



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS

EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA VERMIS CEREBELAR DE TIOPERAMIDA
NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL DE CAMUNDONGOS

Jorge Costa Neto

São Carlos
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS

EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA VERMIS CEREBELAR DE TIOPERAMIDA
NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL DE CAMUNDONGOS

Jorge Costa Neto

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Fisioterapia da
Universidade Federal de São Carlos, como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Fisioterapia.

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

São Carlos
2013

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

C837em Costa Neto, Jorge.
Efeitos da microinjeção intra vermis cerebelar de tioperamida na consolidação da memória emocional de camundongos / Jorge Costa Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
54 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisioterapia. 2. Memória emocional. 3. Histamina. 4. Tioperamida. 5. Labirinto em cruz elevado. 6. Esquiva inibitória. I. Título.

CDD: 615.82 (20^a)

FOLHA DE APROVAÇÃO

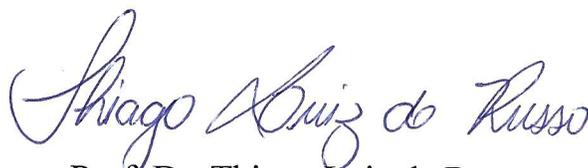
Membros da Banca Examinadora para Defesa de Dissertação de Mestrado de JORGE COSTA NETO, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 12 de agosto de 2013.

Banca Examinadora



Profa. Dra. Rosana Mattioli

(UFSCar)



Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo

(UFSCar)



Profa. Dra. Carla Christina Medalha

(UNIFESP)

À minha família, minha bússola, meu Norte, onde sempre posso ancorar e buscar suporte, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Em especial, meu agradecimento à minha orientadora Rosana Mattioli por ter me aceitado como seu aluno, pela sua dedicação, amizade e paciência. Obrigado por acompanhar meu progresso de perto.

Aos Professores, Thiago Luiz de Russo e Carla Medalha, por participarem da minha banca de mestrado, pela atenção dispensada e pela contribuição a este trabalho.

Ao Professor Ricardo Luiz Nunes de Souza pelas sugestões e contribuições como membro da banca de qualificação.

Aos meus pais, João Bosco e Isabel, pelo amor, carinho, dedicação e sacrifícios em prol da minha educação e formação pessoal.

Aos meus irmãos, Jeniffer e Jefferson, pelo carinho, companheirismo e exemplos de vida.

Ao querido primo Douglas, motivo de inspiração ao estudo da neurociência. Você cativa e enche amor todos a sua volta.

Ao Galvão, Idalina, Renata e em especial ao Fernando, pela belíssima amizade construída, pela atenção e compreensão nestes últimos anos.

Aos amigos do laboratório de Neurociências, Kelly, Diogo, Carol, Lucas, Fernanda e Carlos Eduardo, por partilharem o conhecimento, pela amizade, e companheirismo.

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

Aos amigos de São Carlos que estão presentes no meu dia-a-dia, aos da Fisio07 e aos de Jundiaí, que mesmo distantes se fazem próximos e presentes.

Aos secretários da PPG-FT, Claudio e Heloisa, sempre estão dispostos a ajudar.

Aos auxílios fornecidos pela CAPES.

RESUMO

Trabalhos experimentais apontam que o cerebelo não atua somente no controle motor, mas realiza tarefas mais complexas, como a consolidação da memória emocional. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da atuação da Tioperamida (TIO), antagonista do receptor histaminérgico H₃, na consolidação da memória emocional de camundongos via vermis cerebelar. Para isso foi realizado dois experimentos. O experimento 1 utilizou o labirinto em cruz elevado (LCE) como aparato de teste, e o experimento 2 a esQUIVA inibitória (EI). Em ambos os experimentos foram utilizados 4 grupos experimentais de camundongos machos, da cepa Suíço Albino, pesando entre 25-35 g. Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico que consistiu na implantação da cânula guia no vermis cerebelar. Em cada experimento havia um grupo controle, que foi tratado com salina (SAL), e três grupos que receberam tratamento farmacológico de diferentes concentrações de TIO: 0,06, 0,3 e 1,5 ng/0,1µl. Os testes foram realizados em dois dias consecutivos (exposição e reexposição), sendo que o tratamento farmacológico ocorreu imediatamente após a exposição. Os dados foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Duncan ($p < 0,01$). Foi constatado que, em ambos os experimentos, os dados dos grupos da exposição anteriores ao tratamento farmacológico não apresentaram diferença estatística e foram agrupados em pool. No experimento 1 a diminuição da exploração dos braços abertos na reexposição foi considerada indicativo de aprendizado e memória. Os dados do experimento 1 apontaram déficit da consolidação da memória emocional para o grupo de menor dose de TIO (0,06 ng/0,1µl), pois os dados deste grupo não apresentaram diferença estatística em relação ao pool, para as variáveis porcentagem de entrada em braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA). Os demais grupos (0,3 e 1,5 ng/0,1µl) apresentaram redução da atividade exploratória. Houve também diferença estatística entre os grupos da reexposição, sendo o menor grupo de TIO estatisticamente diferente do SAL e os dois grupos de maiores doses utilizados neste estudo, não apresentaram esta diferença. Nenhuma das doses de TIO utilizadas interferiram na atividade locomotora dos animais, pois não houve diferença na variável EBF. No experimento 2 foi indicativo de aprendizagem e memória o aumento da latência na reexposição. O aumento da latência foi observado nos grupos SAL, 0,06 e 0,3 ng/0,1µl em comparação com o pool, e não houve diferença para o grupo 1,5 ng/0,1µl. Entre os dados dos grupos da reexposição, houve diferença dos grupos TIO 0,3 e 1,5 ng/0,1µl em comparação ao controle, e não foi observada esta diferença em relação ao grupo TIO 0,06. Os resultados do experimento 2 indicam facilitação da consolidação da memória emocional para o grupo de dose intermediária de TIO (0,3 ng/0,1µl) e prejuízo para a maior dose de TIO (1,5 ng/0,1µl).

Palavras-chave: Memória Emocional, Sistema Histaminérgico, Receptor Histaminérgico H₃, Tioperamida, Labirinto em Cruz Elevado, EsQUIVA Inibitória.

ABSTRACT

Experimental studies indicate that the cerebellum works not only in motor control but performs more complex tasks, such as the consolidation of emotional memory. The purpose of this study was to evaluate the effects of actions of thioperamide (THIO), histaminergic H3 receptor antagonist, in the consolidation of emotional memory in mice through the cerebellar vermis. To this was done two experiments. Experiment 1 used the elevated plus maze (EPM) as the test apparatus, and the experiment 2 used the Inhibitory Avoidance Test (IAT). In both experiments were utilized four experimental groups of male mice of Swiss Albino strain, weighing between 25-35g. All animals were submitted to surgical procedure that consisted in the implementation of the guide cannula in the cerebellar vermis. In each experiment there was one control group that was treated with saline (SAL), and three groups that received pharmacological treatment of THIO different concentrations: 0.06, 0.3 and 1.5 ng/0.1µl. The tests were done on two consecutive days (exposure and reexposure), and drug treatment occurred immediately after exposure. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) of a track followed by the Duncan test ($P < 0.01$). It was concluded that, in both experiments, the data of previous exposure groups pharmacological treatment did not differ significantly and were grouped in *pool*. In experiment 1 the reduction of exploration of the open arms on reexposure was considered indicative of learning and memory. The data of experiment 1 pointed out a deficit of emotional memory consolidation for the group with lower dose of THIO (0.06ng /0.1µl), because the data of this group showed no statistical difference in relation to the pool for the variables %OAE and %TAE. The other groups (0.3 and 1.5 ng/0.1 µl), had a reduction in exploratory activity. There was also a statistical difference between the groups of reexposure, being the smallest group of THIO, statistically different from SAL and the two groups of larger doses used in this study did not show this difference. None of the doses used THIO intervened in locomotor activity of the animals, because there was no difference in the variable EAE. In experiment 2 was indicative of learning and memory latency increase on reexposure. The latency increase was observed in groups SAL, 0.06 and 0.3ng/0,1 µl compared with the pool. There was no difference for the group 1.5 ng/0.1 µl. Among the group data of reexposure, there was a difference of 0.3 THIO groups and 1.5 ng/0.1 µl compared to the control, and this difference was not observed in group THIO 0.06.

Keywords: Emotional Memory; Histaminergic System; Cerebellum; H3 Histaminergic Receptor, Elevated Plus Maze, Inhibitory Avoidance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Distribuição do sistema histaminérgico; localização e concentração dos receptores histaminérgicos..... 18
- Figura 2:** Vista frontal do Labirinto em Cruz Elevado isolado da sala de tese por meio de uma cortina preta opaca..... 25
- Figura 3:** Vista frontal da Caixa de Esquiva Inibitória..... 27
- Figura 4:** Procedimento experimental da Caixa de Esquiva inibitória..... 29
- Figura 5:** Sítios de micro injeção no vermis cerebelar de camundongos de avordo com o Atlas Paxinos e Franklin..... 34
- Figura 6:** Efeitos da microinjeção no vermis cerebelar do antagonista do receptor H3 tioperamida, nas doses de 0,06 ng/0,1µl, 0,3 ng/0,1µl e 1,5 ng/0,1µl, sobre a consolidação da memória emocional do Labirinto em Cruz Elevado. Os dados são apresentados com as médias e erro padrão da média para a porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) e frequência de entrada nos braços fechados (EBF). N=10. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ comparação exposição/reexposição. # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$ comparação na exposição entre os grupos tratados e salina (ANOVA seguida de teste de *post hoc* de Duncan)..... 35
- Figura 7:** Efeitos da microinjeção no vermis cerebelar do antagonista do receptor H3 tioperamida, nas doses de 0,06 ng/0,1µl, 0,3 ng/0,1µl e 1,5 ng/0,1µl, sobre a consolidação da memória emocional na esquiva inibitória. Os dados são apresentados com as médias e erro padrão da média para o tempo de latência (segundos). N=10. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ comparação exposição/reexposição. # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$ comparação na exposição entre os grupos tratados e salina (ANOVA seguida de teste de *post hoc* de Duncan)..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais do Labirinto em Cruz Elevado..... 30

