

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

**DIOGO COSTA GARÇÃO**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO NEURAL NA  
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DE *Meriones Unguiculatus* APÓS LESÃO  
ISQUÊMICA UNILATERAL ENCEFÁLICA.**

**São Carlos**

**2013**

**DIOGO COSTA GARÇÃO**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO NEURAL NA  
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DE *Meriones Unguiculatus* APÓS LESÃO  
ISQUÊMICA UNILATERAL ENCEFÁLICA.**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Mattioli

**São Carlos**

**2013**

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

G237ph

Garção, Diogo Costa.

Participação do sistema histaminérgico neural na recuperação funcional de *Meriones unguiculatus* após lesão isquêmica unilateral encefálica / Diogo Costa Garção. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
99 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisioterapia. 2. Isquemia. 3. Recuperação funcional. 4. Treinamento funcional. 5. Histamina. I. Título.

CDD: 615.82 (20<sup>a</sup>)

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Banca Examinadora para Defesa de Tese de Doutorado de Diogo Costa Garção, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

Banca Examinadora



Prof. Dra. Rosana Mattioli

(UFSCar)



Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo

(UFSCar)




Prof. Dr. João Eduardo de Araújo

(USP)



Prof. Dra. Luciana Cofiel Marin

(USP)



Prof. Dra. Flávia Faganello Navega

(UNESP)

Aos meus pais, **Joel e Lourdes**, ao meu irmão **Danilo** e a minha avó **Marieta** (*in* memória) por serem à base da minha vida e tornar possível à realização desse sonho.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**À Prof Dr Rosana Mattioli**, pela forma que me acolheu no laboratório, por ter acreditado em mim e por tudo que me ensinou durante esses anos. Admiro-te pela profissional ética, humana e competente. Muito obrigado!

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por repor minhas forças e iluminar meus passos todos os dias.

Ao **Prof. Dr João Eduardo de Araújo** e a **Guilherme Bertolino**, por terem me ensinado o procedimento cirúrgico.

À **Profª Drª Margarete Zanardo** e a **equipe do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural do Instituto de Pesquisa e Tecnologia – ITP** pela grande colaboração nas análises histológicas.

À **Profª Drª Flávia Roberta Faganello Navega**, **Profª Drª Margarete Zanardo** e ao **Prof. Dr João Eduardo de Araújo** pelas considerações realizadas durante a qualificação, enriquecendo este trabalho.

Aos colegas de laboratório: **Marcos, Fernanda Romanguera, Luciana Cofiel, Kelly, Nadiesca, Anna Carolina, Lucas, Fernanda Daher, Glessler e Jorge** por todos os momentos que passamos juntos.

Aos amigos **Catarina e Michel**, pelos conselhos e companhia.

Aos **Professores, colegas e funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia pela companhia e colaboração em minha formação profissional.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** (processo 2008/10349-2), pelo auxílio financeiro concedido.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*A parte experimental dos dois estudos deste trabalho foi desenvolvida no laboratório de Neurociências da Universidade Federal de São Carlos sob a orientação da Profª Drª Rosana Mattioli e as análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural do Instituto de Pesquisa e Tecnologia – ITP, com a colaboração da Profª Drª Margarete Zanardo Gomes. 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 apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 2008/10349-2).*



## RESUMO

O Estudo I teve como objetivo testar um modelo experimental de recuperação funcional da pata anterior para gerbilos após lesão isquêmica unilateral encefálica e investigar as alterações comportamentais e expressão de Fos em gerbilos submetidos a treino motor após lesão isquêmica unilateral encefálica. Os testes comportamentais utilizados foram o teste de estimulação da vibrissa e a tarefa de recolher tablete. Os animais foram distribuídos em quatro subgrupos: Lesão fictícia (n= 12), Lesão fictícia treinado (n= 11), Lesão (n= 11) e Lesão treinado (n= 12). Cortes das regiões do córtex motor, hipocampo e estriado dorsal foram expostos à reação de imunohistoquímica para expressão da Fos, em seguida, foi calculado o valor médio do número de neurônios em cada região. Os dados comportamentais foram analisados através do teste de *Kruskal-Wallis* e os dados morfológicos foram submetidos à análise de variância de uma via, ambos seguidos do teste *Student-Newman-Keuls* ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos lesados apresentam médias significativamente menores na tarefa de recolher tablete e maiores porcentagens de erro no teste de estimulação da vibrissa quando comparados aos grupos lesão fictícia, indicando que a lesão prejudicou o desempenho motor em ambos os testes. No último treino, os grupos treinados apresentaram aumento significativo na tarefa de recolher tablete em relação aos grupos não treinados, demonstrando que o treino funcional melhora o desempenho da tarefa em animais intactos e lesados. Houve aumento significativo na marcação dos neurônios do córtex motor e hipocampo do grupo lesado treinado quando comparado ao grupo lesado. O treino funcional aumentou o desempenho motor em animais treinados independente da lesão na tarefa de recolher tablete e provocou aumento da ativação neuronal no córtex motor e hipocampo dos animais lesados. Além disso, o modelo experimental utilizado se mostrou útil para avaliar o desempenho motor da pata anterior de gerbilos. O Estudo II teve como objetivo investigar o efeito do precursor da histamina (L-histidina) e do antagonista dos receptores  $H_1$  (Pirilamina) na recuperação funcional de gerbilos (*Meriones unguiculatus*) após lesão isquêmica unilateral do encéfalo. Para isso, foram realizados dois experimentos, sendo empregados os mesmos procedimentos experimentais, no entanto, diferem nos tratamentos farmacológicos realizados, que foram: I - L-histidina (doses: 100 mg/kg e 200 mg/kg) e II - Pirilamina (doses: 35 mg/kg e 70 mg/kg), sendo ambos acompanhados de grupos controles da droga (salina), cirurgia (lesão fictícia) e treino motor (não treinado). Os testes comportamentais utilizados foram o teste de estimulação da vibrissa e a tarefa de recolher tablete. Foi utilizado o Teste de *Kruskal-Wallis* ( $p < 0,05$ ), seguido do Teste de comparações múltiplas de *Student - Newman - Keuls* ( $p < 0,05$ ) e correção de *Bonferroni* ( $p < 0,025$ ). Verificou-se que a lesão prejudica o desempenho motor e o treino da tarefa de recolher tablete melhora o desempenho de animais independente da lesão. A L-histidina associada com o treino motor prejudicou a recuperação funcional, enquanto, a pirilamina combinada com o treino potencializou a recuperação funcional. Com relação ao teste de estimulação da vibrissa, os animais lesados submetidos ao treino e tratados com l-histidina apresentaram déficit de evocação da memória, contudo, a pirilamina possui efeito contrário quando aplicada em animais lesados e treinados. Os resultados sugerem que o sistema histaminérgico neural participa do processo de recuperação funcional de gerbilos submetidos à lesão isquêmica unilateral encefálica.

**Palavras chaves:** Isquemia; Recuperação Funcional; Treino Motor e Histamina.

## ABSTRACT

The aim of the first study was to investigate behavioural alterations and Fos expression in gerbils submitted to functional training after unilateral cerebral ischaemic injury. The behavioural procedures that were used to test functional recovery were the vibrissal stimulation test and the pellet-collecting task. Twenty-four hours after surgery, the animals were submitted to the experimental procedure, which lasted three weeks. The animals were distributed into four subgroups: sham lesion, sham lesion and trained, ischaemic injury and ischaemic injury and trained. The motor cortex, hippocampus and dorsal striatum were subjected to immunohistochemistry reaction for Fos expression, and the mean number of cells in each region was calculated. Behavioural data were analysed using the *Kruskal Wallis* test ( $p \leq 0.05$ ), and the morphological data were subjected to one-way Analysis of Variance, both followed by the *Student-Newman-Keuls* test ( $p \leq 0.05$ ). The animals in the injury group presented significantly lower averages in the pellet-collecting task and higher percentages of error in the vibrissal stimulation test when compared to animals in the sham lesion group, indicating that the lesion impaired motor performance in both tests. After training, the trained groups showed a significant increase in the pellet-collecting task compared to untrained groups, demonstrating that functional training improves task performance in sham and injured animals. A significant increase in the activation of neurons in the motor cortex and hippocampus of the injury and trained group was observed when compared to the injured group. Functional training increased the motor performance of the trained animals, independently of lesion, in the pellet-collecting task and caused increased neuronal activation in the motor cortex and hippocampus in the injury animals. Moreover, the presented method is useful for the evaluation of motor performance in gerbils. The objective of the second study was to investigate the effects of the histamine precursor L-Histidine and the H<sub>1</sub>-receptor antagonist Pyrilamine on the functional recovery of gerbils (*Meriones unguiculatus*) following a unilateral ischemic brain injury. Two experiments were conducted under the same experimental procedures to test the effects of two pharmacological treatments in experiment I, L-Histidine doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg and in experiment II, Pyrilamine was administered at doses of 35 mg/kg and 70 mg/kg. Both experiments were accompanied by control groups for the drug (saline), the lesion (sham lesion) and training on the pellet-collecting task (untrained). The behavioural tests that were used to test functional recovery were the vibrissal stimulation test and the pellet-collecting task. The *Kruskal-Wallis* test ( $p < 0.05$ ), the *Student-Newman-Keuls* multiple comparison test ( $p < 0.05$ ) and a *Bonferroni* correction ( $p < 0.025$ ) were used for statistical analysis. It was established that a unilateral cerebral ischemic injury impairs motor performance and that training on the pellet-collecting task improves performance independently of the lesion. L-Histidine impaired functional recovery when administered in combination with motor training, while Pyrilamine in combination with training potentiated functional recovery. With respect to the vibrissal stimulation test, the injured animals that received training in combination with L-Histidine showed a memory recall deficit; however, Pyrilamine had the opposite effect in animals that were injured and trained. These results suggest that the neural histaminergic system participates in the process of functional recovery of gerbils following a unilateral ischemic brain injury.

**Keywords:** Functional Recovery; Motor Training; Ischemia; Histamine.

## LISTA DE FIGURAS

### ESTUDO I

- Figura 1:** Foto do gerbilo (*Meriones unguiculatos*). 26
- Figura 2:** Fotografia do aparato experimental de recolher tablete. 28
- Figura 3:** Médias ( $\pm$  DP) do número de tentativas de sucesso na tarefa de recolher tablete durante o primeiro e vigésimo primeiro treino dos animais submetidos à lesão fictícia, Lesão Fictícia Treinado, Lesão e Lesão Treinado. 31
- Figura 4:** Médias ( $\pm$  DP) da porcentagem de erros do teste de estimulação de vibrissa durante o primeiro e vigésimo primeiro treino dos animais submetidos à lesão fictícia, Lesão Fictícia Treinado, Lesão e Lesão Treinado. 32
- Figura 5:** Médias ( $\pm$ DP) do número de neurônios no córtex motor, hipocampo e estriado dorsal dos grupos lesão fictícia, lesão fictícia treinado, lesão e lesão treinado. 34
- Figura 6:** Fotomicrografia de cortes coronais do Córtex Motor de gerbilos, ilustrando a marcação imunohistoquímica contra c-Fos. 35
- Figura 7:** Fotomicrografia de cortes coronais da área CA1 do hipocampo de gerbilos, ilustrando a marcação imunohistoquímica contra c-Fos. 35

### ESTUDO II

- Figura 1:** Foto do gerbilo (*Meriones unguiculatos*). 41
- Figura 2:** Fotografia do aparato experimental de recolher tablete. 43

**Figura 3:** Médias ( $\pm$  EPM) do número de tentativas de sucesso na tarefa de recolher tablete durante o primeiro e vigésimo primeiro treino dos animais lesão fictícia ou lesão isquêmica, não treinado ou treinados, tratados com salina ou L-histidina . 48

**Figura 4:** Médias ( $\pm$  EPM) do número de tentativas de sucesso na tarefa de recolher tablete durante o primeiro e vigésimo primeiro treino dos animais submetidos à lesão fictícia ou lesão isquêmica, não treinado ou treinados, tratados com salina ou Pirilamina. 49

**Figura 5:** Médias ( $\pm$  EPM) das porcentagens de erro do teste de estimulação da vibrissa durante o primeiro e vigésimo primeiro treino dos animais submetidos à lesão fictícia ou lesão isquêmica, não treinado ou treinados, tratados com salina ou L-histidina. 51

**Figura 6:** Médias ( $\pm$  EPM) das porcentagens de erro do teste de estimulação da vibrissa durante o primeiro e vigésimo primeiro treino dos animais submetidos à lesão fictícia ou lesão isquêmica, não treinado ou treinado, tratado com salina ou Pirilamina. 53

## LISTA DE TABELAS

### ESTUDO II

**Tabela 1:** Grupos experimentais tratados com L-histidina e respectivos controles 45

**Tabela 2:** Grupos experimentais tratados com Pirilamina e respectivos controles. 46

## LISTA DE ABREVIATURAS

SNC – Sistema Nervoso Central

H<sub>1</sub> - Receptor Histaminérgico 1

H<sub>2</sub> - Receptor Histaminérgico 2

H<sub>3</sub> - Receptor Histaminérgico 3

H<sub>4</sub> - Receptor Histaminérgico 4

IP3 - Inositol Trifosfato

DAG - Diacilglicerol

AMPC - Adenosina monofosfato cíclico

PKA - Proteína kinase A

GABA – Ácido gama-aminobutírico

CPA - Clorfeniramina

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

T1- Primeiro treino

T21- Vigésimo primeiro treino

S - Sham

ST - Sham Treinado

L - Lesão

LT - Lesão Treinado

min - Minuto

µm - Micrómetro

PBS - Solução Tampão

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

M - mol

pH - Potencial Hidrogeniônico

ABC – Avidina Hiotina Peroxidade

BSA - Soro Albumino Bovino

EPM - Erro Padrão da Média

SNK - Student – Newman – Keuls

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

lh – L-histidina

P - Pirilamina

## LISTA DE ANEXO

<b>ANEXO A</b> – Parecer do comitê de ética	67
<b>ANEXO B</b> – Manuscrito I submetido à <i>Neuroscience Letters</i>	69
<b>ANEXO B</b> - Manuscrito II submetido ao <i>Journal of Neuroscience Methods</i>	84



## SUMÁRIO

<b>CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	18
<b>OBJETIVOS</b>	22
<b>ESTUDO I: Efeitos comportamentais e expressão de Fos induzidos pelo treino funcional em <i>Meriones unguiculatus</i> após lesão isquêmica unilateral encefálica.</b>	23
<b>RESUMO</b>	23
<b>ABSTRACT</b>	24
<b>INTRODUÇÃO</b>	25
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
<i>Amostra</i>	26
<i>Aspectos Éticos</i>	26
<i>Procedimento Cirúrgico</i>	26
<i>Testes Comportamentais</i>	27
<i>Delineamento Experimental</i>	28
<i>Grupos Experimentais</i>	29
<i>Filmagem</i>	29
<i>Eutanásia dos animais</i>	29
<i>Preparo das lâminas e processamentos para imunohistoquímica</i>	29
<i>Análise morfológica quantitativa</i>	30
<i>Análise estatística</i>	30
<b>RESULTADOS</b>	30
<b>DISCUSSÃO</b>	36
<b>ESTUDO II: Influência do sistema histaminérgico neural na recuperação funcional de <i>Meriones unguiculatus</i> após lesão isquêmica unilateral encefálica.</b>	38
<b>RESUMO</b>	38
<b>ABSTRACT</b>	39
<b>INTRODUÇÃO</b>	40

<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	41
<i>Amostra</i>	41
<i>Aspectos Éticos</i>	41
<i>Procedimento Cirúrgico</i>	42
<i>Testes Comportamentais</i>	42
<i>Delineamento Experimental</i>	43
<i>Tratamento Farmacológico e Procedimento de Injeção</i>	44
<i>Filmagem</i>	44
<i>Análise Histológica</i>	44
<i>Experimentos</i>	45
<i>Análise Estatística</i>	46
<b>RESULTADOS</b>	47
<b>DISCUSSÃO</b>	54
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	57
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	58
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO - A</b>	67
<b>ANEXO - B</b>	69
<b>ANEXO - C</b>	84

## CONTEXTUALIZAÇÃO

### *Sistema histaminérgico neural, recuperação funcional e neuroplasticidade.*

Há cerca de quatro décadas, iniciaram-se estudos sobre o sistema histaminérgico neural devido a seu efeito sedativo (Gabarg *et al.*, 1974), sendo depois descoberto seu papel como um neurotransmissor (Haas *et al.*, 1991; Onodera *et al.*, 1994).

A histamina é uma monoamina biogênica incapaz de ultrapassar a barreira hematocefálica que é encontrada nos mastócitos e em neurônios do sistema nervoso central. Sua degradação ocorre pela ação da enzima N-metiltransferase e sua síntese através da descarboxilação do aminoácido L-histidina (Watanabe *et al.*, 1984). O local de síntese deste neurotransmissor em mamíferos é o núcleo tuberomamilar, que está localizado na região posterior do hipotálamo (Cooper *et al.*, 1996). As fibras eferentes do núcleo tuberomamilar projetam-se em duas direções: as fibras ascendentes passam pelo feixe prosencefálico medial e pela face ventral do hipotálamo; e as fibras descendentes projetam-se para o cerebelo e medula espinhal (Wada *et al.*, 1991).

As ações histaminérgicas centrais são mediadas por quatro subclasses de receptores ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  e  $H_4$ ), os quais diferem em farmacologia, localização e ações intracelulares em que estão envolvidos (Leurs *et al.*, 1995). No sistema nervoso central estão presentes os receptores  $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$ , sendo que os receptores  $H_1$  e  $H_2$  são pós-sinápticos e o  $H_3$  é um auto-receptor pré-sináptico que regula a síntese e liberação de histamina neural (Schwartz *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2005). O receptor  $H_4$  foi identificado no sistema nervoso central e sua função, até o momento, é considerada restrita à dor (Strakhova *et al.*, 2009).

Os receptores  $H_1$  são receptores acoplados a proteína G e a sua ativação estimula a atividade da fosfolipase C que gera dois segundos mensageiros, o inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Tais segundos mensageiros provocam liberação de cálcio no citosol e bloqueiam a abertura dos canais de potássio gerando despolarização celular. Os receptores  $H_1$  possuem vasta distribuição no córtex, hipocampo, amígdala, tálamo, núcleo estriado e cerebelo (Brown *et al.*, 2001).

Os receptores  $H_2$  também são metabotrópicos e, apesar de atuarem por mecanismos diferentes que os receptores  $H_1$ , ao serem estimulados ativam a adenil ciclase, libera o segundo mensageiro (adenosina monofosfato cíclico – AMPc) e em seguida ativam a proteína kinase A (PKA) (Leurs *et al.*, 1995). Distribuídos no encéfalo e medula espinhal, os receptores  $H_2$  possuem altas densidades nos núcleos da base e em regiões do sistema límbico, como amígdala e hipocampo. A estimulação desses receptores pode disparar cascatas

intracelulares e estimular reguladores essenciais, responsáveis pelas alterações funcionais e estruturais nas sinapses (Köhler *et al.*, 2011).

Quando ativados, os autorreceptores H<sub>3</sub> promovem a inibição da ativação da adenil ciclase e conseqüentemente a diminuição da produção do segundo mensageiro (AMPC). No núcleo túbero mamilar, os receptores H<sub>3</sub> agem modulando a liberação e síntese de histamina e a liberação de outros neurotransmissores como a acetilcolina, dopamina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). No encéfalo possui alta distribuição no córtex cerebral, hipocampo, amígdala, núcleo acumbente, núcleo estriado, substância negra e cerebello (Brown *et al.*, 2001).

Os receptores H<sub>4</sub> são expressos principalmente em células de origem hematopoiética, como eosinófilos e mastócitos, além disso, recentemente foi identificado no sistema nervoso central de humanos e ratos na amígdala, cerebello, corpo caloso, córtex pré-frontal e tálamo. (Haas *et al.*, 2008; Neumann *et al.*, 2010). Moya-García e colaboradores (2011) demonstraram que os receptores H<sub>4</sub> promovem hiperpolarização e inibição dos disparos neuronais, após verificar as ações intracelulares durante a microinfusão de agonista seletivo. Até o momento, os estudos sugerem que esta ultima subclasse de receptores vem sendo associada na mediação da nocicepção (Connely *et al.*, 2009).

Várias pesquisas têm sido realizadas no sentido de verificar quais influências o sistema histaminérgico neural exerceria sobre as funções do sistema nervoso central. Dentre estas funções estão o controle do ritmo circadiano e do sono (Burns *et al.*, 2003), os processos motivacionais (White e Rumbold, 1988), as alterações comportamentais (Onodera *et al.*, 1994), a ansiedade (Faganelo e Mattioli, 2007), a percepção da dor (Mobarakeh *et al.*, 2000), a modulação da atividade psicomotora (Alvarez *et al.*, 1994), a aprendizagem e memória (Mattioli *et al.*, 1998; Cofiel e Mattioli, 2006) e a plasticidade e recuperação funcional do sistema nervoso central (Weiler *et al.*, 1992; Piratello e Mattioli, 2004; Piratello e Mattioli, 2007).

Evidências experimentais indicam que o sistema histaminérgico neural pode ter importante papel na recuperação funcional do sistema nervoso central, entretanto, tem apresentado resultados contraditórios. Um estudo realizado por Weiler *et al.* (2007) sugere que a lesão unilateral do núcleo túbero mamilar de ratos, local de produção da histamina no sistema nervoso central, prejudicou o processo de recuperação funcional em ratos após hemivibrisectomia. Neste contexto, Garção *et al.* (2009) demonstraram que a CPA impede a recuperação funcional da tarefa de aprendizagem espacial em peixes *Carassius auratus* submetidos à ablação telencefálica.

Por outro lado, Piratello e Mattioli (2004) sugeriram que a CPA acelerou o processo de recuperação funcional em peixes após lesão vestibular. Outro estudo em gatos demonstrou que a Tioperamida, um antagonista dos receptores H<sub>3</sub>, favorece a recuperação funcional sensório-motora e acelera a compensação vestibular (Tighilet *et al.*, 2006). Porém, o estudo de Piratello e Mattioli (2007) apresentou resultados opostos, em que o aumento dos níveis de histamina no sistema nervoso central, através do bloqueio dos receptores H<sub>3</sub> (Tioperamida) impediu a compensação vestibular em peixes *Carassius auratus*.

Segundo Carmichael (2003), a recuperação funcional baseia-se em três fases. A primeira é caracterizada pela resolução do dano agudo provocado pela lesão do tecido cerebral, sendo observadas inicialmente pequenas melhoras na função neurológica nos primeiros dias após a lesão, que são oriundas, dentre outras causas, à redução do edema local, reperfusão da área de penumbra isquêmica e resolução de processos inflamatórios (Hallett, 2001; Chen *et al.*, 2002; Carmichael, 2003). A segunda fase envolve os processos neuroplásticos, na qual ocorrem profundas mudanças estruturais e fisiológicas no tecido cerebral (Calabresi *et al.*, 2003). E por fim, as estratégias comportamentais adotadas para compensar os respectivos déficits funcionais.

Numerosas teorias e hipóteses tentam explicar a recuperação funcional após lesão do sistema nervoso central, entretanto, os mecanismos de recuperação e os processos neuroplásticos envolvidos ainda permanecem pouco esclarecidos (Nudo, 1999; Teasell, 2003).

A Neuroplasticidade se refere às alterações estruturais e funcionais nas sinapses, como resultado dos processos adaptativos do organismo, sendo responsável pela melhoria de habilidades motoras adquiridas com a prática, ajustes e prejuízos decorrentes de perdas sensoriais e também pela recuperação funcional após uma lesão do sistema nervoso central (Kaas, 1996). Este fenômeno está presente tanto em situações fisiológicas, como nos processos de aprendizagem e memória, quanto em resposta a lesões centrais ou periféricas do sistema nervoso (Weiller e Rijntjes, 1999).

