UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Clorfeniramina microinjetada no hipocampo dorsal reverte o efeito ansiolítico
da L-histidina e prejudica a memória emocional de camundongos**

LUCAS CANTO DE SOUZA

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.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Clorfeniramina microinjetada no hipocampo dorsal reverte o efeito ansiolítico
da L-histidina e prejudica a memória emocional de camundongos**

LUCAS CANTO DE SOUZA

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.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Mattioli

RIBEIRÃO PRETO – SP

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Clorfeniramina microinjetada no hipocampo dorsal reverte o efeito ansiolítico da L-histidina e prejudica a memória emocional de camundongos

LUCAS CANTO DE SOUZA

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.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Mattioli

RIBEIRÃO PRETO – SP

2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Canto-de-Souza, Lucas

Clorfeniramina microinjetada no hipocampo dorsal reverte o efeito ansiolítico da L-histidina e prejudica a memória emocional de camundongos. Ribeirão Preto, 2011.

53 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Mattioli, Rosana.

1. L-histidina. 2. Clorfeniramina. 3. Hipocampo dorsal. 4. Ansiedade. 5. Memória emocional.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Canto de Souza

Clorfeniramina microinjetada no hipocampo dorsal reverte o efeito ansiolítico da L-histidina e prejudica a memória emocional de camundongos.

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 Rosana Mattioli, por ter me aceitado como seu aluno, pela sua dedicação, paciência e ajuda ao resolver meus problemas, pela amizade e por ter me iniciado na vida científica;

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho;

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

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

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

Aos amigos do laboratório de Neurociências que já foram embora, Flávia Faganello, Luciana Cofiel, Fernanda Romaguera, Marcos (Miagui) e Nadiesca, e aos que estão presentes, Kelly, Carol, Fernanda Daher, Jorge e Diogo pela amizade, pelos conselhos e pelos momentos de diversão;

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

Aos amigos do LPA e aos amigos da psicobiologia;

Aos meus amigos de Araraquara, pela amizade, por escutarem as minhas explicações sobre este trabalho, e não entenderem nada;

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

Aos auxílios fornecidos pela CAPES/PROEX durante esses dois anos;

RESUMO

CANTO-DE-SOUZA, L. **Clorfeniramina microinjetada no hipocampo dorsal reverte o efeito ansiolítico da L-histidina e prejudica a memória emocional de camundongos**. 2011. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O nosso grupo tem investigado os efeitos da Clorfeniramina (CPA), antagonista H₁, e da L-histidina (LH), uma droga precursora da síntese de histamina, sobre a ansiedade e a memória emocional. Diante disso, os objetivos desse estudo foram investigar os efeitos LH administrada i.p. e da CPA microinjetada no hipocampo dorsal sobre a ansiedade e a memória emocional de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE). O experimento foi realizado em dois dias consecutivos. No primeiro dia (T1) 71 camundongos machos da cepa Suíço-Albino pesando 25-35g foram pré-tratados i.p. com salina (SAL) ou LH (500mg/Kg). Após duas horas, os sujeitos receberam microinjeção de SAL ou CPA (0,016nmol; 0,052nmol; 0,16nmol/0,1μl) no hipocampo dorsal. Após cinco minutos, os animais foram expostos ao LCE por cinco minutos. Vinte quatro horas depois, o mesmo protocolo experimental foi adotado na reexposição (T2). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos de acordo com o tratamento farmacológico: SAL/SAL (n=9), SAL/CPA1 (n=9), SAL/CPA2 (n=10), SAL/CPA3 (n=8), LH/SAL (n=10), LH/CPA1 (n=8), LH/CPA2 (n=8) e LH/CPA3 (n=9). As três doses de CPA microinjetadas no hipocampo dorsal não alteraram a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) na exposição ao LCE: T1 – SAL/CPA1 (46,13±4,45); SAL/CPA2 (47,59±4,89); SAL/CPA3 (44,30±6,65) – quando comparados com o grupo controle SAL/SAL (35,84±2,77) e não alteraram o número de entradas nos braços fechados (EBF) – SAL/CPA1 (8,56±1,06); SAL/CPA2 (9,70±1,10); SAL/CPA3 (9,38±1,25) - quando comparados com o grupo controle SAL/SAL (10,56±1,11). A administração i.p. de LH aumentou a %TBA em T1 para o grupo LH/SAL (59,79±4,71), quando comparado ao grupo controle SAL/SAL (35,84±2,77), mas não alterou o EBF: LH/SAL (9,20±1,78) e SAL/SAL (10,56±1,11). Os animais do grupo LH/CPA3 diminuíram %TBA (32,25±4,81) em T1 quando comparados com o grupo LH/SAL (59,79±4,71). Os animais do grupo SAL/CPA1 não apresentaram diminuição da %TBA em T2 (T1: 46,13±4,45; T2: 39,38±6,53). O mesmo foi observado para os sujeitos dos grupos LH/CPA2 (T1: 50,10±3,99; T2: 40,97±8,22) e LH/CPA3 (T1: 32,25±4,81; T2: 32,16±6,93). Nós concluímos que: a CPA microinjetada no hipocampo dorsal de camundongos não apresenta efeito sobre a ansiedade; a administração intraperitoneal de LH apresenta efeito ansiolítico em camundongos expostos ao LCE e que esse efeito é revertido pela maior dose de CPA (0,16nmol/0,1μl); são necessárias maiores doses de CPA para que haja prejuízo na memória emocional de camundongos reexpostos ao LCE quando os níveis de histamina no hipocampo dorsal estão elevados.

Palavras-chave: L-histidina, Clorfeniramina, hipocampo dorsal, ansiedade, memória emocional.

ABSTRACT

CANTO-DE-SOUZA, L. **Dorsal hippocampal microinjections of chlorpheniramine reverses anxiolytic-like effect of L-histidine and impairs mice emotional memory.** 2011. 53 f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Our group has been investigating the effects of Chlorpheniramine (CPA), a histaminergic H₁ antagonist, and of L-Histidine (LH), a histamine precursor, on anxiety-related behaviors and emotional memory. Thus the aim of this study was to investigate the effects of LH i.p. injections and of dorsal intra-hippocampal microinjections of Chlorpheniramine (CPA) on anxiety-related behaviors and emotional memory in male mice using elevated plus-maze (EPM). The experiment was performed in two days. On the first day (T1) 71 male Swiss Albino mice of body weight 25-35g were pre-treated with saline (SAL) i.p. or LH (500mg/Kg) i.p. After two hours they were treated with dorsal intra-hippocampal microinjections of SAL or CPA (0.016nmol; 0.052nmol; 0.16nmol/0,1μl). Five minutes after intra-hippocampal microinjections the animals were exposed to EPM for 5 minutes. Twenty four hours later the same protocol was repeated (T2). The animals were randomly assigned to 8 groups based on drug treatment: SAL/SAL (n=9), SAL/CPA1 (n=9), SAL/CPA2 (n=10), SAL/CPA3 (n=8), LH/SAL (n=10), LH/CPA1 (n=8), LH/CPA2 (n=8) and LH/CPA3 (n=9). All three doses of intra-hippocampal microinjections of CPA did not change the percentage of time spent in the open-arms (%OAT) on T1 – SAL/CPA1 (46.13±4.45); SAL/CPA2 (47.59±4.89); SAL/CPA3 (44.30±6.65) – when compared to control group SAL/SAL (35.84±2.77) and did not change the enclosed arm entries (EAE) – SAL/CPA1 (8.56±1.06); SAL/CPA2 (9.70±1.10); SAL/CPA3 (9.38±1.25) – when compared to control group SAL/SAL (10.56±1.11). Intraperitoneal injections of LH increased %OAT on T1 on LH/SAL group (59.79±4.71), when compared to control group SAL/SAL (35.84±2.77), but not EAE LH/SAL (9.20±1.78) and SAL/SAL (10.56±1.11). Animals treated with LH and CPA3 (LH/CPA3) decreased %OAT (32.25±4.81) on T1 when compared to LH/SAL (59.79±4.71) group. SAL/CPA1 animals did not decreased %OAT on T2 (T1: 46.13±4.45; T2: 39.38±6.53). The same happened to LH/CPA2 (T1: 50.10±3.99; T2: 40.97±8.22) and LH/CPA3 (T1: 32.25±4.81; T2: 32.16±6.93) groups. Thus, we conclude that: dorsal intra-hippocampal microinjection of Chlorpheniramine has no effect on anxiety-related behaviors in male mice; intraperitoneal injection of L-Histidine has an anxiolytic-like effect in male mice exposed to elevated plus-maze, that is reversed by the higher dose of Chlorpheniramine (0.16nmol/0,1μl); higher doses of CPA are necessary to impair emotional memory when the levels of hippocampal histamine are elevated.

