

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Fisioterapia
Laboratório de Neurociências

**A PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS
H4 NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL E NO
CONTROLE MOTOR EM CAMUNDONGOS.**

CARLOS EDUARDO MONICI FERNANDES

São Carlos
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Fisioterapia
Laboratório de Neurociências

**A PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS
H4 NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL E NO
CONTROLE MOTOR EM CAMUNDONGOS.**

Aluno: Carlos Eduardo Monici Fernandes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Mattioli

Coorientadora: Profa. Dra. Kelly Regina Serafim

São Carlos
2019

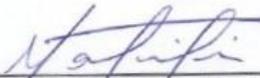


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

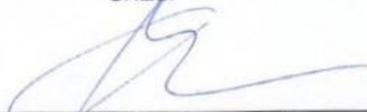
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Carlos Eduardo Monici Fernandes, realizada em 22/02/2019:



Prof. Dra. Rosana Mattioli
UFSCar



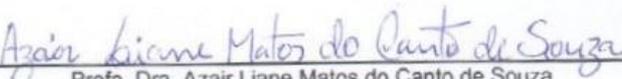
Prof. Dra. Flavia Roberta Faganello Navega
UNESP



Prof. Dr. João Eduardo de Araújo
USP



Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
UFSCar



Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
UFSCar

Dedico esta Tese à Deus, à minha família, aos meus amigos e aos professores que passaram por toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre com todos que amo e que nos momentos mais árduos, revela amor e misericórdia. Que o Senhor esteja sempre em meu coração, guiando os meus caminhos.

À minha vitoriosa e amada Mãe, pelo amor incondicional e por sempre acreditar em mim. À ti, digo: **A PROMESSA FOI CUMPRIDA!**

Às minhas Irmãs por estarem sempre comigo, demonstrando-me que juntos somos mais fortes.

Ao meu Pai, pela força e torcida contínua pelo meu melhor.

Às pessoas que caminharam ao meu lado durante minha vida, compartilhando todos os momentos.

À minha querida orientadora Dra. Rosana Matioli, pela paciência e dedicação ao longo desses anos. Obrigado por conceder-me esta jornada única.

À minha eterna orientadora Dra. Luciana Auxiliadora de Paula Vasconcelos, por iniciar-me nesta vida acadêmica.

Aos queridos colegas de laboratório: Carol, Bruna, Evelyn, Lucas, Fernanda e Tereza. Obrigado por tornarem parte do meu crescimento profissional e pessoal.

Aos queridos professores Dr. Thiago Luiz de Russo e Dr. João Paulo dos Santos Fernandes, por toda ajuda com o VUF-8430.

À Rosana Finoti Pupim Silva por ser tão solícita e atenciosa nos procedimentos de WB.

À querida Dra. Kelly Regina Serafim. Não tenho palavras para agradecer tudo que fizeste por mim ao longo desses anos. Tenho a absoluta certeza de que essa Tese jamais seria realizada sem a sua ajuda. MUITÍSSIMO obrigado por tudo.

Aos auxílios concedidos pela FAPESP (Processos 2015/22309-9 e 2015/15342-0), CNPq (Processo 303088/2014-1) e CAPES (Código de Financiamento 001).

“Aprendi que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser, e devo ter paciência. Mas, aprendi também, que posso ir além dos limites que eu próprio coloquei”.

Charles Chaplin

CONTEXTUALIZAÇÃO

Os experimentos do presente trabalho intitulado “A participação dos receptores histaminérgicos H4 na modulação da memória emocional e no controle motor em camundongos” foram desenvolvidos no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob a orientação da Profa. Dra. Rosana Mattioli. A análise histológica do presente trabalho foi realizada no Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia Molecular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, sob a coordenação do Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo. Os procedimentos de Imunohistoquímica foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza e da técnica de laboratório Rosana Finoti Pupim Silva. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFSCar. Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, Processos 2015/22309-9 e 2015/15342-0, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, Processo 303088/2014-1 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Evidências experimentais sugerem a participação do cerebelo em funções motoras e não motoras. Visto que recentes resultados demonstram a participação do sistema cerebelar histaminérgico na consolidação da memória, este trabalho investigou o efeito de microinjeções e o entendimento das bases moleculares do agonista histaminérgico H4 (VUF-8430) na consolidação da memória emocional em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo voltado à ansiedade (Experimento 1); à caixa de esquivas inibitória (EI), um modelo voltado ao medo (Experimento 2); no controle motor e na aprendizagem motora em camundongos submetidos ao rotarod (Experimento 3); e, na expressão proteica dos níveis séricos de CREB e CREB fosforilado através da técnica de *Western blotting* (Experimento 4). No quarto dia após a cirurgia de implantação da cânula-guia, para a realização dos Experimentos 1, 2 e 3, os animais receberam microinjeções intra-vérteis de salina (SAL) ou VUF (0,15 nmol; 0,49 nmol; e 1,48 nmol/0,1 µl) pós-exposição. Esses experimentos foram realizados em dois dias consecutivos. **Experimento 1:** foi realizado no LCE e, imediatamente após a exposição (T1), houve o tratamento farmacológico; no segundo dia de teste (T2), ocorreu apenas a reexposição ao LCE. A diminuição da atividade nos braços abertos (EBA e TBA) em T2 comparada à T1, permitiu inferir a aprendizagem e consolidação da memória emocional. **Experimento 2:** foi realizado na EI e o tratamento farmacológico ocorreu após o primeiro dia de teste (D1); no segundo dia de teste (D2), os animais foram apenas reexpostos à EI. O aumento ou a diminuição das latências de D2 comparado à D1, permitiu inferir a facilitação ou o déficit na aprendizagem e consolidação da memória emocional. **Experimento 3:** foi realizado no rotarod e os animais receberam o tratamento farmacológico imediatamente após a exposição (R1); no segundo dia de teste (R2), os animais foram apenas reexpostos ao aparato, caracterizando a aprendizagem motora. O aumento ou a diminuição das latências de R2 comparado à R1 permitiu inferir a facilitação ou déficit na consolidação da aprendizagem motora. **Experimento 4:** foi realizada a injeção sistêmica intraperitoneal (I.P.) do VUF-8430, na dose de 500 ng/kg, para investigar a expressão proteica através da fosforilação do fator de transcrição CREB, utilizando a técnica de *Western blotting*, no vérteis cerebelar e em estruturas clássicas vinculadas à memória emocional (córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo). **Resultados:** no Experimento 1, o VUF (0,49 nmol e 1,48 nmol) prejudicou a consolidação da memória emocional no LCE; no Experimento 2, o VUF (1,48 nmol) prejudicou a consolidação da memória emocional na EI; no Experimento 3, o VUF (0,49 nmol e 1,48 nmol) prejudicou a consolidação da aprendizagem motora no rotarod; e, no Experimento 4, houve uma diminuição da expressão proteica (CREB e pCREB) no vérteis cerebelar e no córtex pré-frontal de camundongos. **Conclusões:** a maior dose do VUF-8430 (1,48 nmol), microinjetada no vérteis cerebelar de camundongos, induziu um déficit na aprendizagem e consolidação da memória nos modelos utilizados no presente estudo (LCE, EI e rotarod). Além disso, a diminuição da expressão proteica no vérteis cerebelar verificada pelos níveis de CREB e pCREB ao injetar I.P. a dose mais alta do agonista histaminérgico dos receptores H4 (VUF-8430), pode corroborar os déficits encontrados, entretanto, há a necessidade de novos estudos para investigar o papel dos receptores histaminérgicos H4 no sistema nervoso central.

Palavras-chave: Sistema histaminérgico; memória emocional; consolidação; cerebelo; camundongos.

ABSTRACT

Experimental evidence suggests the participation of the cerebellum in motor and non-motor functions. Since recent results demonstrate the participation of the histaminergic cerebellar system in the consolidation of memory, this study investigated the effect and the understanding of the molecular bases of the histaminergic H4 agonist (VUF-8430) microinjection in the consolidation of emotional memory in mice submitted to the elevated plus maze (EPM) and the inhibitory avoidance task (IAT) as well as in motor control in mice submitted to the rotarod test. On the fourth day after surgical recovery from the procedure to implant a cannula, the animals received saline (SAL) or VUF (0.15 nmol; 0.49 nmol; e 1.48 nmol/0.1 μ l) administered post-exposure. Experiments 1, 2 and 3 were performed on two consecutive days: Exposure and 24h after, the re-exposure. **Experiment 1:** was held in the EPM and immediately post-T1, the pharmacologic treatment occurred; in T2, there were only re-exposure to EPM. The decrease in activity in the open arms (OAE and OAT) between T1 and T2, inferred the emotional memory. **Experiment 2:** was held in the IAT and the pharmacological treatment was post-D1; in D2, the animals were only re-exposed to the IAT. The increase or decrease of latencies in D2 compared to D1 inferred the emotional memory. **Experiment 3:** was held in the rotarod and the animals received the drug treatment post-R1; in R2, the animals were only re-exposed, featuring motor learning. The increase or decrease in R2 latencies compared to R1, inferred the motor learning. **Experiment 4:** VUF-8430 was I.P. injected at a dose of 500 ng/kg to investigate protein expression by phosphorylation of the CREB transcription factor, using the Western blotting technique, in the cerebellar vermis and in classic structures linked to emotional memory (prefrontal cortex, amygdala and hippocampus). **Results:** in Experiment 1, VUF (0.49 nmol and 1.48 nmol) impaired the consolidation of emotional memory in the EPM; in Experiment 2, VUF (1.48 nmol) impaired the consolidation of emotional memory in the IAT; in Experiment 3, VUF (0.49 nmol and 1.48 nmol) impaired the consolidation of motor learning in the rotarod; in Experiment 4, there was a decrease in protein expression (CREB and pCREB) in the cerebellar vermis and prefrontal cortex in mice. **Conclusions:** the highest dose of VUF-8430 (1.48 nmol), microinjected in the cerebellar vermis in mice, induced deficit in learning and memory consolidation in the models used in the present study (EPM, IAT and rotarod). In addition, the decrease in the protein expression in the cerebellar vermis verified by CREB and pCREB levels when injected I.P. the highest dose of the H4 receptor agonist (VUF-8430) can corroborate these deficits, however, there is a need for further studies to investigate the role of histamine H4 receptors in the central nervous system.

Keywords: Histaminergic system; emotional memory; consolidation; cerebellum; mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de sinalização clássica que levam à ativação de CREB	20
Figura 2. Vista dorsal do cerebelo de um ser humano, demonstrando a superfície cortical e os núcleos profundos em seu interior	23
Figura 3. Labirinto em cruz elevado (LCE)	35
Figura 4. Desenho experimental no LCE	36
Figura 5. Caixa de esquivas inibitória (EI)	38
Figura 6. Desenho experimental na EI.....	39
Figura 7. Rotarod para camundongos	40
Figura 8. Desenho experimental no rotarod para camundongos	41
Figura 9. Representação esquemática dos locais das microinjeções dentro do vérmis cerebelar dos camundongos e fotomicrografia do cerebelo de camundongo demonstrando um típico sítio de injeção.....	44

Figura 10. Efeitos das microinjeções intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) nas porcentagens de (A) entradas nos braços abertos (% EBA) e (B) tempo gasto nos braços abertos (% TBA) durante T1 e T2 no LCE.....	47
Figura 11. Efeitos das microinjeções intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) na consolidação da memória de Esquiva Inibitória	50
Figura 12. Efeitos das microinjeções intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) na consolidação da aprendizagem motora no teste do rotarod	52
Figura 13. Membranas representativas com as bandas de fluorescência da análise de Western blotting de tCREB, pCREB e α -tubulina no vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo em camundongos	54
Figura 14. Porcentagens dos valores de tCREB e pCREB em comparação ao grupo controle nas seguintes estruturas: vérmis cerebelar; córtex pré-frontal; amígdala; hipocampo	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais no LCE	32
Tabela 2. Grupos experimentais na EI	33
Tabela 3. Grupos experimentais no rotarod	33
Tabela 4. Grupos experimentais submetidos à técnica de <i>Western blotting</i>	34
Tabela 5. Efeitos das microinjeções intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol); a droga foi administrada pós-T1, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE	48

ANEXO

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.....	86
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

AMPC - Monofosfato cíclico de adenosina

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CPF - Córtex pré-frontal

CPFm - Córtex pré-frontal medial

CREB - Fator de transcrição celular

D1 - Primeiro dia de teste na esQUIVA inibitória

D2 - Segundo dia de teste na esQUIVA inibitória

EBA - Entradas nos braços abertos

% EBA - % entradas nos braços abertos

EBF - Entrada nos braços fechados

HA – Histamina

i.c.v. - Intracerebroventricular

I.P. - Intraperitoneal

LCE - Labirinto em cruz elevado

LTD - Depressão de Longa Duração

LTP - Potenciação de longa duração

NMDAR - Receptor de glutamato ionotrópico de NMDA

pCREB – Fator de transcrição celular CREB fosforilado

R1 - Primeiro dia de teste no rotarod

R2 - Segundo dia de teste no rotarod

SAL - Salina

SNH - Sistema neural histaminérgico

SNC - Sistema nervoso central

T1 - Primeiro dia de teste no labirinto em cruz elevado

T2 - Segundo dia de teste no labirinto em cruz elevado

TBA - Tempo nos braços abertos

%TBA - % tempo nos braços abertos

TBF - Tempo no braço fechado

TC - Tempo no centro

TE - Total de entradas

VGCCs - Canais de cálcio voltagem-dependentes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A memória.....	17
1.2	O cerebelo	22
1.3	O sistema neural histaminérgico.....	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODO	30
3.1	Sujeitos experimentais	30
3.2	Droga.....	30
3.3	Procedimento cirúrgico e microinjeção	31
3.4	Grupos experimentais	32
3.4.1	Experimento 1.....	32
3.4.2	Experimento 2.....	33
3.4.3	Experimento 3.....	33
3.4.4	Experimento 4.....	34
3.5	Equipamentos e procedimentos	35
3.5.1	Labirinto em cruz elevado (LCE)	35
3.5.2	Esquiva inibitória (EI)	37
3.5.3	Rotarod para camundongos	39
3.5.4	Ensaio de <i>Western blotting</i> para CREB e CREB fosforilado (pCREB).....	41
3.6	Histologia	43
3.7	Análise estatística	45

4	RESULTADOS	46
4.1	Experimento 1: Efeitos das microinjeções no vérmis cerebelar de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) nos comportamentos de camundongos expostos (T1) e reexpostos (T2) ao labirinto em cruz elevado (LCE).....	46
4.2	Experimento 2: Efeitos das microinjeções no vérmis cerebelar de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) na consolidação da memória em camundongos expostos (D1) e reexpostos (D2) à uma tarefa de esquiva inibitória (EI).....	49
4.3	Experimento 3: Efeitos das microinjeções no vérmis cerebelar de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) na consolidação da memória em camundongos expostos (R1) e reexpostos (R2) ao rotarod.....	51
4.4	Experimento 4: Efeitos das injeções de SAL (0,9 %) ou VUF-8430 (500 ng/kg) na expressão de CREB e pCREB no vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo, utilizando a técnica de <i>Western blotting</i>	53
5	DISCUSSÃO	56
5.1	Efeitos da administração intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) no labirinto em cruz elevado e na caixa de esquiva inibitória	56
5.2	Efeitos da administração intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) no rotarod	60
5.3	Efeitos da administração I.P. de SAL (0,9 %) ou VUF-8430 (500 ng/kg) na expressão de CREB e pCREB no vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo em camundongos	63
5.4	Discussão final.....	66
6	CONCLUSÃO	69
7	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 A memória

Os principais estágios de formação da memória passam por quatro fases que compreendem os processos de aquisição, consolidação/armazenamento, evocação e reconsolidação (Kandel et al., 2003; Kolb; Wishaw, 2002; Brewin, 2018). A fase de aquisição da memória refere-se ao período de tempo entre a percepção de estímulos provenientes de uma determinada experiência e o momento em que esses estímulos são codificados e memorizados (Hamann, 2001); assim, quanto maior o nível de atenção durante essa fase, maior será a probabilidade desse evento ser armazenado permanentemente (Kentros et al., 2004).

A fase de consolidação da memória é o processo pelo qual uma informação adquirida é estabilizada para ser armazenada como uma memória de longa duração, podendo estar sujeita à interferências farmacológicas e/ou comportamentais (Glaser et al., 2010). Para que essa informação recém-aprendida durante a fase de aquisição seja transformada em modificações estáveis durante a fase de consolidação, é necessário que ocorra a síntese proteica (Nakayama et al., 2013). Adicionalmente, a consolidação da memória pode ser modulada por fatores endógenos neuro-humorais característicos do animal, como a ansiedade e o nível de estresse (McGaugh, 2006; Roozendaal et al., 2009).

A fase de evocação da memória envolve uma reativação rápida das memórias que encontram-se latentes (Cammara et al., 2005). Entretanto, a reconstrução de experiências prévias pode ser influenciada por experiências emocionais no momento dessa evocação (Buchanan, 2007). Dudai e Eisenberg (2004) sugerem que evocações por um curto período de tempo podem induzir uma desestabilização de uma memória previamente consolidada,

entretanto, essa memória pode ser estabilizada posteriormente em um processo denominado reconsolidação; contudo, a reconsolidação pode ser mais difícil de ocorrer em memórias mais fortes e remotas, ou em indivíduos mais ansiosos (Brewin, 2018).

A fase de reconsolidação fundamenta-se na desestabilização da memória após sua reativação, deixando-a lábil e vulnerável, sujeita novamente à interferências e necessitando de um novo ciclo de consolidação para ser preservada (Nader; Einarsson, 2010). Adicionalmente, a reconsolidação permite a integração de novas informações no traço mnemônico original, culminado no fortalecimento ou enfraquecimento da mesma (Alberini; Ledoux, 2013).