Tabela 2: Grupos experimentais da Caixa de Esquiva Inibitória..... 30

LISTA DE ABREVIATURA

- %EBA:** porcentagem de entradas nos braços abertos
- %TBA:** porcentagem de tempo gasto nos braços abertos
- %TBF:** porcentagem de tempo gasto nos braços fechados
- %TC:** braços abertos
- BA:** braços fechados
- BF :** porcentagem de tempo gasto na plataforma central
- cAMP:** adenosilil monofosfato cíclico, do inglês cyclic adenosylyl monophosphate
- EBA:** frequência de entradas nos braços abertos
- EBF:** frequência de entradas nos braços fechados
- EI:** esquiiva inibitória
- GABA:** ácido gama-aminobutírico
- i.c.:** intracraniana
- i.c.v.:** intracerebroventricular
- i.p.:** intraperitoneal
- LCE:** labirinto em cruz elevado
- PC:** plataforma central
- PE-10:** tubo de polietileno
- SAL:** salina
- SNC:** sistema nervoso central
- TBA:** tempo gasto nos braços abertos
- TBF:** tempo gasto nos braços fechados
- TC:** tempo gasto na plataforma central
- TIO:** tioperamida

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 MÉTODOS	22
2.1 Sujeitos.....	23
2.2 Implantação da cânula guia.....	23
2.3 Drogas e procedimentos de microinjeção.....	23
2.4 Equipamentos e procedimentos experimentais.....	25
2.4.1 <i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	25
2.4.2 <i>Análise comportamental - Labirinto em Cruz Elevado</i>	25
2.4.3 <i>Procedimento Experimental - Labirinto em Cruz Elevado</i>	26
2.4.4 <i>Esquiva Inibitória</i>	27
2.4.5 <i>Análise comportamental - Esquiva Inibitória</i>	28
2.4.6 <i>Procedimento experimental - Esquiva Inibitória</i>	28
2.5 Grupos experimentais.....	29
2.6 Histologia.....	30
2.7 Análise estatística.....	31
2.8 Ética.....	31
3.0 RESULTADOS	33
3.1 Resultados experimento 1: Labirinto em Cruz Elevado.....	33
3.2 Resultados experimento 2: Esquiva Inibitória.....	37
4.0 DISCUSSÃO	40
5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
6.0 APÊNDICES	56

1.0 INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

O cerebelo, é uma estrutura do sistema nervoso supra-segmentar que deriva da parte dorsal do metaencéfalo e fica situado dorsalmente ao bulbo e à ponte, contribuindo para a formação do tecto do IV ventrículo. Anatomicamente, distingue-se no cerebelo, uma porção ímpar e mediana, o vermis cerebelar, ligado a duas grandes massas laterais, os hemisférios cerebelares. O vermis é pouco separado dos hemisférios na face superior do cerebelo, o que não ocorre na face inferior, onde dois sulcos são bem evidentes o separam das partes laterais (GRAY; MAYO, 1988).

Um traçado histórico com foco na linha de investigação sobre o cerebelo nos indica que a neurociência cognitiva desta estrutura é um campo multidisciplinar. Franz Joseph Gall (1758-1828) tinha sugerido que o cerebelo é a sede do "amor físico-sexual". Luigi Rolando (1773-1831) sugeriu que o cerebelo é fundamental para a geração do movimento (ROLANDO 1810, em CLARKE; O'MALLEY, 1996) e Marie Jean Pierre Flourens (1794-1867) estudou o comportamento de pombos submetidos à cerebeloctomia e propôs (SCHMAHMANN, 2010) que o cerebelo é fundamental para a coordenação do movimento. Em relação à performance motora, o cerebelo está relacionado com o controle da motricidade, participando da harmonia de combinações de múltiplos movimentos em sequência (THACH, 1998). Sua estrutura anatômica é altamente organizada e recebe estímulo referente à posição da cabeça, do tronco, dos membros e do movimento que está sendo realizado, assim como recebe estímulo do córtex cerebral em relação ao comando motor. Portanto, suas conexões permitem que essa estrutura compare o movimento contínuo com o comando motor. Desta forma, o cerebelo atua como um comparador, ajustando a saída do comando motor com base na entrada sensorial (UMPHRED, 2004).

As observações relevantes a respeito do cerebelo não se limitam apenas às pesquisas em neurologia, mas se estendem para a psiquiatria. A tentativa em aproximar o cerebelo de funções cognitivas não é recente. Observações clínicas datadas de 1800 relatam disfunção intelectual, distúrbios psiquiátricos e sócio-emocionais em pacientes com agenesia ou degeneração cerebelar. Na década de 1960, James W. Prescott desenvolveu uma hipótese que considerava entrada somatossensorial, particularmente a estimulação do movimento, um fator importante no desenvolvimento do comportamento emocional, sugerindo que a privação somatossensorial poderia resultar em supersensibilidade e hiperativação do cerebelo. Ele considerava o cerebelo como um sistema regulador mestre para os processos sensoriais, emocionais e motores, e propôs que os comportamentos emocionais de autistas e hiperativos poderiam ser explicados por meio da disfunção do sistema regulatório do cerebelo (SCHMAHMANN, 1991).

Estudos datados da década de 70, que utilizam-se de relatos de casos, correlação entre alterações psicóticas com estudos anatômicos do cerebelo e estimulação cerebelar em pacientes com psicose e agressão (HARPER; HEATH, 1973; HEATH; HARPER, 1974; HEATH, 1977; HEATH; LLEWELLYN; ROUCHELL, 1980), sugerem que o cerebelo, principalmente o vermis, é um fabricante de ritmo emocional (HEATH, 1977). Ainda na década de 70, Cooper e colaboradores (1974) utilizaram um estimulador com eletrodos colocados sobre a superfície do cerebelo em pacientes com paralisia cerebral para o tratamento da espasticidade e epilepsia, e demonstraram não apenas melhorias no controle das crises epiléticas, mas também no comportamento destes pacientes, incluindo estado de alerta, depressão, raiva e agressividade (SCHMAHMANN, 1991).

Dentre as estruturas cerebelares, o vermis parece estar relacionado com as funções cognitivas. Snider e Maite (1976) demonstraram interações fisiológicas entre o vermis cerebelar e estruturas límbicas no tronco cerebral e no circuito de Papez, e sugeriram que o

cerebelo, principalmente o vermis cerebelar, está envolvido em funções emocionais. Um estudo com ressonância magnética demonstra alteração na morfologia do vermis cerebelar de pacientes com disfunção comportamental, como em pacientes com autismo (COURCHESNE *et al.*, 1988).

Estudos anatômicos demonstraram ligações do vermis cerebelar com a amígdala, o septo e o lócus cerúleus. Essas regiões são conhecidas por modular emoções, bem como influenciar comportamentos afetivos e processos de aprendizagem e memória. Além disso, foram demonstradas alterações sinápticas relacionadas com as tarefas de aprendizagem, que sugerindo que o cerebelo não está apenas ligado a estas áreas responsáveis pela aprendizagem e memória, mas também participa ativamente destes processos (HEATH; HARPER, 1974).

O passo inicial para a formação de uma nova memória é a aquisição de informações. Estas informações podem estar vinculadas a estímulos externos, através da entrada sensorial decorrente da interação entre o sujeito e o ambiente, ou a partir de representações internas com uso da cognição e emoção (MILNER; SQUIRE; KANDEL, 1998). Após a informação ser adquirida, esta precisa ser armazenada em curto ou longo período de tempo. Enquanto a informação permanece armazenada, ela pode ser acessada por um processo conhecido como evocação (CAMMAROTA *et al.*, 2005). Memória, então, compreende os processos responsáveis pela aquisição, armazenamento e evocação da experiência aprendida. A retenção da memória a curto prazo (definida em minutos ou horas) pode ser convertida para retenção a longo prazo (definida em dias, semanas ou meses) por uma sequência específica de acontecimentos chamada de consolidação, que se inicia imediatamente após a fase de aquisição. Com o passar do tempo, até mesmo as memórias mais consolidadas podem desaparecer, um processo chamado de extinção.

A memória pode ser classificada em memória declarativa e não declarativa (SCHACTER 1987; MILNER; SQUIRE; KANDEL, 1998). A memória declarativa está

relacionada a lembranças conscientes sobre fatos e acontecimentos. Este é o tipo de memória que normalmente se faz referência quando os termos "memória" ou "lembrança" são utilizados na linguagem comum. Em geral, é a memória declarativa que fica prejudicada em pacientes com amnésia, e parece estar envolvida no armazenamento de uma “representação” do mundo externo, e como “representação” pode ser verdadeira ou falsa (SCHACTER, 1987). Por outro lado, a memória não declarativa está representada em uma coleção heterogênea de habilidades inconscientes. Ela está envolvida na base das mudanças do comportamento hábil, ou seja, sua expressão ocorre por meio do comportamento e não por recordações. Abrange a capacidade de responder adequadamente a estímulos através da prática, como resultado do condicionamento ou aprendizado por hábito (ZOLA; MORGAN, 1993). Ela também inclui mudanças na capacidade de detectar ou identificar objetos, fenômeno conhecido como *priming*. No caso da memória não declarativa, as mudanças no comportamento são resultantes da experiência prévia, porém sem fornecer acesso consciente a episódios anteriores (KNOWLTON; SQUIRE, 1993). Muitas são as formas de memórias não declarativas, como habituação, sensibilização e condicionamento clássico.

