

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

**MODULAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL EM
CAMUNDONGOS: ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS SISTEMAS
HISTAMINÉRGICO E COLINÉRGICO NA AMÍDALA**

CARLOS EDUARDO MONICI FERNANDES

São Carlos
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

**MODULAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL EM
CAMUNDONGOS: ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS SISTEMAS
HISTAMINÉRGICO E COLINÉRGICO NA AMÍDALA**

Carlos Eduardo Monici Fernandes

Dissertação de Mestrado 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: Profa. Dra. Rosana Mattioli

São Carlos
2015

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

F363mm Fernandes, Carlos Eduardo Monici.
Modulação da memória emocional em camundongos :
análise da interação dos sistemas histaminérgico e
colinérgico na amígdala / Carlos Eduardo Monici Fernandes. -
- São Carlos : UFSCar, 2015.
58 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Fisioterapia. 2. Clorfeniramina. 3. PNU-282987. 4.
Memória emocional. 5. Amígdala. 6. Labirinto em cruz
elevado. I. Título.

CDD: 615.82 (20^a)




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 Carlos Eduardo Monici Fernandes, realizada em 06/02/2015:



Prof. Dra. Rosana Mattioli
UFSCar



Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP



Prof. Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço
UFSCar

*Dedico este trabalho a Deus, minha família,
professores e a todos que acreditaram em
mim desde o início da jornada.*

AGRADECIMENTOS

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

À minha vitoriosa e amada Mãe por me ensinar e me educar. A caminhada continua e a jornada será longa, mas vencerei pela área em que meu Avô triunfou.

Às minhas Irmãs por estarem sempre comigo. Nossa família e nossos valores estarão acima de tudo.

Ao meu Pai, pela força e torcida continua para que eu encontre o meu caminho.

À Lucyla, por todo amor e companheirismo dedicado a mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Rosana Matioli. A você dedico a minha admiração e consideração. Obrigado por tudo.

À Profa. Dra. Luciana Auxiliadora de Paula Vasconcelos, por iniciar-me nesta vida acadêmica. Sempre terei um enorme carinho por você.

Às amigas formadas durante toda minha vida e em especial aos colegas de laboratório: Carol, Fer, Lucas, Bruna e Jorge. Pessoas que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me quando necessário, tornando-se parte da minha história e do meu crescimento.

À Dra. Kelly Regina Serafim, pois sem você, este trabalho jamais seria realizado. Obrigado por guiar-me quando não achava o caminho, por mostrar-se sempre presente e disposta a ajudar, tornando-se uma querida amiga que levarei por toda a minha vida.

À Tereza, por todo auxílio técnico e colaboração.

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do sonho uma ponte. Fica a promessa do reencontro, fica o desejo de boa sorte, fica a vontade de que lutes e venças”.

Fernando Sabino

CONTEXTUALIZAÇÃO

Os experimentos do presente trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob a orientação da Profa. Dra. Rosana Mattioli. A análise histológica do presente trabalho foi realizada no Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) do Departamento de Psicologia da UFSCar, sob a orientação da Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFSCar. Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Processo 2012/10913-0) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Processo 300543/2010-7).

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram verificar os efeitos das microinjeções bilaterais de agonista colinérgico nicotínico PNU-282987, na amígdala, sobre a ansiedade e memória emocional, e analisar se as microinjeções do PNU-282987 revertem o efeito amnésico provocado pelo antagonista histaminérgico H1 Clorfeniramina (CPA) em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Para essas investigações foram realizados dois experimentos. Foram utilizados 79 camundongos da cepa Suíço-Albino, machos, pesando entre 25 e 40g. O teste comportamental foi realizado em dois dias consecutivos: T1 e T2. No experimento 1, os animais receberam microinjeções bilaterais intra-amígdala de salina (SAL) ou PNU (0,1 nmol) pré-T1 e pré-T2. Após cinco minutos da microinjeção, os animais foram expostos ao LCE. Foram formados quatro grupos experimentais: SAL-SAL; SAL-PNU; PNU-SAL; PNU-PNU. No experimento 2, os animais receberam microinjeções combinadas bilaterais intra-amígdala de CPA (0,16 nmol) ou PNU (0,1 nmol) apenas pré-T1. Após cinco minutos os animais foram expostos ao LCE; em T2 houve apenas a reexposição. Foram formados quatro grupos experimentais: SAL-SAL; PNU-SAL; CPA-SAL; CPA-PNU. Os dados foram analisados usando a ANOVA de duas vias e o teste *post hoc* Duncan. A ANOVA não mostrou diferenças significativas entre os grupos em T1 para as medidas de ansiedade [% entradas nos braços abertos (%EBA); % tempo gasto nos braços abertos (%TBA), $p > 0,05$]. O PNU, microinjetado *per se*, não apresentou efeitos na aquisição da memória emocional, entretanto no experimento 2, as microinjeções combinadas de PNU e CPA, foram capazes de reverter o déficit na memória induzido pela CPA (ANOVA, $p < 0,05$), sugerindo a interação entre esses sistemas na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. Não houve mudanças significativas nas entradas dos braços fechados (ANOVA, $p > 0,05$), medida representativa da atividade locomotora. Os resultados do presente estudo sugerem que as microinjeções do PNU-282987 intra-amígdala não apresentaram efeitos sobre a aquisição da memória emocional, entretanto houve uma interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico na amígdala na modulação da aquisição da memória emocional em camundongos reexpostos ao LCE.

Palavras-chave: clorfeniramina, PNU-282987, memória emocional, amígdala, camundongo, labirinto em cruz elevado.

ABSTRACT

This study investigated the effects of bilateral intra-amygdala microinjections of PNU-282987, which is a nicotinic cholinergic agonist, on anxiety and emotional memory as well as the reversal of amnesia induced by an H1 histaminergic antagonist (CPA) in mice subjected to the elevated plus-maze (EPM). For this purpose, two experiments were performed. The subjects were seventy-nine adult male Swiss mice weighing 25-40g at testing. Behavioral testing was performed on two consecutive days (T1 and T2). In both experiments, the drugs were administered prior to testing. In Experiment 1, the animals received bilateral microinjections of saline (SAL) or PNU-282987 (0.1 nmol) and four experimental groups were tested; i.e., SAL-SAL, SAL-PNU, PNU-SAL and PNU-PNU groups. In Experiment 2, the animals received combined bilateral microinjections of CPA (0.16 nmol) and PNU-282987 on T1 and they were re-exposed to the EPM 24 hours later. Four experimental groups were tested; i.e., SAL-SAL, PNU-SAL, CPA-SAL and CPA-PNU groups. ANOVA followed by Duncan's tests revealed no significant differences between the SAL and treated groups at T1 in the measurements of anxiety (i.e., % open arm entries and % open arm time, ANOVA, $p > 0.05$), which indicates that the CPA and PNU did not induce effects on anxiety. The isolated microinjections of PNU-282987 did not produce effects on emotional memory; however, the combined microinjections of PNU-282987 and CPA were able to reverse the deficit in memory induced by CPA (ANOVA, $p < 0.05$). There were no significant changes in the numbers of enclosed arm entries which served as a measure of locomotor activity (ANOVA, $p > 0.05$). Taken together, these results suggest that intra-amygdala injections of PNU-282987 did not induce effects on anxiety and emotional memory *per se*; however, the combined injections of CPA and PNU-282987 reversed the amnesic effects caused by CPA, which is suggestive of an interaction between the histaminergic and cholinergic systems in the modulation of emotion memory acquisition in mice subjected to the EPM.

Keywords: chlorpheniramine, PNU-282987, emotional memory, amygdala, mice, elevated plus-maze.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 1. Divisões e subdivisões nucleares da amígdala de rato | 15 |
| FIGURA 2. Labirinto em cruz elevado (LCE) | 29 |
| FIGURA 3. Representação esquemática dos locais das microinjeções dentro da amígdala dos camundongos | 32 |
| FIGURA 4. Efeitos das microinjeções intra-amígdala de SAL ou PNU-282987 (0,1 nmol) nas porcentagens de entradas (% EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (% TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE | 34 |
| FIGURA 5. Efeitos das microinjeções intra-amígdala de SAL, CPA (0,16 nmol) ou PNU (0,1 nmol) nas porcentagens de entradas (% EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (% TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| TABELA 1. Grupos experimentais 1 | 27 |
| TABELA 2. Grupos experimentais 2 | 28 |
| TABELA 3. Efeitos das microinjeções intra-amídala de SAL ou PNU-282987 (0,1 nmol), ambas as drogas administradas pré-teste, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE..... | 35 |
| TABELA 4. Efeitos das microinjeções intra-amídala de SAL, CPA (0,16 nmol) ou PNU (0,1 nmol), ambas as drogas foram administradas pré-exposição, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE..... | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|----------------------------------|
| ACh | Acetilcolina |
| BA | Braços abertos |
| BLA | Núcleo Basolateral da amígdala |
| CPA | Maleato de Clorfeniramina |
| EBF | Entrada nos braços fechados |
| EBA | Entradas nos braços abertos |
| % EBA | % entradas nos braços abertos |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| HA | Histamina |
| i.p. | Intraperitoneal |
| LCE | Labirinto em cruz elevado |
| mAChR | Receptor colinérgico muscarínico |
| nAChR | Receptor colinérgico nicotínico |
| NBM | Núcleo basal magnocelular |
| SAL | Salina |
| SNH | Sistema neural histaminérgico |
| SNC | Sistema nervoso central |
| T1 | Teste 1 |
| T2 | Teste 2 |
| TBA | Tempo nos braços abertos |
| %TBA | % tempo nos braços abertos |

TBF Tempo no braço fechado

TC Tempo no centro

TE Total de entradas

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | Amígdala..... | 14 |
| 1.2 | Sistema Neural Histaminérgico..... | 16 |
| 1.3 | Sistema Colinérgico | 19 |
| 1.4 | Modelo experimental: labirinto em cruz elevado..... | 22 |
| 2 | OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 24 |
| 2.2 | Objetivos Específicos..... | 24 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODO | 25 |
| 3.1 | Sujeitos experimentais | 25 |
| 3.2 | Drogas | 25 |
| 3.3 | Procedimento cirúrgico e microinjeção | 26 |
| 3.4 | Tratamento farmacológico | 27 |
| 3.4.1 | Experimento 1 | 27 |
| 3.4.2 | Experimento 2 | 28 |
| 3.5 | Modelo experimental | 28 |
| 3.6 | Análise comportamental..... | 29 |
| 3.7 | Histologia | 31 |
| 3.8 | Análise estatística..... | 32 |
| 4 | RESULTADOS | 33 |
| 4.1 | Ausência de efeitos das microinjeções na amígdala de SAL ou PNU (0,1 nmol) nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE..... | 33 |
| 4.2 | Efeitos das microinjeções combinadas na amígdala de SAL, CPA (0,16 nmol) ou PNU (0,1 nmol) nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE..... | 36 |
| 5 | DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1 | Efeitos da administração intra-amígdala de PNU (0,1 nmol), CPA (0,16 nmol) ou SAL, sobre as respostas de ansiedade | 40 |
| 5.2 | Efeitos da administração intra-amígdala de PNU (0,1 nmol) ou SAL na memória emocional | 42 |
| 5.3 | Efeitos das microinjeções combinadas intra-amígdala de PNU (0,1 nmol), CPA (0,16 nmol) ou SAL na interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico | 44 |
| 6 | CONCLUSÃO | 48 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

1 INTRODUÇÃO

A memória pode ser definida como a capacidade que os organismos têm em armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente e compreende principalmente os processos de aquisição, consolidação e evocação das informações adquiridas (KANDEL et al., 2003; KOLB; WISHAW, 2002). As emoções desempenham um papel fundamental no controle comportamental, fornecendo adaptação da conduta mediante situações distintas, inclusive relacionadas à sobrevivência do indivíduo (SACCHETTI et al., 2009).