Experimentalmente, a persistência de uma determinada memória vai depender de diferentes variáveis, tais como: a intensidade do treino e o número de repetições realizadas (Sierra et al., 2013). Os eventos emocionais apresentam um forte componente motivacional para que ocorram os processos da memória, alterando estratégias comportamentais em situações futuras (Ledoux, 2000). Portanto, o condicionamento do medo fornece uma forma de aprendizagem que transformará um estímulo inócuo, em um estímulo que antecipará uma determinada situação aversiva (Strata, 2015).

Um dos grandes achados que permitiu o entendimento dos mecanismos de formação da memória, foi a descoberta do processo eletrofisiológico conhecido como “potenciação de longa duração” (LTP). A LTP consiste no aumento persistente da resposta de neurônios à uma breve estimulação repetida de um axônio ou de um conjunto de axônios, permitindo uma diminuição no limiar de excitabilidade dessa célula nervosa, facilitando a sua ativação (Kandel et al., 2003).

Há um processo parecido, mas inibitório, denominado “depressão de longa duração” (LTD). Em comparação com a LTP, a LTD inibe a resposta neuronal (Stanton, 1996). Uma característica comum da LTP e da LTD é que podem ser medidos por horas, dias ou semanas. De fato, a duração dessas mudanças sugeriu que existe uma forte relação entre LTP, LTD e as memórias de longa duração (Teyler; Discenna, 1984). A LTP pode ser atribuído aos

mecanismos envolvidos na formação de memórias aversivas no cerebelo; já a LTD, pode ser correlacionada à aprendizagem motora (Zhu et al., 2007).

Uma das ferramentas utilizadas para o estudo dos processos da memória é a farmacologia. A administração de agentes farmacológicos após o treino, permitiu verificar a influência de certos compostos no processo de consolidação de uma tarefa (Izquierdo; McGaugh, 2000). Com resultados de estudos farmacológicos, conheceu-se diferentes classes de neurotransmissores, receptores, cascatas metabólicas e sistemas neuromodulatórios que atuam na consolidação da memória.

Sugere-se que a consolidação da memória seja dependente da síntese proteica e a sua inibição pode bloquear o surgimento de novas memórias (Kida et al., 2002). Em nível nuclear, a fosforilação ocorre em proteínas que participam dessa síntese, destacando-se a importância do fator de transcrição celular CREB, proteína ligante ao elemento responsivo monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), necessário para a formação da memória (Stevens, 1994; O'Connell et al., 2000). A expressão de CREB fosforilado (pCREB) é considerada a forma ativa de CREB e este processo ocorre devido à participação do AMPC (Peoples; Cavanaugh, 2003).

A expressão de CREB na formação e manutenção da memória tem sido extensivamente estudada, pois sugere-se que aja como mediador crucial de mudanças atividade-dependentes na expressão do gene alvo que, por sua vez, impõem modificações duradouras na estrutura e função dos neurônios (Belgacem; Borodinsky, 2017). O cálcio (Ca^{2+}) é um importante segundo mensageiro, implicado na transdução de inúmeras vias de sinalização, agindo na fisiologia do sistema nervoso central (Rosenberg; Spitzer, 2011). Segundo Brini e seus colaboradores (2014), aumentos na concentração de Ca^{2+} citosólico ocorrem através da despolarização de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (VGCCs) e canais de Ca^{2+} controlados por ligandos, tais como o receptor de glutamato ionotrópico de NMDA (NMDAR), que, após ligação de glutamato, permite o influxo de Ca^{2+} (Figura 1). Aumentos transitórios no Ca^{2+} são seguidos pelo

recrutamento de diferentes vias de sinalização, modificando assim, o status de ativação de CREB (Belgacem; Borodinsky, 2017). A sensibilização pelo Ca^{2+} da via intracelular Ras/MAPK estimula a fosforilação de CREB, promovendo a expressão gênica (Wu et al. 2001).

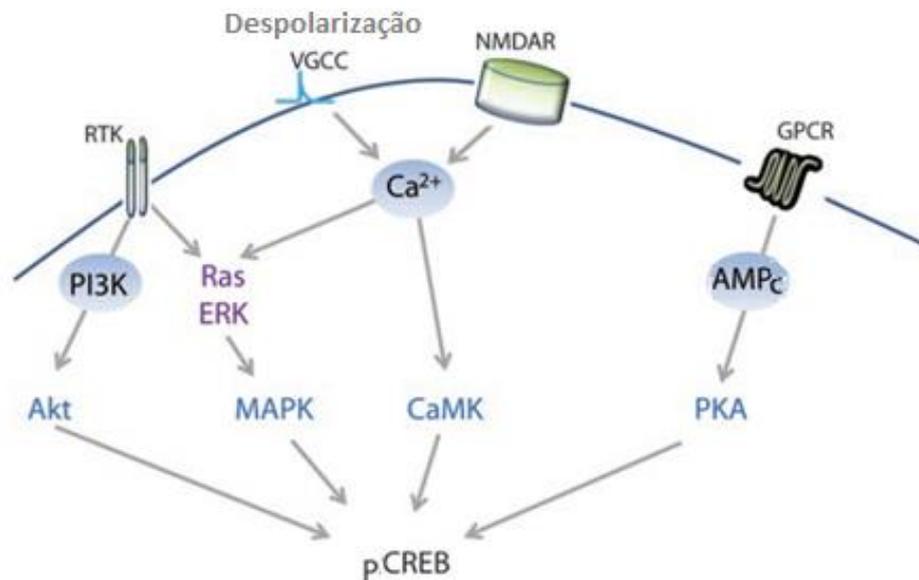


Figura 1: Vias de sinalização clássica que levam à ativação de CREB. A despolarização da membrana (canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, VGCC) e os receptores de glutamato (NMDAR) levam a elevações de Ca^{2+} citosólicos e nucleares, recrutando as vias de sinalização cAMK ou Ras/MAPK. Os receptores acoplados à proteína G (GPCR) ativam o eixo AMPc/PKA, enquanto os receptores Tirosina Quinases (RTKs) recrutam as cascatas de sinalização Ras/MAPK ou Akt, levando à fosforilação de CREB (pCREB) (adaptada de Belgacem; Borodinsky, 2017).

Na década de 1990, estudos envolvendo *Drosophila* e *Aplysia* mostraram a participação direta desse fator de transcrição na formação e plasticidade sináptica da memória (Yin et al., 1994; Bartsch et al., 1995). Um estudo de Benito e Barco (2010) mostrou que a expressão de CREB está envolvida em diversos tipos de memórias em roedores, tais como: aversiva, olfativa e espacial. A expressão de CREB, por meio da indução da expressão gênica, é um elemento chave na conversão da memória de curto em longo prazo e a diminuição da ação desse fator prejudica a LTP, e, conseqüentemente, a consolidação da memória (Pittenger et al., 2002), pois

uma das primeiras vias ativadas durante o processo de LTP é a via de transcrição de genes dependentes da expressão de CREB (Poser; Storm, 2001).

A fosforilação de CREB resulta na ativação da expressão gênica, demonstrando grande importância na regulação gênica para a expressão de adaptações neurais e a exposição repetida à substâncias psicoativas ou estímulos ambientais, como o estresse, pode promover alterações duradouras na expressão desses genes (Nestler 2005; 2008). Dessa forma, a ativação celular é necessária para que o indivíduo aumente a atenção à um determinado estímulo, ocasionando uma resposta molecular para a aprendizagem e memória (Peoples; Cavanaugh, 2003). Adicionalmente, a expressão do gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) interfere na expressão de pCREB, promovendo um importante papel na plasticidade sináptica e função cognitiva (Huang; Reichardt, 2001; Bitner, 2012), tornando-se assim, alvo de ativação de CREB (Tao et al., 1998), onde o seu produto proteico está envolvido no processamento da aprendizagem e da memória (Alonso et al., 2002; Bekinschtein et al., 2008).

Sugere-se que a expressão de CREB seja amplamente vista como um componente central para a integração de sinais convergentes, tanto intracelulares, quanto extracelulares (Kida et al., 2002). A regulação transcricional de genes relacionados à neuroplasticidade está particularmente associada à pCREB, correlacionando-se tanto com as medidas fisiológicas, quanto com as medidas comportamentais (Mayr; Montminy, 2001). Além disso, o aumento funcional da expressão de CREB pode aumentar a plasticidade associativa (Zhou et al., 2009), a excitabilidade da rede neural (Won; Silva, 2008) e a probabilidade de participação neuronal nos mais diversos tipos de memórias (Suzuki et al., 2011; Middei et al., 2012), enquanto que a sua atenuação genética e/ou farmacológica levará a comprometimentos dessa neuroplasticidade (Chen et al., 2010).

O papel das emoções sobre a memória, na modulação dos comportamentos emocionais, tem sido objeto de estudo em animais e, dessa forma, dentre as diversas regiões encefálicas

envolvidas com a modulação das emoções no processamento da memória, o cerebelo, mais especificamente o vérmis cerebelar, desperta grande interesse para o entendimento das bases neurobiológicas das emoções, aprendizagem e memória (Sacchetti et al., 2007; Gianlorenço et al., 2012).

1.2 O cerebelo

O cerebelo é um órgão do sistema nervoso supra-segmentar derivado da parte dorsal do metencéfalo. Localizado dorsalmente ao bulbo e a ponte, contribui para a formação do teto do IV ventrículo e, demonstrando toda a sua importância funcional, ocupa cerca de um quarto do volume craniano em um ser humano e consiste em uma estrutura globosa com dois hemisférios que apresentam dobraduras paralelas transversais denominadas folhas, que são separadas por fissuras (Machado, 2006). As fissuras prima e póstero-lateral dividem o cerebelo em três lobos anatomicamente distintos, denominados: lobo anterior, lobo posterior e lobo flóculo-nodular (Lent, 2005). Anatomicamente, ligando os hemisférios cerebelares, distingue-se no cerebelo uma porção impar e mediana denominada vérmis cerebelar (Machado, 2006). A Figura 2 mostra a superfície do cerebelo formada por um córtex cerebelar, constituído por três camadas, e uma substância branca onde alocam-se quatro núcleos profundos em cada hemisfério cerebelar: fastigial, interpostos (globoso e emboliforme) e denteado (Lent, 2005).

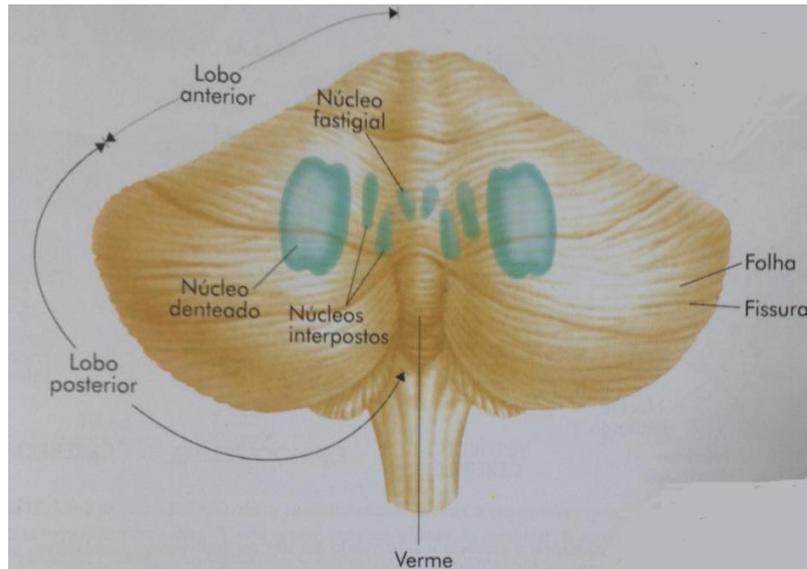


Figura 2: Vista dorsal do cerebelo de um ser humano, demonstrando a superfície cortical e os núcleos profundos em seu interior (Lent, 2005).

O cerebelo está envolvido no planejamento e na regulação do movimento, na avaliação e organização das informações sensoriais para a realização de uma determinada ação e na aprendizagem motora (Kandel et al., 2003; Manto et al., 2012). Nas últimas décadas, os estudos envolvendo imagens e modelos computacionais, corroboram as informações de que o cerebelo participa de funções motoras e não motoras, destacando a sua participação em funções cognitivas e nos processos emocionais (Koziol et al., 2014). Popa e seus colaboradores (2014) sugerem que a participação do cerebelo em funções motoras e não motoras relaciona-se à um modo comum de processamento das informações, sugerindo que o córtex cerebelar possui uma enorme capacidade para estabelecer associações entre diferentes sinais sensoriais, motores e não motores.

O controle motor sofre influência do lobo anterior do cerebelo, enquanto que o lobo posterior relaciona-se à cognição e o vermis cerebelar apresenta contribuição direta para o processamento afetivo em seres humanos (Schmahmann et al., 2007). O cerebelo está ligado as áreas corticais associativas dos hemisférios cerebrais, como as regiões pré-frontal, occipito-

parietal e temporal (Bugalho et al., 2006), além de uma ligação bidirecional com áreas envolvidas na regulação emocional (Middleton; Strick, 2001). Assim, o cerebelo é fortemente conectado ao sistema reticular e áreas límbicas, como a amígdala, o hipocampo e o núcleo septal (Schmahmann, 2018; Turner et al., 2007).

As lesões cerebelares, além de acarretarem déficits motores relacionados à diminuição do tônus muscular, perda de equilíbrio e coordenação, também acarretam déficits cognitivos relacionados à perda de funções executivas e modulações emocionais, aprendizagem, atenção, habilidades de linguagem e visuoespaciais, reforçando assim, a sua participação nos processos cognitivos, especificamente na aprendizagem e na memória (Schmahmann; Sherman, 1998; Barrios; Guardia, 2001; Gordon, 2007).

Evidências em animais e humanos sugerem o papel do cerebelo na percepção e reconhecimento das informações emocionais, bem como na experiência e regulação dos estados emocionais em relação aos comportamentos motor, cognitivo e social, participando da aprendizagem emocional, dor, aspectos emocionais da fala e nos transtornos do humor (Adamaszeck et al., 2017). Sacchetti e colaboradores (2002) sugeriram evidências para o envolvimento do cerebelo, especificamente o vérmis cerebelar, no medo condicionado, atribuindo o seu papel na consolidação da memória aversiva, o que poderia contribuir para a inibição do comportamento motor (*freezing*), ou para a sua facilitação (esquiva ou fuga).

Recentes publicações do nosso laboratório de pesquisa, sugerem que a histamina e seus receptores H1, H2 e H3 estão envolvidos na modulação dos processos de aprendizagem e memória em camundongos, destacando-se nas etapas de formação e recuperação da memória mediante diferentes tarefas, em estruturas como o cerebelo (Silva-Marques et al., 2016; Gianlorenço et al., 2015; Costa Neto et al., 2013), a amígdala (Fernandes et al., 2016; Serafim et al., 2016; Daher; Mattioli, 2015), o hipocampo (Canto-de-Souza et al., 2015) e o córtex pré-frontal medial (Canto-de-Souza; Mattioli, 2016).

1.3 O Sistema Neural Histaminérgico

Em estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório, encontramos diferentes efeitos da microinjeção de substâncias histaminérgicas em diferentes estruturas encefálicas em camundongos testados no labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste de esquiva inibitória (EI). Ações facilitatórias ou inibitórias para os receptores histaminérgicos podem ser explicadas em termos da complexidade das projeções neurais regionalizadas em sítios de histamina (HA) nas estruturas encefálicas, nas diferentes redes sinápticas e receptores presentes, e nas interações com outros sistemas neurotransmissores (Alvarez, 2009). Gianlorenço e colaboradores (2011) investigaram o efeito da microinjeção de HA no vérmis cerebelar em camundongos utilizando o LCE e demonstraram que o sistema neural histaminérgico (SNH) e o cerebelo estão envolvidos no processo de consolidação da memória emocional, através de uma inibição dose-dependente da histamina.

A HA é uma monoamina biogênica, encontrada no encéfalo da maioria das espécies animais e possui um importante papel na modulação da aprendizagem e da memória (Prell; Green, 1986). É sintetizada a partir da histidina pela enzima histidina descarboxilase, que irá converter o aminoácido histidina em histamina, através da descarboxilação oxidativa, sendo catabolizada no encéfalo através da telemetilhistamina pela enzima histamina N-metiltransferase (Lin et al., 1991).

Os neurônios histaminérgicos originam-se no núcleo tuberomamilar localizados na região posterior do hipotálamo, ramificando-se por todo o sistema nervoso central (Song et al., 2006; Alvarez, 2009), inervando o córtex cerebelar e seus núcleos profundos, desempenhando um importante papel como centro regulador da atividade cerebral (Wada et al., 1991). A ação dos efeitos biológicos da HA é mediada por pelo menos quatro tipos de receptores: H1, H2, H3 e H4 (Strakhova et al., 2009; Brown et al., 2001; Haas; Panula, 2003). A histamina é considerada um mediador químico que controla funções fisiológicas através da interação com

esses quatro subtipos de receptores histaminérgicos (Parsons; Ganellin, 2006). Evidências sugerem uma ligação entre a histamina, a aprendizagem e a memória, sendo que a HA e seus receptores estão envolvidos na modulação dos processos de aprendizagem e memória, destacando-se nas etapas de formação e recuperação da memória mediante diferentes tipos de tarefas (Benetti; Izquierdo, 2012).

