

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

KELLY REGINA SERAFIM

**O PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS H₁ DA AMÍDALA NA
MODULAÇÃO DA ANSIEDADE E EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL EM
CAMUNDONGOS REEXPOSTOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

São Carlos

2012

KELLY REGINA SERAFIM

**O PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS H₁ DA AMÍDALA NA
MODULAÇÃO DA ANSIEDADE E EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL EM
CAMUNDONGOS REEXPOSTOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Mattioli.

SÃO CARLOS

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S481pr

Serafim, Kelly Regina.

O papel dos receptores histaminérgicos H1 da amígdala na modulação da ansiedade e evocação da memória emocional em camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado / Kelly Regina Serafim. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 68 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

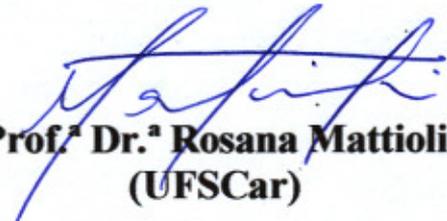
1. Medicina experimental - camundongo. 2. Ansiedade. 3. Memória emocional. 4. Clorfeniramina. 5. Amígdala. 6. Labirinto em cruz elevado. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

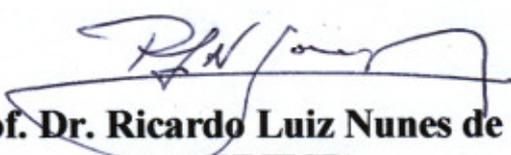
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da banca examinadora para defesa de tese de doutorado de KELLY REGINA SERAFIM, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 27 de Janeiro de 2012

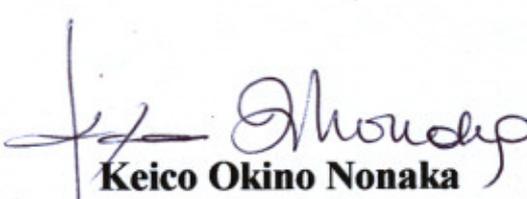
Banca Examinadora:



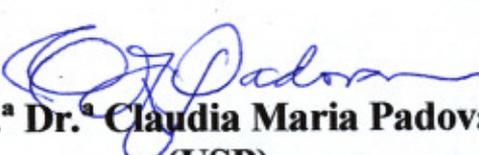
Prof.^a Dr.^a Rosana Mattioli
(UFSCar)



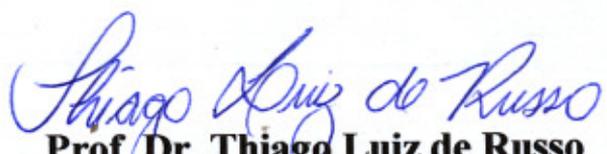
Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
(UNESP)



Keico Okino Nonaka
(UFSCar)



Prof.^a Dr.^a Claudia Maria Padovan
(USP)



Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
(UFSCar)

Dedico este trabalho aos meus pais, Dinho e Lé, que sempre acreditaram em mim, e nos momentos mais difíceis não me deixaram desistir.

Ao meu sobrinho Lucas que ainda não nasceu, mas já preenche a minha vida com alegria e Amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos em todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais pelo amor incondicional, pelo apoio, pelas palavras de conforto, e acima de tudo por sempre acreditarem em mim;

À Prof.^a Rosana, minha orientadora, pela dedicação, amizade, pelo carinho, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, enfim, por ter me oferecido a oportunidade de dar o primeiro passo na área da pesquisa, e me ajudado a crescer profissionalmente;

À banca examinadora pela disponibilidade, e atenção dispensada na leitura desse trabalho;

Ao meu marido e companheiro, Cristiano, pelo Amor, por estar presente em minha vida, por saber silenciar nos momentos certos, e por abraçar os meus sonhos como se fossem seus;

Ao meu irmão, Kleber, e a minha cunhada, Silvia, pela amizade, por saberem me ouvir, pelos conselhos, pelos momentos de alegria, e por estarem presentes em todos os momentos da minha caminhada;

À minha irmã do coração e amiga, Anna Carolyn, por ter sido companheira e amiga, pela sua disposição em me ajudar, pela sua amizade, pelos ótimos momentos que passamos juntos, e por ter me estendido à mão no momento que mais precisei;

À Fernanda Daher, que esteve presente desde o início do meu Doutorado, e por ter sido, sem dúvidas, o meu braço direito. Sua colaboração durante o meu Doutorado foi essencial para que eu pudesse chegar até aqui;

Aos amigos do Laboratório de Neurociências, Fernanda, Lucas, Jorge, Flávia, Michele, Diogo, pela amizade e carinho. Sem vocês a jornada ficaria muito mais difícil.

Aos amigos do Laboratório de Neurociências que não estão mais presentes, mas continuam no meu coração, Flávia Faganello Navega, Luciana Cofiel, Fernanda Romaguera e Marcos e Nadiesca;

À profa. Azair, por ter aberto as portas do LPA e ter colaborado com o desenvolvimento do meu Doutorado;

Aos amigos do LPA, que sempre estiveram disponíveis para me ajudar com colaborações essenciais;

À Tereza pela colaboração técnica;

Aos auxílios fornecidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - processo 2008/08713-8;

Os experimentos do presente trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob a orientação da Prof. Dra. Rosana Mattioli. A análise histológica do presente trabalho foi realizada no Laboratório de Pesquisa e Aprendizagem (LPA) do Departamento de Psicologia da UFScar, sob a orientação da Profa. Dra. Azair Liane Mattos do Canto de Souza. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 2008/08713-8).

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar o papel dos receptores histaminérgicos H_1 sobre o déficit de evocação da memória emocional induzido pela L-histidina. Para essa investigação, foi verificado o efeito da Clorfeniramina (CPA), antagonista H_1 , administrada na amígdala, sobre a ansiedade e a evocação da memória emocional em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Foram utilizados 117 camundongos machos da cepa Suíço-Albino, pesando entre 25 e 32 g. O teste comportamental foi realizado em dois dias consecutivos: teste 1 (T1) e teste 2 (T2). Em ambos os dias, as drogas foram administradas pré-teste. Os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p) de L-histidina (LH), precursor histaminérgico, na dose de 500mg/kg, e duas horas depois receberam injeções na amígdala (i.a) de SAL ou CPA, nas doses de 0,016nmol/0,1 μ l; 0,052nmol/0,1 μ l e 0,16 nmol /0,1 μ l. Após cinco minutos da injeção central os animais foram expostos ao LCE. Para cada dose de CPA administrada os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais de acordo com o tratamento farmacológico: controle (injeção i.p SAL e i.a SAL); LH-SAL (injeção i.p LH e i.a SAL); SAL-CPA (injeção i.p SAL e i.a CPA); LH-CPA (injeção i.p LH e i.a CPA). Os dados foram analisados usando a ANOVA de duas vias e o teste post hoc de Fisher LSD. A injeção i.p de LH e a infusão de CPA não induziram diferenças significativas entre os grupos em T1 para as medidas de ansiedade (%entradas nos braços abertos, %EBA; % tempo gasto nos braços abertos, %TBA), nas diferentes doses de CPA utilizadas (ANOVA, $p > 0.05$), indicando que as drogas não induziram efeitos nas medidas de ansiedade. Em T2 houve uma redução significativa na exploração dos braços abertos (%EBA e %TBA) em relação a T1, para os grupos controle e SAL-CPA nas doses de CPA de 0,016 nmol e 0,052 nmo/0,1 μ l ($p < 0,05$), sugerindo uma evocação da aprendizagem aversiva relacionada aos braços abertos. Os grupos LH que receberam infusão de SAL (LH-SAL) ou CPA (LH-CPA) não diminuíram significativamente as %EBA e %TBA (ANOVA, $p > 0,05$) nas três doses de CPA. Adicionalmete, na maior dose de CPA (0,16 nmol/0,1 μ l), apenas o grupo controle diminuiu as %EBA e %TBA ($p < 0,05$) em T2. Não houve mudanças significativas nas entradas dos braços fechados (EBF) (ANOVA, $p > 0,05$), medida representativa da atividade locomotora dos animais. Nossos resultados sugerem que a L-histidina e os receptores H_1 presentes na amígdala não participam dos estados de ansiedade, mas estão envolvidos no comprometimento da memória emocional em camundongos reexpostos ao LCE.

Palavras-chave: camundongos, ansiedade, memória emocional, clorfeniramina, amígdala, labirinto em cruz elevado.

ABSTRACT

This study investigated the role of H₁ amygdala receptors in state-dependent memory deficits induced by L-histidine (LH). To address this question, we investigated the effects of H₁ antagonist chlorpheniramine (CPA) microinjected into the amygdala on anxiety and emotional memory retrieval in mice submitted to the EPM. Experimental subjects were 117 adult male Swiss mice weighing 25-32g at testing. Tests using an elevated plus-maze (EPM) were performed on two consecutive days: Trial 1 (T1) and Trial 2 (T2). Before each trial, mice were intraperitoneally (IP) injected with LH (500mg/kg), a histaminergic precursor. Two hours later, they were microinjected with chlorpheniramine (CPA; 0.016, 0.052, or 0.16 nmol/ 0.1 µl), or saline (SAL) into the amygdala, and five minutes later re-exposed to the EPM. For each CPA dose administered, the animals were randomly assigned to four groups based on drug treatment: control (i.p injection and i.a SAL), LH-SAL (i.p injection LH and i.a SAL), SAL-CPA (i.p injection SAL and i.a CPA) and LH-CPA (i.p injection of LH and i.a CPA). The data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) and Fisher LSD tests. IP injection of LH and microinjection of CPA into the amygdala did not induce significant T1 differences between groups for percentages of open arm entries (%OAE) or open arm time (%OAT) (ANOVA, $p > 0.05$), which indicated that the drugs did not affect anxiety. In T2, the control group and the groups that received IP injection of SAL and an 0.016- or 0.052-nmol infusion of CPA (SAL-CPA) demonstrated significant reductions in open arm exploration (%OAE and %OAT) ($p < 0.05$), suggesting a retrieval of aversive information concerning the open arms. Importantly, the LH groups that received an injection of SAL (LH-SAL) or CPA (LH-CPA) did not exhibit decreased open arm activity; no significant differences in %OAE and %OAT ($p > 0.05$) were observed between T1 and T2, suggesting that the LH-induced deficit in emotional memory retrieval was not reversed by CPA injection. Furthermore, animals that received IP injections of SAL and 0.16 nmol infusion of CPA (SAL-CPA) did not exhibit decreased open arm exploration in T2 compared to T1 ($p > 0.05$). No significant changes were observed in the number of enclosed arm entries (EAE), an EPM index of general exploratory activity. Taken together, these results suggest that the H₁ receptors in the amygdala are not implicated in anxiety-like behaviors but are involved in emotional memory deficits induced by the T1/T2 EPM protocol in mice.

Keywords: mice; anxiety, emotional memory, chlorpheniramine, amygdala, elevated plus-maze;

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Divisão nuclear e subdivisões da amígdala de rato.....	16
Figura 2. (A) Figura esquemática da distribuição das fibras nervosas histaminérgicas nos encéfalos de ratos (secção sagital). (B) Sistema neural histaminérgico no encéfalo de humanos.....	20
Figura 3. Labirinto em cruz elevado.....	30
Figura 4. Representação esquemática dos locais de injeção dentro da amígdala de camundongo. Os cortes estão entre -1.06 mm e -1.46 mm do bregma de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (2001). O número de pontos é menor do que o total de camundongos devido à sobreposição.....	33
Figura 5. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e intra-amígdala (i.a) de SAL ou CPA (0,016 nmol/0,1 µl) nas porcentagens de entradas (%EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (%TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE. Ambas as drogas foram administradas antes do teste. Grupos: controle: SAL-SAL (injeção i.p e i.a de SAL); LH-SAL (injeção i.p de LH e i.a de SAL); SAL-CPA (injeção i.p de SAL e i.a de CPA) e LH-CPA (injeção i.p de LH e i.a de CPA). * $p < 0,05$, para T1 comparado com T2. (ANOVA seguida do teste de Fisher LSD).....	37

Figura 6. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e intra-amídala (i.a) de SAL ou CPA (0,052 nmol/0,1 µl) nas porcentagens de entradas (%EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (%TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE. Ambas as drogas foram administradas antes do teste. Grupos: controle: SAL-SAL (injeção i.p e i.a de SAL); LH-SAL (injeção i.p de LH e i.a de SAL); SAL-CPA (injeção i.p de SAL e i.a de CPA) e LH-CPA (injeção i.p de LH e i.a de CPA). * $p < 0,05$, para T1 comparado com T2. (ANOVA seguida do teste de Fisher LSD).....41

Figura 7. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e intra-amídala (i.a) de SAL ou CPA (0,016 nmol/0,1 µl) nas porcentagens de entradas (%EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (%TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE. Ambas as drogas foram administradas antes do teste. Grupos: controle: SAL-SAL (injeção i.p e i.a de SAL); LH-SAL (injeção i.p de LH e i.a de SAL); SAL-CPA (injeção i.p de SAL e i.a de CPA) e LH-CPA (injeção i.p de LH e i.a de CPA). * $p < 0,05$, para T1 comparado com T2. (ANOVA seguida do teste de Fisher LSD).....45

LISTA DE TABELAS

Pág

Tabela 1. Grupos Experimentais submetidos ao LCE- tratamento pré-T1 (exposição) e pré- T2 (reexposição) de injeção i.p LH (500mg/kg) e central de SAL ou CPA..... 31

Tabela 2. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e da infusão de CPA (0,016nmol) na amígdala, ambas as drogas administradas pré-teste, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE. 39

Tabela 3. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e da infusão de CPA (0,052nmol) na amígdala, ambas as drogas administradas pré-teste, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.....43

Tabela 4. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e da infusão de CPA (0,16 nmol) na amígdala, ambas as drogas administradas pré-teste, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AV	Via amidalofugal ventral
BAs	Braços abertos
CaMKII	Proteína cinase II dependente de cálcio e calmodulina
BL	Basolateral
CPA	Clorfeniramina
EBF	Entrada nos braços fechados
EBA	Entradas nos braços abertos
% EBA	% entradas nos braços abertos
ET	Estria terminal
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HA	Histamina
i.p	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
LH	L-histidina
NE	Norepinefrina
TM	Núcleo tuberomamilar
LTP	Potenciação de longa duração
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
Sal	Salina
SNH	Sistema neural histaminérgico

SNC Sistema nervoso central
T1 Teste 1
T2 Teste 2
TBA Tempo nos braços abertos
%TBA % tempo nos braços abertos
TBF Tempo no braço fechado
TC Tempo no centro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A memória e as emoções	13
1.1.1 Amígdala	14
1.2 Memória emocional: modulação na amígdala	17
1.3 Sistema neural histaminérgico	20
1.4 Papel dos receptores histaminérgicos H ₁ sobre os comportamentos emocionais.	23
1.5 Modelo experimental: labirinto em cruz elevado	24
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Sujeitos experimentais	28
3.2 Drogas	28
3.4 Aparato e Procedimento geral	29
3.5 Tratamento farmacológico	30
3.6 Análise comportamental	31
3.7 Histologia	32
3.8 Análise estatística	33
3.9 Ética	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Efeito da injeção i.p LH (500mg/kg) e da infusão intra-amígdala de SAL ou CPA (0,016 nmol/0,1 µl) nos comportamentos de camundongos expostos (T1) e reexpostos (T2) ao LCE.	35
4.2 Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e infusão intra-amígdala de SAL ou CPA (0,052 nmol/0,1 µ) nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.	40
4.3 Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e infusão intra-amígdala de SAL ou CPA (0,16 nmol/0,1 µ) nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.	44
5. DISCUSSÃO	48
5.1 Efeitos da administração i.p de LH (500mg/kg) e da infusão de SAL ou CPA nas doses de 0,016nmol; 0,052 nmol; 0,16 nmol/0,1 sobre as respostas de ansiedade.	48
5.2 Modelos experimentais e memória emocional: modulação da amígdala.	50
5.3 Efeitos da administração i.p de L-histidina e da microinfusão de CPA (0,016nmol; 0,052 nml; 0,16nmol) sobre a memória emocional.	52
5.4 Interação do sistema histaminérgico e colinérgico na modulação da memória emocional	54

5.5 Modulação tônica do sistema histaminérgico nos comportamentos emocionais. _____	55
6. <i>CONCLUSÃO</i> _____	58
7 <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> _____	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 A memória e as emoções

A memória é um processo cognitivo crítico para se estabelecer uma identidade como indivíduo, ou seja, ela nos ajuda a definir quem somos. Além disso, é através da memória que percorremos os vários caminhos, nos quais, nossas experiências passadas são usadas para interpretar e agir sobre nossas experiências futuras (CURRAN & MINTZER, 2006). O arquivo de informações que possuímos e a facilidade em acessá-lo através da memória são vitais para que possamos interpretar o que acontece em nossa volta, e tomar decisões. Portanto, qualquer déficit no processamento da memória, seja por razões naturais, como no envelhecimento, ou devido às doenças degenerativas, como ocorre na doença de Alzheimer, compromete a capacidade de interação com o mundo (HASS & CANLI, 2008).