Keywords: L-histidine, Chlorpheniramine, dorsal hippocampus, anxiety, emotional memory.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA: braço aberto

BF: braço fechado

CA1: área CA1 do hipocampo

CA2: área CA2 do hipocampo

CA3: área CA3 do hipocampo

CPA: clorfeniramina

DG: giro denteado

EBA: frequência de entradas nos braços abertos

EBF: frequência de entradas nos braços fechados

EPM: erro padrão da média

GABA: ácido gama-aminobutírico

HA: histamina

intra-HD: intra hipocampo dorsal

LCE: labirinto em cruz elevado

LH: L-histidina

SAL: salina

SHC: sistema histaminérgico central

SNC: sistema nervoso central

SNH: sistema neural histaminérgico

TE: total de entradas

T. Estic.: total de esticadas

T. Imobil.: total de imobilidade

T1: exposição

T2: reexposição

%EBA: porcentagem da frequência de entradas nos braços abertos

%EBF: porcentagem da frequência de entradas nos braços fechados

%Estic. Prot.: porcentagem de esticar protegido

%Merg. Prot.: porcentagem de mergulhar protegido

%TBA: porcentagem do tempo gasto nos braços abertos

%TBF: porcentagem do tempo gasto nos braços fechados

%TC: porcentagem do tempo gasto no centro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Descaboxilação da histidina em histamina (HASS, SERGEEVA e SELBACH, 2008).	14
Figura 2: Sistema histaminérgico no SNC de humanos (HASS, SERGEEVA e SELBACH, 2008).	14
Figura 3: Labirinto em Cruz Elevado	22
Figura 4: Cirurgia estereotáxica	23
Figura 5: bomba de infusão	24
Figura 6: microinjeção intra-hipocampo dorsal	24
Figura 7: Procedimento pré exposição e pré reexposição ao LCE	24
Figura 8: Sítios de injeção no hipocampo dorsal de camundongos de acordo com o Atlas Paxinos e Franklin (2001).	29
Figura 9: Médias (+EPM) da porcentagem de entradas nos braços abertos dos animais dos grupos tratados i.p. com salina ou L-histidina e microinjetados intra-hd com salina ou clorfeniramina (0,016, 0,052, 0,16 nmol/0,1µl). (n=8-10). intra-HD: intra-hipocampo dorsal; I.P.: intraperitoneal; T1: exposição; T2: reexposição. ANOVA de três vias para medidas repetidas seguidas pelo teste <i>Post hoc</i> de Duncan com $p \leq 0,05$. *Diferença significativa em relação ao T1.	30
Figura 10: Médias (+EPM) da porcentagem do tempo gasto nos braços abertos dos animais dos grupos tratados i.p. com salina ou L-histidina e microinjetados intra-hd com salina ou clorfeniramina (0,016, 0,052, 0,16 nmol/0,1µl). (n=8-10). intra-HD: intra-hipocampo dorsal; I.P.: intraperitoneal; T1: exposição; T2: reexposição. ANOVA de três vias para medidas repetidas seguidas pelo teste <i>Post hoc</i> de Duncan com $p \leq 0,05$. # Diferença significativa em relação ao T1 do grupo SAL/SAL. @ Diferença significativa em relação ao T1 do grupo LH/SAL. *Diferença significativa em relação ao T1.	31
Figura 11: Médias (+EPM) do número de entradas nos braços fechados dos animais dos grupos tratados i.p. com salina ou L-histidina e microinjetados intra-hd com salina ou clorfeniramina (0,016, 0,052, 0,16 nmol/0,1µl). (n=8-10). intra-HD: intra-hipocampo dorsal; I.P.: intraperitoneal; T1: exposição; T2: reexposição. ANOVA de três vias para medidas repetidas seguidas pelo teste <i>Post hoc</i> de Duncan com $p \leq 0,05$. *Diferença significativa em relação ao T1.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.	25
Tabela 2: ANOVA de três vias para medidas repetidas das medidas convencionais e etológicas.	35
Tabela 3: Medidas convencionais e etológicas dos camundongos após a administração intraperitoneal (SAL ou LH - 500 mg/Kg) e intra-hipocampo dorsal (SAL ou CPA 0,016; 0,052; 0,16nmol/0,1µl) pré T1 e T2.	36

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	12
II. OBJETIVOS.....	19
III. MATERIAIS E MÉTODO	21
1. <i>Sujeitos</i>	21
2. <i>Equipamentos</i>	21
3. <i>Drogas</i>	22
4. <i>Cirurgia e microinjeção</i>	22
5. <i>Procedimento</i>	24
6. <i>Análise Comportamental</i>	25
7. <i>Histologia</i>	26
8. <i>Análise estatística</i>	27
9. <i>Ética</i>	27
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSSÃO	38
VI. CONCLUSÕES	45
VII. REFERÊNCIAS	47

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A memória emocional relaciona-se a situações com relevante caráter afetivo, além de situações em que o medo e a ansiedade estão presentes. As respostas expressas durante as experiências com intenso valor emocional, como lutar, interagir com parceiros sexuais, se defender do perigo, promovem a sobrevivência do indivíduo e de sua espécie (LEDOUX, 2000). Experiências associadas a emoções tendem a ser recordadas. Estudos têm sugerido que a liberação de hormônios do estresse, pela experiência emocional, desempenha papel importante na mediação dos efeitos da estimulação emocional na memória de longa duração (MCGAUGH, 2004). Assim, experiências que apresentem um forte componente emocional, facilitam a evocação da memória.

A evocação da memória envolve a reativação rápida de memórias que se encontram latentes (CAMMAROTA et al., 2005). É a reconstrução de experiências prévias, e essa reconstrução pode ser influenciada por muitas variáveis presentes no momento da evocação, relacionadas ao contexto no qual a memória é evocada (TULVING; THOMSON, 1973; ROEDIGER; MCDERMOTT, 2000). Logo, além das memórias de longo prazo sofrerem influência das experiências emocionais durante a aprendizagem, tais memórias podem também ser influenciadas pelas experiências emocionais durante a sua evocação (BUCHANAN, 2007).

Dentre as diversas estruturas encefálicas envolvidas nos processos mnemônicos está o hipocampo que é considerado um importante centro na formação e evocação de certas formas de memória, tais como da memória contextual e espacial (MAREN; HOLT, 2000; BANNERMAN et al., 2004; FERBINTEANU; SHIRVALKAR; SHAPIRO, 2011) e possui também uma função mais geral no processamento de informações e subsequente regulação do comportamento.

Em ratos, o hipocampo está estruturalmente dividido em várias sub-regiões, dentre elas o giro denteado, no qual está presente a *fascia dentata* e o *Hilus*, e o *cornu ammonis*. A região do *cornu ammonis* (CA) é dividida em CA1, CA2 e CA3 (MIKI et al., 2005). A formação hipocampal pode ser dividida em porção dorsal e ventral. A função principal da porção dorsal está

relacionada à aprendizagem espacial e memória, enquanto a porção ventral está envolvida com os comportamentos relacionados à ansiedade (BANNERMAN et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que lesões no hipocampo dorsal prejudicam a aprendizagem espacial e a memória de referência espacial ou de localização egocêntrica (BANNERMAN et al., 2004), enquanto lesões no hipocampo ventral promovem resultados semelhantes aos obtidos com a utilização de benzodiazepínicos, ou seja, reduzem a ansiedade (GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Tem sido demonstrado em alguns trabalhos a participação de neurotransmissões específicas nos processos relacionados à aprendizagem e memória. Neste sentido, Cammarota e colaboradores (2005) evidenciaram a participação do sistema glutamatérgico na evocação e extinção da memória. Na tentativa de caracterizar o envolvimento de outros neurotransmissores nesses processos, diversos grupos têm demonstrado o papel do sistema histaminérgico na modulação da aprendizagem e memória (HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008).

A histamina (HA) possui um importante papel como neurotransmissor do Sistema Nervoso Central (SNC). Esta amina biogênica é sintetizada a partir da descarboxilação do aminoácido histidina, através da histidina-decarboxilase (Figura 1). Os corpos celulares histaminérgicos são encontrados no núcleo tuberomamilar do hipotálamo posterior e inervam praticamente todas as regiões do SNC (HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008) (Figura 2).

As sinalizações intracelulares da HA são mediadas via proteínas G e vários segundos mensageiros, através de sua interação com quatro tipos de receptores: H₁, H₂, H₃ e H₄ (HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008; NESTLER; HYMAN; MALENKA, 2009). No SNC são encontrados os receptores pós-sinápticos H₁, H₂ e o receptor pré-sináptico H₃. Este último regula a síntese e liberação de histamina neural e de outras aminas biogênicas, bem como acetilcolina, glutamato e GABA (ácido gama-aminobutírico) (HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). O receptor H₄ está relacionado ao sistema imunológico (LIN et al., 2005), e recentemente foi

verificado a sua presença em várias regiões do SNC de ratos e humanos (STRAKHOVA et al., 2009).

Figura 1: Descaboxilação da histidina em histamina (HASS, SERGEEVA e SELBACH, 2008).

Figura 2: Sistema histaminérgico no SNC de humanos (HASS, SERGEEVA e SELBACH, 2008).

O Sistema Histaminérgico Central (SHC) está envolvido em várias funções do SNC (BROWN, STEVENS e HASS, 2001). Dentre elas estão o ritmo circadiano e sono (NICHOLSON et al., 1991; MONTI, 1993; BURNS, HUSTON e SPIELER, 2003), motivação (WHITE; RUMBOLD, 1988), alterações comportamentais (ONODERA et al., 1994), ansiedade (IMAZUME; ONODERA, 1993; GHI et al., 1995; FAGANELLO; MATTIOLI, 2007), medo (SANTOS; HUSTON; BRANDÃO, 2003), na percepção da dor (MOBARAKEH et al., 2000), na modulação da atividade psicomotora (ALVAREZ et al., 1994) e na aprendizagem e memória (DE ALMEIDA; IZQUIERDO, 1986; MATTIOLI et al., 1998; MEDALHA; COELHO; MATTIOLI, 2000; COFIEL; MATTIOLI, 2006; SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011a, 2011b).

Alguns autores já demonstraram a influência do sistema histaminérgico na modulação da aprendizagem e memória através de intervenções farmacológicas ou lesões do núcleo tuberomamilar (KLAPDOR; HASENOHRL; HUSTON, 1994; ONODERA et al., 1994) e de outras regiões encefálicas (Da SILVA et al., 2006; PASSANI et al., 2007; ALVAREZ; ALVAREZ, 2008).