Vários neurotransmissores têm sido relacionados a aprendizagem e memória, entre eles, a histamina. A histamina é uma amina biogênica que desempenha papel fundamental nos tecidos periféricos e centrais. No sistema nervoso central (SNC), ela atua como neurotransmissor aminérgico, desempenhando papel importante na regulação de diversos processos fisiológicos e patológicos (PRELL; GREEN, 1986). A histamina é impermeável à barreira hematoencefálica, sendo sintetizada nos corpos dos neurônios histaminérgicos que se encontram agrupados no núcleo túbero mamilar no hipotálamo posterior. A síntese da histamina central ocorre a partir do seu precursor, o aminoácido essencial L-histidina (capaz de atravessar a barreira hematoencefálica), em duas etapas: absorção neuronal da L-histidina pelo L-aminoácido transportador, presente na membrana celular, e uma vez no citoplasma, é

descarboxilada pela ação específica da enzima histidina-descarboxilase (WADA *et al.*, 1991). Uma vez sintetizada, a histamina é armazenada em vesículas por meio do transportador de monoamina vesicular (VMAT-2). Com a chegada do potencial de ação, a vesícula se funde com a membrana pré-sináptica e ocorre a liberação da histamina na terminação axônica na fenda sináptica. No espaço extracelular, a degradação da histamina é realizada pela enzima N-metiltransferase, localizada nas regiões pós-sinápticas e na glia, através do processo de metilação. Da metilação da histamina resulta a tele-metil-histamina, um metabólico sem atividade neuronal. Não é conhecido nenhum sistema de recaptção para a histamina, sendo a metilação o principal mecanismo de inativação deste neurotransmissor. Em situações normais, a velocidade de renovação da histamina é alta, uma vez que a meia vida é de aproximadamente 30 minutos. Porém, em situações de estresse, como choque aplicado nas patas e imobilização, a velocidade de síntese da histamina central pode aumentar (ERICSON; KÖHLER; BLOMQUIST, 1991).

A histamina central interage através de quatro subtipos de receptores: H1, H2, H3 e H4 (HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). Estes receptores se diferenciam quanto à concentração, localização e propriedades das respostas intracelulares mediadas, figura 1. O receptor H4 é o mais recente descoberto (NGUYEN, *et al.*, 2001; LEURS, *et al.*, 2009) e teve sua presença verificada no SNC de ratos e humanos em áreas como amígdala, hipocampo, núcleo caudado, substância negra, tálamo, hipotálamo e cerebelo (STRAKHOVA, *et al.*, 2009). O receptor histaminérgico H1 está presente no hipocampo, córtex, amígdala, núcleos do hipotálamo, tálamo, núcleos septais e cerebelo. O receptor H2 está localizado no hipocampo, córtex, amígdala, corpo estriado e gânglios basais (STRAKHOVA *et al.*, 2009).

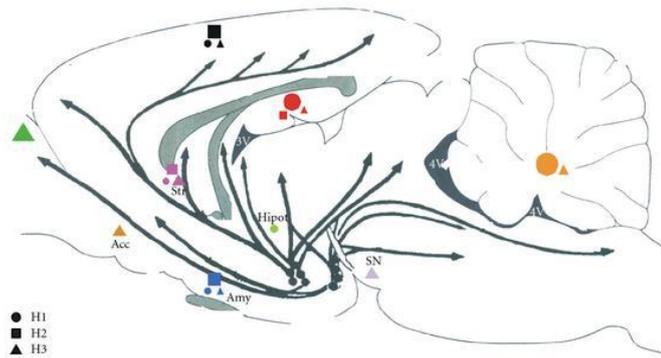


Figura 1: Distribuição do sistema histaminérgico; localização e concentração dos receptores histaminérgicos (KOHLER *et al.*, 2011).

O receptor H3 exibe algumas peculiaridades em relação aos demais receptores descritos acima. Diferentemente dos outros, ele é um receptor pré-sináptico, caracterizado como auto-receptor: sua ativação controla a liberação (ARRANG; GARBARO; SCHWARTZ, 1983) e a síntese (ARRANG; GARBARO; SCHWARTZ, 1987) da histamina central. O receptor H3 realiza um papel inibitório no sistema histaminérgico, uma vez que sua ativação gera a diminuição da síntese e liberação da histamina, via *feedback* negativo, e sua desativação produz efeito contrário. Mais especificamente, a estimulação do receptor H3 diminui a síntese e a liberação da histamina, via inibição da adenilato ciclase, que catalisa a formação do segundo mensageiro cAMP (monofosfato cíclico de adenosina), que por sua vez inibe a histidina descarboxilase de catalisar a formação da histamina.

Além de atuar como auto-receptor, o receptor H3 também atua como hetero-receptor, controlando a liberação de outros neurotransmissores, como a dopamina, noradrenalina, noroepinefrina, acetilcolina, serotonina, glutamato, GABA (ácido gama-aminobutírico) (HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008).

A histamina central, seus neurônios e conexões, bem como seus quatro tipos de receptores compõem o sistema neural histaminérgico (SNH). O núcleo tuberomamilar é a

principal forma de inervação histaminérgica do encéfalo e deste núcleo partem projeções axonais que inervam praticamente todo o encéfalo. (HASS; PANULA, 2003; WADA *et al.*, 1991, HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). O SNH é um dos principais sistemas de modulação do SNC e suas ações influenciam funções como ciclo circadiano (MONTI, 1993; BURNS; HUSTON; SPIELER, 2003), ansiedade (IMAIZUME; ONODERA, 1993; GHI *et al.*, 1995; FAGANELLO; MATTIOLI, 2007), alterações comportamentais (ONODERA *et al.*, 1994), processos de recuperação funcional (PIRATELLO; MATTIOLI, 2004), percepção da dor (MOBARAKEH *et al.*, 2000) e processos de aprendizagem e memória (BROWN; STEVENS; HAAS, 2001; HASS; SERGEEVA; SELBACH, 2008; MEDALHA *et al.*, 2000; DE ALMEIDA; IZQUIERDO, 1986).

O efeito da alteração do sistema histaminérgico na formação de memórias tem sido analisado em vários paradigmas comportamentais. Alguns autores já demonstraram a influência do sistema histaminérgico na modulação da aprendizagem e memória através de lesões do núcleo tuberomamilar (KLAPDOR; HASENOHRL; HUSTON, 1994; ONODERA *et al.*, 1994). Outros estudos, com experimentação animal, apontam facilitação ou inibição da memória emocional através da administração de substâncias histaminérgicas. De acordo com Kamei Tasaka (1993), a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de histamina facilitou a formação de memória para a tarefa de esquiva. Resultados opostos foram encontrados por Alvarez e Banzan (2008), que sugeriram que a microinjeção de histamina diretamente no hipocampo, em ratos submetidos à tarefa de esquiva, prejudicou a consolidação da memória em ratos.

O labirinto em cruz elevado (LCE), validado para ratos (PELLOW *et al.*, 1985) e para camundongos (LISTER, 1987) é um dos modelos animais mais amplamente utilizados para avaliação da ansiedade. Ele é baseado na aversão natural que os roedores apresentam aos espaços abertos em relação aos braços fechados, de modo que, os espaços abertos poderiam

representar áreas de risco potencial, enquanto os braços fechados áreas protegidas. A preferência do comportamento exploratório dos animais nos braços fechados é resultante da avaliação de risco e representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo. Estudos utilizando roedores tratados com fármacos ansiolíticos apontaram aumento da exploração dos braços abertos, enquanto estudos com fármacos ansiogênicos apontam resultados contrários (STHEPENS *et al.*, 1986; LISTER, 1987; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005)

Além de sua ampla utilização na avaliação das questões relacionadas à ansiedade, O LCE tem sido utilizado para o entendimento das bases biológicas das emoções relacionadas com a aprendizagem e memória, ao se inserir mais um dia de teste. Alguns estudos demonstraram que uma única experiência ao aparelho reduz significativamente a exploração nos braços abertos na reexposição ao aparelho (FILE; ZANGROSSI, 1993; GRIEBEL *et al.*, 1997; GONZALES; FILE, 1997; RODGERS *et al.*, 1997).

Outro modelo usado na investigação dos processos que envolvem aprendizado e memória é a esquiava inibitória (EI). Na tarefa de EI, o animal primeiramente é exposto a um estímulo condicional, a caixa de esquiava, e exibirá uma resposta, que também é condicionável. Após cruzar para o compartimento escuro, aprende a associar o lado escuro da caixa (resposta exploratória) a um leve choque aplicado nas pastas (estímulo incondicionado). Com isso, em uma próxima exposição a caixa de esquiava, o animal evitará expressar sua resposta inata. Esse tipo de condicionamento é bastante utilizado na pesquisa comportamental e seu aprendizado envolve percepção espacial e visual, sensibilidade à dor e a um componente emocional. Alguns estudos utilizam esse modelo para avaliar o papel do SNH na memória emocional, como é o caso de Zarrindast e colaboradores (2006), que apontaram prejuízo da recuperação da memória em camundongos, com administração i.c.v. de histamina, utilizando o modelo de EI.

Um modo interessante de alterar a concentração de histamina central é mediante a ativação ou bloqueio o receptor H3. Atualmente, vários grupos de pesquisadores estudam substâncias antagonistas do receptor H3 com o objetivo de melhor elucidar sua íntima relação com processos cognitivos. Existem estudos pré-clínicos e clínicos sobre o uso potencial destes fármacos para o tratamento de disfunções cognitivas, tais como, a Doença de Alzheimer, déficit de atenção, hiperatividade e déficit cognitivo na esquizofrenia (BRIONI *et al.*, 2011). Em relação à Doença de Alzheimer, evidências indicam redução na concentração de histamina nos neurônios (PANULA *et al.*, 1998), que pode contribuir para o declínio cognitivo.