Investigações sistemáticas em relação às regiões encefálicas que estariam envolvidas com as emoções tiveram início no século XX. O anatomista James Papez (1883-1953) foi um dos pesquisadores que propôs, em 1937, a primeira teoria sobre um circuito neural que constituiria o substrato para a expressão e a experiência emocional. O circuito proposto por Papez era formado por estruturas interligadas, como o hipocampo, os corpos mamilares, os núcleos talâmicos anteriores, e o giro do cíngulo. O hipotálamo era o elemento fundamental para a expressão emocional, enquanto o giro do cíngulo era considerado como uma área cortical receptiva para as experiências emocionais. MacLean (1952) introduziu na literatura a expressão sistema límbico, que incluiria as estruturas inicialmente propostas por Papez, e outras regiões, como a amígdala, o septo, e o córtex pré-frontal. Atualmente, a expressão sistema límbico continua sendo usada e se refere a um conjunto de estruturas encefálicas que participa da coordenação subjetiva e comportamental das emoções (CANTERAS & BITTENCOURT, 2008).

Ultimamente, uma atenção considerável tem sido direcionada para o entendimento do impacto das emoções nos sistemas cerebrais envolvidos com o processamento da memória. Estudos comportamentais apontam uma associação entre as emoções e a memória, demonstrando forte ligação entre diferentes estados emocionais e o

armazenamento, consolidação e a evocação das memórias (HASS & CANLI, 2008). Segundo Damásio (1996), “A emoção modula constantemente a forma como os dados e os acontecimentos são guardados na memória”. Quando uma pessoa vivencia mudanças no seu estado emocional ou humor, há mudanças concomitantes na sua maneira de processar as informações provenientes do meio externo. Assim, a memória para eventos com um forte componente emocional torna-se mais eficiente em termos adaptativos, em relação àquelas para eventos neutros, uma vez que estímulos emocionais apetitivos (recompensa) ou aversivos (defesa contra um perigo e luta com um predador) mostram-se essenciais para a sobrevivência do indivíduo e de sua espécie (QUEVEDO et al, 2003; LEDOUX, 2000). Por outro lado, nas desordens emocionais, como no estresse pós-traumático, ocorre uma persistência de eventos das memórias traumáticas vivenciadas (BREWIN et al. 2007). Segundo Gerritsen et al (2011), a recordação persistente das memórias com valência emocional negativa parece estar associada ao estado de humor. Indivíduos com estado de humor deprimido apresentam uma tendência a se lembrarem de recordações tristes ou pessimistas mais facilmente. Além disso, a vivência constante de memórias com cunho negativo tem sido considerada um dos principais indícios para o desenvolvimento da depressão.

Dentre as regiões cerebrais envolvidas com a modulação das emoções no processamento da memória, encontra-se o complexo amigdalóide. Estudos realizados em humanos por Gerritsen et al (2011) mostraram que indivíduos saudáveis não depressivos com uma tendência maior a lembranças de memórias negativas apresentavam um volume maior da amígdala e volume menor do hipocampo ao exame de ressonância magnética. Estudos prévios em roedores sugerem uma influência da estimulação emocional na memória através de mecanismos neurobiológicos na amígdala, além da sua interação com outras regiões cerebrais, como por exemplo, o hipocampo, nos mecanismos de memória (RICHARDSON et al., 2004; ALVAREZ & RUARTE, 2002).

1.1.1 Amígdala

O estudo das emoções em neurociências tornou-se possível através do mapeamento dos sistemas neurais envolvidos nas respostas emocionais (PESSOA, 2008). Paralelamente, investigações comportamentais têm identificado a amígdala como uma estrutura chave nos mecanismos neurobiológicos das emoções, e apontam para a modulação dos núcleos da amígdala, principalmente o núcleo BL, nos comportamentos emocionais

(MCGAUGH, 2004; KNAPSKA et al, 2007; SAH et al., 2003). Os estudos de Knapska et al (2007) e Sah et al (2003) sugerem, ainda, a presença de circuitos inter e intra-neurais, nessa estrutura, essenciais no processamento da memória emocional.

A amígdala é considerada, dentre outras regiões do sistema nervoso central (SNC), uma estrutura importante na aquisição e no armazenamento da memória emocional, uma vez que participa das intermediações entre as informações sensoriais e as respostas comportamentais e fisiológicas, principalmente, durante as experiências emocionais (MCNAUGHTON & CORR, 2004; KNAPSKA et al., 2007). Estudos comportamentais sugerem a participação da amígdala nos processos gerais relacionados com as emoções: expressão facial (VICTOR, et al., 2010), comportamento sexual (MARAS & PETRULIS, 2010) e no estresse pós-traumático (SHIN & LIBERZON, 2010). Além das funções relacionadas com as emoções, vários estudos apontam para a contribuição da amígdala na modulação dos processos cognitivos, particularmente na aprendizagem emocional (PARE et al., 2004; EHRLICH et al., 2009), e tomada de decisão (GUPTA et al., 2011).

Em relação a sua anatomia, a amígdala é um complexo de núcleos localizado na porção ântero-medial de cada lobo temporal. Apresenta forma de amêndoa e é composta por aproximadamente treze núcleos (complexo amidaloide), cada um com sítio distinto de conexão no encéfalo humano e de outras espécies animais. Os núcleos da amígdala são divididos em subdivisões que apresentam extensivas conexões internucleares e intranucleares. Esses núcleos e os subnúcleos são diferenciados conforme a sua citoarquitetura, histoquímica e, nas suas conexões (SAH et al., 2003).

Segundo a nomenclatura proposta por Knapska (2007) os núcleos da amígdala são divididos em grupos específicos (FIGURA 1):

- grupo centromedial (núcleos: central e centromedial);
- grupo profundo ou basolateral (núcleos: lateral, basal e basal acessório);
- grupo superficial ou cortical (núcleos: cortical e trato olfatório lateral);

Além dos grupos acima citados, os mesmos autores sugerem, ainda, um grupo de núcleos separados, que não se enquadram dentro das divisões propostas, e são denominados de massas celulares intercaladas e área amígdala hipocampal (PARE et al., 2004; KNAPSKAS, 2007).

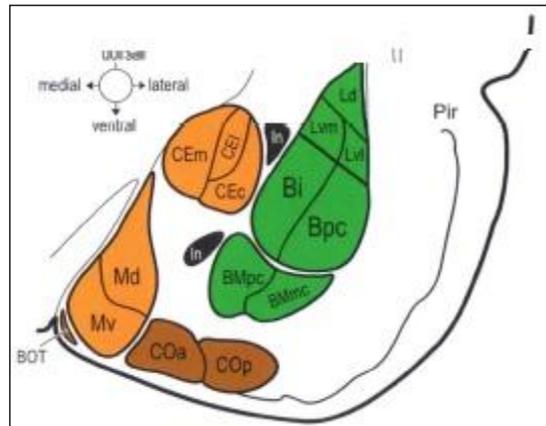


FIGURA 1. Divisão nuclear e subdivisões da amígdala de rato. Os núcleos amígdalares são divididos em 3 grupos: o centromedial (laranja), profundo ou basolateral (verde) e cortical (marrom). Na região cinza escuro os núcleos intercalados estão indicados. CEc, núcleo central subdivisão nuclear; CEL, núcleo central, subdivisão lateral; CEM núcleo central, subdivisão medial; Coa, núcleos cortical, subdivisão anterior; COp, núcleo cortical, subdivisão posterior; BOT, núcleo vermelho do trato olfatório; Bi, núcleo basal, subdivisão intermediária; Bpc, núcleo basal, subdivisão parvocelular; BMmc, núcleo basomedial, subdivisão magnoceular; BMpc, núcleo basomedial, subdivisão parvocelular; Ld, núcleo lateral, subdivisão dorsal; Lvm, núcleo lateral subdivisão ventromedial; Lvl, núcleo lateral, subdivisão ventrolateral; Md, núcleo medial, subdivisão dorsal; Mv, núcleo medial, subdivisão ventral; In, núcleo intercalado; Pir, córtex piriforme. Fonte: KNAPSKA, 2007.

Segundo Kalin (2004) e Sah et al (2003), a amígdala participa de uma rede neural bem organizada, conectando-se com estruturas mesencefálicas e prosencefálicas. As aferências que chegam à amígdala, principalmente nos núcleos basolaterais (BL), podem ser divididas em àquelas provenientes do córtex cerebral e tálamo, fornecendo informações das áreas sensoriais, e das estruturas relacionadas com os sistemas de memória; enquanto aquelas provenientes das estruturas prosencefálicas, como o hipotálamo e o tronco cerebral, carregam informações comportamentais e dos sistemas autonômicos. Essas aferências projetam-se de forma específica para os núcleos do complexo amigdalóide, e as interconexões dentro da amígdala permitem a integração das informações provenientes principalmente do córtex sensorial, através de conexões glutamatérgicas.

Os núcleos amígdaloide emitem eferências através da via amígdalo-fugal ventral (AV) e a estria terminal (ET), que são os dois principais feixes de fibras que conectam a amígdala com outras áreas encefálicas (KNAPSKA et al, 2007). Os feixes de fibras da ET surgem principalmente dos núcleos do grupo corticomedial e emitem fibras para estruturas subcorticais como hipotálamo ventromedial, septo, e área pré-óptica medial (LEONARD & SCOTT apud Knapska et al, 2007); enquanto a via AV apresenta-se difusa, permitindo a conexão entre os núcleos basolaterais da amígdala, com o tálamo, hipotálamo, septo, núcleo acumbente, giro parahipocampal, córtex cingular e orbitofrontal. Adicionalmente, a área perirrinal juntamente com o córtex frontal recebe aferências dos núcleos amígdaloide. Outra via eferente de extrema importância parte do complexo BL e apresenta substancial projeção para o lobo temporal medial, região responsável pela mediação dos mecanismos de memória (KNAPSKA et al, 2007).

Ainda, segundo Price (2003), a abordagem funcional permite dividir as conexões do complexo amígdaloide em três principais sistemas:

- 1) sistemas de entradas (aferências) sensoriais: proporciona informações sensoriais para a amígdala, modulando o processamento sensorial, composto principalmente de projeções recíprocas entre a amígdala com o córtex olfatório e vias ascendentes viscerais;
- 2) sistemas de saídas (eferências); do complexo amígdaloide para o hipotálamo e estruturas do tronco encefálico, que modulam as funções viscerais relacionadas à significância emocional provenientes dos estímulos internos e externos;
- 3) sistemas de conexões: conexões da amígdala com áreas do córtex pré-frontal ventromedial, insular e temporal, assim como, núcleos talâmicos mediais e núcleos da base. Essas conexões permitem que essa estrutura participe diretamente da regulação dos comportamentos emocionais, e influencie respostas motoras somáticas;

1.2 Memória emocional: modulação na amígdala

O progresso das pesquisas em áreas mais específicas como a biologia celular tem permitido uma visão mais abrangente dos principais mecanismos envolvidos com o processamento da memória, como por exemplo, a influência da liberação de hormônios e a expressão de proteínas, relacionados com a formação e a evocação da memória durante experiências com alto estímulo emocional (HU et al., 2007).

Estudos comportamentais têm investigado o envolvimento da amígdala em mediar os efeitos da liberação de hormônios durante situações de estresse, sugerindo que vários sistemas neuromodulatórios regulam os processos de memória (MCGAUGH, 2004). Dentre os sistemas envolvidos com a expressão dos comportamentos emocionais estão os adrenérgicos (epinefrina e norepinefrina), e os hormônios esteroides (cortisol/corticosterona). Além disso, evidências comportamentais sugerem que a amígdala facilita os processos emocionais através das ações integradas comuns à ativação noradrenérgica e colinérgica dos núcleos BL, e ainda, dos núcleos do tronco encefálico e do *locus coeruleus* promoveriam a ativação direta da amígdala mediada pela norepinefrina (MCGAUGH, 2004). Durante a estimulação emocional, a Norepinefrina (NE) é liberada por neurônios provenientes do *locus coeruleus* e área tegmentar lateral do tronco. Esses neurônios enviam projeções para regiões encefálicas envolvidas na formação da memória, como o hipocampo e a amígdala, indicando a participação da estimulação adrenérgica na expressão da memória emocional (MCGAUGH, 2004). Estudos conduzidos por Mcgaugh & Roozendaal (2002) mostraram que a liberação de NE e a ativação de receptores adrenérgicos na amígdala basolateral são críticas para a regulação dos hormônios liberados durante as experiências emocionais, promovendo uma modulação nos mecanismos da memória emocional em animais e humanos. Resultados semelhantes foram encontrados por Roozendaal et al (2008), que demonstraram um efeito facilitatório da NE administrada na amígdala de ratos, na consolidação da memória no teste de reconhecimento de objetos. Outros estudos mostraram que a administração de antagonistas adrenérgicos na amígdala prejudica os processos de memória (FERRY et al. 1999; HATFIELD & MCGAUGH, 1999). Portanto, os estudos acima citados indicam um importante papel da ativação noradrenérgica na amígdala na modulação dos mecanismos da memória emocional.

Paralelamente aos efeitos na formação da memória, a NE e a estimulação β -adrenérgica desempenham uma modulação determinante sobre a indução da potenciação de longa duração (LTP). Esse mecanismo consiste de uma intensificação duradoura da magnitude da resposta sináptica de um neurônio, após uma estimulação aferente de alta frequência. Além disso, investigações mostram que a LTP é uma importante forma de plasticidade sináptica, portanto, um substrato celular nos mecanismos de memória (LYNCH,

2004; HAAS et al., 2008). Adicionalmente, dentre os mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica via LTP encontram-se a estimulação dos receptores glutamatérgicos (NMDA), o influxo de cálcio na espinha dendrítica pós-sináptica, e finalmente a ativação de proteínas cinases relacionadas à plasticidade, como por exemplo, a proteína cinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII), a proteína cinase A (PKA), e a proteína cinase C (PKC) (LYNCH, 2004; HAAS et al., 2008).

Além da NE, a histamina também facilita a LTP através da ativação dos receptores H₁, promovendo o aumento dos níveis de cálcio intracelular, e a subsequente ativação da PKC, ambos requeridos na indução da LTP (HAAS et al., 2008). Estudo *in vitro* conduzido por Jiang et al (2005) sugere que a histamina pode aumentar a transmissão sináptica excitatória na amígdala, e, ainda, que esta modulação da atividade neuronal está relacionada com os processos fisiológicos e patofisiológicos mediados por essa estrutura, como a aprendizagem emocional e as desordens afetivas. Desta forma, o sistema neural histaminérgico (SNH) participa do processamento da memória emocional, através da plasticidade sináptica, em regiões do SNC relacionadas com as emoções, como por exemplo, a amígdala.

Como mencionado acima, a participação da amígdala num circuito neural bem organizado, permite-lhe integrar e coordenar as principais atividades sensoriomotoras, atuando efetivamente na modulação dos estados emocionais (MISSLIN, 2003). Por exemplo, em ambas as situações de medo e ansiedade, o complexo amigdalóide é a estrutura alvo para os estímulos ameaçadores, além de ser o local onde o sistema septo-hipocampal age para aumentar o valor emocional de tais estímulos levando assim a inibição comportamental (MCNAUGHTON & CORR, 2004). Além disso, essa estrutura parece representar o local para a integração das informações sensoriais polimodais, participa efetivamente nos processo de memória através do armazenamento das informações adquiridas durante as experiências emocionalmente relevantes (MCGAUGH et al., 2004). Adicionalmente, integra o circuito neural relacionado com o estresse (CUI et al., 2008), e não apenas detecta e organiza as respostas ao perigo, mas também, é o centro de aprendizagem para novas ameaças (LABAR, 1996).

O processamento da memória emocional é mediado pelo complexo amigdalóide sob a influência de diversos sistemas de neurotransmissores, como o adrenérgico e o colinérgico (MCGAUGH, 2004; DEBIEC et al., 2011). Esses neurotransmissores influenciam a estimulação neural na amígdala, tornando-a alvo potencial para a atuação de agentes farmacológicos como, por exemplo, as drogas histaminérgicas. Além disso, investigações

comportamentais apontam para o importante papel do SNH na modulação dos comportamentos emocionais, principalmente a aprendizagem e a memória emocional em roedores.

1.3 Sistema neural histaminérgico

Os neurônios que sintetizam e liberam a histamina encontram-se localizados no núcleo tuberomamilar (TM), especificamente na porção posterior do hipotálamo (YANAY & TASHIRO, 2007). Esse grupo de neurônios recebe aferências, principalmente, das áreas límbicas, como a área pré-óptica do hipotálamo e septo, e enviam projeções difusamente para regiões do SNC, como medula espinhal, tálamo, hipotálamo, núcleos da base, septo, hipocampo, amígdala e córtex (HAAS et al., 2008). Esse padrão difuso de distribuição das fibras nervosas histaminérgicas pode ser observado em roedores e humanos, conforme ilustrado na Figura 2 A, B.