Há um interesse considerável destinado ao entendimento do impacto das emoções nos sistemas cerebrais envolvidos com o processamento da memória, onde estudos comportamentais apontam uma associação entre as emoções e a memória, demonstrando uma forte ligação entre diferentes estados emocionais e o armazenamento, consolidação e a evocação das memórias (HASS; CANLI, 2008). Assim, a memória para eventos com um forte componente emocional torna-se mais eficiente em termos adaptativos em relação aos eventos menos marcantes, uma vez que estímulos emocionais apetitivos ou aversivos mostram-se essenciais para a sobrevivência do indivíduo (QUEVEDO et al, 2003; LEDOUX, 2000).

Por outro lado, nas desordens emocionais, como no estresse pós-traumático, ocorre uma persistência de eventos das memórias traumáticas vivenciadas (BREWIN et al. 2007). Além disso, a vivência constante de memórias com cunho negativo tem sido considerada um dos principais indícios para o desenvolvimento da depressão, fobias, estresse pós-traumático e dor crônica (BUCHERELLI et al., 2006).

Estudos comportamentais realizados em animais demonstram o papel das emoções sobre a memória, destacando a participação da amígdala na modulação dos comportamentos emocionais

(GALVIS-ALONSO et al., 2010; SERAFIM et al., 2013), assim, dentre as regiões cerebrais envolvidas com a modulação das emoções no processamento da memória, esta estrutura e todo o seu complexo despertam grande interesse para o entendimento das bases neurobiológicas das emoções, aprendizagem e memória.

1.1 Amígdala

A amígdala é uma importante estrutura do Sistema Nervoso Central (SNC) para aquisição e processamento da memória emocional, intermediando informações sensoriais, respostas comportamentais e fisiológicas, principalmente aquelas com forte apelo emocional, mediando às reações de medo e as respostas adaptativas à dor e à ameaça iminente de perigo (TOYODA et al., 2011; MCNAUGHTON; CORR, 2004).

Quanto às suas características anatômicas, a amígdala é constituída por um complexo de núcleos localizado na porção ântero-medial de cada lobo temporal, caracterizando o complexo amidaloide; cada um destes núcleos possui um sítio distinto de conexão nos encéfalos humanos e de outras espécies animais, além de diferenciarem-se conforme a sua citoarquitetura e histoquímica (SAH et al., 2003).

Segundo a nomenclatura proposta por Knapskas et al. (2007), os núcleos da amígdala são divididos em três grupos específicos (FIGURA 1): o primeiro denominado grupo centromedial, composto pelos núcleos central e centromedial; o segundo denominado grupo basolateral ou profundo, composto pelos núcleos lateral, basal e basal acessório; e o terceiro denominado grupo cortical ou superficial, composto pelos núcleos cortical e trato olfatório lateral. Somado aos grupos supracitados, há a sugestão da presença de um grupo de núcleos separados, que não se

enquadram dentro dessas divisões propostas: núcleos denominados como massas celulares intercaladas e a área da amígdala hipocampal (KNAPSKAS et al., 2007).

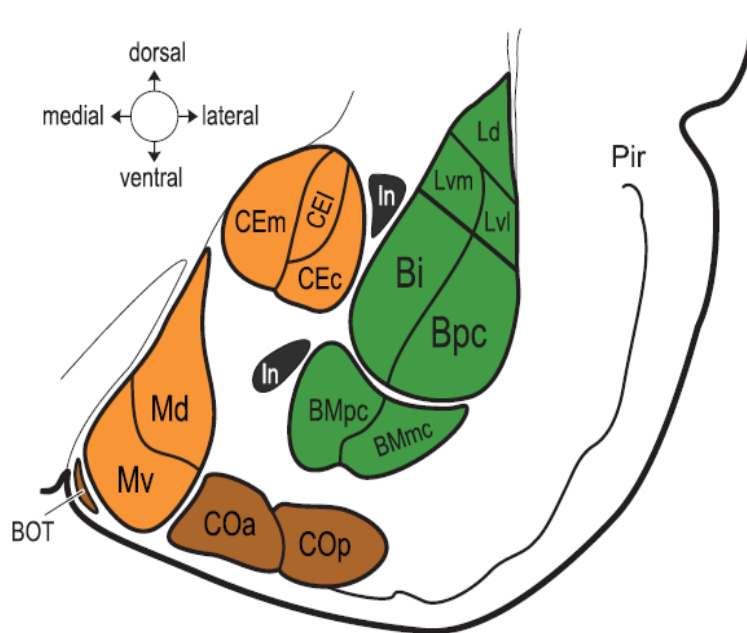


FIGURA 1. Divisões e subdivisões nucleares da amígdala de rato. Os núcleos são divididos em três grupos: **Centromedial** (laranja); **Basolateral** (verde); e **Cortical** (marrom). **CEc**- Núcleo central, subdivisão nuclear; **CEI**- Núcleo central, subdivisão lateral; **CEm**- núcleo central, subdivisão medial; **COa**- Núcleo cortical, subdivisão anterior; **COp**- Núcleo cortical, subdivisão posterior; **BOT**- Núcleo vermelho do trato olfatório; **Bi**- Núcleo basal, subdivisão intermediária; **Bpc**- Núcleo basal, subdivisão parvocelular; **BMmc**- Núcleo basomedial, subdivisão magnoceular; **BMpc**- Núcleo basomedial, subdivisão parvocelular; **Ld**- Núcleo lateral, subdivisão dorsal; **Lvm**- Núcleo lateral, subdivisão ventromedial; **Lvl**- Núcleo lateral, subdivisão ventrolateral; **Md**- Núcleo medial, subdivisão dorsal; **Mv**- Núcleo medial, subdivisão ventral; **In**- Núcleos intercalados; **Pir**- Córtex piriforme. **Fonte:** KNAPSKAS et al., 2007.

O núcleo medial contribui para a interpretação de informações sensoriais interoceptivas e exteroceptivas, para regulação de comportamentos sociais, sexuais e maternos (NEWMAN, 2002), bem como para a modulação da aprendizagem e memória emocional (CANTERAS et al., 1995). O núcleo basolateral da amígdala (BLA) é composto por aproximadamente 80% de neurônios piramidais glutamatérgicos, formando a maioria das conexões com suas áreas externas, como o grupo centromedial e o hipocampo; o restante das conexões do BLA consiste de

interneurônios GABAérgicos, compondo a maior parte dos seus circuitos intrínsecos (SAH et al., 2003). Este complexo é ativado via projeções aferentes corticais e subcorticais frente experiências percebidas como a ansiedade, medo, estresse e raiva (KANDEL et al., 2003; ROGAN; LEDOUX, 1996).

Segundo Brown et al. (2001) são encontradas densidades moderadas de fibras histaminérgicas na amígdala e receptores para histamina (HA) são muito expressos por todo o sistema límbico, sistema do qual faz parte esta estrutura. Evidências sugerem que a amígdala participa na modulação da ansiedade (DERE et al., 2010), exercendo influencia na aprendizagem e memória (PARE et al., 2004; EHRLICH et al., 2009).

1.2 Sistema Neural Histaminérgico

A HA é uma monoamina biogênica, encontrada no encéfalo da maioria das espécies animais, que tem um importante papel modulador na aprendizagem e memória (PRELL; GREEN, 1986). É sintetizada a partir da histidina pela enzima histidina descarboxilase (converte o aminoácido histidina em histamina) através da descarboxilação oxidativa, sendo que o término de sua ação no encéfalo ocorre através de seu catabolismo para telemetilhistamina pela enzima histamina N-metiltransferase (LIN et al., 1991). Os neurônios histaminérgicos originam-se no núcleo tuberomamilar localizados na região posterior do hipotálamo, ramificando-se por todo o SNC, incluindo a medula espinal (SONG et al., 2006; ALVAREZ, 2009). Sugere-se a participação do Sistema Neural Histaminérgico (SNH) nas mudanças neuroplásticas associadas à recuperação funcional em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (ISHUNINA et al., 2003; YANAI; TASHIRO, 2007) e Parkinson (DERE et al., 2010).

Há uma ligação entre HA, aprendizagem e os processos relacionados à memória e evidências recentes sugerem que a HA e seus receptores estão envolvidos na modulação dos processos de aprendizagem e memória, destacando-se nas etapas de formação e recuperação da memória mediante diferentes tarefas (BENETTI; IZQUIERDO, 2012). A HA, no sistema nervoso central, necessita da ativação de receptores específicos e a sua ação é mediada por pelo menos quatro tipos de receptores: H1, H2, H3 e H4 (STRAKHOVA et al., 2009; BROWN et al., 2001; HAAS; PANULA, 2003).

Os receptores H1 têm significativa expressão no córtex, hipocampo, amígdala, tálamo, núcleo estriado e cerebelo e muitas dessas regiões encefálicas estão relacionadas com as funções cognitivas. Além disso, a ativação dos receptores H1 regula vias de sinalização intracelular e modula a plasticidade neural dos processos cognitivos como a aprendizagem e a memória (LINTUNEN et al., 1998). Esses receptores estão implicados ainda na aprendizagem espacial e formação da memória (ZLOMUZICA et al., 2009). Em estudo de Gianlorenço et al. (2010), o precursor histaminérgico LH produziu efeito inibitório da memória emocional em camundongos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e o pré-tratamento com um antagonista H1 (CPA), foi capaz de reverter esse efeito.

Estudos sugerem a participação dos receptores H1 presentes na amígdala mediando emoções e aspectos cognitivos relacionados a ansiedade (ZARRINDAST et al., 2005), aprendizagem e memória (SERAFIM et al., 2013; FOLEY et al., 2009). Em mamíferos, a neurotransmissão histaminérgica é mediada pelos receptores H1 e H2 pós-sinápticos e os autorreceptores H3 pré-sinápticos, sendo que este último também atua como um heteroreceptor (ZLOMUZICA et al., 2009).

Os receptores H3 são amplamente expressos no cérebro de mamíferos, particularmente em regiões associadas à cognição, como o córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo, sendo que a

ativação de autoreceptores H3 inibe a síntese e a liberação de histamina, enquanto que a ativação de heteroreceptores H3 inibe a liberação de neurotransmissores como a acetilcolina (ACh), noradrenalina e a dopamina (FOLEY et.al, 2009). A administração de antagonistas dos receptores H3 na amígdala prejudica a consolidação de memórias relacionadas ao medo, enquanto que agonistas dos receptores H3 facilitam a expressão de memórias indesejáveis (GIOVANNINI et.al, 2003).

Foley e seus colaboradores (2009) relatam que várias estratégias estão sendo formuladas para o desenvolvimento de drogas antagonistas dos receptores H3 que aumentem a liberação de neurotransmissores envolvidos nos processos cognitivos, como a ACh, e os resultados sugerem que entre outros sistemas neurotransmissores, o bloqueio da regulação da função histaminérgica do H3 pode aumentar os mecanismos de neuroplasticidade necessários para a efetiva consolidação da memória.

Os receptores H4 foram identificados recentemente no SNC através da detecção do seu RNAm na amígdala, cerebelo, corpo caloso, córtex pré-frontal e tálamo, tanto em humanos, quanto em ratos. Esses receptores são expressos no sistema nervoso periférico principalmente em células de origem hematopoiéticas (eosinófilos e mastócitos), onde sua função associa-se aos processos inflamatórios e alérgicos; este receptor é encontrado em alta densidade nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal, sugerindo uma possível função na mediação da nocicepção (HAAS et al., 2008).

