

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)  
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA (DFISIO)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**“PAPEL HISTAMINÉRGICO CEREBELAR NA CONSOLIDAÇÃO DA  
MEMÓRIA EMOCIONAL E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM  
CAMUNDONGOS”**

BRUNA SILVA MARQUES

SÃO CARLOS – SP

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)  
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA (DFISIO)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**“PAPEL HISTAMINÉRGICO CEREBELAR NA CONSOLIDAÇÃO DA  
MEMÓRIA EMOCIONAL E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM  
CAMUNDONGOS”**

**BRUNA SILVA MARQUES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Fisioterapia. Área: Neuroplasticidade.

**Orientador(a):** Rosana Mattioli

São Carlos – SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M357p Marques, Bruna Silva  
Papel histaminérgico cerebelar na consolidação da  
memória emocional e atividade locomotora em  
camundongos / Bruna Silva Marques. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
53 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Histamina. 2. Ansiedade. 3. Pânico. 4.  
Aprendizagem. 5. Memória. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

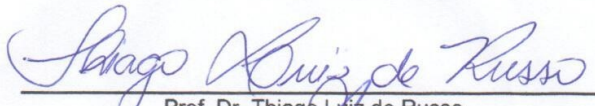
---

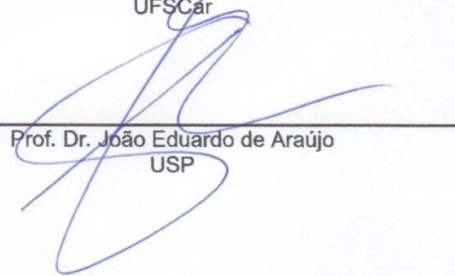
**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Bruna Silva Marques, realizada em 24/02/2016:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Rosana Mattioli  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Eduardo de Araújo  
USP

De tudo, ficaram três coisas:  
A certeza de que ele estava sempre começando,  
A certeza de que era preciso continuar  
E a certeza de que seria interrompido antes de terminar.  
Fazer da interrupção um caminho novo.  
Fazer da queda um passo de dança,  
Do medo uma escada,  
Do sono uma ponte,  
Da procura um encontro.  
(Fernando Sabino)

Os experimentos deste trabalho foram desenvolvidos no laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob a orientação da prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Mattioli. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFSCar. Este trabalho contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## RESUMO

SILVA-MARQUES, B. **Papel Histaminérgico cerebelar na Consolidação da Memória Emocional e Atividade Locomotora em Camundongos.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo. 2015.

Evidências experimentais sugerem que o papel do cerebelo na aprendizagem pode ser mais complexo do que a regulação das respostas motoras, e seu envolvimento na consolidação da memória emocional em camundongos tem demonstrado ser significativo. Considerando a dificuldade em interpretar o comportamento de medo/ansiedade nos modelos usuais para o estudo do sistema histaminérgico e memória emocional, o presente estudo propôs a avaliação comportamental de camundongos submetidos ao labirinto em T-elevado (LTE) após microinjeção de histamina no vérmis cerebelar. O teste de Campo Aberto foi realizado para medir a atividade locomotora dos animais. Foram utilizados camundongos suíços albinos, machos, adultos jovens, pesando entre 25-35g. Os nossos dados sugerem que a histamina não afetou a consolidação da memória emocional durante a fuga ou atividade locomotora no campo aberto nas doses utilizadas neste estudo. No entanto, observou-se um aumento significativo da esQUIVA inibitória 14h após a microinjeção de histamina na dose de 6.8 nmol/0.5µl. Sugerimos que a histamina facilita a consolidação a memória emocional na esQUIVA inibitória em camundongos.

**Palavras-chave:** Histamina, Ansiedade, Pânico, Aprendizagem, Memória.

## **ABSTRACT**

Experimental evidence suggests that the cerebellum plays a more complex role in learning than simply regulating the motor response. Rather, it is thought to play a significant role in the consolidation of emotional memory in mice. Due to the difficulty of interpreting fear and anxiety behaviors - the standard methodology for the study of the histaminergic system and emotional memory - in mice, we propose a behavioral assessment of mice subjected to the Elevated T-Maze after histamine microinjection of the cerebellar vermis. Young male Swiss albino mice weighing 25 – 35 g were used. In addition, locomotor activity was tested in an open field test. Our data suggest that histamine did not affect memory consolidation during escape or open field behavior at the doses used in this study. However, we observed a significant increase in inhibitory avoidance on the second day in animals receiving a dose of 6.8 nmol/0.5 $\mu$ l, suggesting that histamine facilitates the consolidation of inhibitory avoidance in mice.

**Key-words:** Histamine, Anxiety, Panic, Learning, Memory.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais projeções histaminérgicas e distribuição de seus receptores no encéfalo de ratos. As formas indicam as regiões onde se localizam cada subtipo de receptor e o maior tamanho de uma forma indica a predominância do receptor específico. Acc: núcleo acumbens; Amy: amígdala; Hipot: hipotálamo; Str: estriado; SN: substância negra (KOHLER et al, 2011).....	16
<b>Figura 2:</b> Camundongos machos da linhagem Suíço Albino.....	24
<b>Figura 3:</b> Camundongo posicionado no aparelho estereotáxico.....	25
<b>Figura 4:</b> Labirinto em T-Elevado.....	28
<b>Figura 5:</b> Campo Aberto.....	30

**Figura 6:** Delineamento do estudo.....31

**Figura 7:** Latência de saída dos braços abertos (fuga) de camundongos no Labirinto em T-elevado (POOL), quando comparados com a latência de saída dos braços abertos 24 horas após da administração da solução salina ou de histamina nas doses 2.72 nmol, 4.07 nmol, 6.8 nmol and 13.6 nmol / 0,5µl.....36

**Figura 8:** Latência de saída dos braços fechados (esquiva inibitória) de camundongos no Labirinto em T-elevado (POOL), quando comparado com a latência de saída dos braços fechados 24 horas após da administração de solução salina ou de histamina nas doses de 2.72 nmol, 4.07 nmol, 6.8 nmol and 13.6 nmol / 0,5µl.....37

**Figura 9** – Número de quadrantes percorridos no Campo Aberto 24h após a administração de histamina (2.72 nmol, 4.07 nmol, 6.8 nmol e 13.6 nmol/0,5µl) e imediatamente após a última exposição ao LTE.....38

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Experimento I: Efeito histaminérgico na consolidação da memória emocional no comportamento de Fuga no LTE.....**32**

**Tabela 2** – Experimento II: Efeito histaminérgico na consolidação da memória emocional no comportamento de esquiva inibitória no LTE.....**33**

**Tabela 3:** Valores de ANOVA 2 vias para as variáveis do experimento 1 analisadas na exposição do grupo controle (SALINA) .....**35**

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CA:** Campo Aberto

**CPA:** Clorfeniramina

**HA:** Histamina

**HDC:** Dicloridrato de histamina

**LCE:** Labirinto em Cruz Elevado

**LTE:** Labirinto em T-Elevado

**NTM:** Núcleo Tuberomamilar

**RA:** Ranitidina

**SAL:** Salina

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**SNH:** Sistema Neural Histaminérgico

**TAG:** Transtorno de Ansiedade Generalizada

**TP:** Transtorno de Pânico

**VLPO:** Núcleo Pré-óptico Ventro-lateral

## ANEXOS

<b>Anexo A</b> – <i>Missing Values</i> .....	<b>50</b>
<b>Anexo B</b> – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar) .....	<b>51</b>
<b>Anexo C</b> – Sítio de implantação das cânulas confirmadas pela histologia no vérmis cerebelar.....	<b>52</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. Geral.....	23
2.2. Específicos.....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1. Animais.....	24
3.2. Cirurgia e microinjeção.....	25
3.3. Tratamento farmacológico.....	27
3.4. Equipamentos e Procedimentos.....	27
3.4.1. Labirinto em T-Elevado.....	27
3.4.2. Campo Aberto.....	29
3.5. Delineamento do estudo.....	30
3.6. Grupos experimentais.....	32
3.7. Histologia.....	33
3.8. Análise Estatística.....	34
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Experimento I.....	35
4.2. Experimento II.....	36

5. <b>DISCUSSÃO</b> .....	39
6. <b>CONCLUSÕES</b> .....	43
7. <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	44