Quanto ao papel do receptor H3 em processos cognitivos, há evidências que indicam sua ação na aprendizagem e memória, e sua presença no cerebelo (STRAKHOVA *et al.*, 2009; GIANLORENÇO *et al.*, 2011b). Apesar de classicamente o cerebelo estar relacionado à desempenho motor, há importantes evidências de sua relação com funções cognitivas (GORDON, 2007), principalmente no vermis cerebelar. Em seus estudos, Sacchetti e colaboradores (2002) realizaram um breve bloqueio químico do vermis cerebelar de roedores após a aquisição do medo associativo e sugeriram a relação desta região cerebelar na formação da memória emocional. Além disso, o vermis cerebelar está sob influência das projeções histaminérgicas, e nele foram encontrados os receptores H3. Todavia, pouco se sabe sobre o papel deste receptor em processos associados à memória e aprendizagem. Diante disto, o presente estudo tem por objetivo investigar o efeito da TIO, antagonista do receptor histaminérgico H3, microinjetada no vermis cerebelar, sobre a consolidação da memória emocional de camundongos reexpostos ao LCE e a EI.

2.0 MATERIAL E MÉTODO

2.0 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Sujeitos

Foram utilizados 95 camundongos machos da cepa Suíço-Albino, pesando entre 25 e 35g no momento dos testes, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram agrupados em número de quatro por caixa (31×20×13 cm) e mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 5\%$) e iluminação (100 lux), com ciclo claro-escuro programados de 12/12horas (sendo início da fase clara às 7:00). Os animais tiveram livre acesso à água e alimento, exceto durante as breves sessões de teste. Todos os camundongos eram experimentalmente ingênuos e as sessões experimentais ocorreram durante a fase clara, entre 8 e 15 horas.

2.2 Implantação da cânula guia

Os animais foram anestesiados, via intraperitoneal (i.p.), com cloridrato de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e posicionados em um equipamento estereotáxico para implantação da cânula guia (25 gauge) de 7 mm de comprimento no vermis cerebelar. As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram, em relação ao bregma, segundo o Atlas de Paxinos e Franklin (2001): -6,5 mm posterior, 0,0 mm lateral e -2,0 mm ventral. A cânula guia foi fixada ao crânio com um parafuso e cimento acrílico dental (JET resina líquida polimerizante). Um mandril (calibre 33 de fio de aço inoxidável) foi inserido dentro da cânula guia para mantê-la desobstruída, sendo removido antes do procedimento de microinjeção. Durante os três dias de período pós-cirúrgico, os animais foram tratados com paracetamol adicionado aos frascos de água potável numa proporção de 0,2 ml a 250 ml de água

(concentração final de 0,16 mg/ml) (MESSIER; EMOND; ETHIER, 1999; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2008).

2.3 Droga e procedimento e microinjeção

A droga utilizada neste estudo foi o maleato de tioperamida (TIO), sal de maleato (SIGMA, MO, USA), antagonista do receptor de histamina H₃. A droga foi dissolvida em solução salina em três concentrações diferentes: 0,06, 0,3, e 1,5 nmol/0,1µl. As diferentes concentrações de doses foram calculadas a partir dos estudos de Orsetti, Piera e Carlo (2001), com as adaptações necessárias para estrutura alvo de infusão e o tipo de animal utilizado. Para o grupo controle foi utilizada salina. As três doses de TIO, bem como a salina, foram identificadas por sistemas de códigos seguindo-se o protocolo de um estudo cego. Cada grupo experimental recebeu uma das quatro soluções.

As soluções foram infundidas no vermis cerebelar por meio de uma agulha de microinjeção (33-gauge) que se estendia 1,0 mm além da extremidade da cânula guia. A agulha era ligada a uma microseringa Hamilton (5,0 ul) por meio de um tubo de polietileno (PE-10) e a administração das soluções foi controlada por uma bomba de infusão (Insight BI 2000—Equipamentos Científicos Ltda, Brasil), programada para administrar o volume de 0,1µl de solução durante 60 s. O procedimento de microinjeção consistiu em remoção do mandril, inserção da agulha de injeção dentro da cânula guia e a infusão das soluções no vermis cerebelar. Durante este procedimento, os animais foram manualmente contidos e após a infusão ser concluída, a agulha de injeção permanecia por mais 60 s a fim de evitar o refluxo. A confirmação do êxito da microinfusão foi obtida por meio da monitorização do movimento de uma pequena bolha de ar no interior do tubo de PE-10.

2.4. Equipamentos e Procedimentos Experimentais

2.4.1 Labirintos em Cruz Elevado

O LCE é composto por dois braços abertos (BA) (30x5x0,25 cm) e dois braços fechados (BF) (30x5x15cm) ligados a uma plataforma central (PC) comum (5x5cm). O aparato é feito de acrílico e elevado a uma altura de 38,5 cm acima do nível do solo. Todos os testes foram realizados sob iluminação de 77 lux, conforme medido sobre a plataforma central do LCE. O aparato se isolava do restante da sala por uma cortina preta opaca.

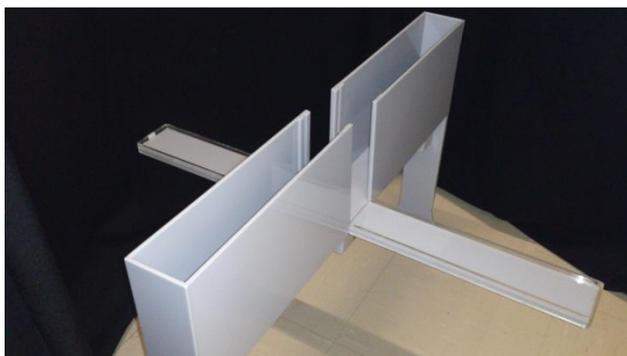


Figura 2: Labirinto em Cruz Elevado isolado da sala de teste por meio de uma cortina preta opaca.

2.4.2 Análise comportamental – Labirinto em Cruz Elevado

Todas as sessões de teste foram gravadas em vídeo por meio de uma câmera digital posicionada a 90° do labirinto, ligada a um computador em uma sala adjacente. As imagens foram analisadas por um observador treinado, utilizando o programa XPLO-RAT

(BECERRA-GARCIA *et al.*, 2005): um pacote de software de análise etológica, desenvolvido no Laboratório de Comportamento Exploratório USP/Ribeirão Preto- Brasil. Os parâmetros comportamentais analisados neste estudo foram baseados em Lister (1987), sendo: frequência de entradas nos braços abertos (EBA), frequência de entradas nos braços fechados (EBF) - foi considerada uma entrada quando o animal pisava com as quatro patas em um dos braços do labirinto - tempo gasto nos braços abertos (TBA), tempo gasto nos braços fechados (TBF), tempo gasto na plataforma central (TC). Estes dados foram utilizados para calcular o total de entradas ($TE=EBA+EBF$), porcentagem de entradas nos braços abertos ($\%EBA=(EBA/TE)\times 100$), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($\%TBA=(TBA/300)\times 100$), porcentagem de tempo gasto nos braços fechados ($\%TBF=(EBF/300)\times 100$), porcentagem de tempo gasto na plataforma central ($\%TC$).

2.4.3. Procedimento Experimental – Labirinto em Cruz Elevado

Três dias após a cirurgia, iniciaram-se os testes comportamentais realizados em dois dias consecutivos: exposição no primeiro dia e reexposição após 24 horas. Os animais foram transportados para a sala adjacente à sala de teste e mantidos em repouso, durante pelo menos uma hora, a fim de facilitar a adaptação ao ambiente. Transcorrido este tempo, cada animal foi cuidadosamente colocado sobre a plataforma central do LCE, com a face voltada para um dos braços abertos. Cada animal teve cinco minutos para explorar o aparato. Imediatamente após a exposição, os animais receberam a microinjeção da solução correspondente ao seu grupo experimental. Após 24 horas, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental, porém, sem a microinjeção (reexposição). No intervalo entre as sessões de teste o labirinto foi cuidadosamente limpo com etanol 5% e um pano seco.

2.4.4. Esquiva Inibitória

O aparato utilizado para a EI (figura 3) consiste em uma caixa de acrílico (46,0x27,0x30,0 cm) dividida em dois compartimentos. Os compartimentos são de igual tamanho (25,0x27,0x30,0 cm), sendo um escuro, dotado de tampa preta, paredes pretas e com iluminação de apenas 1 lux. O outro compartimento é claro, iluminado com lâmpadas led, sem tampa e com iluminação de 450 lux. No centro da divisória que isola os compartimentos há uma abertura no formato de porta guilhotina (7x7 cm), localizada no mesmo nível do piso. O acionamento desta porta se dá por meio de um programa instalado em computador, em resposta aos sensores de infravermelho.

O assoalho é composto por hastes de aço inoxidável (2,5 mm de diâmetro) separadas por uma distância de 1 cm, que liberam choques elétricos intermitentes com a intensidade de 0,5 mA.



Figura 3: Vista frontal da Caixa de Esquiva Inibitória

2.4.5 Análise comportamental - Esquiva Inibitória

Os dois dias de testes foram gravados por meio de uma câmera ligada ao computador e registrados em vídeo. Posteriormente, as latências da *Habituação 1* e do *Teste de Consolidação* foram quantificadas pelo examinador. Foi indicativo de consolidação da memória quando o animal apresentou uma latência maior no segundo dia de teste em comparação com o primeiro dia, ou não atravessou para o compartimento escuro no segundo dia de teste em 300s.