Os receptores H1 têm significativa expressão no córtex cerebral, hipocampo, amígdala, tálamo, núcleo estriado e cerebelo. Além disso, a ativação dos receptores H1 regula as vias de sinalização intracelular e modula a plasticidade neural dos processos cognitivos como a aprendizagem e a memória (Lintunen et al., 1998). Esses receptores estão implicados ainda na aprendizagem espacial e formação da memória (Zlomuzica et al., 2009). Em um estudo de Gianlorenço e colaboradores (2010), o precursor histaminérgico LH, microinjetado no vérmis cerebelar, produziu efeito inibitório da memória emocional em camundongos submetidos ao LCE e o pré-tratamento com um antagonista dos receptores H1 (CPA), foi capaz de reverter esse efeito. Em mamíferos, a neurotransmissão histaminérgica é mediada pelos receptores H1 e H2 pós-sinápticos e os autoreceptores H3 pré-sinápticos, sendo que este último também atua como um heteroreceptor (Zlomuzica et al., 2009).

Os receptores H3 são expressos no cérebro de mamíferos, particularmente em regiões associadas à cognição, como o córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo, sendo que a ativação de autoreceptores H3 inibe a síntese e a liberação de histamina, enquanto que a ativação de heteroreceptores H3 inibe a liberação de neurotransmissores como a acetilcolina (ACh), noradrenalina e a dopamina (Foley et al., 2009).

Foley e seus colaboradores (2009), sugerem que estratégias estão sendo formuladas para o desenvolvimento de drogas antagonistas dos receptores H3 que aumentem a liberação de neurotransmissores envolvidos nos processos cognitivos, como a ACh, e os resultados sugerem

que o bloqueio da regulação da função histaminérgica desses receptores, pode aumentar os mecanismos de neuroplasticidade necessários para uma efetiva consolidação da memória.

Os receptores H4 foram identificados recentemente no SNC através da detecção do seu RNA mensageiro no cerebelo, amígdala, corpo caloso, córtex pré-frontal e tálamo, tanto em humanos, quanto em ratos (Strakhova et al., 2009) e camundongos (Connelly et al., 2009). Inicialmente, esses receptores foram identificados no sistema nervoso periférico, principalmente em células de origem hematopoiéticas (eosinófilos e mastócitos), tendo a sua função associada aos processos inflamatórios e alérgicos, sendo encontrados em alta densidade nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal, sugerindo uma possível função na mediação da nocicepção (Haas et al., 2008).

As bases biológicas do sistema neural histaminérgico e sua atuação no SNC apresentam grande importância na modulação dos processos de aprendizagem e memória. Em um estudo de Galeotti e seus colaboradores (2013) foi demonstrado que o agonista histaminérgico dos receptores H4 VUF-8430, microinjetado intracerebroventricular (i.c.v.) em camundongos, foi capaz de reverter o déficit na memória emocional induzido pela escopolamina (antagonista colinérgico muscarínico) na caixa de esquivas inibitória (EI). Ainda sobre o estudo de Galeotti et al. (2013), quando o VUF-8430 foi microinjetado *per se* não apresentou resultados na memória emocional na EI; entretanto, no mesmo estudo, mostrou um efeito ansiogênico na caixa claro-escuro e, quando utilizada a maior dose no teste do rotarod, os animais apresentaram um significativo déficit na coordenação motora, aumentando o número de quedas do aparato.

O VUF-8430 demonstra uma alta afinidade aos receptores H4 e foi caracterizado farmacologicamente apresentando uma indução quimiotáxica e, assim, ativando esses receptores de forma tão eficaz como a histamina (Lim et al., 2009b). Portanto, esse agonista histaminérgico pode ser uma importante ferramenta farmacológica para futuros estudos,

validando este receptor como um novo alvo para a utilização de novas drogas (Lim et al., 2009a).

O nosso grupo de pesquisa tem investigado a atuação do sistema histaminérgico cerebelar na memória emocional de camundongos através dos receptores H1 (Gianlorenço et al., 2012), H2 (Gianlorenço et al., 2013) e H3 (Costa Neto et al., 2013). Entretanto, a participação do receptor histaminérgico H4 no SNC continua pouco explorada na literatura por ter sido recentemente descoberta (Strakhova et al., 2009; Connelly et al., 2009).

Sabe-se que estudos experimentais ofertam importantes diretrizes clínicas, assim, o presente estudo, poderá auxiliar no esclarecimento do papel desses receptores no vérmis cerebelar em camundongos, bem como a sua relação com os processos de consolidação da memória emocional e atividade locomotora, uma vez que o presente estudo investigou se o agonista histaminérgico do receptor H4 (VUF-8430) apresenta efeito na consolidação da memória emocional e na aprendizagem locomotora de camundongos submetidos aos testes no labirinto em cruz elevado (LCE), na caixa de esquivas inibitória (EI) e no rotarod, bem como na ativação da expressão proteica no vérmis e em estruturas clássicas vinculadas a memória emocional (amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal), uma estrutura que recentemente teve o seu papel atribuído à memória emocional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atuação do sistema neural histaminérgico via receptores H4 na consolidação da memória emocional e no controle motor de camundongos via vérmis cerebelar, bem como na expressão proteica das seguintes estruturas: vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo.

2.2 Objetivos Específicos

- **Experimento 1:** Verificar os efeitos do agonista histaminérgico H4 (VUF-8430), microinjetado no vérmis cerebelar, sobre a ansiedade e consolidação da memória emocional de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado;
- **Experimento 2:** Verificar os efeitos do agonista histaminérgico H4 (VUF-8430), microinjetado no vérmis cerebelar, sobre o medo e consolidação da memória emocional de camundongos submetidos ao teste de esquiva inibitória;
- **Experimento 3:** Verificar os efeitos do agonista histaminérgico H4 (VUF-8430), microinjetado no vérmis cerebelar, sobre o controle motor de camundongos submetidos ao teste do rotarod.
- **Experimento 4:** Verificar se a injeção sistêmica do VUF-8430 ativa a expressão proteica no vérmis cerebelar e em estruturas clássicas vinculadas à memória emocional (córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo), através da fosforilação do fator de transcrição CREB utilizando a técnica de *Western blotting*.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados 180 camundongos suíços albinos, machos, experimentalmente ingênuos, alojados em grupos com cinco animais em gaiolas de polipropileno ($31 \times 20 \times 13$ cm), mantidos sob um ciclo de 12h de luz (luzes acesas às 7h), em ambiente controlado à temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de $50 \pm 5\%$, sob intensidade luminosa de aproximadamente 100 lux. Alimento e água potável foram fornecidos livremente, exceto durante os períodos de testes. As sessões experimentais foram realizadas na fase de luz do ciclo, entre 9h e 14h, minimizando a influência da variação do ritmo circadiano sobre as respostas comportamentais.

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos, protocolo nº 8336250515 (Anexo A) e estão em conformidade com as diretrizes brasileiras para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Droga

A droga utilizada foi a Dihidrobromida VUF-8430 {2-[(Aminoiminometil) aminoetil ácido carbamimidotioico ester, S-(2-guanidiletil)-isotiureia}, agonista dos receptores histaminérgicos H4 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO). Para os Experimentos 1, 2 e 3, foi microinjetada no vérmis cerebelar nas doses de 0,15 nmol, 0,49 nmol e 1,48 nmol, em um volume de 0,1 μl , adaptadas de um estudo prévio realizado por Galeotti et al. (2013). Para o

Experimento 4, foi injetada intraperitoneal na dose de 500 ng/kg, adaptada da dose de 1,48 nmol utilizada nos experimentos anteriores.

A droga foi dissolvida em solução salina estéril 0,9% (SAL) e mantida refrigerada em tubos *ependorfs* codificados para que o experimentador não tivesse conhecimento do seu conteúdo no momento do experimento e durante as análises das imagens gravadas. Os animais pertencentes aos grupos controles receberam solução salina com volume equivalente ao da droga.

3.3 Procedimento cirúrgico e microinjeção

Os animais receberam a implantação de uma cânula-guia (25 gauge) de 7 mm de comprimento 1 mm acima do vérmis cerebelar baseado nas coordenadas estereotáxicas definidas pelo Atlas de Franklin e Paxinos (2001), após anestesiados via intraperitoneal (I.P.) com solução de Cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), em um volume de 10 ml/kg, além da administração de anestesia local (3% de lidocaína com norepinefrina 1: 50.000). A cânula foi fixada no crânio com cimento acrílico (JET resina e líquido polimerizante); um mandril foi inserido no interior da cânula-guia para evitar a obstrução da mesma, reduzindo o risco de contaminação. O procedimento cirúrgico foi realizado em um aparelho estereotáxico (Stoelting Co, Illinois, USA) cujas coordenadas tiveram por base os valores: - 6,5 mm posterior ao bregma; e 2 mm ventral à superfície craniana (Franklin; Paxinos, 2001). A analgesia pós-operatória foi fornecida aos animais por 3 dias, adicionando acetaminofeno (200 mg/ml) na água potável em uma proporção de 0,2 ml de paracetamol para 250 ml de água (a concentração final foi de 0,16 mg/ml).

A agulha da microinjeção possuía 8 mm de comprimento (33 gauges) e foi inserida dentro da cânula-guia para a infusão da droga, sendo conectada, por meio de um tubo de

polietileno (PE-10) à microseringa Hamilton de 5 µl. Visando a completa recuperação dos animais, o procedimento das microinjeções ocorreram no quarto dia após a cirurgia, realizado imediatamente após a exposição dos camundongos no primeiro dia de teste e consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha, injeção da solução por 60 s, permanência da agulha por 30 s após o término da infusão e reinsertão do mandril. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar 0,1 µl de solução durante 60 s (Gianlorenço et al., 2011).

3.4 Grupos Experimentais

3.4.1 Experimento 1: Os animais receberam microinjeções de SAL (0,9 %) ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; e 1,48 nmol/0,1 µl) imediatamente após serem expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) no primeiro dia de teste (pós-T1).

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	LCE	SAL	—————	10
VUF 0,15nmol	LCE	VUF	0,15 nmol	10
VUF 0,49nmol	LCE	VUF	0,49 nmol	10
VUF 1,48nmol	LCE	VUF	1,48 nmol	10

Tabela 1. Grupos experimentais no LCE.

3.4.2 Experimento 2: Os animais receberam microinjeções de SAL (0,9 %) ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; e 1,48 nmol/0,1 µl) imediatamente após serem expostos à caixa de esQUIVA inibitória (EI) no primeiro dia de teste (pós-D1).

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	EI	SAL	-----	10
VUF 0,15 nmol	EI	VUF	0,15 nmol	12
VUF 0,49 nmol	EI	VUF	0,49 nmol	12
VUF 1,48 nmol	EI	VUF	1,48 nmol	12

Tabela 2. Grupos experimentais na EI.

3.4.3 Experimento 3: Os animais receberam microinjeções de SAL (0,9 %) ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; e 1,48 nmol/0,1 µl) imediatamente após serem expostos ao rotarod no primeiro dia de teste (pós-R1).

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	Rotarod	SAL	-----	10
VUF 0,15 nmol	Rotarod	VUF	0,15 nmol	11
VUF 0,49 nmol	Rotarod	VUF	0,49 nmol	12
VUF 1,48 nmol	Rotarod	VUF	1,48 nmol	11

Tabela 3. Grupos experimentais no rotarod.

3.4.4 Experimento 4: Os animais receberam injeções de SAL (0,9 %) ou VUF-8430 (500 ng/kg) administradas de forma intraperitoneal (I.P.) e a dose foi baseada em estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório. Após 2 h, os animais tiveram os seus encéfalos removidos e as amostras foram armazenadas para a realização da técnica de *Western blotting*. Para essa análise foram utilizados 5 animais por grupo em cada estrutura encefálica: vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo. Foi utilizado um grupo controle (SAL) diferente para cada estrutura supracitada.

Grupos	Tratamento	Dose	N
SAL	SAL	500 ng/kg	5
Vérmis cerebelar	VUF	500 ng/kg	5
SAL	SAL	500 ng/kg	5
Córtex pré-frontal	VUF	500 ng/kg	5
SAL	SAL	500 ng/kg	5
Amígdala	VUF	500 ng/kg	5
SAL	SAL	500 ng/kg	5
Hipocampo	VUF	500 ng/kg	5

Tabela 4. Grupos experimentais submetidos à técnica de *Western blotting*.

3.5 Equipamentos e procedimentos

Os animais foram transportados para o local do experimento, onde permaneceram por 1 hora antes do teste para a adaptação dos mesmos ao ambiente. Imediatamente após a realização do teste no primeiro dia, os camundongos receberam as microinjeções.

3.5.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é constituído de acrílico e possui dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 0,25 cm) com as paredes de acrílico em cinza, conectados a uma plataforma comum central (5 x 5 cm), elevado 38,5 cm do nível do chão (Figura 3). Classicamente, o LCE avalia a ansiedade, pois o comportamento dos animais associado aos componentes emocionais durante o teste, expressam o conflito entre a motivação para explorar o labirinto e a tendência natural para evitar espaços abertos, comportamento inerente em roedores (Lister, 1990).



Figura 3: Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

Além disso, este modelo também foi proposto para avaliar a memória emocional. Carobrez e Bertoglio (2005) sugeriram que a utilização do LCE fosse estendida para a compreensão das bases biológicas dos componentes emocionais relacionados à aprendizagem e memória. Portanto, a ansiedade pode ser inferida pela atividade nos braços abertos durante a exposição e a aprendizagem e memória podem ser inferidas através da redução da exploração dos braços abertos (entradas e tempo gasto nos braços abertos) durante a reexposição (File, 1993; Dal-Col et al., 2003). Um estudo de Galvis-Alonso e colaboradores (2010) sugeriu que, durante o teste, os animais adquirem informações sobre áreas seguras e perigosas do labirinto e o uso de reexposição permite inferir a aquisição, consolidação e retenção da memória emocional.

No LCE, os animais foram colocados individualmente na plataforma central do labirinto, com a face voltada para o braço aberto, explorando-o por 5 min., caracterizando o primeiro dia de teste (T1). Assim que o animal terminasse a exploração em T1, o mesmo recebia o tratamento farmacológico. Após vinte e quatro horas, os camundongos foram reexpostos ao labirinto sob as mesmas condições experimentais, entretanto sem o tratamento farmacológico, caracterizando T2, o segundo dia de teste (Figura 4). No intervalo entre a troca dos animais, o labirinto foi limpo com álcool 5%.

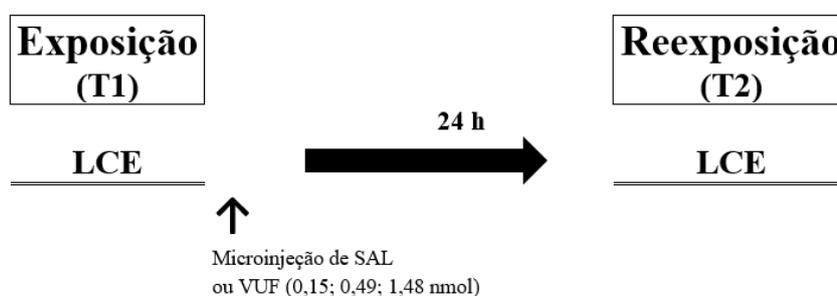


Figura 4: Desenho experimental no LCE.

Todas as sessões foram filmadas por uma câmera digital ligada a um computador em uma sala adjacente, para análises posteriores dos camundongos utilizando o software X-Plot-Rat 3.0 (Becerra-Garcia et al., 2005), considerando: frequência de entradas nos braços abertos (EBA, definida quando as quatro patas dos animais estiverem fora da área central) e nos braços fechados (EBF); duração do tempo despendido nestes compartimentos aberto e fechado (TBA e TBF) e na plataforma central (TC). Estes dados foram utilizados para o cálculo das porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos (Entradas: $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$; Tempo: $[\text{tempo no compartimento}/300] \times 100$).

Durante a reexposição ao labirinto (T2), a diminuição da atividade nos braços abertos (entradas e tempo gasto) foi definida como índice de aprendizagem e memória (Cruz et al., 1994). A atividade locomotora foi avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (Rodgers et al., 1997).

3.5.2 Esquiva Inibitória (EI)

Para a EI, foi utilizada a caixa claro-escuro composta por uma arena em acrílico (46 x 27 x 30 cm) dividida em dois compartimentos: um menor (15 x 27 x 30 cm), preto e dotado de tampa, e, um maior (31 x 27 x 30 cm), branco e iluminado por uma lâmpada fluorescente fria de 20 W (Figura 5). Os dois compartimentos são separados por uma porta guilhotina preta de 27 x 30 cm (base x altura), com uma abertura de 7 x 7 cm localizada no centro da divisão, ao nível do chão. O piso é constituído por barras de aço inoxidável (2,5 mm de diâmetro) distanciadas 1 cm entre si, liberando choques elétricos com intensidade de 0,5 mA, por 3s.



Figura 5: Caixa de esquia inibitória (EI).

Os testes na EI foram realizados em dois dias consecutivos (Fine et al., 1985; Page et al., 1991). No intervalo entre a troca dos animais, a caixa foi limpa com álcool 5%. No primeiro dia de teste (D1), cada animal foi transportado individualmente até a caixa claro-escuro, sendo posicionado no centro da parte iluminada por 5 s. Então, a porta guilhotina abria automaticamente e o tempo de latência para o animal atravessar para o compartimento escuro foi medido. Depois que o animal atravessou com as quatro patas para o compartimento escuro, a porta guilhotina foi fechada e o animal retirado do aparato. Após 30 min. desta habituação, foi realizado o treino de aquisição. Nessa sessão, imediatamente após o animal entrar no compartimento escuro, a porta guilhotina foi fechada e ocorreram choques em suas patas (0,5 mA, por 3 s). Após 20 s, o animal foi removido do aparato e colocado em sua caixa. Após 2 min., o animal foi testado seguindo o mesmo procedimento. Caso não atravessasse para o compartimento escuro em até 120 s, indicaria que a aquisição da resposta de esquia foi obtida e se entrasse no compartimento escuro, a porta fechava e o mesmo choque era liberado. Após o término do teste em D1, os animais receberam o tratamento farmacológico (Figura 6).