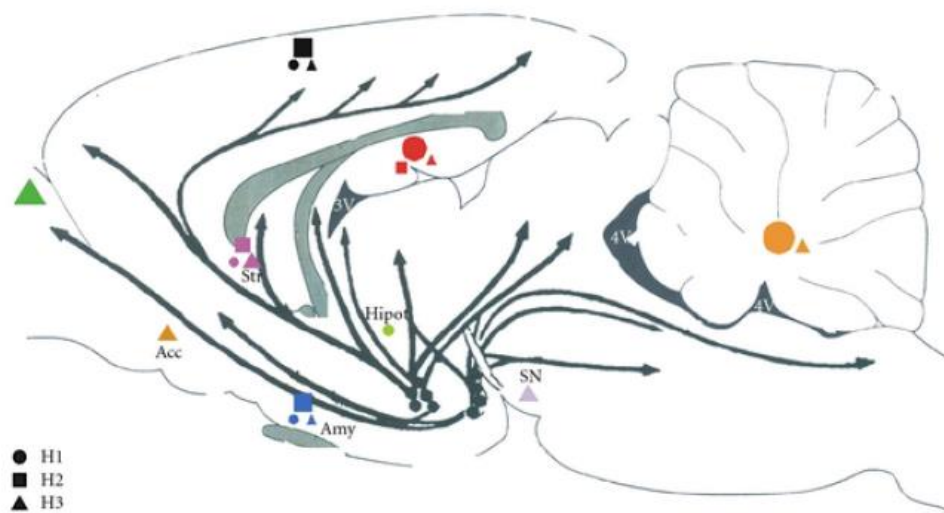
## 1. INTRODUÇÃO

A histamina (HA), produto da descarboxilação da histidina, é uma amina biogênica e um neuromodulador do Sistema Nervoso Central (SNC), importante na regulação de diversos processos fisiológicos, como a modulação do ciclo circadiano e de sono, a regulação da temperatura corporal, motivação e cognição (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). O Sistema Neural Histaminérgico (SNH) (Figura 1) é composto de grupos de neurônios originados no núcleo tuberomamilar (NTM) da área hipotalâmica posterior de mamíferos, enviando projeções para grande parte do SNC. As fibras ascendentes passam pelo feixe prosencefálico medial e pela face ventral do hipocampo, chegando até o bulbo olfatório, enquanto as fibras descendentes projetam-se para o cerebelo e medula espinhal (WADA et al, 1991). O sistema neural histaminérgico dos roedores é similar ao sistema encontrado no cérebro humano (PANULA et al, 1984).

Os efeitos histaminérgicos são mediados por quatro subtipos de receptores: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> (JUTEL; BLASER; AKDIS, 2005). A estimulação desses receptores desencadeia cascatas de sinalização intracelular que implicam na plasticidade neuronal e, conseqüentemente, em sua função e estrutura (DERE et al, 2010). Os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> são excitatórios, enquanto o subtipo H<sub>3</sub> é um autorreceptor que regula de forma inibitória a síntese e liberação de histamina (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). Os receptores H<sub>4</sub> são expressos primariamente em células envolvidas com o sistema



imune e tiveram sua ação no sistema nervoso central descrita recentemente (GALEOTTI; SANNA; GHELARDINI; 2013).



**Figura 1:** Principais projeções histaminérgicas e distribuição de seus receptores no encéfalo de ratos. As formas indicam as regiões onde se localizam cada subtipo de receptor e o maior tamanho de uma forma indica a predominância do receptor específico. Acc: núcleo acumbens; Amy: amígdala; Hipot: hipotálamo; Str: estriado; SN: substância negra (KÖHLER et al, 2011).

Estudos farmacológicos e genéticos em roedores indicam que, além de suas funções amplamente conhecidas de mediação à resposta inflamatória, a histamina pode ser um potencial sinalizador de perigo, promovendo a reação de ansiedade (BROWN; STEVENS; HAAS, 2001). A ansiedade e o medo são respostas adaptativas geradas em antecipação ou na presença de estímulos que ameaçam perturbar a integração do organismo. Enquanto o medo é geralmente provocado por um determinado contexto distinguível, a ansiedade pode ocorrer na ausência de situação de perigo (DAVIS, 2000). Variações extremas ou perturbações dos mecanismos neurais de controle do medo e da ansiedade podem desencadear situações de persistência da ansiedade mesmo após a

retirada do estímulo aversivo e levar a problemas psicológicos e de comportamento em seres humanos, tais como o transtorno do pânico, as fobias, e os transtornos de estresse pós-traumático (CUTHBERT et al, 2003. VICTOR; BERNSTEIN, 2009. WEISBERG, 2009).

De acordo com McNaughton e Corr (2004), há uma distinção funcional que faz com que o medo seja uma reação mais propensa a ameaças imediatas, com a função de afastar o animal para longe do perigo. Desta forma, abrange os comportamentos de luta, fuga, congelamento (*freezing*) e se mostra insensível a drogas ansiolíticas. Já em uma situação de conflito entre aproximação e esquiva, a ansiedade tem a função de mobilizar o animal em direção à fonte de ameaça. Na reação de ansiedade ocorre inibição de comportamentos diligentes, aumento do acesso ao risco e quiescência defensiva, sensíveis a drogas ansiolíticas.

Tais respostas adaptativas de defesa podem ser moduladas pela HA cerebral. Gianlorenço et al (2015), em seu estudo sobre a consolidação da memória de medo em camundongos na tarefa de esquiva inibitória, discutem que as projeções histaminérgicas da substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e vérmis cerebelar estão envolvidas na modulação da consolidação da memória emocional.

Tradicionalmente, o cerebelo esteve envolvido com funções de controle sensorio-motor e equilíbrio, evidenciados pelos déficits decorrentes de lesões cerebelares, como a dismetria, ataxia e tremor intencional (HOLMES, 1939). Porém, evidências sugerem que desordens cerebelares podem também culminar em transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão, ansiedade

(BALDAÇARA et al, 2008). Schmahmann (2007) sugere que o controle motor é influenciado principalmente pelo lobo anterior do cerebelo, enquanto o lobo posterior está envolvido com a cognição, e o vérmis cerebelar apresenta contribuição para o processamento afetivo em seres humanos.

Estas novas descobertas abrem uma gama de possibilidades em âmbito experimental e clínico, entre elas reconhecer, diagnosticar e tratar condições, antes desconsideradas, que afetam a qualidade de vida de pacientes portadores de ataxia cerebelar. Além disso, compreender tanto o amplo papel do cerebelo no sistema nervoso, como a forma com que esta estrutura contribui para os sintomas neuropsiquiátricos, mesmo na ausência de ataxia é de suma importância para o desenvolvimento de novos tratamentos para distúrbios de saúde mental incapacitantes (JEREMY, SCHMAHMANN, 2008).

Embora seja difícil reproduzir alguns sintomas de transtornos de ansiedade evidenciados na prática clínica, pode-se inferi-la com bastante precisão em ratos ou camundongos (JACOBSON, CRYAN, 2009). A correspondência entre modelos animais e ansiedade tem sido explorada, principalmente com base em resultados farmacológicos (TEIXEIRA; ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 2000). No entanto, modelos tradicionais interferem nos processos psicobiológicos, como a habilidade motora, motivação, privação de alimentos e/ou água. (HANDLEY, 1991). A fim de não utilizar estímulos aversivos, surgiram modelos de ansiedade baseados em comportamentos etológicos, como o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (LARCERDA, 2006).

Em estudos prévios do nosso laboratório, encontramos diferentes efeitos da microinjeção de substâncias histaminérgicas no cerebelo em camundongos testados no LCE e no teste de esquiva inibitória. Gianlorenço, Canto-de-Souza e Mattioli (2011) investigaram o efeito da microinjeção de HA no vérmis cerebelar em camundongos através do LCE, e demonstraram que o sistema histaminérgico e o cerebelo estão envolvidos no processo de consolidação da memória emocional, através de inibição dose-dependente da histamina. Recentemente, com o objetivo de investigar o papel dos receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> na consolidação da memória emocional em camundongos, os resultados demonstraram que o antagonista H<sub>1</sub> clorfeniramina (CPA) não afetou o comportamento dos animais nas doses utilizadas, porém foi capaz de reverter o efeito inibitório da histamina na consolidação da memória no LCE (GIANLORENÇO et al, 2012). Por outro lado, Gianlorenço, Canto-de-Souza e Mattioli (2013) evidenciaram uma facilitação na consolidação da memória emocional no teste de esquiva inibitória na dose 1,36nmol, e que o pré-tratamento com o antagonista H<sub>2</sub> ranitidina (RA) foi capaz de prevenir este efeito.