Os papéis precisos da neuroplasticidade em modelar e remodelar comportamentos são ainda desconhecidos, contudo, as alterações podem recuperação da função após lesão no sistema nervoso central, mas em outros casos, por exemplo, também geram dor do membro fantasma após amputação (Hamdy *et al.*, 2000). Embora diversos estudos realizados nas últimas décadas tenham melhorado o entendimento dos mecanismos de

plasticidade do sistema nervoso central, ainda são desconhecidas as vias neurais que envolvem diferentes neurotransmissores, dentre eles a histamina.

O sistema histaminérgico vem sendo associado a várias alterações neuroplásticas relacionadas à recuperação funcional, além da histamina funcionar como um substrato neural no controle de tarefas cognitivas (Wada *et al.*, 1991; Cofiel e Mattioli, 2006). De forma semelhante, a histamina também é classificada como neuromoduladora (Onodera *et al.*, 1994; Wada *et al.*; 1991), podendo assim influenciar na excitabilidade de várias regiões cerebrais moduladas por outras aminas biogênicas, como a dopamina e serotonina (Wada *et al.*, 1991)

Por outro lado, ainda não foram totalmente elucidadas as influências do sistema histaminérgico neural sobre as lesões do sistema nervoso central, e de que forma esta associação estaria agindo sobre a recuperação funcional. Sendo assim, o presente estudo visa se inserir nesse contexto para melhor compreensão dos processos de recuperação funcional.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

- Investigar a participação do sistema histaminérgico neural na recuperação funcional de *Meriones unguiculatus* após lesão isquêmica unilateral encefálica.

### **Específicos**

- Testar um modelo experimental de treino para recuperação funcional da pata anterior para gerbilos após lesão isquêmica unilateral encefálica e investigar as possíveis alterações comportamentais e expressão de Fos induzidas pelo treino motor utilizando o respectivo modelo. (Estudo I)

- Avaliar o efeito do precursor da histamina (L-histidina) e do antagonista dos receptores H<sub>1</sub> (Pirilamina) na recuperação de gerbilos (*Meriones unguiculatus*) após lesão isquêmica unilateral encefálica. (Estudo II)

## ESTUDO I

### EFEITOS COMPORTAMENTAIS E EXPRESSÃO DE FOS INDUZIDOS PELO TREINO FUNCIONAL EM *MERIONES UNGUICULATUS* APÓS LESÃO ISQUÊMICA UNILATERAL ENCEFÁLICA.

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi testar um modelo experimental de recuperação funcional da pata anterior para gerbilos, além de investigar as alterações comportamentais e expressão de Fos após lesão isquêmica unilateral encefálica. Os testes comportamentais utilizados foram o teste de estimulação da vibrissa e a tarefa de recolher tablete. Os animais foram distribuídos em quatro subgrupos: Lesão fictícia (n= 12), Lesão fictícia treinado (n= 11), Lesão (n= 11) e Lesão treinado (n= 12). Cortes das regiões do córtex motor, hipocampo e estriado dorsal foram expostos à reação de imunohistoquímica para expressão da Fos, em seguida, foi calculado o valor médio do número de neurônios em cada região. Os dados comportamentais foram analisados através do teste de *Kruskal-Wallis* e os dados morfológicos foram submetidos à análise de variância de uma via, ambos seguidos do teste Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos lesados apresentam médias significativamente menores na tarefa de recolher tablete e maiores porcentagens de erro no teste de estimulação da vibrissa quando comparados aos grupos lesão fictícia, indicando que a lesão prejudicou o desempenho motor em ambos os testes. No último treino, os grupos treinados apresentaram aumento significativo na tarefa de recolher tablete em relação aos grupos não treinados, demonstrando que o treino funcional melhora o desempenho da tarefa em animais intactos e lesados. Houve aumento significativo na marcação dos neurônios do córtex motor e hipocampo do grupo lesado treinado quando comparado ao grupo lesado. O treino funcional aumentou o desempenho motor em animais treinados independente da lesão na tarefa de recolher tablete e provocou aumento da ativação neuronal no córtex motor e hipocampo dos animais lesados. Além disso, o modelo experimental utilizado se mostrou útil para avaliar o desempenho motor da pata anterior de gerbilos.

**Palavras chave:** Recuperação Funcional; Treino Motor; Isquemia.



## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate behavioural alterations and Fos expression in gerbils submitted to functional training after unilateral cerebral ischaemic injury. The behavioural procedures that were used to test functional recovery were the vibrissal stimulation test and the pellet-collecting task. Twenty-four hours after surgery, the animals were submitted to the experimental procedure, which lasted three weeks. The animals were distributed into four subgroups: sham lesion, sham lesion and trained, ischaemic injury and ischaemic injury and trained. The motor cortex, hippocampus and dorsal striatum were subjected to immunohistochemistry reaction for Fos expression, and the mean number of cells in each region was calculated. Behavioural data were analysed using the *Kruskal Wallis* test ( $p \leq 0.05$ ), and the morphological data were subjected to one-way Analysis of Variance, both followed by the *Student-Newman-Keuls* test ( $p \leq 0.05$ ). The animals in the injury group presented significantly lower averages in the pellet-collecting task and higher percentages of error in the vibrissal stimulation test when compared to animals in the sham lesion group, indicating that the lesion impaired motor performance in both tests. After training, the trained groups showed a significant increase in the pellet-collecting task compared to untrained groups, demonstrating that functional training improves task performance in sham and injured animals. A significant increase in the activation of neurons in the motor cortex and hippocampus of the injury and trained group was observed when compared to the injured group. Functional training increased the motor performance of the trained animals, independently of lesion, in the pellet-collecting task and caused increased neuronal activation in the motor cortex and hippocampus in the injury animals. Moreover, the presented method is useful for the evaluation of motor performance in gerbils.

**Keywords:** Functional Recovery; Motor Training; Ischemia.

## INTRODUÇÃO

As lesões encefálicas isquêmicas constituem a terceira maior causa de morte e é a principal contribuidora para a morbidade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos ocasionando consequências econômicas e sócias a longo-prazo. Cerca de 85% das doenças vasculares encefálicas são isquêmicas e surgem após a oclusão transitória ou permanente de alguma artéria cerebral (Pentón-Rol *et al.*, 2011).

As alterações teciduais isquêmicas surgem da interação entre eventos moleculares e bioquímicos, como a excitotoxicidade, despolarização, inflamação e apoptose. Enquanto, dentre os déficits funcionais estão anormalidades sensório-motoras, mudanças no comportamento exploratório e comprometimentos cognitivos (Zhang *et al.*, 2006; Krieger e Yenari, 2004).

Diversos estudos apontam vantagem na utilização do modelo experimental de isquemia em gerbilos, devido à facilidade de promover isquemia encefálica quando comparado às outras amostras. Nos gerbilos, apenas a oclusão da artéria carótida externa durante 5 minutos é capaz de promover lesão cerebral isquêmica, que ocorre devido à ausência da artéria comunicante posterior, impossibilitando a circulação colateral entre os vasos que suprem os hemisférios cerebrais (Levine e Payan, 1966; Lee *et al.*, 2003). Além disso, os prejuízos neuronais em regiões encefálicas vulneráveis a isquemia são semelhantes aos humanos e incluem áreas como o córtex motor, hipocampo e corpo estriado (De Araujo *et al.*, 2012, Janac *et al.*, 2006; Janac *et al.*, 2008).

Por outro lado, vários estudos apontam benefícios do treinamento motor na lesão isquêmica encefálica e que aspectos como tipo, intensidade e tempo de início da atividade podem influenciar na capacidade adaptativa do encéfalo (Lee *et al.*, 2003). Para Jones e colaboradores (2009), ratos após lesão isquêmica unilateral do córtex motor e submetidos a treinamento de tarefa específica para o hemicorpo comprometido, apresentaram melhora do desempenho funcional e aumenta da expressão da proteína Fos no córtex motor. Gerbilos após oclusão unilateral da artéria carótida externa, que realizaram treino diário em esteira, apresentaram melhora do comportamento motor, todavia quando iniciado precocemente a atividade induziu lesões neuronais (De Araújo *et al.*, 2008). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi testar um modelo experimental de recuperação funcional da pata anterior para gerbilos após lesão isquêmica unilateral encefálica e investigar as alterações comportamentais e expressão de Fos induzidos pelo treino motor utilizando o respectivo modelo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Amostra*

Foram utilizados 46 gerbilos machos (*Meriones unguiculatos*), idade entre dois e três meses, pesando de 50 a 80 g, provenientes de um único criadouro particular (Figura 1). Antes dos experimentos, os animais foram separados em grupos de quatro animais por gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm) e permaneceram durante duas semanas no biotério do Departamento de Fisioterapia para controle de possíveis doenças.



**Figura 1:** Foto do gerbilo (*Meriones unguiculatos*).

As condições ambientais do laboratório foram controladas com temperatura em torno de 24°C, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso a alimento e água, exceto para os animais dos grupos treinados, que durante a fase de treino receberam de alimentação o equivalente a 10% do peso corporal, imediatamente após os treinos.

### *Aspectos Éticos*

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pelo comitê de ética e pesquisa em animais da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (Parecer: 047/2008, ANEXO A) e, concomitantemente, estiveram de acordo com os preceitos da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC.

### *Procedimento Cirúrgico*

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Contudo, foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo que em um foi realizada lesão isquêmica unilateral do encéfalo e no outro grupo os encéfalos dos animais foram mantidos intactos. A lateralidade da lesão foi definida baseando-se na preferência do animal, em teste um dia antes do procedimento cirúrgico, no qual era exposto ao aparato de tarefa de recolher tabletes.

Durante o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados utilizando Zoletil administrada via intramuscular com dose de 5 mg/kg peso do animal. Após cessarem os movimentos voluntários, os animais foram posicionados em uma tábua de cirurgia e foi realizada a tricotomia e incisão na região ventral do pescoço. Em seguida, foram afastados os tecidos subcutâneo e muscular para promover a exposição da artéria carótida externa ipsilateral ao hemisfério a ser lesionado. Através de um fio de sutura realizou-se 5 minutos de oclusão arterial e, para impedir a desidratação tecidual, a região era irrigada com cloreto de sódio. Por fim, a oclusão foi interrompida, os cérebros expostos a reperusão, a incisão foi suturada e cada animal recebeu via intramuscular Penicilina G Benzatina (120.000 UI) para prevenir possíveis infecções. Foram observados sinais clínicos como a retirada da pata anterior e ptose palpebral unilateral após o procedimento cirúrgico.

Os animais do grupo lesão fictícia receberam todos os procedimentos, entretanto, não foi realizada a oclusão da artéria carótida externa. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em condições similares às anteriores ao procedimento cirúrgico. Este método cirúrgico foi descrito e utilizado por diversos estudos e se mostrou eficaz para lesão isquêmica unilateral encefálica e lesão fictícia (Block *et al.*, 1999; Lipton, 1999; Lee *et al.*, 2003).

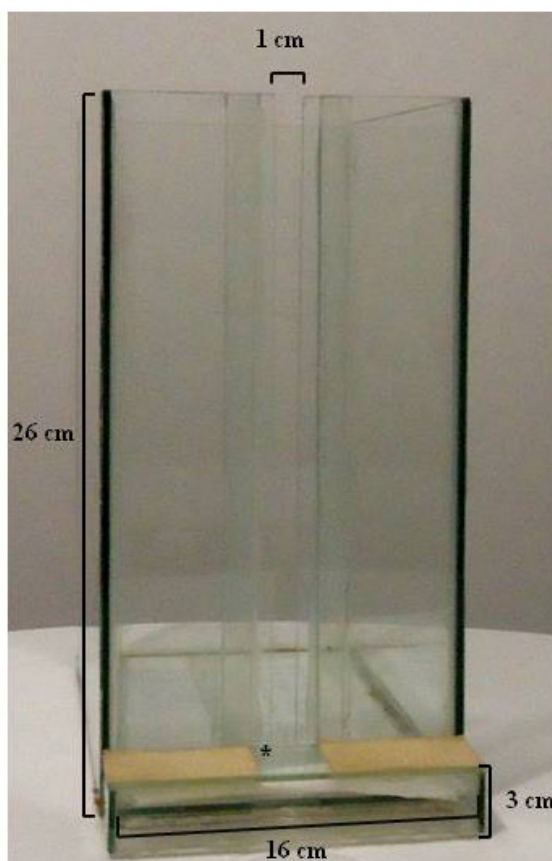
### ***Testes Comportamentais***

- *Tarefa de recolher tablete*

Esse teste é uma medida sensível e apresenta facilidade de reprodutibilidade para investigar o déficit e a recuperação da funcionalidade da pata anterior comprometida em ratos e neste estudo testada em gerbilos (Allred e Jones; 2004; Maldonado *et al.*, 2008).

Os treinos foram conduzidos em um aparato (26 x 34 x 16 cm) que possui uma janela central de 1 x 23 cm e os animais foram treinados a recolher o alimento através desta janela, que estava elevado aproximadamente a uma altura de 3 cm e posicionado de forma estratégica em que o animal recolha o tablete apenas através da pata comprometida (Figura 2). Os animais do grupo controle foram expostos à tarefa de recolher tablete com o alimento posicionado para alcance com o membro de preferência do animal.

Para avaliar a recuperação funcional da habilidade de recolher, foi quantificado o número de sucessos de tentativas por um tempo de 10 minutos, considerando sucesso àquela tentativa em que o animal consegue recuperar o tablete (Allred e Jones; 2004; Maldonado *et al.*, 2008).



**Figura 2:** Fotografia do aparato experimental de recolher tablete. (\*) Indica o local de posicionamento do alimento para o animal com lesão isquêmica unilateral encefálica à direita.

- *Teste de Estimulação da vibrissa*

Segundo Barth *et al.* (1990), esse teste é utilizado para observar a movimentação da pata anterior através da estimulação da vibrissa. Os ratos possuem o comportamento inato que, após estimulação da vibrissa sobre a superfície, apresentam resposta de colocação da pata anterior ipsilateral sobre a mesma.

Estudos prévios demonstraram que lesão no córtex motor prejudica a resposta deste comportamento e que após a lesão inicia-se um processo de compensação contralateral, sendo necessária a inibição da vibrissa e a pata contralateral do animal quando for aplicar o teste (Adkins *et al.*, 2004). O desempenho do animal foi investigado através da porcentagem de erros do animal (não colocação da pata na superfície após estimulação da vibrissa) diante de 10 tentativas às quais o animal foi exposto.

### ***Delineamento Experimental***

O período experimental foi composto por três semanas, iniciando 24 horas após o procedimento cirúrgico (T1- primeiro treino à T21- vigésimo primeiro treino). Os animais

foram diariamente submetidos a treino de recolher tablete com tempo total de 10 minutos, sendo que os tabletes foram colocados em local estratégico em que o animal podia recolher o alimento utilizando apenas a pata comprometida.

Imediatamente após o tempo de exploração do aparato de recolher tabletes, os animais foram submetidos ao teste de estimulação das vibrissas. Em seguida, o animal recebia alimentação equivalente a 10% do peso corporal e os animais do grupo controle do treino motor receberam alimentação *ad libitum* e diariamente foram submetidos ao teste de estimulação das vibrissas.

### ***Grupos Experimentais***

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro subgrupos: animais com lesão fictícia (Sham - S, n= 12), animais não lesados e treinados (Sham Treinado - ST, n= 11), animais submetidos à lesão isquêmica unilateral do encefálo (Lesão - L, n= 11) e animais submetidos à lesão e expostos ao treino motor (Lesão Treinado - LT, n= 12)

### ***Filmagem***

Os experimentos foram gravados através de uma câmera de vídeo digital (Sony HandyCam DCR-SX45) e as imagens registradas em *cd-rom* (Philips 80 min/700 mb). Posteriormente, as imagens foram assistidas em um monitor de computador para registro das variáveis (HP, 20”).

### ***Eutanásia dos animais***

Após a conclusão dos procedimentos experimentais (T21), os animais foram profundamente anestesiados utilizando dose excessiva intramuscular de Zoletil (10 mg/kg peso do animal). A seguir foram decapitados, os encéfalos removidos, identificados e acondicionados individualmente em coletores com solução de formalina para posterior processamento e análise.

### ***Preparo das lâminas e processamentos para imunohistoquímica***

As amostras de tecido foram desidratadas em série alcoólicas crescentes, diafanizadas em duas séries de xilol e incluídas em parafina sob a forma de blocos. Os blocos rígidos foram seccionados através de micrótomo a uma espessura de 7µm. Foram obtidos cortes das regiões de interesse (Córtex motor, Hipocampo e estriado dorsal). Após serem seccionados, os cortes foram colocados para flutuar sobre uma superfície aquecida, posicionados sobre lâminas de vidro gelatinizadas, para posterior utilização para a reação de imunohistoquímica para a proteína de interesse (*c-Fos*).

Após a desparafinização e reidratação em série alcoólicas decrescentes e lavagem dos tecidos em solução tampão (PBS 0,01M pH7,4), foi realizada recuperação

antigênica com tampão citrato (0,1 M pH 6,0) por meio da exposição a três ciclos de cinco minutos em forno micro-ondas em potência alta. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena ( $H_2O_2$  a 0,3%) durante 10 minutos, seguida de incubação à temperatura ambiente com anticorpo primário para c-Fos (1:1000; Santa Cruz Biotechnology Ltda) diluído em PBS 0,01M pH7,4 e soro albumino bovino a 0,2%, (BSA, Sigma) durante duas horas. Os cortes foram então incubados com anticorpo secundário (anti-rabbit 1:500; Vector Labs Ltda) durante duas horas e posteriormente com o complexo avidina-biotina-peroxidase durante duas horas (ABC, 1:125; Vector Labs Ltda). A revelação foi obtida por meio da adição de Diaminobenzidina (DAB) em  $H_2O_2$  a 0,03% por dez minutos. Entre cada procedimento os cortes foram lavados 3 vezes durante cinco minutos em PBS 0,01M (pH 7,4). Por fim, foi realizada a montagem das lâminas com a fixação das lamínulas.

#### ***Análise morfológica quantitativa***

Para quantificação dos neurónios marcados foi determinada uma área fixa ( $500.000 \mu m^2$ ) correspondente às regiões do córtex motor (M1), hipocampo (CA1) e estriado dorsal (Cpu) ipsilateral à oclusão da carótida. Para cada grupo, ao menos três secções de cada animal foram avaliados. Um valor médio para o número de células em cada uma das regiões dos animais foi então calculado.

#### ***Análise estatística***

Todos os resultados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados de ambos os testes comportamentais foram submetidos separadamente à análise de homogeneidade (Teste de Levene). Em seguida, foram analisados através do teste *Kruskal Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Student – Newman - Keuls*, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Anova de uma via seguido do teste *Student – Newman - Keuls* ( $p \leq 0,05$ ) foram utilizados para avaliar os dados morfológicos do córtex motor, área CA1 do hipocampo e corpo estriado, uma vez detectada a homogeneidade dos dados.

## **RESULTADOS**

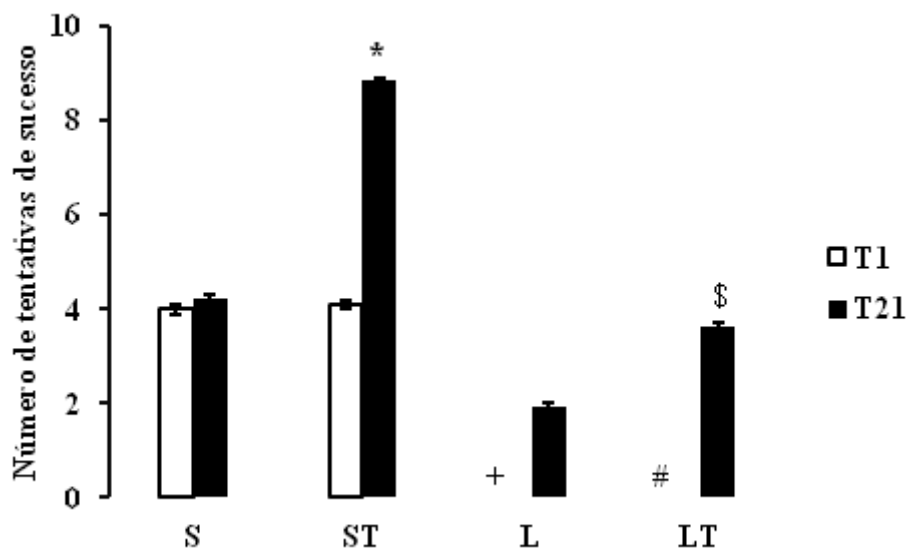
A Figura 3 mostra as médias ( $\pm$ EPM) das tentativas de sucesso dos grupos experimentais durante o Treino 1 (T1) e o Treino 21 (T21). Observou-se em T1 que a lesão prejudica a atividade de recolher tablete, em virtude das médias do número de tentativas dos grupos S e ST se apresentarem significativamente maiores em relação aos grupos L e LT (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=7$ .  $\chi^2 = 71,71$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ).

Quando comparados os dados de tentativas de recolher tabletes em T21, os grupos ST e LT apresentaram aumento significativo na tarefa de recolher tablete em relação

ao grupo S e L, respectivamente (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=7$ .  $\chi^2 = 71,71$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ), demonstrando que o treino funcional melhora o desempenho da tarefa nos animais intactos e lesados.

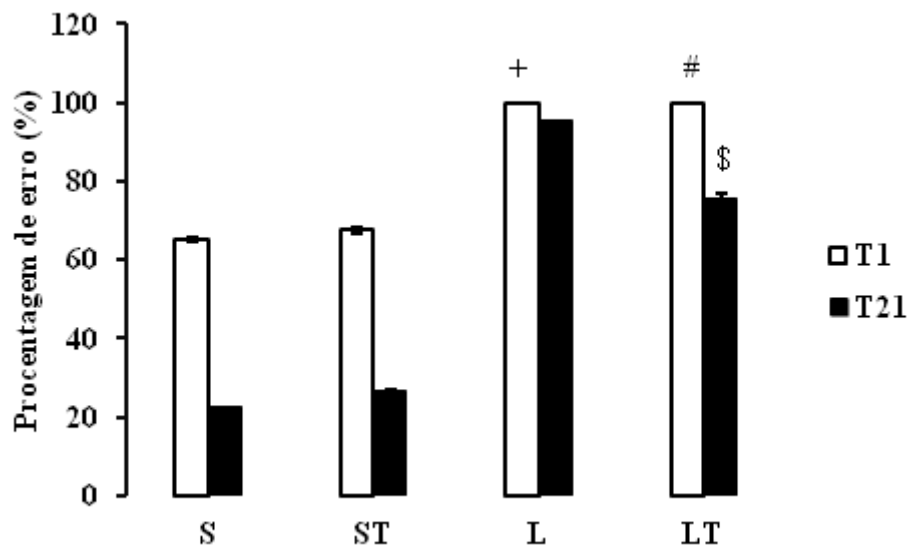
Foi observado aumento significativo das porcentagens de erros dos animais L e LT quando comparados aos animais dos grupos S e ST um dia após a cirurgia (T1) (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=7$ .  $\chi^2 = 79,48$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ) apontando que a lesão afeta o desempenho da tarefa de estimulação de vibrissa (Figura 4).

Em T21, os animais do grupo LT possuíram diminuição da porcentagem de erro quando comparados aos animais do grupo L (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=7$ .  $\chi^2 = 79,48$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ), indicando que o treino funcional reduz a porcentagem de erros do teste de estimulação da vibrissa.