A histamina exerce uma ação dual sobre os processos mnemônicos, podendo tanto inibir quanto facilitar a aprendizagem e memória. Por exemplo, o bloqueio crônico da enzima sintetizadora da histamina induziu tanto a facilitação como a inibição da aquisição da esQUIVA ativa em ratos (CACABELOS; ALVAREZ, 1991; KAMEI; OKUMURA; TASAKA, 1993). Em peixes, a inibição do Sistema Neural Histaminérgico (SNH) com administração i.p. de clorfeniramina (CPA), antagonista do receptor H₁, acelerou o processo de recuperação funcional após lesão vestibular (PIRATELLO; MATTIOLI, 2004) e facilitou a aprendizagem com reforço positivo, melhorando a consolidação da memória de longa duração (SPIELER et al., 1999), porém prejudicou a recuperação funcional após a ablação telencefálica (GARÇÃO et al., 2009). De Almeida e Izquierdo (1986) demonstraram o efeito facilitador da HA sobre a memória emocional, após injeção intracerebroventricular em ratos num teste de esQUIVA ativa. Já camundongos tratados com L-histidina (i.p.), precursor da histamina, antes da exposição e da reexposição ao labirinto em cruz elevado, apresentaram déficit na evocação da memória emocional estado dependente (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011a).

Aparentemente estas evidências contraditórias podem ser explicadas devido ao uso de diferentes espécies de animais como também de diferentes modelos utilizados na avaliação da aprendizagem e memória (BROWN; STEVENS; HASS, 2001).

Com relação à presença de neurotransmissão histaminérgica no hipocampo, sabe-se que dois feixes de fibras histaminérgicas chegam a esta estrutura, uma através do fórnix e a outra pela região caudal. Embora essa inervação não seja muito densa, a ação histaminérgica nessa estrutura tem sido estudada em cérebro de ratos (HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008).

Zarrindast e colaboradores (2006), ao investigarem os efeitos da histamina e seus antagonistas H₁ e H₂ microinjetados na região CA1 do hipocampo de ratos, verificaram que a histamina é capaz de induzir um efeito ansiolítico e que os receptores H₁ e H₂ podem estar envolvidos na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade. No estudo realizado por Da Silva e colaboradores (2006), a histamina, quando microinjetada na região CA1 do hipocampo

de ratos, melhorou a consolidação da memória através de um mecanismo que envolve a ativação dos receptores H₂.

Dentre os diversos modelos animais utilizados para se avaliar ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE) é o que tem sido mais amplamente empregado (RODGERS, 1997). O LCE foi validado para ratos (HANDLEY; MITHANI 1984; PELLOW et al., 1985) e camundongos (STHEPENS et al., 1986; LISTER, 1987) e se baseia na aversão natural que roedores têm aos espaços abertos, e além disso, envolve o estudo dos padrões exploratórios em um labirinto simples que possui quatro braços, dos quais dois têm paredes (braços fechados - BF) e dois não (braços abertos - BA) (LISTER, 1987; FILE, 1992; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

Além de ser utilizado para se avaliar os efeitos de drogas sobre a ansiedade, o LCE pode também ser utilizado com o objetivo de se aferir memória através da comparação dos comportamentos exploratórios emitidos pelo sujeito experimental na reexposição em relação aos emitidos na exposição ao aparato (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011a).

Um aspecto intrigante do uso do LCE está relacionado à influência que a experiência prévia no teste exerce sobre o perfil comportamental e a sensibilidade de roedores a drogas ansiolíticas em exposições subsequentes. Alguns trabalhos têm mostrado que uma única experiência ao aparelho reduz significativamente a exploração nos braços abertos na reexposição ao aparelho (FILE; ZANGROSSI, 1993; GRIEBEL et al., 1997; GONZALES; FILE, 1997; RODGERS et al., 1997). Segundo alguns autores esse fenômeno mostra-se independente do tratamento farmacológico recebido previamente à primeira exposição. Diversas hipóteses foram levantadas para explicar a perda do efeito dentre elas estão: habituação locomotora (DAWSON et al., 1994); mudança celular na transmissão GABA/benzodiazepínica (GONZALEZ; FILE, 1997; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002); mudança na natureza da ansiedade/medo (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000); ativação de estruturas telencefálicas envolvidas no controle do medo

aprendido (ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008); e o papel da consolidação da memória em relação ao LCE (DAL-CÓL et al, 2003; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Estudos sobre as bases biológicas do Sistema Histaminérgico e sua atuação no SNC apresentam grande importância. Alguns trabalhos indicam que os níveis de HA estão diminuídos nas áreas cerebrais de indivíduos com Doença de Alzheimer e Síndrome de Down (HAAS; PANULA, 2003).

O papel do sistema histaminérgico sobre aprendizagem, memória e ansiedade tem sido alvo de estudos, já que anti-histamínicos são amplamente utilizados pela população com objetivo de redução de sintomas de reações alérgicas, diversas vezes e por longos períodos.

Evidências comportamentais obtidas nos trabalhos realizados por Cangioli e colaboradores (2002) e Bongers e colaboradores (2004) direcionam para uma atuação do SNH na modulação da ansiedade e dos componentes relacionados com a memória emocional. Adicionalmente, os resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a L-histidina (precursora da histamina) administrada i.p pré Teste 1 e pré Teste 2, não teve efeito sobre a ansiedade, porém induziu um déficit na evocação da memória emocional estado dependente em camundongos reexpostos ao LCE (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011a).

Diante das evidências da participação do hipocampo dorsal, que possui projeções histaminérgicas, em processos mnemônicos, e que a LH administrada i.p. não apresentou efeito sobre a ansiedade, porém induziu prejuízo na evocação da memória emocional de camundongos reexpostos ao LCE, torna-se importante investigar a participação da neurotransmissão histaminérgica nessa estrutura límbica. Para isso, neste estudo nós investigamos se o prejuízo na evocação da memória emocional estado dependente causado pela LH é mediado por receptores H₁ no hipocampo dorsal de camundongos reexpostos ao LCE.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

- Investigar os efeitos do tratamento sistêmico com L-histidina, sobre a ansiedade e a evocação da memória emocional em camundongos machos reexpostos ao LCE.
- Investigar os efeitos de injeções intra-HD de clorfeniramina sobre a ansiedade e memória emocional em camundongos pré-tratados com L-histidina e reexpostos ao LCE.

MATERIAL E MÉTODO

III. MATERIAL E MÉTODO

1. Sujeitos

Foram utilizados 71 camundongos machos da cepa Suíço-Albino, pesando entre 25 e 35g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram agrupados em 4 por caixa (31×20×13 cm), mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade e luz (ciclo claro escuro de 12/12horas, luzes acesas às 7:00 e apagadas às 19:00 horas) com intensidade luminosa de aproximadamente 100 lux e livre acesso ao alimento e água.

2. Equipamentos

O equipamento utilizado foi o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de acrílico (Figura 3). Este aparato é formado por dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos por uma plataforma central (5 x 5 cm) a dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), sendo o conjunto elevado a 38,5 cm do solo (modificado de LISTER, 1987). Com o objetivo de evitar que os animais tivessem dicas do ambiente, foi colocada ao redor do LCE uma cortina preta e opaca. Esta ficava presa a um suporte posicionado acima do aparato. A luminosidade presente no centro do LCE era de 48 lux.

O registro dos comportamentos foi feito por uma câmera posicionada a 80cm acima do labirinto e acoplada a um computador que possui um software para armazenamento de vídeos (GeoVision GV-600 System) e que está localizado a uma sala adjacente a sala de teste. Os comportamentos foram avaliados através da análise dos vídeos por um observador treinado, utilizando-se um software (X-Plo-Rat) (GARCIA CARDENAS; MORATO, 2005).

Figura 3: Labirinto em Cruz Elevado

3. Drogas

Para a administração sistêmica foi usado o precursor da histamina, a L-histidina (LH) na dose de 500mg/Kg, sendo esta injetada num volume de 2ml/Kg. A dose de L-histidina foi determinada a partir do estudo realizado em nosso laboratório por Serafim e colaboradores (2010). Nesse estudo, os autores utilizaram três doses de LH: 200, 500 e 1000mg/Kg, e verificaram que nenhuma das doses apresentou efeito ansiolítico e a dose intermediária causou déficit de memória estado dependente.

Para as microinjeções foi utilizado a Clorfeniramina (CPA), sal de maleato (Sigma, MO, USA) antagonista H₁, nas doses de 0,016; 0,052 e 0,16nmol/0,1µl (PRIVOU, et al., 1998).

Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina (SAL) estéril (0.9%), a qual foi utilizada como controle. As drogas e a SAL foram codificadas e mantidas sob refrigeração. Somente após a análise dos vídeos o experimentador teve conhecimento dos códigos.

4. Cirurgia e microinjeção

Após serem anestesiados com uma solução (i.p.) de cloridrato de cetamina (100mg/Kg) e xilazina (10 mg/kg), os animais passaram por cirurgia estereotáxica (Figura 4) para a implantação

intracraniana no hipocampo dorsal de duas cânulas-guia (25-gauge), de 7 mm de comprimento. As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico (JET resina e líquido polimerizante). As coordenadas estereotáxicas (Insight EFF-333 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) para implantação das cânulas-guia em relação ao bregma [antero-posterior (AP)= -1,8mm; lateral (L)= $\pm 1,6$ mm e ventral (V)= -1,0mm] foram baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). Mandris, inseridos dentro das cânulas-guia para evitar problemas com obstrução, foram removidos durante o procedimento de injeção. Durante os 3 dias pós-cirúrgico os animais foram tratados com acetaminofeno (200mg/mL), adicionado aos frascos de água (MESSIER; EMOND; ETHIER, 1999; NUNES-DE-SOUZA, et al., 2008).