Os resultados indicam possível diferença em modelos relacionados à ansiedade ou ao medo. Lacerda (2006) discorre que o LCE aparentemente gera diferentes tipos de medo e ansiedade, resultando em uma variabilidade complexa de interpretações sobre a interação dos fármacos, e, desta forma, o aparelho foi modificado para o Labirinto em T-Elevado (LTE). Com a proposta de avaliar o medo e a ansiedade em um único aparato e sob as mesmas condições experimentais, Asth et al. (2012) validaram a utilização do LTE para avaliação de memória e ansiedade simultaneamente em camundongos,

propondo sua maior exploração como um modelo potencial para o estudo comportamental.

Com base no pressuposto de que o medo condicionado está relacionado com o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), posto que drogas ansiolíticas prejudicam seu desempenho, e o medo incondicionado com o transtorno do pânico (TP), evidenciado pelo tratamento crônico com antidepressivos (GRAEFF, 2003), o LTE surgiu como um potencial modelo de avaliação dos dois comportamentos em um mesmo aparato. (GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993. VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994. ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 1997. CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Neste modelo, o medo condicionado é representado pela esQUIVA INIBITÓRIA, medida de latência do animal em alcançar um dos braços abertos, sendo colocado na extremidade do braço fechado, e o medo incondicionado é representado pela fuga da extremidade de um dos braços abertos para o braço fechado (TEIXEIRA; ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 2000).

Para avaliar a atividade locomotora dos animais, utilizamos o aparato Campo Aberto. Descrito por Hall na década de 1930, e estendido e modificado por Broaderhurst em 1960, o teste foi inicialmente utilizado para avaliar o estado motor e a emocionalidade de ratos. O termo emocionalidade expressa, segundo Hall, comportamentos derivados de sua exposição a um ambiente novo, como a imobilidade (LISTER, 1990). O aparelho original consiste de uma arena circular bem iluminada com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, circundada por uma parede circular de 0,45 m de altura. Normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como exploração horizontal (número de linhas cruzadas no chão da arena pelo animal), exploração vertical (número de elevações sobre

as patas traseiras), tempo de autolimpeza (grooming), defecação e tempo gasto para deixar a área central. Outros parâmetros de avaliação foram sendo gradativamente acrescentados ao teste, com a possibilidade de utilização de mais de 30 itens de avaliação (WALSH, 1976).

Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia (RAMOS et al., 1998. LISTER, 1990. PRUT; BELZUNG, 2003. CAROLA et al., 2002). Portanto, assim como no Labirinto em Cruz Elevado, a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade no Campo Aberto (CHOLERIS et al, 2001). Desta forma, tem sido proposto o emprego deste modelo na avaliação da ansiedade, considerando-se que um aumento na ambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade (LISTER, 1990. CHOLERIS et al, 2001). Entretanto, esta proposta tem sido criticada por alguns autores, principalmente pelo fato das medidas avaliadas poderem ser influenciadas por vários fatores outros além da própria ansiedade, como atividade locomotora e exploração. A novidade de uma primeira exposição pode gerar imobilidade ou extrema locomoção na periferia do aparelho (FILE, 2001).

O NTM é o único núcleo histaminérgico do sistema nervoso central e está localizado no hipotálamo posterior. Como previamente descrito, está também relacionado com a manutenção da vigília, sendo o principal inibidor do núcleo pré-óptico ventro-lateral (VLPO). Os neurônios histaminérgicos inervam praticamente o cérebro inteiro, incluindo a região da junção mesopontina responsável pelo sono REM. A atividade histaminérgica é promotora da vigília e lesões do NTM resultam em

hipersonolência. Por outro lado, durante o sono NREM e REM, a atividade histaminérgica é tonicamente inibida pelo VLPO (PACE-SCHOTT; HOBSON, 2001).

Desta forma, a fim de elucidar a relação entre as funções não motoras do cerebelo e o sistema histaminérgico neuronal, o presente estudo propôs a avaliação comportamental de camundongos submetidos ao LTE após microinjeção de histamina no vérmis cerebelar e a avaliação locomotora dos animais através do Campo Aberto.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 Geral:**

Investigar os efeitos do sistema histaminérgico cerebelar de camundongos, na consolidação da memória emocional (esquiva inibitória e fuga) no Labirinto em T-Elevado e atividade locomotora no Campo Aberto.

### **2.2 Específicos:**

I. Avaliar o efeito da histamina intravérmis cerebelar na consolidação da memória emocional no comportamento de fuga e atividade locomotora em camundongos no LTE e no Campo Aberto, respectivamente;

II. Avaliar o efeito da histamina intravérmis cerebelar na consolidação da memória emocional no comportamento de esquiva inibitória e atividade locomotora em camundongos no LTE e no Campo Aberto, respectivamente.



### 3. MATERIAIS E METÓDOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 192 camundongos, dos quais 111 chegaram ao final dos experimentos tendo o sítio de microinjeção confirmado e seus dados utilizados nas análises finais (Anexo A). Todos os camundongos utilizados apresentavam as seguintes características: machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Suíço Albino, pesando entre 25-35g e com idade entre 5 e 7 semanas (Figura 2). Os animais, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), SP, Brasil foram aclimatados no biotério do próprio Laboratório de Neurociências, situado no Departamento de Fisioterapia da mesma universidade em ambiente controlado (ciclo de luz de 12 horas, com as luzes acesas às 07:00, temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade de  $50 \pm 5\%$ ).



**Figura 2** – Camundongos machos da linhagem Suíço Albino

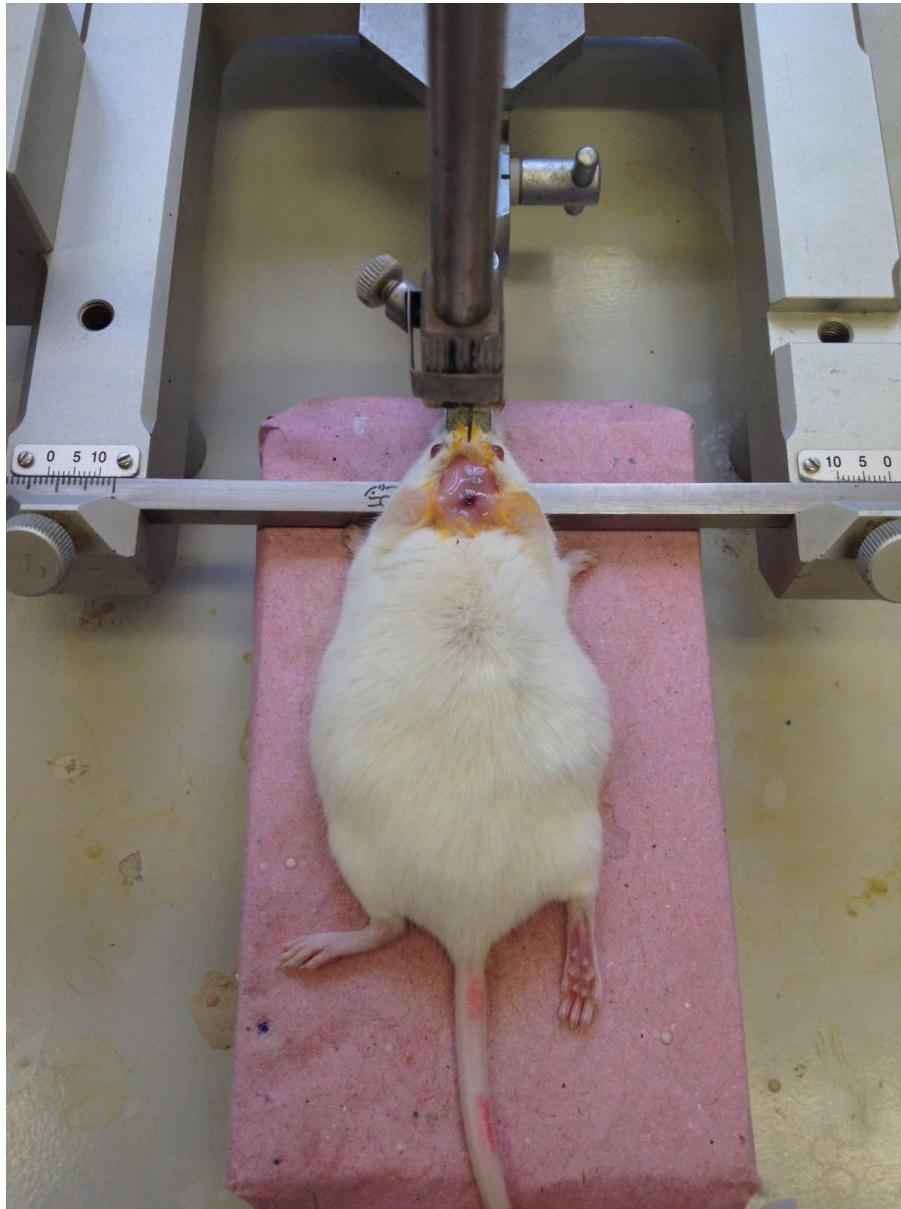
Os sujeitos experimentais permaneceram alojados em gaiolas (28x18x11cm) com capacidade para 5 indivíduos. Água e comida estiveram disponíveis *ad libitum* aos animais durante todo o estudo, exceto durante os períodos de testes. Todos os camundongos sobreviventes à cirurgia (n = 176) foram testados sendo experimentalmente ingênuos, e as sessões experimentais foram conduzidas durante o período do ciclo de luz (8:00 – 12:00) para minimizar a influência da variação do ritmo circadiano dada por respostas comportamentais.