Após vinte e quatro horas, foi realizado um teste de retenção (D2) para avaliar se as informações adquiridas foram consolidadas. Os animais foram submetidos às mesmas condições do treino realizado em D1, mas sem que houvesse o choque elétrico. A sessão encerrava-se quando o animal entrava no compartimento escuro ou após 5 min. Não houve tratamento farmacológico em D2 (Figura 6). O aumento ou a diminuição das latências foram considerados indicativos de aumento ou redução na consolidação da memória, respectivamente. Os experimentos foram gravados e as latências quantificadas pelo pesquisador.

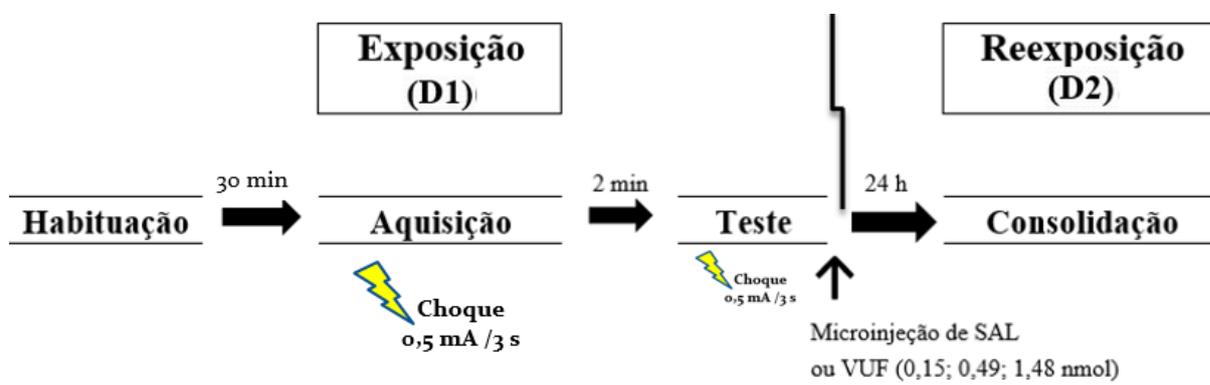


Figura 6: Desenho experimental na EI.

3.5.3 Rotarod para camundongos

O rotarod para camundongos (Master One CM 5000) é um equipamento confeccionado em acrílico, cujas medidas são: 450 x 540 x 350 mm (A x L x C). Contém um cilindro rotatório motorizado com aceleração progressiva, podendo variar de 0 a 54 r.p.m. com raio de espaço de aproximadamente 2,7 cm (Figura 7). O aparelho possui cinco baias com espaço de 3 cm para cada camundongo, de modo que até cinco animais possam ser avaliados por vez e um sistema de detecção de queda através de impacto com circuito microprocessado para a cronometragem de permanência na baia e contagem de queda dos animais. A latência para queda dos animais

foi medida automaticamente através de um sensor localizado no chão do aparato, parando imediatamente o cronometro quando o animal caía.



Figura 7: Rotarod para camundongos.

Os testes no rotarod foram realizados em dois dias consecutivos (R1 e R2). Os camundongos caminharam continuamente sobre o cilindro em rotação para evitar a queda. Em R1, os animais foram inicialmente mantidos sobre os cilindros por 5 min. para o período de habituação ao aparato. Quinze minutos após essa habituação, os camundongos foram novamente colocados no rotarod com velocidade de rotação progressiva e invariável entre 7 r.p.m. e 16 r.p.m. por 5 min. ou até que ocorresse a queda do animal (adaptado de Galeotti et al., 2013), verificando o controle motor dos camundongos. Após o término de R1, os animais receberam o tratamento farmacológico. Em R2, os animais foram apenas reexpostos sob as mesmas condições experimentais de R1, sem que houvessem as microinjeções, caracterizando

a aprendizagem motora (Figura 8). O aumento ou a diminuição das latências foram considerados indicativos de aumento ou redução na consolidação da aprendizagem motora, respectivamente. No intervalo entre a troca dos animais, o cilindro foi limpo com álcool 5%.

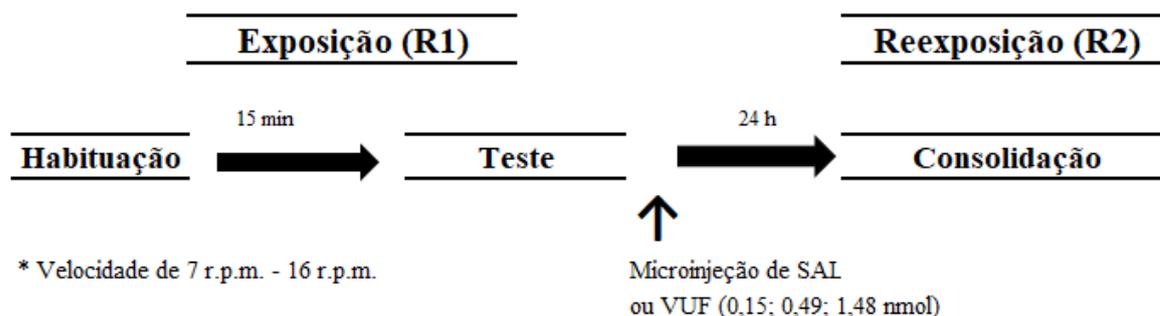


Figura 8: Desenho experimental no Rotarod para camundongos.

3.5.4 Ensaio de *Western blotting* para CREB e CREB fosforilado (pCREB)

Nesse experimento, foi investigado se a injeção I.P. do agonista histaminérgico H4 VUF-8430, na dose de 500 ng/kg (adaptada da dose de 1,48 nmol utilizada nos Experimentos 1, 2 e 3), aumenta a síntese proteica, necessária em processos de consolidação da memória, ativando a fosforilação do fator de transcrição CREB, no vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo, utilizando a técnica de *Western blotting*.

Os animais foram decapitados após 2 h do procedimento de injeção I.P. de SAL ou VUF-8430 (500 ng/kg). Os encéfalos foram retirados e congelados em isopropano (-50°C) e armazenados até a sua dissecação, realizada em criostato sob temperatura de -20°C, seguindo as coordenadas estereotáxicas do Atlas de Franklin e Paxinos (2001).

Extratos proteicos nucleares do vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo foram solubilizados em tampão de amostra (Tris base 0,125M; SDS 4%; glicerol 20% v/v; DTT 0,2 M; azul de bromofenol 0,02%; pH 6,8), na concentração de 10 µg /15 µl por

poço, e fervidos por 5 min. a 95°C. As frações proteicas foram submetidas à eletroforese por 80 min. a 130 V em gel de SDS-poliacrilamida 12% (Acrilamida/Bisacrilamida 29:1, 10% SDS). Ao final da separação, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose imersa em tampão de transferência (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 10%) (1 h, a 110 V). As membranas foram coradas com solução de Azul de Coomassie (1% de Azul de Coomassie; 10% ácido acético; 50% metanol) por 1 min. e lavadas em solução descorante (5% ácido acético; 40% metanol), por 2 min. sob agitação (verificação da eficiência do procedimento de transferência). Após a retirada da solução corante, as membranas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente em solução bloqueadora TTBS (Tris base: 10 mM; NaCl 150 mM) acrescida de 5% de leite desnatado e 0,05% de Tween 20, para bloquear as ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram lavadas em solução TTBS (TBS; Tween 20 0,05%) e incubadas com o anticorpo primário anti-CREB-1 (1:1000, Santa Cruz, Biotechnology) ou anti-pCREB (1:750, Millipore) diluídos em TTBS acrescido de leite desnatado 3%, *overnight* a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra e conjugado à peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc, Baltimore Pike, PA, EUA) por 1 h em temperatura ambiente e sob agitação constante. A revelação destas membranas foi realizada através do kit de quimioluminescência ECL-Amersham. Para essa finalidade, foi realizado banho das membranas em ELC por 1 min. e exposição das mesmas ao filme sensível à ECL (Thermo Fisher Scientific) nos tempos adequados para cada anticorpo.

A verificação se houve variação na quantidade de proteína aplicada ao gel foi feita através da detecção de α -tubulina. As membranas foram inicialmente submetidas ao banho com solução de ácido acético 5% por 10 min., seguido da lavagem por 3x / 10 min. em TTBS sob agitação constante. Posteriormente, foi realizado o bloqueio em TTBS acrescido de leite desnatado 5% e posterior incubação com anticorpo anti-camundongo monoclonal α -tubulina

(1:10.000, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), seguido da incubação com anticorpo secundário anti-camundongo produzido em carneiro e conjugado à peroxidase (1:600, GE Healthcare Life Sciences).

As autorradiografias foram escaneadas em modo transparência e a intensidade das bandas foi quantificada pelo programa Image-Master (Amersham Pharmacia Biotech). A análise dos níveis de CREB e CREB fosforilado (pCREB) foi feita a partir da normalização dos valores obtidos de cada banda pela sua respectiva leitura para α -tubulina. Foi obtido o valor da relação pCREB/CREB e esses valores foram expressos em porcentagem de aumento em relação ao grupo controle (equivalente a 100% de ligação).

3.6 Histologia

Ao final dos Experimentos 1, 2 e 3 foram realizadas as análises histológicas dos encéfalos de todos os animais submetidos aos testes. Após receberem uma dose profunda do anestésico com solução de cloridrato de ketamina e xilasina, os animais foram sacrificados e receberam microinjeções de 0,1 μ l de solução de 1% de azul de metileno, conforme procedimento descrito para sua infusão da droga; após serem decapitados, os animais tiveram seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) ao menos por três dias. Dois dias antes das secções, os encéfalos permaneceram em solução de sacarose (20%), em refrigeração por 24h e posteriormente, a solução de sacarose foi trocada para (30%), também mantida em refrigeração por 24h. Foram realizadas secções coronais de 60 μ m ao longo do trajeto da cânula, utilizando um micrótomo criostato (ANCAP 300). As secções foram inspecionadas por microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno no trajeto da cânula indicou o local do sitio das microinjeções. Foram

excluídos os animais cuja microinjeção não infundiu o vérmis cerebelar ou aqueles que apresentaram algum tipo de intercorrência na cirurgia ou durante os testes.

A Figura 9 consiste em uma representação esquemática dos sítios das microinjeções no vérmis cerebelar dos camundongos utilizados nos Experimentos 1, 2 e 3. Foram utilizados 130 animais para as análises dos dados, sendo 40 animais no Experimento 1, 46 animais no Experimento 2 e 44 animais no Experimento 3.

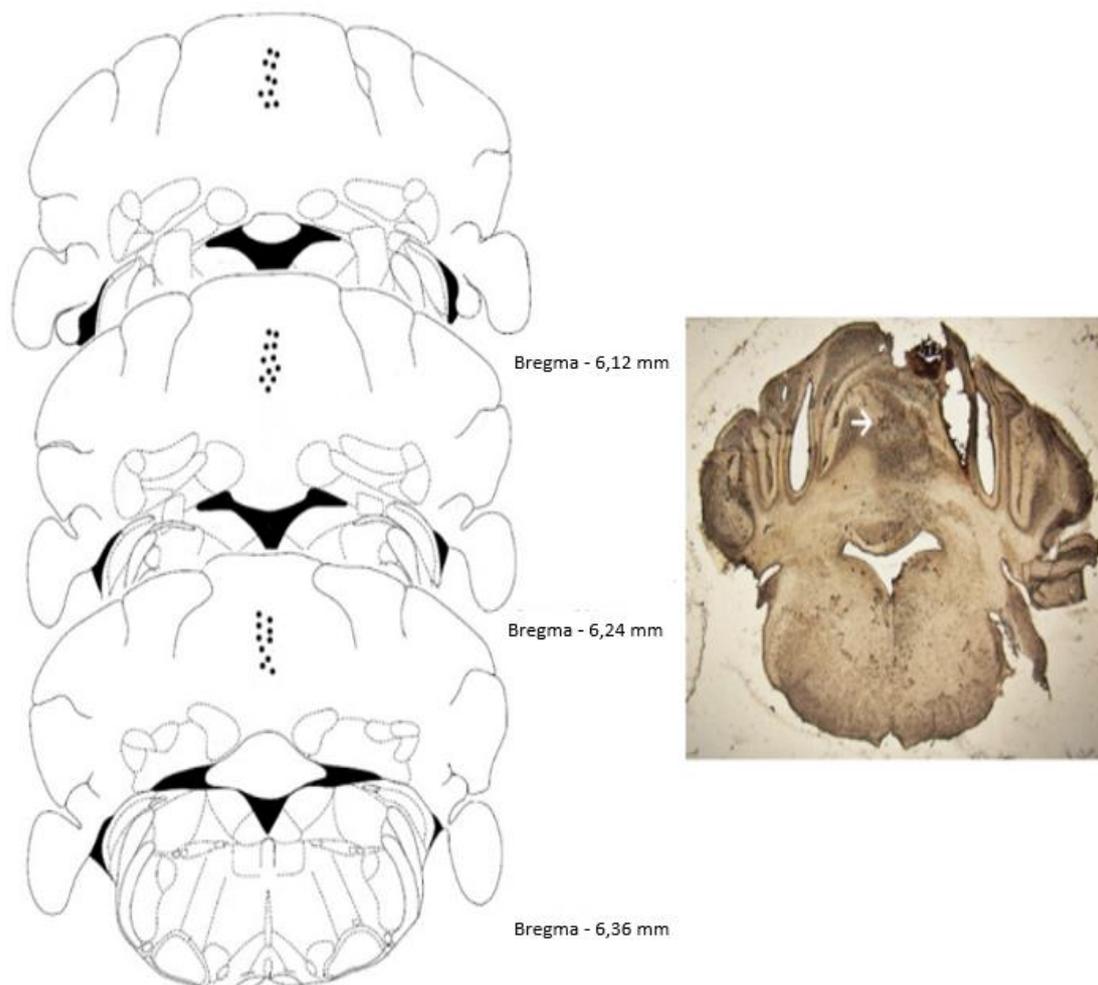


Figura 9: Representação esquemática dos locais das microinjeções dentro do vérmis cerebelar dos camundongos e fotomicrografia do cerebelo de camundongo demonstrando um típico sítio de injeção (indicado pela seta). Os cortes estão entre -6,12mm e -6,36mm do bregma de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (2001). O número de pontos é menor do que o total de camundongos utilizados devido à sobreposição.

3.7 Análise estatística

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade. Para os Experimentos 1, 2 e 3, os dados comportamentais foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma via. Para valores de F significativo, foi efetuado o teste *post-hoc* Duncan para comparações múltiplas. Para o Experimento 4, foi realizado o teste *t-Student* para análise entre dois grupos independentes, um grupo controle (SAL) e um grupo tratado (VUF). O nível de significância adotado foi o de $p < 0,05$. As análises foram realizadas através do software Statistica 8.0 (Stat Soft. Inc).

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Efeitos das microinjeções no vérmis cerebelar de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) nos comportamentos de camundongos expostos (T1) e reexpostos (T2) ao labirinto em cruz elevado (LCE)

Quarenta animais foram utilizados no primeiro experimento (ver Tabela 1). A ANOVA de uma via não indicou diferença significativa entre os animais expostos ao LCE sem tratamento para todas as medidas avaliadas, o que permitiu utilizar os resultados de T1 como *Pool* (Figura 10 AB e Tabela 5). A Figura 10 AB e a Tabela 5 mostram os efeitos das microinjeções de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) no vérmis cerebelar pós-T1, nos comportamentos emocionais de camundongos.

A ANOVA mostrou diferença significativa na % EBA entre os dias de teste [$F_{(3,36)} = 49,00$, $p < 0,001$]. A análise *post hoc* Duncan indicou que houve uma redução na % EBA para os grupos que foram microinjetados com SAL e VUF 0,15 nmol em T2 comparado à T1 (*Pool*). Além disso, houve um aumento na % EBA para os grupos VUF 0,49 nmol e VUF 1,48 nmol em comparação com o grupo SAL em T2 (Figura 10A). Em relação à % TBA, houveram diferenças significativas em todos os grupos [$F_{(3,36)} = 43,71$, $p < 0,001$]. O teste de Duncan indicou que houve uma diminuição na % TBA para os animais microinjetados dos grupos SAL e VUF 0,15 nmol e um aumento na % TBA para os animais dos grupos VUF 0,49 nmol e VUF 1,48 nmol em T2 comparado à T1. Além disso, os grupos VUF 0,49 nmol e VUF 1,48 nmol aumentaram a % TBA em relação ao grupo SAL em T2 (Figura 10B).

A Tabela 5 mostra todos os resultados dos comportamentos etológicos dos animais avaliados no Experimento 1. A ANOVA revelou diferenças significativas no TBA [$F_{(3,36)} =$

42,63, $p < 0,001$), EBA [$F_{(3,36)} = 75,54$, $p < 0,001$], TBF [$F_{(3,36)} = 14,88$, $p < 0,0001$], TE [$F_{(3,36)} = 13,09$, $p < 0,0001$] e TC [$F_{(3,36)} = 3,47$, $p < 0,01$]. Além disso, a ANOVA não indicou diferenças na EBF [$F_{(3,36)} = 2,38$, $p > 0,05$] e no tempo de imobilidade dos animais [$F_{(3,36)} = 0,49$, $p > 0,05$].

