a memória do medo condicionado.

Os mesmos grupos experimentais citados diferiram em relação ao momento da aquisição da informação (aprendizagem) aversiva, possivelmente causada pela injeção pré-treino 1 de HA. Os animais SAL-SAL, HA-SAL e HA-HA das doses intermediária e maior apresentaram latências maiores no teste de retenção em relação a ambos os treinos, ou seja, os camundongos aprenderam a resposta de esquiva logo no primeiro treino, houve uma tendência de maior evitação do ambiente escuro no segundo treino e evocaram a memória emocional passadas 24 h.

A diferença significativa entre treinos 1 e 2 observada no grupo HA-HA 0,1 foi considerada uma possível facilitação da aprendizagem na tarefa de EI. Essa interpretação se deve à tendência de um aumento significativo para o grupo HA 0,1-SAL, também microinjetado com HA pré-treino1, que apresentou $p=0,06$ pelo teste de Duncan. Contudo, o resultado indicativo de facilitação da aprendizagem não foi revertido durante a evocação na menor dose de HA e deverá ser investigado em estudos posteriores. Adicionalmente, nas outras duas doses testadas, os treinos 1 e 2 dos grupos HA-SAL e HA-HA não diferiram entre si; os dois grupos de animais que receberam infusão de HA pré-treino 1 tem suas latências semelhantes no treino de aquisição 2, bem como os que receberam infusão de SAL.

A HA microinjetada isoladamente pré-teste de retenção nas doses intermediária e maior prejudicou a evocação da memória, pois as latências dos grupos SAL-HA 0,5 e SAL-HA 1,0 no teste não aumentaram significativamente em relação as observadas nos treinos. É possível constatar esse resultado comparando os animais SAL-HA com os grupos SAL-SAL e HA-HA, que exibiram o condicionamento ao medo como indicado nas latências elevadas de teste. Assim, a HA microinjetada na amígdala interfere na recuperação da informação adquirida na presença apenas dos seus níveis endógenos.

Outras pesquisas mostraram a influência inibitória da HA também sobre a fase de consolidação da memória mediada pelos receptores histaminérgicos H_1 e H_2 (EIDI et al., 2003; FLOOD et al., 1998). De acordo com Zarrindast et al. (2002), a injeção pós-treino i.c.v. de HA prejudicou a retenção da memória em ratos avaliados na aprendizagem de esquiva (*step-through*). Esse déficit induzido pela HA foi atenuado pela administração de pirilamina, antagonista- H_1 , e cimetidina, antagonista- H_2 , bloqueadores estes que foram capazes de facilitar a consolidação da memória.

O antagonismo aos receptores histaminérgicos também foi descrito por Hasenhörl e coautores (2001). Nesse estudo, a microinjeção pós-treino de clorfeniramina, antagonista- H_1 , no núcleo acumbens de ratos promoveu facilitação da retenção da memória na tarefa de esquiva por subida (*uphill avoidance test*) de maneira dose-dependente. Assim, o bloqueio da transmissão histaminérgica via H_1 pode resultar na facilitação da aprendizagem.

Em contraste, o efeito facilitatório da HA foi observado em outros estudos. A HA na dose de 10 nmol/unilateral microinjetada no complexo basolateral da amígdala facilitou a consolidação da memória aversiva de ratos submetidos ao *step-down*. Tal resultado foi atribuído à ação dos receptores H_3 , uma vez que o efeito foi reproduzido pelo agonista- H_3 específico *imetit* e revertido pelo antagonista- H_3 tioperamida (BENETTI; IZQUIERDO, 2013).

No caso de facilitação induzida pela HA, doses mais altas atuam nos autorreceptores H_3 , inibindo o sistema histaminérgico. A desinibição desse sistema foi demonstrada por Brabante, Charlier e Tirelli (2013) em camundongos C57BL/6J fêmeas. Analisando as etapas de consolidação e reconsolidação da memória no teste de condicionamento do medo ao contexto, os autores verificaram que a administração i.p. de Pitolisante, agonista inverso dos receptores H_3 , facilitou a consolidação dessa memória.