O projeto recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar), parecer nº 012/2014 e protocolo de registro nº 012/2014 (Anexo B). Os preceitos especificados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) foram respeitados.

### **3.2 Cirurgia e microinjeção**

Os camundongos foram anestesiados via intraperitonal utilizando uma solução de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), além da administração de anestesia local (3% de lidocaína com norepinefrina 1: 50.000), e posicionados no aparelho estereotáxico Stoelting. Uma cânula guia de 7 mm de aço inoxidável (calibre 25) foi implantada no vérmis cerebelar de acordo com as seguintes coordenadas de Paxinos e Franklin (2001): 6,5mm posterior ao bregma, 0mm laterais à linha média e 2,0mm de medida ventral a partir da superfície do crânio (Figura 3). A cânula guia foi fixada ao crânio comacrílico dental e parafusos de joalheiro. Um mandril (fio de aço inoxidável de calibre 33) foi inserido na cânula guia para reduzir a incidência de oclusão e contaminação. A analgesia pós-operatória foi fornecida durante 3 dias, adicionando

acetaminofeno (200 mg/ml) em a água potável numa proporção de 0,2 ml de paracetamol para 250ml de água (a concentração final foi de 0,16 mg/mL).



**Figura 3** – Camundongo posicionado no aparelho estereotáxico

As drogas ou solução salina (SAL) foram infundidas no vérmis cerebelar utilizando uma agulha de micro-injecção (calibre 33), que se estendia de 2,0mm para

além da ponta da cânula guia. A unidade de microinjecção foi ligado a uma micro-seringa Hamilton através de um tubo de polietileno (PE-10), e uma bomba de infusão, que foi programada para administrar um volume de 0,5 mL ao longo de um período de 60s (GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011). Uma bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e após a infusão confirmou o fluxo da solução. A agulha foi mantida *in situ* por cerca de 60s a fim de facilitar a dispersão do veículo ou droga e evitar seu refluxo.

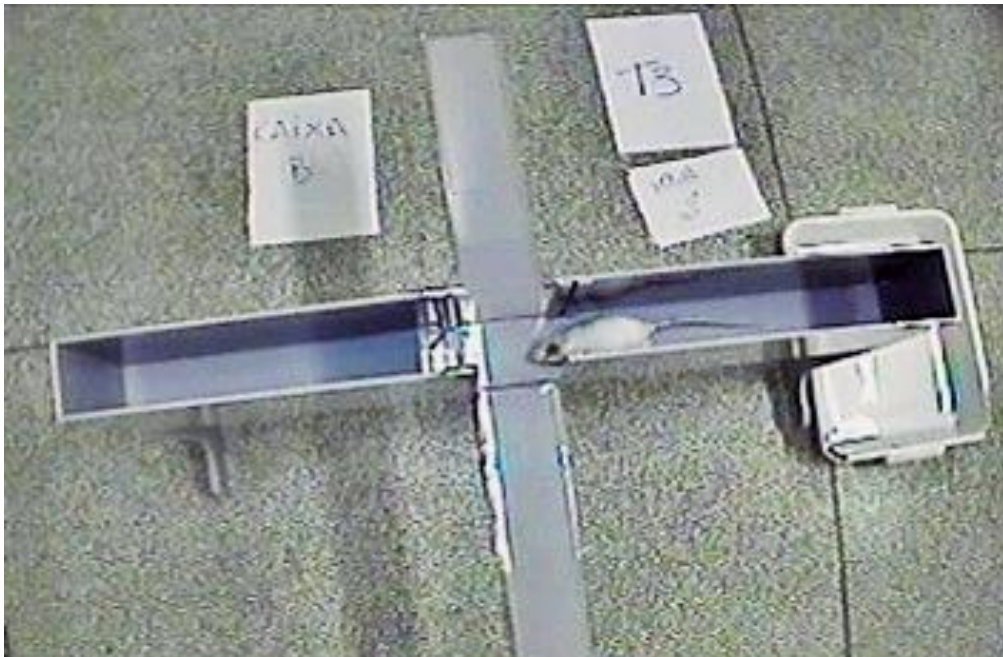
### **3.3 Tratamento Farmacológico**

Dicloridrato de histamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), nas doses 2.72 nmol, 4.07 nmol, 6.8 nmol e 13.6 nmol/0,5µl preparados num veículo de solução salina fisiológica a 0,9% estéril. A solução salina foi usada como controle experimental. As doses foram baseadas em estudos anteriores (GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011) e no estudo-piloto em nosso próprio laboratório. As soluções foram armazenadas sob refrigeração em tubos de identificação desconhecida pelo experimentador até o momento de análise dos dados.

### **3.4 Equipamentos e Procedimentos**

#### **3.4.1 Labirinto em T-Elevado**

Semelhante ao modelo adaptado para camundongos de Conde, Costa e Tomaz (1999), o aparato consiste em três braços de dimensões iguais (30x5cm), elevados a 30cm do solo. O braço fechado, delimitado por paredes laterais (15cm), é perpendicular a dois braços abertos (Figura 4).



**Figura 4** – Labirinto em T-Elevado.

O LTE permite a avaliação dos dois tipos diferentes de comportamento: esquivas inibitórias (medida por meio da latência do animal em alcançar um dos braços abertos, se posto inicialmente na extremidade do braço fechado) e a fuga (latência do animal em alcançar o braço fechado, sendo posicionado inicialmente na extremidade de um dos braços abertos). Como roedores têm aversão natural a ambientes desprotegidos e elevados, há preferência pelo braço fechado. A aprendizagem é medida pelo aumento do tempo que o animal leva para sair do braço fechado na esquivas inibitórias e a diminuição do tempo que o animal leva para sair de um dos braços abertos na avaliação de fuga, ao longo de três sucessivas tentativas na exposição (GRAEFF, 2003). A avaliação da consolidação da memória emocional foi testada através de uma única avaliação de saída do braço fechado (esquivas inibitórias) ou uma de saída de um dos

braços abertos (fuga), 24 horas após a primeira exposição. O ambiente de teste foi isolado do restante da sala. Uma câmera posicionada a 90° acima do labirinto e acoplada ao computador permitiu o registro das imagens.

### **3.4.2 Campo Aberto**

O equipamento consiste em uma arena de madeira quadrada (52x52cm), com paredes opacas de 27cm de altura e piso dividido em 25 quadrantes iguais de 10x10cm (Figura 5). Após a reexposição ao LTE, o animal foi posicionado no centro da arena, e sua atividade locomotora avaliada, no intervalo de 300 segundos. Os parâmetros de avaliação utilizados foram o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal), número de elevações (exploração vertical) e tempo de permanência no centro da arena durante o tempo determinado.