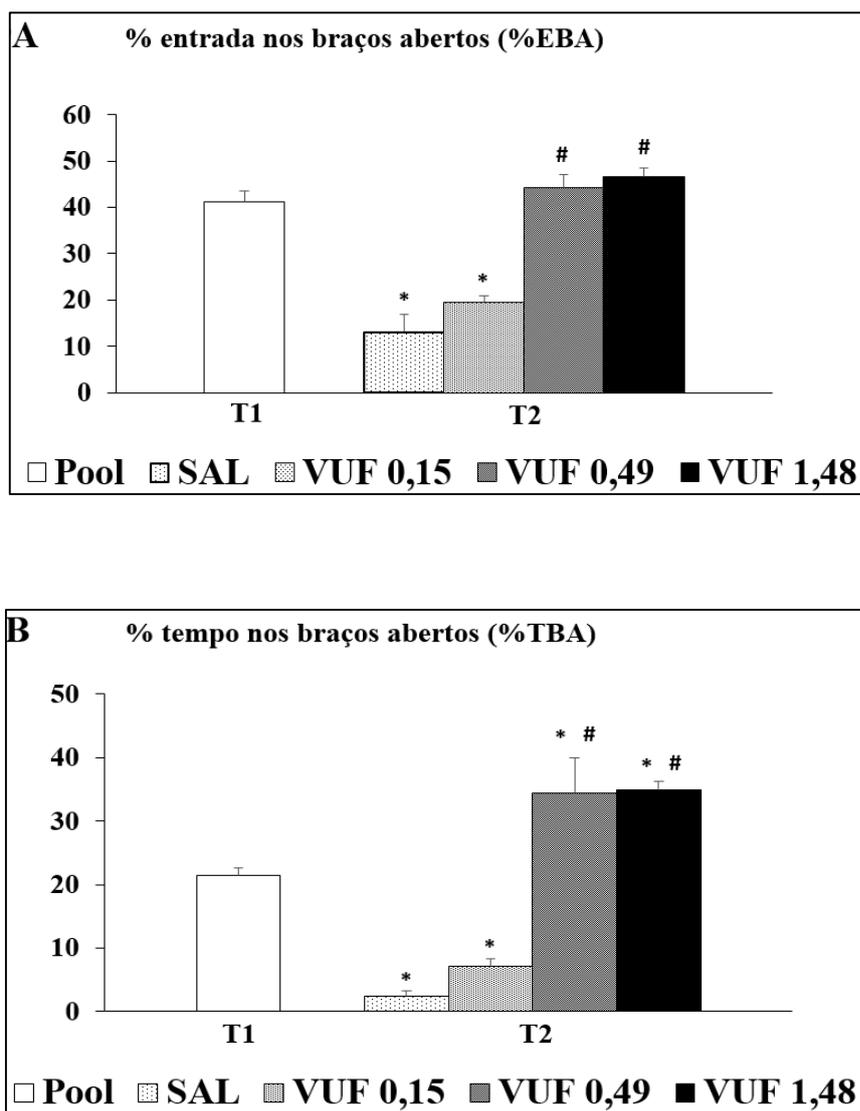


Figura 10: Efeitos das microinjeções intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) nas porcentagens de (A) entradas nos braços abertos (% EBA) e (B) tempo gasto nos braços abertos (% TBA) durante T1 e T2 no LCE. A droga foi administrada pós-T1. Grupos: SAL (n = 10); VUF 0,15nmol (n= 10); VUF 0,49 nmol (n = 10); e VUF 1,48 nmol (n = 10).

* $p < 0,05$ em relação à T1 (Pool); # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (SAL) em T2 (ANOVA, seguida do teste *post hoc* de Duncan).

Tabela 5: Efeitos das microinjeções intra-vérteis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol); a droga foi administrada pós-T1, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.

Comportamentos	T1	T2			
	Pool	SAL	VUF 0,15 nmol	VUF 0,49 nmol	VUF 1,48 nmol
TE	12,90 ± 0,59	10,20 ± 0,95*	11,90 ± 1,73	14,60 ± 1,40#	19,40 ± 0,86*#
EBF	8,65 ± 0,54	8,80 ± 0,88	9,70 ± 1,48	8,20 ± 0,99	10,50 ± 0,82
EBA	5,25 ± 0,33	1,40 ± 0,27*	2,20 ± 0,29*	6,00 ± 0,61#	8,90 ± 0,23*#
TBA	68,44 ± 3,60	11,57 ± 2,70*	21,47 ± 3,73*	103,07 ± 16,82*#	104,74 ± 4,05*#
TBF	158,91 ± 5,69	216,81 ± 18,18*	217,16 ± 7,53*	156,69 ± 11,73#	147,70 ± 3,24#
TC	72,81 ± 5,83	71,63 ± 16,26	61,37 ± 5,81	40,25 ± 6,05*#	47,56 ± 4,82#
Imobilidade	0,00 ± 0,20	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10

Valores representam as Médias ± Erro Padrão. **TE** = total de entradas; **EBF** = entradas nos braços fechados; **EBA** = entradas nos braços abertos; **TBA** = tempo gasto nos braços abertos; **TBF** = tempo gasto nos braços fechados; **TC** = tempo gasto na área central; **Imobilidade** = tempo de imobilidade dos animais.

* $p < 0,05$ em relação à T1 (Pool); # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (SAL) em T2 (ANOVA, seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.2 Experimento 2: Efeitos das microinjeções no vérmis cerebelar de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) na consolidação da memória em camundongos expostos (D1) e reexpostos (D2) à uma tarefa de esquiva inibitória (EI)

Quarenta e seis animais foram utilizados no segundo experimento (ver Tabela 2). A ANOVA de uma via não indicou diferença significativa entre os animais expostos à EI sem tratamento, o que permitiu utilizar os resultados do primeiro dia de teste (D1) como *Pool* (Figura 11).

Os resultados mostram os efeitos da microinjeção de VUF-8430 no vérmis cerebelar de camundongos submetidos ao Teste de Esquiva Inibitória. A ANOVA de uma via indicou diferença entre os dias de teste [$F_{(3,42)} = 6,02, p < 0,0002$] e o teste de Duncan revelou um aumento significativo na latência de retenção em comparação ao registrado em D1 (*Pool*) para os animais que receberam salina (SAL) e VUF (0,15 nmol e 0,49 nmol). Além disso, houve diferença significativa entre os grupos em D2 ($p < 0,0002$) e o teste *post hoc* Duncan indicou uma diminuição da latência de retenção para o grupo VUF 1,48 nmol em comparação com o grupo controle que recebeu SAL (Figura 11).

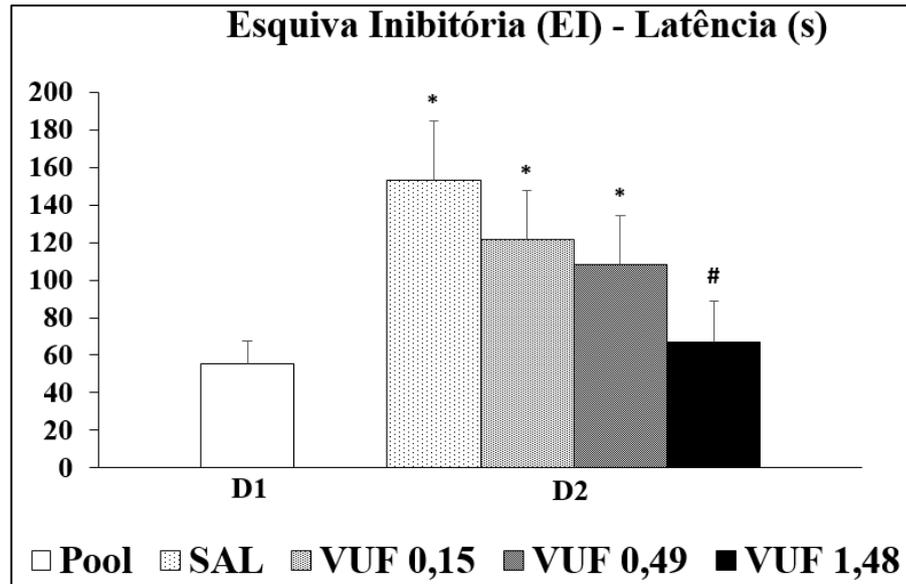


Figura 11: Efeitos das microinjeções intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) na consolidação da memória de Esquiva Inibitória. SAL (n = 10), VUF 0,15nmol (n = 12), VUF 0,49nmol (n = 12) e VUF 1,48nmol (n = 12). Médias e erro padrão da média para o tempo de latência [segundos (s)].

* $p < 0,05$ em relação à D1 (Pool); # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (SAL) em D2 (ANOVA, seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.3 Experimento 3: Efeitos das microinjeções no vérmis cerebelar de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) na consolidação da memória em camundongos expostos (R1) e reexpostos (R2) ao rotarod

Quarenta e quatro animais foram utilizados no terceiro experimento (ver Tabela 3). A ANOVA de uma via não indicou diferença significativa entre os animais expostos ao rotarod sem tratamento, o que permitiu utilizar os resultados de R1 como *Pool* (Figura 12).

A ANOVA de uma via indicou diferença entre os dias de teste [$F_{(3,40)} = 3,51, p < 0,01$] e o teste de Duncan revelou um aumento significativo na latência de retenção em comparação ao registrado em R1 (*Pool*) para os animais que receberam salina (SAL). Além disso, houve diferença significativa entre os grupos em D2 ($p < 0,01$) e o teste *post hoc* Duncan indicou uma diminuição da latência de retenção para os grupos VUF 0,49nmol e VUF 1,48 nmol em comparação com o grupo controle que recebeu SAL (Figura 12).

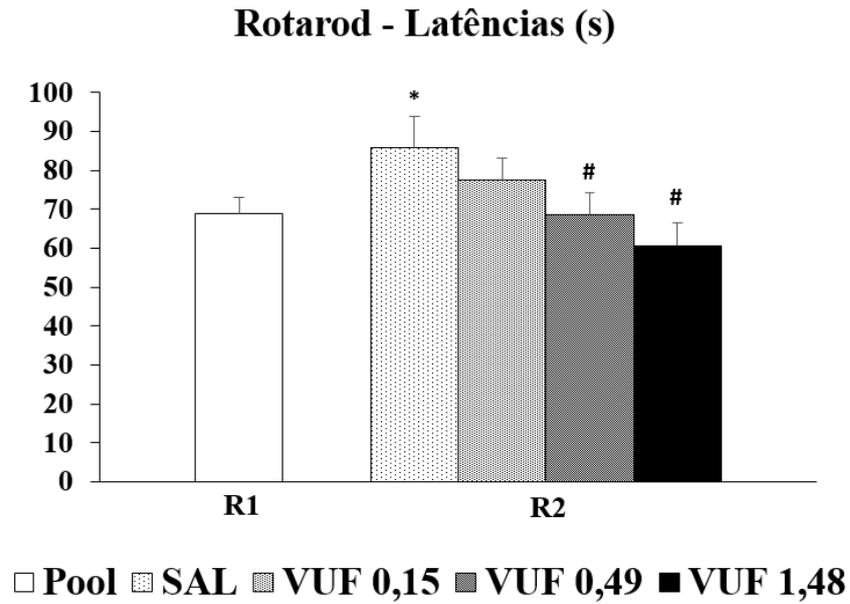


Figura 12: Efeitos das microinjeções intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) na consolidação da aprendizagem motora no teste do rotarod. SAL (n = 10), VUF 0,15nmol (n = 11), VUF 0,49nmol (n = 12) e VUF 1,48nmol (n = 11). Médias e erro padrão da média para o tempo de latência [segundos (s)].

* $p < 0,05$ em relação à R1 (Pool); # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (SAL) em R2 (ANOVA, seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.4 Experimento 4: Efeitos das injeções de SAL (0,9 %) ou VUF-8430 (500 ng/kg) na expressão de CREB e pCREB no vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo, utilizando a técnica de *Western blotting*

A Figura 13 mostra as bandas fluorescentes representativas obtidas após a imunotransferência utilizada na técnica de *Western blotting* para o total de CREB (tCREB), de CREB fosforilado (pCREB) e a α -tubulina nas seguintes estruturas cerebrais: vérmis cerebelar; córtex pré-frontal; amígdala; e hipocampo. A banda marcada pelo anticorpo monoclonal anti-CREB utilizado no estudo possuía o peso molecular de 43 kDa.

A Figura 14 mostra os resultados obtidos da análise de imunotransferência utilizada na técnica de *Western blotting* para o tCREB e pCREB no vérmis cerebelar, no córtex pré-frontal, na amígdala e no hipocampo, de uma amostra coletada após injeção I.P de SAL ou VUF (500 ng/kg) em camundongos. Para o tCREB, o teste *t-Student* indicou diferenças significativas para as seguintes estruturas: vérmis cerebelar [t(8)= 2,95, p < 0,05] e córtex pré-frontal [t(8)= 3,07, p < 0,05]; e não indicou diferenças significativas entre os grupos SAL e VUF na amígdala [t(8)= -0,44, p > 0,05] e no hipocampo [t(8)= -0,45, p > 0,05]. Com relação à pCREB, o teste *t-Student* também mostrou diferenças significativas para o vérmis cerebelar [t(8)= 3,21, p < 0,05] e para o córtex pré-frontal [t(8)= 2,85, p < 0,05]; e não mostrou diferenças significativas na amígdala [t(8)= -0,69, p > 0,05] e no hipocampo [t(8)= -0,49, p > 0,05].

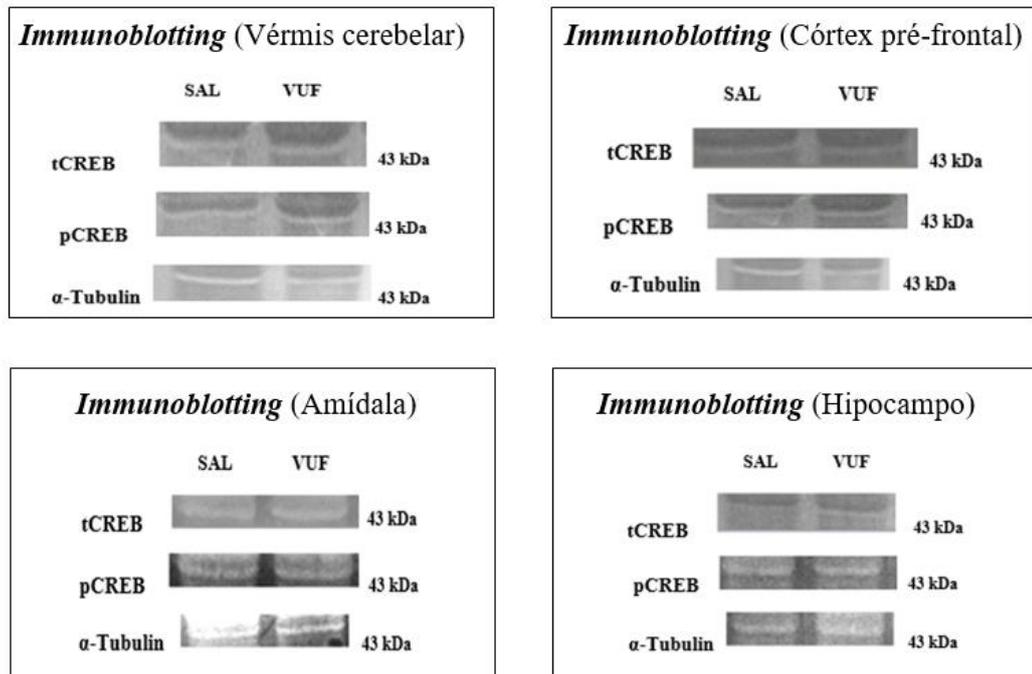


Figura 13: Membranas representativas com as bandas de fluorescência da análise de *Western blotting* de tCREB, pCREB e α -tubulina no vérnis cerebelar, córtex pré-frontal, amídala e hipocampo em camundongos. Animais da esquerda para a direita (SAL - grupo salina; VUF - grupo tratado). A banda marcada pelo anticorpo monoclonal anti-CREB possuía o peso molecular de 43 kDa).