Adicionalmente, como indicado nos atuais resultados, as microinjeções da HA nas doses de 0,5 e 1,0 μ g nos dois dias consecutivos previamente às sessões permitiram a evocação da memória relacionada ao medo, e isso só foi possível quando a aquisição da informação aversiva ocorreu na presença da mesma droga. Esse resultado revela a atuação de mecanismos que induzem estado dependência, como já descrito na literatura (KHALILZADEH; ZARRINDAST; DJAHANGUIRI, 2005; ZARRINDAST et al., 2006).

A aprendizagem dependente de estado produzida por droga emprega o desenho experimental do tipo 2 x 2, com administração de droga e não-droga antes da primeira e/ou segunda sessões de teste, resultando em quatro grupos (OVERTON, 1974). No presente estudo, a dependência de estado foi indicada pelo desempenho natural dos roedores HA-HA, similar à exibida pelo grupo SAL-SAL, de maior esquivas frente ao ambiente aversivo. Essa ausência de alteração de estado no grupo HA-HA contrasta com o desempenho deficiente do grupo SAL-HA, que apresentou déficit na evocação da memória de medo.

Nossos resultados corroboram aqueles obtidos por Zarrindast et al. (2006) utilizando camundongos NMRI albinos submetidos à esquivas por *step-down*. No estudo citado, os animais receberam infusões i.c.v. de HA (20 µg) pré-treino e tiveram sua aprendizagem prejudicada. Contudo, a administração pré-teste da mesma droga nas doses de 10 e 20 µg reverte a amnésia induzida pela HA microinjetada 24 h antes (pré-treino).

Sabe-se que a amígdala desempenha papel central do processamento do medo, ansiedade, aprendizagem e memória, bem como em transtornos afetivos e emocionais. Registros eletrofisiológicos no núcleo basolateral sugerem que a HA modula a transmissão sináptica excitatória bidirecional especialmente via receptores pré-sinápticos H₃ (JIANG; CHEN; LI, 2005). Adicionalmente, neurotransmissões noradrenérgicas, de glicocorticoides, colinérgicas e glutamatérgicas que influenciam a memória também são mediadas pela BLA (MCGAUGH et al. 2000; MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2002; PASSANI et al., 2011).

O treino de esquivas inibitórias aumenta os níveis de noradrenalina (NE) na amígdala durante a aplicação do choque, elevação que é sustentada por cerca de 2 h (MCINTYRE et al., 2003). Já os glicocorticoides ativam núcleos do tronco encefálico, como núcleo do trato solitário e *locus coeruleus*, que enviam projeções noradrenérgicas para a amígdala e potencializam sua cascata de sinalização dentro da estrutura límbica. Como efeito, há ativação dos α -adrenoreceptores e β -adrenoreceptores presentes na rede neuronal intrínseca da amígdala.

As eferências a partir do CEA mediadas pela *stria terminalis* e outras vias modulam a retenção da memória que ocorrem em outras regiões do cérebro. Há também interações neuromoduladoras intrínsecas à amígdala baseadas em evidências experimentais e discutidas por McGaugh (2004) como fundamentais para a consolidação da memória emocional dentro do BLA. Ampliando essa ideia, as

interações poderiam estar presentes não apenas no BLA, mas também no CEA. Sabe-se, por exemplo, que o CEA está envolvido na formação da memória de medo (ZIMMERMAN; MAREN, 2010), no processamento da informação CS-US e na plasticidade subjacente ao condicionamento ao medo (MAREN, 2008).

As influências colinérgica e glutamatérgica, que partem do núcleo basal magnocelular, ocorrem em passos seguintes à ativação dos adrenoreceptores na amígdala. A regulação da liberação de acetilcolina (ACh) acontece através da ativação dos receptores histaminérgicos (MCGAUGH, 2004), de modo a influenciar a memória. Essa interação foi relatada por PASSANI et al. (2001) que administraram pós-treino antagonistas-H3 intra-BLA e verificaram uma diminuição da liberação de ACh e consequente prejuízo da consolidação da memória de medo contextual.

A interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico sobre a retenção da memória já tem evidências consistentes na literatura (EIDI et al., 2003). Sugerimos que as interações moduladoras intra-amígdala dos dois sistemas também justifiquem o déficit na evocação induzida pela HA discutida no presente estudo. Assim, os níveis de HA elevados pelas microinjeções especialmente no BLA e CEA teriam efeito inibitório sobre a neurotransmissão colinérgica, o que reduziria a liberação de ACh, influenciando a neuroplasticidade desses núcleos e promovendo amnésia nos camundongos.

Adicionalmente, existe a hipótese de que as doses maiores de HA intra-amígdala tenham ativado os heteroreceptores H_3 , localizados tanto em neurônios histaminérgicos como em outros tipos neuronais – por exemplo, neurônios colinérgicos e glutamatérgicos. Esses receptores promovem um *feedback* negativo que restringe a síntese e liberação de HA e de outros neurotransmissores, tais como ACh e glutamato (GLU) (HAAS; PANULA, 2003). No último caso, a liberação reduzida do GLU teria um efeito marcante na neuroplasticidade.

As influências moduladoras do sistema histaminérgico sobre a neurotransmissão glutamatérgica já foram descritas para neurônios do giro denteado hipocampal por Brown e Haas (1999). A HA, agindo sobre os receptores H_3 , tem um efeito inibitório pré-sináptico sobre o influxo de cálcio, resultando na diminuição da liberação de GLU no hipocampo. Os receptores glutamatérgicos não são, portanto, ativados, impossibilitando a potenciação de longo prazo (LTP) subjacente à plasticidade sináptica.

Alterações nos níveis da HA cerebral também estão implicadas na nocicepção (HAAS; PANULA, 2003). A ação antinociceptiva do SNH envolve os receptores H_1 , H_2 e H_3 , e parece contribuir para a analgesia induzida por estresse (BROWN; STEVENS; HAAS, 2001). Deste modo, a interpretação dos presentes resultados poderá ser complementada por experimentos posteriores que avaliem o componente nociceptivo dado pelo choque nas patas sobre a memória de esquia.

Considerando os resultados dos **Experimentos 1 e 2**, concluímos que houve ausência de efeitos da HA nas três doses testadas sobre os comportamentos analisados no LCE. Porém, houve influência da HA na memória emocional dos camundongos submetidos à tarefa de EI. Os dois modelos experimentais utilizados permitem avaliar a memória aversiva dos animais, porém referem-se a paradigmas comportamentais diferentes: o LCE baseia-se na esquia inata das áreas potencialmente ameaçadoras e está relacionado à ansiedade dos animais; a caixa de EI baseia-se na esquia condicionada pelo animal do ambiente que lhe oferece perigo real, relacionando-a ao medo. Nesse contexto, podemos sugerir que a HA atua de modo distinto nas vias que mediam essas emoções.

A estimulação da amígdala pode tanto facilitar como prejudicar a memória para testes envolvendo aversão, dependendo do tipo de estímulo, da intensidade da estimulação e das condições de treino. Isso indica claramente seus efeitos moduladores. Outras influências moduladoras importantes sobre tarefas diferentes são as sinapses histaminérgicas e de outros neurotransmissores, que operam distintamente para o medo condicionado contextual e para o EI (FIORENZA et al., 2012). A hipótese de que o SNH poderia promover um mecanismo crucial para refinar uma resposta comportamental adequada mediada pela amígdala tem sido, portanto, corroborada (BENETTI; IZQUIERDO, 2013).