Estudo de Alvarez (2009), sugere que a HA, como um neurotransmissor e neuromodulador, participa dos processos de aprendizagem por meio da ativação específica dos receptores H1, H2 e H3. Entretanto, a literatura apresenta resultados diferentes quanto ao seu papel durante a aquisição, retenção da informação e recuperação da memória, enquanto algumas publicações descrevem efeitos inibitórios (BITNER et al., 2011; SERAFIM et al., 2010), outras

demonstram um papel facilitatório (ALVAREZ; BANZAN, 2008; GIANLORENÇO et al., 2011) na aprendizagem e na memória.

Ações facilitatórias ou inibitórias para os receptores de HA podem ser explicadas em termos da complexidade das projeções neurais regionalizadas em sítios de HA nas estruturas encefálicas, nas diferentes redes sinápticas e receptores presentes, e nas interações com outros sistemas neurotransmissores, como por exemplo, o sistema colinérgico (ALVAREZ, 2009).

1.3 Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico está intimamente relacionado com os processos de aprendizagem e memória e a sua neurodegeneração é considerada um mecanismo importante nas doenças neurodegenerativas e distúrbios cognitivos (VICENS et al, 2011). Este sistema distribui-se em uma variedade de diferentes núcleos, sendo que o núcleo basal magnocelular (NBM) caracteriza-se como a principal fonte de inervação colinérgica para o neocórtex e a amígdala, enquanto o septo médio (complexo da banda diagonal) fornece aferências colinérgicas para o hipocampo (WOOLF et al., 1984; MESULAM et al., 1983).

Há a presença de dois grandes grupos de receptores colinérgicos: os muscarínicos (mAChR, receptor metabotrópico), encontrados em todas as células alvos do sistema nervoso parassimpático, assim como nas células alvos nos neurônios colinérgicos pós-ganglionares simpáticos; e os nicotínicos (nAChR, receptor ionotrópico), que possuem cinco subunidades proteicas dispostas simetricamente (duas α , uma β , γ e δ), regulando a liberação e a ativação de neurotransmissores nas regiões pré e pós-sinápticas, podendo controlar a eficácia da transmissão sináptica (MIYAZAWA et al., 2003).

Segundo Roncarati et al. (2009), déficits cognitivos e de atenção estão presentes na doença de Alzheimer, nos processos de envelhecimento e na esquizofrenia, correlacionando-se a uma hipofunção ou degeneração do sistema colinérgico. No mesmo estudo, a análise *post-mortem* de encéfalos acometidos com a esquizofrenia sugeriu anormalidades na expressão do receptor nicotínico, principalmente, a subunidade alfa-7. Além disso, alguns estudos de biologia molecular sugerem uma relação entre o polimorfismo do gene que codifica o receptor nicotínico alfa-7 e a patogênese da esquizofrenia (GAULT et al., 2003; MARTIN; FREEDMAN, 2007).

Diversos neurotransmissores como a histamina, a dopamina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), a noradrenalina e a serotonina, estão implicados em processos cognitivos e interagem com o sistema colinérgico (PASSANI; BLANDINA, 1998). A participação dos sistemas neurotransmissores supracitados, pode, de alguma forma, interagir com a ACh causando efeito aditivo ou mesmo sinérgico na cognição (RONCARATI et al., 2009).

A administração aguda e crônica de agonista colinérgico nicotínico (ABT-418; GTS-21; Lobelina) acarreta efeitos benéficos na aprendizagem e na memória (LEVIN; SIMON, 1998), no entanto, existem resultados diferentes na literatura envolvendo agonistas nicotínicos. Por exemplo, o tratamento agudo com agonistas nicotínicos melhorou a função da memória de trabalho no labirinto radial (LEVIN et al., 1998), enquanto nenhum efeito sobre a aprendizagem espacial e a memória foi detectado após 10 dias de administração de nicotina crônica em camundongos (VICENS et al., 2003). Em outro estudo, a administração oral do agonista colinérgico nicotínico GTS-21 facilitou as funções cognitivas em humanos saudáveis (KITAGAWA et al., 2003). O PNU demonstrou ser um potente agonista específico dos receptores nicotínicos das subunidades alfa-7 já sintetizado (CHAN et al., 2007). Em um estudo realizado por Ishida et al. (2011), o PNU-282987 na dose de 3.0 µg microinjetado bilateralmente

no núcleo central da amígdala em ratos, reverteu o efeito do antagonista dos receptores opióides naloxona no teste de preferência condicionada por aversão.

Há evidências que sugerem a modulação do sistema histaminérgico nos dois percursos colinérgicos, o nicotínico e o muscarínico (BLANDINA et al, 1998; PASSANI et al., 2000). Estudos sobre os efeitos de agonistas e antagonistas histaminérgicos microinjetados no núcleo basolateral da amígdala em ratos, utilizando um teste de condicionamento operante, fornecem evidências adicionais do papel da ACh na modulação da consolidação da memória aversiva por microdiálise *in vivo* (CANGIOLI et al., 2002; PASSANI et al., 2001). No estudo de Cangioli et al. (2002), as microinjeções dos agonistas histaminérgicos H3 RAMH e immepip facilitaram a liberação de ACh; já no estudo de Passani et al. (2001), antagonistas H3 ciproxifan, clobenprobit e tioperamida, diminuíram a liberação de ACh, prejudicando a memória emocional, entretanto quando as microinjeções eram combinadas com o atagonista H2 cimetidina, ocorreu o bloqueio da diminuição deste neurotransmissor.

No estudo de Komater et al. (2005) em ratos, a tioperamida i.p. (intraperitoneal) e o ciproxifan i.p., reverteram o déficit de memória induzido pelo antagonista colinérgico muscarínico escopolamina i.p. no labirinto aquático de discriminação visual, modelo que incita o medo. No mesmo estudo, quando utilizado o labirinto circular de Barnes, modelo que infere ansiedade e capacidade cognitiva, o ciproxifan i.p. produziu efeitos menos evidentes se comparado ao labirinto aquático, não havendo resultados quando utilizada a tioperamida i.p. Os autores sugerem ainda que, embora demonstrando o papel dos receptores H3 na aprendizagem espacial e uma potencial interação na neurotransmissão histaminérgica e colinérgica, os diferentes resultados observados refletiram a natureza da tarefa utilizada.

1.4 Modelo experimental: labirinto em cruz elevado

O nosso grupo de pesquisa tem investigado o papel do SNH na ansiedade e na memória emocional utilizando a reexposição no labirinto em cruz elevado (LCE), pois se trata de um teste de ansiedade baseado na aversão de roedores aos espaços abertos, validado para ratos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985) e camundongos (STEPHENS et al., 1986; LISTER, 1987). O comportamento dos animais associado aos componentes emocionais durante o teste, expressam o conflito entre a motivação para explorar o labirinto e a tendência natural para evitar espaços abertos, comportamento inerente aos roedores (LISTER, 1990). Carobrez e Bertoglio (2005) sugerem que o uso do LCE tem se estendido para o entendimento das bases biológicas de componentes emocionais relacionados à aprendizagem e memória.

A ansiedade pode ser inferida pela atividade nos braços abertos (EBAs) durante a exposição e a aprendizagem emocional pode ser inferida através da diminuição da exploração dos braços abertos (entradas nos braços abertos e tempo gasto nos braços abertos) durante a reexposição (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO et al., 2011). Estudos demonstram a relação entre as emoções e a cognição no repertório comportamental de roedores através da utilização do protocolo de exposição (T1) e reexposição (T2) no LCE (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; DAL-COL et al., 2003). Durante o teste, os animais adquirem informações a respeito das áreas seguras e potencialmente perigosas do labirinto e a utilização da reexposição permite inferir a aquisição e a retenção da memória (GALVIS-ALONSO et al., 2010).

Estudos sugerem a participação do SNH nas respostas de ansiedade, como observado no estudo de Miyata et al. (2011) sugerindo efeito ansiolítico em camundongos que receberam injeção de antagonista histaminérgico seletivo aos receptores H1 Clorfeniramina (CPA) na região medial do córtex pré-frontal submetidos à plataforma aberta elevada. Em um estudo proveniente

do nosso grupo de pesquisa indicou que a injeção sistêmica de CPA em camundongos provocou uma diminuição da atividade nos braços abertos em T1 no LCE, sugerindo efeito ansiogênico (SERAFIM et al., 2012). Outro estudo desenvolvido em nosso laboratório não obteve efeito considerável na ansiedade de camundongos que tiveram CPA microinjetada na amígdala submetidos ao LCE (SERAFIM et al., 2013).

Estudo realizado em nosso laboratório de Neurociências por Serafim et al. (2012), a injeção sistêmica de LH provocou um déficit da evocação da memória emocional e a dose mais alta de CPA (0,16 nmol) microinjetada na amígdala, induziu um comprometimento da memória emocional em camundongos reexpostos ao LCE. Esses resultados sugerem que o efeito inibitório dessa dose de CPA pode ter sido provocado pela ação do antagonista nos receptores H1 presentes na amígdala, induzindo uma diminuição da atividade colinérgica nessa estrutura com consequente comprometimento da expressão da memória emocional.

Além disso, resultados sugerem que o sistema colinérgico desempenha importante papel nos processos cognitivos, dentre estes a memória, pois quando há um comprometimento da via colinérgica, ocorre déficit cognitivo em seres humanos (NARDONE et al., 2010; YU et al., 2006). A interação entre o SNH e o sistema colinérgico pode ser a causa dos resultados discrepantes apresentados na literatura referentes à atuação da HA na modulação dos processos emocionais (PASSANI et al., 2001).

A partir destes resultados, foi realizado o presente estudo investigando a interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico de camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), a partir de microinjeções bilaterais na amígdala de antagonista do receptor histaminérgico H1 maleato de clorfeniramina (CPA) e de agonista seletivo do receptor $\alpha 7$ colinérgico nicotínico PNU-282987 (N-(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-4-clorobenzamida).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico na amígdala de camundongos na aquisição da memória emocional, utilizando o modelo experimental do labirinto em cruz elevado (LCE).

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se as microinjeções isoladas de PNU na amígdala induzem efeitos sobre a ansiedade e memória emocional em camundongos submetidos ao LCE;
- Analisar se as microinjeções do agonista colinérgico nicotínico (PNU-282987) revertem o efeito amnésico provocado pelo antagonista histaminérgico H1 (CPA) na amígdala em camundongos reexpostos ao LCE.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino, machos, pesando entre 25g e 40g, experimentalmente ingênuos, alojados em gaiolas de polipropileno (31×20×13 cm), em grupos de cinco e mantidos sob um ciclo de 12h de luz (luzes acesas às 07:00h), em um ambiente controlado à temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de $50 \pm 5\%$. Alimentos e água potável foram fornecidos livremente, exceto durante os períodos de testes. Todas as sessões experimentais foram realizadas na fase clara do ciclo de luz, entre 7 h e 16 h.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocolo 009/13) e estão em conformidade com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Drogas

As drogas utilizadas foram o antagonista do receptor histaminérgico H1 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) maleato de clorfeniramina (CPA), microinjetado na amígdala na dose de 0,16 nmol e volume de 0,1 μl (SERAFIM et al., 2012) e o agonista seletivo do receptor alfa-7 colinérgico nicotínico-nAChR α 7 (Sigma-Aldrich) PNU-282987 [N-(3R)-1-Azabicyclo(2.2.2)oct-3-yl-4-clorobenzamida], microinjetado na dose de 0,1 nmol e volume de 0,1 μl (ISHIDA et al., 2011).