**Figura 3:** Médias ( $\pm$  EPM) do número de tentativas de sucesso na tarefa de recolher tablete durante o primeiro (T1) e vigésimo primeiro (T21) treino dos animais submetidos à lesão fictícia (S), Lesão Fictícia Treinado (ST), Lesão (L) e Lesão Treinado (LT). (+) / (#) Indicam diferença significativa em relação à S e ST em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença significativa em relação à S em T21 ( $p < 0,01$ ). (\$) Indica diferença significativa em relação à L em T21 ( $p < 0,01$ ).

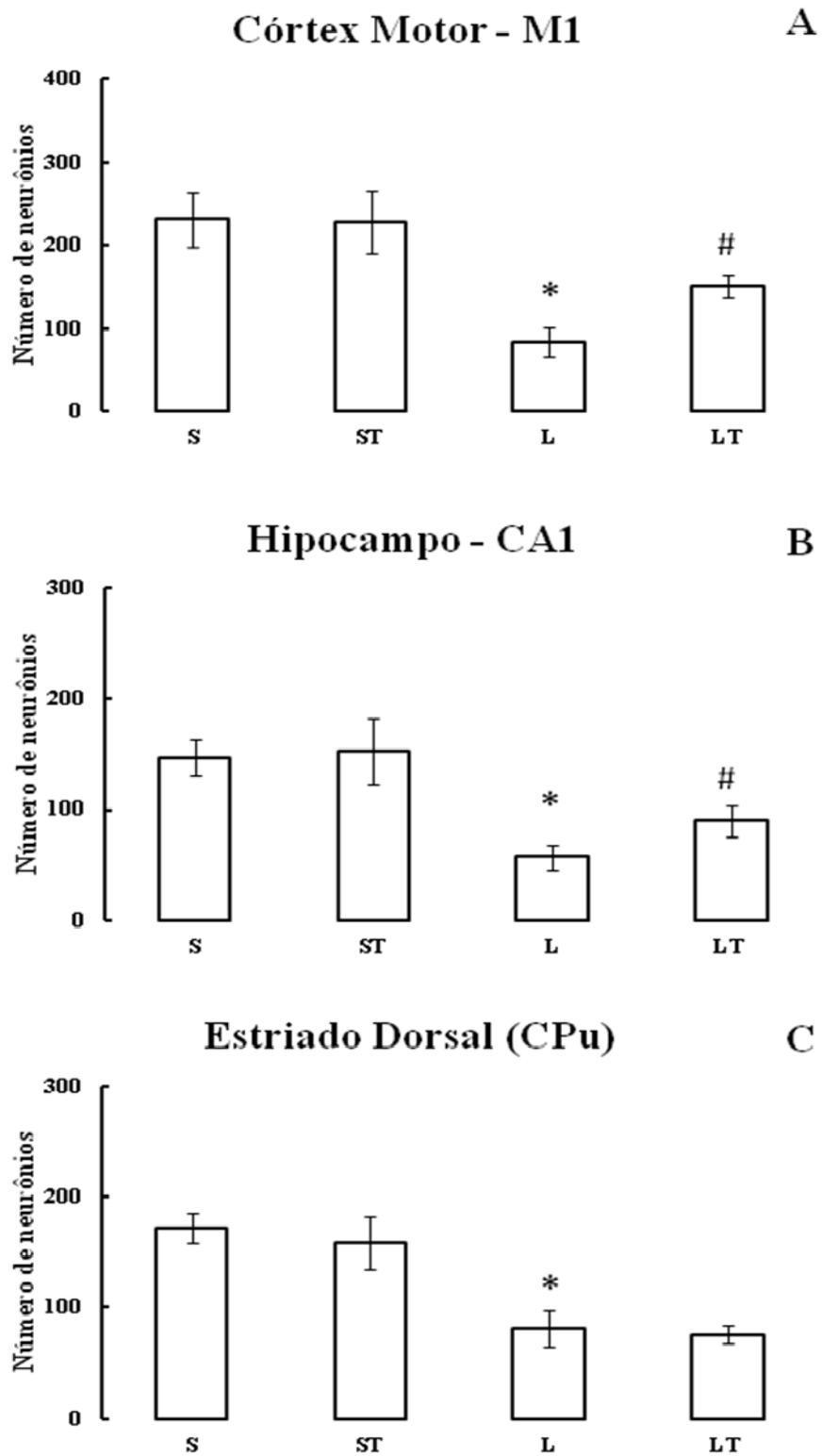




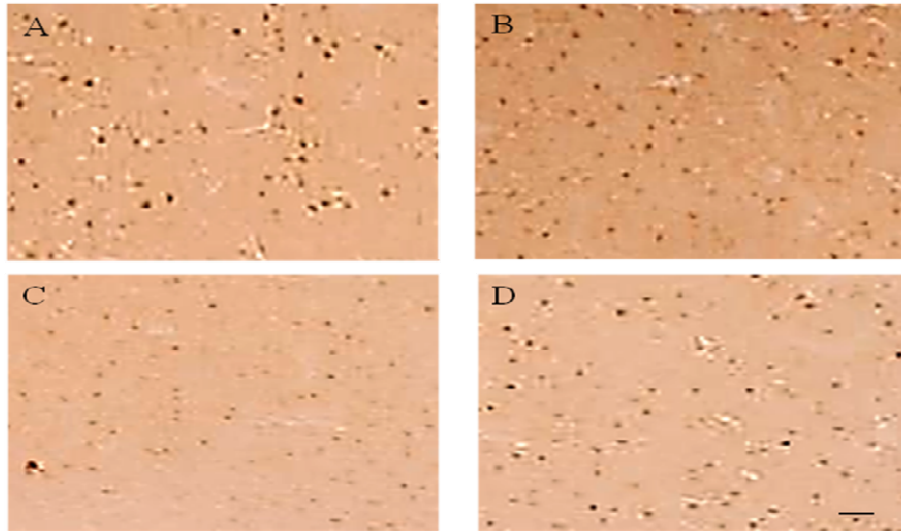
**Figura 4:** Médias ( $\pm$  EPM) da porcentagem de erros do teste de estimulação de vibrissa durante o primeiro (T1) e vigésimo primeiro (T21) treino dos animais submetidos à lesão fictícia (S), Lesão Fictícia Treinado (ST), Lesão (L) e Lesão Treinado (LT). (+) / (#) Indicam diferença significativa em relação à S e ST em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\$) Indica diferença significativa em relação à L em T21 ( $p < 0,01$ ).

A avaliação histológica apontou redução significativa da expressão da proteína Fos nos animais do grupo L quando comparado aos animais dos grupos S e ST no córtex motor ( $F_{3,31} = 64,50$ ;  $p < 0,01$ ), Hipocampo ( $F_{3,29} = 53,65$ ;  $p < 0,01$ ) e estriado dorsal ( $F_{3,22} = 50,79$ ;  $p < 0,01$ ), demonstrando que a lesão influencia significativamente na diminuição dos neurônios marcados nas áreas estudadas. Por outro lado, o número de neurônios marcados no córtex motor ( $F_{3,31} = 64,50$ ;  $p < 0,01$ ) e hipocampo ( $F_{3,29} = 53,65$ ;  $p < 0,01$ ) dos animais do grupo LT aumentou significativamente em relação aos animais do grupo L, indicando que o treino funcional foi capaz de alterar a ativação neuronal nestas regiões nos animais lesados. (Figura 5)

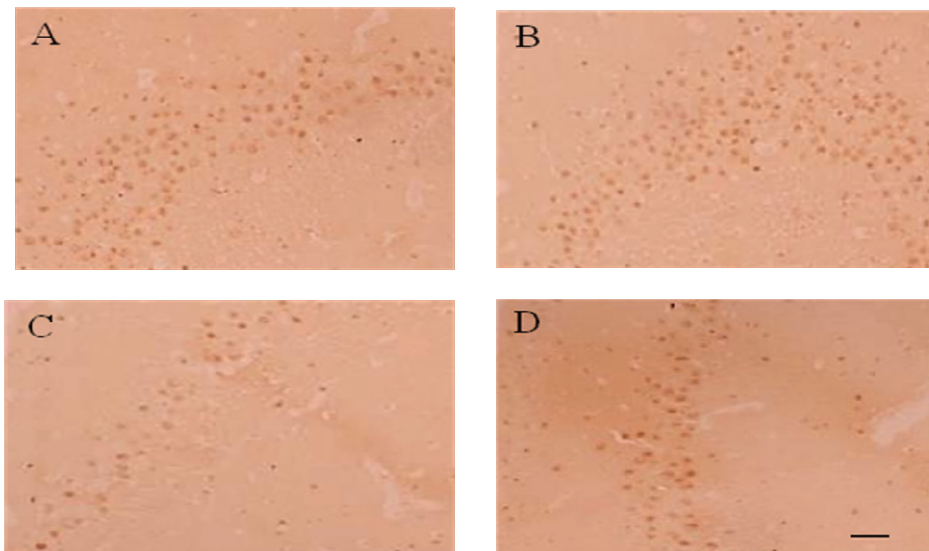
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as marcações na região do estriado dorsal entre o grupo L em relação ao LT ( $F_{3,63} = 21,35$ ;  $p > 0,05$ ) e o grupo S em relação ao grupo ST no córtex motor ( $F_{3,31} = 64,50$ ;  $p < 0,01$ ), hipocampo ( $F_{3,29} = 53,65$ ;  $p < 0,01$ ) e estriado dorsal ( $F_{3,22} = 50,79$ ;  $p < 0,01$ ). (Figura 5)



**Figura 5:** Médias ( $\pm$ EPM) do número de neurônios no córtex motor – M1 (A), hipocampo – CA1 (B) e estriado dorsal - CPu (C) dos grupos lesão fictícia (S), lesão fictícia treinado (ST), lesão (L) e lesão treinado (LT). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa de L em relação a S e ST ( $p \leq 0,01$ ) na figura 5A, 5B e 5C. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de LT em relação a L ( $p \leq 0,01$ ) na figura 5A e 5B.



**Figura 6:** Fotomicrografia de cortes coronais do Córtex Motor de gerbilos, ilustrando a marcação imunohistoquímica contra c-Fos. (A) Grupo S, (B) Grupo ST, (C) Grupo L e (D) Grupo LT. Nota-se o aumento significativo das marcações no grupo lesado treinado (LT) em relação ao grupo lesado e não treinado (L). Observa-se um aumento de 400x e a barra da escala em D representa 17,15  $\mu$ m em A, B, C e D.



**Figura 7:** Fotomicrografia de cortes coronais da área CA1 do hipocampo de gerbilos, ilustrando a marcação imunohistoquímica contra c-Fos. (A) Grupo S, (B) Grupo ST, (C) Grupo L e (D) Grupo LT. Nota-se o aumento significativo das marcações no grupo lesado e treinado (LT) em relação ao grupo lesado e não treinados (L). Observa-se um aumento de 400x e a barra da escala em D representa 17,15  $\mu$ m em A, B, C e D.

## DISCUSSÃO

Os resultados dos testes comportamentais deste estudo apontam que animais dos grupos lesados (L e LT) possuem prejuízos nas tarefas propostas, por apresentarem diminuição do número de tentativas de sucesso e aumento da porcentagem de erros no teste de estimulação da vibrissa. Este resultado está de acordo com estudos prévios, que gerbilos submetidos à lesão unilateral isquêmica possuem privação de oxigênio e glicose que ocasiona morte neuronal com subseqüentes alterações comportamentais motoras e morfológicas (Córtex motor, hipocampo e estriado) (Sim *et al.*, 2004; Sim *et al.*, 2005).

Estudos comportamentais em gerbilos submetidos à isquemia encefálica demonstraram alterações funcionais específicas para cada estrutura. Lesão isquêmica da área M1 do córtex motor compromete habilidades manuais, aprendizagem motora e cognição (De Araujo *et al.*, 2008). O hipocampo está associado à regulação de comportamentos emocionais e exploração de novos ambientes, enquanto, o estriado dorsal atua na locomoção e movimentos estereotipados (Janac *et al.*, 2008). Sendo as tarefas propostas relacionadas a aspectos motores, acreditamos que o comprometimento de áreas encefálicas causadas por meio do procedimento cirúrgico justifica a redução do desempenho motor dos animais e diminuição da ativação dos neurônios no córtex motor, hipocampo e estriado dorsal após a isquemia.

Vários estudos prévios apontam efeitos da atividade física como fator neuroprotetor, amenizando a lesão neurológica por impedir a morte neuronal. Ratos expostos a exercício físico moderado possuem a redução das taxas de agregação de plaquetas com difosfato de adenosina, indicando que a atividade reduz risco de doenças isquêmicas do encéfalo (Anderson *et al.*, 2000; Scopel *et al.*, 2006). O treinamento motor prévio a lesão reduziu a área de enfarte, edema e déficits neurológicos nos roedores (Ang *et al.*, 2003). A expressão de neurotrofinas também foi potencializada em animais treinados anteriormente a lesão isquêmica, demonstrando influência do exercício físico na plasticidade neuronal (Ding *et al.*, 2004).

Adicionalmente, após evento isquêmico são observados efeitos da atividade física como ampliação da vascularização encefálica, aumento da neurogênese e facilitação da aprendizagem (Cotman e Berchtold, 2002; Lee *et al.*, 2008). Em outro estudo, gerbilos treinados em esteira, durante 30 minutos diários por 7 dias consecutivos, apresentaram melhora do desempenho de tarefas motoras e diminuição da perda neuronal (Lee *et al.*, 2003). Risedal e colaboradores (1999) demonstraram que exercícios iniciados 5 dias após a lesão podem prevenir a perda tecidual futura e estimular a reorganização cortical circunvizinha não

danificada. Por outro lado, exercícios na roda de correr realizados por ratos submetidos à lesão isquêmica do córtex sensório-motor provocou menores desempenhos em uma bateria comportamental de tarefas motoras (teste de estimulação da vibrissa, teste de rota rod e teste de percorrer viga) quando comparados a animais submetidos a interação social e enriquecimento ambiental (Johansson e Ohlsson; 1996).

Diversos ganhos são promovidos pelo treinamento antes e após a lesão isquêmica, embora, as condições da atividade como tipo, intensidade e tempo de início parecem influenciar os resultados (Bland *et al.*, 2001; Arida *et al.*, 2004) Após 24 horas da lesão isquêmica, ratos foram expostos a atividade motora e apresentaram melhor resultado funcional sem aumentar o dano tecidual (Yang *et al.*, 2003). Além disso, estudos prévios apresentam evidências que treina motor após lesão isquêmica encefálica melhorar a função cerebral por aumentar a expressão de fatores neurotrófico, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), e a atividade neuronal (Seo *et al.*, 2010).

Resultados similares foram encontrados no presente estudo, em que os grupos treinados independente da lesão obtiveram melhora do desempenho motor, além de aumentar a expressão da proteína Fos na área M1 do córtex motor e CA1 do hipocampo nos animais lesados treinados quando comparados ao grupo lesado. Com relação à expressão gênica da proteína Fos no estriado dorsal não ter se alterado frente ao treino motor, acredita-se ser devido essa região está relacionada principalmente a locomoção, atividade que não foi contemplada durante o treino motor realizado neste estudo. Os presentes dados suportam evidências que o treino funcional precoce e diário exerce efeito na recuperação funcional e induz aumento da ativação neuronal no córtex motor e hipocampo.

Apesar da tarefa de recolher tablete ter sido inicialmente criada para o estudo da recuperação funcional da pata anterior de ratos da linhagem *Wistar* (Allred e Jones; 2004; Maldonado *et al.*, 2008), este teste comportamental se mostrou útil também com gerbilos, tendo em vista o desempenho dos animais treinados no aparato experimental. Por fim, conclui-se que este modelo experimental mostrou-se útil para avaliar a tarefa de recolher tablete em gerbilos, tendo em vista o aumento do desempenho motor em animais treinados independente da lesão e aumento da ativação neuronal no córtex motor e hipocampo dos animais lesados e treinados.

## ESTUDO II

### INFLUÊNCIA DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO NEURAL NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DE *Meriones unguiculatus* APÓS LESÃO ISQUÊMICA UNILATERAL ENCEFÁLICA.

#### RESUMO

O objetivo foi investigar o efeito do precursor da histamina (L-histidina) e do antagonista dos receptores H<sub>1</sub> (Pirilamina) na recuperação funcional de gerbilos (*Meriones unguiculatus*) após lesão isquêmica unilateral do encéfalo. Para isso, foram realizados dois experimentos, sendo empregados os mesmos procedimentos experimentais, no entanto, diferem nos tratamentos farmacológicos realizados, que foram: I - L-histidina (doses: 100 mg/kg e 200 mg/kg) e II - Pirilamina (doses: 35 mg/kg e 70 mg/kg), sendo ambos acompanhados de grupos controles da droga (salina), cirurgia (lesão fictícia) e treino motor (não treinado). Os testes comportamentais utilizados foram o teste de estimulação da vibrissa e a tarefa de recolher tablete. Foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* ( $p < 0,05$ ), seguido do teste de comparações múltiplas de *Student - Newman - Keuls* ( $p < 0,05$ ) e correção de *Bonferroni* ( $p < 0,025$ ). Verificou-se que a lesão prejudica o desempenho motor e o treino da tarefa de recolher tablete melhora o desempenho de animais independente da lesão. A L-histidina associada com o treino motor prejudicou a recuperação funcional, enquanto, a pirilamina combinada com o treino potencializou a recuperação funcional. Com relação ao teste de estimulação da vibrissa, os animais lesados submetidos ao treino e tratados com L-histidina apresentaram déficit de evocação da memória, contudo, a pirilamina possui efeito contrário quando aplicada em animais lesados e treinados. Os resultados sugerem que o sistema histaminérgico neural participa do processo de recuperação funcional de gerbilos submetidos à lesão isquêmica unilateral encefálica.

**Palavras chaves:** Recuperação Funcional; Treino Motor; Isquemia e Histamina.

## ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of the histamine precursor L-Histidine and the H<sub>1</sub>-receptor antagonist Pyrilamine on the functional recovery of gerbils (*Meriones unguiculatus*) following a unilateral ischemic brain injury. Two experiments were conducted under the same experimental procedures to test the effects of two pharmacological treatments in experiment I, L-Histidine doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg and in experiment II, Pyrilamine was administered at doses of 35 mg/kg and 70 mg/kg. Both experiments were accompanied by control groups for the drug (saline), the lesion (sham lesion) and training on the pellet-collecting task (untrained). The behavioural tests that were used to test functional recovery were the vibrissal stimulation test and the pellet-collecting task. The *Kruskal-Wallis* test ( $p < 0.05$ ), the *Student-Newman-Keuls* multiple comparison test ( $p < 0.05$ ) and a *Bonferroni* correction ( $p < 0.025$ ) were used for statistical analysis. It was established that a unilateral cerebral ischemic injury impairs motor performance and that training on the pellet-collecting task improves performance independently of the lesion. L-Histidine impaired functional recovery when administered in combination with motor training, while Pyrilamine in combination with training potentiated functional recovery. With respect to the vibrissal stimulation test, the injured animals that received training in combination with L-Histidine showed a memory recall deficit; however, Pyrilamine had the opposite effect in animals that were injured and trained. These results suggest that the neural histaminergic system participates in the process of functional recovery of gerbils following a unilateral ischemic brain injury.

**Keywords:** Functional Recovery; Motor Training; Ischemia; Histamine.



## INTRODUÇÃO

A histamina é uma monoamina biogênica encontrada nos mastócitos e em neurônios do sistema nervoso central, mas que não ultrapassa a barreira hematocefálica. Sua degradação ocorre pela ação da enzima N-metiltransferase e sua síntese através da descarboxilação do aminoácido L-histidina (Watanabe *et al.*, 1984). Várias pesquisas têm sido realizadas no sentido de verificar quais influências o sistema histaminérgico neural exerceria sobre as funções do sistema nervoso central. Dentre estas funções estão o controle do ritmo circadiano e do sono (Burns *et al.*, 2003), os processos motivacionais (White e Rumbold, 1988), as alterações comportamentais (Onodera *et al.*, 1994), a ansiedade (Faganelo e Mattioli, 2007), a percepção da dor (Mobarakeh *et al.*, 2000), a modulação da atividade psicomotora (Alvarez *et al.*, 1994), a aprendizagem e memória (Mattioli *et al.*, 1998; Cofiel e Mattioli, 2006) e a plasticidade e recuperação funcional do sistema nervoso central (Weiler *et al.*, 1992; Piratello e Mattioli, 2004; Piratello e Mattioli, 2007).

Estudos prévios demonstraram que a clorfeniramina, um antagonista dos receptores H<sub>1</sub>, impede a recuperação funcional de tarefa de aprendizagem espacial em peixes *Carassius auratus* submetidos à ablação telencefálica quando comparados a animais não tratados (Garção *et al.*, 2009). Outro estudo em gatos demonstrou que a Tioperamida, um antagonista dos receptores H<sub>3</sub>, favorece a recuperação funcional sensório-motora e acelera a compensação vestibular (Tighilet *et al.*, 2006). Porém, o estudo de Piratello e Mattioli (2007) apresentou resultados opostos, que o aumento dos níveis de histamina no sistema nervoso central, através do bloqueio dos receptores H<sub>3</sub> (Tioperamida) impediu a compensação vestibular em peixes *Carassius auratus*.

Em roedores, o bloqueio dos receptores H<sub>3</sub> acelera a recuperação funcional de déficits ocular e postural estático após hemilabirintectomia (Lozada *et al.*, 2004). Adicionalmente, a administração de L-histidina aumenta o fluxo sanguíneo cerebral em ratos e que este efeito é antagonizado por drogas bloqueadoras dos receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, sugerindo que esse processo é mediado por essas subclasses de receptores histaminérgicos (Suzuki *et al.*, 1999).

O modelo experimental de isquemia para Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) tem sido muito utilizado em estudos que investigam a recuperação de animais após lesão isquêmica encefálica. Devido à ausência da comunicação entre as artérias cerebrais médias e posteriores, apenas uma simples oclusão da artéria carótida comum de cinco minutos é capaz de produzir isquemia unilateral encefálica nestes animais (Block, 1999; Lipton, 1999). Neste

modelo, ocorre o comprometimento de várias estruturas encefálicas responsáveis por diferentes tipos de comportamento motor que podem ser avaliadas através de estudos comportamentais (Janac *et al.*, 2006; Janac *et al.*, 2008).

Diante das evidências do envolvimento do sistema histaminérgico neural nos processos de recuperação funcional, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do precursor da histamina (L-histidina) e do antagonista dos receptores H<sub>1</sub> (Pirilamina) na recuperação funcional de gerbilos (*Meriones unguiculatus*) após lesão isquêmica unilateral encefálica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Amostra*

Foram utilizados 234 Gerbilos machos (*Meriones unguiculatus*), idade entre dois e três meses, pesando de 50 a 80 g, provenientes de um único criadouro particular. Antes dos experimentos, os animais foram separados em grupos de quatro animais por gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm) e permaneceram durante duas semanas no biotério do Departamento de Fisioterapia para controle de possíveis doenças.

As condições ambientais do laboratório foram controladas com temperatura em torno de 24°C, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso a alimento e água, exceto para os animais dos grupos treinados, que durante a fase de treino receberam de alimentação o equivalente a 10% do peso corporal, imediatamente após o treino.



**Figura 1:** Foto do gerbilo (*Meriones unguiculatus*).

### *Aspectos Éticos*

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pelo

comitê de ética e pesquisa em animais da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (Parecer: 046, ANEXO A) e, concomitantemente, estiveram de acordo com os preceitos da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC.

### ***Procedimento Cirúrgico***

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Contudo, foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo que em um foi realizada lesão isquêmica unilateral do encéfalo e no outro grupo os encéfalos dos animais foram mantidos intactos. A lateralidade da lesão foi definida baseando-se na preferência do animal, em teste um dia antes do procedimento cirúrgico, no qual era exposto ao aparato de tarefa de recolher tabletes e a pata usada com maior frequência foi considerada como dominante.