Figura 4: cirurgia estereotáxica

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção dos mandris, inserção das agulhas de injeção com 8mm de comprimento (33-gauge) dentro das cânulas-guia para a injeção de soluções no hipocampo dorsal. As agulhas foram conectadas, por meio de tubos de polietileno (PE-10) a microseringas Hamilton (5 μ l). Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos Científicos Ltda, Brasil, Figura 5) foi programada para injetar simultaneamente 0,1 μ l de solução durante um período de 60 segundos no hipocampo dorsal esquerdo e direito (Figura 6). Após a infusão das soluções, as agulhas de injeção permaneceram por mais 90 segundos. O

movimento de uma pequena bolha de ar nos tubos de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmava o fluxo da solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).

Figura 5: bomba de infusão

Figura 6: microinjeção intra-hipocampo dorsal

5. Procedimento

O experimento foi realizado em dois dias consecutivos, o Teste 1 (T1) e o Teste 2 (T2). Em T1 os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p) de salina ou LH (500mg/kg). Depois de duas horas, os camundongos receberam uma microinjeção no hipocampo dorsal de salina ou CPA (0,016; 0,052; 0,16nmol/0,1µl) (ISAYAMA et al., 2001; HUANG et al., 2003) e após cinco minutos foram transportados para o labirinto, conforme o procedimento descrito na Figura 7. Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto com a cabeça voltada para um braço aberto (STHEPENS et al., 1986; LISTER, 1987), sendo o teste realizado durante cinco minutos. Depois de cada teste o labirinto foi limpo com uma solução de álcool a 5%. Após 24 horas, o mesmo procedimento foi realizado na reexposição (T2).

Figura 7: Procedimento pré exposição e pré reexposição ao LCE

As drogas foram administradas pré T1 e pré T2, sob as mesmas condições experimentais, e o tratamento farmacológico foi realizado conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

Grupo	T1		T2	
	I.P.	CENTRAL	I.P.	CENTRAL
SAL/SAL (n=9)	SAL	SAL	SAL	SAL
SAL/CPA1 (n=9)	SAL	CPA1	SAL	CPA1
SAL/CPA2 (n=10)	SAL	CPA2	SAL	CPA2
SAL/CPA3 (n=8)	SAL	CPA3	SAL	CPA3
LH/SAL (n=10)	LH	SAL	LH	SAL
LH/CPA1 (n=8)	LH	CPA1	LH	CPA1
LH/CPA2 (n=8)	LH	CPA2	LH	CPA2
LH/CPA3 (n=9)	LH	CPA3	LH	CPA3

SAL: salina; LH: L-histidina; CPA1: clorfeniramina 0,016nmol/0,1µl; CPA2: clorfeniramina 0,052nmol/0,1µl; CPA3: clorfeniramina 0,16nmol/0,1µl.

6. *Análise Comportamental*

Os comportamentos analisados envolveram tanto os parâmetros convencionais (LISTER, 1987), quanto os etológicos (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

Medidas Convencionais: Total de entradas (TE), frequência de entradas nos braços abertos (EBA) e sua porcentagem (%EBA), número de entradas nos braços fechados (EBF), porcentagem do tempo gasto nestes compartimentos (%TBA e %TBF) e na plataforma central (%TC). A entrada em um braço é definida quando as quatro patas do animal estiverem fora da área central.

Medidas etológicas: foi registrada a frequência de levantamentos (*Rearing*- elevação do corpo sobre as patas traseiras); os mergulhos (*head-dipping* – movimentos exploratórios da cabeça/ombros em direção ao solo quando o animal estiver nos braços abertos e na plataforma

central); as posturas de esticar o corpo (*stretched attend postures – SAP*), movimentos que consistem em esticar o corpo e retrai-lo a posição original, sem ocorrência de locomoção e o tempo de imobilidade, no qual se observa apenas os movimentos respiratórios. Os braços fechados e a plataforma central foram designadas áreas “protegidas”, enquanto os braços abertos foram designados como áreas “desprotegidas” (ROGERS; JOHNSON, 1995). Para os cálculos das porcentagens foram utilizadas as seguintes fórmulas: $[(\text{Frequência de entradas}/\text{Total}) \times 100]$ e $[(\text{Tempo no compartimento}/300) \times 100]$.

Para avaliar as respostas relacionadas à ansiedade e à memória, os dados foram verificados através do paradigma T1/T2 (DAL-COL et al., 2003; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; SERAFIM, et al., 2010; GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011a). A ansiedade foi inferida através das medidas de exploração dos braços abertos em T1. Durante a reexposição (T2), a diminuição da atividade nos braços abertos (entradas e tempo gasto nos braços abertos) foi utilizada como uma resposta de aprendizagem e memória. A atividade locomotora foi avaliada pelo número total de entradas (TE) e pela frequência de entradas nos braços fechados (EBF) (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994).

7. Histologia

Após o término dos experimentos, os animais receberam uma dose letal do anestésico [cloridrato de cetamina (200mg/Kg) e xilazina (20 mg/kg), i.p.] e em seguida foram submetidos a uma microinjeção bilateral de 0,1 µl de uma solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o procedimento descrito para a microinjeção de drogas. Em seguida, os animais foram decapitados, seus cérebros removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Após três dias, os cérebros sofreram secções coronais de 80 micrômetros ao longo do trajeto das cânulas através do uso do micrótomo (ANCAP 300). As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (2001).

8. *Análise estatística*

Inicialmente os dados obtidos foram submetidos aos testes de homogeneidade e normalidade. Na sequência, os dados comportamentais foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de três vias com medidas repetidas (Fator 1: tratamento com SAL ou LH; Fator 2: tratamento com SAL ou CPA1 ou CPA2 ou CPA3; Fator 3: exposição e reexposição). Quando apropriado, foi utilizado o teste *Post hoc* de Duncan para comparações múltiplas de médias de grupo. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

9. *Ética*

Os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados de acordo com os preceitos da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) para o trabalho com animais. Além disso, este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar (005/2009).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A Figura 8 é uma representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (2001). Os círculos cinza representam as canulações positivas, enquanto que os pretos representam as negativas.

Figura 8: Sítios de injeção no hipocampo dorsal de camundongos de acordo com o Atlas Paxinos e Franklin (2001).

As figuras de 9 a 11 representam as médias (+EPM) da porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) e o número de entradas nos braços fechados (EBF) dos animais dos grupos SAL/SAL (animais tratados com salina i.p e salina central em T1 e T2), SAL/CPA1 (animais tratados com salina i.p e CPA 0,016nmol/0,1µl central em T1 e T2), SAL/CPA2 (animais tratados com salina i.p e CPA 0,052nmol/0,1µl central em T1 e T2), SAL/CPA3 (animais tratados com salina i.p e CPA 0,16nmol/0,1µl central em T1 e T2), LH/SAL (animais tratados com LH i.p e SAL central em T1 e T2), LH/CPA1 (animais tratados com LH i.p e CPA 0,016nmol/0,1µl central em T1 e T2), LH/CPA2 (animais tratados com LH i.p e CPA 0,052nmol/0,1µl central em T1 e T2) e LH/CPA3 (animais tratados com LH i.p e CPA 0,16nmol/0,1µl central em T1 e T2).

Figura 9: Médias (+EPM) da porcentagem de entradas nos braços abertos dos animais dos grupos tratados i.p. com salina ou L-histidina e microinjetados intra-hd com salina ou clorfeniramina (0,016, 0,052, 0,16 nmol/0,1µl). (n=8-10). intra-HD: intra-hipocampo dorsal; I.P.: intraperitoneal; T1: exposição; T2: reexposição. ANOVA de três vias para medidas repetidas seguidas pelo teste *Post hoc* de Duncan com $p \leq 0,05$. *Diferença significativa em relação ao T1.

Figura 10: Médias (+EPM) da porcentagem do tempo gasto nos braços abertos dos animais dos grupos tratados i.p. com salina ou L-histidina e microinjetados intra-hd com salina ou clorfeniramina (0,016, 0,052, 0,16 nmol/0,1µl). (n=8-10). intra-HD: intra-hipocampo dorsal; I.P.: intraperitoneal; T1: exposição; T2: reexposição. ANOVA de três vias para medidas repetidas seguidas pelo teste *Post hoc* de Duncan com $p \leq 0,05$. # Diferença significativa em relação ao T1 do grupo SAL/SAL. @ Diferença significativa em relação ao T1 do grupo LH/SAL. *Diferença significativa em relação ao T1.

Figura 11: Médias (+EPM) do número de entradas nos braços fechados dos animais dos grupos tratados i.p. com salina ou L-histidina e microinjetados intra-hd com salina ou clorfeniramina (0,016, 0,052, 0,16 nmol/0,1µl). (n=8-10). intra-HD: intra-hipocampo dorsal; I.P.: intraperitoneal; T1: exposição; T2: reexposição. ANOVA de três vias para medidas repetidas seguidas pelo teste *Post hoc* de Duncan com $p \leq 0,05$. *Diferença significativa em relação ao T1.

Na Figura 9 estão representadas as médias (+EPM) da porcentagem do número de entradas nos braços abertos (%EBA) dos animais dos grupos SAL/SAL, SAL/CPA1, SAL/CPA2, SAL/CPA3, LH/SAL, LH/CPA1, LH/CPA2 e LH/CPA3.

A ANOVA de três vias para medidas repetidas revelou que houve diferença significativa para o Fator 1 (SAL ou LH) $F_{(1,63)}=4,30$ $p \leq 0,05$ e para o Fator 3 (exposições) $F_{(3,63)}=36,90$ $p < 0,01$, porém o mesmo não ocorreu para o Fator 2 (SAL ou CPA1 ou CPA2 ou CPA3) (Fator 2 $F_{(3,63)}=1,51$ $p=0,22$). A ANOVA também revelou que não houve interação entre os Fatores (Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 $F_{(3,63)}=0,62$ $p=0,60$).