2.4.6. Procedimento experimental - Esquiva Inibitória

Três dias após a cirurgia, iniciaram-se os testes comportamentais realizados em dois dias consecutivos: exposição no primeiro dia e reexposição após 24 horas. Os animais foram transportados para a sala de experimento e mantidos em repouso, durante pelo menos uma hora, a fim de facilitar a adaptação ao ambiente.

Cada animal foi transportado individualmente até a EI e posicionado no centro do compartimento iluminado por cinco segundos (*Exposição 1*). Transcorrido este tempo, a porta guilhotina foi aberta, sendo permitido que o animal explorasse todo o aparato. Uma vez que o animal atravessasse com as quatro patas para o compartimento escuro, a porta guilhotina era fechada encerrando o teste. Na sequência, o animal foi transportado para sua caixa de moradia. Após 30 minutos, esse procedimento foi repetido (*Exposição 2*)

Trinta minutos depois, durante a sessão de *Aquisição 1* cada animal foi submetido ao mesmo procedimento, exceto que, imediatamente após entrar no compartimento escuro e a porta guilhotina se fechar, foram liberados choques nas patas do animal, de 0,5 mA por dois segundos. Após 20 segundos, o animal foi removido do aparato e retornou à caixa de moradia.

Após intervalo de dois minutos, iniciou-se a *Aquisição 2*, em que o animal foi novamente exposto segundo o mesmo protocolo. Caso o animal não tenha atravessado para o compartimento escuro em 120 segundos, foi indicado que a aquisição da resposta de esquiva foi obtida e o animal foi removido do aparato. Caso o animal tenha atravessado para o compartimento escuro, o mesmo choque da exposição anterior foi aplicado. Imediatamente após esta exposição, os animais receberam a microinjeção da solução correspondente ao seu grupo experimental.

Vinte e quatro horas depois foi realizado o *Teste de Consolidação*, em que o animal foi exposto novamente a EI, porém, a sessão de teste foi encerrada quando o animal atravessou para o compartimento escuro ou transcorrido 300 segundos sem que ele realizasse este comportamento. Nesta sessão não foram aplicados choques.

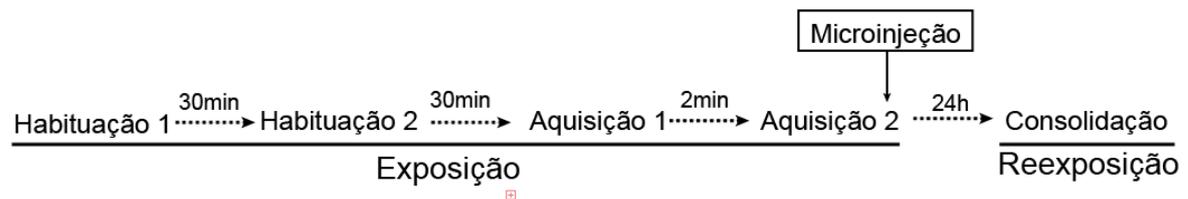


Figura 4: Procedimento experimental da Esquiva Inibitória.

2.5 Grupos experimentais

Foram realizados os experimentos nos dois modelos de teste, LCE e EI, seguindo os mesmos procedimentos experimentais com os tratamentos farmacológicos apropriados para cada grupo experimental, como demonstra a tabela 1 e 2.

Tabela 1: Grupos experimentais Labirinto em Cruz Elevado.

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	LCE	Salina	---	10
TIO	LCE	Tioperamida	0,06 nmol/0,1 µl	10
TIO	LCE	Tioperamida	0,3 nmol/0,1 µl	10
TIO	LCE	Tioperamida	1,5 nmol/0,1 µl	10

Tabela 2: Grupos experimentais da Esquiva Inibitória.

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	EI	Salina	---	10
TIO	EI	Tioperamida	0,06 nmol/0,1 µl	10
TIO	EI	Tioperamida	0,3 nmol/0,1 µl	10
TIO	EI	Tioperamida	1,5 nmol/0,1 µl	10

2.6 Histologia

No fim do experimento os animais foram profundamente anestesiados via ip., e receberam 0,1 µl de azul de metileno a 1% (i.c.), de acordo com o procedimento de microinjeção, para marcação do sítio de microinjeção. Os animais sofreram deslocamento cervical, foram decapitados, seus encéfalos removidos e iniciou-se a fase de preparação dos encéfalos para secção.

A preparação dos encéfalos foi constituída de imersão dos encéfalos por 72 horas em solução de formalina (10%), solução de sacarose 20% por 24 horas, seguida de solução de sacarose 30%. Após esse período, os encéfalos sofreram secções coronais de 80 micrômetros ao longo do trajeto da cânula guia, utilizando um micrótomo (ANCAP 300). Os cortes obtidos foram analisados com uso de microscópio (Olympus B202) e o sítio de injeção foi verificado através da dispersão do azul de metileno, de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001).

2.7 Análise estatística

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para homogeneidade de variância. Os dados foram analisados utilizando-se uma análise de variância (ANOVA) de uma via. As diferenças indicadas foram verificadas através do teste de Duncan. Um valor de $p < 0,01$ foi requerido para a significância.

2.8 Ética

Os procedimentos experimentais realizados neste estudo estavam de acordo com os procedimentos da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), que são baseados no National Institutes EUA de Guia de Saúde de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, e foram aprovados pelo CEPEA-UFSCar (012/2011).

3.0 RESULTADOS

3.0 RESULTADOS

A Figura 5 é uma representação esquemática dos resultados histológicos, de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (2001). Os círculos azuis representam as canulações positivas e “x” vermelho, as negativas. O índice de canulação positiva foi de aproximadamente 85% e os dados que demonstraram implantação incorreta da cânula guia foram excluídos da análise.

3.1 Resultados experimento 1: Labirinto em cruz elevado.

Foi realizada ANOVA de uma via entre todos os grupos para as variáveis comportamentais da exposição (isto é, variáveis obtidas no primeiro dia de teste sem nenhum tratamento farmacológico), que não demonstrou diferença estatística. Por esse motivo, os dados de todos os animais foram agrupados em *pool*.

A figura 6 representa os efeitos do tratamento da TIO microinjetada no vermis cerebelar de camundongos na exposição e reexposição ao LCE, para a porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) e frequência de entrada nos braços fechados (EBF).

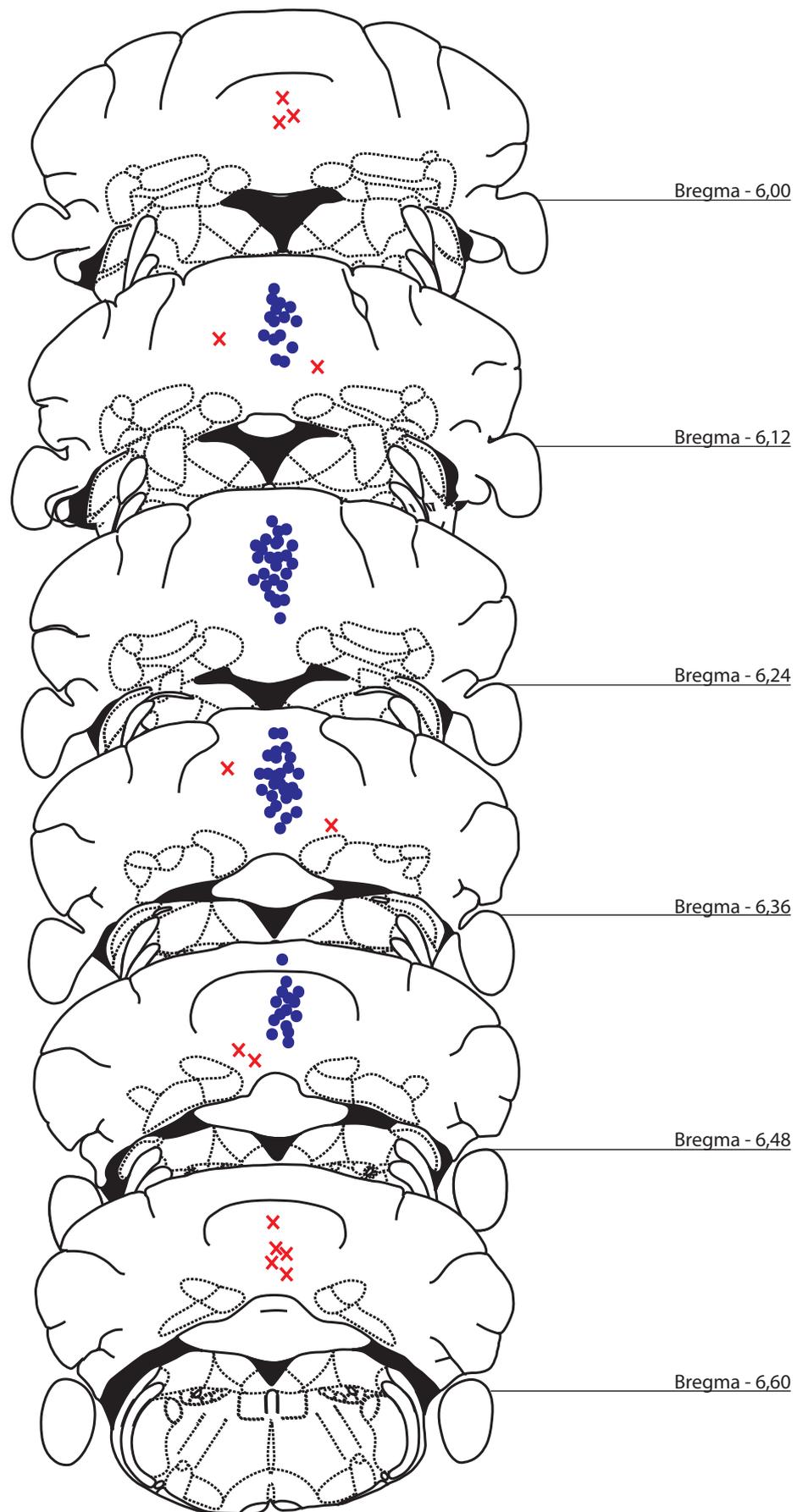


Figura 5: Sítios de micro injeção no vermis cerebelar de camundongos de acordo com o Atlas Paxinos e Franklin