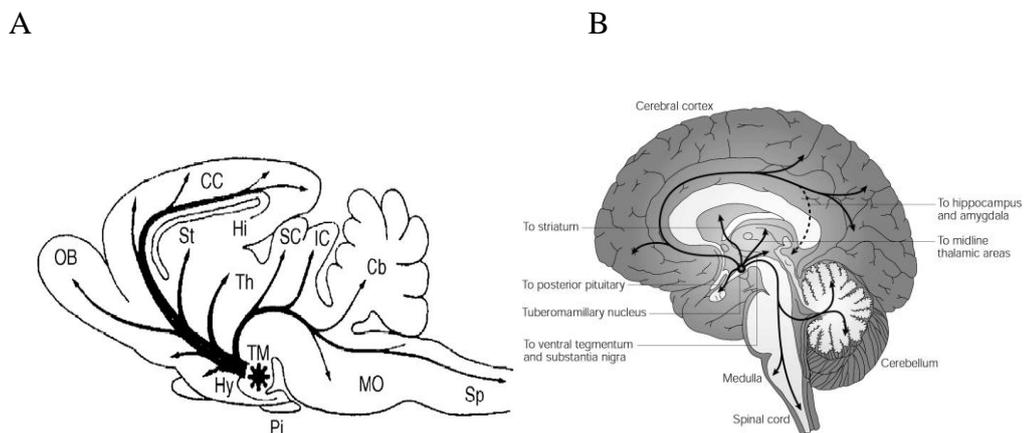


Figura 2. (A). Figura esquemática da distribuição das fibras nervosas histaminérgicas no cérebro de ratos (secção sagital). Abreviações: Cb: cerebelo; CC: córtex cerebral; Hi: Hipocampo; Hy: hipotálamo; IC: colículo inferior; MO: medula oblonga; OB: bulbo olfatório; Pi: pituitária; SC: colículo superior; SP: medula espinhal; St: núcleo estriado; Th: tálamo; TM: núcleo tuberomamilar. (YANAI & TASHIRO, 2007). (B) Sistema neural histaminérgico no encéfalo de humanos (HASS & PANULA, 2003).

A Histamina (HA) é uma amina (4-(2-ominoetio) imizadol (O β imidazolelitamina) sintetizada e transportada no encéfalo da maioria das espécies animais. Essa amina é sintetizada a partir da histidina, pela enzima histidina descarboxilase (HDO) que converte o aminoácido histidina em histamina, através da descarboxilação oxidativa. O término da ação da HA no encéfalo ocorre através de seu catabolismo para telemetilhistamina pela enzima histamina N-metiltransferase (LIN et al., 1991).

Assim como outros neurotransmissores, a histamina atua por meio de receptores acoplados a proteína G. Esses receptores ativam uma classe de proteínas através de ligantes específicos, e desta forma, iniciam uma cascata de eventos que vão regular a atividade de enzimas intracelulares ou canais iônicos (LEURS et al., 1995). Os efeitos da histamina sobre os sistemas biológicos são mediados por 4 tipos distintos de receptores (H_1 a H_4) metabotrópicos e associados a segundos mensageiros, que serão apresentados abaixo.

Os receptores H_1 , H_2 e H_3 são localizados principalmente no SNC, e a expressão de um quarto tipo de receptores (H_4) foi demonstrada inicialmente nos tecidos periféricos, como por exemplo, nos leucócitos (MORGAN et al., 2007). Entretanto, estudo recente sugere a existência dos receptores H_4 também no SNC de ratos e humanos (STRAKHOVA et al., 2009). Geralmente, os receptores H_1 e H_2 excitam ou potencializam os impulsos excitatórios (HAAS et al., 2008), enquanto a ativação dos receptores H_3 inibem a síntese e a liberação de histamina (HAAS et al., 2008; BROWN et al., 2001).

Os receptores histaminérgicos H_1 são metabotrópicos, acoplados a proteína G, (HAAS et al, 2008), e a sua estimulação ativa a fosfolipase C que leva a produção de dois segundos mensageiros, como o inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (LEURS et al., 1995). Os efeitos intracelulares da ativação desses receptores são mediados por segundos mensageiros envolvidos com o armazenamento do cálcio. Além disso, a ativação desses receptores provoca uma cascata de sinalização, como a produção de mensageiros retrógrados, como por exemplo, o ácido araquidônico e óxido nítrico, assim como fatores de transcrição de genes. Portanto, a estimulação dos receptores H_1 ativa uma cascata intracelular de sinalização pré e pós-sináptica implicando na plasticidade neural (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Os receptores H_1 têm significativa expressão no córtex, hipocampo, amígdala, tálamo, núcleo estriado e cerebelo (RYU et al., 1995; LINTUNEN et al. 1998).

Os receptores H_2 apresentam ampla expressão no encéfalo e medula espinhal, e são encontrados particularmente nos núcleos da base e em parte do sistema límbico (hipocampo e amígdala) (BROWN et al., 2001). Esses receptores também são acoplados a proteína G e quando estimulados ativam a adenil ciclase, e a liberação de segundo mensageiro

como adenosina monofosfato cíclico (AMPC), e subsequentemente ativação da PKA (LEURS et al., 1995). Da mesma maneira que os receptores H₁, a estimulação dos receptores H₂ pode disparar cascatas intracelulares e ativar reguladores chaves, responsáveis pelas mudanças funcionais e estruturais nas sinapses (BAKKER et al., 2004; ATZORI et al., 2000).

Os autorreceptores H₃ apresentam-se heterogeneamente distribuídos nas áreas cerebrais e estão localizados nos dendritos e terminais dos neurônios. A estimulação desses receptores leva a inibição da ativação da adenil ciclase, e consequente diminuição da produção do segundo mensageiro AMPC. No núcleo TM, esses receptores agem como autorreceptores modulando a liberação e a síntese de histamina. Como heterorreceptores pré-sinápticos, modulam de maneira negativa a liberação de outros neurotransmissores incluindo a acetilcolina, dopamina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). No encéfalo, são encontrados no córtex cerebral, hipocampo, amígdala, núcleo acumbente, núcleo estriado, substância negra, e cerebelo (BROWN et al., 2001).

A última classe de receptores, o H₄, é acoplada a proteína G e dentre suas funções podemos destacar a mediação da mobilização de cálcio, e da quimiotaxia de mastócitos e basófilos (LING et al., 2004). Outra função dessa classe de receptores é a propriedade antiprurídica dos antagonistas H₄, indicando sua possível ação terapêutica nas manifestações prurídicas crônicas em humanos (DUNFORD et al., 2007). Strakhova e colaboradores (2009) verificaram a presença desses receptores no SNC de ratos, com exceção ao hipocampo e hipotálamo. No mesmo estudo, foi verificada a existência desses receptores em regiões do SNC de humanos, incluindo o hipocampo, o córtex cerebral, o tálamo, amígdala e medula espinhal. A partir desses achados, os autores sugerem que devido a sua distribuição, os receptores H₄ podem estar envolvidos em mecanismos relacionados à dor (STRAKHOVA et al., 2009).

Devido à ampla distribuição dos receptores histaminérgicos no SNC, a HA participa de várias funções cerebrais. Esse neurotransmissor está envolvido nas funções cognitivas, aprendizagem e formação da memória, atenção, e no controle do ciclo do sono e vigília (HAAS et al., 2008; VAN RUITENBEEK et al., 2010; MOCHIZUKI et al., 1992), e da memória emocional (GIANLORENÇO et al., 2011; SERAFIM et al., 2010; ALVAREZ, 2009). Evidências comportamentais têm sugerido também, a atuação do SNH na ansiedade (MALMBERG-AIELLO et al., 2002; KUMAR et al., 2007; ZARRINDAST et al., 2010).

Além da participação do SNH nas funções acima citadas, estudos recentes indicam algumas evidências sobre o potencial das drogas histaminérgicas como recurso terapêutico em doenças neurológicas e distúrbios cognitivos, como por exemplo, na doença de

Parkinson, Alzheimer, narcolepsia, desordem de déficit de atenção e hiperatividade (BLANDINA et al, 2010; BENARROCH et al., 2010).

Estudos comportamentais demonstram a participação do SNH na modulação dos comportamentos emocionais, principalmente a aprendizagem e memória emocional, através das lesões e tratamentos farmacológicos nos núcleos tuberomilares (KLAPDOR et al., 1994; FRISCH et al., 1999), e em outras estruturas encefálicas decisivas nesses comportamentos como hipocampo, a amígdala e cerebelo (ALVAREZ & BANZAN, 2008; CANGIOLI et al., 2002; GIANLORENÇO et al., 2011b). Outros estudos têm ainda investigado o papel dos receptores histaminérgicos H₁ e H₂ na memória e plasticidade sináptica em camundongos geneticamente modificados para esses receptores (DAI et., 2006; DERE et al., 2003).

Entretanto, os resultados dos estudos referentes aos processos de aprendizagem e memória, e o papel do SNH durante a aquisição, armazenamento da informação e a evocação da memória permanecem contraditórios (DA SILVA et al., 2006).

1.4 Papel dos receptores histaminérgicos H₁ sobre os comportamentos emocionais.

Muitas das regiões cerebrais que expressam os receptores histaminérgicos H₁ estão relacionadas com as funções cognitivas. Dentre essas regiões, encontra-se a amígdala. Além disso, como já descrito anteriormente, a ativação dos receptores H₁ regula vias de sinalização intracelular e modula mudanças plásticas como a plasticidade neural, ambos os eventos envolvidos nos processos cognitivos como a aprendizagem e a memória (LINTUNEN et al. 1998).

Estudos comportamentais têm investigado o papel dos receptores H₁ na ansiedade e memória emocional em roedores. A HA, administrada na amígdala de ratos submetidos ao LCE, parece ter um efeito ansiogênico que pode ser revertido pela ação do antagonista H₁, pirilamina, mas não pelo antagonista H₂, cimetidina. Esses estudos apontam para a atuação dos receptores H₁ presentes na amígdala na modulação da ansiedade (ZARRINDAST et al., 2005). Yanay e colaboradores (1998) demonstraram que camundongos knock-out para os receptores H₁ apresentaram uma frequência menor de comportamentos relacionados com a ansiedade no LCE, sugerindo que a estimulação dos receptores H₁ está

relacionada com um efeito ansiogênico. Com relação aos processos de memória, estudos utilizando animais geneticamente modificados, com mutação do gene que codifica os receptores H₁ e H₂, demonstraram um comprometimento no teste de reconhecimento de objetos, e no teste de memória, indicando que os receptores H₁ e H₂ estão envolvidos nos mecanismos de aprendizagem e memória (DAI et al., 2006; ZLOMUZICA et al., 2009).

Os estudos acima citados sugerem que o SNH apresenta um papel modulatório sobre os mecanismos de ansiedade e aprendizagem emocional e que os receptores H₁ presentes na amígdala, participam desses mecanismos (ALVAREZ & RUARTE, 2009). Embora haja na literatura estudos investigando os efeitos dos agentes histaminérgicos administrados na amígdala nos comportamentos emocionais, não há evidências de outros grupos de pesquisa conduzindo investigações sobre a participação dos receptores H₁ da amígdala na aprendizagem e memória emocional utilizando como modelo o protocolo (T1/T2) no LCE.

1.5 Modelo experimental: labirinto em cruz elevado

O modelo experimental utilizado no presente estudo foi o LCE, que é um teste clássico utilizado para avaliar os efeitos de drogas sobre os estados de ansiedade em roedores. (FILE et al., 1992; PELLOW et al., 1985). O LCE foi validado para ratos (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985) e camundongos (STEPHENS et al., 1986; LISTER, 1987), e se baseia no repertório comportamental dos roedores frente a uma situação de conflito resultante da tendência natural dos animais de explorarem ou de evitarem situações perigosas (CRUZ-MORALES et al., 2002). Evidências comportamentais sugerem que os espaços abertos são considerados os principais estímulos ansiogênicos quando comparados com a altura, ou a novidade (TREIT et al., 1993; SIMON et al., 1994). De acordo com Carobrez e Bertoglio (2005), o LCE induz um estado de medo espontâneo dado que durante a sessão de teste, com livre exploração do labirinto, há uma clara preferência dos animais em permanecerem nos braços fechados em relação aos braços abertos. Além disso, segundo Treit et al (1993), os roedores preferem os braços fechados do labirinto em relação aos braços abertos devido à possibilidade de realizarem tigmotaxia. Porém estudo realizado por Martínez

et al. (2002) mostrou que modificações nos braços abertos do LCE permitindo a realização de tigmotaxia não provocaram aumento na exploração dessas áreas, não corroborando, portanto, esta hipótese.

Ultimamente, a sua utilização tem se difundido para o entendimento das bases biológicas das emoções relacionadas com a memória (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005), devidos as mudanças comportamentais, como por exemplo, o aumento da esquiva dos braços abertos (BAs), observadas durante a reexposição no LCE (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). O aumento da esquiva dos BAs na segunda exposição pode estar relacionado com a memória emocional dessas áreas do labirinto, consideradas potencialmente perigosas (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). A experiência nos BAs induz um aumento significativo dos níveis sanguíneos de corticosterona em ratos, quando comparado aos animais expostos aos braços fechados. Desta forma, os BAs representam uma área com um significado emocional mais pronunciado dentro do campo exploratório dos animais no LCE (DAL-CÓL et al., 2003).

Diferentes estudos têm investigado a relação entre as emoções e a cognição no repertório comportamental de roedores através da utilização do protocolo exposição (T1) e reexposição (T2) no LCE (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; DAL-CÓL et al., 2003). Segundo Galvis-Alonso et al (2010), os animais adquirem informações a respeito das áreas seguras e potencialmente perigosas do labirinto durante o teste, e a utilização de uma exposição subsequente permite inferir aquisição e retenção da memória. Adicionalmente, exposições repetidas induzem mudanças comportamentais (diminuição das entradas e tempo gasto nos BAs; aumento do tempo gasto no centro e nos braços fechados) dependentes da experiência prévia no LCE. Além disso, a diminuição da exploração dos BAs pode ser observada até mesmo depois de um período de 9 e 33 dias após a primeira exposição (GALVIS- ALONSO et al., 2010), indicando que a análise da atividade nos BAs, numa segunda exposição, permite inferir aprendizagem e memória emocional em roedores (JURGENSON et al., 2010; GIANLORENÇO et al., 2011a; SERAFIM et al., 2010; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002). Portanto, o uso do protocolo T1/T2 no LCE é um método efetivo para avaliar a participação de neurotransmissores, como a histamina, na modulação dos comportamentos emocionais.

O sistema histaminérgico promove um importante mecanismo para ativação refinada da amígdala, e pode participar da modulação desta estrutura relacionada a processos biológicos (JIANG et al., 2005), tais como ansiedade, aprendizagem e memória (HASENÖHRL et al., 2001; ALVAREZ & RUARTE, 2002). Apesar da ação da histamina e

de componentes relacionados sobre os estados de ansiedade e mecanismos de aprendizagem e memória, já terem sido analisados em algumas regiões cerebrais de ratos, como o hipocampo (ALVAREZ et al., 2002; ROSTAMI et al., 2006), amígdala (PASSANI et al., 2001; ZARRINDAST et al., 2005), núcleo acumbente (ALVAREZ et al., 2002; HASENÖHRL et al., 2001), colículo inferior e substância periaquedutal (SANTOS et al., 2001), há poucas investigações do efeito do sistema histaminérgico na amígdala de camundongos durante a reexposição no LCE.

O nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a participação do SNH sobre a aprendizagem emocional em camundongos (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO et al., 2011a; GIANLORENÇO et al., 2011b). Esses resultados corroboram estudos anteriores que apontavam para uma atuação desse sistema na modulação da memória emocional (CANGIOLI et al., 2002). Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que camundongos que receberam injeção i.p de LH pré-T1 e pré-T2, não reduziram a atividade dos braços abertos, após 24 horas de T1. A partir desse dado, podemos inferir que houve um comprometimento na habilidade de evocar a memória durante a re-exposição, quando os animais estavam sob o efeito da HA (SERAFIM et al., 2010). Adicionalmente, os resultados do estudo acima citado mostraram que a LH não induziu efeitos sobre a aquisição e o armazenamento da memória, uma vez que o grupo LH-SAL (injeção i.p pré-T1 de LH, e i.p pré-T2 de SAL) reduziu a atividade exploratória dos braços abertos durante a re-exposição, indicando que a aprendizagem ocorreu na primeira exposição para esse grupo, e que a memória foi evocada em T2.