O teste *Post hoc* de Duncan revelou diferença significativa com relação à exposição para os grupos SAL/CPA2, SAL/CPA3 e LH/CPA2 e que há tendência na diminuição da %EBA em T2 para os animais do grupo SAL/SAL ($p=0,068$).

A Figura 10 representa as médias (+EPM) da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) dos animais dos grupos SAL/SAL, SAL/CPA1, SAL/CPA2, SAL/CPA3, LH/SAL, LH/CPA1, LH/CPA2 e LH/CPA3.

A ANOVA revelou tendência significativa para os fatores, 1 $F_{(1,63)}=3,51$ $p=0,065$ e 2 $F_{(3,63)}=2,33$ $p=0,083$ e interação entre os fatores Fator 1 x Fator 2 ($F_{(3,63)}=2,84$ $p < 0,05$). Além disso, a análise estatística revelou que há diferença significativa para o Fator 3 ($F_{(3,63)}=47,71$ $p < 0,01$) e que há interação entre os três fatores: Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 ($F_{(3,63)}=3,63$ $p < 0,05$).

O teste *Post hoc* de Duncan revelou diferença significativa com relação à exposição para os grupos SAL/SAL, SAL/CPA2, SAL/CPA3, LH/SAL e LH/CPA1. É possível observar também que houve aumento da %TBA em T1 para os animais do grupo LH/SAL quando comparados com o T1 dos sujeitos do grupo SAL/SAL, e que os sujeitos do grupo LH/CPA3 apresentam diminuição na %TBA quando comparados com o grupo LH/SAL.

A Figura 11 representa as médias (+EPM) do número de entradas nos braços fechados (EBF) dos animais dos grupos SAL/SAL, SAL/CPA1, SAL/CPA2, SAL/CPA3, LH/SAL, LH/CPA1, LH/CPA2 e LH/CPA3.

A ANOVA revelou que houve diferença significativa apenas para o Fator 3 ($F_{(3,63)}=25,32$ $p<0,01$) (Fator 1 $F_{(1,63)}=0,0$ $p=0,99$; Fator 2 $F_{(3,63)}=0,053$ $p=0,98$) e que não houve interação entre os três fatores Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 ($F_{(3,63)}=0,47$ $p=0,71$). O teste *Post hoc* de Duncan revelou aumento significativo na EBF em T2, quando comparados ao T1, apenas nos grupos SAL/CPA3 e LH/CPA2.

A Tabela 2 representa os dados da ANOVA de três vias para medidas repetidas (Fator 1: tratamento com SAL ou LH; Fator 2: tratamento com SAL ou CPA1 ou CPA2 ou CPA3; Fator 3: exposição e reexposição) dos comportamentos: total de entradas (TE), número de entradas nos braços abertos (EBA), porcentagem de tempo gasto nos braços fechados (%TBF), porcentagem de tempo gasto no centro (%TC), e os parâmetros etológicos total de esticadas (T. Estic.), porcentagem de esticadas protegidas (%Estic. Prot.), total de mergulhos (T. Merg.), porcentagem de mergulhos protegidos (%Merg. Prot.), total de levantadas (Levantar) e total de imobilidade (T. Imobil.).

A Tabela 3 representa as médias ($\pm$ EPM) e os resultados do teste *Post hoc* de Duncan dos mesmos comportamentos apresentados na Tabela 2. Para o EBA foi observado diminuição significativa em T2, em relação ao T1, apenas para o grupo SAL/CPA2. Já para a %TBF houve aumento significativo em T2, em relação ao T1, para os grupos SAL/SAL, SAL/CPA2, SAL/CPA3, LH/SAL e LH/CPA2. Com relação à %TC houve aumento significativo em T2, em relação ao T1, para o grupo LH/CPA2 e aumento significativo em T1 para o grupo LH/CPA3 em relação ao T1 do grupo LH/SAL. Para o T. Estic. foi observado diminuição significativa em T1 para os grupos SAL/CPA1, SAL/CPA3 e LH/SAL em relação ao T1 do grupo SAL/SAL. O teste *Post hoc* de Duncan revelou ainda que houve aumento na %Estic. Prot. em T2, em relação ao T1, para o grupo SAL/CPA3 e que houve diminuição, para esse mesmo parâmetro, em T1 do grupo LH/SAL em relação ao T1 do grupo SAL/SAL. Ao analisarmos o T. Merg. podemos observar que houve diminuição significativa em T2, em relação ao T1, para os grupos SAL/CPA2, SAL/CPA3 e LH/SAL. Ainda com relação ao T. Merg., houve aumento significativo em T1 do grupo

LH/SAL, quando comparado ao T1 do grupo SAL/SAL e diminuição em T1 do grupo LH/CPA3 em relação ao T1 do grupo LH/SAL. O teste *Post hoc* de Duncan também revelou que houve aumento significativo na %Merg. Prot. em T2, em relação ao T1, para os grupos SAL/SAL, SAL/CPA2, SAL/CPA3, LH/SAL, LH/CPA1 e LH/CPA2. O mesmo teste estatístico revelou diminuição significativa em T1 nos grupos SAL/CPA2 e LH/SAL quando comparado ao T1 do grupo SAL/SAL e que houve aumento em T1 do grupo LH/CPA3 em relação ao T1 do grupo LH/SAL.

Tabela 2: ANOVA de três vias para medidas repetidas das medidas convencionais e etológicas.

COMPORTAMENTOS	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 1xFator 2	Fator1xFator2xFator3
TE	F(1,63)=3,0 p=0,09	F(3,63)=1,19 p=0,32	F(3,63)=1,78 p=0,19	F(3,63)=0,30 p=0,82	F(3,63)=0,46 p=0,71
EBA	F(1,63)=5,36 p<0,05	F(3,63)=2,45 p=0,071	F(3,63)=8,08 p<0,01	F(3,63)=0,96 p=0,42	F(3,63)=0,46 p=0,71
% TBF	F(1,63)=3,31 p=0,074	F(3,63)=1,0 p=0,40	F(3,63)=78,41 p<0,01	F(3,63)=1,22 p=0,31	F(3,63)=1,13 p=0,34
% TC	F(1,63)=0,57 p=0,45	F(3,63)=3,67 p<0,05	F(3,63)=15,82 p<0,01	F(3,63)=3,25 p<0,05	F(3,63)=2,44 p=0,072
T. Estic.	F(1,63)=1,8 p=0,18	F(3,63)=13,35 p<0,01	F(3,63)=1,66 p=0,20	F(3,63)=2,46 p=0,071	F(3,63)=1,87 p=0,14
% Estic. Prot.	F(1,63)=10,45 p<0,01	F(3,63)=2,42 p=0,074	F(3,63)=11,78 p<0,01	F(3,63)=0,44 p=0,73	F(3,63)=3,17 p<0,05
T. Merg.	F(1,63)=1,78 p=0,19	F(3,63)=0,44 p=0,72	F(3,63)=28,45 p<0,01	F(3,63)=2,68 p=0,054	F(3,63)=2,35 p=0,081
% Merg. Prot.	F(1,63)=3,37 p=0,071	F(3,63)=1,60 p=0,20	F(3,63)=67,81 p<0,01	F(3,63)=4,24 p<0,01	F(3,63)=1,89 p=0,14
Levantar	F(1,63)=1,34 p=0,25	F(3,63)=0,34 p=0,79	F(3,63)=0,13 p=0,72	F(3,63)=3,04 p<0,05	F(3,63)=0,58 p=0,63
T. Imobil.	F(1,63)=1,18 p=0,28	F(3,63)=2,87 p<0,05	F(3,63)=0,35 p=0,55	F(3,63)=0,27 p=0,85	F(3,63)=1,90 p=0,14

Fator 1: tratamento com SAL ou LH; Fator 2: tratamento com SAL ou CPA1 ou CPA2 ou CPA3; Fator 3: exposição e reexposição

Tabela 3: Medidas convencionais e etológicas dos camundongos após a administração intraperitoneal (SAL ou LH - 500 mg/Kg) e intra-hipocampo dorsal (SAL ou CPA 0,016; 0,052; 0,16nmol/0,1µl) pré T1 e T2.