*Figura 5 – Campo Aberto.*

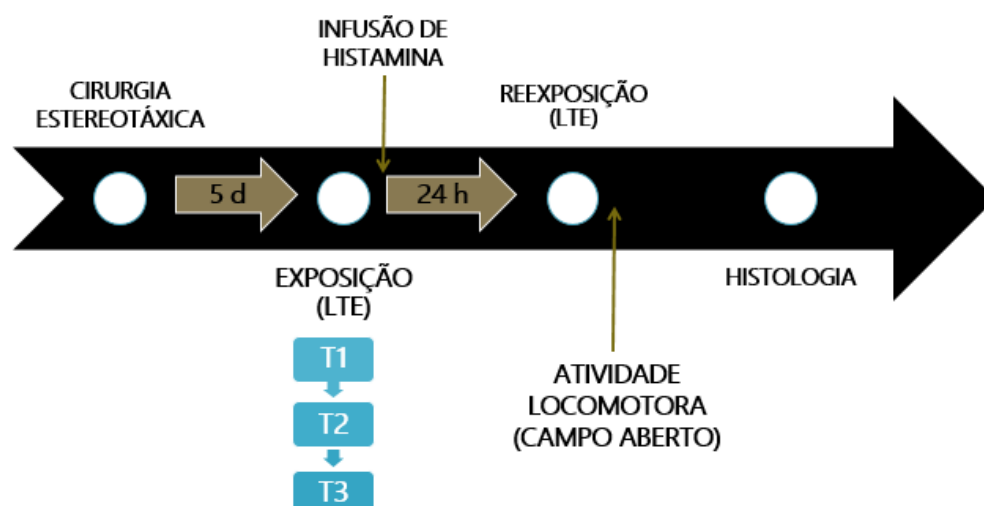
### 3.5 Delineamento do estudo

O protocolo experimental foi baseado no relatório de Teixeira, Zangrossi Jr. e Graeff (2000), adaptado para camundongos por Asth et al (2012) e testado em estudo piloto em nosso laboratório. O delineamento do estudo está representado na figura 6. Cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram transportados para a sala de testes e deixados em repouso durante pelo menos 30 minutos antes dos experimentos para habituação.

No **Experimento I**, com o objetivo de avaliar o efeito da histamina no comportamento de fuga no LTE, os animais foram expostos ao aparato três vezes consecutivas, com intervalos de 30 segundos entre as exposições, na extremidade de um

dos braços abertos. A medida de latência de saída, com as quatro patas, foi utilizada como parâmetro de comparação com a reexposição. Imediatamente após a última exposição ao labirinto, os camundongos receberam microinfusão, no vérmis cerebelar, de HA (2.72 nmol, 4.07 nmol, 6.8 nmol e 13.6 nmol/0,5µl) ou solução salina. Vinte e quatro horas após a primeira exposição ao LTE, os animais foram reexpostos ao mesmo braço aberto e sua medida de latência de saída, com as quatro patas, para o braço fechado, foi medida apenas uma vez. A diminuição da latência de saída do braço aberto na reexposição em relação ao primeiro dia foi utilizada como medida de consolidação da memória nos animais.

Logo após o teste no LTE, a atividade locomotora dos camundongos foi avaliada utilizando o campo aberto. Durante 5 minutos, os animais puderam explorar livremente a arena. O equipamento foi limpo com uma solução de etanol a 5% entre cada animal para evitar transferência de odor.



**Figura 6** – Delineamento do Estudo.



No **Experimento II**, com o objetivo de avaliar o efeito da histamina no comportamento de esquivas inibitória no LTE, os animais foram expostos ao aparato três vezes consecutivas, com intervalos de 30 segundos entre as exposições, na extremidade do braço fechado e sua medida de latência de saída, com as quatro patas, foi mensurada. Imediatamente após a última exposição ao labirinto, os animais receberam microinjeção e reexpostos 24h ao aparato depois, seguindo os procedimentos do experimento I. O aumento da latência de saída do braço fechado da reexposição em relação ao primeiro dia foi utilizado como medida de consolidação da memória nos animais.

### 3.6 Grupos Experimentais

***Tabela 1 – Experimento I: Efeito histaminérgico na consolidação da memória emocional no comportamento de Fuga no LTE***

<b><i>GRUPOS EXPERIMENTAIS</i></b>	<b>N</b>	<b>FÁRMACOS</b>
<b><i>GRUPO 1</i></b>	11	SAL
<b><i>GRUPO 2</i></b>	10	2.72 nmol/0,5µl
<b><i>GRUPO 3</i></b>	10	4.07 nmol/0,5µl
<b><i>GRUPO 4</i></b>	11	6.8 nmol/0,5µl
<b><i>GRUPO 5</i></b>	10	13.6 nmol/0,5µl

**Tabela 2 – Experimento II: Efeito histaminérgico na consolidação da memória emocional no comportamento de Esquiva Inibitória no LTE**

<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>N</b>	<b>FÁRMACOS</b>
<b>GRUPO 1</b>	12	SAL
<b>GRUPO 2</b>	12	2.72 nmol/0,5µl
<b>GRUPO 3</b>	12	4.07 nmol/0,5µl
<b>GRUPO 4</b>	12	6.8 nmol/0,5µl
<b>GRUPO 5</b>	11	13.6 nmol/0,5µl

### **3.7 Histologia**

Ao final dos experimentos, todos os animais receberam uma infusão de 0,1ul de 1% de azul de metileno de acordo com o procedimento da infusão das drogas, descrito acima. Após receberem uma dose superior do anestésico pentobarbital sódico, os animais foram decapitados e seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Posteriormente, os encéfalos foram seccionados coronalmente (80µm) ao longo do trajeto da cânula, utilizando um micrótomo criostato (criostato ANCAP 300). As secções foram inspecionadas através de um microscópio (Olympus B202), com a visualização da dispersão do azul de metileno indicando o local da injeção, segundo as coordenadas de Paxinos e Franklin (2001).

Foram excluídos os dados dos animais com locais de injeção fora vermis cerebelar. O tamanho da amostra final de cada corte variou entre 6 e 13. A análise

histológica confirmou que um total de 111 camundongos tiveram o posicionamento preciso da cânula, principalmente nas coordenadas 6.24 e 6.36. Os dados registrados por animal estão descritos no Anexo C.

### **3.8 Análise Estatística**

Todos os resultados foram inicialmente convertidos em Log10 e submetidos ao teste de Levene para verificar homogeneidade da amostra. Os dados foram então analisados através do teste de análise de variância de duas vias (ANOVA Two-way). Quando identificada diferença significativa nos valores de F, os dados foram analisados pelo post-hoc de Duncan. Valores de  $p \leq 0,05$  foram adotados como nível de significância.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Experimento I

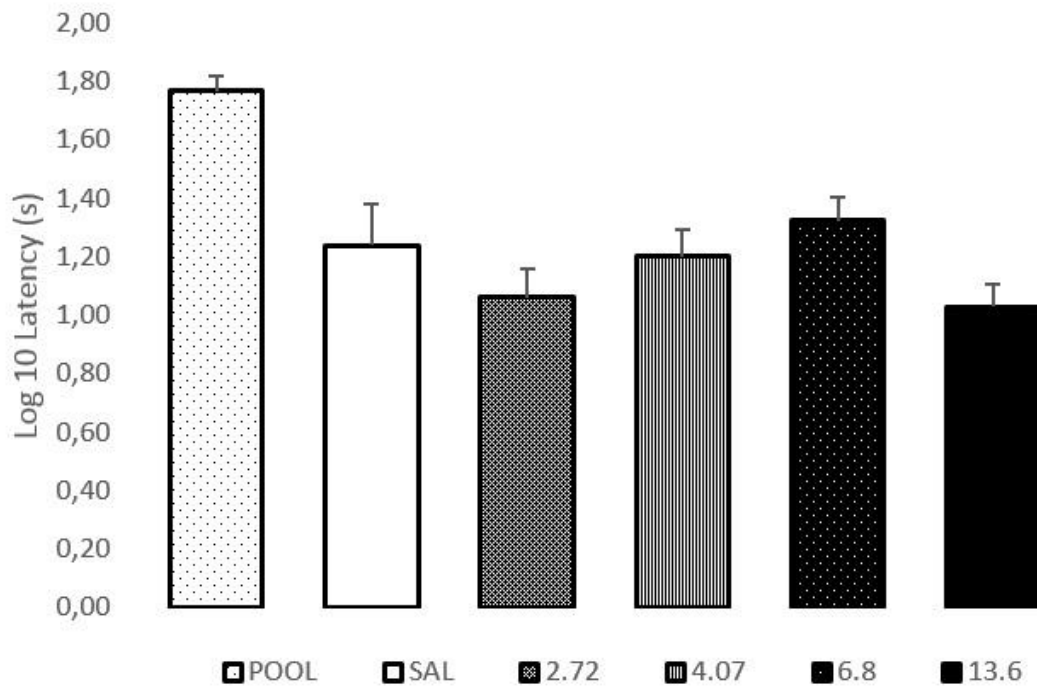
Os resultados mostram o efeito da histamina sobre a consolidação da memória emocional no comportamento de fuga no LTE.