Diante dos resultados encontrados no nosso laboratório surgiu o questionamento de quais receptores histaminérgico estariam envolvidos no déficit da evocação da memória emocional em camundongos re-expostos ao LCE. Assim, considerando o papel central da amígdala sobre a expressão das memórias emocionais (MCGAUGH, 2004, 2004), e tendo em vista que o efeito do sistema histaminérgico nessa região encefálica ainda não está bem elucidado, o presente trabalho teve como objetivo auxiliar no esclarecimento do papel dos receptores histaminérgicos H_1 presentes na amígdala na modulação da ansiedade e na aprendizagem emocional de camundongo, em modelo de LCE.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi verificar se o déficit da evocação da memória emocional estado dependente induzido pela L-histidina em camundongos é mediado pelos receptores H_1 na amígdala. Assim, foram investigados os efeitos da clorfeniramina, microinjetada na amígdala, sobre a ansiedade e a evocação da memória emocional em camundongos pré-tratados com LH, expostos e reexpostos ao LCE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados camundongos machos da cepa Suíço-Albino provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pesando entre 25 e 32g. Os animais foram agrupados em 4 animais por caixa (31×20×13 cm) em ambiente controlado com ciclo de luz (ciclo claro escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 e apagadas às 19: horas), temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade. Os testes foram conduzidos na fase clara entre (900-1600h) do ciclo. Todos os animais eram experimentalmente ingênuos.

3.2 Drogas

As drogas utilizadas foram a L-histidina (LH) (Research Biochemicals International, USA) injetada i.p no volume de 2ml/kg de peso corporal e dose final de 500mg/kg (KUMAR et al., 2007; SERAFIM et al, 2010), e o maleato de clorfeniramina - CPA (Sigma Chemical Co, St Louis, MO), antagonista do receptor H_1 , microinjetada num volume de 0,1 μl e dose final (0,016nmol/0,1 μl ; 0,052 nmol/0,1 μl ; 0,16nmol/0,1 μl). As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios em ratos (PRIVOU et al., 1998) e definidas através de estudo piloto.

Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina estéril (0.9%). Os animais dos grupos controles receberam solução salina em volume equivalente ao da droga. Ambas as drogas e salina foram colocadas em tubos eppendorf codificados sob-refrigeração. Esta codificação era desconhecida pelo experimentador no momento do teste e da análise comportamental.

3.3 Cirurgia e Microinjeção

Os animais receberam implantação intra-craniana de cânulas-guia (25 gauge) de 7 mm de comprimento, bilateralmente na amígdala, após anestesia com solução de Cloridrato de Ketamina (40-80mg/kg) e Xilasina (5-10mg/kg). O procedimento cirúrgico foi realizado em aparelho estereotáxico (Stoelting Co, Illinois, USA), e as coordenadas tiveram por base os valores (-0.8mm posterior ao bregma, \pm 2,7 mm lateral á sutura sagital) e 3,7 mm ventral à superfície craniana (FRANKLIN & PAXINOS, 2001). As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico (JET resina e líquido polimerizante). Os mandris foram inseridos no interior das cânulas-guia para evitar problemas de obstrução e para reduzir contaminação. Para a analgesia pós-operatória, os animais receberam 0,2 ml de paracetamol infantil (200mg/ml) em 250 ml de água (concentração final de 0,16 mg/ml), adicionado à água por um período de 3 dias (MESSIER, et al, 1999; NUNES-DE-SOUZA, et al, 2008).

O procedimento de microinjeção ocorreu após um período de três dias de recuperação dos animais e consistiu na remoção dos mandris, inserção das agulhas de injeção, injeção da solução por 60 segundos na amídala direita e esquerda, permanência das agulhas de injeção por 90 segundos após o término das injeções, e inserção dos mandris enquanto o animal foi contido manual e gentilmente pelo experimentador. As agulhas de injeção tinham comprimento de 8mm (33 gauge), e foram conectadas, por meio de tubo de polietileno (PE-10), às microseringas Hamilton de 5 μ l. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar 0,1 μ l de solução durante 60 segundos na amígdala. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmava o fluxo da solução.

3.4 Aparato e procedimento geral

O equipamento utilizado foi o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) formado por dois braços abertos (30 x 6 x 0,6 cm) unidos por uma plataforma central (6 x 6 cm) a dois braços fechados constituídos de acrílico cinza (30 x 6 x 15,5 cm) (Figura 2). O aparato fica elevado do solo a 38,5 cm (modificado de LISTER, 1987).



FIGURA 3. Labirinto em Cruz Elevado.

O experimento foi realizado em dois dias consecutivos, teste 1 (T1) e teste 2 (T2). Em T1, os animais foram injetados de acordo com o tratamento farmacológico (Tabela 1), e depois de esperado cinco minutos após a injeção central, cada camundongo foi transportado numa caixa individual de paredes opacas (33×15×13cm) até o labirinto. Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto com a face voltada para o braço aberto, e o teste teve duração de cinco minutos. Depois de cada teste o labirinto foi limpo com álcool 20%. Os animais foram injetados 24 horas depois da realização de T1, e reexpostos ao LCE (T2), seguindo-se os mesmos procedimentos acima descritos.

Uma câmera posicionada a 90°C do labirinto e acoplada a um computador a uma sala adjacente a sala de teste permitiu os registros dos testes (T1 e T2) através do programa GeoVision GV-600 System. Os comportamentos foram avaliados através da análise das imagens por um observador treinado, utilizando-se um software (X-Plot-Rat) (GARCIA et al., 2005).

3.5 Tratamento farmacológico

Os animais receberam injeção i.p de LH (500mg/kg), e após 2 horas, tempo estimado para a metabolização da L-histidina em histamina no SNC (HUANG et al., 2003; ISAYAMA et al., 2001), os animais foram microinjetados bilateralmente com CPA (0,016 nmol /0,1 µl; 0,052 nmol /0,1 µl; 0,16nmol/0,1 µl) através de injeção central na amígdala, e

após 5 minutos submetidos ao LCE. Ambas as drogas foram administradas pré-T1 e pré-T2, sob as mesmas condições experimentais. O tratamento farmacológico foi realizado conforme exibido na tabela 1:

Tabela 1. Grupos Experimentais submetidos ao LCE- tratamento pré-T1 (exposição) e pré-T2 (reexposição) de injeção i.p LH (500mg/kg) e central de SAL ou CPA

Grupos Experimentais	Tratamento Farmacológico			
	Exposição (T1)		Reexposição (T2)	
	Tratamento Sistêmico	Tratamento Central	Tratamento Sistêmico	Tratamento Central
Controle	SAL	SAL	SAL	SAL
LH - SAL	LH	SAL	LH	SAL
SAL-CPA	SAL	CPA	SAL	CPA
LH-CPA	LH	CPA	LH	CPA

3.6 Análise comportamental

Os comportamentos analisados envolveram tanto os parâmetros convencionais (LISTER, 1987), quanto os etológicos (CRUZ et al., 1994; RODGERS & JOHNSON, 1995). *Medidas Convencionais:* Frequência de entradas nos braços abertos e fechados (EBA, EBF) (a entrada em um braço definida quando as quatro patas dos animais estiverem fora da área central) e duração do tempo gasto nestes compartimentos (TBA, TBF) e na plataforma central (TC). Estes dados foram usados para o cálculo das porcentagens de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (Entradas: $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$; Tempo: $[\text{tempo no compartimento}/300] \times 100$). Medidas complementares: Foram registrados a frequência de levantamentos (*Rearing*- elevação do corpo sobre as patas traseiras); os mergulhos (*head-dipping*- movimentos exploratórios da cabeça/ombros em direção ao solo); as posturas de esticar o corpo [*stretched attend postures (SAP)*– movimentos que consistem em esticar o corpo e retrá-lo a posição original, sem ocorrência de locomoção]. Como os sinais de tigmotatismo são

importantes para a exploração no LCE, os comportamentos de mergulhar a cabeça e esticar o corpo são diferenciados quanto ao local de sua ocorrência no labirinto. Os braços fechados e a plataforma central foram considerados áreas “protegidas” do labirinto enquanto os braços abertos como “áreas desprotegidas” (TREIT et al., 1993; RODGERS & JOHNSON, 1995).

3.7 Histologia

Após o término do experimento, os animais receberam microinjeção bilateral de 0,1 µl de uma solução de 1% de azul de metileno de acordo com o procedimento descrito para a injeção das drogas. Após receberem uma dose profunda de solução de Ketamina e Xilasina, os animais foram decapitados e seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Depois de fixados em formalina por no mínimo três dias, os encéfalos permaneceram em solução de sacarose 20% por 24 horas sob refrigeração. Em seguida, a solução foi trocada por outra com concentração de 30%, e os frascos contendo o material foram levados novamente à geladeira por mais 24 horas. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados através de cortes coronais de 80 micrômetros (µm) ao longo do trajeto da cânula utilizando um micrótomo criostato (criostato ANCAP 300). Finalmente, as secções foram inspecionadas através de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção. Os animais onde as injeções não atingiram a amígdala, de modo bilateral, foram excluídos do estudo.

A figura 4 consiste numa representação esquemática dos sítios de microinjeção na amígdala. A análise histológica confirmou que 117 camundongos tiveram canulação positiva bilateral na amígdala (FIGURA 4).

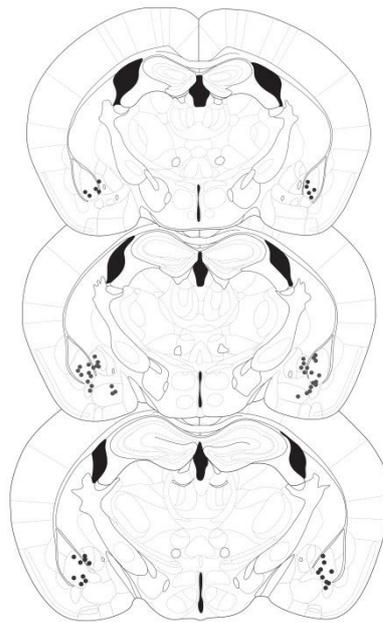


Figura 4. Representação esquemática dos locais de injeção dentro da amígdala de camundongo. Os cortes estão entre -1.06mm e -1.46mm do bregma de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (2001). O número de pontos é menor do que o total de camundongos devido à sobreposição.

3.8 Análise estatística

Inicialmente, todos os dados foram submetidos ao teste de Levene para verificar a sua homogeneidade.

Os resultados foram analisados usando a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (fator 1: tratamento e o fator 2: dias de teste). As diferenças indicadas por valores significativos de F foram verificadas através do teste post hoc de Fisher. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados pelo programa GB-STAT.

3.9 Ética

Os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar (028/2007). Todos os procedimentos estavam de acordo com os preceitos da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4 RESULTADOS

Cento e dezessete camundongos, cuja análise histológica dos encéfalos foi positiva, foram utilizados para investigar os efeitos da injeção sistêmica de LH e diferentes doses da microinjeção intra-amígdala de CPA sobre os comportamentos no LCE. Os grupos descritos a seguir foram distribuídos de acordo com os tratamentos i.p de LH e intra-amígdala de CPA na exposição e reexposição: [CPA 0,016 nmol/0,1 µl: controle ($n = 11$), LH-SAL ($n = 11$), SAL-CPA ($n = 10$), LH-CPA ($n = 8$); CPA 0,052 nmol/0,1 µl: controle ($n = 11$), LH-SAL ($n = 11$), SAL-CPA ($n = 9$), LH-CPA ($n = 8$); CPA 0,16 nmol/0,1 µl: controle ($n = 10$), LH-SAL ($n = 11$), SAL-CPA ($n = 9$), LH-CPA ($n = 8$)].

4.1 Efeito da injeção i.p LH (500mg/kg) e da infusão intra-amígdala de SAL ou CPA (0,016 nmol/0,1 µl) nos comportamentos de camundongos expostos (T1) e reexpostos (T2) ao LCE.

A Figura 5 (A,B) mostra o efeito do tratamento da injeção i.p de LH (500 mg/kg) e da infusão de SAL ou CPA (0,016nmol/0,1µl) na amígdala, pré-T1 e pré-T2, nos comportamentos emocionais. A ANOVA não revelou efeitos significativos para as %EBA [$F_{(3,36)} = 2,44$, $p > 0,05$] e %TBA [$F_{(3,36)} = 1,30$, $p > 0,05$] assim como para as EBA [$F_{(3,36)} = 4,23$, $p > 0,05$] e TBA [$F_{(3,36)} = 0,80$, $p > 0,05$] em T1 (TABELA 2), indicando que as drogas não induziram mudanças nos estados de ansiedade. Adicionalmente, o tratamento não provocou alterações significativas para as outras medidas: TE [$F_{(3,36)} = 2,83$, $p > 0,05$], EBF [$F_{(3,36)} = 2,48$, $p > 0,05$], TBF [$F_{(3,36)} = 2,33$, $p > 0,05$] e TC [$F_{(3,36)} = 0,68$, $p > 0,05$] em T1, como mostrado na Tabela 2.

Em T2, a ANOVA confirmou uma redução na exploração dos braços abertos representada pelas medidas %EBA [$F_{(1,36)} = 12,17, p < 0,05$], %TBA [$F_{(1,36)} = 34,38, p < 0,05$] (FIGURA 5 A, B), EBA [$F_{(1,36)} = 34,98, p < 0,05$] e TBA [$F_{(3,36)} = 13,24, p < 0,05$] e uma interação entre os fatores tratamento e dia de teste para a EBA [$F_{(1,36)} = 5,31, p < 0,05$] e %TBA [$F_{(1,36)} = 7,81, p < 0,05$]. O teste *post hoc* indicou uma diminuição significativa da atividade nos braços abertos (%EBA, %TBA, EBA e TBA) para os grupos controle e SAL-CPA, e uma diminuição da EBA para o grupo LH-SAL (TABELA 2). Não houve diminuição das %EBA e %TBA para os grupos LH-SAL e LH-CPA em T2 (FIGURA 5A, B). Além disso, como indicado na Tabela 2, houve um aumento do TBF [$F_{(1,36)} = 20,09, p < 0,05$] em T2, para os grupos controle e LH-SAL, enquanto nas EBF [$F_{(1,36)} = 0,31, p > 0,05$] não foram observadas mudanças significativas para nenhum grupo experimental. A ANOVA indicou alterações significativas para as medidas TE [$F_{(1,36)} = 12,43, p < 0,05$] e TC [$F_{(1,36)} = 12,14, p < 0,05$] em T2 comparado a T1. O teste *post hoc* Fisher LSD indicou que houve uma diminuição do TE para os grupos controle, LH-SAL e SAL-CPA, e para o TC houve uma diminuição significativa para os grupos controle e LH-SAL (TABELA 2).

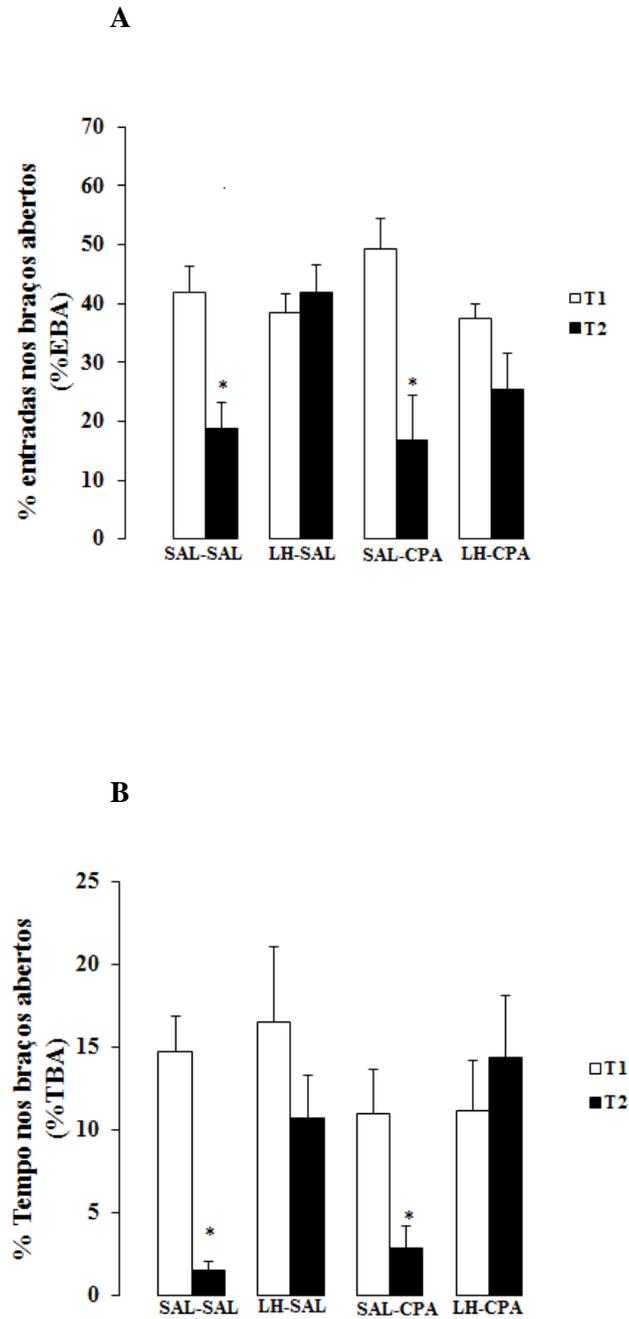


FIGURA 5. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e intra-amídala (i.a) de SAL ou CPA (0,016 nmol/0,1 μ l) nas porcentagens de entradas (%EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (%TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE. Ambas as drogas foram administradas antes do teste. Grupos: controle: SAL-SAL (injeção i.p e i.a de SAL); LH-SAL (injeção i.p de LH e i.a de SAL); SAL-CPA (injeção i.p de SAL e i.a de CPA) e LH-CPA (injeção i.p de LH e i.a de CPA). * $p < 0,05$, para T1 comparado com T2. (ANOVA seguida do teste de Fisher LSD).