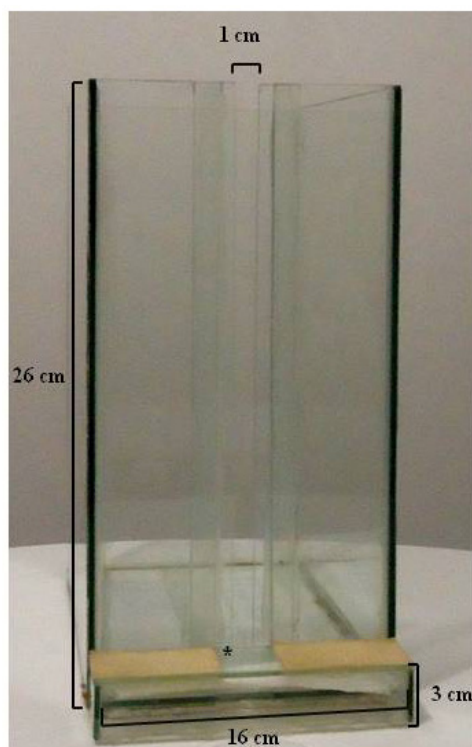
Durante o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados utilizando Zoletil administrada via intramuscular com dose de 5 mg/kg peso do animal. Após cessarem os movimentos voluntários, os animais foram posicionados em uma tábua de cirurgia e foi realizada a tricotomia e incisão na região ventral do pescoço. Em seguida, foram afastados o tecido subcutâneo e muscular para promover a exposição da artéria carótida externa ipsilateral ao hemisfério a ser lesionado. Através de um fio de sutura realizou-se 5 minutos de oclusão arterial e, para impedir a desidratação tecidual, a região era irrigada com cloreto de sódio. Por fim, a oclusão foi interrompida, a incisura foi suturada e cada animal recebeu via intramuscular Penicilina G Benzatina (120.000 UI) para prevenir possíveis infecções.

Os animais do grupo lesão fictícia receberam todos os procedimentos, entretanto, não foi realizada a oclusão da artéria carótida externa. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em condições similares às anteriores ao procedimento cirúrgico. Este método cirúrgico foi descrito e utilizado por diversos estudos e se mostrou eficaz para lesão isquêmica unilateral encefálica e lesão fictícia (Block *et al.*, 1999; Lipton, 1999; Lee *et al.*, 2003).

### ***Testes Comportamentais***

- *Tarefa de recolher tablete*

Os treinos foram conduzidos em um aparato (26 x 34 x 16 cm) que possui uma janela central de 1 x 23 cm e os animais foram treinados a recolher o alimento através desta janela, que estava elevado aproximadamente a uma altura de 3 cm e posicionado de forma estratégica para que o animal recolha o tablete apenas através da pata comprometida. Para avaliar a recuperação funcional da habilidade de recolher tablete, foi quantificado o número de sucessos de tentativas por um tempo de 10 minutos, considerando sucesso àquela tentativa em que o animal consegue recuperar o tablete.



**Figura 2:** Fotografia do aparato experimental de recolher tablete. (\*) Indica o local de posicionamento do alimento para o animal com lesão isquêmica unilateral encefálica à direita.

- *Teste de Estimulação da vibrissa*

Segundo Barth *et al.* (1990), esse teste é utilizado para observar a movimentação da pata anterior através da estimulação da vibrissa. Os roedores possuem o comportamento inato que, após estimulação da vibrissa sobre a superfície, apresentam resposta de colocação da pata anterior ipsilateral sobre a mesma.

Estudos prévios demonstraram que lesão no córtex motor prejudica a resposta deste comportamento e que após a lesão inicia-se um processo de compensação contralateral, sendo necessária a inibição da vibrissa e a pata contralateral do animal quando for aplicar o teste (Adkins *et al.*, 2004). O desempenho do animal foi investigado através da porcentagem de erros do animal (não colocação da pata na superfície após estimulação da vibrissa) diante de 10 tentativas às quais o animal foi exposto.

### ***Delineamento Experimental***

O período experimental foi composto por três semanas, iniciando 24 horas após o procedimento cirúrgico (T1, primeiro treino, à T21, vigésimo primeiro treino). Os animais foram diariamente submetidos a treino de recolher tablete com tempo total de 10 minutos,

sendo que os tabletes foram posicionados do lado contralateral a 1 cm de distância da janela central em que o animal podia recolher o alimento utilizando apenas a pata comprometida.

Imediatamente após o tempo de exploração do aparato de recolher tabletes, os animais foram submetidos ao teste de estimulação das vibrissas. Em seguida, o animal recebia alimentação equivalente a 10% do peso corporal e os animais do grupo controle do treino motor receberam alimentação *ad libitum* e diariamente foram submetidos ao teste de estimulação da vibrissa.

### ***Tratamento Farmacológico e Procedimento de Injeção***

A L-histidina (lh), precursor da histamina, e a Pirilamina sal de maleato (P), antagonista dos receptores H1 (SigmaChemicalCo., St. Louis, MO) foram utilizadas por serem capazes de ultrapassar rapidamente a barreira hematocefálica (Bongers *et al.*, 2010). As concentrações das drogas foram de 100mg/ml e 200 mg/ml para a L-histidina (Serafim *et al.*, 2008) e 35 mg/ml e 70 mg/ml para a Pirilamina (Garção *et al.*, 2009), sendo utilizadas por não causarem efeito na atividade locomotora como verificado em estudos prévios.

O volume injetado foi de 1 ml/kg de peso do animal e os animais do grupo controle receberam solução salina em volume equivalente ao da droga. As soluções foram administradas via intraperitoneal (i.p.), através de uma seringa de 1 ml, dez minutos após cada treino. As drogas e a solução salina foram mantidas sob refrigeração até o momento da utilização, em tubos codificados, de modo que o pesquisador não tinha conhecimento do conteúdo durante o experimento.

### ***Filmagem***

Os experimentos foram gravados através de uma câmera de vídeo digital (Sony HandyCam DCR-SX45) e as variáveis registradas em *cd-rom* (Philips 80 min/700 mb). Posteriormente, as imagens foram assistidas em um monitor de computador para registro das variáveis (HP, 20”).

### ***Análise Histológica***

Após a conclusão dos procedimentos experimentais, os animais foram novamente anestesiados. A seguir foram decapitados e os cérebros removidos e fixados em formalina 10% por no mínimo 5 dias. As amostras de tecido foram desidratadas em série alcoólicas crescentes, diafanizadas em duas séries de xilol e incluídas em parafina sob a forma de blocos. Os blocos rígidos foram seccionados através de micrótomo a uma espessura de 7 $\mu$ m.

Por meio de análise histológica, foi confirmada a agenesia da artéria comunicante anterior. Nenhum animal utilizado foi excluído por não possuir a alteração

vascular encefálica descrita na maioria dos animais desta espécie.

### ***Experimentos***

Realizaram-se dois experimentos, sendo empregados os mesmos procedimentos experimentais descritos anteriormente, no entanto, diferindo no tratamento farmacológico.

#### ***Experimento I: L-histidina (Precursor da histamina)***

- **Grupos experimentais**

- 

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 12 grupos, como mostra a figura abaixo:

Tabela 1: Grupos experimentais tratados com L-histidina e respectivos controles

<b>GRUPO</b>	<b>CIRURGIA</b>	<b>TREINO</b>	<b>DROGA</b>	<b>DOSE</b>	<b>n</b>
STlh100	Sham	Sim	L-Histidina	100 mg/kg	10
STlh200	Sham	Sim	L-Histidina	200 mg/kg	11
Slh100	Sham	Não	L-Histidina	100 mg/kg	11
Slh200	Sham	Não	L-Histidina	200 mg/kg	12
ST	Sham	Sim	Salina	-	12
S	Sham	Não	Salina	-	11
LTlh100	Lesão	Sim	L-Histidina	100 mg/kg	10
LTlh200	Lesão	Sim	L-Histidina	200 mg/kg	10
Llh100	Lesão	Não	L-Histidina	100 mg/kg	10
Llh200	Lesão	Não	L-Histidina	200 mg/kg	10
LT	Lesão	Sim	Salina	-	11
L	Lesão	Não	Salina	-	11

#### ***Experimento II: Pirilamina (Antagonista dos receptores H1)***

- **Grupos experimentais**

Os animais foram separados aleatoriamente em 12 grupos, como mostra a figura abaixo:

Tabela 2: Grupos experimentais tratados com Pirilamina e respectivos controles.

<b>GRUPO</b>	<b>CIRURGIA</b>	<b>TREINO</b>	<b>DROGA</b>	<b>DOSE</b>	<b>n</b>
STP35	Sham	Sim	Pirilamina	35 mg/kg	10
STP70	Sham	Sim	Pirilamina	70 mg/kg	10
SP35	Sham	Não	Pirilamina	35 mg/kg	11
SP70	Sham	Não	Pirilamina	70 mg/kg	10
ST	Sham	Sim	Salina	-	11
S	Sham	Não	Salina	-	12
LTP35	Lesão	Sim	Pirilamina	35 mg/kg	10
LTP70	Lesão	Sim	Pirilamina	70 mg/kg	10
LP35	Lesão	Não	Pirilamina	35 mg/kg	11
LP70	Lesão	Não	Pirilamina	70 mg/kg	10
LT	Lesão	Sim	Salina	-	12
L	Lesão	Não	Salina	-	11

### ***Análise Estatística***

Apesar de se tratar de variáveis de natureza ordinal e utilizarmos testes estatísticos não paramétricos, optamos por apresentar os gráficos em média e erro padrão da média ( $\pm$  EPM) por representarem melhor o efeito biológico. Os dados dos testes comportamentais de ambos os Experimentos (I e II) foram submetidos separadamente ao teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* ( $p < 0,05$ ) seguido pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman Keuls* – *SNK* ( $p < 0,05$ ). Em seguida, foi adotada a correção de *Bonferroni* para os valores de alfa (2) com  $p < 0,025$ .

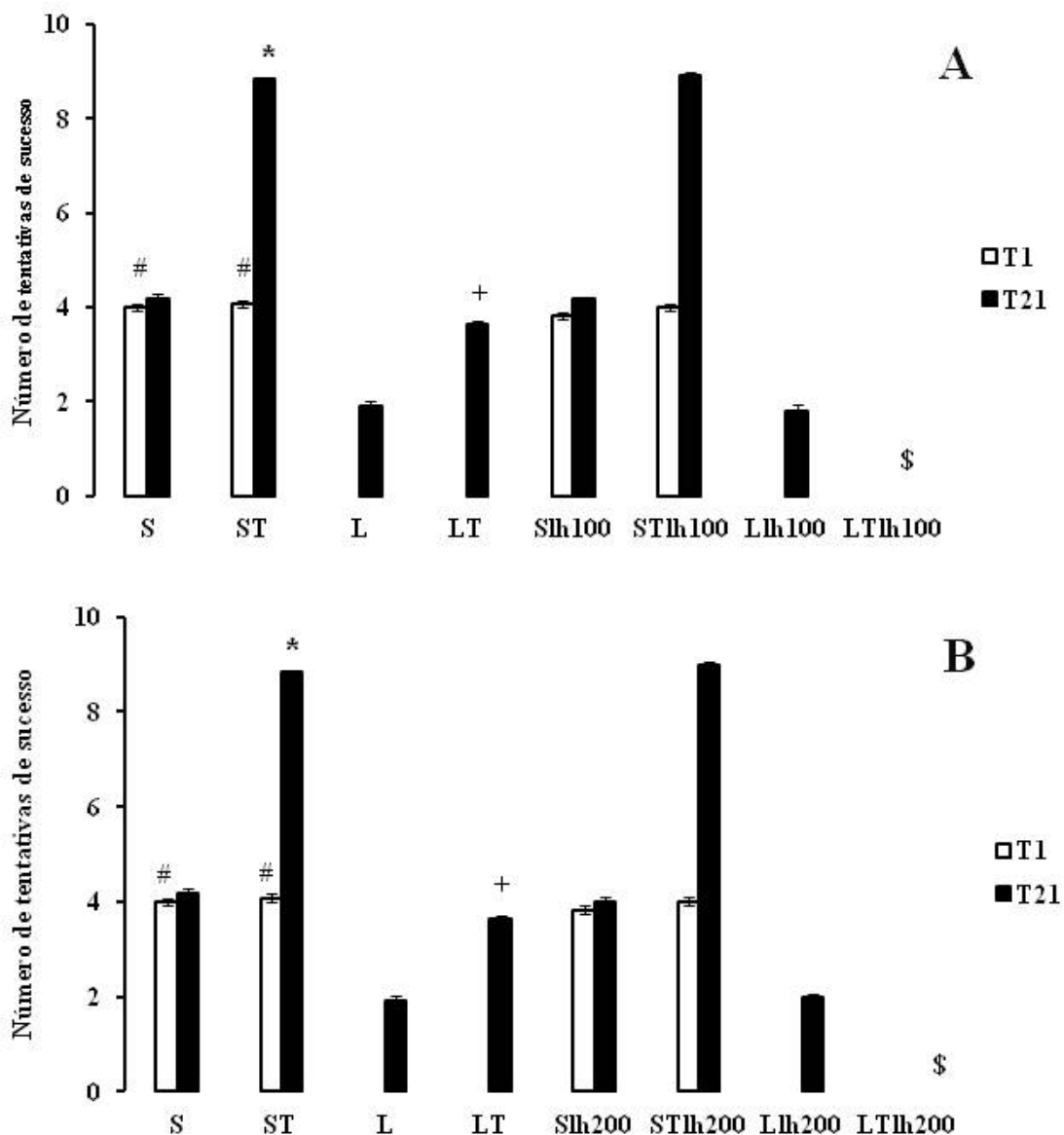
## RESULTADOS

As médias e o erro padrão da média ( $\pm$  EPM) das tentativas de sucesso durante a tarefa de recolher tablete dos grupos em T1 e T21 são apresentados na Figura 3A e 3B. Em T1, o número de tentativas dos grupos S e ST foram significativamente maiores em relação aos grupos L e LT (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 144,38$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ), demonstrando que a lesão prejudica a função de recolher tablete.

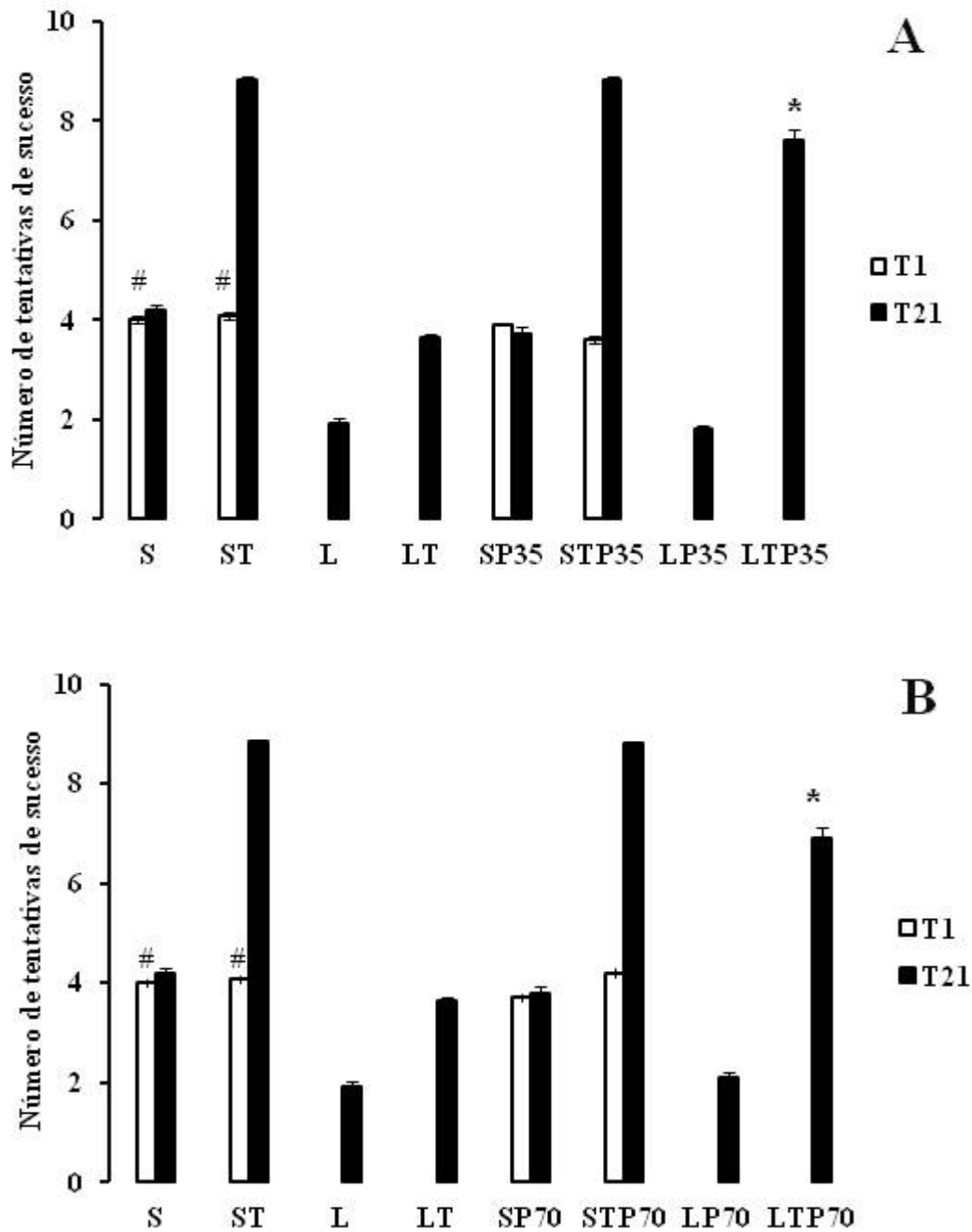
Os animais do grupo ST e LT apresentaram aumento significativo entre as tentativas de recolher tabletes em relação à S e L respectivamente em T21 (3A e 3B) (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 144,38$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ). Todavia, os grupos LTlh100 e LTlh200 (Experimento I) apresentaram redução significativa das tentativas em relação ao grupo LT (LTlh100: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 144,38$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ . LTlh200: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 147,36$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ) (Figura 3A e 3B), sugerindo que o treino melhora o desempenho da tarefa nos animais independente da lesão e que a l-histidina em ambas as doses, quando associada com o treino, prejudicou a recuperação da função.

Dados (médias e erro padrão da média) referentes aos animais tratados com Pirilamina submetidos à tarefa de recolher tablete (Experimento II) são apresentados na Figura 4A e 4B. Em T1, os grupos de animais submetidos a procedimento cirúrgico (L e LT) obtiveram número de tentativas de sucesso significativamente menor em relação aos grupos lesão fictícia (S e ST) (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 147,36$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ), indicando que a lesão prejudica o desempenho da tarefa. Entretanto, em T21 observa-se aumento significativo das tentativas de sucesso dos grupos LTP35 e LTP70 quando comparados ao grupo LT (LTP35: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 146,66$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ . LTP70: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 139,78$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ), indicando que a Pirilamina associada com o treino motor facilitou a evocação da memória em ambas as doses.



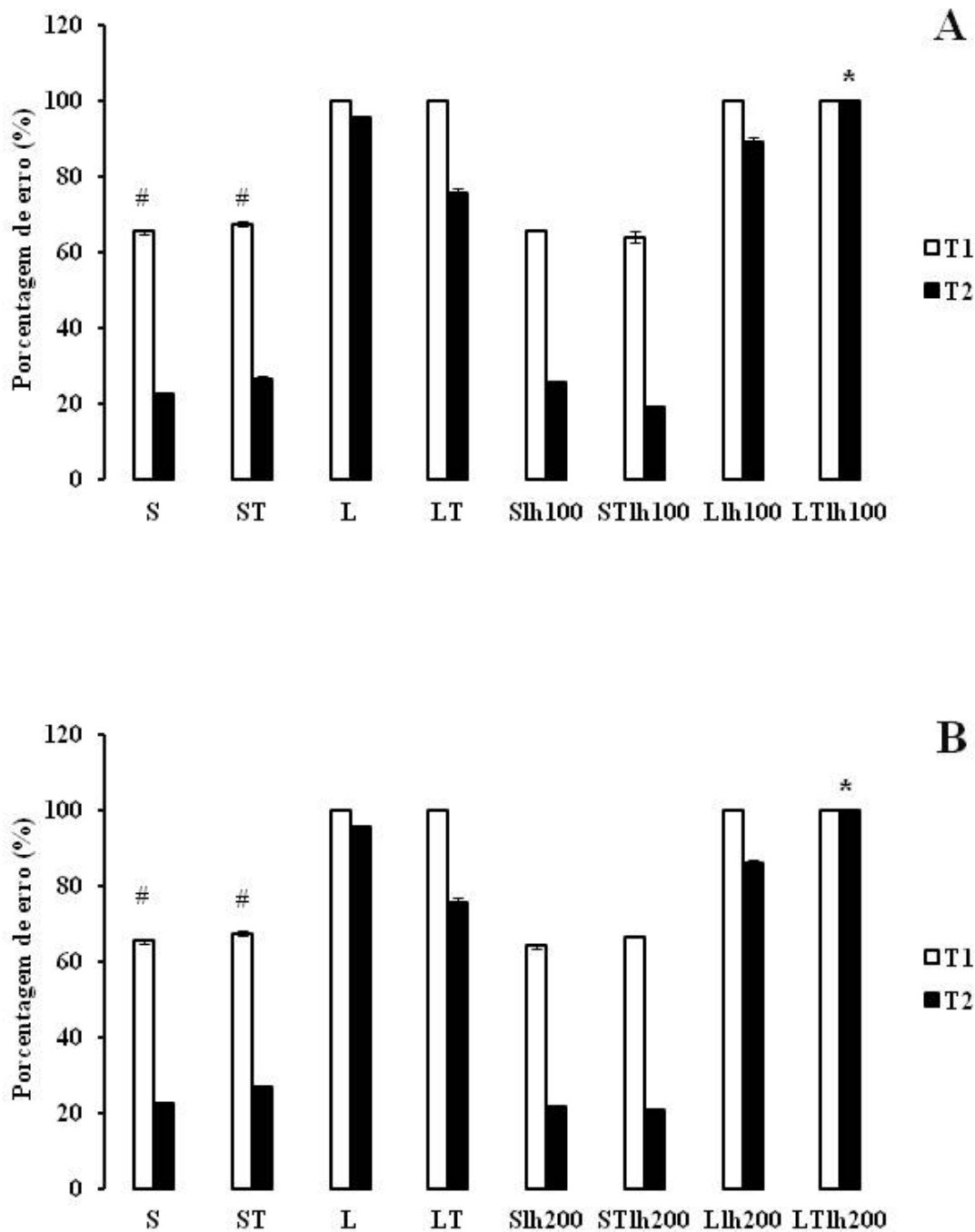


**Figura 3:** Médias ( $\pm$  EPM) do número de tentativas de sucesso na tarefa de recolher tablete durante o primeiro (T1) e vigésimo primeiro (T21) treino dos animais lesão fictícia (S) ou lesão isquêmica (L), não treinado ou treinados (T), tratados com salina ou L-histidina (lh). 3A – Animais do grupo controle e animais tratados com l-histidina na dose de 100 mg/kg. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de S e ST em relação a L e LT em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa de S em T21 ( $p < 0,01$ ). (+) Indica diferença significativa em relação à L em T21 ( $p < 0,01$ ). (§) Indica diferença significativa em relação à LT em T21 ( $p < 0,01$ ). 3B – Animais do grupo controle e animais tratados com l-histidina na dose de 200 mg/kg. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de S e ST em relação a L e LT em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa de S em T21 ( $p < 0,01$ ). (+) Indica diferença significativa em relação à L em T21 ( $p < 0,01$ ). (§) Indica diferença significativa em relação à LT em T21 ( $p < 0,01$ ).