COMPORTAMENTOS	IP. INTRA HD		SALINA								L-Histidina							
			Clorfeniramina (0,016, 0,052, 0,16 nmol/0,1µl)								Clorfeniramina (0,016, 0,052, 0,16 nmol/0,1µl)							
			SALINA		CPA1		CPA2		CPA3		SALINA		CPA1		CPA2		CPA3	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
TE	20,3±1,3	21,3±1,9	21,9±1,7	24,3±1,8	23,6±2,1	21,7±2,3	21,3±1,5	21,6±2,2	23,2±2,6	24,8±2,1	25,5±2,1	26,3±1,5	25±1,7	25,5±1,9	20,1±2,4	23±2,3		
EBA	9,8±0,6	8,4±1,2	13,3±1,1	13,8±2	13,9±1,5	9,7±1,5*	11,9±1,8	8,4±1,7	14±1,5	13,5±1,7	14,3±1,1	14,3±1,4	16±1,7	12,3±2,6	11,2±1,3	11±1,4		
%TBF	36,6±3,4	49,2±4,8*	28,4±2,1	33,5±3	31,6±3,3	47,3±6,5*	28,5±3,4	45,8±5,3*	24,4±3,3	37,2±4,2*	31,3±4	34,8±4,9	27,4±1,9	45,5±4,6*	26,8±5,1	33,7±5		
%TC	27,6±3,5	30,5±3,9	25,5±3,2	27,1±4,6	20,9±2,6	31,9±5,3	27,2±3,9	33,9±3,3	15,8±2,2	24,8±3,4	20,3±2,8	32,1±3,3	22,5±3,4	47,3±5,6*	41±6,7#	34,1±5,6		
T. Estic.	41,3±7,7	38,1±5,8	10,1±1,5@	9,9±1,5	36,7±11,2	44,3±10,7	9,6±1,4@	10,8±2,7	12,8±3,5@	20,3±4,8	11,9±2,4	7±0,9	37,5±6,5	42,3±6,7	13±1,9	13,7±1,7		
%Estic. Prot.	60,4±3	72,5±7,6	58,9±4,3	45±7,4	59±4,8	72,3±5	42,6±10,8	75,8±7,7*	34,1±9,6@	54,1±10	33,9±6,6	39,8±8,9	51,2±3,6	63,9±6,7	45,4±10,6	46,4±9,5		
T. Merg.	19,3±3,7	12±1,8	28,9±5,3	20,3±3,7	33,7±7,6	16,7±3,6*	29,3±3,4	15,6±2,8*	41,3±5,9@	23±3,7*	26,8±2,9	24,8±3,3	29,8±7,3	19,5±3,1	19,6±2,8#	20,2±5,7		
%Merg. Prot.	52,1±10,8	78,6±4,6*	40,2±6,8	45,6±9	25,6±5,2@	55,6±9,3*	41,1±9,7	78,8±5,1*	17,9±6,8@	44,2±8,1*	26,7±6,6	49,7±6,9*	39,3±4	66,8±9,1*	43,6±8,8#	59±11		
Levantar	15,8±1	14,1±2,4	7,1±1,4	8,7±2	12,8±1,8	11,6±2,8	9,6±1,7	9,8±2	10,6±1,4	12,2±1,5	16±3,2	16,3±3,2	11,9±3,6	10,9±3,5	13,6±3,4	11,7±2		
T. Imobil.	0±0	0,9±0,8	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	1,2±0,7	0,3±0,3	0±0	0±0	0,7±0,5	0±0	0,1±0,1	0±0		

Os dados representam à média (±EPM) dos demais comportamentos avaliados no LCE. @Diferente de T1 do grupo SAL/SAL. # Diferente do T1 do grupo LH/SAL.*Diferente de T1. *Post hoc* de Duncan $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

O labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado para se avaliar os efeitos de drogas sobre a ansiedade. Vários estudos já demonstraram que drogas que levam ao aumento da exploração dos braços abertos são consideradas ansiolíticas, enquanto aquelas que diminuem essa exploração são consideradas ansiogênicas (STHEPENS et al., 1986; LISTER, 1987; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Nossos resultados demonstraram que na exposição houve aumento da exploração dos braços abertos dos animais tratados com L-histidina (i.p.) e microinjetados com salina, quando comparados com os animais do grupo SAL/SAL. O aumento da exploração dos braços abertos foi acompanhado pela diminuição do número total de esticadas e da porcentagem de esticadas protegidas, e tendência na diminuição da %TC ($p=0,093$), bem como pelo aumento do total de mergulhos e diminuição na porcentagem de mergulhos protegidos, evidenciando assim, um efeito ansiolítico da L-histidina. Entretanto, quando os camundongos receberam LH i.p. e foram microinjetados intra-hipocampo dorsal com a maior dose de clorfeniramina, o efeito ansiolítico não foi observado. Ao analisarmos o total de entradas e o número de entradas nos braços fechados podemos observar que as drogas não influenciaram na atividade locomotora dos sujeitos expostos ao LCE.

Ao contrário do observado neste trabalho, onde a LH apresentou efeito ansiolítico, estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram que a LH em diferentes doses (200, 500 e 1000mg/Kg) não apresentou efeito ansiolítico quando administrada i.p. em camundongos expostos ao LCE (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011a). Entretanto, no trabalho realizado por Kumar e colaboradores (2007) os autores demonstraram um efeito ansiogênico dose dependente da LH quando administrada i.p. em camundongos expostos ao LCE.

Esses efeitos contraditórios observados podem ser explicados por se tratarem de estudos realizados em diferentes condições experimentais. Nos trabalhos anteriores, os autores não realizaram procedimentos cirúrgicos para a implantação de cânulas-guia. Consequentemente, os sujeitos experimentais não passaram pelo procedimento aversivo de microinjeção cinco minutos antes da exposição ao LCE. Além disso, no nosso estudo foi colocada uma cortina preta e opaca ao redor do LCE, evitando com isso que os animais tivessem qualquer dica visual do ambiente. Assim, a ausência de referências visuais externas pode ter facilitado o comportamento exploratório e/ou efeito ansiolítico da L-histidina.

O nosso trabalho também demonstrou que os animais tratados i.p com LH e que foram submetidos à microinjeção no hipocampo dorsal com a maior dose de CPA (0,16nmol/0,1μl) apresentaram diminuição do tempo exploração dos braços abertos e do total de mergulhos, aumento na %TC e da porcentagem de mergulhos protegidos quando comparados com os animais do grupo LH/SAL, caracterizando assim, a reversão do efeito ansiolítico causado pela LH.

A busca pelo entendimento do papel do sistema histaminérgico no hipocampo de roedores tem sido realizada por diversos pesquisadores. No trabalho realizado por Rostami e colaboradores (2006), os autores verificaram que a microinjeção de histamina no hipocampo ventral de ratos produziu diminuição na %TBA e %EBA quando comparado ao grupo controle. Os autores concluíram que a histamina possui efeito ansiogênico no hipocampo ventral de ratos expostos ao LCE.

Entretanto, quando a histamina é microinjetada no hipocampo dorsal de ratos expostos ao LCE, há um aumento da %TBA e %EBA, caracterizando assim, efeito ansiolítico da histamina no hipocampo dorsal (ZARRINDAST et al., 2006). Além disso, os autores sugerem que o efeito ansiolítico da histamina é mediado por receptores H₁, pois ao microinjetarem pirilamina (antagonista H₁) + histamina, os animais diminuíram a %TBA e %EBA.

No nosso experimento, as doses de clorfeniramina não produziram efeito sobre a ansiedade, contudo, a maior dose reverteu o efeito ansiolítico da LH, o que demonstra que este

efeito pode ser mediado por receptores H₁ no hipocampo dorsal de camundongos expostos ao LCE.

Uma propriedade interessante do LCE está relacionada à influência que a experiência prévia ao aparato exerce sobre o perfil comportamental e a sensibilidade de roedores a drogas ansiolíticas em exposições subsequentes. (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Neste estudo, os resultados do grupo SAL/SAL demonstram que há uma tendência na diminuição da %EBA ($p=0,081$) entre os dois dias, sendo esta confirmada pela %TBA. Isso nos permite inferir que os animais do grupo controle foram capazes de lembrar das características aversivas dos braços abertos.

Quando analisamos os dados referentes à reexposição ao LCE podemos observar, que com a menor dose de CPA, os animais continuaram a explorar os braços abertos de forma semelhante à primeira exposição, evidenciando assim, prejuízo na memória emocional. Porém, quando os sujeitos receberam maiores doses de CPA, as respostas comportamentais dos animais foram alteradas, de forma a reproduzir o perfil de diminuição da exploração dos braços abertos em T2, conforme o observado no grupo SAL/SAL.

Pode-se observar na literatura diversos efeitos contraditórios sobre o envolvimento de antagonistas H₁ em processos mnemônicos. Em estudos realizados com peixes da espécie *Carassius auratus*, a administração i.p. de CPA acelerou o processo de recuperação funcional após lesão vestibular (PIRATELLO; MATTIOLI, 2004) e facilitou a aprendizagem com reforço positivo, melhorando a consolidação da memória de longa duração (SPIELER et al., 1999). Porém, quando injetada i.p. em peixes que sofreram ablação telencefálica, a CPA prejudicou a recuperação funcional dos sujeitos (GARÇÃO et al., 2009).

No estudo realizado por Gianlorenço e colaboradores (2011a), foi observado que a CPA (i.p.) reverteu o prejuízo na memória estado dependente induzido pela LH em camundongos reexpostos ao LCE. Já em outros estudos foi demonstrado que a administração de pirilamina e CPA inibiu os efeitos pró-ativos sobre a aprendizagem e memória, de agonistas histaminérgicos,

como a 2-metilhistamina e 2-tiazoliletilamina, em tarefas de esquiva passiva e de esquiva ativa (*apud* BHATTACHARYA, 1990; *apud* KAMEI et al., 1990). Além disso, Nakazato e colaboradores (2000) observaram que a pirilamina quando microinjetada no hipocampo dorsal de ratos aumenta o número de erros numa tarefa em que se avalia a memória de trabalho.

No nosso estudo, apenas a menor dose de CPA causou prejuízo da memória emocional. Sabe-se que a CPA possui alta afinidade pelo transportador da serotonina (5-HT) (TATSUMI et al., 1997), prejudicando, assim, a recaptção de 5-HT (*apud* YOUNG et al., 1988; *apud* SHISHIDO et al., 1991). Recentemente Miyata e colaboradores (2009) demonstraram através da técnica de microdiálise, que a microinjeção de CPA no córtex pré-frontal aumentou os níveis de 5-HT nesta mesma estrutura em camundongos.