De acordo com a Tabela 2, a injeção i.p de LH e infusão de CPA (0,016 nmol/0,1µl) não induziram diferenças significativas entre os grupos em T1 para os comportamentos de T. Estic [$F_{(3,36)} = 2,55, p > 0,05$], Estic. Prot. [$F_{(3,36)} = 0,83, p > 0,05$], T. Merg. [$F_{(3,36)} = 1,30, p > 0,05$], Merg. Prot [$F_{(3,36)} = 3,22, p > 0,05$] e Levantar [$F_{(1,36)} = 2,71, p > 0,05$]. A ANOVA de duas vias mostrou que o fator dia de teste provocou alterações em todos os comportamentos etológicos avaliados: T. de esticadas [$F_{(1,36)} = 20,55, p < 0,05$], Est. Prot [$F_{(1,36)} = 21,34, p < 0,05$], T. de Merg [$F_{(1,36)} = 19,52, p < 0,05$], Merg. Prot. [$F_{(1,36)} = 18,33, p < 0,05$] e Levantar [$F_{(1,36)} = 17,42, p < 0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que houve uma diminuição da frequência dos comportamentos T. de esticadas, Est. Prot e T. de Merg para o grupo controle e SAL-CPA, e somente o grupo SAL-CPA apresentou uma diminuição significativa da frequência de Merg. Prot e Levantar.

Tabela 2. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e da infusão de CPA (0,016nmol/0,1 µl) na amígdala, ambas as drogas administradas pré-teste, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.

comportamentos	Controle (n =11)		LH-SAL (n= 11)		SAL-CPA (n= 10)		LH-CPA (n= 8)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
TE	7,7 ± 1,2	4,3 ± 0,9*	8,0 ± 0,9	4,7 ± 0,8*	7,1 ± 0,9	4,1 ± 0,9*	8,1 ± 0,5	10,1 ± 2,4
EBF	4,4 ± 0,8	3,6 ± 0,8	4,8 ± 0,5	3,0 ± 0,7	3,9 ± 0,9	3,3 ± 0,7	4,8 ± 0,3	6,7 ± 1,8
EBA	3,2 ± 0,5	0,8 ± 0,1*	3,1 ± 0,4	1,7 ± 0,2*	3,2 ± 0,2	0,8 ± 0,3*	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,7
TBA	44,0 ± 6,6	4,5 ± 1,6*	49,5 ± 13,5	32,1 ± 7,5	33,0 ± 7,9	8,4 ± 4,2*	33,3 ± 9,2	43,0 ± 11,3
TBF	192,0 ± 17,4	268,7 ± 10,1*	175,2 ± 13,4	246,1 ± 13,4*	227,9 ± 10,5	250,3 ± 15,7	195,2 ± 19,4	216,1 ± 16,9
TC	63,9 ± 16,9	26,7 ± 9,6*	75,2 ± 13,1	21,7 ± 8,6*	39,6 ± 9,5	41,2 ± 13,5	71,4 ± 9,0	40,8 ± 7,5
T.Esticar	16,6 ± 2,6	7,1 ± 1,9*	18,7 ± 4,2	16,1 ± 1,8	18,3 ± 2,2	5,2 ± 1,0*	22,0 ± 6,2	20,4 ± 5,9
Est. Prot.	14,1 ± 2,5	5,9 ± 2,0*	15,9 ± 2,7	13,5 ± 2,1	15,7 ± 5,8	9,5 ± 2,1*	13,2 ± 2,2	14,8 ± 3,3
T.Merg.	2,3 ± 0,6	0,5 ± 0,4*	3,7 ± 1,0	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,8	0,4 ± 0,2*	2,5 ± 0,8	1,3 ± 0,4
Merg. Prot.	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,8	0,4 ± 0,2*	2,9 ± 0,6	1,2 ± 0,3
Levantar	4,2 ± 2,0	3,3 ± 1,5	4,0 ± 1,2	2,7 ± 0,5	4,5 ± 1,3	1,7 ± 0,9*	4,2 ± 2,4	6,8 ± 3,8

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; T. Esticar = total de esticadas; Est. Prot = esticadas protegidas; T. Merg = total de mergulhos; Merg. Prot = mergulhos protegidos. * p < 0,05 para T1 comparado com T2 (ANOVA).

4.2 Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e infusão intra-amídala de SAL ou CPA (0,052 nmol/0,1 μ) nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.

A Figura 6 (A,B) mostra o efeito do tratamento da injeção i.p de LH (500 mg/kg) e infusão intra-amídala de SAL ou CPA (0,052 nmol/0,1 μ l), pré-T1 e pré-T2, nos comportamentos emocionais. A ANOVA revelou que não houve efeito significativo dos tratamentos nas medidas de ansiedade: %EBA [$F_{(3,35)} = 0,27$, $p > 0,05$], %TBA [$F_{(3,35)} = 2,38$, $p > 0,05$], EBA [$F_{(3,35)} = 0,60$, $p > 0,05$] e TBA [$F_{(3,35)} = 3,00$, $p > 0,05$] em T1 (TABELA 3), indicando que as drogas não induziram efeito sobre os estados de ansiedade. A Tabela 3 mostra que também não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais para as outras medidas TE [$F_{(3,35)} = 0,35$, $p > 0,05$], EBF [$F_{(3,35)} = 0,30$, $p > 0,05$], TBF [$F_{(3,35)} = 2,15$, $p > 0,05$] e TC [$F_{(3,35)} = 2,29$, $p > 0,05$] em T1.

Como indicado na Figura 6 (A,B) o fator dia de teste induziu alterações significativas na atividade dos braços abertos em T2 representada pelas medidas: %EBA [$F_{(1,35)} = 6,37$, $p < 0,05$] e %TBA [$F_{(1,35)} = 7,48$, $p < 0,05$], assim como nas EBA [$F_{(1,35)} = 21,64$, $p < 0,05$] e TBA [$F_{(1,35)} = 14,14$, $p < 0,05$], mas não houve interação entre o tratamento e dia de teste para essas medidas (ANOVA, $p > 0,05$). O teste *post hoc* indicou uma diminuição na %EBA e %TBA para os grupos controle e SAL-CPA, enquanto o grupo LH-SAL exibiu apenas uma diminuição significativa na EBA em T2. Por outro lado, os grupos LH (LH-SAL e LH-CPA) não apresentaram diferenças significativas nas %EBA e %TBA entre T1 e T2. Em T2, a ANOVA revelou aumento significativo no TBF [$F_{(1,35)} = 5,66$, $p < 0,05$] para os grupos controle e LH-SAL e uma diminuição da EBF [$F_{(1,35)} = 19,99$, $p < 0,05$] para os grupos SAL-CPA e LH-CPA. A ANOVA mostrou diferenças significativas no TE [$F_{(1,35)} = 23,43$, $p < 0,05$] e TC [$F_{(1,35)} = 15,02$, $p < 0,05$] em T2. O teste *post hoc* Fisher LSD mostrou que somente o grupo LH-CPA não exibiu diminuição significativa no TE e TC (TABELA 3).

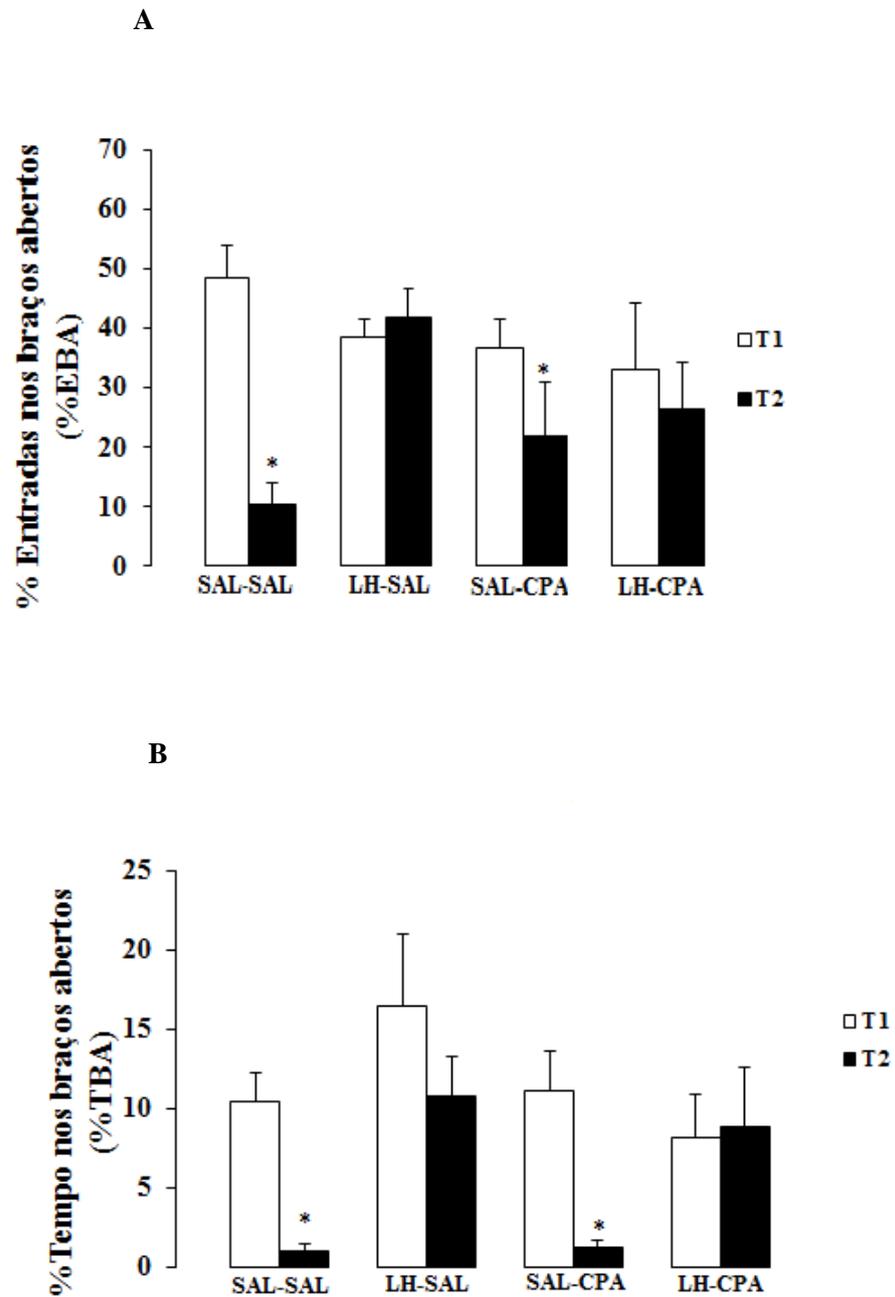


FIGURA 6. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e intra-amídala (i.a) de SAL ou CPA (0,052 nmol/0,1 μ l) nas porcentagens de entradas (%EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (%TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE. Ambas as drogas foram administradas antes do teste. Grupos: controle: SAL-SAL (injeção i.p e i.a de SAL); LH-SAL (injeção i.p de LH e i.a de SAL); SAL-CPA (injeção i.p de SAL e i.a de CPA) e LH-CPA (injeção i.p de LH e i.a de CPA). * $p < 0,05$ para T1 comparado com T2. (ANOVA seguida do teste de Fisher LSD).

Com relação às medidas etológicas não houve diferenças significativas entre os grupos em T1 para os todos os comportamentos avaliados: T. Estic [$F_{(3,35)} = 2,55$, $p > 0,05$], Estic. Prot. [$F_{(3,35)} = 0,89$, $p > 0,05$], T. Merg. [$F_{(3,35)} = 1,50$, $p > 0,05$], Merg. Prot [$F_{(3,35)} = 1,22$, $p > 0,05$] e Levantar [$F_{(3,35)} = 3,30$, $p > 0,05$]. Em T2, a ANOVA indicou que os grupos controle e SAL-CPA diminuíram significativamente o T. de Esticadas [$F_{(1,35)} = 0,83$, $p < 0,05$] e T. Merg. [$F_{(1,35)} = 4,79$, $p < 0,05$], e somente o grupo LH-CPA diminuiu a frequência de levantar [$F_{(1,35)} = 0,90$, $p < 0,05$] em T2 (TABELA 3). A ANOVA, também, mostrou que não houve diferenças significativas entre T1e T2, para os comportamentos Est. Prot [$F_{(1,35)} = 1,95$, $p > 0,05$] e Merg. Prot [$F_{(1,35)} = 1,60$, $p > 0,05$].

Tabela 3. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e da infusão de SAL ou CPA (0,052nmol/0,1 µl) na amígdala, ambas as drogas administradas pré-teste, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.

comportamentos	Controle (n=11)		LH-SAL (n=11)		SAL-CPA (n=9)		LH-CPA (n=8)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
TE	6,4 ± 0,9	3,5 ± 0,7*	8,0 ± 0,9	4,7 ± 0,8*	8,8 ± 2,0	3,1 ± 1,2*	8,5 ± 2,2	4,2 ± 0,9
EBF	3,6 ± 0,8	3,0 ± 0,5	4,8 ± 0,5	3,0 ± 0,7	5,5 ± 1,2	2,1 ± 0,8*	6,0 ± 1,6	2,8 ± 0,6*
EBA	2,8 ± 0,3	0,5 ± 0,2*	3,1 ± 0,4	1,7 ± 0,2*	3,3 ± 0,4	1,0 ± 0,4*	2,5 ± 0,7	1,3 ± 0,5
TBA	31,1 ± 5,8	2,9 ± 1,2*	49,5 ± 13,5	32,1 ± 7,5	33,0 ± 7,3	3,6 ± 1,4*	24,3 ± 8,3	26,5 ± 11,1
TBF	185,4 ± 24,2	274,4 ± 8,8*	175,2 ± 13,4	246,1 ± 13,4*	218,7 ± 23,1	285,6 ± 3,3	218,0 ± 23,1	236,1 ± 19,8
TC	83,4 ± 7,2	22,5 ± 8,5*	75,2 ± 13,1	21,7 ± 8,6*	47,8 ± 16,8	10,7 ± 2,3*	57,6 ± 16,5	37,3 ± 11,5
T.Esticar	14,7 ± 4,2	7,1 ± 1,8*	18,7 ± 4,2	16,1 ± 1,8	21,1 ± 3,3	11,6 ± 2,7*	15,7 ± 1,4	12,3 ± 2,8
Est. Prot.	14,1 ± 2,5	13,9 ± 2,0	15,9 ± 2,7	13,5 ± 2,1	15,1 ± 2,9	9,5 ± 2,1	18,7 ± 4,1	14,5 ± 2,3
T. Merg.	2,8 ± 0,6	0,6 ± 0,1*	3,7 ± 1,0	1,4 ± 0,1	3,5 ± 1,0	1,0 ± 0,3*	3,5 ± 0,8	1,3 ± 0,4
Merg. Prot.	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,5	0,9 ± 0,3	2,9 ± 0,6	1,2 ± 0,3
Levantar	4,2 ± 2,0	3,3 ± 1,5	4,0 ± 1,2	2,7 ± 0,5	5,9 ± 0,6	4,0 ± 0,5	3,8 ± 1,3	0,8 ± 0,2*

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; T. Esticar = total de esticadas; Est. Prot. = esticadas protegidas; T. Merg. = total de mergulhos; Merg. Prot. = mergulhos protegidos. * p < 0,05 para T1 comparado com T2 (ANOVA).

4.3 Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e infusão intra-amídala de SAL ou CPA (0,16 nmol/0,1 μ) nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.

Os efeitos do tratamento da injeção i.p de LH (500 mg/kg) e infusão intra- amídala de SAL ou CPA (0,16 nmol/0,1 μ l) são mostrados na Figura 7 (A, B). A ANOVA mostrou que não houve efeito significativo para as medidas de ansiedade %EBA [$F_{(3,34)} = 1,87, p > 0,05$], %TBA [$F_{(3,34)} = 0,40, p > 0,05$], EBA [$F_{(3,34)} = 1,72, p > 0,05$] e TBA [$F_{(3,34)} = 0,40, p > 0,05$] em T1 (TABELA 4), indicando que as drogas não afetaram os estados de ansiedade. Além disso, os tratamentos não induziram mudanças significativas nas medidas: TE [$F_{(3,34)} = 0,28, p > 0,05$], EBF [$F_{(3,34)} = 0,32, p > 0,05$], TBF [$F_{(3,34)} = 0,04, p > 0,05$] e TC [$F_{(3,34)} = 0,28, p > 0,05$] em T1 (TABELA 4).