A análise de variância ANOVA de duas vias indicou que não houve diferença significativa entre os animais expostos ao LTE sem tratamento farmacológico (grupo controle) para todas as medidas avaliadas (Tabela 3), o que permitiu utilizar os resultados de T1 como Pool para as análises seguintes.

***Tabela 3: Valores de ANOVA 2 vias para as variáveis do experimento 1 analisadas na exposição sem tratamento farmacológico***

<i>Medida</i>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
<i>Tempo de saída do braço aberto do LTE</i>	0.993081	0.420667

Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos entre o grupo que recebeu solução salina (grupo controle) e os grupos que receberam microinjeção de histamina em todas as doses ( $F_{4,47} = 1.714, p > 0.05$ ), o que sugere que a histamina não afetou a consolidação da memória no comportamento de fuga no LTE nas doses utilizadas neste estudo (Figura 7).



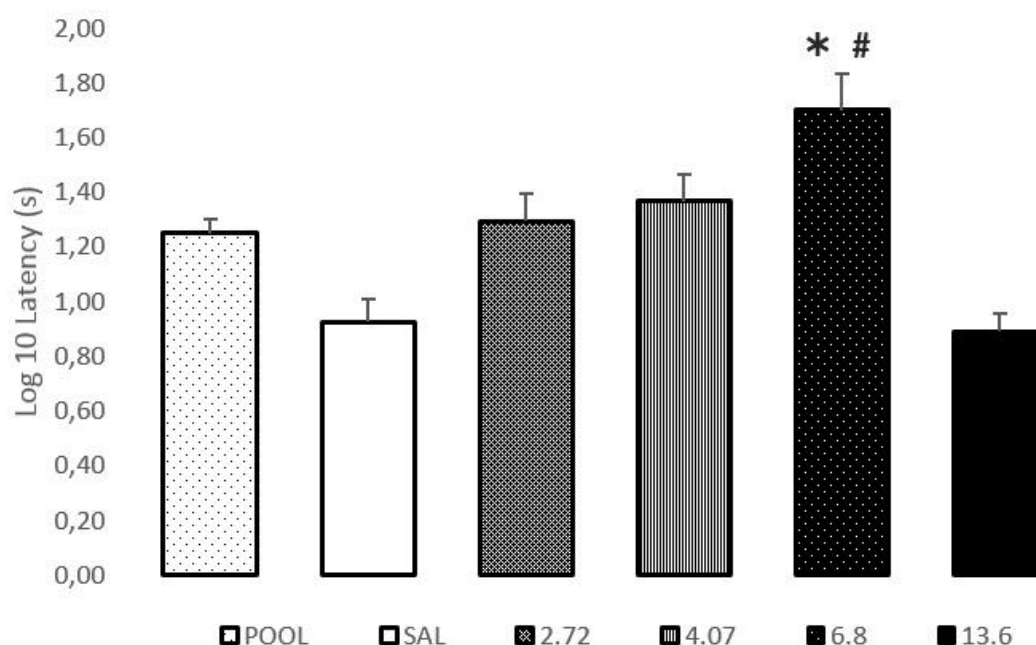
**Figura 7:** Latência de saída dos braços abertos (fuga) de camundongos no Labirinto em T-elevado (POOL), quando comparados com a latência de saída dos braços abertos 24 horas após da administração da solução salina ou de histamina nas doses 2.72 nmol, 4.07 nmol, 6.8 nmol e 13.6 nmol/0,5 $\mu$ l.

## 4.2 Experimento II

Os resultados mostram o efeito da histamina sobre a consolidação da memória emocional no comportamento de esQUIVA inibitória no LTE.

A análise estatística mostrou uma diferença significativa apenas entre o grupo controle e o grupo histamina na dose 6.8 nmol/0,5 $\mu$ l, ( $F_{4,54} = 7.117$ ,  $p < 0.0001$ ) onde o teste de Duncan revelou um aumento significativo da latência de saída do braço fechado no segundo dia ( $p = 0,000804$ ). Além disso, houve diferença significativa entre esta dose e todos os outros grupos analisados ( $p < 0.05$ ). Este resultado sugere que a

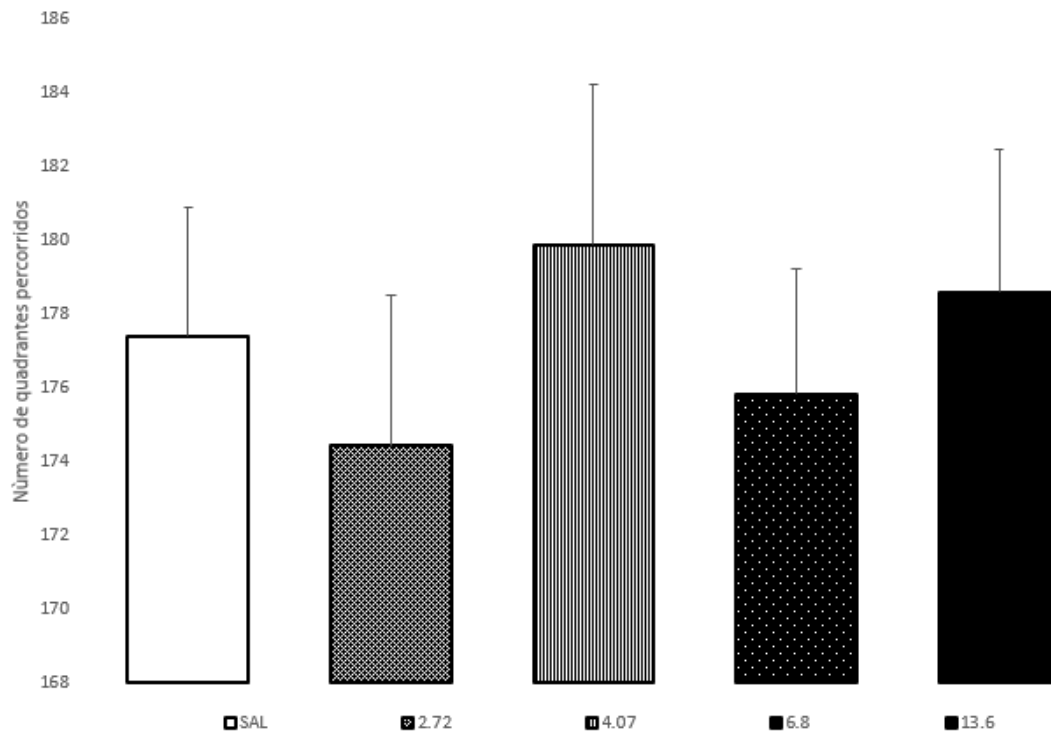
histamina facilita a consolidação da memória no comportamento de esQUIVA inibitória em camundongos na dose 6.8 nmol/0,5µl (Figura 8).



**Figura 8:** Latência de saída dos braços fechados (esQUIVA inibitória) de camundongos no Labirinto em T-elevado (POOL), quando comparado com a latência de saída dos braços fechados 24 horas após da administração de solução salina ou de histamina nas doses de 2.72 nmol, 4.07 nmol, 6.8 nmol e 13.6 nmol/0,5µl. \* Representa diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ); # Representa diferença significativa em relação a todos os outros grupos.