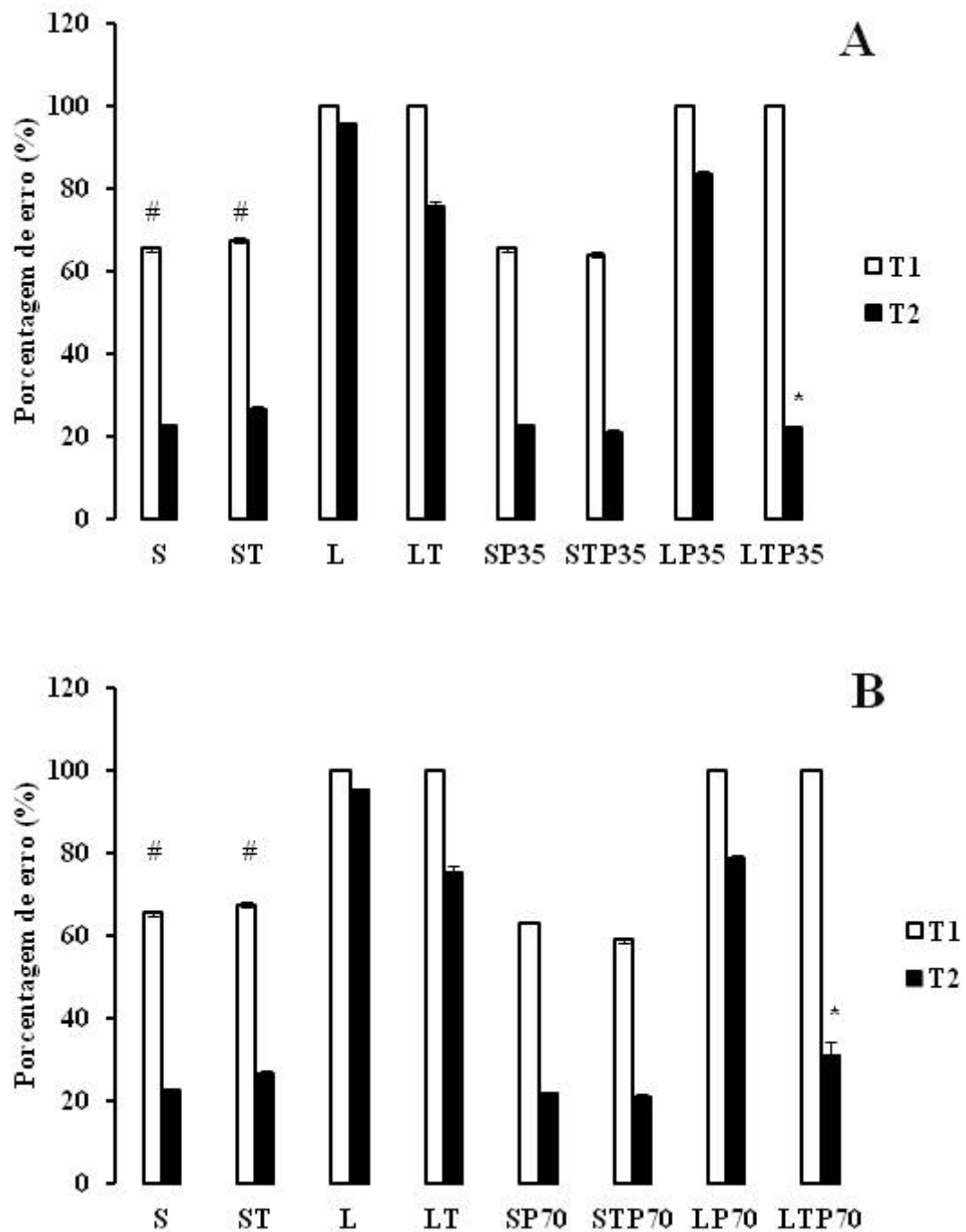
**Figura 4:** Médias ( $\pm$  EPM) do número de tentativas de sucesso na tarefa de recolher tablete durante o primeiro (T1) e vigésimo primeiro (T21) treino dos animais submetidos à lesão fictícia (S) ou lesão isquêmica (L), não treinado ou treinados (T), tratados com salina ou Pirilamina (P). 4A – Animais do grupo controle e animais tratados com Pirilamina na dose de 35 mg/kg. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de S e ST em relação a L e LT em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa de LT em T21 ( $p < 0,01$ ). 4B – Animais do grupo controle e animais tratados com Pirilamina na dose de 70 mg/kg. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de S e ST em relação a L e LT em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa de LT em T21 ( $p < 0,01$ ).

A Figura 5A e 5B apresenta as médias ( $\pm$ EPM) das porcentagens de erro do teste de estimulação da vibrissa. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais dos grupos L e LT apresentaram porcentagens de erros maiores em relação aos grupos S e ST (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 153,59$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ). Em T21, os grupos LTlh100 e LTlh200 apresentaram aumento significativo da porcentagem de erros em relação ao grupo LT (LTlh100: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 153,59$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ . LTlh200: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2= 156,95$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ). Esses resultados demonstram que a lesão afeta o desempenho da tarefa e que a l-histidina prejudica a evocação da memória nas doses estudadas nos animais lesados quando associado ao treino motor.



**Figura 5:** Médias ( $\pm$  EPM) das porcentagens de erro do teste de estimulação da vibrissa durante o primeiro (T1) e vigésimo primeiro (T21) treino dos animais submetidos à lesão fictícia (S) ou lesão isquêmica (L), não treinado ou treinados (T), tratados com salina ou l-histidina (lh). 5A – Animais do grupo controle e animais tratados com l-histidina na dose de 100 mg/kg. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de S e ST em relação a L e LT em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação a LT em T21 ( $p < 0,01$ ). 5B – Animais do grupo controle e animais tratados com l-histidina na dose de 200 mg/kg. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de S e ST em relação a L e LT em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação a LT em T21 ( $p < 0,01$ ).

Em T21, os animais dos grupos LTP35 e LTP70 mostraram redução estatisticamente significativa da porcentagem de erros do teste de estimulação de vibrissa quando comparados ao grupo LT (LTP35: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2 = 153,23$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ . LTP70: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2 = 150,27$ ; *SNK*,  $p < 0,01$ ), indicando que a Pirilamina em ambas as doses quando associada com o treino motor facilita a evocação da memória nos animais lesados e treinados (Figura 6).



**Figura 6:** Médias ( $\pm$  EPM) das porcentagens de erro do teste de estimulação da vibrissa durante o primeiro (T1) e vigésimo primeiro (T21) treino dos animais submetidos à lesão fictícia (S) ou lesão isquêmica (L), não treinado ou treinado (T), tratado com salina ou Pirilamina (P). 6A – Animais do grupo controle e animais tratados com Pirilamina na dose de 35 mg/kg. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de S e ST em relação a L e LT em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação a LT em T21 ( $p < 0,01$ ). 6B – Animais do grupo controle e animais tratados com Pirilamina na dose de 70 mg/kg. (#) Indica diferença estatisticamente significativa de S e ST em relação a L e LT em T1, respectivamente ( $p < 0,01$ ). (\*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação a LT em T21 ( $p < 0,01$ ).

## DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que os animais dos grupos lesados (L e LT) demonstraram grandes prejuízos nos testes comportamentais propostos, visto que apresentaram redução do número de tentativas de sucesso na tarefa de recolher tabletes e aumento da porcentagem de erros no teste de estimulação da vibrissa. Estudos prévios mostraram que gerbilos submetidos à lesão isquêmica unilateral possuem redução da habilidade motora e equilíbrio no teste de Rota Rod (De Araujo *et al.*, 2008). Sendo a tarefa de recolher tablete e o teste de estimulação da vibrissa, testes comportamentais que, respectivamente, avaliam a coordenação funcional e a movimentação da pata anterior de roedores, acreditamos que prejuízos neuronais após a isquemia em regiões encefálicas responsáveis por comportamentos motores (hipocampo, córtex motor, corpo estriado e cerebelo) podem esclarecer o motivo pelo qual os animais submetidos ao procedimento cirúrgico obtiveram desempenhos inferiores quando comparados aos animais não lesados.

Diversos estudos revelaram os efeitos da atividade física após a isquemia encefálica em roedores. Entretanto, os resultados ainda são contraditórios. Ratos com lesão isquêmica do córtex sensório-motor submetidos a exercícios na roda de correr apresentaram menores desempenhos em uma bateria comportamental de tarefas motoras (teste de estimulação da vibrissa, teste de rota rod e teste de percorrer viga) quando comparados a animais submetidos a interação social e enriquecimento ambiental (Johansson e Ohlsson; 1996). Adicionalmente, o treinamento precoce na esteira com ratos após lesão encefálica provocou diminuição na secreção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo, indicando que o treino motor precoce prejudicou a plasticidade (Griesbach *et al.*, 2004).

Por outro lado, Lee e colaboradores (2003) demonstraram que exercícios físicos na esteira promove redução da apoptose e aumento da proliferação celular no giro dentado do hipocampo em gerbilos submetidos à isquemia global. Além disso, observa-se melhora dos desempenhos funcionais em roedores submetidos à isquemia unilateral do córtex sensório-motor e expostos a treinamento de tarefas específicas para o hemisfério comprometido (Jones *et al.*, 2009). Segundo Biernaskie e Corbett (2001), ratos com isquemia do córtex sensório-motor expostos a ambiente enriquecido e treinados com tarefas específicas (tarefa subir escada, teste do cilindro e tarefa de recolher tablete) recuperaram a função por adquirirem desempenho funcional e arborização dendrítica semelhantes aos animais não lesados e não treinados.

Resultados similares foram encontrados no presente estudo, em que o grupo LT recuperou a função de recolher tablete e reduziu a porcentagem de erros durante o teste de estimulação de vibrissa após 21 dias de treino motor específico. Esses dados podem ser explicados uma vez que o treinamento motor de atividades complexas é capaz de influenciar nos circuitos neurais promovendo alterações plásticas estruturais nas estruturas encefálicas após lesão isquêmica cerebral (Jones *et al.*, 1999).

Alguns estudos afirmam que apenas o treino motor não é capaz de promover a completa recuperação da função e que a combinação de tratamentos poderia acelerar e/ou potencializar a reabilitação (Biernaskie e Corbett, 2001; Feeney *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2009). Dentre os tratamentos sugeridos à possível associação com o treino motor estão a eletroestimulação cortical e farmacoterapia (Adkins e Jones, 2003; Adkins e Jones, 2005).

Diversos estudos sugerem que a histamina influencia a plasticidade neural, participando como substrato neural nos processo de aprendizagem, memória e recuperação funcional (Piratello e Mattioli, 2007; Garção *et al.*, 2009).

Prast e colaboradores (1996) concluíram que a L-histidina promove efeito facilitador na memória de curta duração de ratos em teste de memória social, e que um inibidor da síntese de histamina ( $\alpha$ -fluormetilhistidina) causa efeito inibidor no processo de memória espacial. Administração intraperitoneal de Pirilamina provocou prejuízos na consolidação de memória e a intra-hipocampal provocou prejuízo na memória de trabalho de ratos (Nakazato *et al.*, 2000). Ratos com mutação dos genes para os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> expostos ao labirinto de Barnes possuíram déficit de memória (Dai *et al.*, 2007). Além disso, antagonistas dos receptores H<sub>1</sub> pirilamina e clorfeniramina impediram a aprendizagem e memória espacial em ratos submetidos a labirinto de oito braços (Chen *et al.*, 2001).

Por outro lado, a administração pós-treino de clorfeniramina em peixes da espécie *Carassius auratus* apresentou efeito positivo na aprendizagem e memória e que possui organização dose-dependente (Spieler *et al.*, 1999; Medalha *et al.*, 2000). Um estudo realizado por Roegge e colaboradores (2007) demonstrou que a administração, via intraperitoneal, de pirilamina em ratos facilita a consolidação da memória espacial em modelo de labirinto de 16 braços. Os resultados do presente estudo demonstraram que a L-histidina prejudica o desempenho no teste de estimulação da vibrissa em gerbilos após lesão isquêmica unilateral encefálica, enquanto, a Pirilamina facilita em ambas as doses estudadas. Estes resultados podem indicar prejuízo e facilitação, respectivamente, da evocação do reflexo e/ou memória motora.



Com relação à recuperação funcional, Garção e colaboradores (2009) demonstraram que a clorfeniramina prejudica a recuperação funcional de peixes da espécie *Carassius auratus* em modelo de aprendizagem espacial após ablação telencefálicas. Enquanto, em um estudo realizado por Piratello e Mattioli (2004) a clorfeniramina acelerou o processo de recuperação funcional utilizando modelo experimental de compensação vestibular em peixes após hemilabirintectomia. Adicionalmente, a Tioperamida, um antagonista dos receptores H<sub>3</sub>, favorece a recuperação funcional sensório-motora e acelera a compensação vestibular de gatos (Tighilet *et al.*, 2006).

No presente estudo, o efeito do tratamento farmacológico em animais não lesados e lesados que não foram treinados, submetidos ao teste de recolher tablete, ambas as drogas nas doses estudadas não influenciaram nos desempenhos funcionais. Todavia, quando associadas ao treino motor de recolher tabletes, a L-histidina (Grupos LTlh100 e LTlh200) inibiu a recuperação funcional, enquanto, a Pirilamina (Grupos LTP35 e LTP70) apresentou efeito positivo no desempenho das tarefas quando comparada a animais treinados e tratados com salina.

Gatos submetidos à lesão unilateral do córtex frontal quando associado o treino motor com tratamento farmacológico (anfetamina) obtiveram melhor desempenho funcional da atividade locomotora quando comparados aos animais do grupo tratamento farmacológico ou treinamento motor isolado (Hovda e Feeney, 1984). Adicionalmente, Kline e colaboradores (1994) demonstraram que metilfenidato (Agonista serotoninérgico) quando aplicado em ratos submetidos à hemiplegia não apresentaram melhora do desempenho funcional em teste de caminhada, mas quando associada o tratamento farmacológico com o treino ocorre melhora duradoura na recuperação funcional. Os resultados deste estudo corroboram estudos prévios, os quais quando associado o treino motor com a ação farmacológica ocorre a aceleração da reabilitação. No presente estudo, a associação da Pirilamina e treino motor específico surtiu efeito semelhante ao da amfetamina e treino motor relatado anteriormente (Hovda & Feeney; 1984). Assim, sugerimos que o antagonista H<sub>1</sub>, facilita a aquisição e/ou retenção do treino motor e conseqüentemente a recuperação funcional.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Estudo I desta tese, um modelo de recuperação funcional para Ratos foi testado para gerbilos (*Meriones unguiculatu*). Neste modelo, os animais são estimulados a utilizar a pata anterior comprometida para recolher tabletes de banana durante 10 minutos. Verificou-se que animais lesados apresentaram prejuízos no número de tentativas de sucesso de recolher tablete comparado aos animais não lesados e que o treino no mesmo aparato experimental foi capaz de melhorar o desempenho motor no grupo não lesado e induzir a recuperação funcional no grupo lesado. Este modelo foi utilizado em ambos os estudos deste trabalho e mostrou-se útil para treino de atividades específicas para gerbilos. Adicionalmente, os dados morfológicos corroboram os dados comportamentais, devido o treino funcional induzir maior ativação neuronal observadas através da proteína *c-fos*, que se apresenta mais reativa no córtex motor (M1) e hipocampo (CA1) do grupo lesado treinado (LT) quando comparado ao grupo lesado (L).

Uma vez que se verificou que os animais eram capazes de recuperar a função utilizando o respectivo modelo experimental, foi estudado o efeito do precursor dos receptores histaminérgicos (l-histidina) e o bloqueio dos receptores H<sub>1</sub> (Pirilamina) na recuperação funcional de gerbilos com lesão isquêmica unilateral encefálica.

A estimulação dos receptores histaminérgicos com a utilização da L-histidina (ambas as doses) não apresentou efeito na recuperação funcional para tarefa de recolher tablete em gerbilos com lesão isquêmica unilateral encefálica. Apenas quando associado o treino com o tratamento farmacológico, a L-histidina impediu a recuperação da função (Experimento I do Estudo II).

O bloqueio dos receptores H<sub>1</sub> utilizando a Pirilamina não promoveu efeito sobre os comportamentos avaliados, embora, quando associado com o treino da atividade, facilitou a recuperação funcional em animais lesados nas doses estudadas (Experimento II do Estudo II).

Nota-se que não foi realizada análise de imunohistoquímica no Estudo II deste trabalho, em virtude das diversas tentativas em padronizar a técnica para gerbilos e esta análise deverá ser concluída para que sejam identificadas as possíveis alterações morfológicas nos grupos tratados farmacologicamente.

Assim, o Estudo II confirma a participação do sistema histaminérgico neural no processo de recuperação funcional de gerbilos no modelo experimental estudado. Novos estudos devem ser realizados a fim de estudar o envolvimento dos receptores H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, D.L.; JONES, T.A. D-amphetamine enhances skilled reaching after ischemic cortical lesions in rats. **Neuroscience Letter**, v. 380, p. 214–218, 2005.

ADKINS, D.L.; VOORHIES, A.C.; JONES, T.A. Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions. **Neuroscience**, v.128(3), p. 473-86, 2004.

ADKINS-MUIR, D.L.; JONES, T.A. Cortical electrical stimulation combined with rehabilitative training: enhanced functional recovery and dendritic plasticity following focal cortical ischemia in rats. **Neuroscience Letter**, v. 25, p. 780–788, 2003.

ALLRED, R.P.; JONES, T.A. Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage in female rats: forelimb behavioral effects and dendritic structural plasticity in the contralateral homotopic cortex. **Experimental Neurology**, v. 190(2), p. 433-445, 2004.

ALVAREZ, X. A.; FRANCO, A.; FERNANDEZ-NOVOA, L.; CACABELOS, R. Effects of neurotoxic lesions in the posterior hypothalamic region on psychomotor activity and learning. **Agents and Actions**, v. 43, p. 21-23, 1994.

ANDERSON, B.J.; RAPP, D.N.; BAEK, D.H.; MCCLOSKEY, D.P.; COBURN-LITVAK P.S.; ROBINSON J.K. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. **Physiology & Behavior**, v. 15;70(5), p.425-9, 2000.

ANG, E.T.; WONG, P.T.; MOOCHHALA S.; NG Y.K. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? **Neuroscience**, v. 118(2), p. 335-45, 2003.

ARIDA, R.M.; SCORZA, C.A.; DA SILVA, A.V.; SCORZA, F.A.; CAVALHEIRO, E.A. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. **Neuroscience Letter**, v. 8;364(3), p.135-8, 2004.

BARTH, T.M.; GRANT, M.L.; SCHALLERT T. Effects of MK-801 on recovery from sensorimotor cortex lesions. **Stroke**, suplemento II, p. 153–157, 1990.

BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. **Journal of Neuroscience**, v. 15 (21), p. 5272-80, 2001.

BLAND, S.T.; PILLAI, R.N.; ARONOWSKI, J.; GROTTA, J.C.; SCHALLERT, T. Early overuse and disuse of the affected forelimb after moderately severe intraluminal suture occlusion of the middle cerebral artery in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 126(1-2), p.33-41, 2001.

BLOCK, F. Global ischemia and behavioural deficits. **Progress in Neurobiology**, v. 58, n 3, p. 279-95, 1999.

BONGERS, G.; ESCH, I.; LEURS, R. Molecular Pharmacology of the Four Histamine Receptors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 709, p. 11-19, 2010.

BROWN, R.E.; STEVENS, D.R.; HASS, H.L. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**, v. 65 (6), p. 637-72, 2001.

BURNS, T.A.; HUSTON J.P.; SPIELER, R.E. Circadian variation of brain histamine in goldfish. **Brain Research Bulletin**, v. 59 (4), p. 299–301, 2003.

CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; PISANI, A.; CUPINI, L.M.; BERNARDI, G. Synaptic plasticity in the ischaemic brain. **The Lancet Neurology**, v. 2, p. 622-629, 2003.

CARMICHAEL, S.T. Plasticity of cortical projections after stroke. **Neuroscientist**.v. 9, p. 64-75, 2003.

CHEN, R.; COHEN, L.G.; HALLETT, M. Nervous system reorganization following injury. **Neuroscience**, v. 111: 761-773, 2002.

CHEN, Z.; CHEN, J.Q.; KAMEI, C. Effect of H1-antagonists on spatial memory deficit evaluated by 8-arm radial maze in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 22, p. 609–613, 2001.

COFIEL, L.P.; MATTIOLI, R. Involvement of histamine receptors in the acquisition of inhibitory avoidance in *Carassius auratus*. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 30 (7), p. 1246-1250, 2006.

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

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. Serotonin (5-hydroxytryptamine) and histamine. In: **The biochemical basis of neuropharmacology**, 7th. ed. New York: Oxford University Press, p. 352-409.1996.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 25, p. 295-301, 2002.

DAI, H.; OKUDA, T.; SAKURAI, E.; KURAMASU, A.; KATO, M.; JIA, G.; XU, A.J.; IINUMA, K.; SATO, I.; YANAI, K. Blockage of histamine H1 receptor attenuates social isolation-induced disruption of prepulse inhibition: a study in H1 receptor gene knockout mice. **Psychopharmacology**, v. 183, p. 285–293, 2005.

DE ARAUJO, F.L.B.; BERTOLINO, G.; FUNAYANA, C.A.R.; COIMBRA, N.C.; DE ARAUJO, J. E. Influence of treadmill training on motor performance and organization of exploratory behavior in *Meriones unguiculatus* with unilateral ischemic stroke: Histological correlates in hippocampal CA1 region and the neostriatum. **Neuroscience Letter**, v. 431, p. 179-183, 2008.

DE ARAUJO, F.L.B.; BERTOLINO, G.; GONÇALVES, R.B.; MARINI, L.C.; COIMBRA, N.C.; DE ARAUJO, J. E. Neuropathology and behavioral impairments after three types of global ischemia surgery in *Meriones unguiculatus*: evidence in motor cortex, hippocampal CA1 region and the neostriatum. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 312, p. 1-2, 2012.

DING, Y.; LI, J.; LAI, Q.; RAFOLS, J.A.; LUAN, X.; CLARK, J.; DIAZ, F.G. Motor balance and coordination training enhances functional outcome in rat with transient middle cerebral artery occlusion. **Neuroscience**, v. 123(3), p. 667-74, 2004.

FAGANELLO, F. R.; MATTIOLI, R. Anxiolytic-like effect of chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 30 (31), p. 269-74, 2007.

FEENEY, D.M.; DE SMET, A.M.; RAI, S. Noradrenergic modulation of hemiplegia: Facilitation and maintenance of recovery. **Neurology and Neuroscience**, v.22, p 175-190, 2004.

GABARG, M.; BARBIN, G.; SHWARTZ, J.C. Histaminergic pathway in rat brain evidenced by lesions of the medial forebrain bundle. **Science**, v.186, p. 833-835, 1974.

GARÇÃO D.C.; CANTO-DE-SOUZA L.; ROMAGUERA F.; MATTIOLI R. Chlorpheniramine impairs functional recovery in *Carassius auratus* after telencephalic ablation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42 (4), p. 375-9, 2009.

GRIESBACH, G.S.; HOVDA, D.A.; MOLTENI, R.; WU, A.; GOMEZ-PINILLA, F. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. **Neuroscience**, v. 125(1), p. 129-39, 2004.

HAAS, H. L.; REINER, P. B.; GREENE, R. W. Histaminergic and histaminoceptive neurons: electrophysiological studies in vertebrates. In: Wanatabe, T.; Wada, H. (Eds.), **Histaminergic Neurons; Morphology and Function**. CRC Press, Boca Raton, p. 195-208, 1991.