A ANOVA indicou diferenças significativas entre as exposições apenas para o grupo controle que diminuiu as %EBA [$F_{(1,34)} = 8,51, p < 0,05$] e %TBA [$F_{(1,34)} = 2,17, p < 0,05$], assim como as EBA [$F_{(1,34)} = 23,93, p < 0,05$] e TBA [$F_{(1,34)} = 2,17, p < 0,05$] em T2, e uma interação entre os fatores tratamento e dia de teste na %EBA [$F_{(1,34)} = 5,39, p < 0,05$]. O teste post hoc indicou que o grupo LH- SAL diminuiu as EBA em T2, enquanto que os outros grupos experimentais (SAL-CPA; LH-CPA) não modificaram significativamente a exploração nos braços abertos em T2. A Tabela 4 demonstra que para as outras medidas convencionais, houve um aumento significativo do TBF [$F_{(1,34)} = 25,70, p < 0,05$] para os grupos controle, LH-SAL e LH-CPA, enquanto somente o grupo SAL-CPA não diminuiu o TC [$F_{(1,34)} = 20,62, p < 0,05$]. Como indicado na Tabela 4 não houve alterações significativas para as EBF [$F_{(1,34)} = 0,35, p > 0,05$] para nenhum dos grupos experimentais em T2 comparado a T1, mas houve uma diminuição no TE [$F_{(1,34)} = 16,09, p < 0,05$] para os grupos controle e LH-SAL.

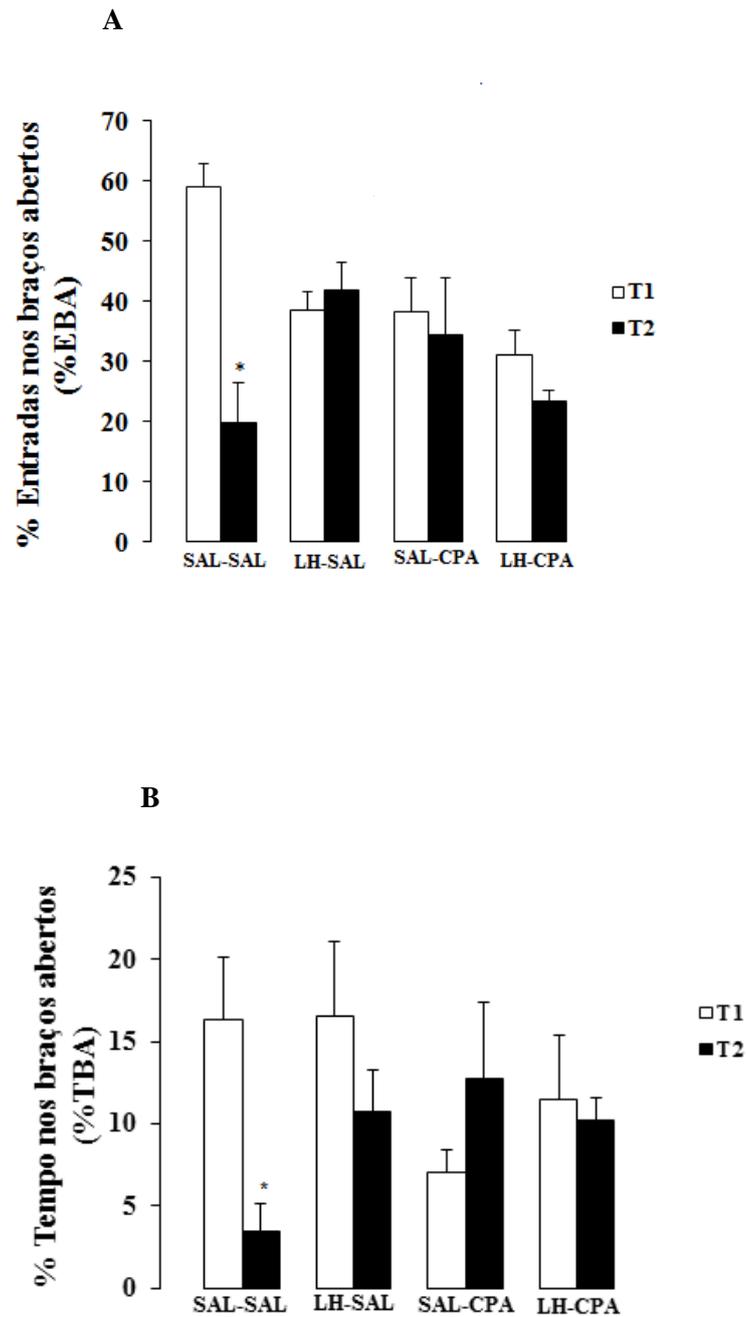


FIGURA 7. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e intra-amídala (i.a) de SAL ou CPA (0,16 nmol/0,1 μ l) nas porcentagens de entradas (%EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (%TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE. Ambas as drogas foram administradas antes do teste. Grupos: controle: SAL-SAL (injeção i.p e i.a de SAL); LH-SAL (injeção i.p de LH e i.a de SAL); SAL-CPA (injeção i.p de SAL e i.a de CPA) e LH-CPA (injeção i.p de LH e i.a de CPA). * $p < 0,05$ para T1 comparado com T2. (ANOVA seguida do teste de Fisher LSD).

Com relação às medidas etológicas que constam na Tabela 4, a ANOVA não indicou diferenças significativas nos comportamentos: T. Estic [$F_{(3,34)} = 1,50, p > 0,05$], Estic. Prot. [$F_{(3,34)} = 0,90, p > 0,05$], T. Merg. [$F_{(3,34)} = 1,50, p > 0,05$], Merg. Prot [$F_{(3,34)} = 0,40, p > 0,05$] e Levantar [$F_{(3,34)} = 2, 20, p > 0,05$] na exposição. A ANOVA mostrou diferenças significativas na frequência de T. Merg. ($F_{(1,34)} = 30,11, p < 0,05$) em T2 em relação a T1. O teste *post-hoc* Fisher LSD mostrou que apenas o grupo LH-CPA apresentou uma redução na frequência deste comportamento. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dias de teste para os comportamentos T. Estic [$F_{(1,34)} = 1,50, p > 0,05$], Estic. Prot. [$F_{(1,34)} = 0,50, p > 0,05$], Merg. Prot [$F_{(1,34)} = 3,40, p > 0,05$] e Levantar [$F_{(1,34)} = 3, 40, p > 0,05$] em todos os grupos experimentais.

Tabela 4. Efeitos da injeção i.p de LH (500mg/kg) e da infusão de CPA (0,16 nmol/0,1 µl) na amígdala, ambas as drogas administradas pré-teste, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.

comportamentos	Controle (n=10)		LH-SAL (n=11)		SAL-CPA (n=9)		LH-CPA (n=8)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
TE	6,9 ± 1,2	4,0 ± 0,8*	8,0 ± 0,9	4,7 ± 0,8*	6,2 ± 0,9	5,1 ± 1,1	6,7 ± 0,7	4,1 ± 0,3
EBF	2,8 ± 0,5	2,6 ± 0,5	4,8 ± 0,5	3,0 ± 0,7	3,7 ± 0,6	3,4 ± 0,8	4,7 ± 0,7	3,0 ± 0,2
EBA	4,1 ± 0,8	1,2 ± 0,4*	3,1 ± 0,4	1,7 ± 0,2*	2,4 ± 0,3	1,6 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,1 ± 0,1
TBA	49,1 ± 11,3	10,4 ± 5,1*	49,5 ± 13,5	32,1 ± 7,5	20,9 ± 4,1	38,2 ± 13,9	34,3 ± 11,8	30,5 ± 4,1
TBF	162,5 ± 30,3	251,3 ± 16,2*	175,2 ± 13,4	246,1 ± 13,4*	199,1 ± 18,2	227,6 ± 16,9	164,8 ± 22,3	246,9 ± 4,1*
TC	88,3 ± 26,6	38,2 ± 12,3*	75,2 ± 13,1	21,7 ± 8,6*	79,8 ± 16,8	34,1 ± 14,1	100,7 ± 26,9	22,5 ± 3,3*
T.Esticar	14,1 ± 0,9	14,3 ± 0,9	18,7 ± 4,2	16,1 ± 1,8	13,0 ± 1,2	13,2 ± 1,0	14,8 ± 1,2	12,4 ± 1,1
Estic.Prot.	11,2 ± 0,5	10,2 ± 0,1	15,9 ± 2,7	13,5 ± 2,1	10,6 ± 0,3	11,0 ± 0,4	10,5 ± 0,2	10,4 ± 0,3
T. Merg.	2,8 ± 0,6	1,6 ± 0,3	3,7 ± 1,0	1,4 ± 0,1	2,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	3,1 ± 1,1	0,5 ± 0,4*
Merg.Prot.	1,2 ± 0,6	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,0 ± 1,4	1,2 ± 0,2
Levantar	2,2 ± 0,6	2,4 ± 0,9	4,0 ± 1,3	2,7 ± 0,5	1,8 ± 0,6	2,8 ± 1,1	1,6 ± 0,7	2,2 ± 0,8

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; T. Esticar = total de esticadas; Est. Prot. = esticadas protegidas; T. Merg. = total de mergulhos; Merg. Prot. = mergulhos protegidos. * p < 0,05 para T1 comparado com T2 (ANOVA).

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo demonstraram que a injeção sistêmica da L-histidina (500mg/kg) e a infusão de Clorfeniramina (CPA) na amígdala, nas doses de 0,016nmol; 0,052 nmol; 0,16 nmol/0,1µl não induziram efeitos na ansiedade. A infusão intra-amígdala de CPA não reverteu o déficit da evocação da memória estado-dependente provocado pela injeção i.p de LH. Adicionalmente, a dose mais alta de CPA (0,16nmol/0,1µl) comprometeu a expressão da memória emocional em camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado. Importante relatar que as drogas não induziram alterações na atividade locomotora representada pelas entradas nos braços fechados dos animais expostos ao LCE. Portanto, os resultados apresentados foram obtidos sem alteração da atividade locomotora.

5.1 Efeitos da administração i.p de LH (500mg/kg) e da infusão de SAL ou CPA nas doses de 0,016nmol; 0,052 nmol; 0,16 nmol/0,1 sobre as respostas de ansiedade.

Nossos resultados demonstraram que a injeção i.p de LH na dose de (500 mg/kg), pré-T1 não provocou efeitos nas respostas de ansiedade, uma vez que não houve diferenças significativas na atividade exploratória dos braços abertos (%EBA e %TBA) entre os grupos controle e LH-SAL, durante a primeira exposição dos animais ao LCE. Nossos resultados são consistentes com estudos prévios realizados em nosso laboratório, que indicaram que a injeção i.p de LH (500mg/kg) não induziu efeitos na ansiedade em camundongos submetidos ao LCE (GIANLORENÇO et al., 2011a; SERAFIM et al., 2010). Por outro lado, resultados diferentes foram obtidos por Kumar e colaboradores (2007) que mostraram que a injeção i.p de LH em diferentes doses (200, 500 e 1000mg/kg), pré-teste, induziu um efeito ansiogênico dose dependente em camundongos expostos ao LCE. Outros estudos mostraram que a histamina administrada na amígdala e no hipocampo induz, também, um efeito ansiogênico em ratos (ZARRINDAST et al., 2005; ZARRINDAST et al., 2010). As discrepâncias dos

resultados acima citados podem estar relacionadas aos comportamentos relacionados com a aversão aos BA(s) durante a exposição dos animais ao LCE. Adicionalmente, estudos indicam que a aversão aos braços abertos parece ser influenciada por vários fatores como horário do dia em que o teste é realizado (GRIEBEL et al., 1993), e o nível de iluminação (GARCIA et al., 2011).

Ainda com relação aos efeitos das drogas histaminérgicas sobre a ansiedade, nossos resultados sugerem que a infusão intra-amídala de CPA parece não afetar os comportamentos relacionados com a ansiedade, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos controle e o grupo SAL que recebeu infusão de CPA (SAL-CPA), nas diferentes doses. As investigações comportamentais do envolvimento dos receptores histaminérgicos H_1 nas respostas de ansiedade, ainda, apresentam resultados contraditórios. Privou e colaboradores sugerem que a injeção unilateral de CPA nas doses de 0,1 μ g ou 20 μ g no núcleo acumbente e núcleo basal magnocelular causou efeito ansiolítico em ratos. Resultados semelhantes foram encontrados por Miyata et al (2011), uma vez que a injeção de CPA na região medial do córtex pré-frontal atenuou as respostas de ansiedade e medo, através da ativação da serotonina em camundongos. Entretanto, outro estudo proveniente do nosso grupo de pesquisa indicou que a injeção sistêmica de CPA (16mg/kg) em camundongos provocou uma diminuição da atividade nos braços abertos durante a primeira exposição no LCE, sugerindo um efeito ansiogênico (SERAFIM et al, 2011, resultados não publicados).

Nossas principais evidências relacionadas às categorias etológicas indicaram que o tratamento sistêmico com LH, e a infusão de CPA não provocaram efeitos nos comportamentos: total de esticadas, esticadas protegidas, total de mergulhos, mergulho protegido e levantar, entre os grupos experimentais em T1. Os resultados da análise etológica adicionados a não observância de diferenças significativas na atividade exploratória dos braços abertos entre os grupos experimentais na primeira exposição, sustentam nossos resultados de que a LH e a CPA, nas diferentes doses, não induziram efeitos sobre a ansiedade. Segundo Rodgers e colaboradores (1997), devido à importância das pistas tigmotáticas, os comportamentos etológicos são divididos em protegidos ou desprotegidos, dependendo da área do labirinto em que acontecem, ou seja, as áreas protegidas seriam os braços fechados (BF) e o centro, e as áreas desprotegidas seriam os BAs. Além disso, outros estudos sugerem que a análise da frequência das medidas complementares nas áreas protegidas, juntamente com a

atividade nos braços abertos são os melhores indicadores das respostas de ansiedade em roedores submetidos ao LCE (CRUZ, 1994; ESPEJO et al., 1997).

Os resultados divergentes encontrados na literatura sugerem que a atuação do sistema histaminérgico na ansiedade depende das condições experimentais, sítios de injeção e os métodos utilizados durante os testes. Outra explicação para os resultados diferentes encontrados na literatura surge das evidências comportamentais apontando para os efeitos modulatórios da histamina, através da sua interação com outros neurotransmissores, como a acetilcolina (ACh). Estudos conduzidos por Prast et al. (1999) sugerem que a histamina modula a liberação da acetilcolina através da estimulação dos receptores H₁. Os mesmos autores mostraram em um estudo *in vitro*, que a perfusão com o antagonista H₁ no núcleo estriado ventral de ratos diminuiu a liberação de ACh (PRAST et al., 1999). Além disso, outras evidências sugerem que os níveis de ACh estão relacionados com o estado de ansiedade, uma vez que, o aumento da liberação desse neurotransmissor diminui a ansiedade em roedores e humanos (DEGROOT & TREIT, 2002). Achados clínicos sugerem que, em humanos, níveis aumentados de ACh resultam em diminuição da ansiedade. A relação entre a ACh e ansiedade apresenta suporte nas investigações realizadas com pacientes com doença de Alzheimer, já que eles apresentam perda progressiva dos neurônios colinérgicos responsáveis pela modulação dos processos cognitivos, e 33% deles sofrem com transtornos de ansiedade (DEGROOT & TREIT, 2002). Apesar do presente estudo não ter testado a interação entre o sistema histaminérgico e colinérgico nas respostas de ansiedade, pesquisas futuras que explorem esta interação poderão contribuir no esclarecimento das contradições que aparecem na literatura a respeito do papel do sistema histaminérgico na ansiedade.

5.2 Modelos experimentais e memória emocional: modulação da amígdala.

Devido ao pequeno tamanho dos encéfalos dos roedores, principalmente, dos camundongos, torna-se difícil distinguir os vários núcleos que compõem o complexo amigdalóide, durante o procedimento de histologia. No nosso estudo, nós utilizamos como sujeitos experimentais, camundongos, portanto, foi considerado o

complexo amígdaloide, como um todo, durante o tratamento farmacológico. Outros estudos têm investigado a atuação de diferentes classes de fármacos nos comportamentos emocionais, através da administração de drogas na amígdala desses roedores, sem a distinção dos seus núcleos (BARBALHO et al., 2009; BAPTISTA et al., 2009).