As drogas foram dissolvidas em solução salina estéril 0,9% (SAL) e mantidas refrigeradas em tubos eppendorfs codificados para que o experimentador não tivesse conhecimento do seu conteúdo no momento do experimento e durante as análises das imagens gravadas. Os animais pertencentes aos grupos controles receberam solução salina com volume equivalente aos das drogas.

3.3 Procedimento cirúrgico e microinjeção

Os animais receberam a implantação craniana de duas cânulas-guia (25 gauge) de 7 mm de comprimento bilateralmente 1mm acima da amígdala baseado nas coordenadas estereotáxicas definidas pelo Atlas de Franklin e Paxinos (2001), após anestesiados com solução de Cloridrato de Cetamina (50mg/kg) e Xilasina (5mg/kg) diluída em salina a 0,9% (NASEHI et al., 2011). As cânulas foram fixadas no crânio com cimento acrílico (JET resina e líquido polimerizante). Os mandris foram inseridos no interior das cânulas-guia para evitar a obstrução das mesmas, reduzindo o risco de contaminação. O procedimento cirúrgico foi realizado em aparelho estereotáxico (Stoelting Co, Illinois, USA) e suas coordenadas tiveram por base os valores: - 0.8mm posterior ao bregma; \pm 3 mm lateral à sutura sagital; e 3,5 mm ventral à superfície craniana (FRANKLIN; PAXINOS, 2001). Logo após a cirurgia, os animais receberam injeção subcutânea de Flunixinina meglumina, comercialmente conhecido como Banamine (2,5 mg/kg, segundo o Guia Terapêutico Veterinário).

As agulhas das microinjeções possuíam 8 mm de comprimento (33 gauges) e foram inseridas dentro das cânulas-guia para a infusão bilateral da droga na amígdala, sendo conectadas por meio de um tubo de polietileno (PE-10) à microseringa Hamilton de 5 μ l. O procedimento das microinjeções ocorreu no quarto dia (pré-exposição) e no quinto dia (pré-reexposição) no

Experimento 1 e apenas no quarto dia (Experimento 2) após o procedimento cirúrgico para a recuperação dos animais, consistindo em: após remoção dos mandris, inserção das agulhas; microinjeções da solução por 60 segundos; permanência das agulhas por 60 segundos após o término da infusão; e retirada das agulhas. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar 0,1 μ l de solução durante 60 segundos.

3.4 Tratamento farmacológico

3.4.1 Experimento 1: Efeitos das microinjeções na amígdala de PNU-282987 (0,1 nmol) nos comportamentos de camundongos expostos (T1) e reexpostos (T2) ao LCE.

O primeiro experimento verificou o efeito isolado do PNU sobre a ansiedade e a memória emocional. Os animais receberam microinjeções de SAL ou PNU-282987 (0,1 nmol) pré-exposição (T1) e pré reexposição (T2) (Tabela 1):

Tabela 1. Grupos experimentais 1

| Teste (T1) | Grupos | N | Reteste (T2) | Grupos | N |
|-------------------|---------------|----------|---------------------|---------------|----------|
| LCE | SAL | 10 | LCE | SAL | 10 |
| LCE | SAL | 10 | LCE | PNU | 10 |
| LCE | PNU | 9 | LCE | SAL | 9 |
| LCE | PNU | 10 | LCE | PNU | 10 |

3.4.2 Experimento 2: Efeitos das microinjeções combinadas na amígdala de CPA (0,16 nmol) e PNU-282987 (0,1 nmol) nos comportamentos de camundongos expostos (T1) e reexpostos (T2) ao LCE.

A partir dos resultados do Experimento 1, foi realizado o Experimento 2 com microinjeções bilaterais intra-amígdala combinadas de CPA e PNU para verificar o efeito da interação das drogas na aquisição da memória emocional. Os animais receberam microinjeções de SAL, CPA (0,16 nmol) ou PNU-282987 (0,1 nmol) pré-exposição e após 5 min., microinjeções de SAL ou do agonista colinérgico PNU-282987 (Tabela 2).

Tabela 2. Grupos experimentais 2

| Teste (T1) | Grupos | N | Reteste (T2) | Grupos | N |
|-------------------|---------------|----------|---------------------|---------------|----------|
| LCE | SAL | 8 | LCE | SAL | 8 |
| LCE | PNU | 9 | LCE | SAL | 9 |
| LCE | CPA | 11 | LCE | SAL | 11 |
| LCE | CPA | 12 | LCE | PNU | 12 |

3.5 Modelo experimental

O modelo experimental utilizado foi o labirinto em cruz elevado (LCE), possuindo dois braços abertos (30x5x25cm) e dois braços fechados (30x5x15cm) com as paredes constituídas em acrílico na cor cinza, unidos por uma plataforma comum central (5x5cm). As plataformas estão à 38,5 cm de altura do piso (FIGURA 2).



FIGURA 2: Labirinto em cruz elevado (LCE)

3.6 Análise comportamental

Os animais foram transportados para o local do experimento, onde permaneceram por 1h antes do teste para facilitar a adaptação dos mesmos ao ambiente. Os camundongos receberam as microinjeções e os testes foram iniciados.

No LCE, os animais foram colocados individualmente na plataforma central do labirinto, com a face voltada para o braço aberto, explorando-o livremente por 5 min., caracterizando o primeiro dia de teste (T1). Após vinte e quatro horas, os camundongos foram reexpostos ao labirinto sob as mesmas condições experimentais, caracterizando o segundo dia de teste (T2).

Todas as sessões foram filmadas por uma câmera digital ligada a um computador, para análises posteriores dos comportamentos dos camundongos utilizando o software X-Plo-Rat 3.0 (GARCIA et al., 2005). Os parâmetros considerados foram: frequência de entradas nos braços

abertos (EBA, definida quando as quatro patas dos animais estiveram fora da plataforma central) e nos braços fechados (EBF); duração do tempo despendido nestes compartimentos aberto e fechado (TBA e TBF) e na plataforma central (TC), onde estes dados foram utilizados para o cálculo das porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos [Entradas: $(\text{aberto}/\text{total}) \times 100$]; [Tempo: $(\text{tempo no compartimento}/300) \times 100$]; o total de entradas (TE) foi caracterizado como a soma das entradas nos braços abertos e fechados (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

As medidas etológicas analisadas foram: levantar (elevação do corpo sobre as patas traseiras); mergulhar (movimentos exploratórios da cabeça/ombros em direção ao solo); esticar (movimentos que consistem em esticar o corpo e retrá-lo para a posição original, sem locomoção). Como os sinais de tigmotatismo são importantes para a exploração no LCE, os comportamentos de mergulhar e esticar são diferenciados quanto ao local de sua ocorrência no labirinto. Os braços fechados e a plataforma central foram considerados “áreas protegidas” do labirinto, enquanto os braços abertos foram considerados “áreas desprotegidas” (TREIT et al., 1993; RODGERS; JOHNSON, 1995).

Em T1, a análise etológica somada à atividade exploratória dos braços abertos entre os grupos experimentais, demonstram efeitos sobre a ansiedade. Em T2, a diminuição da atividade nos braços abertos (entradas e tempo gasto) foi definida como índice de aprendizagem e memória (GALVIS-ALONSO et al., 2010; GIANLORENCO et al., 2011). Em T1 e T2, a atividade locomotora foi avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (CRUZ et al., 1994).

3.7 Histologia

Ao final dos experimentos foram realizadas as análises histológicas dos encéfalos de todos os animais submetidos aos testes. Após receberem uma dose profunda do anestésico com solução de Cloridrato de Cetamina e Xilasina, os animais foram sacrificados e receberam microinjeções de 0,1 µl de solução de 1% de azul de metileno, conforme procedimento descrito para a microinjeção; após serem decapitados, os animais tiveram seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) ao menos por três dias. Dois dias antes das secções, os encéfalos permaneceram em solução de sacarose (20%), em refrigeração por 24h e posteriormente, a solução de sacarose foi trocada para (30%), também mantida em refrigeração por 24h. Foram realizadas secções coronais de 80 µm ao longo do trajeto da cânula, utilizando um micrótomo criostato (ANCAP 300). As secções foram inspecionadas por microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno no trajeto da cânula indicou o local do sitio das microinjeções. Foram excluídos os animais cuja microinjeção não infundiu a amígdala bilateralmente.

A Figura 3 consiste em uma representação esquemática dos sítios das microinjeções na amígdala. Em um total de 96 animais utilizados durante a realização dos experimentos, a análise histológica confirmou que 79 camundongos obtiveram canulação positiva bilateral na amígdala (FIGURA 3).

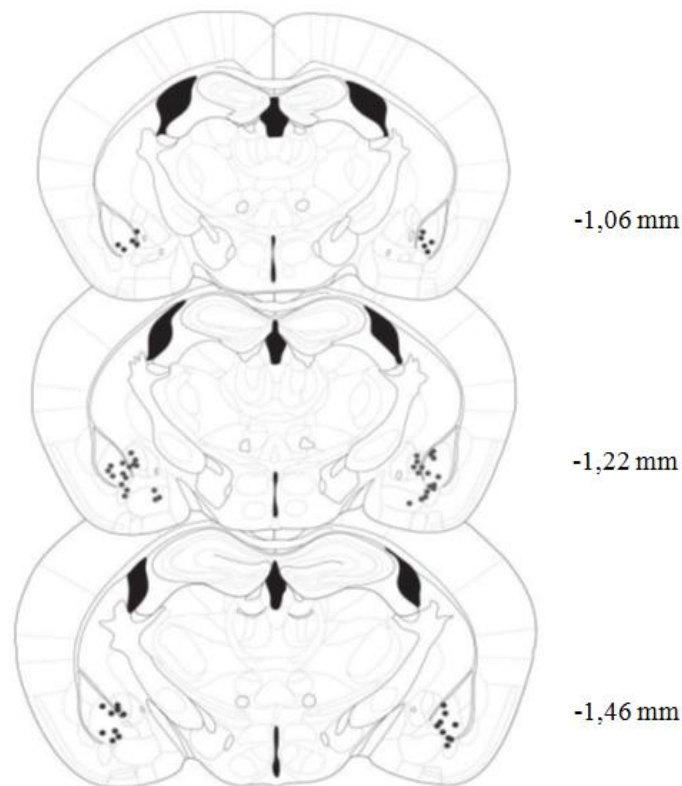


FIGURA 3. Representação esquemática dos locais das microinjeções dentro da amígdala dos camundongos. Os cortes estão entre -1,06mm e -1,46mm do bregma de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (2001). O número de pontos é menor do que o total de camundongos devido à sobreposição.

3.8 Análise estatística

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade. Os dados comportamentais foram analisados através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas comparando dois fatores: um independente (tratamento farmacológico) e outro dependente (dias de teste). Para valores de F significativo, foi efetuado o teste *post-hoc* Duncan para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi o de $p < 0,05$. As análises foram realizadas através do software Statistica 8.0 (Stat Soft. Inc).

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1. Ausência de efeitos das microinjeções na amígdala de PNU-282987 (0,1 nmol) nos comportamentos de camundongos expostos (T1) e reexpostos (T2) ao LCE.

Trinta e nove animais obtiveram canulação positiva mediante análise histológica e foram utilizados no primeiro experimento.

A Figura 4 (A e B) mostra o efeito das microinjeções de SAL ou PNU-282987 (0,1 nmol) na amígdala pré-T1 e pré-T2 nos comportamentos emocionais. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não revelou efeitos significativos para o fator tratamento para as % EBA [$F_{(3,35)} = 1,27, p > 0,05$] e % TBA [$F_{(3,35)} = 0,32, p > 0,05$], assim como para as EBA [$F_{(3,35)} = 1,31, p > 0,05$] e TBA [$F_{(3,35)} = 0,27, p > 0,05$] entre os grupos SAL-SAL, SAL-PNU, PNU-SAL e PNU-PNU em T1 (TABELA 3), indicando que as drogas não induziram mudanças nos estados de ansiedade. Adicionalmente, o tratamento não provocou alterações significativas para as outras medidas consideradas: TE [$F_{(3,35)} = 1,29, p > 0,05$], EBF [$F_{(3,35)} = 1,47, p > 0,05$], TBF [$F_{(3,35)} = 0,37, p > 0,05$] e TC [$F_{(3,35)} = 0,65, p > 0,05$] em T1, como demonstrado na Tabela 3.

Para o fator dias de teste, em T2, a ANOVA de duas vias mostrou uma diferença significativa na exploração dos braços abertos representada pelas medidas % EBA [$F_{(1,35)} = 67,94, p < 0,05$], % TBA [$F_{(1,35)} = 38,00, p < 0,05$] (FIGURA 4 A e B), EBA [$F_{(1,35)} = 57,16, p < 0,05$] e TBA [$F_{(1,35)} = 38,61, p < 0,05$] (TABELA 3). O teste *post hoc* Duncan indicou uma diminuição significativa da atividade nos braços abertos (% EBA, % TBA, EBA e TBA) para todos os grupos experimentais (SAL - SAL, SAL - PNU, PNU - SAL e PNU - PNU), como observados nas Figuras 4 A e B e na Tabela 3.

Além disso, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Duncan, demonstrou um aumento no TBF [$F_{(1,35)} = 51,06, p < 0,05$] em T2 quando comparado a T1, para todos os grupos experimentais,

enquanto nas EBF [$F_{(1,35)} = 0,03$, $p > 0,05$] e TC [$F_{(1,35)} = 0,49$, $p > 0,05$] não foram observadas mudanças estatisticamente relevantes para nenhum grupo experimental (TABELA 3). Houve alterações significativas para a medida TE [$F_{(1,35)} = 20,34$, $p < 0,05$] em T2 comparado a T1, onde o teste *post hoc* Duncan indicou que houve uma diminuição do TE nos grupos SAL-PNU e PNU-PNU (TABELA 3).

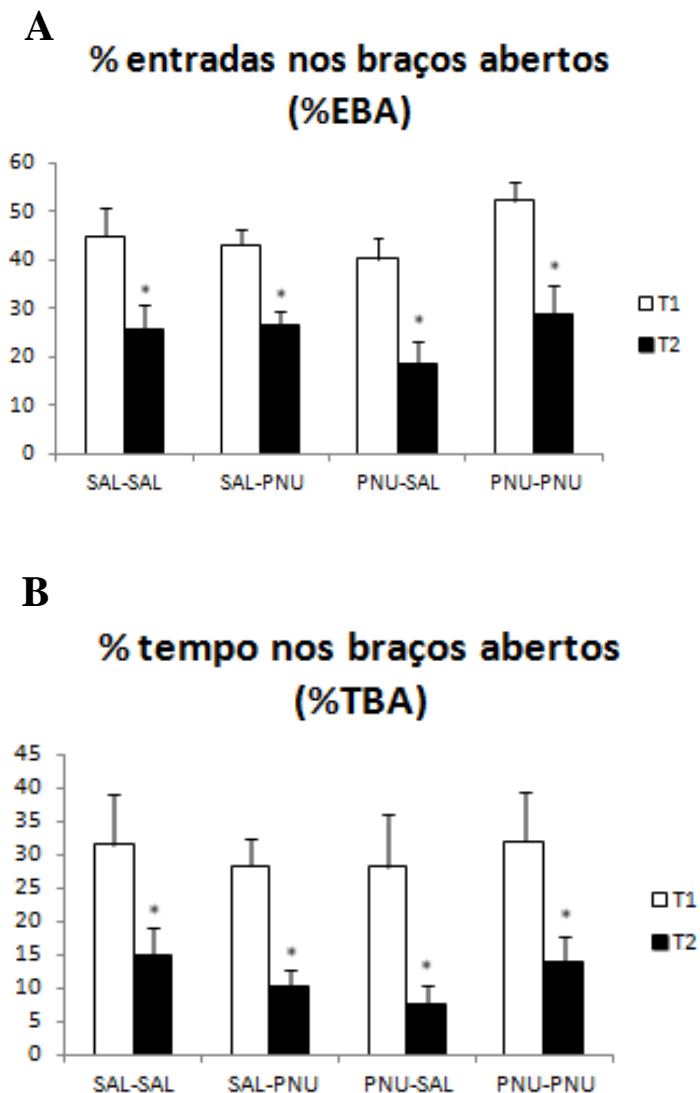


FIGURA 4. Efeitos das microinjeções intra-amídala de SAL ou PNU-282987 (0,1 nmol) nas porcentagens de entradas (% EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (% TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE. Ambas as drogas foram administradas antes do teste. Grupos: SAL-SAL; SAL-PNU; PNU-SAL; e PNU-PNU. * $p < 0,05$, para T1 comparado com T2. (ANOVA seguida do teste *post hoc* Duncan).

Tabela 3. Efeitos das microinjeções intra-amídala de SAL ou PNU-282987 (0,1 nmol), ambas as drogas administradas pré-teste, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.

| Comportamentos | SAL-SAL (n=10) | | SAL-PNU (n=10) | | PNU-SAL (n=9) | | PNU-PNU (n=10) | |
|----------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 |
| TE | 14.3 ± 1.9 | 12 ± 2.4 | 18.9 ± 2.2 | 12,0 ± 0.9* | 12.3 ± 1.2 | 9.7 ± 1.8 | 16.9 ± 1.8 | 12.8 ± 2.0* |
| EBF | 7.2 ± 0.8 | 8.2 ± 1.5 | 10.4 ± 1.2 | 8.8 ± 0.7 | 7.1 ± 0.4 | 7.4 ± 1.0 | 8.0 ± 0.9 | 8.1 ± 1.0 |
| EBA | 7.1 ± 1.7 | 3.8 ± 1.1* | 8.5 ± 1.3 | 3.2 ± 0.3* | 5.3 ± 1.0 | 2.3 ± 0.9* | 8.9 ± 1.2 | 4.7 ± 1.1* |
| TBA | 94.5 ± 22.9 | 44.5 ± 12.6* | 85.1 ± 12.0 | 31.1 ± 6.7* | 84.4 ± 23.9 | 23.1 ± 7.9* | 87.0 ± 17.5 | 41.9 ± 11.4* |
| TBF | 133.8 ± 18.8 | 215.2 ± 17.3* | 155.6 ± 11.9 | 201.7 ± 16.7* | 163.0 ± 20.6 | 227.6 ± 11.0* | 157.0 ± 19.0 | 194.6 ± 20.0* |
| TC | 71.6 ± 14.1 | 40.2 ± 9.0 | 59.2 ± 6.4 | 67.1 ± 10.8 | 52.4 ± 8.7 | 49.2 ± 5.7 | 55.9 ± 5.7 | 63.4 ± 10,3 |

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

* $p < 0,05$ para T1 comparado com T2 (ANOVA, seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.2 Experimento 2. Efeitos das microinjeções combinadas na amígdala de CPA (0,16 nmol) e PNU-282987 (0,1 nmol) nos comportamentos de camundongos expostos (T1) e reexpostos (T2) ao LCE.

Quarenta animais obtiveram canulação positiva mediante análise histológica e foram utilizados no segundo experimento.

A Figura 5 (A e B) mostra o efeito das microinjeções de SAL, CPA (0,16 nmol) ou PNU-282987 (0,1 nmol) na amígdala pré-T1, nos comportamentos emocionais. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não revelaram efeitos significativos para as % EBA [$F_{(3,36)} = 6,51$, $p > 0,05$] e % TBA [$F_{(3,36)} = 1,27$, $p > 0,05$] assim como para as EBA [$F_{(3,36)} = 3,93$, $p > 0,05$] e TBA [$F_{(3,36)} = 1,27$, $p > 0,05$] entre os grupos SAL-SAL, PNU-SAL, CPA-SAL e CPA-PNU em T1 (TABELA 4), indicando que as drogas não induziram mudanças nos estados de ansiedade. Adicionalmente, o tratamento não provocou alterações significativas para as outras medidas consideradas: TE [$F_{(3,36)} = 0,49$, $p > 0,05$], EBF [$F_{(3,36)} = 0,35$, $p > 0,05$], TBF [$F_{(3,36)} = 1,28$, $p > 0,05$] e TC [$F_{(3,36)} = 0,09$, $p > 0,05$] em T1, como demonstrado na Tabela 4.

De acordo com a Tabela 4, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais em T1 para os comportamentos de Esticar [$F_{(3,36)} = 1,50$, $p > 0,05$], Esticadas Protegidas [$F_{(3,36)} = 3,27$, $p > 0,05$], Mergulhar [$F_{(3,36)} = 3,95$, $p > 0,05$], Mergulho Protegido [$F_{(3,36)} = 0,36$, $p > 0,05$] e Levantar [$F_{(1,36)} = 2,71$, $p > 1,71$].

Em T2, a ANOVA de duas vias mostrou uma redução na comparação T1 e T2 na exploração dos braços abertos representada pelas medidas % EBA [$F_{(1,36)} = 37,87$, $p < 0,05$] e % TBA [$F_{(1,36)} = 16,32$, $p < 0,05$] (FIGURAS 5 A e B), assim como para as EBA [$F_{(1,36)} = 15,38$, $p < 0,05$] e TBA [$F_{(3,36)} = 16,32$, $p < 0,05$] (TABELA 4); ocorreu também uma interação entre os fatores tratamento e dia de teste para a % EBA [$F_{(1,36)} = 5,77$, $p < 0,05$]. O teste *post hoc* indicou

uma diminuição significativa na atividade nos braços abertos (% EBA, % TBA, EBA e TBA) para os grupos SAL-SAL, PNU-SAL e CPA-PNU, exceto para o grupo CPA-SAL (FIGURAS 5 A e B e TABELA 4). Além disso, como indicado na Tabela 4, houve um aumento do TBF [$F_{(1,36)} = 23,78$, $p < 0,05$] em T2, para os grupos SAL-SAL, PNU-SAL e CPA-PNU, enquanto nas EBF [$F_{(1,36)} = 0,33$, $p > 0,05$] não foram observadas mudanças significativas para nenhum grupo experimental.

A ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* Duncan, indicaram alteração significativa para a medida TE [$F_{(1,36)} = 6,98$, $p < 0,05$] com diminuição do TE no grupo CPA-PNU; já para a medida TC [$F_{(1,36)} = 2,57$, $p > 0,05$], não houve diminuição significativa para todos os grupos experimentais, em T2 comparado a T1 (TABELA 4).

A ANOVA de duas vias mostrou que o fator dia de teste não indicou alterações entre T1 e T2 para os seguintes comportamentos etológicos: Esticar [$F_{(1,36)} = 1,50$, $p > 0,05$], Esticadas Protegidas [$F_{(1,36)} = 3,27$, $p > 0,05$], Mergulho Protegido [$F_{(1,36)} = 0,36$, $p > 0,05$] e Levantar [$F_{(1,36)} = 1,71$, $p > 0,05$]; enquanto a ANOVA, seguida pelo teste *post hoc* Duncan, mostraram uma diminuição no comportamento Mergulhar [$F_{(1,36)} = 3,95$, $p < 0,05$] para os grupos SAL-SAL, PNU-SAL e CPA-PNU (TABELA 4).

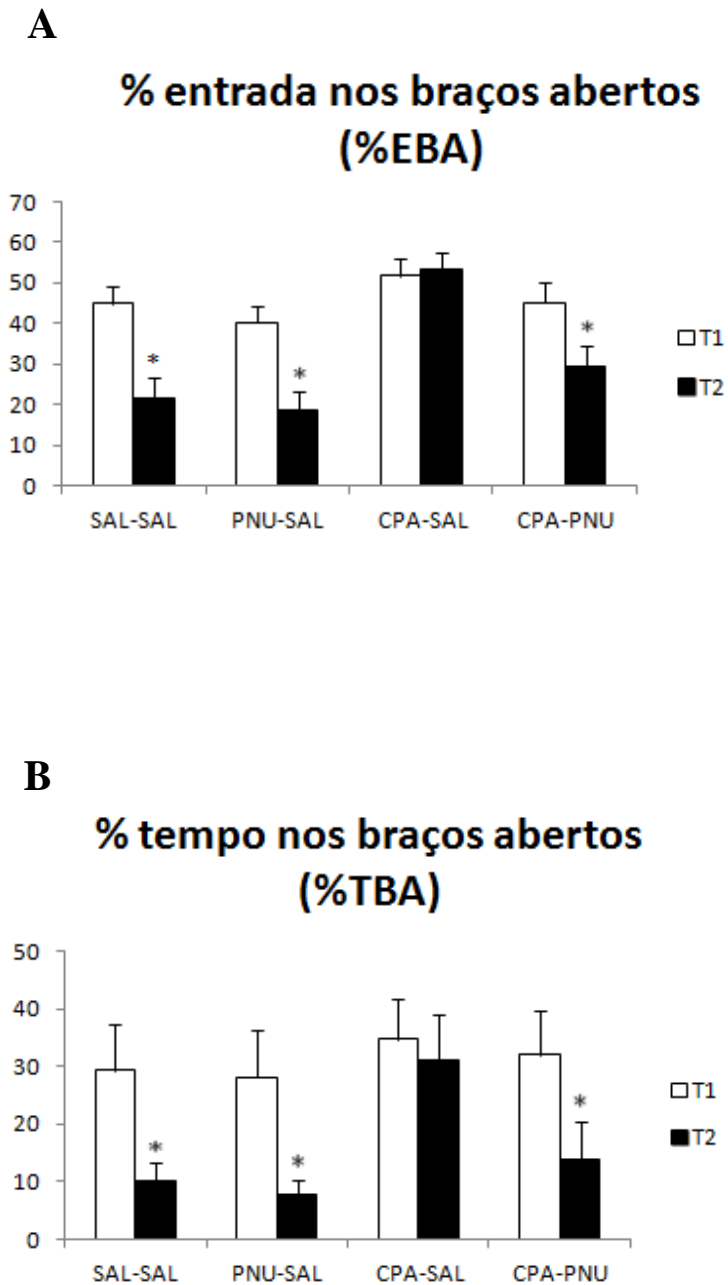


FIGURA 5. Efeitos das microinjeções intra-amídala de SAL, CPA (0,16 nmol) ou PNU-282987 (0,1 nmol) nas porcentagens de entradas (% EBA) (A) e tempo gasto nos braços abertos (% TBA) (B) durante T1 e T2 no LCE. As drogas foram administradas pré-exposição. Grupos: SAL-SAL; PNU-SAL; CPA-SAL; e CPA-PNU. * $p < 0,05$, para T1 comparado com T2. (ANOVA seguida do teste *post hoc* Duncan).

Tabela 4. Efeitos das microinjeções intra-amídala de SAL, CPA (0,16 nmol) ou PNU-282987 (0,1 nmol), ambas as drogas foram administradas pré-exposição, nos comportamentos de camundongos expostos e reexpostos ao LCE.

| Comportamentos | SAL-SAL (n=8) | | PNU-SAL (n=9) | | CPA-SAL (n=11) | | CPA-PNU (n=12) | |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|--------------|----------------|---------------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 |
| TE | 14.1 ± 2.1 | 11.3 ± 2.7 | 12.3 ± 1.2 | 9.7 ± 1.8 | 13.5 ± 1.9 | 13.6 ± 1.4 | 15.2 ± 1.5 | 10.5 ± 1.3* |
| EBF | 7.5 ± 1.0 | 8.3 ± 1.9 | 7.1 ± 0.4 | 7.4 ± 1.0 | 6.7 ± 1.1 | 6.2 ± 0.6 | 8.9 ± 1.3 | 7.6 ± 1.2 |
| EBA | 6.6 ± 1.4 | 3.0 ± 0.8* | 5.3 ± 1.0 | 2.3 ± 0.9* | 6.8 ± 1.0 | 7.1 ± 0.9 | 6.3 ± 0.6 | 2.8 ± 0.5* |
| TBA | 88.6 ± 23.7 | 30.0 ± 10.2* | 84.6 ± 23.9 | 23.1 ± 7.9* | 103.9 ± 21.2 | 93.3 ± 24.1 | 95.9 ± 23.4 | 41.8 ± 19.7* |
| TBF | 148.5 ± 20.3 | 229.0 ± 17.6* | 163.0 ± 20.6 | 227.6 ± 11.0* | 144.3 ± 19.9 | 159.4 ± 20.0 | 146.8 ± 21.4 | 206.8 ± 22.6* |
| TC | 63.3 ± 6.3 | 40.9 ± 10.7 | 52.4 ± 8.7 | 49.2 ± 5.7 | 51.7 ± 9.3 | 47.2 ± 7.8 | 57.2 ± 9.0 | 51.3 ± 10.1 |
| Esticar | 36,8 ± 3.9 | 34,5 ± 6,6 | 33.4 ± 1.4 | 34.2 ± 4.1 | 29.9 ± 4.3 | 36.8 ± 4.1 | 45.6 ± 3.7 | 39.0 ± 3,7 |
| Est. Prot. | 21.5 ± 3.7 | 26.8 ± 4.4 | 20.3 ± 2.7 | 28.5 ± 3.8 | 14.6 ± 2.3 | 19.2 ± 2.9 | 27.6 ± 4.1 | 30.5 ± 4.1 |
| Mergulhar | 4,7 ± 0.8 | 1.1 ± 0.4* | 3.5 ± 1.0 | 1.0 ± 0.4* | 4.3 ± 0.9 | 3.8 ± 0.5 | 2.9 ± 0.5 | 0.6 ± 0.2* |
| Merg. Prot. | 0.5 ± 0.2 | 0.1 ± 0.1 | 0.2 ± 0.1 | 0.2 ± 0.1 | 0.2 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 0.1 ± 0.1 | 0.1 ± 0.1 |
| Levantar | 7.3 ± 0.6 | 6.2 ± 0.6 | 7.8 ± 0.8 | 9.0 ± 0.8 | 8.2 ± 0.5 | 9.2 ± 0.5 | 7.9 ± 0.7 | 8.4 ± 0,7 |

Valores representam as Médias ± Erro Padrão. **TE** = total de entradas; **EBF** = entradas nos braços fechados; **EBA** = entradas nos braços abertos; **TBA** = tempo gasto nos braços abertos; **TBF** = tempo gasto nos braços fechados; **TC** = tempo gasto na área central; **Esticar** = total de esticadas; **Est. Prot** = esticadas protegidas; **Mergulhar** = total de mergulhos; **Merg. Prot** = mergulhos protegidos; **Levantar** = total de levantadas.

* **p** < **0,05** para T1 comparado com T2 (ANOVA, seguida do teste *post hoc* de Duncan).

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos no presente estudo demonstraram que as microinjeções do agonista colinérgico nicotínico PNU-282987 (0,1 nmol) e do antagonista histaminérgico do receptor H1 Clorfeniramina (0,16 nmol) intra-amídala não induziram efeito na ansiedade dos animais utilizados nos dois experimentos realizados, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na atividade exploratória dos braços abertos (% EBA e % TBA) entre o grupo SAL-SAL e os grupos tratados com PNU e CPA durante a primeira exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado (LCE). O PNU na dose estudada de 0,1 nmol, quando utilizado de maneira isolada, não apresentou efeito na memória emocional, entretanto, quando realizada a combinação do PNU com a microinjeção de Clorfeniramina (CPA), foi capaz de reverter o déficit na memória induzido por este antagonista histaminérgico, sugerindo a interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico na amídala de camundongos reexpostos ao LCE. As drogas utilizadas nos experimentos não induziram alterações na atividade locomotora, representada pelas entradas nos braços fechados (EBF) dos animais expostos ao LCE.

5.1 Efeitos da administração intra-amídala de PNU-282987 (0,1 nmol), CPA (0,16 nmol) ou SAL, sobre as respostas de ansiedade.

Os resultados do presente estudo demonstraram que as microinjeções intra-amídala de PNU-282987 (0,1 nmol) e CPA (0,16 nmol), pré-T1 não provocaram efeitos nas respostas relacionadas à ansiedade, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na atividade exploratória dos braços abertos (%EBA e %TBA) entre o grupo SAL-SAL e os grupos PNU-SAL, CPA-SAL e CPA-PNU durante a exposição dos animais ao LCE.

Os resultados do presente estudo relacionados à ansiedade corroboram com um estudo desenvolvido em nosso laboratório por Serafim e colaboradores (2012), entretanto as investigações comportamentais demonstram o envolvimento dos receptores histaminérgicos H1 nas respostas de ansiedade. O estudo de Privou et al. (1998) sugere que a injeção unilateral de CPA nas doses de 0,1 µg ou 20µg no núcleo acumbente e núcleo basal magnocelular (NBM) causou efeito ansiolítico em ratos. Resultados semelhantes foram encontrados por Miyata et al (2011), uma vez que a injeção de CPA na região medial do córtex pré-frontal atenuou as respostas de ansiedade e medo. Entretanto, estudo proveniente do nosso grupo de pesquisa indicou que a injeção sistêmica de CPA (16 mg/kg) em camundongos provocou uma diminuição da atividade nos braços abertos durante a exposição no LCE, sugerindo um efeito ansiogênico (SERAFIM et al., 2013).

A dose do agonista colinérgico nicotínico PNU-282987 utilizada no presente estudo foi de 0,1 nmol e os resultados sobre a ansiedade não foram observados. Com relação aos estudos do PNU sobre a ansiedade, Vicens e seus colaboradores (2011), sugerem que a administração sub-crônica utilizando injeções i.p. de PNU-282987 (3mg/kg) pré-teste em camundongos submetidos ao campo aberto, sugerem efeito ansiogênico. Há indícios de que altas doses de nicotina administradas 15 min antes do teste, provocam efeito ansiogênico em camundongos submetidos ao LCE (CARRASCO et al., 2006).

As discrepâncias dos resultados encontrados no LCE podem ser atribuídas aos comportamentos relacionados à aversão dos braços abertos (BAs) durante a exposição dos animais, pois estudos indicam que esta aversão parece ser influenciada por fatores como o horário em que o teste é realizado (GRIEBEL et al., 1993) e o nível de iluminação do local de teste (GARCIA et al., 2011).

As principais evidências relacionadas às categorias etológicas neste estudo indicaram que as drogas utilizadas não provocaram efeitos nos comportamentos de esticar, esticadas protegidas, mergulhar, mergulho protegido e levantar entre os grupos experimentais em T1. Os resultados da análise etológica somados a não observância de diferenças significativas na atividade exploratória dos braços abertos entre os grupos experimentais na primeira exposição, corroboram os resultados encontrados no presente estudo de que as doses utilizadas de CPA e PNU não induziram efeitos sobre a ansiedade.

5.2 Efeitos da administração intra-amídala de PNU-282987 (0,1 nmol) ou SAL na memória emocional.

Os resultados obtidos no presente estudo quando as microinjeções do agonista colinérgico nicotínico PNU-282987 (0,1 nmol) foram utilizadas de maneira isolada não apresentou resultados na memória emocional como verificado no Experimento 1. Um estudo de Redrobe e seus colaboradores (2009) utilizando PNU (10 mg/kg), mostrou que os receptores nicotínicos colinérgicos alfa-7 medeiam os processos de neuroproteção e melhoram o desempenho cognitivo em camundongos, entretanto, no presente estudo, não foram encontrados efeitos pró-cognitivos do PNU na dose utilizada.

No estudo de Vicens e seus colaboradores (2011), não foi observado nenhum efeito em camundongos sobre a aquisição ou a retenção na tarefa de aprendizagem espacial, após 12 dias de administração sub-crônica de PNU e este resultado pode ser atribuído à dessensibilização do receptor nicotínico colinérgico, dado que a subunidade alfa-7 nAChR dessensibiliza muito rapidamente em resposta à elevada concentração de agonista *in vitro*. De fato, a nicotina e agonistas parciais seletivos às subunidades alfa-7 causam uma ativação transiente desses

receptores, seguido por um período de inibição residual prolongado ou a dessensibilização propriamente dita (PAPKE et al., 2009).

Ainda sobre o estudo de Vicens et al. (2011), quando o PNU (5 mg/kg) foi administrado de forma aguda por 5 dias consecutivos, não foram observados efeitos significativos sobre a aquisição da memória espacial no labirinto aquático de Morris. Entretanto, quando uma dose mais elevada de PNU (10 mg/kg) foi administrada, tornou-se eficaz na melhoria do déficit de aprendizagem e memória induzido pela escopolamina na exploração do braço não familiarizado no labirinto em Y modificado (REDROBE et al., 2009).

Os núcleos central e basolateral da amígdala (BLA) parecem estar envolvidos na modulação da memória aversiva e evidências indicam que estes núcleos influenciam a consolidação da memória para diferentes tipos de experiências (MCGAUGH 2002; PACKARD; CAHILL 2001). Entretanto, devido ao tamanho reduzido dos encéfalos dos camundongos, torna-se difícil distinguir os vários núcleos que compõem o complexo amidoide durante o procedimento de análise histológica, portanto, durante o tratamento farmacológico realizado no presente estudo, foi considerado o complexo como um todo.

Uma possível explicação para o PNU não ter induzido efeitos na aquisição da memória emocional no LCE no presente estudo, pode estar relacionada aos efeitos pró-cognitivos dos agonistas nicotínicos colinérgico em tarefas que apresentam cunho emocional relacionado ao medo, como a esQUIVA inibitória. No LCE, a experiência prévia ao aparato altera reações subsequentes dos roedores ao teste (HOLMES; RODGERS, 1998; RODGERS; JOHNSON, 1995), portanto, ocorre uma mudança qualitativa nos estados emocionais de uma forma incondicionada (T1) para uma forma aprendida (T2) de resposta de ansiedade e/ou medo (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002). Outra explicação para o PNU-282987 não ter apresentado resultado na memória emocional pode estar relacionada a dose de 0,1 nmol utilizada.

Um estudo realizado por Jiang e Role (2008) sugere que a ativação dos receptores nicotínicos colinérgicos na amígdala facilita a transmissão sináptica entre esta estrutura e o córtex cerebral, melhorando o desempenho em tarefas relacionadas à aprendizagem aversiva e a consolidação da aprendizagem do medo depende desta estrutura, representando um possível local para o armazenamento da memória para eventos aversivos (SCHAFE et al. 2005).

5.3 Efeitos das microinjeções combinadas intra-amígdala de PNU-282987 (0,1 nmol), CPA (0,16 nmol) ou SAL na interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que as microinjeções do agonista colinérgico nicotínico PNU-282987 (0,1 nmol) intra-amígdala foram capazes de reverter o déficit na aprendizagem e na aquisição da memória emocional induzido pelas microinjeções do antagonista histaminérgico do receptor H1 Clorfeniramina (0,16 nmol) sugerindo a interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE, uma vez que as ações colinérgicas podem interagir com outros sistemas neurotransmissores, no caso do presente estudo, o sistema histaminérgico.

O efeito neuromodulador que a histamina (HA) exerce sobre a liberação da acetilcolina (ACh) é complexo. Há evidências indicando que a HA controla a liberação central de ACh no córtex cerebral e na amígdala, ativando neurônios colinérgicos do NBM e da banda diagonal da área septal medial que se projetam para o córtex cerebral e o hipocampo, respectivamente (BACCIOTTINI et al., 2001). A amígdala é inervada tanto por fibras histaminérgicas, provenientes do núcleo tuberomamilar, quanto por terminações colinérgicas, derivadas do NBM (BROWN et al., 2001; KHATEB et al., 1995). A possível interação entre esses sistemas é suportada por Khateb e colaboradores (1995), que mostraram que a HA despolariza a membrana

dos neurônios colinérgicos através da ativação de receptores H1 e aumenta a frequência de disparo tônico desses neurônios no NBM, induzindo ativação do córtex cerebral.

Implicações histaminérgicas na aprendizagem e memória são suportadas por evidências experimentais de que antagonistas dos receptores histaminérgicos H3 facilitam a aquisição da memória (GIOVANNINI et al., 1999), possivelmente através de mecanismos colinérgicos (PASSANI; BLANDINA, 1998). Segundo Bucherelli e colaboradores (2006), os sistemas colinérgico e histaminérgico modulam apenas a consolidação da memória e que a variabilidade da memória recuperada oferece oportunidade para tratamentos de distúrbios como as fobias, o estresse pós-traumático e a dor crônica. Neste estudo, verificou-se a fase de aquisição da memória, obtendo a reversibilidade do déficit induzido pelo antagonista histaminérgico dos receptores H1 (CPA) mediante utilização do agonista nicotínico colinérgico PNU-282987.

As evidências bioquímicas e eletrofisiológicas indicam que as interações ACh/HA parecem ser multifacetadas (BACCIOTTINI et al., 2001). A histamina ativa os receptores H3 corticais, que estão provavelmente localizados em interneurônios GABA e inibe a liberação de ACh cortical através do mecanismo GABAérgico que regula a excitabilidade neuronal através da interação com proteínas específicas de membrana (BLANDINA et al., 1996). Por outro lado, as projeções histaminérgicas para o NBM exercem uma influência tônica na atividade colinérgica cortical, despolarizando neurônios colinérgicos através da ativação dos receptores H1, aumentando a liberação de ACh a partir do córtex cerebral (CECCHI et al., 1998). A ativação de neurônios histaminérgicos projetados no BLA inibe o tônus colinérgico desta área e os receptores H2 pós-sinápticos parecem responsáveis por este efeito (PASSANI et al, 2000).

Assim, os antagonistas do receptor H3, através do aumento da liberação de HA endógena, podem facilitar a atividade colinérgica em áreas cerebrais importantes para funções cognitivas.

Porém, a administração sistêmica destes compostos histaminérgicos não podem responder a uma ação seletiva sobre regiões no cérebro. É importante notar que as tarefas cognitivas não implicam necessariamente que todas as alterações de comportamento devem ser interpretadas em termos de aprendizagem e memória, uma vez que a ligação entre a alteração comportamental e um processo cognitivo não é uma relação de um-para-um (BACCIOTTINI et al., 2001).

Os resultados do presente estudo sugerem que o aumento de ACh ofertado pelo PNU-282987, foi capaz de reverter o déficit de memória induzido pela CPA nos animais pertencentes ao grupo CPA-PNU. Estudos utilizando microdiálise *in vivo* demonstraram que os níveis de ACh na amígdala aumentam enquanto ratos executam uma tarefa de alternância espontânea (na qual o animal utiliza pistas visuais para recordar os braços previamente visitados) e que este aumento está correlacionado ao bom desempenho na tarefa executada (GOLD, 2003; MCINTYRE et al., 2003).

A ativação de receptores de HA regula a liberação de ACh e estas influências moduladoras convergem na ativação de projeções da amígdala para outras regiões do cérebro envolvidas na consolidação da memória (PASSANI et al., 2001; CANGIOLI et al., 2002). Lesões no *striatum terminallis* bloqueiam os efeitos de modulação da memória e microinjeções intra-amígdala de drogas sugerem que a modulação dentro da amígdala não é suficiente para afetar a memória, havendo necessidade de projeções eferentes (MCGAUGH, 2004).

Interações fundamentais entre os sistemas neuromoduladores ocorrem na região do BLA, onde estes efeitos são integrados por meio de ações comuns sobre a ativação noradrenérgica e colinérgica dentro desta região, que por sua vez, regula a consolidação da memória através de projeções da amígdala para regiões encefálicas envolvidas no processamento de diferentes tipos de memórias e por meio destas ativações entre esses sistemas que as experiências emocionalmente excitantes tornam-se melhores recordadas (MCGAUGH, 2004).

Estudos têm fornecido evidências sugerindo que os hormônios de estresse liberados por experiências emocionais desempenham um papel importante na mediação dos efeitos da excitação emocional sobre a memória, além disso, também há evidências substanciais de que as influências neuromoduladoras ocorrem no BLA, regulando a consolidação da memória para vários tipos de experiências por meio de projeções através deste núcleo para diversas outras regiões do cérebro envolvidas no armazenamento de informação recém-adquirida (MCGAUGH, 2004), entretanto, como já foi discorrido no presente estudo, foi considerado o complexo amigdalóide como um todo.

Os resultados encontrados em estudos desenvolvidos em nosso laboratório por Serafim e colaboradores (2013; 2014) sugerem que a diminuição do tônus colinérgico na amígdala pode ter sido induzida pelas microinjeções do antagonista histaminérgico (CPA) causando um déficit na aquisição da memória emocional em camundongos durante a reexposição ao LCE e os resultados do presente estudo corroboraram esta hipótese, pois o déficit induzido pela CPA foi revertido ao utilizar o agonista colinérgico nicotínico PNU-282987, aumentando o aporte de ACh na amígdala, com conseqüente facilitação da aprendizagem e da memória.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem a interação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico na amígdala, uma vez que as microinjeções do agonista colinérgico nicotínico PNU-282987 (0,1 nmol) intra-amígdala foram capazes de reverter o déficit na aprendizagem e na aquisição da memória emocional induzido pelas microinjeções do antagonista histaminérgico do receptor H1 Clorfeniramina (0,16 nmol) em camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado (LCE).

Assim, propomos que o antagonista histaminérgico ao receptor H1 reduz a ativação colinérgica na amígdala, levando ao déficit na aprendizagem emocional.

7. 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: 92-99, 2008.

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

BACCIOTTINI et al. Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 124: 183–194, 2001.

BITNER et al. In-vivo histamine H3 receptor antagonism activates cellular signaling suggestive of symptomatic and disease modifying efficacy in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v.60: 460-466, 2011.

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

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

BLANDINA et al. Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H3 receptor activation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 119: 1656–64, 1996.

BLANDINA et al. H3 modulation of the release of neurotransmitters in vivo. The Histamine H3 Receptor a Target for New Drugs, **Elsevier**, v. 30: 27–40, 1998.

- BREWIN et al. Memory for emotionally neutral information in posttraumatic stress disorder: a meta-analytic investigation. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 116(3): 448–463, 2007.
- BROWN et al. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**, v. 63: 637-672, 2001.
- BUCHERELLI et al. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. **Learning & Memory**, v. 13: 426-430, 2006.
- CANGIOLI et al. Activation of histamine H3 receptors in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. **European Journal of Neuroscience**, v. 16: 521–28, 2002.
- 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: 1193–1205, 2005.
- CARRASCO et al. Effects of co-administration of bupropion and nicotinic agonists on the elevated plus maze test in mice. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30(3): 455–62, 2006.
- CANTERAS et al. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 360: 213-245, 1995.
- CECCHI et al. Increase of acetylcholine release from rat cortex of freely moving rats by administration of histamine into nucleus basalis magnocellularis. **Inflammation Research**, v.47: 32–3, 1998.
- CHAN et al. Frontal cortical alpha7 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in working and reference memory. **Neuropharmacology**, v. 52(8): 1641–9, 2007.
- CRUZ et al. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49: 171-176, 1994.

DAL-COL et al. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 74: 395-400, 2003.

DERE et al. Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. **Behavioural Brain Research**, v. 215(2): 209–20, 2010.

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

FRANKLIN, K.B.J; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, 2^a ed, California, USA, 2001.

FOLEY et al. H3 Receptor Antagonism Enhances NCAM PSA-Mediated Plasticity and Improves Memory Consolidation in Odor Discrimination and Delayed Match-to-Position Paradigms. **Neuropsychopharmacology**, v. 34: 2585–2600, 2009.

GALVIS-ALONSO et al. A combined study of behavior and Fos expression in limbic structures after re-testing Wistar rats in the elevated plus-maze. **Brain Research Bulletin**, v. 81: 595-599, 2010.

GAULT et al. Comparison of polymorphisms in the alpha7 nicotinic receptor gene and its partial duplication in schizophrenic and control subjects. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 123(1): 39-49, 2003.

GARCIA et al. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 85: 265-270, 2005.

GARCIA et al. The effects of pentylenetetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. **Behavioural Brain Research**, v. 217: 171-177, 2011.

- GIANLORENÇO et al. L-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H1 receptor. **Progress in Neuro-Psychopharma & Biological Psychiatry**, v. 35: 91-95, 2010.
- GIANLORENÇO et al. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 86: 134– 138, 2011.
- GIOVANNINI et al. Effects of histamine H3 receptor agonists and antagonists on cognitive performance and scopolamine-induced amnesia. **Behavioural Brain Research**, v. 104: 147–55, 1999.
- GIOVANNINI et al. Improvement in fear memory by histamine elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells, **Journal of Neuroscience**, v. 23: 9016–9023, 2003.
- GOLD, P.E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80: 194–210, 2003.
- GRIEBEL et al. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. **Behavioral Processes**, v. 29: 37–48, 1993.
- HAAS, B.W; CANLI, B.W. Emotional memory function, personality structure and psychopathology: A neural system approach to the identification of vulnerability markers. **Brain Research Reviews**, v. 58(1): 71–84, 2008.
- HAAS et al. Histamine in the nervous system. **Physiology Reviews**, v. 88: 1183-1241, 2008.
- HAAS, H; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. **Neuroscience**, v. 4: 121-30, 2003.
- HANDLEY, S. L; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Archives of Pharmacology**, v. 327: 1-5, 1984.

HOLMES, A; RODGERS, R. J. Responses of Swiss–Webster Mice to Repeated Plus-Maze Experience: Further Evidence for a Qualitative Shift in Emotional State? **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 60(2): 473–488, 1998.

ISHIDA et al. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptors in the central amygdaloid nucleus alter naloxone-induced withdrawal following a single exposure to morphine. **Psychopharmacology**, v. 214: 923–931, 2011.

ISHUNINA et al. Estrogen receptors and metabolic activity in the human tuberomamillary nucleus: changes in relation to sex, aging and Alzheimer’s disease. **Brain Research**, v. 988: 84–96, 2003.

JIANG, L.; ROLE, L.W. Facilitation of cortico-amygdala synapses by nicotine: activity dependent modulation of glutamatergic transmission. **Journal of Neurophysiology**, v. 99: 1988–1999, 2008.

KANDEL et al. **Princípios da Neurociência**. São Paulo: Editora Manole, 9ª ed, 2003.

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

KITAGAWA et al. Safety, pharmacokinetics, and effects on cognitive function of multiple doses of GTS-21 in healthy, male volunteers. **Neuropsychopharmacology**, v. 28(3): 542–51, 2003.

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

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

KOMATER et al. Effects of histamine H3 receptor antagonists in two models of spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v.159: 295–300, 2005.

- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23: 155-184, 2000.
- LEVIN, E.D; SIMON, B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. **Psychopharmacology**, v.138: 217–30, 1998.
- LEVIN et al. Nicotine-dizocilpine interactions and working and reference memory performance of rats in the radial-arm maze. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 61: 335–40, 1998.
- LIN et al. Immunohistochemical evidence for the presence of type B monoamine oxidase in histamine-containing neurons in the posterior hypothalamus of cats. **Neuroscience Letters**, v. 128: 61–65, 1991.
- LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v.46: 321-340, 1990.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92: 180-185, 1987.
- LINTUNEN et al. Postnatal expression of H1-receptor mRNA in the rat brain: correlation to L-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. **European Journal of Neuroscience**, v. 10(7): 2287-2301, 1998.
- MARTIN, L.F; FREEDMAN, R. Schizophrenia and the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. **International Review of Neurobiology**, v. 78: 225-46, 2007.
- MCGAUGH, J.L. The Amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27: 1-28, 2004.
- MCGAUGH J.L. The amygdala regulates memory consolidation. **Neuropsychology of Memory**, pp. 437–49, 3^a ed, 2002.

MCINTYRE et al. Cooperation between memory systems: acetylcholine release in the amygdala correlates positively with performance on a hippocampus-dependent task. **Behavioral Neuroscience**, v. 117: 320–26, 2003.

MCNAUGHTON, N; CORR, P.G. A two-dimensional neurophysiology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.18: 215-232, 2004.

MESULAM et al. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6). **Neuroscience**, v. 10: 1185–201, 1983.

MIYATA et al. Chlorpheniramine exerts anxiolytic-like effects and activates prefrontal 5-HT systems in mice. **Psychopharmacology**, v. 213: 441-452, 2011.

MIYAZAWA et al. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. **Nature**, v.423 (6943): 949–55, 2003.

NARDONE, R. Cholinergic dysfunction and amnesia in patients with Wernicke-Korsakoff syndrome: a transcranial magnetic stimulation study. **Journal of Neural Transmission**, v. 117: 385-391, 2010.

NASEHI et al. Involvement of the cholinergic system of CA1 on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. **Journal of Psychopharmacology**, 26(8): 1151-61, 2011.

NEWMAN et al. Pheromonal signals access the medial extended amygdala: one node in a proposed social behavior network. **In Hormones, Brain and Behavior**, 17-31, 2002.

PACKARD, M.G; CAHILL, L. Affective modulation of multiple memory systems. **Neurobiology of behavior**, v. 11: 752–56, 2001.

PAPKE et al. Activation and desensitization of nicotinic alpha7-type acetylcholine receptors by benzylidene anabaseines and nicotine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329(2): 791–807, 2009.

- PARE et al. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **Journal of Neuroscience**, v.92: 1-9, 2004.
- PASSANI, M; BLANDINA, P. Cognitive implications for H3 and 5-HT3 receptors modulation of cortical cholinergic function: a parallel story. **Methods and Findings of Experimental Clinical Pharmacology**, v. 20(8): 725, 1998.
- PASSANI et al. Central histaminergic system and cognitive processes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24: 107–13, 2000.
- PASSANI et al. Thioperamide and cimetidine modulate acetylcholine release from the amygdala of freely moving rats. **Inflammation Research**, v. 49: 43–4, 2001.
- PELLOW et al. 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: 149-167, 1985.
- PRELL, G.D; GREEN, J.P. Histamine as a neuroregulator, **Annual Review of Neuroscience**, v.9: 209-254, 1986.
- PRIVOU et al. The H1- and H2-histamine blockers chlorpheniramine and ranitidine applied to the nucleus basalis magnocellularis region modulate anxiety and reinforcement related processes. **Neuropharmacology**, v. 37: 1019-1032, 1998.
- QUEVEDO et al. Consolidação da memória e estresse pós-traumático. **Revista Brasileira de Psiquiatria**; v. 25 (supl I): 25-30; 2003.
- REDROBE et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation ameliorates scopolamineinduced behavioural changes in a modified continuous Y-maze task in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.602 (1): 58–65, 2009.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, J.T. Factor Analysis of spatiotemporal and ethological measures in the marine elevated plus-Maze test of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 52, 1995.
- ROGAN, M.T; LEDOUX, J.E. Emotion: system, cells, synaptic plasticity. **Cell**, v. 85, 1996.

- RONCARATI et al. Procognitive and Neuroprotective Activity of a Novel $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist for Treatment of Neurodegenerative and Cognitive Disorders. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329: 459–468, 2009.
- SACCHETTI et al. Cerebellum and emotional behavior. **Neuroscience**, v.162, p. 756-762, 2009.
- SAH et al. The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. **Physiol. Rev.**, v.83, 2003.
- SCHAFE et al. Tracking the fear engram: The lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. **Journal of Neuroscience**, v. 25: 10010–10015, 2005.
- SERAFIM et al. Chlorpheniramine infused into amygdala impairs emotional memory expression in the inhibitory avoidance and elevated plus maze testing. **Brain Research Bulletin**, 2014, *em preparação*.
- SERAFIM et al. H1 but not H2 histamine antagonist receptors mediate anxiety-related behaviors and emotional memory deficit in mice subjected to elevated plus-maze testing. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46: 440-446, 2013.
- SERAFIM et al. H1-histamine receptors in the amygdala are involved in emotional memory but do not mediate anxiety-related behaviors in mice submitted to EPM testing. **Brain Research Bulletin**, v. 89: 1-7, 2012.
- SERAFIM et al. L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43(1): 100-106, 2010.
- SONG et al. Histamine improves rat rota-rod and balance beam performances through H(2) receptors in the cerebellar interpositus nucleus. **Neuroscience**, v. 140 (1): 33–43, 2006.
- STEPHENS et al. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**, v. 90: 166-169, 1986.

- STRAKHOVA et al. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. **Brain Research**, v. 1250: 41-8, 2009.
- TOYODA et al. Interplay of Amygdala and Cingulate Plasticity in Emotional Fear. **Neural Plasticity**, 2011.
- TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44: 463- 469, 1993.
- VICENS et al. Behavioral effects of PNU-282987, an alpha7 nicotinic receptor agonist, in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 216: 341–348, 2011.
- VICENS et al. Effects of early training and nicotine treatment on the performance of male NMRI mice in the water maze. **Neural Plasticity**, v. 10: 303–17, 2003.
- WOOLF et al. Cholinergic systems in the rat brain. I. Projections to the limbic telencephalon. **Brain Research Bulletin**, v. 13: 751–84, 1984.
- YANAI, K; TASHIRO, M. The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: an insight from human positron emission tomography studies. **Pharmacology & Therapeutics**, v.113: 1-15, 2007.
- YU et al. Effect of endogenous histamine in the ventral hippocampus on fear memory deficits induced by scopolamine as evaluated by step-through avoidance response in rats. **Physiology & Behavior**, v. 87: 687- 693, 2006.
- ZARRINDAST et al. The effects of histaminergic agents in the central amygdala of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural Pharmacology**, v. 16: 643-649, 2005.
- ZLOMUZICA et al. Histamine H1 receptor knockout mice exhibit impaired spatial memory in the eight-arm radial maze. **British Journal of Pharmacology**, v. 157: 86–91, 2009.