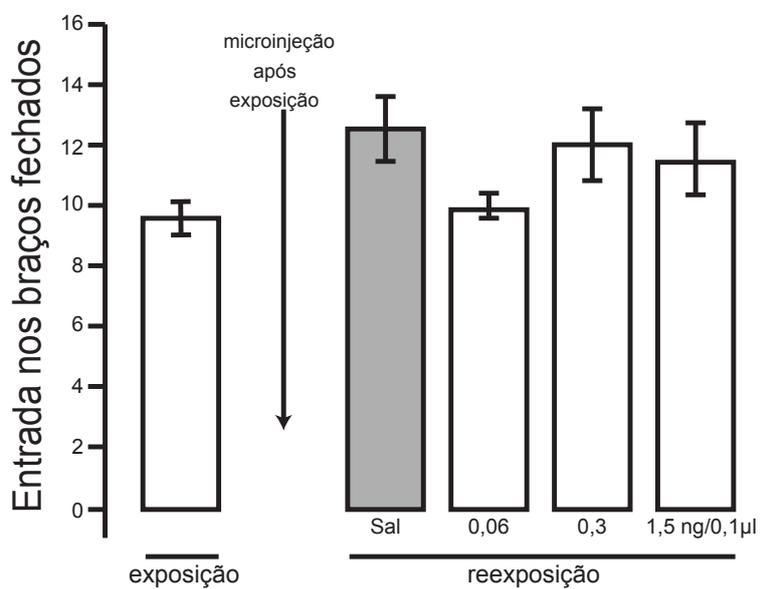
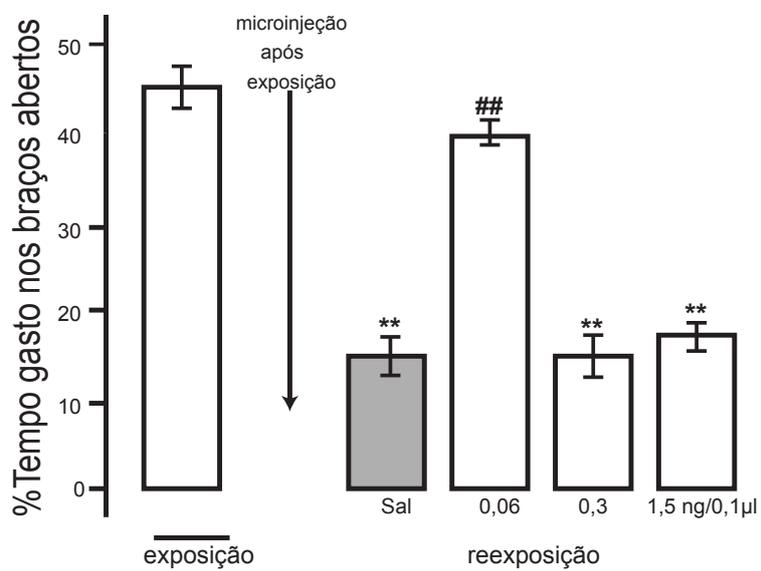
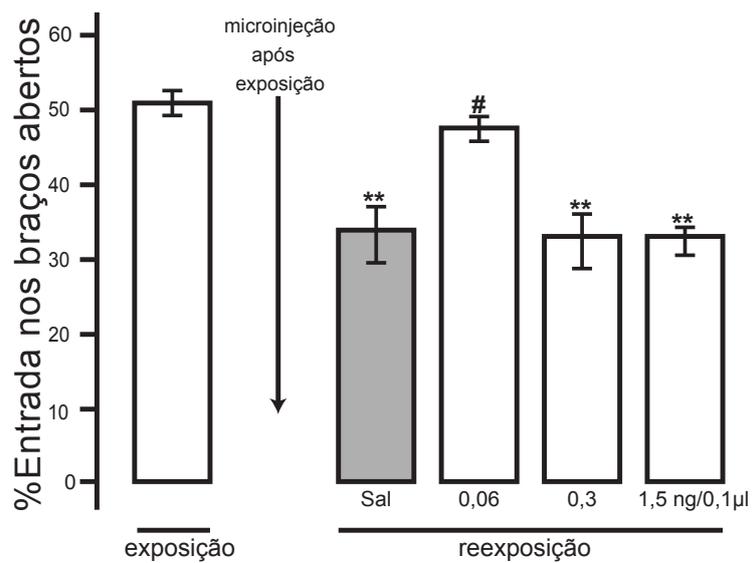


Figura 6: Efeitos da microinjeção no vermis cerebelar do antagonista do receptor H3 tioperamida, nas doses de 0,06 ng/0,1µl, 0,3 ng/0,1µl e 1,5 ng/0,1µl, sobre a consolidação da memória emocional em camundongos submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado. Os dados são apresentados com as médias e erro padrão da média para a porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA), porcentagem de tempo gasto nos braços aberto (%TBA) e frequência de entrada nos braços fechados (EBF). N=10. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ comparação exposição/reexposição. # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$ comparação na exposição entre os grupos tratados e salina (ANOVA seguida de teste de *post hoc* de Duncan).

Na %EBA a ANOVA indicou que houve diferença entre a exposição comparada com a reexposição ($F=14,617$ e $p < 0,001$). Em seguida foi realizado o teste de *post hoc* de Duncan, que indicou redução da %EBA para os grupos Salina ($p < 0,001$), TIO 0,3 ng/0,1µl ($p < 0,001$) e TIO 1,5 ng/0,1µl ($p < 0,001$) em comparação com o *pool*. Esta redução, porém, não foi observada para o grupo TIO 0,06 ng/0,1µl ($p=0,358$). A análise estatística também demonstrou diferença entre os grupos da reexposições, sendo o grupo TIO 0,06 ng/0,1µl ($p=0,002$) estatisticamente diferente do controle; os dois grupos de maiores doses, TIO 0,3 ng/0,1µl ($p=0,779$) e TIO 1,5 ng/0,1µl ($p=0,764$), não apresentaram diferença em comparação com o grupo controle.

Resultados semelhantes foram encontrados na %TBA, ($F=5,580$ e $p < 0,001$). Houve diferença para os mesmos três grupos, Salina ($p < 0,001$), TIO 0,3 ng/0,1µl ($p < 0,001$) e TIO 1,5 ng/0,1µl ($p < 0,001$) em comparação com o *pool*, e não houve diferença para o grupo TIO 0,06 ng/0,1µl ($p=0,302$). Entre os dados dos grupos experimentais da reexposição, houve diferença do grupo TIO 0,06 ng/0,1µl ($p < 0,001$) em comparação ao controle, e este apresentou diferença em relação os grupos TIO 0,3 ng/0,1µl ($p=0,962$) e TIO 1,5 ng/0,1µl ($p=0,658$).

Nenhuma das doses de TIO interferiu na atividade locomotora dos animais, pois não houve diferença no EBF ($F=2,363$ e $p=0,061$).

3.2 Resultados experimento 2: Caixa de Esquiva Inibitória.

A figura 7 representa os efeitos do tratamento da TIO microinfundida no vermis cerebelar de camundongos na exposição e reexposição a EI. A figura representa a latência, isto é, tempo em segundos que o animal levou para atravessar do compartimento claro para o escuro.

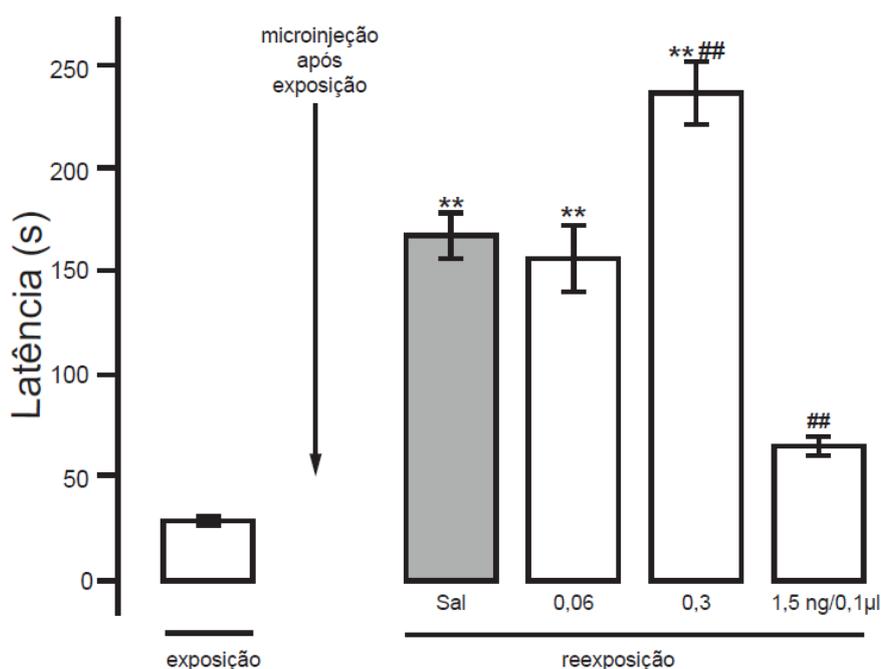


Figura 7: Efeitos da microinjeção no vermis cerebelar do antagonista do receptor H3 tioperamida, nas doses de 0,06 ng/0,1µl, 0,3 ng/0,1µl e 1,5 ng/0,1µl, sobre a consolidação da memória emocional em camundongos submetidos a esquiva inibitória. Os dados são apresentados com as médias e erro padrão da média para o tempo de latência (segundos). N=10. * $p<0,01$, ** $p<0,001$ comparação exposição/reexposição. # $p<0,01$, ## $p<0,001$ comparação na exposição entre os grupos tratados e salina (ANOVA seguida de teste de *post hoc* de Duncan).