As investigações sobre o papel da amígdala no delineamento dos mecanismos envolvidos com a memória emocional têm sido realizadas através da administração de drogas nessa estrutura, utilizando diferentes modelos comportamentais. Estudos conduzidos por Ribeiro e colaboradores (2011) mostraram que a inativação do núcleo BL de ratos, pós-treino, comprometeu a retenção da memória no teste de esQUIVA discriminativa no LCE. A administração intra-amígdala de agonista dos receptores canabinóides, pós-treino, prejudicou a consolidação da memória emocional de ratos no teste de esQUIVA inibitória (GHIASVAND et al., 2011). Outros estudos têm demonstrado, ainda, a modulação da amígdala nos comportamentos emocionais através da administração de drogas histaminérgicas nessa estrutura. Estudo conduzido por Passani et al (2001) mostrou que a injeção bilateral do antagonista H₃ na amígdala de ratos prejudicou a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto, enquanto a injeção de HA no núcleo BL prejudicou a latência de fuga em ratos num teste de esQUIVA ativa (ALVAREZ & RUARTE, 2002).

No presente trabalho, nós utilizamos o LCE para investigar o papel dos receptores H1 presentes na amígdala no déficit da evocação da memória emocional em camundongos pré-tratados com LH, utilizando o protocolo T1/T2. Vários estudos sugerem que uma exposição prévia ao LCE provoca mudanças nas respostas comportamentais em uma segunda exposição, como por exemplo, a diminuição da atividade nos BAs, indicativa de uma aprendizagem aversiva (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005, STERN et al., 2008). Portanto, a evocação da memória emocional pode ser inferida através da diminuição da exploração dos Bas, em T2. Além disso, o LCE tem contribuído para a compreensão dos mecanismos associados à dor, nos vários tipos de desordens de ansiedade, como na ansiedade generalizada, fobia e estresse pós-traumático (CORNÉLIO et al., 2011; ADAMEC et al., 1998; FILE et al., 19).

Adicionalmente, a ampla utilização desse modelo é devido à eficiência e facilidade do seu uso, uma vez que é um procedimento simples e rápido. Ainda, o uso desse modelo não requer a necessidade de treinamento dos animais, nem a utilização de

estímulos nociceptivos; privação de água ou alimento (PELLOW et al., 1985; RODGER et al., 1997).

5.3 Efeitos da administração i.p de L-histidina e da microinfusão de CPA (0,016nmol; 0,052 nml; 0,16nmol) sobre a memória emocional.

No presente trabalho foi detectada uma diminuição significativa da atividade nos BAs representada pelas medidas (%EBA e %TBA) em T2 comparada com T1, para o grupo controle (SAL-SAL) e para os grupos que receberam injeção i.p de SAL e intra-amídala de CPA (SAL-CPA) nas doses de 0,016 e 0,052 nmol, indicando que os animais desses grupos foram capazes de evocar a informação aversiva adquirida em T1. Esses resultados são consistentes com recentes estudos que propõem uma aprendizagem aversiva relacionada com a exploração dos BAs ocorrendo na primeira exposição (T1), e que exposições subsequentes no LCE provocam uma facilitação da evocação da informação aversiva (JÜRGENSON et al., 2010; GALVIN-ALONSON et al., 2010).

Por outro lado, a injeção sistêmica de LH (500mg/kg) induziu um efeito inibitório na evocação da memória estado dependente, uma vez que o grupo que recebeu injeção i.p de LH e infusão de SAL na amídala (LH-SAL) não diminuiu a atividade nos braços em T2. Os resultados encontrados no nosso estudo indicam que camundongos tratados com injeção i.p de LH pré-teste, apresentam um comprometimento da habilidade de evocar a memória aversiva relacionada aos braços abertos. Além disso, esses dados reproduzem resultados prévios encontrados em nosso laboratório, que mostraram que a injeção sistêmica de LH (500mg/kg) induziu um déficit na evocação da memória estado dependente em camundongos reexpostos ao LCE (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO et al., 2011a). Nossos estudos corroboram estudos que sugerem o papel inibitório da histamina nos processos de memória. Estudos conduzidos por Rubio e colaboradores (2001) demonstraram o efeito inibitório da LH na aquisição da resposta de esquiva em ratos. Recentemente, Ahmadi et al. (2010) mostraram que a injeção i.c.v de histamina, pós-treino, comprometeu a aprendizagem e a memória emocional em camundongos submetidos ao teste de esquiva inibitória. A injeção de histamina intra-vermis cerebelar, prejudicou a consolidação da memória em camundongos submetidos ao LCE (GIANLORENÇO et al., 2011b). Por outro lado,

outros estudos indicam um efeito facilitatório da histamina nos processos de aprendizagem e memória em roedores (PRAST et al., 1996; BONINI et al., 2011).

A CPA, nas três doses estudadas, não reverteu o déficit estado dependente de evocação da memória emocional induzido pela LH, já que os grupos que receberam injeção i.p de LH e infusão de CPA (LH-CPA) não diminuíram a atividade dos braços abertos em T2, quando comparado com T1. Além disso, o grupo SAL-CPA que recebeu injeção i.p de SAL e infusão de CPA na dose mais alta (0,16 nmol/0,1 µl) não diminuiu as entradas e o tempo gasto nos BAs em T2, indicando que a CPA provocou um comprometimento da memória emocional.

Não há dados na literatura mostrando os efeitos da infusão do antagonista CPA na amígdala de camundongos nos processos de aprendizagem e memória emocional. Os estudos que investigaram a participação dos receptores H₁ nesses processos utilizaram outras estruturas cerebrais, ou via de administração da droga, para o tratamento farmacológico. A infusão i.c.v do antagonista dos receptores H₁, CPA, aprimora a aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris (HASENÖHRL et al., 1999), enquanto a injeção i.p de CPA reverte o comprometimento da evocação da memória emocional causado pela injeção i.p de LH, em camundongos reexpostos ao LCE (GIANLORENÇO et al., 2011a). Em humanos, o tratamento oral com o antagonista do receptor H₁, dexclorfeniramina, prejudicou o desempenho em uma tarefa dependente de atenção, mas não apresentou efeitos nas tarefas de memória (VAN RUITENBEEK et al., 2010).

A observação mais relevante da análise dos comportamentos etológicos foi a ausência da redução da frequência de total de esticadas nos grupos LH (LH-SAL e LH-CPA) em T2, quando comparados aos animais dos grupos controle e SAL-CPA nas doses de 0,016 e 0,052 nmol. O tratamento sistêmico com LH não reduziu a exploração dos BAs e a frequência de esticar, comportamento indicativo de avaliação de risco, durante a reexposição, fortalecendo os nossos resultados que sugerem que a LH prejudica a evocação da memória emocional em camundongos reexpostos ao LCE. Entretanto, os dados da análise etológica na maior dose de CPA (0,16nmol) não corroboram os resultados inibitórios referentes ao tratamento sistêmico com LH e infusão de CPA, na evocação da memória emocional, uma vez que não houve diferenças significativas para o comportamento de T. esticadas para todos os grupos experimentais entre as exposições (T1 e T2).

Inicialmente, o comportamento de esticadas era categorizado como uma medida de ansiedade, entretanto, estudos utilizando análises fatoriais, e estudos farmacológicos apontam que esse comportamento não está somente relacionado à ansiedade, mas, pode, também, ser considerado como um componente da avaliação de risco. Segundo Espejo (1997), o esticar pode ser definido como um comportamento de avaliação de risco promovendo informação, confirmação e identificação do perigo em situações potencialmente ameaçadoras, possibilitando ao animal escolher a estratégia comportamental mais adequada. Além disso, estudo comportamental conduzido por Holmes & Rodger et al (1998) mostra que a submissão dos animais a uma segunda exposição no LCE produz mudanças nas respostas comportamentais induzidas pela estimulação emocional, ou seja, animais reexpostos ao LCE apresentam redução significativa nos comportamentos de mergulhar e postura de esticar 24 horas após a primeira exposição.

Estudos comportamentais sugerem que os receptores H_1 modulam os processos de aprendizagem e memória emocional em roedores (ALVAREZ & BANZAN, 2008; YANAY et al., 2007). Considerando as projeções já bem estabelecidas entre os núcleos histaminérgicos e a amígdala, nós hipotetizamos que o bloqueio dos receptores H_1 presentes nessa estrutura poderia reverter o efeito inibitório da injeção i.p de LH na evocação da memória emocional em camundongos. Entretanto, nossos resultados não somente sugerem que a CPA não reverteu o déficit da evocação da memória estado dependente induzido pela LH, além disso, demonstram que a dose mais alta de CPA compromete a memória emocional. Na busca pelo entendimento da participação dos receptores histaminérgicos H_1 nos mecanismos da aprendizagem e memória, evidências comportamentais têm sugerido uma interação do sistema neural histaminérgico e do colinérgico na modulação dos comportamentos emocionais (BACCIOTTINI et al., 2002; BLANDINA et al, 2004).

5.4 Interação do sistema histaminérgico e colinérgico na modulação da memória emocional

As fibras histaminérgicas provenientes do núcleo tuberomamilar, juntamente com as terminações colinérgicas derivadas do núcleo basal magnocelular

inervam a amígdala (BROWN et al., 2001; KHATEB et al., 1995). Além disso, o tônus colinérgico na amígdala pode ser modulado por componentes histaminérgicos permitindo que a expressão da memória emocional seja modificada apropriadamente dependendo da interação entre esses sistemas. Por exemplo, a manipulação dos receptores H₃ através da administração de drogas agonistas, no núcleo BL da amígdala de rato, provocou um aumento da liberação de acetilcolina, induzindo um desempenho mais eficiente no teste de condicionamento ao contexto (CANGIOLI et al., 2002).

Nós sugerimos que o comprometimento da memória emocional induzido pela dose mais alta de CPA (0,16nmol) poderia ter sido provocado pela atuação do antagonista nos receptores histaminérgicos H₁ presentes na amígdala, com a subsequente diminuição do tônus colinérgico. A estimulação colinérgica é responsável pela modulação dos processos cognitivos, portanto, uma diminuição do seu tônus na amígdala poderia induzir um déficit na memória emocional dos camundongos durante a reexposição. Esta hipótese ganha suporte através do estudo *in vitro* conduzido por Khateb et al (1995), que sugere uma possível interação entre esses sistemas. Esses autores mostraram que a histamina, através da ativação dos receptores H₁, despolariza a membrana dos neurônios colinérgicos, e aumenta a frequência de disparo tônico desses neurônios no núcleo basal magnocelular induzindo uma ativação do córtex cerebral (KHATEB et al 1995). Em outro estudo, a injeção intra-hipocampal do antagonista histaminérgico H₃, clobenpropit, reverteu o déficit de retenção da memória emocional em ratos, induzido pela administração de escopolamina, antagonista dos receptores colinérgicos muscarínicos, e esse efeito pro-cognitivo foi inibido pelo antagonista do receptor H₁ (YU et al., 2006). Os estudos acima citados sugerem uma interação do sistema histaminérgico e colinérgico na modulação dos comportamentos emocionais. Embora, nossos resultados sugiram que a histamina exerça seus efeitos pró-cognitivos através da interação com o sistema colinérgico na amígdala, esta hipótese ainda não foi testada.

5.5 Modulação tônica do sistema histaminérgico nos comportamentos emocionais.

No presente trabalho, a injeção i.p de LH e a infusão do antagonista CPA, na dose mais alta (através dos grupos LH-SAL e SAL-CPA) provocaram ação inibitória na aprendizagem emocional. A ampla distribuição dos neurônios histaminérgicos no SNC sugere um efeito modulatório desse neurotransmissor em estruturas encefálicas, que apresentam conexões neurais com a amígdala (HASS et al., 2008; ALVAREZ, 2009). Além disso, a organização anatômica do SNH permite uma possível influência na excitabilidade e a na atividade neuronal de várias regiões, como por exemplo, o *locus coeruleus* e o hipocampo, promovendo um controle modulatório tônico nos processos de aprendizagem e memória (SANTOS et al., 2001; LIN et al., 2000). Pode-se exemplificar a existência dessa rede neural entre a amígdala e outras estruturas modulando os comportamentos emocionais, através do estudo de Alvarez & Ruarte (2002). Esses autores demonstraram que a administração simultânea de histamina na amígdala e no hipocampo de ratos prejudicou a latência de fuga em um teste de esquiiva inibitória. No mesmo estudo, a estimulação histaminérgica somente da amígdala reproduziu o efeito inibitório observado quando ambas as estruturas foram estimuladas. Entretanto, a histamina injetada somente no hipocampo foi mais efetiva em aumentar a latência de fuga, sugerindo uma interação funcional entre os neurônios histaminérgicos da amígdala e do hipocampo durante os processos de memória.

A característica peculiar da histamina, e de outras aminas biogênicas, de se projetar difusamente pelo SNC lhe confere uma possível modulação tônica sobre os comportamentos emocionais, ou seja, um nível adequado de histamina seria necessário para a expressão desses comportamentos. Estudo conduzido por Santos e colaboradores (2001) mostrou que a infusão de CPA no colículo inferior de ratos não produziu mudanças significativas nos comportamentos emocionais, enquanto a ranitidina, antagonista do receptor H_2 , induziu comportamentos aversivos caracterizados por respostas autonômicas como piloereção e defecação, sugerindo que a histamina exerce um controle tônico inibitório no colículo inferior nas respostas de aversão, via receptor H_2 .

O sistema histaminérgico modula a atividade neural de estruturas encefálicas, como o *locus coeruleus*, que por sua vez modula o estado de atenção (MCGAUGH, 2004), e apresenta estreita interação neuromodulatória com a amígdala. Estudo *in vitro* conduzido por Korotkova et al (2005) mostrou que a histamina excita os neurônios noradrenérgicos via receptor H_1 no *locus coeruleus* de ratos. Além disso, algumas aminas como a histamina, podem modificar os processos de memória

provavelmente devido à uma relação dose-efeito não linear durante a estimulação emocional (BALDI & BUCHERELLI, 2005). A injeção sistêmica do agonista, L-histidina, poderia ter deslocado a curva dose-efeito da Histamina influenciando a atividade neural de várias regiões encefálicas, dentre elas, o *locus coeruleos*. Essa hipótese é sustentada pelo estudo conduzido por Chen & Sara (2007) que mostrou que a ativação do *locus coeruleos* de ratos através da estimulação elétrica, provocou uma inibição dos neurônios da amígdala. Nossos estudos sugerem que a injeção sistêmica de L-histidina teria diminuído a estimulação noradrenérgico na amígdala, via estimulação do *locus coeruleos*, comprometendo a evocação da memória emocional de camundongos reexpostos ao LCE. Adicionalmente, a infusão do antagonista do receptor H₁, Clorfeniramina, nas doses de 0,016 nmol e 0,052 nmol não comprometeu a memória emocional, enquanto a maior dose prejudicou esse processo. Nós sugerimos que a infusão do antagonista, CPA, na maior dose, inibiu a amígdala que é uma estrutura facilitatória da expressão da memória emocional. Desta forma, no nosso estudo a amígdala inibida induziu um comprometimento da memória emocional em camundongos reexpostos ao LCE.

Os dados do presente estudo corroboram as sugestões de Santos et al (2001) e Liu et al (2000), sugerindo um controle tônico do sistema neural histaminérgico nos comportamentos emocionais. A função adaptativa dos sistemas moduladores, como o histaminérgico, é suportada por um recrutamento coordenado de outros neuromoduladores através da regulação da sua excitabilidade, permitindo assim uma ação modulatória nos mecanismos envolvidos na expressão dos comportamentos relacionados com as emoções, principalmente, a aprendizagem e a memória.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a L-histidina e os receptores H_1 presentes na amígdala não participam das respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade. A L-histidina induz um déficit estado dependente da evocação da memória emocional em camundongos submetidos a exposições repetidas no labirinto em cruz elevado. Adicionalmente, a maior dose de CPA injetada na amígdala causa um comprometimento da memória emocional.

Portanto, nós sugerimos que a expressão dos comportamentos emocionais em roedores está sob a influência da modulação tônica exercida pela Histamina. Além disso, novos estudos deverão ser realizados para o esclarecimento da interação entre o sistema histaminérgico e colinérgico na expressão da memória emocional em roedores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R. et al. Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals-implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p.301-318, 1998.

AHMADI, S et al. Repeated histamine pretreatment decreased amnesia induced by post-training administration of the drug in a step-down inhibitory avoidance test in mice. **Archiv. Iran. Med.**, v. 13, n. 3, p. 2009- 216, 2010.

ALVAREZ, E. O. The role of histamine on cognition, **Behav. Brain. Res.**, v.199, p.183-189, 2009.

ALVAREZ, E.O; BANZAN, A.M. The activation of histamine-sensitive sites of the ventral hippocampus modulates the consolidation of a learned active avoidance response in rats. **Behav. Brain. Res.**, v. 189, p. 92–99, 2008.

ALVAREZ, E.O; RUARTE, M.B. Histaminergic neurons of the ventral hippocampus and the baso-lateral amygdala of the rat: functional interaction on memory and learning mechanisms. **Behav. Brain. Res.**, v. 128, p. 81-90, 2002.

ATZORI M. et al. H2 histamine receptor-phosphorylation of Kv3.2 modulates interneuron fast spiking. **Nat. Neurosci** , v. 3, p. 791–798, 2000.