Sabe-se que a 5-HT possui um papel modulador sobre a memória (PEREZ-GARCIA; MENESES, 2008) e que, em humanos, o aumento da neurotransmissão serotoninérgica está associada à melhora na consolidação da memória (HARMER et al., 2002) enquanto que baixos níveis de 5-HT no SNC prejudicam a memória tanto em humanos (HUGHES; GALLAGHER; YOUNG, 2002; PORTER; LUNN; O'BRIEN, 2003) como em outras espécies (LIEBEN, et al., 2004). Diante disso, ao microinjetarmos doses maiores de CPA (0,052 e 0,16nmol/0,1µl) no hipocampo dorsal, nós podemos sugerir que além de se ligarem aos receptores H₁, as moléculas de CPA podem ter se ligado aos transportadores de 5-HT, aumentando assim, os níveis de 5-HT no hipocampo dorsal.

Efeitos contraditórios da atuação da HA sobre a memória têm sido relatados. De Almeida e Izquierdo (1986) demonstraram o efeito facilitador da HA sobre a memória emocional após injeção intracerebroventricular em ratos em um teste de esquiva ativa. Miyazaki e colaboradores (1995) verificaram que em camundongos submetidos ao LCE a histidina reverteu o efeito prejudicial da escopolamina, numa tarefa de aprendizagem e memória, e que esta resposta está associada aos receptores H₁.

Efeitos inibidores da LH sobre a memória emocional foram relatados em estudos prévios realizados em nosso laboratório (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011a). Entretanto, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a LH não causou déficit de memória estado dependente. No nosso trabalho, foi colocada uma cortina preta e opaca ao redor do LCE com o objetivo de manter o ambiente ao redor do labirinto homogêneo, com isso evitando as dicas visuais do ambiente.

Em tarefas de localização espacial nas quais há presença de dicas visuais, o hipocampo armazena a dica visual, não sendo necessário fazer o mapa espacial. Numa situação na qual não há dica visual, essa estrutura límbica é recrutada a fazer o mapeamento do ambiente ao qual o sujeito está inserido (FERBINTEANU; SHIRVALKAR; SHAPIRO, 2011). Diante disso, a falta de dicas ambientais somadas as evidências da participação da HA hipocampal no processamento da memória emocional podem ser os fatores responsáveis pela diferença dos nossos resultados em relação aos obtidos por Serafim e colaboradores (2010) e Gianlorenço e colaboradores (2011a). O hipocampo seria responsável pelo componente espacial no processamento da memória emocional.

Quando os animais são tratados i.p. com LH e com a menor dose de CPA no hipocampo dorsal pode-se observar a ocorrência da diminuição na exploração dos braços abertos na reexposição ao LCE. Todavia, o mesmo comportamento é alterado quando os sujeitos são tratados com doses maiores de CPA (grupo LH/CPA2 e LH/CPA3). Esses resultados demonstram que quando os níveis de HA estão mais elevados, devido à prévia administração de LH, maiores doses de CPA são necessárias para que o prejuízo na memória emocional seja observado.

Os relatos na literatura sobre a participação do sistema histaminérgico sobre a ansiedade, a aprendizagem e a memória ainda são muito tímidos quando comparados com a investigação do envolvimento de outros sistemas, como serotoninérgico e glutamatérgico, em comportamentos relacionados à ansiedade e a processos mnemônicos.

Até o presente estudo não há descrições na literatura sobre o envolvimento da neurotransmissão histaminérgica do hipocampo dorsal em comportamentos relacionados à

ansiedade e memória emocional de camundongos submetidos ao LCE. Os resultados obtidos no nosso estudo apontam para um efeito ansiolítico da LH mediado por receptores H₁ presentes no hipocampo dorsal de camundongos. Somado a tal achado nós sugerimos ainda que tais receptores localizados no hipocampo dorsal estão envolvidos na modulação da memória emocional. Além disso, a partir de nossos resultados, sugerimos uma possível interação da CPA com transportador de 5-HT no hipocampo dorsal, porém outros estudos específicos precisam ser realizados para confirmar essa interação.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Assim podemos concluir que:

- A Clorfeniramina microinjetada no hipocampo dorsal de camundongos não resultou em efeito sobre a ansiedade;
- A L-histidina administrada i.p. resultou em efeito ansiolítico em camundongos sendo esse efeito revertido pela maior dose de CPA (0,16 nmol/0,1µl) no hipocampo dorsal;
- São necessárias maiores doses de CPA para que haja prejuízo na memória emocional de camundongos reexpostos ao LCE quando os níveis de histamina no hipocampo dorsal estão elevados.

REFERÊNCIAS

VII. REFERÊNCIAS

- ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **J. Neurosci. Methods**. v. 169 (1), p. 109-18, 2008.
- ALVAREZ, E. O.; ALVAREZ, P. A. Motivated exploratory behaviour in the rat: the role of hippocampus and the histaminergic neurotransmission. **Behav. Brain Res.**, v. 186, p. 118–125, 2008.
- ALVAREZ, X. A.; FRANCO, A.; FERNANDEZ-NOVOA, L.; CACABELOS, R. Effects of neurotoxic lesions in the posterior hypothalamic region on psychomotor activity and learning. **Agents and Actions**. v. 43, p. 21-23, 1994.
- BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.P.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; BAST, T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H.J and FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neurosc. Behav. Rev.**, v. 28, p. 273-283, 2004.
- 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.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.73, p. 963–969, 2002.
- BERTOGLIO, L.J.; JOCA, S.R.L.; GUIMARÃES, F.S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 175, p.183-188, 2006.
- BHATTACHARYA, S. K. Central histamine receptors in learning and memory in rats. **European Journal of Pharmacology**. v.183(3), p. 925, 1990.
- BONGERS, G.; LEURS, R.; ROBERTSON, J.; RABER, J. Role of H₃- Receptor-Mediated Signaling in Anxiety and Cognition in Wild-Type and ApoE Mice. **Neuropsychopharmacology**. 29(3):441-9, 2004.
- BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HASS, H. L. The physiology of brain histamine. **Prog. Neurobiol.**, v. 63, p. 637–72, 2001.
- BUCHANAN, T. W. Retrieval of Emotional Memories. **Psychol Bull.** v. 133(5), p. 761–779, 2007.
- BURNS, T.A.; HUSTON J.P.; SPIELER, R.E. Circadian variation of brain histamine in goldfish. **Brain Research Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 299–301, 2003.
- CACABELOS, R.; ALVAREZ, X. A., Histidine decarboxylase inhibition induced by alpha-fluoromethylhistidine provokes learning-related hypokinetic activity. **Agents Actions**, v. 33, p. 131-134, 1991.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R. M.; BARROS, D. M.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Retrieval and the Extinction of Memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.25, p. 465-474, 2005.

CANGIOLI, I.; BALDI, E.; MANNAIONI, P. F.; BUCHERELLI, C.; BLANDINA, P.; PASSANI, M. B. Activation of histaminergic H₃ receptor in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 521-528, 2002.

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

COFIEL, L. P.; MATTIOLI R. Involvement of histamine receptors in the acquisition of inhibitory avoidance in *Carassius auratus*. **Elsevier**, v. 30, n 7, p. 1246-1250, Set. 2006.

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

DAL-CÓL, M.L.C.; PEREIRA, L.O.; ROSA, V. P.; CALIXTO, A. V.; CAROBREZ, A. P.; FARIA, M. S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacology Biochemistry and Behavioural**, v. 74, p. 395-400, 2003.

DA SILVA, W. C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H₂ receptor-dependent mechanism. **Neurobiology Learn and Memory**, v. 86, p.100-106, 2006.

DAWSON, G. R.; CRAWFORD, S. P.; STANHOPE, K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M.D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **Psychopharmacology**. v. 113, p. 570–572, 1994.

DE ALMEIDA, M. A. M. R.; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. **Archives of International Pharmacodynamics**. v. 283, p. 193-198, 1986.

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(1), p. 269-74, 2007.

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.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT, J. M.; HEAL, D. J. MARSDEN, C. A. (eds). **Exper. Approa. to Anxiety and Depres.**, p. 25-44, 1992.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. “One-trial tolerance” to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? **Psychopharmacology**. v.110, p. 240 –244, 1993.

GARÇÃO, D. C.; CANTO-DE-SOUZA, L.; ROMAGUERA, F.; MATTIOLI, R. Chlorpheniramine impairs functional recovery in *Carassius auratus* after telencephalic ablation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 375-379, 2009.

GARCIA, A.M.B; CARDENAS, F.P; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 85, p. 265-270, 2005.

GHI, P.; FERRETTI, C.; BLENGIO, M.; PORTALEONE, P. Stress-induced changes in histaminergic system: effects of diazepam and amitriptyline. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 51, p. 65-68, 1995.

GIANLORENÇO, A. C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. L-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H₁ receptor. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, V. 35, p. 91-95, 2011a.

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**, 2011b.

GONZALEZ, L.E.; FILE, S. E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 1505-1511, 1997.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety. **Oxford: Oxford University Press**, 2nd ed, 2000.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAULT, G., SANGER, D. J. Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 57, p. 817-827, 1997.

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the Nervous System. **Physiology Review**, v. 88, p. 1183-1241, 2008.

HAAS, H.L.; PANULA, P. The role of Histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. **Neuroscience**, v. 4, p. 121-130, 2003.

HANDLEY, S. L. e MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HARMER, C. J.; BHAGWAGAR, Z.; COWEN, P. J.; GOODWIN, G. M. Acute administration of citalopram facilitates memory consolidation in healthy volunteers. **Psychopharmacology (Berl)** v. 163, p.106–110, 2002.

HUANG, Y.W.; CHEN, Z.; HU, W. W.; ZHANG, L. S.; WU, W.; YING, L. Y.; WEI, E. Q. Facilitating effect of histamine on spatial memory deficits induced by dizocilpine as evaluated by 8-arm radial maze in SD rats. **Acta Pharmacology Sinica**, 2003.