Foi realizada ANOVA de uma via entre todos os grupos para as latências da exposição (isto é, dados obtidos no primeiro dia de teste sem nenhum tratamento farmacológico), que não demonstrou diferença estatística. Por esse motivo, os dados de todos os animais foram agrupados em *pool*.

A ANOVA indicou que houve diferença entre a exposição comparada com a reexposição ($F=162,961$ e $p<0,001$). Em seguida foi realizado o teste de *post hoc* de Duncan que indicou aumento da latência para os grupos Salina ($p<0,001$), TIO 0,06 ng/0,1 μ l ($p<0,001$) e TIO 0,3ng/0,1 μ l ($p<0,001$) em comparação com o *pool*, e não houve diferença para o grupo TIO 1,5ng/0,1 μ l ($p=0,786$). Entre os dados dos grupos experimentais da reexposição, houve diferença dos grupos TIO 0,3ng/0,1 μ l ($p<0,001$) e TIO 1,5ng/0,1 μ l ($p<0,001$) em comparação ao controle, e não foi observada esta diferença em relação ao grupo TIO 0,06 ng/0,1 μ l ($p=0,298$).

4.0 DISCUSSÃO

4.0 DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos realizados neste estudo permitem traçar uma possível ação do sistema histaminérgico do cerebelo sobre a consolidação da memória emocional nos dois modelos de teste utilizados. Os resultados do experimento 1 indicaram déficit da consolidação da memória emocional para a menor dose de TIO (0,06 ng/0,1µl) com uso do LCE, e o experimento 2 indicou facilitação da consolidação da memória emocional para a dose intermediária (0,3 ng/0,1µl) e déficit para a maior dose de TIO (1,5 ng/0,1µl), utilizadas no presente estudo com uso da EI.

No experimento 1, a memória emocional foi inferida através da análise do perfil do comportamento exploratório dos animais expresso no LCE. Nossos resultados demonstram diminuição na atividade exploratória nos braços abertos (%EBA e %TBA) para o grupo controle e para os grupos de maiores doses de TIO testadas (0,3 ng/0,1µl e 1,5 ng/0,1µl). O LCE oferece aos animais um possível conflito entre a motivação para explorar o labirinto e a tendência natural que estes animais apresentam em evitar os espaços abertos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Esta redução nos permitiu inferir aprendizagem e memória, pois com a experiência do primeiro dia de teste (exposição) é esperado que no segundo dia (reexposição) os camundongos evitem áreas de risco que os braços abertos apresentam. No entanto, a redução na atividade exploratória nos braços abertos não foi observada no grupo tratado com a menor dose de TIO (0,06 ng/0,1µl) testada neste estudo. Assim, podemos sugerir que para esta menor dose de TIO microinjetada no vermis cerebelar houve prejuízo da consolidação da memória emocional.

No experimento 2, a memória emocional foi inferida através da análise do tempo de latência, isto é, tempo que o animal gasta para atravessar do compartimento iluminado para o compartimento escuro. Porém, no ambiente escuro o animal é submetido ao estímulo aversivo

do choque elétrico. A aprendizagem é avaliada comparando a latência da *Habituação 1*, no primeiro dia de teste, com o *Teste de Consolidação*, no segundo dia de teste, sendo esperado aumento no último dia (MISANE; JOHANSSON; ÖGREN, 1998; ANGLADE *et al.*, 1994). Para o grupo tratado com a maior dose de TIO (0,3 ng/0,1µl) não foi verificado o aumento da latência na reexposição, sugerindo déficit na consolidação da memória.

Prejuízo nos processos de aprendizagem e memória é um resultado consistente entre os estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa. Gianlorenço e colaboradores (2011a) e Serafim e colaboradores (2010) também apontaram efeitos inibitórios sobre a memória emocional, utilizando o mesmo protocolo experimental no LCE, com a administração via intraperitoneal (i.p.) de L-histidina, o precursor da histamina. Além disso, outro estudo desenvolvido por Gianlorenço e colaboradores (2011b) demonstrou que a microinjeção de histamina no vermis cerebelar de camundongos também apresentou déficit na consolidação da memória emocional. Assim, sugerimos que a alteração da concentração de histamina cerebelar através da microinjeção direta de histamina no vermis cerebelar, bem como por microinjeção TIO, que aumenta a concentração de histamina endógena, podem prejudicar a consolidação da memória emocional.

Os resultados do experimento 1 indicam que, além de prejuízo para a menor dose de TIO testada neste estudo, as duas maiores doses não apresentaram nenhum efeito sobre a consolidação da memória emocional. Para estes resultados, sugerimos como primeira hipótese que o receptor H3 também desempenha um papel complexo na regulação dos níveis de outros neurotransmissores além da histamina, desempenhando função de heteroreceptor. O receptor H3 regula a liberação de acetilcolina e serotonina, influenciando, respectivamente, os sistemas serotoninérgicos e colinérgicos, que também estão relacionados nos processos de aprendizagem e de memória (HILL *et al.*, 1997). Assim, as doses mais elevadas de TIO também podem ativar estes sistemas. Como segunda hipótese, sugerimos que TIO não

apresenta grau elevado de especificidade para receptor H3, e as duas doses mais elevadas de TIO podem ativar os outros dois receptores histaminérgicos. O receptor H1 e H2 são também expressos no cerebelo, sendo que o receptor H1 é o de maior concentração. Gianlorenço e colaboradores (2011a) demonstraram reversão do efeito amnésico causado pela L-histidina, via receptor H1. No entanto, estas hipóteses não foram ainda testadas.

Os resultados do experimento 2 indicam que para a dose intermediária de TIO (0,3 ng/0,1µl) houve efeito facilitatório na consolidação da memória emocional. Alguns estudos que utilizaram a TIO para avaliar processos de aprendizagem e memória indicam facilitação dos processos mnemônicos. Bernaerts, Lamberty e Tirelli (2004) utilizaram a EI e demonstraram efeitos facilitatórios na consolidação da memória. Seus resultados indicam efeito tipo dose-dependente nas diferentes doses injetadas via i.p.. Além disso, a TIO foi capaz de reverter o efeito amnésico causado pela injeção de escopolamina e dizocilpina. Orsetti, Piera e Carlo (2001) também encontraram efeito facilitatório na administração de TIO via i.p., utilizando o modelo de labirinto em Y. Komater e colaboradores (2005) demonstraram que a TIO, também via i.p., não teve efeito sobre a aprendizagem espacial, porém, seus resultados apontam atenuação dos efeitos inibitórios provocados pela administração de escopolamina.

Os resultados dos dois experimentos apontam contradição entre facilitação e inibição da memória emocional nas diferentes doses utilizadas nos grupos experimentais. Essa discrepância pode ser justificada pela ação do neurotransmissor investigado neste estudo. A histamina, semelhante a outras aminas biogênicas, apresenta possível modulação tônica (PASSANI, 2000) nas influências comportamentais. Assim, podemos sugerir que no experimento 1 a menor dose de TIO foi suficiente para aumentar a concentração de histamina cerebelar e prejudicar a consolidação da memória emocional de camundongos reexpostos ao LCE, e que para ambas as maiores doses testadas no presente estudo este comportamento não

foi observado. Podemos sugerir também que para o experimento 2, o grupo experimental que recebeu a dose intermediária de TIO apresentou facilitação e a maior dose de TIO testada apresentou prejuízo na memória. Podemos acrescentar, ainda, que a histamina possui característica de modular o comportamento emocional de maneira não linear (BALDI; BUCHERELLI, 2005).

Nossos resultados indicaram, também, inibição da consolidação da memória para o grupo de menor dose de TIO que foi submetido à LCE, sendo que o grupo de igual dose submetido à EI não apresentou efeitos sobre a consolidação da memória, sugerindo que os modelos de teste podem estimular diferentes vias neuronais. De acordo com McNaughton e Corr (2004), existem circuitos neurais distintos entre os processos que envolvem o medo relacionado com ameaças imediatas e o medo antecipatório, ansiedade e ameaças distantes. Nos processos que envolvem o medo imediato existe esta representação em níveis hierárquicos do SNC mais inferiores, isto é, estruturas subcorticais: matéria cinzenta periaquidantal, hipotálamo medial e amígdala; e a representação do medo antecipatório relacionado com a ansiedade está envolvido em áreas mais superiores: amígdala, sistema septo-hipocampal, cíngulo posterior e córtex pré-frontal. Podemos sugerir que o LCE incita o medo antecipatório, relacionado com a ansiedade, e que a EI está relacionada com o medo aparente. Nós sugerimos que o cerebelo pode integrar esses sistemas funcionais e que a histamina intra cerebelar atuaria diferentemente quando avaliamos a memória relacionada com a ansiedade. Esta justificativa também nos esclarece o efeito inibitório encontrado no grupo de menor dose submetido ao LCE em contraste ao efeito facilitatório indicado no grupo de dose intermediária de TIO testado neste estudo.

Classicamente o cerebelo está relacionado a tarefas motoras, porém, há um número crescente de estudos que sustenta a tese de que o cerebelo está envolvido em funções

cognitivas (SCHMAHMANN; PANDYA, 1995; DESMOND, *et al.*, 1997). Os resultados do presente estudo demonstram que o cerebelo participa da consolidação da memória emocional.

Os estudos descritos acima sugerem a interação de uma função superior, como a memória e aprendizagem, em uma estrutura subcortical. O conceito de rede neuronal propõe que áreas distantes do encéfalo possam participar de forma diversa, através de vias e circuitos próprios no controle de funções cognitivas, contribuindo com elementos específicos para o resultado comportamental, e os resultados do presente estudo contribuem para esta abordagem.