BACCIOTTINI, L et al. Endogenous histamine in the medial septum-diagonal band complex increases the release of acetylcholine from the hippocampus: a dual-probe microdialysis study in the freely moving rat. **Eur. J. Neurosci**, v. 15, p. 1669-1680, 2002.

BAKKER, R.A. et al. Constitutively active Gq/11-coupled receptors enable signaling by co-expressed G(i/o)-coupled receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 5152– 5161, 2004.

BALDI, E; BUCHERELLI, C. The inverted “u-shaped” dose-effect relationships in learning and memory: Modulation of Arousal and Consolidation. **Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.**, v. 3, p.9-21, 2005.

BAPTISTA, D. et al. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. **Brain. Res.**, v. 1294, p. 29 - 37, 2009.

BARBALHO, C.A. et al. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain. Res.**, v.1267, p.65-76, 2009.

BENARROCH, E.E. Histamine in the CNS: multiple functions and potential neurologic implications. **Neurology**, v. 75, p. 1472–1479, 2010.

BERTOGLIO L.J; CAROBREZ A. P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. **Behav. Brain. Res**, v. 132: p. 135-143, 2002.

BLANDINA, P. et al. Histamine neuronal system as therapeutic target for the treatment of cognitive disorders. **Future. Neurol**, v. 5, p. 543–555, 2010.

BLANDINA, P. et al. Acetylcholine, Histamine, and Cognition: Two Sides of the Same Coin. **Learn. Mem**, v. 11, p. 1-8, 2004.

BLISS, T.V; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 31-39, 1993.

BONINI, J.S. Histamine facilitates consolidation of fear extinction. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v. 14, n.9 p. 1209-1217, 2011.

BREWIN, C.R, et al. Memory for emotionally neutral information in posttraumatic stress disorder: a meta-analytic investigation. **J. Abnorm. Psychol**, v. 116, n.3, p. 448–463, 2007.

BROWN, R.E. et al. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**, v. 63, p. 637-672, 2001.

CANGIOLI, L. et al. Activation of histaminergic H3 receptor in the rat BL amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. **Europ. J. Neurosci**, v. 16, p. 521-528, 2002.

CANTERAS, N.S; BITTENCOURT, J.C. **Comportamentos motivados e emoções. In: Neurociências da mente e do Comportamento.** Ed Guanabara Koogan, 2008, p.228-240.

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

CHEN, F. J; SARA, S.J. Locus coeruleus activation by foot shock or electrical stimulation inhibits amygdala neurons. **Neuroscience**, v. 144, p. 472–481, 2007.

CORNÉLIO, A.M. et al. Environmentally induced antinociception and hyperalgesia in rats and mice. **Brain. Res**, v. 14-15, p. 56-62, 2011.

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

CRUZ-MORALES, S.E. et al. One trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze test in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 72, p. 973-978, 2002.

CUI, H. et al. Effects of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs in the amygdala. **Neuroscience**, v. 151, p.703-712, 2008.

CURRAN, V.; MINTZER, M. Z. Psychopharmacology of memory. **Psychopharmacology**, v.188, p. 393-396, 2006.

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

DAI, H et al. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. **Neurosci. Res.**, v.52, n.2, p.306-313, 2006.

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

DAMÁSIO, A.R. **O Erro de Descartes: Emoção, Razão e o Encéfalo Humano.** São Paulo, ed. companhia das Letras, 1996, p. 336.

DEBIEC, J. et al. Noradrenergic enhancement of reconsolidation in the amygdala impairs extinction of conditioned fear in rats—a possible mechanism for the persistence of traumatic memories in PTSD. **Depression and anxiety**, v. 28, p. 186–193, 2011.

DEGROOT, A; TREIT, D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. **Brain. Res.**, v. 949, p. 60–70, 2002.

DERE, E. et al. Histidine-decarboxylase knockout mice show deficient nonreinforced episodic object memory, improved negatively reinforced water-maze performance, and increased neo- and ventro-striatal dopamine turnover. **Learn. Mem.** v. 10, n.6, p. 510–519, 2003.

DUNFORD, P.J. et al. Histamine H₄ receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology.** v. 119, n. 1 , p. 176-183, 2007.

EHRlich, I. et al. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. **Neuron**, v.62, p.757-767, 2009.

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

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

FERRY, B et al. Involvement of α_1 -adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. **Eur. J. Pharmacol**, v. 372, n. 1, p. 9-16, 1999.

FILE, S.E et al. Trial 2 in the elevated plus maze: a different form of fear. **Psychopharmacology**, v.11, p.491-494, 1993.

FRISCH, C., et. Memory improvement by post-trial injection of lidocaine into the tuberomammillary nucleus, the source of neuronal histamine. **Neurobiol. Learn. Mem**, v. 72, p. 69–77, 1999.

GALVIS-ALONSO, O.Y. et al. A combined study of behavior and Fos expression in limbic structures after re-testing Wistar rats in the elevated plus-maze. **Brain. Res. Bull**, v.81.n.6, p. 595-599, 2010.

GARCÍA, A.M.B. et al. The effects of pentylenetetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. **Behav. Brain. Res**, v. 217, p.171-177, 2011.

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

GHIASVAND, M, et al. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the central amygdala impairs inhibitory avoidance memory consolidation via NMDA receptors. **Neurobiol. Learn. Mem**, v. 96, n.2, p.333-338, 2011.

GIANLORENÇO, A. C. et al. L-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H1 receptor. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry**, v. 35, p. 91-95, 2011 a.

GIANLORENÇO, A.C. et al. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. **Brain. Res. Bull**, v. 86, n.1-2, p.134-138, 2011 b.

GERRITSEN, L. Amygdala to hippocampal volume ratio is associated with negative memory bias in healthy subjects. **Psychological Medicine**, v. 11, p.1-9, 2011.

GRIEBEL, G, et al. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. **Behav Proc** , v, 29, p. 37 – 48, 1993.

GUPTA, R et al. The amygdala and decision-making. **Neuropsychology**. v. 49, p. 760- 766, 2011.

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

HAAS, B.W; CANLI, B.W. Emotional memory function, personality structure and psychopathology: A neural system approach to the identification of vulnerability markers. **Brain. Res. Rev**, v. 58, n. 1, p. 71–84, 2008.

HAAS, H.L.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Nat. Rev. Neurosci**, v. 4, p. 121–130, 2003.

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

HATFIELD, T., MCGAUGH, J.L. Norepinefrine infused into basolateral amygdala post training enhances retention in a special water maze task. **Neurobiol. Learn. Mem**, v. 71, p. 232-239, 1999.

HASENOHRL, R.U. et al. Comparison of intra-accubens injection of histamine with histamine H1-receptor antagonist chlorpheniramine in effects on reinforcement and memory parameters. **Behavioural Brain Research**, v.124, p. 203-2111, 2001.

HASENOHRL, R.U. et al. Intraventricular infusion of the histamine H1 receptor antagonist chlorpheniramine improves maze performance and has anxiolytic-like effects in aged hybrid Fischer 344/Brown Norway rats, **Exp. Brain. Res**, v. 128, p. 435–440, 1999.

HOLMES, A; RODGERS, R. J . Responses of Swiss–Webster Mice to Repeated Plus-Maze Experience: Further Evidence for a Qualitative Shift in Emotional State? **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 60, n. 2, p. 473–488, 1998.

HU, H et al. Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. **Cell**, v.131, n. 1, p. 160-173, 2007.

HUANG, Y.W. et al. facilitating effect of histamine on spatial memory deficits induced by dizocilpine as evaluated by 8-arm radial maze in SD rats. **Acta. Pharmacol.Sin**, v.24, n. 12, p. 1270-1276, 2003.

ISAYAMA, S. et al. Effects of Histidine on working memory deficits induced by the 5-HT_{1A}-receptor agonist 8-OH-DPAT. **J. Pharmacol**, v. 86, p. 451-453, 2001.

JIANG, X. Histaminergic modulation of excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. **Neuroscience**, v. 13, p. 691–703, 2005.

JÜRGENSON, M. et al. Behavioral profile of mice with impaired cognition in the elevated plus-maze due to a deficiency in neural cell adhesion molecule. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 96. n. 4, p. 461-468, 2010.

KALIN, N. H.et al. The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. **J. Neurosci**, v.24, p.5506-5515, 2004.

KHATEB, A. et al. Cholinergic nucleus basalis neurons are excited by histamine in vitro. **Neuroscience**, v. 69, p. 495–506, 1995.

KLAPDOR, K.et al. Facilitation of learning in adult and aged rats following bilateral lesions of the tuberomammillary nucleus region. **Behav. Brain. Res**, v. 61, p. 113-116, 1994.

KNAPSKAS, E. et al. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 1113-1173, 2007.

KOROTKOVA, T.M. et al. Histamine excites noradrenergic neurons in locus coeruleus in rats. **Neuropharmacology**, v.49, p. 129-134, 2005.

KUMAR, K. V. et al. Histaminergic H1 receptors mediate L-Histidine-induced anxiety in elevated plus-maze test in mice. **Behav. Pharmacol.**, v. 18, p. 213-217, 2007.

LABAR, K. S.; LEDOUX, J. E. Partial disruption of fear conditioning in rats with unilateral amygdala damage: correspondence with unilateral temporal lobectomy in humans. **Behav. Neurosci.**, v. 110, p. 991-997, 1996.

LEDOUX, J. E. Emotional circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 23, p. 155-184, 2000.

LEONARD, C.M; SCOTT, J.W. Origin and distribution of the amygdalofugal pathways in the rat: an experimental neuroanatomical study. In: KANAPSKAS, E et al. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 1113-1173, 2007.

LEURS R. et al. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. **Pharmacol. Ther.**, v. 66, p. 413-463, 1995.

LIN, J.S. Brain structures and mechanisms involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. **Sleep Med. Rev.** 4 (5), 471-503, 2000.

LIN, J.S., et al. Immunohistochemical evidence for the presence of type B monoamine oxidase in histamine-containing neurons in the posterior hypothalamus of cats. **Neurosci. Lett.** v. 128, p. 61-65, 1991.

LING, P et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, 161-171, 2004.

LINTUNEN, M. et al. Postnatal expression of H1-receptor mRNA in the rat brain: correlation to L-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. **Eur. J. Neurosci.** v. 10, n.7, p. 2287-2301, 1998.

- LISTER, G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p.180-185, 1987.
- LYNCH M. A. Long-Term Potentiation and Memory. **Physiol Rev.** v.84, p. 87–136, 2004.
- MALMBERG-AIELLO, P. et al. Mouse light/dark box reveals anxiogenic-like effects by activation of histamine H1 receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 71, p. 321-326, 2002.
- MARAS, P.M; PETRULIS, A. The anterior medial amygdala transmits sexual odor information to the posterior medial amygdala and related forebrain nuclei. **Eur. J. Neurosci**, v.32, n.3, p.469-482, 2010.
- MARTÍNEZ, J.C. et al. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. **Behav. Processes.** v. 60, p. 15- 26, 2002.
- MCGAUGH, J.L. The Amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 27, p. 1- 28, 2004.
- MCGAUGH, J.L, ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Curr. Opin. Neuro-biol.** v. 12, p. 205-210, 2002.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. G. A two-dimensional neurophysiology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v.18, p.215-232, 2004.
- MESSIER, C . et al. New techniques in stereotaxic Surgery and Anesthesia in the mouse. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 63, p 313-318, 1999.
- MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiol. Clin**, v. 33, p. 55-66, 2003.
- MIYATA, S et al. Chlorpheniramine exerts anxiolytic-like effects and activates prefrontal 5-HT systems in mice. **Psychopharmacology**, v. 213, n.2-3, p. 441-452, 2011.
- MOCHIZUKI, T. et al. Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. **Physiol. Behav**, v. 51, p. 391–394, 1992.
- MORGAN R. K, et al. Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3₊ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. **J. Immunol**, v. 178, p. 8081–8089, 2007.
- NUNES-DE-SOUZA, V et al. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behav. Brain Res**, v. 187 (1), p. 72-79, 2008.
- NUNES-DE-SOUZA, R.L et al. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v.150, n 3, p. 300-310, 2000.

- PARE, D. et al. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **J. Neuroscience**, v.92, p.1-9, 2004.
- PASSANI, M. B. et al. Histamine H3 receptor-mediated impairment of contextual fear conditioning and *in vivo* inhibition of cholinergic transmission in the rat basolateral amygdala. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, p. 1522–32, 2001.
- PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.
- PESSOA, L. On the relationship between emotion and cognition. **Nat. rev. neurosci**, v. 9, p. 148-158, 2008.
- PRAST, H et al. Histaminergic neurons modulate acetylcholine release in the ventral striatum: role of H1 and H2 histamine receptors. **Naunyn-Schmiedeberg. Arch. Pharmacol**, v. 360, p.552–557, 1999.
- PRAST, H; ARGYRIOU, A.; PHILIPPU, A. Histaminergic neurons facilitate social memory in rats. **Brain Res.**, v. 734, p. 316-318, 1996.
- PRICE, J. L. Comparative aspects of amygdala connectivity. **Ann NY Acad Sci**, v. 985, p. 50–58, 2003.
- PRIVOU, C. et al. The H1- and H2-histamine blockers chlorpheniramine and ranitidine applied to the nucleus basalis magnocellularis region modulate anxiety and reinforcement related processes. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 1019-1032, 1998.
- QUEVEDO, J et al. Consolidação da memória e estresse pós-traumático. **Revista Brasileira de Psiquiatria**; v. 25 (supl I): 25-30; 2003.
- RIBEIRO, A.M et al. 2011. Basolateral amygdala inactivation impairs learned (but not innate) fear response in rats. **Neurobiol. Learn. Mem.** 95(4): 433-440.
- RICHARDSON, M.P. et al. Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. **Nat. Neurosci**, v.7, n.3, p. 278–285, 2004.
- RODGERS, R.J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 30, p. 289-304, 1997.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, J.T. Factor Analysis of spatiotemporal and ethological measures in the marine elevated plus-Maze test of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 52 p. 297-303, 1995.
- ROOZENDAAL, B et al. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 90, n. 3, p. 576–579, 2008.

- ROSTAMI, P. et al. The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze of anxiety-like behavior. **Physiology & Behavior**, 2006.
- RUBIO S. et al. Effects of histamine precursor and (R)- alpha-methylhistamine on the avoidance response in rats. **Behav. Brain. Res**, v.124, n. 2, p. 177–81, 2001.
- RYU, J. H. et al. Ontogenic development of histamine receptor subtypes in rat brain demonstrated by quantitative autoradiography. **Brain. Res**, v.87, p.101-110, 1995.
- SAH, P. et al. The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. **Physiol. Rev.**, v 83, p.804-827, 2003.
- SANTOS, N.R. et al. Escape behavior under tonic inhibitory control of histamine H₂-receptor mediated mechanisms in the midbrain tectum. **Behav. Brain. Res**, v. 124, n. 2, 167-175, 2001.
- SERAFIM, K.R. et al. L-histidine provokes state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v.43, n.1, p.100-106, 2010.
- SHIN, L.M; LIBERZON, I. The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v.35, p. 169-191, 2010.
- SIMON, P. et al. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmission. **Behav. Brain Res**, v. 61, p. 59-64, 1994.
- STEPHENS, D. N. et al Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacol.**, v. 90, p. 166-169, 1986.
- STERN, C. A. J. et al. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 90, p.545-550, 2008.
- STRAKHOVA, M.I. et al. Localization of histamine H₄ receptors in the central nervous system of human and rat. **Brain. Res**, v.1250, p.41 - 48, 2009.
- TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.44, p. 463- 469, 1993.
- VAN RUITENBEEK, P. et al.. Histamine H₁ receptor antagonist cetirizine impairs working memory processing speed, but not episodic memory. **Br. J. Pharmacol**, v. 161, n.2, 456-466, 2010.
- VICTOR et al. Relationship between amygdala responses to masked faces and mood state and treatment in major depressive disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.67, n.11, p.1128-1138, 2010.

ZARRINDAST, M-R et al. Anxiety-like behavior induced by histaminergic agents can be prevented by cannabinoidergic WIN55,212-2 injected into the dorsal hippocampus in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 94, p. 387-396, 2010.

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

ZLOMUZICA, A. Histamine H1 receptor knockout mice exhibit impaired spatial memory in the eight-arm radial maze. **Br. J. Pharmacol**, v. 157, p. 86–91, 2009.

YANAY, K. et al. Behavioral characterization and mounts of brain monoamines and their metabolites in mice lacking histamine H₁ receptors. **Neuroscience**, v. 87, p. 479-487. 1998.

YANAY, K.; TASHIRO, M. The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: An insight from human positron emission tomography studies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, p. 1-15, 2007.

YU et al. Effect of endogenous histamine in the ventral hippocampus on fear memory deficits induced by scopolamine as evaluated by step-through avoidance response in rats. **Physiol. Behav**, v. 87, 687- 693, 2006.