HUGHES, J. H.; GALLAGHER, P.; YOUNG, A. H. Effects of acute tryptophan depletion on cognitive function in euthymic bipolar patients. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 12, p. 123–128, 2002.

IMAIZUME, M.; ONODERA, K. The behavioural and biochemical effects of thioperamine, a histamine H₃ receptor antagonist, in a light/dark test measuring anxiety in mice. **Life Sci.** v. 53 (22), p. 1675-1683, 1993.

ISAYAMA, S.; SUGIMOTO, Y.; NISHIGA, M.; KAMEI, C. Effects of Histidine on working memory deficits induced by the 5-HT_{1A}-receptor agonist 8-OH-DPAT. **Journal of Pharmacology**, v. 86, 451-453, 2001.

KAMEI, C.; CHUNG, Y. H.; TASAKA, K. Influence of certain H₁-blockers on the step-through active avoidance response in rats. **Psychopharmacology (berl)**. v. 102(3), p. 312-8, 1990.

KAMEI, C.; OKUMURA, Y.; TASAKA, K. Influence of the histamine depletion on learning and memory recollection in rats. **Psychopharmacology**, v.111, p. 376-382, 1993.

KLAPDOR, K.; HASENOHRL, R. U.; HUSTON, J.P. Facilitation of learning in adult and aged rats following bilateral lesions of the tuberomammillary nucleus region. **Behav Brain Res.**, v. 61, p.113–116, 1994.

LEDOUX, J. E. Emotional circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**. v. 23, p. 155-184, 2000.

LIEBEN, C. K.; VAN OORSOUW, K.; DEUTZ, N. E.; BLOKLAND, A. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rats. **Behav Brain Res.** v. 151, p. 53–64, 2004.

LIN, H. D.; RIJN, R. M. V.; LING, P.; BAKKER, R. A.; THURMOND, R. L.; LURS, R. 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, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacol.**, v. 92, p. 180-185, 1987.

MAREN, S.; HOLT, W. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. **Behavioural Brain Research**. v. 110, p. 97-108, 2000.

MATTIOLI, R.; NELSON, C. A.; HUSTON, J. P.; SPIELER, R.E. Conditioned place preference analysis in the goldfish with the H₁ histamine antagonist chlorpheniramine. **Brain Research Bulletin**. v. 45, p.41-44, 1998.

McGAUGH, J.L. The Amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p. 1-28, 2004.

MEDALHA, C. C.; COELHO, J. L.; MATTIOLI, R. Analysis of the role of histamine in inhibitory avoidance in goldfish. **Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 24, p.295-305, 2000.

MESSIER, C.; EMOND, S.; ETHIER, K.; New techniques in stereotaxic Surgery and Anesthesia in the mouse. **Pharmacol. Bioch. Beh.** V. (63), p.313-318 , 1999.

MIYATA, S.; HIRANO, S.; OHSAWA, M.; KAMEI, J. Chlorpheniramine exerts anxiolytic-like effects and activates prefrontal 5-HT systems in mice. **Psychopharmacology.** v. 213, p. 441–452, 2009.

MIYAZAKI, S.; HNAIZUMI, M.; ONODERA, K. Ameliorating effects of histidine on scopolamine-induced learning deficits using an elevated plus-maze test in mice. **Life Sciences**, v. 56, p. 1563-1570, 1995.

MIKI, T.; SATRIOTOMO, I.; LI, H. P.; MATSUMOTO, Y.; GU, H.; YOKOYAMA, T.; LEE, K.Y.; BEDI, K. S.; TAKEUCHI Y. Application of the physical dissector to the central nervous system: Estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus. **Anatomical Science International.** v. 80, p. 153-162, 2005.

MOBARAKEH, J. I.; NALWALK, J. W.; WATANABE, T.; SAKURADA, S.; HOFFMAN, M.; LEURS, R.; TIMMERMAN, H.; SILOS-SANTIAGO, I.; YANAI, K.; HOUGH, L. B. Improprian antinociception does not require neuronal histamine or histamine receptors. **Brain Research.** v. 974, p. 146-152, 2000.

MONTI, J. M. Involvement of histamine in the control of the waking state. **Life Sci.** 53: 1331-8, 1993.

NAKAZATO, E.; YAMAMOTO, T.; OHNO, M.; WATANABE, S. Cholinergic and glutamatergic activation reverses working memory failure by hippocampal histamine H₁ receptor blockade in rats. **Life Sciences.** v. 67, p.1139-1147, 2000.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Molecular Neuropharmacology. A Foundation for Clinical Neuroscience. 2 ed. Editora McGraw-Hill Companies, Cap. 6, p. 145-180, 2009.

NICHOLSON, A. N.; PETA, A. P.; TURNER, C.; GANELLIN, C. R.; GREENGRASS, P. M.; CASH, A. F.; MERCER, A. D. Sedation and histamine H₁-receptor antagonism: studies in man with the enantiomers of chlorpheniramine e dimethindene. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 270-276, 1991.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.L.M. FORNARI, R. V. , COSTA, M. , PELÁ, I. R. , GRAEFF, F. G. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacol.**, v. 150, n. 3, p. 300-310, 2000.

NUNES-DE-SOUZA, V; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, R. J.; CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behav Brain Res.** v. 187(1), p. 72-9, 2008.

ONODERA, K.; YAMATODANI, A.; WATANABE, T.; WADA, H. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. **Program in Neurobiology**, v. 43, p. 685-702, 1994.

- PASSANI, M. B.; GIANNONI, P.; BUCHERELLI, C.; BALDI, E.; BLANDINA, P. Histamine in the brain: Beyond sleep and memory. **Biochem. Pharmacol.**, v. 73, p. 1113–1122, 2007.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.
- PEREZ-GARCIA, G.; MENESES, A. Memory formation, amnesia, improved memory and reversed amnesia: 5-HT role. **Behavioural Brain Research**. v. 195, p.17–29, 2008.
- PIRATELLO, A.C.; MATTIOLI, R. Effects of Chlorpheniramine and L-histidine on vestibular compensation in goldfish, *Carassius auratus*. **Neuroscience Letters**, v. 367, p. 160-163, 2004.
- PORTER, P. J; LUNN, B. S; O'BRIEN, J. T. Effect of acute tryptophan depletion on cognitive function in Alzheimer disease and in the healthy elderly. **Psychol Med**. v. 33, p. 41–49, 2003.
- PRIVOU, C.; KNOCHÉ, A.; HASENÖHRL, R. U.; HUSTON, J. P. The H₁- and H₂- histamine blockers chlorpheniramine and ranitidine applied to the nucleus basalis magnocellularis region modulate anxiety and reinforcement related processes. **Neuropharmacology**. v.37, 1019-1032, 1998.
- RODGERS, R. J. Animal models of anxiety: where next? **Behav. Pharmacol.**, v. 8, p. 477-496, 1997.
- RODGERS, R. J., JOHNSON, N. 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.; JOHNSON, N. J. T.; CARR, J. , HODGSON, T. P. Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. **Behav. Brain Res.**, v. 86, p. 71-77, 1997.
- ROEDIGER, H. L.; MCDERMOTT, K.B. Distortions of memory. **University Press**. p. 149-162, 2000.
- ROSTAMI, P.; HAJIZADEH-MOGHADDAM, A.; ZARRINDAST, M. R. The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviours. **Physiology & Behavior**. v. 87, p.891–896, 2006.
- SANTOS, N. R.; HUSTON, J. P.; BRANDÃO, M. L. Blockade of histamine H₂ receptors of the periaqueductal gray and inferior colliculus induces fear-like behaviours. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**. v. 75 (1), p. 25-33, 2003.
- SERAFIM, K.R.; KISHI, M.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 43(1), p. 100-106, 2010.
- SHISHIDO, S.; OISHI, R.; SAEKI, K. In vivo effects of some histamine H₁-receptor antagonists on monoamine metabolism in the mouse brain. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. v.343(2), p. 185-9, 1991.

SPIELER, R. E.; NELSON, C. A.; HUSTON, J. P.; MATTIOLI, R. Post-trial administration of H₁ histamine receptor blocker improves appetitive reversal learning and memory in goldfish, *Carassius auratus*. **Neuroscience Lett**. v. 277, p. 5-8, 1999.

STEPHENS, D. N.; MELDRUM, B. S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C., GRUTZNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacol.**, v. 90, p. 166-169, 1986.

STRAKHOVA, M. I.; NIKKEL, A. L.; MANELLI, A. M.; HSIEH, G. C.; ESBENSHADE, T. A.; BRIONI, J. D.; BITNER, R. S. Localization of histamine H₄ receptors in the central nervous system of human and rat. **Brain Research**, v. 1250, p. 41-48, 2009.

TATSUMI, M.; GROSHAN, K.; BLAKELY, R. D.; RICHELSON, E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. **Eur J Pharmacol**. v. 340, p. 249–258, 1997.

TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.44, p. 463-469, 1993.

TULVING, E.; THOMSON, D.M. Encoding specificity and retrieval processes in episodic memory. **Psychol Rev.**, v. 80, p. 352–73, 1973.

WHITE, J. M.; RUMBOLD, G. R. Behavioural effects of histamine and its antagonists: a review. **Psychopharmacology**, 95: 1-14, 1988.

YOUNG, C.S.; MASON, R.; HILL, S. J. Inhibition by H₁-antihistamines of the uptake of noradrenaline and 5-HT into rat brain synaptosomes. **Biochem Pharmacol**. v. 37, p. 976–978, 1988.

ZARRINDAST, M. R.; TORABI, M.; ROSTAMI, P.; FAZLI-TABAEIS, S. The effects of histaminergic agents in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.** 85(3):500-6, 2006.