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

HALLETT, M. Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke. **Brain Research Reviews**. v. 36, p. 169-174, 2001.

HAMDY, S.; ROTHWELL, J.C.; AZIZ, Q.; THOMPSON, D.G. Organization and reorganization of human swallowing motor cortex: implications for recovery after stroke. **Clinical Science**. v. 99, p. 151-157, 2000.

HOVDA, D.A.; FEENEY, D.M. Amphetamine with experience promotes recovery of locomotor function after unilateral frontal-cortex injury in the cat. **Brain Research**. v. 298, p. 358–361, 1984.

JANAC, B.; SELAKOVIC, V.; RADENOVIC, L.; PROLIC, Z. Time course of motor behavior changes in Mongolian gerbils submitted to different durations of cerebral ischemia. **Behavioral Brain Research**. v. 175, p. 362-373, 2006.

JANAC, B.; SELAKOVIC, V.; RADENOVIC, L. Temporal patterns of motor behavioural improvements by MK-801 in Mongolian gerbil submitted to different duration of global cerebral ischemia. **Behavioral Brain Research**. v. 194, p. 72-78, 2008.

JOHANSSON B.B.; OHLSSON A.L. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. **Experimental Neurology**. v. 139, p. 322–327, 1996.

JONES, T.A. Multiple synapse formation in the motor cortex opposite unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats. **Journal of Comparative Neurology**. v. 414, p. 57–66, 1999.

JONES, T.A.; ALLRED, R.P.; ADKINS D.L.; HSU J.E.; O'BRYANT A.; MALDONADO M.A. Remodeling the brain with behavioral experience after stroke. **Stroke**. v. 40, p. 136-138, 2009.

KAAS, J.H. The organization of sensory and motor maps in adult mammals: Gazzaniga, m.s. **The cognitive neuroscience**. Ed: Intirute of Tecnology, Massachusetts, USA, Cap. 4, p. 51-65, 1996.

KLINE, A.E.; CHEN, M.; TSO-OLIVARAS D.; FEENEY D.M. Methylphenidate treatment following ablation induced hemiplegia in rat: Experience during drug action alters effects on recovery of function, **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v. 48, p. 773–779, 1994.

KÖHLER, C.A.; DA SILVA, W.C.; BENETTI, F.; BONINI, J.S. Histaminergic Mechanisms for Modulation of Memory Systems. **Neural Plasticity**, p. 1-16, 2011.

KRIEGER, D.W., YENARI, M.A. Therapeutic Hypothermia for Acute Ischemic Stroke: What Do Laboratory Studies Teach Us? **Stroke**. v. 35 p.1482-1489, 2004.

LEE, S.H.; KIM, Y.; KIM, S.S.; LEE, T.H.; LIM, B.V.; CHANG, H.K.; JANG, M.H.; SHIN, M.C.; SHIN, M.S.; KIM, C.J. Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils. **Life Science**. v.73, p. 2455-2465, 2003.

LEE, S.H.; KIM, Y.H.; KIM, Y.J.; YOON, B.W. Enforced physical training promotes neurogenesis in the subgranular zone after focal cerebral ischemia. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 269 (1-2), p.54-61, 2008.

LEURS, R.; SMIT, M.J.; TIMMERMAN, H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 66, p. 413-463, 1995.

LEVINE, S., PAYAN, H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Experimental Neurology**. v. 16(3), p. 255-62, 1966.

LIM, H. D.; RIJN, R. M. V.; LING, P.; BAKKER, R. A.; THURMOND, R. L.; LURS, R. Evaluation of Histamine H1-, H2-, and H3-Receptor Ligands at the Human Histamine H4 Receptor: Identification of 4-Methylhistamine as the First Potent and Selective H4 Receptor Agonist. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 314, p. 1310–1321, 2005.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain Neurons. **Physiological Reviews**. v. 79, p. 1431-1568, 1999.

LOZADA, A. F.; AARNISALO, A. A.; KARLSTEDT, K.; STARK, H., PANULA, P. Plasticity of histamine H3 receptor expression and binding in the vestibular nuclei after labyrinthectomy in rat. **BioMedical Central Neuroscience**. v. 5 (32), p. 1-9, 2004.

MALDONADO, M.A.; ALLRED, R.P.; FELTHAUSER, E.L.; JONES, T.A. Motor skill training, but not voluntary exercise, improves skilled reaching after unilateral ischemic lesions of the sensorimotor cortex in rats. **Neurorehabil Neural Repair**. v. 22, p. 250-61, 2008.

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

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

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



MOYA-GARCÍA, A.A.; RODRIGUEZ, C.E.; MORILLA, J.; SÁNCHEZ-JIMENEZ, F.; RANEA, J.A.J. The function of histamine receptor H4R in the brain revealed by interaction partners. **Frontiers in Bioscience** (Scholar Edition), v. 3, p. 1058-1066, 2011.

NAKAZATO, E.; YAMAMOTO, T.; OHNO, M.; WATANABE, S. Cholinergic and glutamatergic activation reverses working memory failure by hippocampal histamine H1 receptor blockade in rats. **Life Science**. v. 67, p. 1139-47, 2000.

NEUMANN, D.; BEERMANN, S.; SEIFERT, R. Does the Histamine H4 Receptor have a Pro- or Anti-Inflammatory Role in Murine Bronchial Asthma? **Pharmacology**, v. 85, p. 217-223, 2010.

NUDO, R.J. Recovery after damage to motor cortical areas. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 9: 740-747, 1999.

ONODERA, K.; YAMATODANI, A.; WATANABE, T.; WADA, H. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. **Progress in Neurobiology**. v. 42, p. 685-702, 1994.

PENTÓN-ROL, G.; MARÍN-PRIDA, J.; PARDO-ANDREU, G.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; ACOSTA-MEDINA, E.F.; VALDIVIA-ACOSTA, A.; LAGUMERSINDEZ-DENIS, N.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, E.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; LÓPEZ-SAURA, P.A.; GUILLÉN-NIETO, G.; PENTÓN-ARIAS, E.. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. **Brain Research Bulletin**. v.86, p. 42– 52, 2011.

PIRATELLO, A.C.; MATTIOLI, R. Effects of Chlorpheniramine and L-histidine on vestibular compensation in goldfish, *Carassius auratus*. **Neuroscience Letters**. v.367, p. 160-163, 2004.

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

PRAST, H.; ARGYRIOU, A.; PHILIPPU, A. Histaminergic neurons facilitate social memory in rats. **Brain Research**. v. 734, p. 316–318. 1996.

ROEGGE, C.S. PERRAUT, C., HAO, X., LEVIN, E. D. Histamine H1 receptor involvement imp repulse inhibition and memory function: Relevance for the antipsychotic actions of clozapine, **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v. 86, p. 686-696, 2007.

RISEDAL, A., ZENG, J., JOHANSSON, BB. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v. 19(9), p.997-1003, 1999.

SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M.; GARBARG, M. Three classes of histamine receptor in brain. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 7, p 24-28, 1986.

SCOPEL, D.; FOCESATTO, C.; CIMAROSTI, H.; RABBO, M.; BELLÓ-KLEIN, A.; SALBEGO, C.; NETTO, C.A.; SIQUEIRA, I.R. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. **Brain Research Bulletin**. v. 11(71), p.155-9, 2006.

SEO, H.G.; KIM, D.Y.; PARK, H.W.; LEE, S.U.; PARK, S.H. Early motor balance and coordination training increased synaptophysin in subcortical regions of the ischemic rat brain. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25(11), p.1638-45, 2010.

SERAFIM, K.R.; KISHI, M.S.; CANTO-DE-SOUSA, A. MATTIOLI, R. L-histidine provokes state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43(1), p. 100-106, 2010.

SIM, Y.J.; KIM, H.; KIM, J.Y.; YOON, S.J.; KIM, S.S.; CHANG, H.K.; LEE, T.H.; LEE, H.H.; SHIN, M.C.; SHIN, M.S.; KIM, C.J. Long-term treadmill exercise overcomes ischemia-induced apoptotic neuronal cell death in gerbils. **Physiology & Behavior**. v. 84, p. 733–8, 2005.

SIM, Y.J.; KIM, S.S.; KIM, J.Y.; SHIN, M.S.; KIM, C.J. Treadmill exercise improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of neuronal cells in gerbils. **Neuroscience Letters**. v. 372, p. 256–61, 2004.

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

SUZUKI, G.; CHEN, Z.; SUGIMOTO, Y.; FUJII, Y.; KAMEI, C. Effects of histamine and related compounds on regional cerebral blood flow in rats. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**. v.21 (9), p. 613-617, 1999.

STRAKHOVA, M.I.; NIKKEL, A.L.; MANELLI, A.M.; HSIEH, G.C.; ESBENSHADE, T.A.; BRIONI, J.D.; BITNER, R.S. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. **Brain Research**. v. 1250, p. 41-8, 2009.

TEASELL R. Stroke recovery and rehabilitation. **Stroke**. v. 34: p 365-366, 2003.

TIGHILET B.; TROTTIER S.; MOURRE C.; LACOUR M. Changes in the histaminergic system during vestibular compensation in the cat. **Journal of Physiology**. v. 15, n. 573, p. 723-39, 2006.

ZHANG, Q.; WEI, E.Q.; ZHU, C.Y.; ZHANG, W.P.; WANG, M.L.; ZHANG, S.H.; YU, Y.P.; CHEN, Z. Focal cerebral ischemia alters the spatio-temporal properties, but not the amount of activity in mice. **Behavioural Brain Research**. v. 169(1), p. 66-74, 2006.

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

WATANABE, T.; TAGUCHI, Y.; SHIOSAKA, S.; TANAKA, J.; KUBOTA, H.; TERANO, Y.; TOHYAMA, M.; WADA, H. Distribution of the the histaminergic neuron system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. **Brain Research**. v 295: p 13-25, 1984.

WEILER, H.T.; STEINER, H.; HUSTON, J.P. Plasticity in crossed and uncrossed tuberomammillary-striatal projections in relation to recovery from behavioral asymmetries induced by hemivibrissotomy. **Neuroscience**, v. 37(2), p. 463-9, 1990.

WEILER, H.T.; WAGNER, U.; HUSTON, J.P. Unilateral lesion in the tuberomammillary nucleus region: behavioral asymmetries and effects of histamine precursor. **Behavioural Brain Research**. v. 49, p. 167-73, 1992.

WEILLER, C., RIJNTJES, M. Learning, plasticity, and recovery in the central nervous system. **Experimental Brain Research**. v. 128: p 134-138, 1999.

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

YANG, Y.R.; WANG, R.Y.; WANG, P.S. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. **Neuroscience Letters**. v. 20 (339), p. 91-4, 2003.

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

---

**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal n° 046/2008**

Protocolo n° 047/2008

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 26ª. Reunião, ocorrida em 18/11/2008, **APROVOU** o trabalho intitulado INFLUÊNCIA DO SISTEMA HISTAMINERGICO NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DE RATOS APÓS LESÃO ISQUÊMICA UNILATERAL DO CORTEX SENSORIO-MOTOR, elaborado por Rosana Mattioli e Diogo Costa Garção.

São Carlos, 24 de novembro de 2008.

Prof. Dr. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

## ANEXO B

De: Journal of Neuroscience Methods <authorsupport@elsevier.com>  
Assunto: Your PDF has been built and requires approval  
Para: diogoufscar@yahoo.com.br  
Data: Quinta-feira, 20 de Dezembro de 2012, 12:12

Journal of Neuroscience Methods  
Title: Behavioural effects and Fos expression induced by functional training in Meriones unguiculatus after unilateral cerebral ischaemic injury.  
Authors: Diogo Costa Garção; Margarete Z Gomes, Ph.D; Rosana Mattioli, Ph.D.

Dear. Diogo Costa Garção,

The PDF for your submission, "Behavioural effects and Fos expression induced by functional training in Meriones unguiculatus after unilateral cerebral ischaemic injury." has now been built and is ready for your approval. Please view the submission before approving it, to be certain that it is free of any errors. If you have already approved the PDF of your submission, this e-mail can be ignored.

To approve the PDF please login to the Elsevier Editorial System as an Author:

<http://ees.elsevier.com/jneumeth/>

Your username is: [diogoufscar@yahoo.com.br](mailto:diogoufscar@yahoo.com.br)

Then click on the folder 'Submissions Waiting for Author's Approval' to view and approve the PDF of your submission. You may need to click on 'Action Links' to expand your Action Links menu.

You will also need to confirm that you have read and agree with the Elsevier Ethics in Publishing statement before the submission process can be completed. Once all of the above steps are done, you will receive an e-mail confirming receipt of your submission from the Editorial Office. For further information or if you have trouble completing these steps please go to: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/88/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/88/p/7923).

Please note that you are required to ensure everything appears appropriately in PDF and no change can be made after approving a submission. If you have any trouble with the generated PDF or completing these steps please go to: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/88/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/88/p/7923).

Your submission will be given a reference number once an Editor has been assigned to handle it.

Thank you for your time and patience.  
Kind regards,  
Editorial Office  
Journal of Neuroscience Methods

\*\*\*\*\*

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

**RESEARCH ARTICLE**

**Behavioural effects and Fos expression induced by functional training in *Meriones unguiculatus* after unilateral cerebral ischaemic injury.**

Diogo Costa Garção<sup>1</sup>; Margarete Zanardo Gomes<sup>2</sup>, Rosana Mattioli<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> \*Laboratory of Neuroscience, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP - Brazil.

<sup>2</sup> \*Laboratory of Morphology and Structural Biology, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE – Brazil.

**Address for correspondence**

Diogo Costa Garção

Praça Ernesto Geisel, 22. Centro.

CEP:49560-000

Moita Bonita – Sergipe – Brazil.

Phone number: +55 16 34531228

Fax number: +55 16 34531228

Email address: [diogoufscar@yahoo.com.br](mailto:diogoufscar@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate behavioural alterations and Fos expression in gerbils submitted to functional training after unilateral cerebral ischaemic injury. The behavioural procedures that were used to test functional recovery were the vibrissal stimulation test and the pellet-collecting task. Twenty-four hours after surgery, the animals were submitted to the experimental procedure, which lasted three weeks. The animals were distributed into four subgroups: sham lesion, sham lesion and trained, ischaemic injury and ischaemic injury and trained. The motor cortex, hippocampus and dorsal striatum were subjected to immunohistochemistry reaction for Fos expression, and the mean number of cells in each region was calculated. The animals in the injury group presented significantly lower averages in the pellet-collecting task and higher percentages of error in the vibrissal stimulation test when compared to animals in the sham lesion group, indicating that the lesion impaired motor performance in both tests. After training, the trained groups showed a significant increase in the pellet-collecting task compared to untrained groups, demonstrating that functional training improves task performance in sham and injured animals. A significant increase in the activation of neurons in the motor cortex and hippocampus of the injury and trained group was observed when compared to the injured group. Functional training increased the motor performance of the trained animals, independently of lesion, in the pellet-collecting task and caused increased neuronal activation in the motor cortex and hippocampus in injury animals. Moreover, the presented method is useful for the evaluation of motor performance in gerbils. Keywords: ischaemic injury, functional recovery, motor training.



## INTRODUCTION

Ischaemic brain lesions are the third largest cause of death and are the main contributor to morbidity in developed countries, causing long-term economic and social consequences (Penton-Rol et al., 2012). Eighty-five percent of cerebrovascular diseases are ischaemic and occur after transient or permanent occlusion of a cerebral artery (Penton-Rol et al., 2012).

Alterations in ischaemic tissue arise from the interaction between molecular/biochemical events, such as excitotoxicity, depolarisation, inflammation and apoptosis. However, among the functional deficits are sensorimotor abnormalities, changes in exploratory behaviour and cognitive impairments (Zang et al., 2006; Yenari & Krieger, 2004).

Several studies indicate that the ease of promoting brain ischaemia is an advantage of using the experimental model of ischaemia in gerbils when compared with other species. In gerbils, simple occlusion of the external carotid artery for 5 minutes is capable of promoting cerebral ischaemic injury; the injury occurs due to the absence of the posterior communicating artery, which prevents collateral circulation between the vessels supplying the hemispheres of the brain (Levine & Payan, 1966; Lee et al. 2003). In addition, the neuronal damage in brain regions vulnerable to ischaemia is similar to that suffered by humans and includes such areas as the motor cortex, hippocampus, striatum and cerebellum (Janac et al., 2006; De Araujo et al. 2008a, Janac et al., 2008).

Contrastingly, several studies indicate the benefits of motor training following brain lesion and that certain aspects, such as the type, intensity and time at which the activity commences, may influence the adaptive capacity of the brain (Lee et al., 2003). Jones and colleagues (2009) showed that following unilateral ischaemic injury of the motor cortex mice subjected to training for a task, which was specific for the compromised hemisphere, presented improved functional performance. Gerbils showed improvement of motor

behaviour after unilateral occlusion of the external carotid artery when subjected to daily training on a treadmill, although when the training commenced too early, the activity induced neuronal lesions (De Araújo et al., 2008). Therefore, the objective of this study was to test an experimental model of functional recovery of the forelimb in gerbils after unilateral cerebral ischaemic injury and to investigate possible behavioural recovery and Fos expression induced by functional training in this model.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Sample***

The sample included 46 male gerbils (*Meriones unguiculatus*), aged between two and three months, weighing 50-80 g, obtained from a single breeder. Before the experiments, the animals were separated into groups of four animals per collective cage (41 x 34 x 16 cm) and were quarantined for two weeks in the vivarium of the Department of Physiotherapy to control for possible diseases.

The environmental conditions of the laboratory were controlled, with a temperature of approximately 24 °C, a 12-hour light/dark cycle and free access to food and water, except for the animals in the trained groups, which, during the training phase, received food equivalent to 10% of their body weight immediately after the training.

### ***Surgical Procedure***

All animals underwent the surgical procedure. However, they were randomly divided into two groups; one group underwent a unilateral lesion of the motor cortex, and in the other group, the cortex was kept intact. The side of the lesion was selected based on the animal's preference when exposed to the apparatus for the pellet collection task on the day before the surgical procedure. The contra lateral cortex to the preferred front was lesioned.

During the surgical procedure, the animals were anaesthetised using Zoletil administered intramuscularly at a dose of 5 mg/kg bodyweight. After voluntary movements

ceased, the animals were placed on a surgical board and, following hair removal, an incision was made in the ventral neck region. Immediately after the incision was made, the subcutaneous tissue and muscle were parted to expose the external carotid artery ipsilateral to the hemisphere to be injured. Using a suture thread, the artery was occluded for five minutes, and to prevent tissue dehydration, the area was irrigated with sodium chloride. Finally, the occlusion was removed, the incision was sutured and each rat was given an intramuscular injection of penicillin G benzathine (120,000 IU) to prevent possible infections.

The animals in the sham lesion group underwent the same surgical procedure, except that occlusion of the external carotid artery was not performed. After surgery, the animals were housed in similar conditions to those prior to the surgical procedure.

### ***Behavioural Tests***

- *Pellet collecting task*

The training sessions were conducted in an apparatus (26 x 34 x 16 cm) with a central window (23 x 1 cm). The animals were trained to collect food through this window, which was situated at a height of approximately 3 cm from the floor and positioned strategically so that the animal could only collect the pellet using the affected limb. To assess the functional recovery of the ability to collect, the number of successful attempts during a 10-minute period was counted, where success was defined as an attempt in which the animal managed to retrieve the pellet (Allred & Jones, 2004; Maldonado et al. 2,008).

- *Vibrissal stimulation test*

According to Barth et al. (1990), this test is used to observe the movement in the forelimb via vibrissal stimulation. Mice possess the innate behaviour of, in response to surface vibrissal stimulation, reflexively placing the ipsilateral forelimb on top of the surface.

Previous studies have demonstrated that damage to the motor cortex impairs this behavioural response and that after injury, a contra lateral compensatory process begins,

requiring the vibrissal and the contra lateral limb of the animal to be restrained when applying the test. The animal's performance is assessed via the animal's error percentage (failure to place the limb on the surface following vibrissal stimulation) in the 10 attempts to which the animal is exposed.

### ***Experimental Design***

The experiment period consisted of three weeks, beginning 24 hours before the surgical procedure. The animals were subjected to daily training in pellet collection for 10 minutes, with the pellets placed in a location from which the animal could only collect the food using the affected limb.

Immediately after the pellet collection training, the animals were subjected to the vibrissal stimulation test. After training, the animals received food equivalent to 10% of their body weight, assessed after the vibrissal stimulation test. The animals in the motor training control group were fed freely and were subjected daily to the vibrissal stimulation test.

### ***Experimental Groups***

The animals were randomly distributed into four subgroups: animals with sham lesion (S, n= 12), animals with sham lesion that were trained (TS, n= 11), animals submitted to unilateral ischaemic brain injury (L, n= 11) and animals subjected to injury and to motor training (TL, n= 12).

### ***Filming***

The experiments were recorded using a digital video camera (Sony DCR-SX45 HandyCam) and the variables recorded on CD-ROM (Philips min/700 80 Mb). Subsequently, the images were reviewed on a computer monitor to record variables (HP, 20").

### ***Euthanasia of animals***

After completion of the experimental procedures, the animals were again

anesthetised via a lethal intramuscular dose of Zoletil (10 mg/kg bodyweight). Following this, they were decapitated, and their brains were removed and placed into individual collectors with formaldehyde solution and labelled for later processing and analysis.

### ***Preparation of slides and immunohistochemical processing***

The tissue samples were dehydrated in an increasing alcohol series, diaphanised in two series of xylol and embedded in paraffin to form blocks. The rigid blocks were sectioned by microtome to a thickness of 7  $\mu\text{m}$ . Slices were obtained from regions of interest (motor cortex, hippocampus and dorsal striatum). Once cut, the slices were allowed to float on a heated surface, were placed on gelatinised slides and were subsequently used for immunohistochemical reaction to detect the protein of interest (c-Fos).

After de-paraffinisation and rehydration in a descending alcohol series and washing of tissues in buffer (0.01 M PBS, pH 7.4), antigen retrieval was performed in citrate buffer (0.01 M pH 6.0) by means of three 5-minute cycles of exposure in a microwave oven at high power. Endogenous peroxidase activity was blocked ( $\text{H}_2\text{O}_2$  at 0.3%) for 10 minutes, and the slices were incubated at room temperature with the primary antibody for *c-Fos* (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Ltd.) in 0.01 M PBS, pH 7.4 and 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma) for two hours followed by incubation with a secondary antibody (anti-rabbit 1:500, Vector Labs Inc.) for two hours and subsequently with avidin-biotin-peroxidase complex for two hours (ABC, 1:125, Vector Labs Inc.). The staining was obtained by adding diaminobenzidine ( $\text{DAB} + \text{H}_2\text{O}_2$  at 0.03%) for ten minutes. Between each procedure, the sections were washed three times for five minutes in 0.01 M PBS, pH 7.4. Finally, the slides were coverslipped.

### ***Quantitative morphology***

A fixed area (500,000  $\mu\text{m}^2$ ) was used to quantify the number of labelled neurons in sections from the motor cortex, hippocampus and dorsal striatum. For each treatment, approximately

three sections from each animal were evaluated. A mean value for the number of cells in each region of the animal was then calculated.

### ***Statistical analysis***

All of the results are presented as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The data from both behavioural tests were subjected separately to homogeneity analysis (Levene's test). They were then analysed using the Kruskal-Wallis test for multiple comparisons and Student-Newman-Keuls test, with a significance level of  $p \leq 0.05$ . One-way ANOVAs followed by the *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0.05$ ) were used to evaluate the morphological data of the motor cortex (M1), area hippocampus (CA1) and dorsal striatum (CPu).