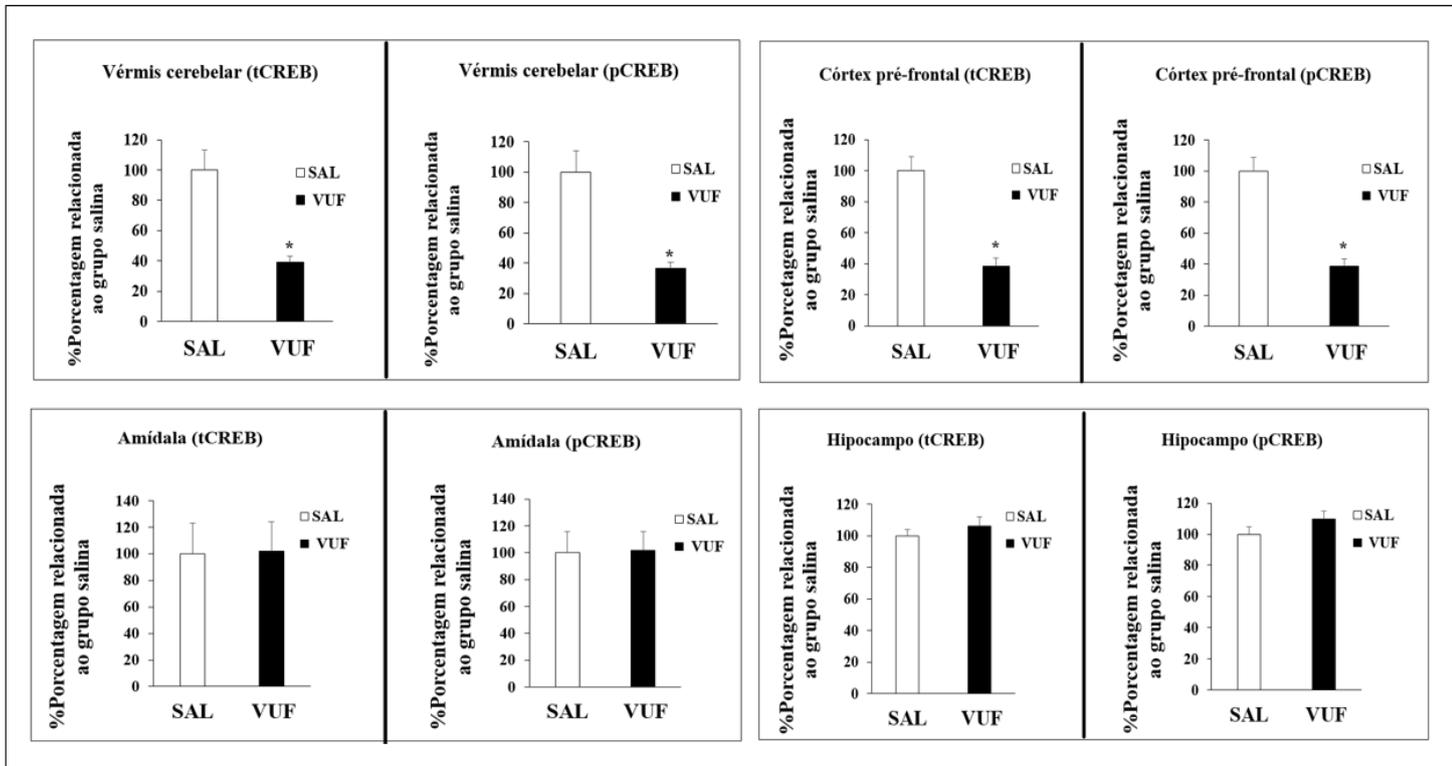


Figura 14: Porcentagens dos valores de tCREB e pCREB em comparação ao grupo controle nas seguintes estruturas: vértex cerebelar; córtex pré-frontal; amígdala; hipocampo. Os histogramas representam a média \pm SEM ($n = 5$ camundongos por grupo) da porcentagem de valores de tCREB e pCREB do grupo VUF em relação ao grupo SAL (* $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeitos da administração intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) no labirinto em cruz elevado e na caixa de esQUIVA inibitória

Os resultados obtidos no Experimento 1 demonstraram que as microinjeções do agonista do receptor histaminérgico H4 VUF-8430 nas doses de 0,49 nmol e 1,48 nmol prejudicaram a consolidação da memória, uma vez que esse déficit caracterizou-se pelo aumento da atividade exploratória dos animais nos braços abertos (% EBA e % TBA) observado nos grupos tratados com VUF (0,49 nmol e 1,48 nmol) em relação ao grupo SAL durante a reexposição ao labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, houve um aumento na % TBA para esses grupos em T2 comparado à T1. A droga utilizada em suas diferentes dosagens não induziu alterações na atividade locomotora, representada pelas entradas dos animais nos braços fechados (EBF) no LCE.

Nesse modelo, é possível avaliar a ansiedade devido ao conflito entre a motivação para explorar o labirinto e a tendência natural dos roedores em evitar espaços abertos (Lister, 1990). Entretanto, este modelo também foi proposto para avaliar a memória emocional (Carobrez; Bertoglio, 2005). Portanto, a ansiedade pode ser inferida pela atividade nos braços abertos durante a exposição e a aprendizagem emocional pode ser inferida através da redução da exploração dos braços abertos durante a reexposição (Galvis-Alonso, 2010; Dal-Col et al., 2003; File, 1993). Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que o agonista histaminérgico H4 utilizado prejudicou a consolidação da memória emocional em camundongos submetidos ao LCE, sugerindo um papel inibitório do VUF-8430, nas doses de

0,49 nmol e 1,48 nmol, microinjetadas no vérmis cerebelar dos animais submetidos à este modelo.

Além do teste no LCE, modelo classicamente voltado à ansiedade, o Experimento 2 investigou a resposta comportamental emocional utilizando uma tarefa de esquiiva inibitória, que é um paradigma experimental efetivo para avaliar a memória aversiva, envolvendo comportamentos semelhantes ao medo (Nonankan et al., 2013). No Experimento 2, quando o VUF-8430, na dose de 1,48 nmol, foi microinjetado no vérmis cerebelar pós-D1, houve déficit na consolidação da memória emocional, como observado na diminuição das latências do grupo VUF 1,48 nmol se comparada ao grupo controle SAL no segundo dia de teste (D2). Portanto, infere-se um efeito amnésico desta droga nessa dosagem na EI. Os outros grupos tratados com o VUF (0,15 nmol e 0,49 nmol), além do próprio grupo SAL, apresentaram comportamentos relacionados ao medo devido ao aumento das latências no segundo dia de teste, tornando-se um indicativo da consolidação da memória aversiva nesses animais.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração intra-vérmis do VUF (1,48 nmol) prejudicou a consolidação da informação aversiva em camundongos submetidos à EI. Em outro estudo, Galeotti e colaboradores (2013) mostraram que o VUF-8430 microinjetado i.c.v. em camundongos, foi capaz de reverter o déficit na memória emocional induzido pela escopolamina na EI, entretanto, quando a droga foi microinjetada sozinha, não houve efeito na memória emocional neste modelo. Esses resultados diferentes, quanto à modulação exercida pelos receptores H4, podem estar relacionados ao estímulo emocional atuando como um modulador endógeno essencial para os processos da memória, interagindo com agentes ativos mnemônicos fornecidos por fatores exógenos, como por exemplo, a droga utilizada em suas diferentes doses (McGaugh, 1989). Essa modulação também pode estar relacionada aos locais de injeção, idade e espécie dos animais utilizados para avaliar a memória emocional.

As projeções histaminérgicas para o vérmis cerebelar podem estar implicadas na modulação da formação da memória emocional independente do seu papel nos processos motores ou sensoriais, representando uma possível interface entre o estímulo sensorio, o estado emocional do sujeito e as respostas motoras (Sacchetti et al., 2007; 2009). Resultados recentes do nosso laboratório têm traçado as ações da histamina via receptores H1, H2 e H3 no vérmis cerebelar usando os modelos do LCE e da EI. Um estudo realizado por Gianlorenço e colaboradores (2013) sugeriu que a participação do sistema histaminérgico cerebelar na consolidação da memória emocional é dependente de um componente de ansiedade ou de medo, indicando que as vias neurais que modulam as memórias relacionadas à esses comportamentos são distintas. Níveis elevados de HA no vérmis cerebelar produziram resultados diferentes nos animais, na mesma dose, em modelos que avaliaram diferentes funções, sejam com um componente de ansiedade, presente no modelo do LCE (Gianlorenço et al., 2011), ou sejam com um componente de medo, presente no modelo da EI (Gianlorenço et al., 2015). No presente estudo, quando utilizou-se um agonista do receptor H4, ambos os modelos (estímulos mediados pela ansiedade e pelo medo) apresentaram comprometimento da consolidação da memória emocional.

Steimer (2002) sugere que a ansiedade e o medo atuam como um sinal de conflito motivacional, ou seja, uma ameaça ou um perigo, desencadeando respostas adaptativas apropriadas, provavelmente demonstrando alguma sobreposição na circuitaria neuronal em diferentes áreas encefálicas, bem como nos mecanismos comportamentais. Portanto, esses resultados indicam que os receptores H1, H2 e H4 no vérmis cerebelar usando modelos de ansiedade e medo, implicam em circuitos neurais envolvidos em diferentes funções relacionadas à emoção. Além disso, a necessidade operacional em definir a ansiedade e o medo surge a partir das concepções de que essas duas categorias de emoção são mediadas no encéfalo por subsistemas compartilhados, porém independentes (Davis et al., 2010). De fato, a ansiedade

pode ser apenas uma forma mais elaborada de medo que proporciona ao indivíduo uma maior capacidade de adaptação e planejamento (Barlow, 2000), geralmente definida como uma antecipação emocional mediante uma situação aversiva. O medo, por outro lado, está ligado à uma ameaça real e definida ou à um perigo iminente (Davis et al., 2010). Assim, sugerimos que os receptores H4, apesar de possuírem vias diferentes, têm algo em comum, pois ambos os modelos, envolvendo ansiedade e medo, demonstraram uma mesma resposta, prejudicando a consolidação da memória emocional, independentemente do tipo de estímulo envolvido.

Tomados em conjunto, os resultados dos Experimentos 1 e 2, contribuíram para explicar os efeitos produzidos pelo VUF-8430 em diferentes paradigmas experimentais utilizados para avaliar a memória aversiva. Os dois modelos experimentais utilizados nesse estudo, permitiram uma avaliação da memória aversiva relacionada aos paradigmas comportamentais distintos. Enquanto o LCE, modelo relacionado à ansiedade, baseia-se na prevenção pelas áreas potencialmente ameaçadoras adquiridas no primeiro dia de teste, o teste na EI baseia-se na evasão condicionada mediante um perigo real, relacionando-se à expressão do medo. No presente estudo, a dose mais elevada de 1,48 nmol induziu um efeito amnésico nos dois modelos utilizados, mesmo que a tarefa proposta demonstrasse um componente emocional diferente.

Portanto, sugerimos que o sistema neural histaminérgico, via receptores H4 presentes no vérmis cerebelar em camundongos, induz um déficit na expressão da memória emocional relacionado à ansiedade e ao medo, prejudicando a fase de consolidação quando utilizado o agonista VUF-8430 na dose de 1,48 nmol.

5.2 Efeitos da administração intra-vérmis de SAL ou VUF-8430 (0,15 nmol; 0,49 nmol; 1,48 nmol) no rotarod

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que as microinjeções no vérmis cerebelar do agonista do receptor histaminérgico H4 VUF-8430 nas doses de 0,49 nmol e 1,48 nmol diminuíram a latência dos animais submetidos ao teste do rotarod, indicando que essas doses prejudicam a consolidação da aprendizagem motora em camundongos quando comparadas ao grupo SAL na reexposição (R2).

Bloedel e seus colaboradores (1991), através da ablação de regiões cerebelares que resultaram em uma incapacidade de aquisição de comportamentos adaptativos, sugeriram que o cerebelo possui um importante papel na aprendizagem motora atrelado às alterações necessárias nos fenômenos adaptativos e condicionados. O cerebelo dispõe de uma acurada rede de vias reguladoras para que haja um controle correto em um determinado ato motor, agindo na comparação, modulação e ajuste dos estímulos através de suas projeções para áreas motoras corticais, contribuindo para a regulação e o planejamento do movimento, bem como na aquisição sensorial e organização temporal (Nixon; Passingham, 2001). Portanto, indivíduos com comprometimentos cerebelares apresentam distúrbios na precisão e coordenação dos movimentos realizados (Manto et al., 2012). No presente estudo, acreditamos que os déficits encontrados no rotarod possam estar ligados à coordenação motora dos animais, uma vez que não obtivemos déficits quanto à mobilidade dos animais verificados no LCE (Experimento 1). Como a droga é microinjetada no vérmis cerebelar, inferimos que a mesma pode interferir diretamente na coordenação motora dos animais submetidos ao rotarod.

Em um estudo de Song e colaboradores (2006), ao utilizarem o rotarod, observaram que a HA microinjetada no núcleo interposto cerebelar em ratos promoveu uma melhora no desempenho motor, nas habilidades de equilíbrio e coordenação, onde essa melhora foi

atribuída à ativação dos receptores histaminérgicos H₂, sugerindo que as projeções histaminérgicas hipotálamo-cerebelares podem modular o circuito cerebelar para assegurar a precisão dos movimentos. Além disso, a HA excita neurônios do núcleo denteado do cerebelo via receptores H₂, sugerindo o envolvimento dessas projeções histaminérgicas no planejamento e no início do movimento (Quin et al., 2011). No presente estudo, ao utilizar-se um agonista histaminérgico dos receptores H₄ microinjetado no vérmis cerebelar de camundongos, houve um comprometimento na consolidação da aprendizagem motora dos animais submetidos ao rotarod.

Como visto, o sistema neural histaminérgico está envolvido na regulação da atividade locomotora, entretanto, os estudos que investigam os efeitos da HA no controle motor de roedores, apresentam resultados distintos. Enquanto alguns estudos demonstraram que a HA produz efeito bifásico na atividade locomotora espontânea em ratos, ocorrendo hipoatividade transitória inicial seguida por hiperatividade, e que a redução da HA em animais *knockout* para receptores histaminérgicos provoca uma diminuição da atividade locomotora, demonstrando assim, um papel facilitador desse neurotransmissor na atividade motora (Bristow; Bennett, 1988; Chiavegatto et al., 1998). No entanto, em outros estudos envolvendo microinjeção i.c.v. de HA, apenas a hipoatividade foi observada (Inoue et al., 1996; Toyota et al., 2002) e no estudo de Galeotti e seus colaboradores (2013), houve um déficit significativo no comprometimento da coordenação motora dos camundongos no rotarod quando utilizada a dose mais alta do agonista do receptor H₄ VUF-8430. Portanto, nossos resultados corroboram o estudo de Galeotti et al. (2013), mostrando um déficit na aprendizagem motora induzido pela dose mais alta do VUF-8430 utilizada nos respectivos estudos.

Sabe-se, que o VUF-8430 também apresenta afinidade para os receptores H₃, demonstrando propriedades agonistas (Lim et al., 2009a). No entanto, supõe-se que os receptores H₃ e H₄ tenham um papel distinto e contrastante no encéfalo de mamíferos. O H₃

atua como autoreceptor nas terminações dos neurônios histaminérgicos e a sua ativação modula a liberação e síntese de HA, inibindo a neurotransmissão histaminérgica (Köhler et al., 2011; Brown et al., 2001). Por esta razão, inúmeros antagonistas/agonistas inversos dos receptores H3 foram sintetizados e estudados para melhorar a atividade histaminérgica e, nessas bases, Galeotti e seus colaboradores (2013) sugerem que um envolvimento da ativação dos receptores H3 nos efeitos farmacológicos produzidos pelo VUF-8430 seja muito improvável, atribuindo os efeitos encontrados à sua ação nos receptores H4 encontrados no SNC.

A expressão central dos receptores H4 foi recentemente descoberta e, por isso, não são encontrados muitos estudos embasando-a na literatura. Assim, há a necessidade de maiores evidências a fim de auxiliar na orientação para investigações futuras, elucidando o papel desses receptores no SNC, além de suas ações e manifestações clínicas, tornando-os potenciais alvos terapêuticos.

5.3 Efeitos da administração I.P. de SAL (0,9 %) ou VUF-8430 (500 ng/kg) na expressão de CREB e pCREB no vérmis cerebelar, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo em camundongos

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a administração aguda I.P. do VUF-8430 (500 ng/kg) induziu uma diminuição dos níveis de CREB e pCREB no vérmis cerebelar e no córtex pré-frontal de camundongos, sugerindo que essa dose prejudica a ativação de vias de sinalização celular nessas estruturas. Entretanto, não houve alteração dessa expressão proteica na amígdala e no hipocampo.

A diminuição dos níveis de CREB e pCREB no vérmis cerebelar em camundongos, pode estar relacionado aos eventos bioquímicos associados ao comprometimento cognitivo, corroborando os resultados dos experimentos anteriores realizados no presente estudo (LCE, EI e rotarod), pois houve déficits na consolidação da memória quando utilizado o VUF-8430 (1,48 nmol) intra-vérmis nos aparatos supracitados, prejudicando as funções cognitivas e de neuroproteção. No entanto, Galeotti e colaboradores (2013), mostraram que a microinjeção i.c.v. dessa droga foi capaz de reverter os déficits na memória emocional induzidos pela escopolamina na EI. Essas discrepâncias em relação à modulação exercida pelos receptores H4 podem estar relacionadas à excitação emocional, que é considerada como um modulador endógeno fundamental, interagindo com agentes ativos mnemônicos fornecidos por fatores exógenos (McGaugh, 1989). No presente estudo, acreditamos que o VUF-8430 induziu uma inibição significativa da expressão de CREB no vérmis cerebelar, associando-se ao comprometimento cognitivo verificado nos outros experimentos realizados.

Além disso, houve uma diminuição na expressão de CREB e pCREB no córtex pré-frontal (CPF). A atenuação da via de sinalização do vérmis cerebelar induzida pelo VUF-8430 pode ter diminuído a estimulação do CPF, uma vez que as eferências cerebelares visam não

apenas áreas motoras corticais, mas também regiões relacionadas à modulação emocional, como o próprio CPF, que, por sua vez, está envolvido na atenção e no controle cognitivo. Segundo Chen et al. (2010), as atenuações genética e farmacológica da expressão de CREB prejudicam a excitabilidade das redes neurais e das funções cognitivas. Estudos mostram que o córtex pré-frontal medial (CPFm) pode atuar como uma área de ligação na memória remota de forma semelhante à atuação do hipocampo na memória recente, sendo que a separação da função do hipocampo e do CPFm na recuperação da memória recente e remota, respectivamente, sugere que o CPFm possa tomar parte na função de ligação do hipocampo na memória remota (Frankland; Bontempi, 2005; 2006).

A expressão gênica dependente de CREB no hipocampo por sinalização monoaminérgica ou dopaminérgica, facilita a indução de LTP e, conseqüentemente, facilita os processos de aprendizagem e memória (Reymann; Frey, 2007; Barco et al., 2008). A expressão de pCREB e BDNF associa-se à neurogênese e contribui para a plasticidade neural do hipocampo na habilidade de adaptação em resposta aos mais variáveis estímulos (Lee et al., 2002; Fujioka et al., 2004). Em contrapartida, a diminuição da expressão de CREB associa-se à redução da neurogênese, ocasionando a ansiedade (Nakagawa et al., 2002).