Em conclusão, estes resultados demonstram a inibição e facilitação da consolidação da memória emocional em camundongos reexpostos ao LCE e EI. Assim, podemos sugerir que a TIO microinjeção no vermis cerebelar de camundongos influencia nos processos da consolidação da memória emocional.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANGLADE, F.; BIZOT, J. C.; DODD, R. H.; BAUDOIN, C.; CHAPOUTHIER, G. Opposite effects of cholinergic agents and benzodiazepine receptor ligands in a passive avoidance task in rats. *Neuroscience Letters*, v. 182, p. 247-250, 1994.

ARRANG, J. M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J. C. Autoinhibition of histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*, v. 302, p. 832 - 837, 1983.

ARRANG, J. M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J. C. Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience*, v. 23, p.149-157, 1987.

BALDI, E.; BUCHERELLI, C. The inverted "u-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. *Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine*, v. 3, p. 9 - 21, 2005.

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

BERNAERTS, P.; LAMBERTY, Y.; TIRELLI, E. Histamine H3 antagonist thioperamide dose-dependently enhances memory consolidation and reverses amnesia induced by dizocilpine or scopolamine in a one-trial inhibitory avoidance task in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 154, p. 211 - 219, 2004.

BRIONI, J. D.; ESBENSHADE, T. A.; GARRISON, T. R.; BITNER, S. R.; COWART, M. D. Discovery of Histamine H3 Antagonists for the Treatment of Cognitive Disorders and Alzheimer's Disease. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 336, p. 38–46, 2011.

BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HAAS, H. L. The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology*, v. 63, p. 637–672, 2001.

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

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

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 29, p. 1193 – 1205, 2005.

COOPER, I. S.; RIKLAN, M.; WALTZ, J. M.; AMIN, I.; PANI, K. A study of chronic cerebellar stimulation in disorders of sensory communication in the central nervous system. *Boletín de estudios médicos y biológicos*, v. 28, p. 347 - 390, 1974.

COURCHESNE, E.; YEUNG-COURCHESNE, R.; PRESS, G. A.; HESSELINK, J. R.; JERNIGAN, T. L. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *The New England Journal of Medicine*, v. 318, p. 1349–1354, 1988.

DE ALMEIDA, M. A. M. R.; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*. v. 283, p. 193-198, 1986.

DESMOND, J. E.; GABRIELI, J. D.; WAGNER, A. D.; GINIER, B. L.; GLOVER, G. H. Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *The Journal of Neuroscience*. v. 17, p. 9675 - 9685, 1997.

ERICSON, H.; BLOMQUIST, A.; KÖHLER, C. Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, v.311, p.45-64, 1991.

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

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

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

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

GIANLORENÇO, A. C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. l-Histidine induces statedependent memory deficit in mice mediated by H (1) receptor. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 35, p. 91–95, 2011 (A).

GIANLOURENÇO, A. C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. *Brain Research Bulletin*, v. 86, p. 134 - 138, 2011 (B).

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

GORDON, N. The cerebellum and cognition. *Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, v. 11, p. 232-234, 2007.

GRAY, H. MAYO, G. C. *Atlas de anatomia humana*. Ed.Guanabara Koogan, ed.29, Rio de Janeiro, 1988.

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

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews*, v.88, p. 1183–1241, 2008.

HASS H.; PANULA P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 4, p. 121–130, 2003.

HARPER, J. W.; & HEATH, R. G. Anatomic connections of the fastigial nucleus to the rostral forebrain in the cat. *Experimental Neurology*, v. 39, p. 285–292, 1973.

HEATH R. G.; HARPER J. W. Ascending projections of the cerebellar fastigial nucleus to the hippocampus, amygdala, and other temporal lobe sites: evoked potential and histological studies in monkeys and cats. *Experimental Neurology*, v. 45, p. 268–287, 1974.

HEATH, R. G. Modulation of emotion with a brain pacemaker. Treatment for intractable psychiatric illness. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, v. 165, p. 300 – 317, 1977.

HEATH, R. G.; LLEWELLYN, R. C.; ROUCHELL, A.M. The cerebellar pacemaker for intractable behavioral disorders and epilepsy: follow-up report. *Biological Psychiatry*, v. 15, p. 243–256, 1980.

HILL, S. J.; GANELLIN, C. R.; TIMMERMAN, H.; SCHWARTZ, J. C.; SHANKLEY, N. P.; YOUNG, J. M.; SCHUNACK W.; LEVI, R.; HAAS, H. L. International Union of Pharmacology, XIII, Classification of Histamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 3, p. 253 - 278, 1997.

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

KAMEI, C.; TASAKA, K. Effect of histamine on memory retrieval in old rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.16, p.128-132, 1993.

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

KNOWLTON, B. J.; SQUIRE, L. R. The learning of categories: parallel brain systems for item memory and category knowledge. *Science*. v. 262, p. 1747 - 1749, 1993.

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

KOMATER, A. V.; BUCKLEY, J. M.; BROWMAN, E. K.; PAN, B. J.; HANCOCK, A. A.; DECKER, W. M.; FOX, B. G. Effects of histamine H₃ receptor antagonists in two models of spatial learning. *Behavioural Brain Research*, v.159, p. 295-300, 2005.

LEURS, R.; CHAZOT, P. L.; SHENTON, F. C.; LIM, H.D.; DE ESCH, J. P. Molecular and biochemical pharmacology of the histamine h4 receptor. *British journal of pharmacology*, v. 157, p. 14 - 23, 2009.

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

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

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

MESSIER, C.; EMOND, S.; ETHIER, K. New techniques in stereotaxic Surgery and Anesthesia in the mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavioral*, v. 63, p 313 - 318, 1999.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuro*, v.20, p.445 - 468, 1998.

MISANE I.; JOHANSSON C.; ÖGREN S. O. Analysis of the 5-HT_{1A} receptor involvement in passive avoidance in the rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 125, p. 499 - 509, 1998.

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

MONTI, J. M. Involvement of histamine in the control of the waking state. *Life Sciences*. v. 53, p. 1331 - 1338, 1993.

NGUYEN, T.; SHAPIRO, D. A.; GEORGE, S. R.; SETOLA, V.; LEE, D. K.; CHENG, R.; RAUSER, L.; LEE, S. P.; LYNCH, K. R.; ROTH, B. L.; O'DOWD, B. F. Discovery of novel member of the histamine receptor family. *Molecular Pharmacology*, v. 59, p. 427 - 433, 2001.

NUNES-DE-SOUZA, V. et al. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 187, p. 72 - 79, 2008.

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.

ORSETTI, M.; PIERA, G.; CARLO, G. Histamine H₃-receptor antagonism improves memory retention and reverses the cognitive deficit induced by scopolamine in a two-trial place recognition task. *Behavioural Brain Research*, v. 124, p. 235 - 242, 2001.

PANULA, P.; RINNE J.; KUOKKANEN. K.; ERIKSSON, K. S.; SALLMEN. T.; KALIMO, H.; RELJA, M. Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, v. 82, p. 993 - 997, 1998.

PASSANI, M. B. et al. Central histaminergic system and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 24, p. 107 - 113, 2000.

PAXINOS, G.; KEITH B.J. FRANKLIN K. B. J. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, segunda edição ELSEVIER SCIENCE 2001

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, p. 149 - 167, 1985.

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.

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

RODGERS, R. J. Animal models of anxiety: where next? *Behavioural Pharmacology*, v. 8, p. 477 - 496, 1997.

SACCHETTI, B.; BALDI, E.; LORENZINI, C. A.; BUCHERELLI, C. Cerebellar role in fear- conditioning consolidation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 8406 - 8411, 2002.

SCHACTER, D. Implicit memory: History and current status. *J. Exp. Psychology Learning and Memory Cognition*, v. 13, p. 501 - 518, 1987.

SCHMAHMANN, J. D. An emerging concept. The cerebellar contribution to higher function. *Archives of Neurology*, v. 48, p. 1178 – 1187, 1991.

SCHMAHMANN, J. D. The Role of the Cerebellum in Cognition and Emotion: Personal Reflections Since 1982 on the Dysmetria of Thought Hypothesis, and Its Historical Evolution from Theory to Therapy. *Neuropsychology Review*, v. 20, p. 236 – 260, 2010.

SCHMAHMANN, J. D.; PANDYA, D. N. Prefrontal cortex projections to the basilar pons: implications for the cerebellar contribution to higher function. *Neuroscience Letters*. v. 199, p. 175 - 178, 1995.

.

SERAFIM, K. R.; KISHI, M.; CANTO-DE-SOUZA, 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, p. 100 – 106, 2010.

SNIDER, R. S.; MAITI, A. Cerebellar contributions to the Papez circuit. *Journal of Neuroscience Research*, v. 2, p. 133 – 146, 1976.

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

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

THACH, W. T. Combination, complementarity and automatic control: a role for the cerebellum in learning movement coordination. *Novartis Foundation Symposium*, v. 28, p. 218 - 232, 1998.

UMPHRED, D. A. Reabilitação neurológica. Edição 4, Editora Manole, São Paulo, 2004.

WADA, H.; INAGAKI, N.; YAMATODANI, A.; WATANABE, T. Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity?. Trends in Neurosciences, v. 14, p. 415 - 418, 1991.

ZARRINDAST, M. R.; TORABI, M.; ROSTAMI, P.; FAZLI-TABAEIS, S. The effects of histaminergic agents in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. Pharmacology Biochemistry & Behavior, v. 85, p. 500 - 506, 2006.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R. Neuroanatomy of memory. Annual Review of Neuroscience, v.16, p.547 - 563, 1993.