Os resultados do campo aberto não mostraram diferença significativa entre nenhum dos grupos ( $F_{4,106}=0,3349$ ,  $p > 0,05$ ), sugerindo que a histamina, administrada 24h antes do teste, não apresentou efeitos adversos sobre a locomoção dos camundongos (Figura 9). No entanto, o tempo de permanência na área central nos

grupos Salina e na dose mais alta (13.6nmol) foi significativamente maior em relação aos demais grupos ( $p<0,05$ ).



**Figura 9** – Número de quadrantes percorridos no Campo Aberto 24h após a administração de histamina (2.72 nmol, 4.07 nmol, 6.8 nmol e 13.6 nmol/0,5 $\mu$ l) e imediatamente após a última exposição ao LTE.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do Experimento I não mostraram diferença significativa entre o grupo controle e as doses utilizadas no comportamento de fuga em camundongos, analisada através do LTE. A fuga medida no LTE pode servir como um modelo animal de pânico, evidenciada pela redução de latência de saída dos braços abertos após administração aguda de benzodiazepínicos em doses não-sedativas (MOCHCOVITCH, NARDI, 2010). Em todas as doses utilizadas em nosso estudo, houve declínio de latência de saída do braço aberto, bem como no grupo controle, sugerindo que não houve efeito da histamina intracerebelar na consolidação da memória emocional em camundongos em nossas condições experimentais.

Estes resultados concordam com o estudo de Carvalho-Neto e Nunes-de-Souza (2004). Os autores discorrem que não há diferença significativa na latência para deixar o braço aberto ao longo de cinco exposições, o que sugere que não há habituação à fuga do braço aberto e, portanto, a latência para abandonar o braço aberto não é um parâmetro útil para avaliar o medo incondicionado nesta espécie. Jardim et al (1999) observaram que a latência para abandonar o braço aberto é bastante semelhante à latência para abandonar o braço fechado pela primeira vez (latência da linha de base), sugerindo que os camundongos não fogem do braço aberto.

No teste de campo aberto, realizado imediatamente após a última exposição ao LTE, não houve diferença significativa entre o número de quadrantes percorridos, exploração central ou elevações dos animais, em todos os grupos avaliados. Estes resultados indicam que a microinjeção de histamina no vérmis cerebelar dos



camundongos, vinte e quatro horas anteriores à reexposição no labirinto, não afetou sua atividade locomotora.

No experimento II, foi avaliada a esQUIVA inibitória no mesmo aparato, utilizando diferentes animais. Os resultados mostraram aumento da latência de saída do braço fechado 24h após a administração de histamina na dose 6.8 nmol em comparação ao grupo controle, o que sugere um efeito facilitatório sobre a memória emocional de camundongos nesta dose.

Na esQUIVA inibitória, medida através da latência de saída do braço fechado no LTE, os animais evitam os braços abertos (Zangrossi Jr, Graeff, 1997). Quando reexpostos no aparato, 24h após o treino, o aumento da latência para sair do braço fechado para um dos braços abertos sugere a consolidação da memória emocional. Durante a sessão de treino no primeiro dia, os animais aprendem a discriminar entre os braços abertos e o fechado e expressam sua escolha com base na experiência prévia (ASTH et al, 2012).

O efeito facilitatório da microinjeção de histamina no vérmis cerebelar de camundongos na esQUIVA inibitória foi documentada por Gianlorenço, Canto-de-Souza e Mattioli (2013) no LCE. A resposta foi uma curva de dose-efeito não-linear em U invertido, e o pré-tratamento com o antagonista de H<sub>2</sub>, ranitidina, aboliu este efeito, enquanto a microinfusão combinada com antagonista de H<sub>1</sub>, clorfeniramina, não foi capaz de prevenir o efeito facilitatório da histamina.

Além disso, encontramos uma diminuição da latência de saída do braço fechado no segundo dia, em relação à primeira exposição, em camundongos submetidos

ao labirinto, somente no grupo controle. Este resultado surpreendeu, uma vez que um aumento de latência de esquiva tem sido relatado em roedores (TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000. CARVALHO-NETO; NUNES-DE-SOUZA, 2004. ASTH et al, 2012).

Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza (2004) mostraram, em seu estudo sobre protocolos utilizando o LTE para avaliação de ansiedade e memória em camundongos, uma maior expressão dos resultados quando o aparato possui paredes translúcidas, em comparação ao labirinto com paredes opacas, uma vez que a baixa da latência para deixar o braço fechado, com aumento gradual ao longo das exposições, e a diminuição da latência para deixar o braço aberto são importantes para demonstrar o aprendizado nos testes de esquiva inibitória e fuga, respectivamente. O mesmo autor sugere que o aumento do número de exposições (cinco em vez de três exposições) no braço fechado auxilia a aquisição da memória dos animais, enquanto o aumento no número de exposições para o grupo de fuga não mostrou diferença entre três ou cinco exposições.

Os presentes resultados podem ser atribuídos a uma característica desta espécie, ou seja, o comportamento exploratório em camundongos pode ser mais evidente do que o medo do braço aberto do LTE, uma vez que os camundongos tem um comportamento exploratório mais ativo do que os demais roedores. Panksepp (2010) explica o comportamento com a teoria que engloba um dos quatro instintos básicos de sobrevivência em mamíferos, o “Seeking System”. Segundo o autor, o animal pode tornar-se extremamente interessado em explorar e/ou cumprir uma determinada tarefa em uma situação de conflito. Coenen e Schlaepfer (2012) salientam que o sistema não responde apenas a incentivos positivos, mas a conflitos emocionais em que os animais

precisam procurar soluções para o problema, como em situações de avaliação de risco nos braços abertos.

No teste de campo aberto, realizado imediatamente após a última exposição ao LTE, não houve diferença significativa entre o número de quadrantes percorridos em todos os grupos avaliados. Estes resultados indicam que a microinjeção de histamina no vérmis cerebelar dos camundongos, vinte e quatro horas anteriores à reexposição no labirinto, não afetou sua atividade locomotora geral. No entanto, o tempo de permanência na área central nos grupos Controle (SAL) e na dose 13.6nmol foi significativamente maior que os demais, o que suporta a teoria de que o instinto de exploração/forrageamento se sobrepõe ao medo do espaço aberto.

File (2001), encontrou, através do emprego da análise fatorial, que a variável locomoção na porção central do Campo Aberto contribui para o mesmo fator no qual estão as medidas de ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado, para ratos machos, enquanto que para as fêmeas, estas mesmas variáveis pesaram mais no fator locomoção. Lacerda (2006), em seu estudo sobre efeito de ansiolíticos no Campo Aberto, por outro lado discute que nas doses mais altas, o efeito pode ser inespecífico, uma vez que o diazepam poderia sedar os animais e o pentilenotretazol poderia causar alterações fisiológicas que se confundiriam com manifestações pré-convulsivantes competindo com outros comportamentos. Portanto, o emprego da ambulação central no Campo Aberto como índice de ansiedade é uma questão ainda em discussão.

Desta forma, sugerimos o uso do aparato como um potencial método de avaliação para estudos de hiperatividade em camundongos.

## **6. CONCLUSÕES**

Em síntese, os resultados do presente estudo sugerem que a histamina tem efeito facilitatório sobre a memória emocional de camundongos submetidos ao teste de esquiva inibitória pelo LTE e não possui efeito sobre a memória emocional no comportamento de fuga. Por fim, sugerimos o uso do aparato como um método de avaliação para estudos de hiperatividade em camundongos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. ASTH, L et al. The elevated T-maze task as an animal model to simultaneously investigate the effects of drugs on long-term memory and anxiety in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 87, p. 526–533, fevereiro, 2012.
2. BALDAÇARA, L. et al. Cerebellum and psychiatric disorders. **Rev Bras Psiquiatr**, V. 30(3), P. 281-289, 2008.
3. BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HAAS, H. L. The physiology of brain histamine. **Prog Neurobiol**, v. 63, p. 637–672, 2001.
4. CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on, **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 29, nº8, p. 1193–1205, 2005.
5. CAROLA, V. et al Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behavioral Brain Research** v. 134 p. 49-57, 2002.
6. CARVALHO-NETO, E. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 148 p. 119–132, 2004.
7. CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25 p. 235-260, 2001.
8. COENEN, V.A.; SCHLAEPFER, T.E. Panksepp's SEEKING System concepts and their implications for the treatment of depression with deep-brain

- stimulation. *Neuropsychanalysis: An Interdisciplinary Journal for Psychoanalysis the Neurosciences*, v. 14(1), pp. 2044-3978; 2012.
9. CONDE, C. A; COSTA, V.; TOMAZ, C. Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure, **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 63(1), p. 63–69, 1999.
  10. CUTHBERT, B.N. et al. The psychophysiology of anxiety disorder: Fear memory imagery. **Psychophysiology**, v. 40, p. 407–422, 2003.
  11. DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In: Aggleton, JP., editor. *The Amygdala: a functional analysis*. Oxford. **Oxford University Press**, p. 213-287, 2000.
  12. DERE, E. et al. Neuronal Histamine and the Interplay of Memory, Reinforcement and Emotions. **Behav Brain Res**, v. 215, nº 2, p. 209-220, 2010.
  13. FILE, SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 125 p. 151- 157, 2001.
  14. GALEOTTI, M.D.; SANNA, C.; GHELARDINI, C. Pleiotropic effect of histamine H<sub>4</sub> receptor modulation in the central nervous system, **Neuropharmacology**, v. 71, p. 141–147, 2013.
  15. GIANLORENÇO, A. C. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. **Brain Res Bull**, v. 86, p. 134-138, 2011.
  16. GIANLORENÇO, A. C. L.; SERAFIM, K. R.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Emotional memory consolidation impairment induced by

- histamine is mediated by H1 but not H2 receptors. **Brain Research Bulletin**, v. 89, p. 197–202, 2012.
17. GIANLORENÇO, CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Intra-cerebellar microinjection of histamine enhances memory consolidation of inhibitory avoidance learning in mice via H<sub>2</sub> receptors, **Neurosci. Lett**, v. 557, p. 159–164, 2013.
  18. GIANLORENÇO, A.C.L. et al. Cerebellar vermis H<sub>2</sub> receptors mediate fear memory consolidation in mice, **Neuroscience Letters** v. 587, p. 57–61, 2015.
  19. GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: Effect of diazepam. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 26, P. 67–70, 1993.
  20. GRAEFF, F. G. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Rev Bras Psiquiatr**, 25(Supl II):42-5, 2003.
  21. HAAS, H. L.; SERGEEVA O. A.; SELBACH, O. Histamine in the Nervous System **Physiol Rev**, v. 88, p. 1183–1241, 2008.
  22. HANDLEY, S. L. Serotonin in animal models of anxiety: The importance of stimulus and response. **Biomedical**, p. 89-115, 1991.
  23. HOLMES, G. The cerebellum of man. **Brain**, v. 62, p. 1–30, 1939.
  24. JACOBSON, L.H.; CRYAN, J.F. Genetic approaches to modeling anxiety in animals. In: Stein MB, Steckler T, eds. **Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment**. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; p. 161-201, 2009.

25. JARDIM, M.C. et al. Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. **Brain Res Bull**, v. 48, p. 407–411, 1999.
26. JEREMY, D.; SCHMAHMANN, M. D. The Cerebellum in behavioral Neurology and Neuropsychiatry. **Spring - The Official Publication of the National Ataxia Foundation**, v. 36, n° 1, 2008.
27. JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Histamine in chronic allergic responses. **J Invest Allergy Clin Immunol**. v. 15, p. 1-8, 2005.
28. LACERDA, G. F. M. L. Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial, 2006, 74 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
29. LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 46, p. 321-340, 1990.
30. KOHLER, C.A. et al. Histaminergic Mechanisms for Modulation of Memory Systems. **Neural Plasticity**, v. 2011, 2011.
31. McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci. Biobehav**, v. 28, n. 3, p. 285–305, 2004.
32. MOCHCOVITCH, M.D.; NARDI, A.E. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in the treatment of panic disorder: A systematic review of placebo-controlled studies. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 10, p. 1285-1293, 2010.
33. PACE-SCHOTT, E.F.; HOBSON, J.A. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. **Nat Rev Neurosci**, v. 3(9), p. 591-605, 2001.



34. PANKSEPP, J. Evolutionary substrates of addiction: The neurochemistries of pleasure seeking and social bonding in the mammalian brain. Kassel, Jon D. (Ed). Substance abuse and emotion. Washington, DC, US: American Psychological Association, XII, p. 137-167, 2010.
35. PANULA, P.; YANG, H-YT.; COSTA, E. Histamine-containing neurons in rat hypothalamus. Proceeding of National Academy of Science of the United States of America, v. 81, p. 2572-2576, 1984.
36. PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. Elsevier Science, California, 2001.
37. PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology** 60061:1-31, 2003.
38. RAMOS, A et al. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. [Behavioural Brain Research](#), v. **96**, p. 195–205, 1998.
39. SCHMAHMANN, J.D. The primary motor cerebellum is in the anterior lobe but not the posterior lobe: Evidence from stroke patients. **Neurology** v. 68, p. 357, 2007.
40. TEIXEIRA, A. C.; ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral Effects of Acute and Chronic Imipramine in the Elevated T-Maze Model of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, No. 4, pp. 571–576, 2000.

41. VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: A new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n°3, p. 549-554, novembro, 1994.
42. WADA, H.; INAGAKI, N.; YAMATODANI, A.; WATANABE, T. Is the histaminergic neurons system a regulatory centre for whole-brain activity? **Trends Neuroscience**, 14: 415-418; 1991.
43. WALSH R.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**. v. 83(3): p. 482-504, 1976.
44. WEISBERG, R.B. Overview of generalized anxiety disorder: epidemiology, presentation, and course. **J Clin Psychiatry**, v. 70, p. 4–9, 2009.
45. VICTOR, A.M.; BERNSTEIN, G.A. Anxiety disorders and posttraumatic stress disorder update. **Psychiatr Clin North Am**, v. 32, p. 57–69, 2009.
46. ZANGROSSI, H. JR.; GRAEFF, F. G. A behavioral validation of the elevated T-maze: A new animal model of anxiety. **Brain Res. Bull.** v. 44, p. 1–5; 1997.

**ANEXO A – MISSING**

<b>MOTIVO</b>	<b>N</b>
<b>Morte durante a cirurgia</b>	<b>16</b>
<b>Cânula posicionada fora do sítio de implantação</b>	<b>4</b>
<b>Animais fora do peso estabelecido</b>	<b>4</b>
<b>Perda de capacete durante os testes</b>	<b>29</b>
<b>Cânula obstruída</b>	<b>20</b>
<b>Comportamento <i>outlayer</i></b>	<b>5</b>

**N inicial: 192****N final: 111**

## ANEXO B

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de  
São Carlos (CEUA/UFSCar)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 678  
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679  
Fax: (016) 3351.8025  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

---

**Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**nº 012/2014**

Protocolo nº. 012/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *Papel histaminérgico cerebelar na consolidação da memória emocional e atividade locomotora em camundongos no labirinto em T-Elevado*, submetido pelo pesquisador **Bruna Silva Marques**.

São Carlos, 09 de junho de 2014

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

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

**ANEXO C – SÍTIO DE IMPLANTAÇÃO DAS CÂNULAS CONFIRMADAS  
PELA HISTOLOGIA NO VÉRMIIS CEREBELAR**

Experimento I – Fuga

<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
6,36	6,24	6,36	6,36	6,24
6,36	6,36	6,36	6,24	6,24
6,24	6,48	6,36	6,24	6,36
6,48	6,24	6,24	6,24	6,48
6,36	6,24	6,48	6,36	6,48
6,24	6,36	6,24	6,36	6,36
6,36	6,24	6,36	6,48	6,24
6,36	6,36	6,24	6,36	6,36
6,36	6,48	6,24	6,36	6,24
6,24	6,24	6,36	6,48	6,48
6,24	---	----	6,24	----

## Experimento II – Esquiva inibitória

<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
6,48	6,24	6,24	6,36	6,24
6,24	6,36	6,24	6,36	6,48
6,24	6,24	6,48	6,36	6,36
6,48	6,36	6,36	6,48	6,24
6,24	6,24	6,48	6,48	6,24
6,24	6,36	6,36	6,24	6,36
6,36	6,24	6,36	6,24	6,24
6,36	6,24	6,36	6,36	6,24
6,24	6,48	6,24	6,48	6,24
6,36	6,36	6,24	6,48	6,36
6,24	6,36	6,36	6,24	6,36
6,24	6,48	6,24	6,24	---