Nossos resultados também demonstram que o agonista dos receptores histaminérgicos H4 falhou em induzir a fosforilação de CREB no hipocampo e na amígdala. O comprometimento da consolidação da memória emocional induzida pela microinjeção do VUF-8430 no vérmis cerebelar verificada nos outros experimentos do presente estudo, pode ter atenuado a estimulação neuronal na amígdala e no hipocampo, uma vez que a amígdala e o cerebelo podem ser funcionalmente interconectados durante a aprendizagem aversiva (Strata et al., 2015). Além disso, a falta de efeito do VUF-8430 no hipocampo e na amígdala pode estar relacionada à dose adotada no presente estudo.

Conexões anatômicas diretas e indiretas existem entre o cerebelo e as áreas límbicas (Sacchetti et al., 2009). Além disso, evidências apontam que a amígdala e o hipocampo estão anatomicamente conectados e interagem funcionalmente durante a codificação da memória emocional (Richardson et al., 2004; Calandreau et al., 2006). Estudos sugerem que o núcleo basolateral da amígdala modula as funções do hipocampo durante o condicionamento do medo, promovendo uma interação dinâmica entre essas estruturas, influenciando mutuamente os processos da neuroplasticidade (Kim et al., 2005; Huff et al., 2006), promovendo a modulação da aprendizagem e os processos da memória. Em nosso estudo, a diminuição da expressão de CREB no vérmis cerebelar pode ter atenuado a ativação das vias de sinalização na amígdala e no hipocampo.

Sabe-se, que a expressão de pCREB está associado à regulação transcricional de genes relacionados à neuroplasticidade, correlacionando-se com as medidas fisiológicas e comportamentais (Mayr; Montminy, 2001). Segundo Cowansage et al. (2013), respostas comportamentais podem ser importantes para equilibrar a plasticidade neural e que há os mesmos padrões em diferentes circuitos e, assim, consistente com a teoria de que o *feedback* entre circuitos neurais anatomicamente distintos seja essencial para uma cognição saudável.

No entanto, apesar da importância bem estabelecida e fundamentada da expressão de CREB e pCREB na plasticidade sináptica, as suas contribuições endógenas para a formação da memória ainda não são bem caracterizadas na literatura, principalmente no vérmis cerebelar. Dessa forma, há a necessidade de uma maior investigação em estudos futuros, do papel desenvolvido dessa estrutura na ativação de vias de sinalização celular nas funções cognitivas e de neuroproteção, assim como nas estruturas clássicas vinculadas à memória, como o CPF, a amígdala e o hipocampo.

5.4 Discussão final

Os resultados obtidos no presente estudo no LCE, corroboram um estudo desenvolvido em nosso laboratório de pesquisa por Gianlorenço e colaboradores (2011), onde a HA microinjetada intra-vérmis em camundongos utilizando este mesmo modelo, prejudicou a consolidação da memória, sugerindo um possível papel inibitório na memória emocional com um componente de ansiedade; entretanto, em um outro estudo também desenvolvido por Gianlorenço e colaboradores (2013), ao utilizar a HA intra-vérmis em camundongo na EI, houve facilitação da memória emocional com um componente de medo, demonstrando assim, um resultado diferente ao encontrado no presente estudo. Contudo, nossos resultados corroboram aqueles obtidos por Ahmadi e seus colaboradores (2010), que demonstraram um efeito inibitório da injeção i.c.v de HA pós-treino, na aprendizagem e na memória emocional em camundongos submetidos à EI.

A ansiedade e o medo atuam como um sinal de ameaça ou um perigo, desencadeando respostas adaptativas e, provavelmente, demonstrando sobreposição na circuitaria neuronal em diferentes áreas encefálicas, bem como nas respostas comportamentais (Steimer, 2002). Além disso, Davis e colaboradores (2010), sugerem que essas duas categorias de emoção são mediadas no encéfalo por subsistemas compartilhados, porém independentes. De fato, a ansiedade pode ser apenas uma forma mais elaborada de medo, proporcionando ao indivíduo uma maior capacidade de adaptação e planejamento (Barlow, 2000), sendo definida como uma antecipação emocional, mediante uma situação aversiva; já o medo, por outro lado, está ligado à uma ameaça definida ou à um perigo iminente (Davis et al., 2010).

McNaughton e Corr (2004), sugerem que exista uma distinção funcional entre o medo, relacionado à essas ameaças definidas, e a ansiedade, relacionada à ameaças distantes ou antecipatórias, com funções executadas por dois sistemas neurais paralelos: o medo, com

representação neural em níveis inferiores, em áreas como a substância cinzenta periaquedutal, o hipotálamo medial e a amígdala; e a ansiedade, com maior representação neural em níveis superiores, em áreas como a amígdala, o sistema septo-hipocampal, o cíngulo posterior e o CPF. Assim, o vérmis cerebelar e a amígdala, que é uma estrutura presente em ambas as situações, podem interagir mediados por conexões anatômicas diretas ou indiretas entre o cerebelo e as áreas límbicas (Sacchetti et al., 2009), portanto, os resultados advindos por intermédio do SNH, podem estar relacionados ao efeito da HA sobre uma dessas projeções cerebelares.

No presente estudo, sugerimos a hipótese dos receptores H4 agirem como um elo entre a ansiedade e o medo, pois, apesar de possuírem diferentes vias neurais, existe algo em comum nas respostas apresentadas pelos animais, visto que nos dois modelos, independente do estímulo ser voltado à ansiedade ou ao medo, houve déficits na consolidação da memória dos camundongos.

Destaca-se ainda, o fato da descoberta desses receptores histaminérgicos H4 no SNC ser recente e, por isso, faltam estudos que elucidem qual o seu verdadeiro papel na aprendizagem, na memória emocional e no controle motor. No presente estudo, os resultados comportamentais obtidos no LCE, na EI e no rotarod, foram corroborados pela análise imunohistoquímica, através da técnica de *Western blotting*, que revelou uma diminuição da expressão proteica dos níveis de CREB e pCREB, ou seja, não houve ativação farmacológica das vias de sinalização no vérmis cerebelar induzida pelo VUF-8430. Portanto, nossos resultados sugerem déficits induzidos por este agonista histaminérgico dos receptores H4, em sua dose mais alta utilizada (1,48 nmol), na consolidação da memória emocional e no controle motor em camundongos.

O presente estudo foi o primeiro trabalho que investigou a ação de um agonista dos receptores H4 (VUF-8430), microinjetado no vérmis cerebelar de camundongos, submetidos à diferentes testes comportamentais, bem como à análise de *Western blotting* verificando a

expressão proteica no vérmis e em estruturas classicamente vinculadas à memória, tais como: o córtex pré-frontal, a amígdala e o hipocampo.

Desta forma, os nossos resultados possibilitam novas orientações para investigações futuras relacionadas à esses receptores, incrementando o conhecimento sobre as bases neurobiológicas da formação da memória, caracterizando-os como um provável alvo terapêutico nas mais diversas manifestações clínicas, tais como as desordens amnésicas.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a maior dose do VUF-8430 (1,48 nmol) nos dois modelos utilizados para avaliar a aprendizagem e a memória emocional (LCE e EI), prejudicou a consolidação da memória em camundongos via vérmis cerebelar, independentemente da atividade proposta estar relacionada à ansiedade, como no LCE, ou relacionada ao medo, como na EI. Em relação ao comportamento motor, o VUF-8430 (1,48 nmol), também prejudicou a aprendizagem motora dos animais submetidos ao teste do rotarod. Além disso, a diminuição da expressão proteica no vérmis cerebelar verificada pelos níveis de CREB e pCREB, pode corroborar esses déficits encontrados na consolidação da memória.

7. REFERÊNCIAS

ADAMASZEK, M; D'AGATA F; FERRUCCI, R; HABAS, C; KEULEN S; KIRKBY, K.C; LEGGIO, M; MARIËN, P; MOLINARI, M; MOULTON, E; ORSI, L; VAN OVERWALLE, F; PAPADELIS, C; PRIORI, A; SACCHETTI, B; SCHUTTER, D.J; STYLIADIS, C; ERHOEVEN, J. Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. **Cerebellum**, v. 16(2): 552-576, 2017.

AHMADI, S; MALEKMOHAMMADI, N; ZARRINDAST, M.R. Repeated histamine pretreatment decreased amnesia induced by post-training administration of the drug in a step-down inhibitory avoidance test in mice. **Archives of Iranian Medicine**, v. 13(3): 2009- 216, 2010.

ALBERINI, C.M; LEDOUX, J.E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v. 23(17): R746-50, 2013.

ALONSO, M; VIANNA, M.R; DEPINO, A.M; MELLO E SOUZA, T; PEREIRA, P; SZAPIRO, G; PITOSI, F; IZQUIERDO, I; MEDINA, J.H. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. **Hippocampus**, v. 12(4): 551-60, 2002.

ALVAREZ, E. O. The role of histamine on cognition. **Behavioural Brain Research**, v.199: 183–189, 2009.

BALDI, E; BUCHERELLI, C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 53: 160-90, 2015.

BARCO, A; LOPEZ DE ARMENTIA, M; ALARCON, J.M. Synapse-specific stabilization of plasticity processes: The synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32(4): 831–51, 2008.

BARLOW, D.H. Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory. **The American Psychologist**, v. 55: 1247-1263, 2000.

BARRIOS, M; GUARDIA, J. Relación del cerebelo con las funciones cognitivas: evidencias neuroanatómicas, clínicas y de neuroimagen. **Revista de Neurología**, v. 33 (6): 582-591, 2001.

BARTSCH, D; GHIRARDI, M; SKEHEL, P.A; KARL, K.A; HERDER, S.P; CHEN, M; BAILEY, C.H; KANDEL, E.R. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. **Cell**, v. 83(6): 979-92, 1995.

BECERRA-GARCIA, A.M; CARDENAS, F.P; MORATO, S. Effect of different illumination levels on the rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, v. 80: 265-270, 2005.

BEKINSCHTEIN, P; CAMMAROTA, M; IZQUIERDO, I; MEDINA, J.H. BDNF and memory formation and storage. **Neuroscientist**, v. 14(2): 147-56, 2008.

BELGACEM, Y.H; BORODINSKY, L.N. CREB at the Crossroads of Activity-Dependent Regulation of Nervous System Development and Function. **The plastic brain**, 19-39, 2017.

BENETTI, F; IZQUIERDO, I. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16: 1539-1545, 2012.

BENITO, E; BARCO, A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. **Trends in Neurosciences**, v. 33: 230-40, 2010.

- BITNER, R.S. Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation: a mechanistic marker in the development of memory enhancing Alzheimer's disease therapeutics. **Biochemical Pharmacology**, v. 83(6): 705-14, 2012.
- BLOEDEL, J.R; BRACHA, V; KELLY, T.M; WU, J. Substrates for motor learning: Does the cerebellum do it all? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 627: 305-318, 1991.
- BREWIN, C.R. Memory and Forgetting. **Current Psychiatry Reports**, 20(10): 87, 2018.
- BRINI, M; CALI, T; OTTOLINI, D; CARAFOLI, E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71(15): 2787–2814, 2014.
- BRISTOW, L.J; BENNETT, G.W. Biphasic effects of intra-accumbens histamine administration on spontaneous motor activity in the rat: a role for central histamine receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 95: 1292–1302, 1988.
- BROWN, R.E; STEVENS, D.R; HAAS, H.L. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**, v. 63: 637-672, 2001.
- BUCHANAN, T. W. Retrieval of Emotional Memories. **Psychology Bulletin**, v. 133(5): 761–779, 2007.
- BUGALHO, P; CORREA, B; VIANA-BAPTISTA, V. Papel do Cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: Bases científicas e Modelos de estudo. **Acta Médica Portuguesa**, v.19: 257-268, 2006.
- CALANDREAU, L; TRIFILIEFF, P; MONS, N; COSTES, L; MARIEN, M; MARIGHETTO, A; MICHEAU, J; JAFFARD, R; DESMEDT, A. Extracellular hippocampal acetylcholine level controls amygdala function and promotes adaptive conditioned emotional response. **Journal of Neuroscience**, v. 26: 13556–13566, 2006.
- 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: 465-474, 2005.

CANTO-DE-SOUZA, L. GARÇÃO, D.C; ROMAGUERA, F; MATTIOLI, R. Dorsal hippocampal microinjection of chlorpheniramine reverses the anxiolytic-like effects of l-histidine and impairs emotional memory in mice. **Neuroscience Letters**, v. 587: 11–16, 2015.

CANTO-DE-SOUZA, L; MATTIOLI, R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 130: 44-51, 2016.

CAROBREZ, A.P; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, v. 29: 1193–205, 2005.

CHEN, G; ZOU, X; WATANABE, H; VAN DEURSEN, J.M; SHEN, J. CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. **Journal of Neuroscience**, v. 30(39): 13066–13077, 2010.

CHIAVEGATTO, S; NASELLO, A.G; BERNARDI, M.M. Histamine and spontaneous motor activity: biphasic changes, receptors involved and participation of the striatal dopamine system. **Life Sciences**, v. 62: 1875–1888, 1998.

CONNELLY, W.M; SHENTON, F.C; LETHBRIDGE, N; LEURS, R; WALDVOGEL, H.J; FAULL, R.L; LEES, G; CHAZOT, P.L. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. **British Journal of Pharmacology**, v. 157: 55–63, 2009.

COSTA NETO, J; SERAFIM, K.R; GIANLORENÇO, A.C.L; MATTIOLI, R. Low-dose thioperamide injected into the cerebellar vermis of mice immediately after exposure to the elevated plus-maze impairs their avoidance behavior on re-exposure to the apparatus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46: 943-948, 2013.

COWANSAGEA, K.K; BUSH, D.E.A; JOSSELYN, S.A; KLANNA, E; LEDOUXA, J.E. Basal variability in CREB phosphorylation predicts trait-like differences in amygdala-

dependent memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110(41): 16645–16650, 2013.

CRUZ, A.P.M; FREI, F; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49: 171-176, 1994.

DAHER, F; MATTIOLI, R. Impairment in the aversive memory of mice in the inhibitory avoidance task but not in the elevated plusmaze through intra-amygdala injections of histamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 135: 237–245, 2015.

DAL-COL, 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 Behavior**, v. 74: 395-400, 2003.

DAVIS, M., WALKER, D.L., MILES, L., GRILLON, C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 5: 105–135, 2010.

DUDAI, Y; EISENBERG, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. **Neuron**, v.44: 93-100, 2004.

FERNANDES, C.E.M; SERAFIM, K.R GIANLORENÇO, A.C.L; MATTIOLI, R. Cholinergic agonist reverses H1-induced memory deficit in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 72: 16–22, 2016.

FILE, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 58: 199–202, 1993.

FINE, A., DUNNETT, S.B., BJÖRKLUND, A., IVERSEN, S.D. Cholinergic ventral forebrain grafts into the neocortex improve passive avoidance memory in a rat model of Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82: 5227–5230, 1985.

FOLEY, A.G; PRENDERGAST, A; BARRY, C; SCULLY, D; UPTON, N; MEDHURST, A.D; REGAN, C.M. H3 Receptor Antagonism Enhances NCAM PSA-Mediated Plasticity and Improves Memory Consolidation in Odor Discrimination and Delayed Match-to-Position Paradigms. **Neuropsychopharmacology**, v. 34: 2585–2600, 2009.

FRANKLAND, P.W; BONTEMPI, B. Fast track to the medial prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103(3): 509–10, 2006.

FRANKLAND, P.W; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6(2): 119–30, 2005.

FRANKLIN, K.B.J; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, California, USA, 2001.

FUJIOKA T, FUJIOKA A, DUMAN RS. Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 24: 319–38, 2004.

GALEOTTI, N; SANNA, M.D; GHELARDINI, C. Pleiotropic effect of histamine H4 receptor modulation in the central nervous system. **Neuropharmacology**, v. 71: 141–147, 2013.

GALVIS-ALONSO, O.Y; GARCIA, A.M.B; OREJARENA, M.J; LAMPREA, M.R; BOTELHO, S; CONDE, C.A; MORATO, C.S; GARCIA-CAIRASCO N. A combined study of behavior and Fos expression in limbic structures after re-testing Wistar rats in the elevated plusmaze. **Brain Research Bulletin**, v. 81(6): 595–599, 2010.

GIANLORENÇO, A.C.L; CANTO-DE-SOUZA, A; MATTIOLI, R. Intra-cerebellar microinjection of histamine enhances memory consolidation of inhibitory avoidance learning in mice via H2 receptors. **Neuroscience Letters**, v. 557: 159–164, 2013.

GIANLORENÇO, A.C.L; RIBOLDI, A.M; SILVA-MARQUES, B; MATTIOLI, R. Cerebellar vermis H2 receptors mediate fear memory consolidation in mice. **Neuroscience Letters**, v. 587: 57–61, 2015.

GIANLORENÇO, A.C.L; SERAFIM, K.R; CANTO-DE-SOUZA, A; MATTIOLI, R. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H1 but not H2 receptors. **Brain Research Bulletin**, v. 89: 197– 202, 2012.

GIANLORENÇO, A.C.L; CANTO-DE-SOUZA, A; MATTIOLI, R. L-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H1 receptor. **Progress in Neuro-Psychopharma & Biological Psychiatry**, v. 35: 91-95, 2010.

GIANLORENÇO, A.C.L; CANTO-DE-SOUZA, A; MATTIOLI, R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 86: 134– 138, 2011.