Foi descrito na literatura os sistemas encefálicos responsáveis pelas emoções de ansiedade e medo. Os mecanismos associados à resposta defensiva incondicionada estão associados ao chamado sistema de fuga/luta ou **Sistema Cerebral Aversivo** (BRANDÃO et al., 1999; 2003). Já as respostas condicionadas são organizadas pelo **Sistema de Inibição Comportamental** (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). O complexo amidaloide participa de ambos os sistemas e parece exercer uma interface entre as sensações e as emoções (LEDOUX, 2000).

O processamento das informações pela amígdala ocorre por mecanismos intrínsecos às suas redes (projeções intra e internucleares) e pode ser modificado por interações com outras estruturas cerebrais que integram as entradas sensoriais (SAH et al., 2003). Existem evidências importantes de que sistemas neuromoduladores apresentam interações críticas entre si dentro da região basolateral da amígdala, regulando os processos mnemônicos de variadas experiências através de projeções para outras regiões cerebrais (DAVIS et al., 2003). Um desses sistemas seria o histaminérgico, como proposto por McGaugh (2004).

Nossos resultados sugerem que os níveis histaminérgicos na amígdala modulam os dois sistemas, Sistema Cerebral Aversivo e Sistema de Inibição Comportamental, de forma diferente. Além disso, há indícios do envolvimento da atividade histaminérgica em distúrbios da memória relacionados ao envelhecimento, como a Doença de Alzheimer (ALVAREZ et al., 1996; PASSANI; BLANDINA, 2011). Assim, os achados da presente pesquisa contribuem para a investigação das bases biológicas da aprendizagem e memória e, por conseguinte, para uma melhor compreensão de transtornos emocionais e neurodegenerações.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A comparação dos grupos expostos ao LCE em T1 indicou que a HA intra-amígdala nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 μg não teve efeito sobre os comportamentos relativos à ansiedade.
- A elevação dos níveis do neurotransmissor/neuromodulador através da infusão de HA no complexo amigdalóide não afetou a memória emocional dos camundongos submetidos ao LCE.
- A aprendizagem emocional dos animais na tarefa de EI tende a ser facilitada pela microinjeção de HA intra-amígdala na dose de 0,1 μg . Essa possível facilitação será investigada em estudos futuros.
- A HA exógena nas doses de 0,5 e 1,0 μg infundida na amígdala prejudicou a evocação da memória de medo condicionado nos roedores submetidos à tarefa de EI.
- Sugerimos uma participação distinta da HA nas vias que processam ansiedade e medo, destacadamente na mediação das emoções aversivas realizada pela amígdala e de influência na memória emocional.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, E. O. The role of histamine on cognition. *Behav Brain Res*, v. 199, n. 2, p. 183-189, 2009.
- ALVAREZ, E. O.; RUARTE, M. B. Histaminergic neurons of the ventral hippocampus and the baso-lateral amygdala of the rat: functional interaction on memory and learning mechanisms. *Behav Brain Res*, v. 128, p. 81-90, 2002.
- ALVAREZ, X. A et al. Blood levels of histamine, IL-1 beta and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol*. v. 29, p. 237-252, 1996.
- BEAR, M. F. et al. Neuroscience: exploring the brain. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2 ed, 2001.
- BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 16, n. 7, p. 1539-1545. 2013.
- BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res*, v. 108, p. 197–203, 2000.
- BERTOGLIO, L.J. et al. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res*, v. 175, p.183-188, 2006.
- BLAKE; M. G.; BOCCIA, M. B.; BARATTI, M. B. Behavioral differences on memory retrieval between two variants of step-through inhibitory avoidance task in mice. *Neuroscience Letters* v. 444, p. 102–105, 2008.
- BLANCHARD, R. J. et al. Introduction to the handbook on fear and anxiety. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, v. 17, p. 3-7, 2008.
- BRABANTE, Y.; CHARLIER, C.; TIRELLI, E. The histamine H3-receptor inverse agonist Pitolisant improves fear memory in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 243, p. 199– 204, 2013.
- BRANDAO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. *Revista brasileira de Psiquiatria*, v.25, p.36-41, 2003.
- BRANDAO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDOSSIO, J.E.; DE ARAUJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience Biobehavior Review*, v.1, p.863-75, 1999.
- BRAVO, T. P. et al. Role of histamine in brain protection in surgical brain injury in mice. *Brain Res*, v. 1205, p. 100-107, 2008.

BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HAAS, H. L. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol*, v. 63, p. 637-672, 2001.

BURNS, T. A. et al. Circadian variation of brain histamine in goldfish. *Brain Res Bull*, v. 59, n. 4, p. 299–301, 2003.

CAHILL, L. & MCGAUGH, J. L. Mechanisms of motional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*. v. 21, p. 294–299, 1998.

CANTO-DE-SOUZA, L.; MATTIOLI, R. Clorfeniramina microinjetada no hipocampo dorsal reverte o efeito ansiolítico da L-histidina e prejudica a memória emocional de camundongos. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2011.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 29, p. 1193-1205, 2005.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 49, p.171-176, 1994.

DA SILVA, W. C. et al. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. *Neurobiol Learn Mem*, v. 86, p.100-106, 2006.

DAI, H. et al. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. *Neurosci Res*, v. 57, p. 306-313, 2007.

DAL-CÓL, M. L. C. et al. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 74, p. 395-400, 2003.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci*. v. 17, p. 208–214, 1994.

DERE, E. et al. Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. *Behav Brain Res*, v. 215, n. 2., p. 209-220, 2010.

ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behavioural Brain Res*, v. 86, p. 105-112, 1997.

EHRLISH, i. et al. Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron Review*, v. 62, p. 757-771, 2009.

FAGANELLO, F. R.; MATTIOLI, R. Anxiolytic-like effect of chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 31, p. 269-274, 2007.

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

FERBINTEANU, J.; SHIRVALKAR, P.; SHAPIRO, M. L. Memory Modulates Journey-Dependent Coding in the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, v. 31(25), p. 9135–9146, 2011.

FERRARI, P. F. et al. Interindividual Variability in Swiss Male Mice: Relationship between Social Factors, Aggression, and Anxiety. *Phys & Behav*, v. 63, p. 821-827, 1998.

FLOOD, J. F. et al. Effect of histamine H2 and H3 receptor modulation in the septum on post-training memory processing. *Psychopharmacology*, v. 140, p. 279-284, 1998.

FRISCH, C. et al. The histamine H1-antagonist chlorpheniramine facilitates learning in aged rats. *Neurosci Lett*, v. 229, p. 89-92, 1997.

GARCIA, A. M. B. et al. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav*, v. 85, p.265-270, 2005.

GBAHOU, F. et al. Compared pharmacology of human histamine H3 and H4 receptors: structure-activity relationships of histamine derivatives. *Br J Pharmacol*, v. 147, p. 744–754, 2006.

GIANLORENÇO, A. C. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. & MATTIOLI, R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. *Brain Res Bull.*, v. 86 (1-2), p. 134-8, 2011.

GRAY, J.A.; MCNAUGAHTON, N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septohippocampal system. 2 nd ed. Oxford University Press, London, England, 2000.

HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature Rev*, v. 4, p. 121-129, 2003.

HAAS, H. L. et al. O. Histamine in the Nervous System. *Physiol Rev.*, v. 88, p. 1183-1241, 2008.

HASENÖHRL, R. U. et al. Comparison of intra-accumbens injection of histamine with histamine H1-receptor antagonist chlorpheniramine in effects on reinforcement and memory parameters. *Behav Brain Res*, v. 124, p. 203-211, 2001.

HILL, S. J. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev*, v. 42, p. 45-83, 1990.

HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav*. v. 60, n. 2, p. 473-88, 1998.

HUSTON, J. P. et al. The tuberomammillary nucleus projections in the control of learning, memory and reinforcement processes: evidence for an inhibitory role. *Behav Brain Res*, v. 87, p. 97-105, 1997.

JIANG, X. et al. Histaminergic modulation of excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience*, v. 131, p. 691-703, 2005.

KANDEL, E. R. et al. *Princípios da Neurociência*. Barueri, SP: Manole, 4 ed, 2003.

KHALILZADEH, A.; ZARRINDAST, M. R. & DJAHANGUIRI, B. Effects of intracerebroventricular administration of ultra low doses of histaminergic drugs on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Behav Brain Res*, v. 166, p. 184-187, 2005.

KOHLER, C. A. et al. Histaminergic Mechanisms for Modulation of Memory Systems. *Neural Plasticity*, v. 2011, 2011.

LIM, H. D. et al. Evaluation of Histamine H1-, H2-, and H3-Receptor Ligands at the Human Histamine H4 Receptor: Identification of 4-Methylhistamine as the First Potent and Selective H4 Receptor Agonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 314, p.1310–1321, 2005.

LISTER, G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, v. 92, p.180-185, 1987.

MAREN, S. Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur. J. Neurosci.* v. 28, p. 1661–1666, 2008.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to mammalian amygdala. *Prog. Neurobiol.* v. 55, p. 257–332, 1998.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 27, p.1–28, 2004.

MCINTYRE, C. K. et al. Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 7, 1–13, 2011.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. v. 28, p. 285–305, 2004.

MEDALHA, C. C.; COELHO, J. L.; MATTIOLI, R. Analysis of the role of histamine in inhibitory avoidance in goldfish. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiat*, v. 24, p. 295-305, 2000.

MOBARAKEH, J. I. et al. Role of histamine H receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. *Eur J Pharmacol*, v. 391, p. 81-89, 2000.

MOGHADDAM, A. H. et al. GABA and histamine interaction in the basolateral amygdala of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviors. *Pharmacology*, v. 82, p. 59-66, 2008.

NASEHI, M. et al. The effects of dopaminergic drugs in the dorsal hippocampus of mice in the nicotine-induced anxiogenic-like response. *Pharmacol Biochem Behav.* v 98, n. 3, p. 468-73, 2011.

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

OVERTON, D. A. Experimental methods for the study of state-dependent learning. *Federation Proceedings*, v. 33, 1800-1813, 1974.

PACKARD, M. G. Anxiety, cognition, and habit: A multiple memory systems perspective. *Brain Res*, v. 1293, p. 121-128, 2009.

PANKSEPP, J. The basic emotional circuits of mammalian brains: Do animals have affective lives? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, p. 1791–1804, 2011.

PASSANI, M. B.; BLANDINA, P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci.* v. 32, n. 4, p. 242-249, 2011.

PASSANI, M. B. et al. Central histaminergic system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 24, p. 107-113, 2000.

PASSANI, M. B. et al. Histamine H3 receptor-mediated impairment of contextual fear conditioning and in vivo inhibition of cholinergic transmission in the rat basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience* v.14, p.1522–32, 2001.

PASSANI, M. B. et al. Acetylcholine, histamine, and cognition: two sides of the same coin. *Learn. Mem.* v. 11, p. 1-8. 2011.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain: in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic, 2 ed., 2001.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, p. 149-167, 1985.

PIRATELLO, A. C.; MATTIOLI, R. Thioperamide delays vestibular compensation in goldfish. *Neurosci Lett*, v. 415, p. 146-148, 2007.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the Murine Elevated Plus-Maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 52, p. 297-303, 1995.

RODGERS, R. J. et al. Plus-Maze Retest Profile in Mice: Importance of Initial Stages of Trial 1 and Response to Post-Trial Cholinergic Receptor Blockade. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 54, p.41-50, 1996.

ROGAN, M. T.; LEDOUX, J. E. Emotion: system, cells, synaptic plasticity. *Cell*, v. 85, p. 469-475, 1996.

SAH, P.; FABER, E. S.; LOPEZ DE ARMENTIA, M.; POWER, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev.* v. 83, p. 803–834, 2003.

SERAFIM, K. R. et al. H1-histamine receptors in the amygdala are involved in emotional memory but do not mediate anxiety-related behaviors in mice submitted to EPM testing. *Brain Res Bull.* v. 89, n. 1-2, p. 1-7, 2012.

SERAFIM, K. R. et al. L-histidine provokes state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*, v. 43(1), p. 100-106, 2010.

SPIELER, R. E. et al. Post-trial administration of H1 histamine receptor blocker improves appetitive reversal learning and memory in goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci Lett*, v. 277, p. 5-8, 1999.

STRAKHOVA, M. I. et al. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Res*, v. 1250, p. 41-48, 2009.

SWANSON, L. W. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Amsterdam: Elsevier, 1992.

SWANSON, L. W.; PETROVICH, G. D. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* v. 21, p. 323–231, 1998.

TRUITT, W. A. et al. Anxiety-like behavior is modulated by discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. *Neuroscience*, v. 160, p. 284-294, 2009.

VIANA, F. A. B. *Guia Terapêutico Veterinário*. CEM Ltda. 2 ed. 2003.

WATANABE, T. et al. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res*, v. 295, p. 13-25, 1984.

ZARRINDAST, M. R. et al. Effects of histamine and opioid systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Eur J Pharmacol*, v. 452, p. 193-197, 2002.

ZARRINDAST, M. R. The effects of histaminergic agents in the central amygdala of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol*, v.16, p. 643-649, 2005.

ZARRINDAST, M. R. et al. Influence of Morphine-or apomorphine- induced sensitization on histamine state-dependent learning in the step-down passive avoidance test. *Behav Brain Res*, v. 171, p. 50-55, 2006.

ZARRINDAST, M. R. et al. Histaminergic system of the lateral septum in the modulation of anxiety-like behaviour in rats. *Eur J Pharmacol*, v. 583, p. 108-114, 2008.

ZIMMERMAN, J. M.; MAREN, S. NMDA receptor antagonism in the basolateral but not central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats. *Eur. J. Neurosci.* v. 31, p. 1664–1670, 2010.

YANAI, K.; TASHIRO, M. The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: an insight from human positron emission tomography studies. *Pharmacol Ther*, v. 113, p. 1–15, 2007.

YOSHIMATSU, H. Hypothalamic neuronal histamine regulates body weight through the modulation of diurnal feeding rhythm. *Nutrition*, v. 24, p. 827-831, 2008.

YUZURIHARA, M. et al. Effects of drugs action as histamine releasers or histamine receptor blockers on an experimental anxiety model in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 67, p. 145-150, 2000.

APÊNDICE A – Animais excluídos das análises e as justificativas

Tabela 6 – Justificativas para a exclusão dos 251 camundongos de um total de 455 animais utilizados ao longo de todo o período. 204 camundongos tiveram seus sítios de microinjeção bilateralmente confirmados e seus dados considerados nas análises finais.

Justificativa	Número de camundongos excluídos	
	LCE	EI
Apenas uma lateral atingida	40	37
Nenhuma lateral atingida	34	22
Encéfalo sem análise histológica	1	0
<i>Outlier*</i>	17	21
Amídala atingida bilateralmente e apenas 1 treino	0	6
Problemas técnicos do equipamento	0	2
Critério de exclusão na habituação	0	3
Sem cruzamento durante o treino	0	4
Intensidade do choque alterada	0	7
Queda do aparato	1	0
Sem filmagem	2	1
Cânula obstruída ou deslocada	9	
Capacete descolado	4	
Morte durante/ seguida à cirurgia	40	

*O critério utilizado para definir um *outlier* foi: animal cujos dados, para cada medida analisada, não estavam compreendidos no intervalo de valores dado pelo cálculo da Média $\pm$ (2 X Desvio Padrão da Média). Estes foram excluídos das análises.