## **RESULTS**

Figure 1 shows the mean ( $\pm$  SD) of successful attempts in the experimental groups during Training 1 (T1) and Training 21 (T21). It was observed in T1, that the average number of attempts made by the S and ST groups was significantly higher than for the LN and LT groups (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=7$ .  $\chi^2 = 71.71$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ), suggesting that the lesion impairs the activity of collecting pellets.

In T21, the ST and LT groups showed a significant increase in attempts of the pellet-collecting task compared with the S and L groups (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=7$ .  $\chi^2 = 71.71$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ), demonstrating that functional training improves task performance in intact and injured animals.

A significant increase was observed in the error percentage of L and LT animals when compared to the S and ST animals one day after surgery (T1) (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=7$ .  $\chi^2 = 79.78$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ), indicating that the lesion affects performance in the vibrissal stimulation task. In T21, the animals in group LT possessed a decreased error percentage when compared to animals in group L (*Kruskal-Wallis* test,  $p < 0.01$ ,  $DF = 7$ .  $\chi^2 =$

79.48; SNK,  $p < 0.01$ ), indicating that functional training reduces the error percentage of the vibrissal stimulation test. (Figure 2)

Histological evaluation revealed a significant decrease in Fos protein expression in group L compared with groups S and ST in the motor cortex ( $F_{3,31} = 64,50$ ;  $p < 0.01$ ), hippocampus ( $F_{3,29} = 53,65$ ;  $p < 0.01$ ) and dorsal striatum ( $F_{3,22} = 50,79$ ;  $p < 0.01$ ), showing that lesions significantly influence the reduction of marked neurons in the areas studied. Moreover, the number of marked neurons in the motor cortex ( $F_{3,31} = 64,50$ ;  $p < 0.01$ ) and hippocampus ( $F_{3,29} = 53,65$ ;  $p < 0.01$ ) of the TL group increased significantly compared with animals in the L group, indicating that the functional training was capable of altering the neuronal response in these animals in the affected regions. (Figures 3, 4 and 5)

No statistically significant differences were observed when comparing the labelling of neurons in the dorsal striatum region between the L and TL groups ( $F_{3,63} = 21,35$ ;  $p > 0.05$ ) and when comparing the labelling of neurons in the S and ST groups in the motor cortex ( $F_{3,31} = 64,50$ ;  $p < 0.01$ ), hippocampus ( $F_{3,29} = 53,65$ ;  $p < 0.01$ ) and dorsal striatum ( $F_{3,22} = 50,79$ ;  $p < 0.01$ ) (Figures 3, 4 and 5).

## **DISCUSSION**

The behavioural results of this study indicate that animals in the injured groups (I and TI) showed impairment in the attempted tasks, as they displayed a decrease in the number of successful attempts and an increase in the percentage of errors in the vibrissal stimulation test. This result is in agreement with previous studies, in which gerbils submitted to unilateral ischaemic injury are deprived of oxygen and glucose resulting in neuronal death that causes subsequent behavioural, motor and morphological changes (in the motor cortex, hippocampus and dorsal striatum).

Behavioural studies in gerbils subjected to brain ischaemia revealed specific functional changes in each specific structure. Ischaemic injury in the M1 area of the motor

cortex impairs manual skills, motor learning and cognition (De Araujo et al, 2008). The hippocampus is associated with regulation of emotional behaviour and the exploration of new environments, the striatum acts on locomotion and stereotyped movements, while coordination and balance are related to the cerebellum (Janac et al., 2008). Because the proposed tasks are related to motor aspects, we believe that the impairment of the brain areas caused by the surgical procedure account for the reduction in the animals' performance after ischaemia.

Several previous studies have highlighted the effects of physical activity as a neuroprotective factor, mitigating neurological injury by preventing neuronal death. Mice exposed to moderate physical exercise have reduced rates of platelet aggregation with adenosine diphosphate, indicating that activity reduces the risk of ischaemic brain diseases (Anderson et al. 2000; Scopel et al. 2006). Motor training prior to injury reduced the area of infarction, oedema and neurological deficits in rodents (Ang et al., 2003). Additionally, the expression of neurotrophins was potentiated in animals trained prior to ischaemic injury, demonstrating the influence of exercise on neuronal plasticity (Ding et al., 2004b).

However, after an ischaemic event, the effects of physical activity are observed, such as expansion of brain vascularisation, increased neurogenesis and a facility for learning (Cotman & Berchtold, 2002; Lee et al., 2008). In another study, gerbils trained on a treadmill for 30 minutes daily for 7 consecutive days showed impairment in the performance of motor tasks and decreased neuronal loss (Lee et al., 2003). Risedal and colleagues (1999) demonstrated that exercise when commenced 5 days after injury may prevent future tissue loss and stimulate cortical reorganisation in an undamaged neighbouring area.

Despite the many gains promoted by training before and after ischaemic injury, the conditions of the activity such as the type, intensity and time of commencement appear to influence the results (Bland et al., 2001; Arida et al., 2004) Twenty-four hours after the



ischaemic injury, mice were exposed to motor activity and presented better functional outcome without increasing tissue damage (Yang et al., 2003). Here, we obtained similar results; the trained lesion group showed improvement in motor performance and increased expression of protein Fos in the motor cortex M1 area and in the CA1 region of the hippocampus when compared to the lesion group. The gene expression of protein Fos in the dorsal striatum, which remained unaltered despite the motor training, may not have been affected, as this region is involved in motor activities that were not tested by the functional training performed in this study (locomotion). These data support the evidence that early functional training and daily exercise have an impact on functional recovery and induce increased neuronal activation in the motor cortex and hippocampus.

Although the pellet-collecting task was originally created to study the functional recovery of the forelimb in the *Wistar* strain of mice (Allred & Jones, 2004; Maldonado et al., 2008), this behavioural test proved useful in gerbils, taking into account the performance of trained animals on the experimental apparatus. Finally, this test is also useful to evaluate the effect of a functional training task, as pellet collecting increased the motor performance in trained animals independently of the injury and caused increased neuronal activation in the motor cortex and hippocampus in trained lesion animals.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was funded by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Process: 3000543/2010-7) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Process 2008/10349-2).

## REFERENCES

- Adkins DL, Voorhies AC, Jones TA. Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions, *Neuroscience* 2004;128(3):473-86.
- Allred RP, Jones TA. Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage in female rats: forelimb behavioral effects and dendritic structural plasticity in the contralateral homotopic cortex, *Exp Neurol* 2004;190(2):433-445.
- Anderson BJ, Rapp DN, Baek DH, McCloskey DP, Coburn-Litvak PS, Robinson JK. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze, *Physiol Behav* 2000;15;70(5):425-9.
- Ang ET, Wong PT, Moochhala S, Ng YK. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience* 2003;118(2):335-45.
- Arida RM, Scorza CA, da Silva AV, Scorza FA, Cavalheiro EA. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation, *Neurosci Lett* 2004;8;364(3):135-8.
- Barth TM, Grant ML, Schallert T. Effects of MK-801 on recovery from sensorimotor cortex lesions, *Stroke* 1990:153-157.
- Bland ST, Pillai RN, Aronowski J, Grotta JC, Schallert T. Early overuse and disuse of the affected forelimb after moderately severe intraluminal suture occlusion of the middle cerebral artery in rats, *Behavioural Brain Research* 2001:126(1-2):33-41.
- Block F. Global ischemia and behavioural deficits, *Prog Neurobiol* 1999;58(3):279-95.
- Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity, *Trends Neurosci* 2002;25:295-301.
- De Araujo FLB, Bertolino G, Funayana CAR, Coimbra NC, De Araujo J E. Influence of treadmill training on motor performance and organization of exploratory behavior in *Meriones Unguiculatus* with unilateral ischemic stroke: Histological correlates in hippocampal CA1 region and the neostriatum, *Neurosci Lett* 2008;431:179-183.
- De Araujo FLB, Bertolino G, Gonçalves RB, Marini LC, Coimbra NC, De Araujo JE. Neuropathology and behavioral impairments after three types of global ischemia surgery in *Meriones unguiculatus*: evidence in motor cortex, hippocampal CA1 region and the neostriatum, *J Neurol Sci* 2012;312:1-2.
- Ding Y, Li J, Lai Q, Rafols JA, Luan X, Clark J, Diaz FG. Motor balance and coordination training enhances functional outcome in rat with transient middle cerebral artery occlusion, *Neuroscience*. 2004;123(3):667-74.
- Janac B, Selakovic V, Radenovic L, Prolic Z. Time course of motor behavior changes in Mongolian gerbils submitted to different durations of cerebral ischemia, *Behav Brain Res* 2006;175:362-373.

Janac, B.; Selakovic, V.; Radenovic, L. Temporal patterns of motor behavioural improvements by MK-801 in Mongolian gerbil submitted to different duration of global cerebral ischemia, *Behav Brain Res* 2008;194:72-78.

Jones T.A.; Allred R.P.; Adkins D.L.; Hsu J.E.; O'Bryant A.; Maldonado M.A. Remodeling the brain with behavioral experience after stroke, *Stroke* 2009;40:136-138.

Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic Hypothermia for Acute Ischemic Stroke: What Do Laboratory Studies Teach Us? *Stroke* 2004;35:1482-1489.

Lee SH, Kim Y, Kim SS, Lee TH, Lim BV, Chang HK, Jang MH, Shin MC, Shin MS, Kim CJ, Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils. *Life Sci* 2003;73:2455-2465.

Lee SH, Kim YH, Kim YJ, Yoon BW. Enforced physical training promotes neurogenesis in the subgranular zone after focal cerebral ischemia, *J Neurol Sci* 2008;269(1-2):54-61.

Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*), *Exp Neurol*. 1966;16(3):255-62.

Lipton P. Ischemic cell death in brain Neurons, *Physiol Rev* 1999;1431-1568.

Maldonado, M.A.; Allred, R.P.; Felthouser, E.L.; Jones, T.A. Motor skill training, but not voluntary exercise, improves skilled reaching after unilateral ischemic lesions of the sensorimotor cortex in rats, *Neurorehabil Neural Repair* 2008;22:250-61.

Pentón-Rol G, Marín-Prida J, Pardo-Andreu G, Martínez-Sánchez G, Acosta-Medina EF, Valdivia-Acosta A, Lagumersindez-Denis N, Rodríguez-Jiménez E, Llopiz-Arzuaga A, López-Saura PA, Guillén-Nieto G, Pentón-Arias E. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils, *Brain Res Bull* 2011;86:42– 52.

Risedal A, Zeng J, Johansson BB. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat, *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(9):997-1003.

Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull*, 2006;71(1-3):155-9.

Sim YJ, Kim H, Kim JY, Yoon SJ, Kim SS, Chang HK, et al. Long-term treadmill exercise overcomes ischemia-induced apoptotic neuronal cell death in gerbils, *Physiol Behav* 2005;84:733–8.

Sim YJ, Kim SS, Kim JY, Shin MS, Kim CJ. Treadmill exercise improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of neuronal cells in gerbils, *Neurosci Lett* 2004;372:256–61.

Zhang Q, Wei EQ, Zhu CY, Zhang WP, Wang ML, Zhang SH, Yu YP, Chen Z. Focal cerebral ischemia alters the spatio-temporal properties, but not the amount of activity in mice, *Behav Brain Res*. 2006;169(1):66-74.

Yang YR, Wang RY, Wang PS. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats, *Neurosci Lett*. 2003;339(2):91-4.

## LEGENDS

**Figure 1:** Means ( $\pm$  standard deviation) of the number of successful attempts in the pellet collecting task during the first (T1) and twenty-first (T21) training session for animals subjected to sham lesion (S), trained sham lesion (TS), injury (L) and trained injury (TL). (\*) Indicates a significant difference in the number attempts compared with the number of attempts made by animals in the S group during T1 ( $p < 0.01$ ). (+) / (#) Indicates a significant difference in the number attempts compared with the number of attempts made by animals in the S and TS groups, respectively, during T21 ( $p < 0.01$ ). (\$) Indicates a significant difference in the number of attempts compared with the number of attempts made by animals in the L group during T21 ( $p < 0.01$ ).

**Figure 2:** Means ( $\pm$  SEM) of the error percentage observed on the vibrissal stimulation test during the first (T1) and twenty-first (T21) training session of the animals subjected to sham lesion (S), trained sham lesion (TS), injury (L) and trained injury (TL). (\*) / (+) Indicates a significant difference in the number attempts compared with the number of attempts made by animals in the S and ST groups, respectively, during T21 ( $p < 0.01$ ). (#) Indicates a significant difference in the number attempts compared with the number of attempts made by animals in the L group during T21 ( $p < 0.01$ ).

**Figure 3:** Mean of the number of labelled neurons of the motor cortex (M1), hippocampus (CA1) and dorsal striatum (CPu) of the sham lesion (S), trained sham lesion (TS), injury (L) and trained Injury (TL) groups. (\*) Indicates a statistically significant difference when the L group is compared with the S and ST groups ( $p \leq 0.01$ ). (#) Indicates a statistically significant difference when the TL group is compared with the L group ( $p \leq 0.01$ ).

**Figure 4:** Photomicrograph of coronal sections from the Motor Cortex M1 area in gerbils, showing c-Fos positive neurons. (A) Group S (B) Group TS, (C) Group L (D) Group TL. Note the significant increase in labelling in the TL group compared to the L group. The magnification is 400 x, and the scale bar in D is 17.15  $\mu\text{m}$  in A, B, C and D.

**Figure 5:** Photomicrograph of coronal sections of the hippocampus CA1 area in gerbils, labelled neurons illustrating immunohistochemistry against c-Fos. (A) Group S (B) Group TS, (C) Group L (D) Group TL. Note the significant increase in labelling in the TL group compared to the L group. The magnification is 400 x, and the scale bar in D represents 17.15  $\mu\text{m}$  in A, B, C and D.

**ANEXO C**

De: Neuroscience Letters <nsl@elsevier.com>  
Assunto: Neuroscience Letters Submission Confirmation  
Para: diougoufscar@yahoo.com.br  
Data: Quinta-feira, 22 de Novembro de 2012, 18:25

Dear GARÇÃO,

Your submission entitled "The influence of the neural histaminergic system on the functional recovery of *Meriones unguiculatus* following a unilateral cerebral ischemic injury." has been received for consideration in Neuroscience Letters.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/nsl/>

Your username is: Garção

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/nsl/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/nsl/automail_query.asp).

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will then receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Neuroscience Letters. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Neuroscience Letters  
Email: [nsl@elsevier.com](mailto:nsl@elsevier.com)

**The influence of the neural histaminergic system on the functional recovery of *Meriones unguiculatus* following a unilateral cerebral ischemic injury.**

Diogo Costa Garção <sup>1</sup>; Rosana Mattioli <sup>1</sup>.

<sup>1</sup>\*Laboratory of Neuroscience, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP - Brazil.

**Address for correspondence**

Diogo Costa Garção

Praça Ernesto Geisel, 22. Centro.

CEP:49560-000

Moita Bonita – Sergipe – Brazil.

Phone number: +55 16 34531228

Fax number: +55 16 34531228

Email address: [diogoufscar@yahoo.com.br](mailto:diogoufscar@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of the histamine precursor L-Histidine and the H1-receptor antagonist Pyrilamine on the functional recovery of gerbils (*Meriones unguiculatus*) following a unilateral ischemic brain injury. Two experiments were conducted under the same experimental procedures to test the effects of two pharmacological treatments in experiment I, L-Histidine doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg and in experiment II, Pyrilamine was administered at doses of 35 mg/kg and 70 mg/kg. Both experiments were accompanied by control groups for the drug (saline), the lesion (sham lesion) and training on the pellet-collecting task (untrained). The behavioural tests that were used to test functional recovery were the vibrissal stimulation test and the pellet-collecting task. The *Kruskal-Wallis* test ( $p < 0.05$ ), the *Student-Newman-Keuls* multiple comparison test ( $p < 0.05$ ) and a *Bonferroni* correction ( $p < 0.025$ ) were used for statistical analysis. It was established that a unilateral cerebral ischemic injury impairs motor performance and that training on the pellet-collecting task improves performance independently of the lesion. L-Histidine impaired functional recovery when administered in combination with motor training, while Pyrilamine in combination with training potentiated functional recovery. With respect to the vibrissal stimulation test, the injured animals that received training in combination with L-Histidine showed a memory recall deficit; however, Pyrilamine had the opposite effect in animals that were injured and trained. These results suggest that the neural histaminergic system participates in the process of functional recovery of gerbils following a unilateral ischemic brain injury.

**Keywords:** functional recovery; Histamine; Motor training; Ischemia.

## INTRODUCTION

Histamine is a biogenic monoamine found in mast cells and neurons of the central nervous system that does not cross the blood-brain barrier. Degradation of histamine occurs through the action of the enzyme N-methyltransferase and synthesis of histamine occurs via the decarboxylation of the amino acid L-Histidine [42]. Several studies have been conducted to establish the influences of the neural histaminergic system on central nervous system functions, including the control of circadian rhythms and sleep [8], motivational processes [44], behavioural changes [33], anxiety [14], pain perception [31], modulation of psychomotor activity [4], learning and memory [10,29] and plasticity and functional recovery of the central nervous system [34,35,43].

Previous studies have shown that Chlorpheniramine, an H<sub>1</sub> receptor antagonist, prevents the functional recovery of spatial learning in the fish species *Carassius auratus* following telencephalic ablation compared to untreated fish [16]. Another study has demonstrated that Thioperamide, an H<sub>3</sub> receptor antagonist, promotes recovery of sensorimotor function and accelerates vestibular compensation in cats [41]. However, a study by Piratello and Mattioli [35] reported a conflicting result, showing that increased levels of histamine in the central nervous system, through the blocking of H<sub>3</sub> receptors (Thioperamide), prevented vestibular compensation in *Carassius auratus*.

In rodents, the blocking of H<sub>3</sub> receptors accelerates functional recovery from ocular and static postural deficits following hemilabyrinthectomy [27]. Additionally, the administration of L-Histidine increases cerebral blood flow in mice, this effect is antagonised by the administration drugs that block the H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors, which suggests that cerebral blood flow is mediated by these subclasses of histaminergic receptors [40].

The experimental model of ischemia in gerbils (*Meriones unguiculatus*) has long been used to investigate the recovery of animals after a brain lesion. Due to a lack of communication between the posterior and middle cerebral arteries, a simple occlusion of the common carotid artery for five minutes produce global ischemia in these animals [7,26]. In this model, impairment occurs in several brain structures responsible for different types of motor behaviour, and this impairment can be evaluated by behavioural studies [19,20].

Confronted with this evidence that the Histaminergic Neural System is involved in the processes of functional recovery, the objective of this study was to investigate the effects of the histamine precursor, L-Histidine, and the H<sub>1</sub> receptor antagonist, Pylramine, on the functional recovery of gerbils (*Meriones unguiculatus*) following a unilateral cerebral



ischemic injury.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Sample***

We used 234 male gerbils (*Meriones unguiculatus*) that were between two and three months for age, weighed between 50 and 80 g and were obtained from a single breeder. Prior to the experiments, the animals were separated into groups of four animals per collective cage (41 x 34 x 16 cm) and remained for two weeks in the vivarium to control for possible disease.

The environmental conditions of the laboratory were controlled by keeping the temperature at approximately 24 °C and by keeping the animals on a light/dark cycle of 12/12 hours. The animals had free access to food and water, except for the animals in the trained groups during the training phase, these animals received an amount of food equivalent to 10% of their body weight immediately after training.

### ***Surgical Procedure***

All animals underwent the same surgical procedure but were randomised into two groups to receive either a unilateral lesion of the motor cortex or a sham lesion. The side of the lesion was based on the side of dominant limb of the animal, which was determined on the day before the surgical procedure and was defined as the limb used most frequently during the pellet-collecting task.

During the surgical procedure, the animals were anaesthetised using Zoletil, which was administered intramuscularly at a dose of 5 mg/kg of the animal's body weight. Once voluntary movements ceased, the animals were placed on a surgical board, hair was removed, and an incision was made in the ventral neck region. The subcutaneous tissue and muscle were parted to expose the external carotid artery ipsilateral to the hemisphere to be injured. A suture thread was used to occlude the artery for 5 minutes and the area was irrigated with sodium chloride to prevent tissue dehydration. After 5 minutes, the occlusion was interrupted and the incision was sutured. At the end of the procedure, each animal received an intramuscular injection of penicillin G benzathine (120,000 IU) to prevent possible infections.

The animals in the sham lesion group underwent the same surgical procedure, except that occlusion of the external carotid artery was not performed. After surgery, the animals were housed in conditions similar to those conditions in which the animals were

housed prior to the surgical procedure. This surgical method was used by Lee *et al.* [24] and was an effective method for producing unilateral ischemic brain injuries and sham lesions.

### ***Behavioural Tests***

- *Pellet-collecting task*

This test is a sensitive gauge to investigate the deficit and recovery of functional coordination of the impaired forelimbs of mice and has easily reproducible results. This test was performed with gerbils in this study.

The training sessions for the pellet-collecting task were conducted in an apparatus (26 x 34 x 16 cm) with a central window of 23 x 1 cm. Animals were trained to collect food through this central window, which was situated at a height of approximately 3 cm and positioned strategically so that the animal could collect the pellet using only the affected limb. To assess the functional recovery of the ability to collect pellets following the lesion, the number of successful attempts was counted during a period of 10 minutes. A success was defined as attempt in which the animal managed to retrieve the pellet [3,28].

- *Vibrissal Stimulation Test*

According to Barth *et al.* [5], this test is used to observe movement in the forelimb via vibrissal stimulation. Mice have an innate behaviour in which they display a reflex of placing the ipsilateral forelimb on top of the vibrissal surface in response to stimulation.

Previous studies have demonstrated that damage to the motor cortex impairs this reflex. After injury, a contralateral compensatory process begins. Due to this compensatory process, both the vibrissae and the contralateral limb of the animal must test the functional recovery of the ipsilateral limb. Performance on the vibrissal stimulation test is assessed by computing the error percentage, which is defined as the number of attempts out of 10 attempts in which the animal fail to place the forelimb on the surface in response to vibrissal stimulation.

### ***Experimental Design***

The experiment period consisted of three weeks, beginning 24 hours after the surgical procedure. The animals were trained daily on the pellet-collecting task for a total period of 10 minutes. During the task, the pellets were placed on the outer and opposite side 1

cm away from the central window from which the animal could collect food using only the affected limb.

Immediately following the pellet-collecting task, the animals were administered the vibrissal stimulation test. If the animal failed to collect any pellets during the pellet-collecting task, the animal received an amount of food corresponding to 10% of their body weight after the vibrissal stimulation test was completed. However, the animals in the motor training control group were fed freely and were subjected daily to the vibrissal stimulation test only.

### ***Pharmacological Treatment and Injection Procedure***

L-Histidine (lh), the precursor of histamine, and Pyrilamine maleate salt (P), an H<sub>1</sub> receptor antagonist (SigmaChemicalCo., St. Louis, MO), were used in this study because both drugs are capable of rapidly crossing the blood-brain barrier [25]. The drug concentrations tested were 100mg/ml and 200 mg/ml for L-Histidine [38] and 35 mg/ml and 70 mg/ml for Pyrilamine [16]; these doses were used because previous studies have established that these doses have no effect on locomotor activity.

The volume of drug and solution that was injected into each animal was equal to 1 ml/kg of the animal's body weight. The animals in the control group received an injection of saline solution in a volume equivalent to the drug. The solutions were administered intraperitoneally (IP) using a 1 ml syringe 10 minutes after each training. Both the drugs and the saline solution were kept under refrigeration until the time of use. Coded tubes were used so that the researcher was unaware of the contents during the experiment.

### ***Filming***

The experiments were recorded using a digital video camera (Sony DCR-SX45 HandyCam). Subsequently, the images were reviewed on a computer monitor (HP, 20") to record the variables. The variables were stored on a CD-ROM (Philips min/700 80 mb).

### ***Histological Analysis***

After the experimental procedures were completed, the animals were anaesthetised and decapitated. Their brains were removed and fixed in 10% formaldehyde for at least 5 days. Thereafter, each brain was sectioned to a thickness of 50 $\mu$  using a cryostat.

Agenesis of the anterior communicating artery was confirmed by means of histological analysis. No animal that was used in this study was excluded for the absence of

the cerebral vascular alteration described in the majority of the animals of this species.

### ***Experiments***

Two experiments were performed with the same experimental procedures as described above, differing only with respect to the pharmacological treatment that was administered. In experiment I, L-Histidine (lh) was administered at doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg. In experiment II, Pyrilamine (P) was administered at doses of 35 mg/kg and 70 mg/kg. Each experiment included groups of controls for the drugs (saline), the lesion (L; sham lesion, S) and the motor training (T; untrained). Each group included 10-12 animals.

### ***Statistical Analysis***

All of the variables were of an ordinal nature and non-parametric tests were used for statistical analysis. However, we chose to present the data in terms of means and standard errors of the mean ( $\pm$  SEM) because these summary statistics provide a better graphical representation of the biological effects. Test data from both experiments were analysed using the non-parametric *Kruskal-Wallis* test ( $p < 0.05$ ) and the *Student-Newman-Keuls* multiple comparison test (*SNK*) ( $p < 0.05$ ). A *Bonferroni* correction was then applied for the number of alpha values ( $n=2$ ) included in comparisons, which resulted in a significance level of  $p < 0.025$ .

## **RESULTS**

The mean and standard error of the mean ( $\pm$  SEM) of successful attempts that were recorded for groups during T1 (first training) and T21 (last training) of the pellet-collecting task are shown in Figure 1. During T1, the number of successful attempts made by animals in groups S and ST were significantly higher than the number of successful attempts made by animals in groups L and LT (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ .  $\chi^2 = 144.38$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ), which indicates that the injury impaired pellet-collecting function.

During T21, the number of successful attempts made by animals in groups ST and LT were increased significantly compared to the number of successful attempts made by animals in groups S and L, respectively (*Kruskal-Wallis* test,  $p < 0.01$ ,  $DF = 15$ ,  $\chi^2 = 144.38$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ). However, animals in groups LTlh100 and LTlh200 (experiment I) had a significant reduction in the number of successful attempts compared to the number of successful attempts made by animals in group LT (LTlh100: *Kruskal-Wallis* test,  $p < 0.01$ ,  $DF = 15$ ,  $\chi^2 = 144.38$ ; *SNK*,  $p < 0.01$  and LTlh200: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF = 15$ ,  $\chi^2 = 147.36$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ) (Figure 1). These results suggest that training improves performance of the task

in the animals independently of the lesion, but that L-Histidine at either dose impairs functional recovery when administered in combination with training.

Data (means and standard errors of the mean) from the animals that were treated with Pyrilamine in combination with motor training (Experiment II) are shown in Figure 2. During T1, the groups of animals that were lesioned (L and LT) had a significantly lower number of successful attempts made on the pellet-collecting task compared to the number of successful attempts made by animals in the sham-lesion groups (S and ST) (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ ,  $\chi^2 = 147.36$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ). These results indicate that the lesion impairs performance of this task. However, during T21, a significant increase was observed in the number of successful attempts made by animals in groups LTP35 and LTP70 compared to the number of successful attempts made by animals in group LT (LTP35: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ ,  $\chi^2 = 146.66$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ . LTP70: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ ,  $\chi^2 = 139.78$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ), which indicates that Pyrilamine in combination with motor training facilitated functional recovery at both doses.

Figure 3 shows the mean ( $\pm$  SEM) of the error percentage observed on the vibrissal stimulation test. During T1, which occurred 24 hours after the surgical procedure, the animals in groups L and LT had higher error percentages on the vibrissal stimulation test compared to the error percentages of the animals in groups S and ST (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ ,  $\chi^2 = 153.59$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ). During T21, animals in groups LTlh200 and LTlh100 had significant increases in their error percentages compared to the animals in the LT group (LTlh100: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ ,  $\chi^2 = 153.59$ ; *SNK*,  $p < 0.01$  and LTlh200: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ ,  $\chi^2 = 156.95$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ). These results demonstrate that the injury affects task performance and that L-Histidine administered in combination with motor training impairs recall memory in injured animals at both doses of L-Histidine that were studied.

The animals in groups LTP35 and LTP70 had statistically significant reductions in their error percentages on the vibrissal stimulation test compared to the error percentages of animals in the LT group during T21 (*Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ ,  $\chi^2 = 153.23$ ; *SNK*,  $p < 0.01$  and LTP70: *Kruskal-Wallis*,  $p < 0.01$ ,  $DF=15$ ,  $\chi^2 = 150.27$ ; *SNK*,  $p < 0.01$ ). These results indicate that Pyrilamine administered in combination with motor training facilitates memory recall at both doses of Pyrilamine that were studied (Figure 4).

## DISCUSSION

The results indicated that the animals in the injured groups (L and LT) had large

deficits on the behavioural tests: injured animals showed a reduction in the number of successful attempts made on the pellet-collecting task and an increase in error percentages on the vibrissal stimulation test. Previous studies have shown that gerbils with unilateral ischemic injuries have a reduction in motor skills and balance on the Rotarod test [12]. Because the pellet-collecting task and the vibrissal stimulation test are behavioural tests that measure the functional coordination and movement of the forelimb of rodents, respectively, we believe that neuronal damage resulting from ischemia in brain regions responsible for motor behaviours (e.g., hippocampus, motor cortex, striatum and cerebellum) may explain why the animals with the lesion had lower performance on the both tasks compared to the sham-lesion animals.

Several studies have shown the effects of physical activity on functional recovery following brain ischemia in rodents. However, the results are contradictory. Mice that exercised on the running wheel following ischemic injury of the sensorimotor cortex had lower performance on a battery of behavioural motor tasks (i.e., the vibrissal stimulation test, the Rotarod test and the beam traversal test) when compared to animals that were exposed to social interaction and environmental enrichment [20]. Furthermore, early training on the treadmill after a focal brain injury in mice resulted in an increase in the area of the lesion and a delay in functional recovery on the limb placement test compared to animals that were not trained on the treadmill. However, Lee and colleagues [24] showed that physical exercise on the treadmill promoted a reduction of apoptosis and an increase cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus in gerbils with global ischemia.

Moreover, there is an improvement of functional performance in rodents with unilateral ischemia of the sensorimotor cortex when these rodents are exposed to training for tasks specific to the compromised hemisphere [22]. According to Biernaskie and Corbett [6], mice with ischemia of the sensorimotor cortex that were exposed to an enriched environment and trained with specific tasks (i.e., stair climbing, the cylinder test and the pellet-collecting task) recovered function by acquiring functional performance and dendritic branching that was similar to the uninjured and untrained animals.

Similar results were found in the present study. The LT group had an improvement in the number of successful attempts on the pellet-collecting task and a reduction in error percentages during the vibrissal stimulation test after 21 days of specific motor training. Given that the motor training of complex activities can influence changes in neural circuits, these results may explained by the promotion of plastic alterations in brain structures that have been observed after cerebral ischemia [21].

Some studies claim that motor training alone is incapable of promoting full functional recovery and that the combination of treatments can accelerate and/or potentiate rehabilitation [6,15,22]. Some treatments that are suggested for possible co-administration with motor training include cortical electrostimulation and pharmacotherapy [1,2].

Several studies suggest that histamine affects neural plasticity by acting as a neural substrate in the processes of learning, memory and functional recovery [16,35]

Prast and colleagues [36] concluded that L-Histidine promotes a facilitating effect on short-term memory in mice during a social memory test and that a histamine synthesis inhibitor ( $\alpha$ -fluormethylhistidine) provokes an inhibitory effect on the process of spatial memory. Intraperitoneal administration of Pylamine resulted in losses in memory consolidation and intra-hippocampal injection of Pylamine damaged working memory in mice [32]. Mice with mutations of the genes that encode for the H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors showed a memory deficit when exposed to the Barnes maze [11]. Moreover, H<sub>1</sub> antagonists Pylamine and Chlorpheniramine impeded learning and spatial memory in mice subjected to an 8 arm radial maze [9].

In another study, however, the post-training administration of Chlorpheniramine in the fish species *Carassius auratus* had a positive, dose-dependent effect on learning and memory [30,39]. A study by Roegge and colleagues [37] demonstrated that intraperitoneal administration of Pylamine facilitates the consolidation of spatial memory in mice subjected to a 16 arm radial maze. The results of the present study demonstrated that L-Histidine at both doses tested impairs performance on both the pellet-collecting task and the vibrissal stimulation test in gerbils with unilateral cerebral ischemic injuries, while Pylamine facilitates performance in these injured animals on both tasks for both of the doses tested. These results indicate impairment and facilitation, respectively, of the evoked of the reflex and/or the motor memory.

With respect to functional recovery, Garção and colleagues [16] demonstrated that Chlorpheniramine impairs functional recovery on a spatial learning model in the fish species *Carassius auratus* following telencephalic ablation. Another study by Piratello and Mattioli [34] showed that chlorpheniramine accelerates the process of functional recovery in an experimental model of vestibular compensation in fish following hemilabyrinthectomy. In addition, Thioperamide, an H<sub>3</sub> receptor antagonist, promotes functional sensorimotor recovery and accelerates the vestibular compensation of cats [41].

In the present study, neither L-Histidine nor Pylamine at either of the doses studied had any influence on functional performance in either the animals that had the sham-

lesion or the animals that were injured but not trained. However, when the drug treatment was administered in the animals that trained on the pellet-collecting task, L-Histidine (groups LTh100 and LTh200) inhibited functional recovery and Pyrilamine (groups LTP35 and LTP70) had a positive effect on the performance of the task compared to trained animals treated with saline.

Better functional performance in locomotor activity is observed in cats with a unilateral lesion of the cortex when motor training is combined with pharmacological treatment (amphetamine) compared to injuries animals that receive only the pharmacological treatment or only the motor training [17]. Additionally, Kline and colleagues [23] demonstrated that administration of methylphenidate (a serotonergic agonist) to hemiplegic mice resulted in no improvement in functional performance on the walk test; however, a lasting improvement in functional recovery occurred when this pharmacological treatment was combined with training. Therefore, the results of this study support previous studies by showing that motor training in combination with pharmacologic treatment can lead to acceleration of the rehabilitation process. In the present study, the combination of Pyrilamine and specific motor training produced a similar effect to the effect observed from the combination of amphetamine and motor training that was previously reported [17]. Thus, we suggest that the H<sub>1</sub> antagonist Pyrilamine facilitates the acquisition and/or retention of motor training and consequently, that Pyrilamine facilitate functional recovery.

### **Acknowledgements**

This work was funded by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Process: 3000543/2010-7) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Process 2008/10349-2).

### **REFERENCES**

- [1] D.L. Adkins, T.A. Jones, D-amphetamine enhances skilled reaching after ischemic cortical lesions in rats, *Neurosci. Lett.* 380 (2005) 214–218.
- [2] D.L. Adkins-Muir, T.A. Jones, Cortical electrical stimulation combined with rehabilitative training: enhanced functional recovery and dendritic plasticity following focal cortical ischemia in rats, *Neurosci. Lett.* 25 (2003) 780–788.
- [3] R.P. Allred, T.A. Jones, Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage in female rats: forelimb behavioral effects and dendritic structural plasticity in the contralateral homotopic cortex, *Exp. Neurol.* 190 (2004) 433-445.



- [4] X. A. Alvarez, A. Franco, L. Fernandez-Novoa, R. Cacabelos, Effects of neurotoxic lesions in the posterior hypothalamic region on psychomotor activity and learning, *Agents Actions* 43 (1994) 21-23.
- [5] T.M. Barth, M.L. Grant, T. Schallert, Effects of MK-801 on recovery from sensorimotor cortex lesions, *Stroke (suppl II)* (1990) 153–157.
- [6] J. Biernaskie, D. Corbett, Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury, *J. Neurosci*, 15 (21) (2001) 5272-5280.
- [7] F. Block, Global ischemia and behavioural deficits, *Progress Neurobiol.* 58 (3) (1999) 279-295.
- [8] T.A. Burns, J.P. Huston, R.E. Spieler, Circadian variation of brain histamine in goldfish, *Brain Res.* 59 (4) (2003) 299–301.
- [9] Z. Chen, J.Q. Chen, C. Kamei, Effect of H1-antagonists on spatial memory deficit evaluated by 8-arm radial maze in rats, *Acta Pharmacol Sin.* 22 (2001) 609–613.
- [10] L.P. Cofiel, R. Mattioli, Involvement of histamine receptors in the acquisition of inhibitory avoidance in *Carassius auratus*, *Progr. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30 (7) (2006) 1246-1250.
- [11] H. Dai, T. Okuda, E. Sakurai, A. Kuramasu, M. Kato, G. Jia, A.J. Xu., K. Iinuma, I. Sato, K. Yanai, Blockage of histamine H1 receptor attenuates social isolation-induced disruption of prepulse inhibition: a study in H1 receptor gene knockout mice, *Psychopharmacology (Berl)*. 183 (2005) 285–293.
- [12] F.L.B. de Araujo, G. Bertolino,; C.A.R. Funayana, N.C. Coimbra, J. E. de Araujo, Influence of treadmill training on motor performance and organization of exploratory behavior in *Meriones Unguiculatus* with unilateral ischemic stroke: Histological correlates in hippocampal CA1 region and the neostriatum, *Neurosci. Lett.* 431 (2008) 179-183.
- [13] F.L.B. de Araujo, G. Bertolino,; R.B. Gonçalves, L.C. Marini, N.C. Coimbra, J. E. de Araujo, N, Neuropathology and behavioral impairments after three types of global ischemia surgery in *Meriones unguiculatus*: evidence in motor cortex, hippocampal CA1 region and the neostriatum. *J Neurol Sci* 312 (2012) 1-2.
- [14] F. R. Faganello, R. Mattioli, Anxiolytic-like effect of chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation, *Progr. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30 (31) (2007) 269-274.
- [15] D.M. Feeney, A.M. de Smet, S. Rai, Noradrenergic modulation of hemiplegia: Facilitation and maintenance of recovery, *Restor Neurol Neurosci.* 22 (2004) 175-190.
- [16] D.C. Garção, L. Canto-de-Souza, F. Romaguera, R. Mattioli, Chlorpheniramine impairs functional recovery in *Carassius auratus* after telencephalic ablation, *Braz J Med Biol Res*, 42 (4) (2009) 375-379.

- [17] D.A. Hovda, D.M. Feeney, Amphetamine with experience promotes recovery of locomotor function after unilateral frontal-cortex injury in the cat, *Brain Res.* 298 (1984) 358–361.
- [18] B. Janac, V. Selakovic, L. Radenovic, Z. Prolic, Time course of motor behavior changes in Mongolian gerbils submitted to different durations of cerebral ischemia, *Behav Brain Res.* 175 (2006) 362-373.
- [19] B. Janac, V. Selakovic, L. Radenovic, Temporal patterns of motor behavioural improvements by MK-801 in Mongolian gerbil submitted to different duration of global cerebral isquemia, *Behav Brain Res.* 194 (2008) 72-78.
- [20] B.B. Johansson, A.L Ohlsson, Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat, *Exp Neurol.* 139 (1996) 322–327.
- [21] T.A. Jones, Multiple synapse formation in the motor cortex opposite unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats, *J Comp Neurol.* 414 (1999) 57–66.
- [22] T.A. Jones, R.P. Allred, D.L. Adkins, J.E. Hsu, A. O'Bryant, M.A. Maldonado, Remodeling the brain with behavioral experience after stroke, *Stroke* 40 (2009) 136-138.
- [23] A.E. Kline, M. Chen, D. Tso-Oliveras D.M. Feeney, Methylphenidate treatment following ablation induced hemiplegia in rat: Experience during drug action alters effects on recovery of function, *Pharmacol Biochem Behav.* 48 (1994) 773–779.
- [24] S.H. Lee, Y. Kim, S.S. Kim, T.H. Lee, B.V. Lim, H.K. Chang, M.H. Jang, M.C. Shin, M.S. Shin, C.J. Kim, Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils, *Life Sci.* 73 (2003) 2455-2465.
- [25] R. Leurs, M.J. Smit, H. Timmerman, Molecular pharmacological aspects of histamine receptors, *Pharmacol Ther.* 66 (1995) 413-463.
- [26] P. Lipton, Ischemic cell death in brain Neurons, *Physiol Rev.* 79 (1999) 1431- 1568.
- [27] A. F. Lozada, A. A. Aarnisalo, K. Karlstedt, H. Stark, P. Panula, Plasticity of histamine H3 receptor expression and binding in the vestibular nuclei after labyrinthectomy in rat, *BMC Neurosci.* 5 (32) (2004) 1-9.
- [28] M.A. Maldonado, R.P. Allred, E.L. Felthouser, T.A. Jones, Motor skill training, but not voluntary exercise, improves skilled reaching after unilateral ischemic lesions of the sensorimotor cortex in rats, *Neurorehabil Neural Repair.* 22 (2008) 250-261.
- [29] R. Mattioli, C. A. Nelson, J. P. Huston, R.E. Spieler, Conditioned place preference analysis in the goldfish with the H1 histamine antagonist chlorpheniramine, *Brain Res Bull.* 45 (1998) 41-44.
- [30] C.C. Medalha, J.L. Coelho, R. Mattioli, Analysis of the role of histamine in inhibitory avoidance in goldfish, *Progr. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 24 (2000) 295-305.
- [31] J. I. Mobarakeh, J. W. Nalwalk, T. Watanabe, S. Sakurada, M. Hoffman, R. Leurs, H. Timmerman, I. Silos-Santiago, K. Yanai, L. B. Hough, Improprian antinociception does not require neuronal histamine or histamine receptors, *Brain Res.* 974 (2000) 146-152.

- [32] E. Nakazato, T. Yamamoto, M. Ohno, S. Watanabe, Cholinergic and glutamatergic activation reverses working memory failure by hippocampal histamine H1 receptor blockade in rats, *Life Sci.* 67 (2000) 1139-47.
- [33] K. Onodera, A. Yamatodani, T. Watanabe, H. Wada, Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Progress in Neurobiol.* 42 (1994) 685-702.
- [34] A.C. Piratello, R. Mattioli, Effects of Chlorpheniramine and L-histidine on vestibular compensation in goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Lett.* 367 (2004) 160-163.
- [35] A. C. Piratello, R. Mattioli, Thioperamide delays vestibular compensation in goldfish, *Neurosci. Lett.* 415 (2007) 146-148.
- [36] H. Prast, A. Argyriou, A. Philippu, Histaminergic neurons facilitate social memory in rats, *Brain Res.* 734 (1996) 316-318.
- [37] C.S. Roegge, C. Perraut, X. Hao, E. D. Levin, Histamine H1 receptor involvement imp repulse inhibition and memory function: Relevance for the antipsychotic actions of clozapine, *Pharmacol Biochem Behav.* 86 (2007) 686-696.
- [38] K.R. Serafim, M.S. Kishi, A. Canto-de-Sousa, R. Mattioli, L-histidine provokes state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze, *Braz J Med Biol Res.* 43 (1) (2010) 100-106.
- [39] R.E. Spieler, C.A. Nelson, J.P. Huston, R. Mattioli, Post-trial administration of H1 histamine receptor blocker improves appetitive reversal learning and memory in goldfish, *Carassius auratus*, *Neurosci Lett.* 277 (1999) 5-8.
- [40] G. Suzuki, Z. Chen, Y. Sugimoto, Y. Fujii, C. Kamei, Effects of histamine and related compounds on regional cerebral blood flow in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 21 (9) (1999) 613-617.
- [41] B. Tighilet, S. Trottier, C. Mourre, M. Lacour, Changes in the histaminergic system during vestibular compensation in the cat. *J Physiol.* 15 (573) (2006) 723-739.
- [42] T. Watanabe, Y. Taguchi, S. Shiosaka, J. Tanaka, H. Kubota, Y. Terano, M. Tohyama, H. Wada, Distribution of the the histaminergic neuron system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker, *Brain Res.* 295 (1984) 13-25.
- [43] H.T. Weiler, U. Wagner, J.P. Huston, Unilateral lesion in the tuberomammillary nucleus region: behavioral asymmetries and effects of histamine precursor, *Behav Brain Res.* 49 (1992) 167-173.
- [44] J.M. White, G.R. Rumbold, Behavioural effects of histamine and its antagonists: a review, *Psychopharmacology (Berl).* 95 (1988) 1-14.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Means ( $\pm$  SEM) of the number of successful attempts made in the pellet collecting task during the first (T1) and twenty-first (T21) training session of the sham lesion animals (S) or animals with an ischemic injury (L), untrained or trained (T), and treated with saline or L-Histidine (lh). 1A: Animals in the control group and animals treated with L-Histidine at a dose of 100 mg/kg. A (#) indicates a statistically significant difference in the number of attempts made by animals in the L and LT groups during T1 ( $p < 0.01$ ). A (\*) indicates a statistically significant difference in the number of attempts made by animals in the S group during T21 ( $p < 0.01$ ). A (+) indicates a significant difference in the number attempts compared to the number of attempts made by animals in the L groups during T21 ( $p < 0.01$ ). A (§) indicates a significant difference in the number attempts compared to the number of attempts made by animals in the LT group during T21 ( $p < 0.01$ ). 1B: Animals in the control group and animals treated with L-Histidine at a dose of 200 mg/kg. As in 1A, the (\*), (+) and (§) indicate statistically significant differences compared to animals in groups S ( $p < 0.01$ ), L ( $p < 0.01$ ) and LT ( $p < 0.01$ ), respectively, during T21.

Figure 2: Means ( $\pm$  SEM) of the number of successful attempts made in the pellet collecting task during the first (T1) and twenty-first (T21) training session of the sham lesion animals (S) or animals with an ischemic injury (L), untrained or trained (T), and treated with saline or Pyrilamine (P). 2A: Animals in the control group and animals treated with Pyrilamine at a dose of 35 mg/kg. A (\*) indicates a statistically significant difference in the number of attempts made by animals in the LT group during T21 ( $p < 0.01$ ). 2B: Animals in the control group and animals treated with Pyrilamine (P) at a dose of 70 mg/kg. As in 2A, the (\*) indicate statistically significant difference compared to animals in group LT ( $p < 0.01$ ) during T21.

Figure 3: Means ( $\pm$  SEM) of the error percentage observed on the vibrissal stimulation test during the first (T1) and twenty-first (T21) training session of the sham lesion animals (S) or animals with an ischemic injury (L), untrained or trained (T), and treated with saline or L-Histidine (lh). 3A: Animals in the control group and animals treated with L-Histidine at a dose of 100 mg/kg. A (\*) indicates a statistically significant difference in of the error percentage observed on the vibrissal stimulation in the LT group during T21 ( $p < 0.01$ ). 3B: Animals in the control group and animals treated with L-Histidine (lh) at a dose of 200 mg/kg. As in 3A, the (\*) indicate statistically significant difference compared to animals in group LT ( $p < 0.01$ ) during T21.

Figure 4: Means ( $\pm$  SEM) of the error percentage observed on the vibrissal stimulation test during the first (T1) and twenty-first (T21) training session of the sham lesion animals (S) or animals with an ischemic injury (L), untrained or trained (T), and treated with saline or Pyrilamine (P). 4A: Animals in the control group and animals treated with Pyrilamine at a dose of 35 mg/kg. A (\*) indicates a statistically significant difference in of the error percentage observed on the vibrissal stimulation in the LT group during T21 ( $p < 0.01$ ). 4B: Animals in the control group and animals treated with Pyrilamine at a dose of 70 mg/kg. As in 4A, the (\*) indicate statistically significant difference compared to animals in groups LT ( $p < 0.01$ ) during T21.