GLASER, V; CARLINI, V; GABACH, L; GHERSI, M; DE BARIOGLIO, S; RAMIREZ, O; PEREZ, M; LATINI, A. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.30: 1067-1075, 2010.

GORDON, N. The cerebellum and cognition. **European Journal of Pediatric Neurology**, v.11: 232-234, 2007.

HAAS, H; SERGEEVA, O.A; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. **Physiology Reviews**, v. 88: 1183-1241, 2008.

HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. **Neuroscience**, v. 4: 121-30, 2003.

HAMANN, S. Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. **Trends of Cognitive Sciences**, v. 5: 394-400, 2001.

HUANG, E.J; REICHARDT, L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24: 677-736, 2001.

HUFF, N.C; FRANK, M; WRIGHT-HARDESTY, K; SPRUNGER, D; MATUS-AMAT, P; HIGGINS, E; RUDY, J.W. Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. **Journal of Neuroscience**, v. 26: 1616–1623, 2006.

INOUE, I; YANAI, K; KITAMURA, D; TANIUCHI, I; KOBAYASHI, T; NIIMURA, K; WATANABE, T; WATANABE, T. Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors. **Proceeding of National Academy of Science of the United States of America**, v. 93: 13316–13320, 1996.

IZQUIERDO, I; MCGAUGH, J. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology**, v.11: 517-534, 2000.

KANDEL, E.R; SCHWARTZ, J; JESSELL, T.M; SIEGELBAUM, S; HUDSPETH, A.J. **Princípios da Neurociência**. São Paulo: Editora Manole, 9^a ed, 2003.

KENTROS, C.G; AGNIHOTRI, N.T; STREATER, S; HAWKINS, R.D; KANDEL, E.R. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. **Neuron**, v. 42: 283-295, 2004.

KIDA, S; JOSSELYN, S; PENA, O; KOGAN, J; CHEVERE, I; MASUSHIGE, S; SILVA, A. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nature Neuroscience**, v. 5: 348-355, 2002.

KIM, J.J; KOO, J.W; LEE, H.J; HAN, J.S. Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. **Journal of Neuroscience**, v. 25: 1532–1539, 2005.

KÖHLER, C.A; SILVA, W.C; BENETTI, F; BONINI, J.S. Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. **Neural Plasticity**, v. 2011: 1-16, 2011.

KOLB, B.; WISHAW, I.Q. **Neurociência do comportamento**. São Paulo: Editora Manole, 2002.

KOZIOL, L.F; BUDDING, D; ANDREASEN, N; D'ARRIGO, S; BULGHERONI, S; IMAMIZU, H; ITO, M; MANTO, M; MARVEL, C; PARKER, K; PEZZULO, G; RAMNANI, N; RIVA, D; SCHMAHMANN, J; VANDERVERT, L; YAMAZAKI, T. Consensus Paper: The cerebellum's role in Movement and Cognition. **Cerebellum**, v.13 (1):151-77, 2014.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23: 155–84, 2000.

LEE, J; DUAN, W; MATTSON, M.P. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 82: 1367–75, 2002.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

LIM, H.D; ADAMI, M; GUAITA, E; WERFEL, T; SMITS, R.A; DE ESCH, I.J.P; BAKKER, R.A; GUTZMER, R; CORUZZI, G; LEURS, R. Pharmacological characterization of the new histamine H4 receptor agonist VUF 8430. **British Journal of Pharmacology**, v. 157: 34–43, 2009a.

LIM, H.D; ISTYASTONO, E.P; VAN DE STOLPE, A; ROMEO, G; GOBBI, S; SCHEPERS, M; LAHAYE, R; MENGE, W.M.B.P; ZUIDERVELD, O.P; JONGEJAN, A; SMITS, R.A; BAKKER, R.A; HAAKSMA E.E.J; LEURS, R; DE ESCH, I.J.P. Clobenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H3 and H4 receptors: synthesis, pharmacological evaluation, and cross-target QSAR studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17: 3987–3994, 2009b.

LIN, J.S; FORT, P; KITAHAMA, K; PANULA, P; DENNEY, R.M; JOUVET, M. Immunohistochemical evidence for the presence of type B monoamine oxidase in histamine-containing neurons in the posterior hypothalamus of cats. **Neuroscience Letters**, v. 128: 61–65, 1991.

LINTUNEN, M; SALLMEN, T; KARLSTEDT, K; FUKUI, H; ERIKSSON, K.S; PANULA, P. Postnatal expression of H1-receptor mRNA in the rat brain: correlation to L-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. **European Journal of Neuroscience**, v. 10(7): 2287-2301, 1998.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 46: 321-340, 1990.

MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia funcional**. São Paulo: Editora Atheneu, 2^a ed., 2006.

MAYR, B; MONTMINY, M. Transcriptional regulation by the phosphorylationdependent factor CREB. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2(8): 599–609, 2001.

MANTO, M; BOWER, J.M; CONFORTO, A.B; DELGADO-GARCÍA, J.M; DA GUARDA, S.N; GERWIG, M; HABAS, C; HAGURA, N; IVRY, R.B; MARIËN, P; MOLINARI, M; NAITO, E; NOWAK, D.A; OULAD BEN TAIB, N; PELISSON, D; TESCHE, C.D; TILIKETE, C; TIMMANN, D. Consensus Paper: Roles of the cerebellum in motor control – the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. **Cerebellum**, v.11: 457-487, 2012.

MCGAUGH, J. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in theregulation of memory storage, **Annual Review of Neuroscience**, v. 12: 255–287, 1989.

MCGAUGH, J. Make mild moments memorable: add a little arousal. **Trends in Cognitive Sciences**, v.10: 345-347, 2006.

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

MIDDEI, S; SPALLONI, A; LONGONE, P; PITTENGER, C; O'MARA, S.M; MARIE, H; AMMASSARI-TEULE, M. CREB selectively controls learning-induced structural remodeling of neurons. **Learning and Memory**, v. 19(8): 330–336, 2012.

MIDDLETON, F.A; STRICK, P.L. Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. **The Journal of Neuroscience**, v. 15: 700–712, 2001.

NADER, K; EINARSSON, E.O. Memory reconsolidation: an update. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1191: 27-41, 2010.

NAKAGAWA, S; KIM, J.E; LEE, R; MALBERG, J.E; CHEN, J; STEFFEN, C; ZHANG, Y.J; NESTLER, E.J; DUMAN, R.S. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. **Journal of Neuroscience**, v. 22(9): 3673-82, 2002.

NAKAYAMA, D; YAMASAKI, Y; MATSUKI, N; NOMURA, H. Post-retrieval late process contributes to persistence of reactivated fear memory. **Learning & memory**, v. 20(6): 307-310, 2013.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature Neuroscience**, v. 8(11): 1445-9, 2005.

NESTLER, E. J. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 363 (1507): 3245-55, 2008.

NIXON, P.D., PASSINGHAN, R.E. Predicting sensory events – the role of the cerebellum in motor learning. **Experimental Brain Research**, v. 138: 251-257, 2001.

NONANKAN, A., MASUDA, F., HIROSHI NOMURA, H., MATSUKI, N. Impairment of fear memory consolidation and expression by antihistamines. **Brain Research**, v. 1493: 19 – 26, 2013.

O'CONNELL, C; GALLAGHER, H; O'MALLEY, A; BOURKE, M; REGAN, C. CREB phosphorylation coincides with transient synapse formation in the rat hippocampal dentate gyrus following avoidance learning. **Neural Plasticity**, v. 7: 279-289, 2000.

PAGE, K.J., EVERITT, B.J., ROBBINS, T.W., MARSTON, H.M., WILKINSON, L.S. Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following ampa- and ibotenic acid-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss. **Neuroscience**, v. 43: 457–472, 1991.

PARSONS, M.E; GANELLIN, C.R. Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, v.147 (Suppl. 1): S127–S135, 2006.

PEOPLES, L. L.; CAVANAUGH, D. Differential changes in signal and background firing of accumbal neurons during cocaine self-administration. **Journal of Neurophysiology**, v. 90: 993-1010, 2003.

PITTENGER, C; HUANG, Y.Y; PALETZKI, R.F; BOURTCHOULADZE, R; SCANLIN, H; VRONSKAYA, S; KANDEL, E.R. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. **Neuron**, v. 34(3): 447-62, 2002.

POPA, L.S; HEWITT, A.L; EBNER, T.J. The cerebellum for jocks and nerds alike. **Frontiers in Systems Neuroscience**, 2014.

POSER, S; STORM, D.R. Role of Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 19(4): 387–394, 2001.

PRELL, G.D; GREEN, J.P. Histamine as a neuroregulator, **Annual Review of Neuroscience**, v.9: 209-254, 1986.

QUIN, Y.T; MA, S.H; ZHUANG, Q.X; QIU, Y.H; LI, B; PENG, Y.P; WANG, J.J. Histamine evokes excitatory response of neurons in the cerebellar dentate nucleus via H₂ receptors. **Neuroscience Letters**, v. 502(3): 133-137, 2011.

REYMANN, K.G; FREY, J.U. The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, synaptic tagging, late-associativity and implications. **Neuropharmacology**, v. 52: 24–40, 2007.

RICHARDSON, M.P; STRANGE, B.A; DOLAN, R.J. Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. **Nature Neuroscience**, v. 7: 278–285, 2004.

RODGERS, R.J; CAO, B.-J; DALVI, A; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30: 289-304, 1997.

ROOZENDAAL, B; MCEWEN, B; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nature Reviews Neuroscience**, v.10:423-433, 2009.

ROSENBERG, S.S; SPITZER, N.C. Calcium signaling in neuronal development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3(10): a004259, 2011.

SACCHETTI, B; BALDI, E; LORENZINI, C.A; BUCHERELLIET, C. Cerebellar role in fear-conditioning consolidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99: 8406-11, 2002.

SACCHETTI, B; SACCO, T; STRATA, P. Reversible inactivation of amygdala and cerebellum but not perirhinal cortex impairs reactivated fear memories. **European Journal of Neuroscience**, v. 25: 2875-2884, 2007.

SACCHETTI, B; SCELFO, B; STRATA, P. Cerebellum and emotional behavior. **Neuroscience**, v. 162: 756–762, 2009.

SCHMAHMANN, J.D. The cerebellum and cognition. **Neuroscience Letters**, 2018.

SCHMAHMANN, J.D.; SHERMAN, J.C. The cerebellar cognitive affective syndrome. **Brain**, v. 121: 561–579, 1998.

SCHMAHMANN, J.D; WEILBURG, J.B; SHERMAN, J.C. The neuropsychiatry of the cerebellum – insights from the clinic. **The cerebellum**, v.6: 254-267, 2007.

SERAFIM, K.R; RUSSO, P.S.T; FERNANDES, C.E.M; GIANLORENÇO, A.C.L; MATTIOLI, R. Intra-amygdala microinjections of chlorpheniramine impair memory formation or memory retrieval in anxiety- and fear-mediated models. **Brain Research Bulletin**, v. 125: 127–133, 2016.

SIERRA, R; CASSINI, L; SANTANA, F; CRESTANI, A; DURAN, J; HAUBRICH, J; ALVARES, L; QUILLFELDT, J. Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. **Learning & Memory**, v. 20: 379–387, 2013.

SILVA-MARQUES, B; GIANLORENÇO, A.C.L; MATTIOLI, R. Intracerebellar vermis histamine facilitates memory consolidation in the elevated T maze model. **Neuroscience Letters**, v. 620: 33–37, 2016.

SONG, Y.N; LI, H.Z; ZHU, J.N; GUO, C.L; WANG, J.J. Histamine improves rat rotarod and balance beam performances through H2 receptors in the cerebellar interpositus nucleus. **Neuroscience**, v. 140 (1): 33–43, 2006.

STANTON, P. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. **Hippocampus**, v.6: 35-42, 1996.

STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4(3): 231-49, 2002.

STEVENS, C. CREB and memory consolidation. **Neuron**, v.13: 769-770, 1994.

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: 41-8, 2009.

STRATA, P. The emotional cerebellum. **Springer**, v. 14(5): 570-7, 2015.

SUZUKI, A; FUKUSHIMA, H; MUKAWA, T; TOYODA, H; WU, L.J; ZHAO, M.G; XU, H; SHANG, Y; ENDOH, K; IWAMOTO, T; MAMIYA, N; OKANO, E; HASEGAWA, S; MERCALDO, V; ZHANG, Y; MAEDA, R; OHTA, M; JOSSELYN, S.A; ZHUO, M; KIDA, S. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. **Journal of Neuroscience**, v. 31(24): 8786–8802, 2011.

TAO, X; FINKBEINER, S; ARNOLD, D.B; SHAYWITZ, A.J; GREENBERG, M.E. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. **Neuron**, v. 20(4): 709-26, 1998.

TEYLER, T; DISCENNA, P. Long-term potentiation as a candidate mnemonic device. **Brain Research**, v. 319: 15-28, 1984.

TOYOTA, H; DUGOVIC, C; KOEHL, M; LAPOSKY, A.D; WEBER, C; NGO, K; WU, Y; LEE, D.H; YANAI, K; SAKURAI, E; WATANABE, T; LIU, C; CHEN, J; BARBIER, A.J; TUREK, F.W; FUNG-LEUNG, W.P; LOVENBERG, T.W. Behavioral characterization of mice lacking histamine H3 receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 62: 389–397, 2002.

TURNER, B.M; PARADISO, S; MARVEL, C. L; PIERSON, R; BOLES PONTO, L.L; HICHWA, R. D; ROBINSON, R.G. The cerebellum and emotional experience. **Neuropsychologia**, v. 45: 1331-1341, 2007.

WADA, H.T; INAGAKI, N; YAMATODANI, A; WATANABE, T. Is the histaminergic neurons system a regulatory center for whole brain activity? **Trends Neuroscience**, v. 14: 415-418, 1991.

WON, J; SILVA, A.J. Molecular and cellular mechanisms of memory allocation in neuronetworks. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89(3): 285–292, 2008.

WU, G.Y; DEISSEROTH, K; TSIEN, R.W. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98(5): 2808–2813, 2001.

YIN, J.C; WALLACH, J.S; DEL VECCHIO, M; WILDER, E.L; ZHOU, H; QUINN, W.G; TULLY, T. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. **Cell**, v. 79(1): 49-58, 1994.

ZHOU, Y; WON, J; KARLSSON, M.G; ZHOU, M; ROGERSON, T; BALAJI, J; NEVE, R; POIRAZI, P; SILVA, A.J. CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. **Nature Neuroscience**, v. 12(11): 1438–1443, 2009.

ZHU, L; SCELFO, B; HARTELL, N.A; STRATA, P; SACCHETTI, B. The effects of fear conditioning on cerebellar LTP and LTD. **European Journal of Neuroscience**, v. 26: 219-227, 2007.

ZLOMUZICA, R; RUOCCO, L.A; SADILE, A.G; HUSTON, J.P; DERE, E. Histamine H1 receptor knockout mice exhibit impaired spatial memory in the eight-arm radial maze. **British Journal of Pharmacology**, v. 157: 86–91, 2009.

**ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.**

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "A PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR HISTAMINÉRGICO H4 NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL E NO CONTROLE MOTOR EM CAMUNDONGOS.", protocolado sob o CEUA nº 8336250515, sob a responsabilidade de Carlos Eduardo Monici Fernandes - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) em reunião de 18/06/2015.

We certify that the proposal "PARTICIPATION OF THE HISTAMINERGIC H4 RECEPTOR IN THE EMOTIONAL MEMORY MODULATION AND THE MOTOR CONTROL IN MICE.", utilizing 180 Heterogenics mice (180 males), protocol number CEUA 8336250515, under the responsibility of Carlos Eduardo Monici Fernandes - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 06/18/2015.

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 07/2018

Laboratório: Fisioterapia

Procedência: Biotério Externo

Espécie: Camundongos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 6 a 8 semanas N: 180

Linhagem: Swiss Albino

Peso: 25 a 40 g

Nota: Este trabalho investigará o efeito de microinjeções de agonista histaminérgico H4 (VUF-8430) no vérmis cerebelar em camundongos submetidos aos experimentos do labirinto em cruz elevado (LCE), caixa de esquivas inibitória (EI) e Rotarod na consolidação da memória emocional e no controle motor. Após a recuperação da cirurgia de implante da cânula guia, os animais receberão microinjeções de SAL ou VUF (0,15 nmol; 0,49 nmol; e 1,48 nmol / 0,1 ?l) pós-exposição. O experimento do LCE será realizado em dois dias consecutivos (T1 e T2), onde os animais explorarão livremente o labirinto durante 5 min. Serão registrados: número de entradas e tempo nos braços abertos, fechados e na plataforma central. Os índices em T1 indicarão o nível de ansiedade demonstrado pelos animais e a diminuição da atividade nos braços abertos entre T1 e T2, permitirá inferir a memória emocional. O experimento da EI será realizado em dois dias consecutivos (D1 e D2) e o tratamento farmacológico será pós-D1. As latências permitirão inferir a memória emocional. O experimento do Rotarod será realizado em dois dias consecutivos (R1 e R2). A velocidade de rotação do cilindro será de 16 r.p.m. e a latência para queda dos animais será medida automaticamente. Em R1, os animais realizarão a habituação por 5? e após 15? realizarão o teste. Após o término de R1, os animais receberão o tratamento farmacológico. Em R2, os animais serão apenas reexpostos sob as mesmas condições experimentais de R1, sem microinjeções, caracterizando a aprendizagem motora. A confirmação da participação do VUF-8430 na modulação da memória emocional determinará outra investigação, se sua microinjeção ativa a fosforilação do fator de transcrição CREB, utilizando a técnica de Western Blotting (Experimento 4).

São Carlos, 19 de junho de 2015

Azair Liane Matos do Canto de Souza

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos