

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
MESTRADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**CLARICE KRÁS BORGES DA SILVEIRA**

**PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS HIPOCAMPAIS  
NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

**Porto Alegre, 2007**

**CLARICE KRÁS BORGES DA SILVEIRA**

**PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS  
HIPOCAMPAIS NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre, 2007

S587p Silveira, Clarice Krás Borges da.

Papel dos receptores histaminérgicos hipocampais na extinção de memórias aversivas / Clarice Krás Borges da Silveira; orient. Martín Cammarota. Porto Alegre: PUCRS, 2007.

63 f.: gráf. il. tab.

Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Neurociências.

1. Memória Aversiva. 2. Memória/Efeitos de Drogas. 3. Histamina. 4. Aprendizagem de Esquiva. I. Cammarota,

Bibliotecária Responsável:

Sabrina Caimi Silva da Costa

CRB10/1606

Dedico esta dissertação ao meu marido Rubens,  
pelo apoio, incentivo, amor e por possibilitar  
o meu crescimento profissional.  
Aos meus pais e ao meu irmão pela  
constante presença e estímulo nesta caminhada.

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha família Rubens, Pai, Mãe e Daniel pelo amor, apoio, suporte e incentivo.

Ao Martín Cammarota, Ivan Izquierdo e Lia Bevilaqua por me receberem como aluna no laboratório do Centro de Memória, principalmente ao Martín pela orientação, paciência e ensinamentos.

A todos os colegas do Centro de Memória pelo companheirismo, conhecimentos trocados, amizade e apoio constante.

A todos os meus amigos que participaram desta conquista comigo.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a minha formação profissional.

A PUCRS e a CAPES pelo financiamento da minha bolsa de estudos.

Muito obrigada,  
Clarice Krás Borges da Silveira

## RESUMO

Diversos trabalhos experimentais demonstram que o medo é uma resposta adaptativa crucial para a sobrevivência. Assim, as memórias de medo ou aversivas são solidamente armazenadas no cérebro, permitindo aos animais reconhecer e responder adequadamente a situações ameaçadoras. Paralelo à importância de formar e manter memórias associadas a situações aversivas, é fundamental a habilidade de inibir ou extinguir memórias de medo aprendido quando estas já não forem mais relevantes. Dificuldades neste processo de inibição constituem a base de distúrbios psiquiátricos relacionados à ansiedade, as quais têm repercussões sociais cada vez mais prevalentes (Jeffrey & Jay, 1998; Quirk & Gehler, 2003; Myers & Davis, 2002). A extinção de memórias constitui um novo aprendizado envolvendo substratos neuroanatômicos, celulares e moleculares, além de requerer expressão gênica e síntese de proteínas em diferentes áreas do cérebro. Tanto o córtex pré-frontal medial como o córtex entorrinal, a amígdala basolateral e o hipocampo desempenham um papel fundamental neste processo (Cammarota et al, 2007). A histamina controla várias funções neurobiológicas e comportamentais. Baseado nestes fatos percebe-se a necessidade de verificar modos de acelerar a extinção ou inibição de memórias aversivas, bem como estudar por qual via de sinalização isso ocorre. O papel do sistema histaminérgico da região CA1 do hipocampo dorsal foi analisado na extinção de memória relacionado à tarefa de esquiva inibitória. Utilizamos ratos machos Wistar de três meses de idade, treinados na tarefa de Esquiva Inibitória (EI) segundo Lattal & Abel (2001). Nesta tarefa durante o primeiro dia (treino) o animal foi colocado na caixa de esquiva e exibiu uma resposta inata exploratória. Após descer da plataforma no interior da caixa, rumo ao assoalho metálico, aprendeu a associar a descida da plataforma com um leve choque aplicado nas quatro patas. No segundo dia (teste) foi permitido ao animal explorar a caixa por um tempo máximo de 600 segundos. Após, o animal foi retirado da caixa e foram infundidos agonista e antagonista dos receptores de histamina H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> em cânulas bilaterais posicionadas na região CA1 do hipocampo dorsal, de acordo com as coordenadas obtidas no Atlas Paxinos e Watson (1986). Logo em seguida, o animal foi devolvido a sua caixa de moradia. No terceiro dia, os animais foram novamente colocados na caixa da esquiva e foi verificado o tempo de latência (tempo em que o animal demorou a descer da plataforma). A diferença entre o tempo que o animal permaneceu sobre a plataforma na sessão de teste e o tempo que permaneceu sobre a mesma na sessão de treino foi o valor utilizado como medida de aprendizagem. O aprendizado em EI envolve várias habilidades, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade à dor e um componente emocional amplamente modulado por hormônios relacionados ao estresse (Izquierdo & Medina, 1997). Verificamos que a histamina melhora a extinção de memórias aversivas e este efeito parece ser mediado pelo receptor H<sub>2</sub>.

**PALAVRAS-CHAVE:** MEMÓRIA AVERSIVA; MEMÓRIA / efeitos de drogas; HISTAMINA; APRENDIZAGEM DE ESQUIVA INIBITÓRIA

## **ABSTRACT**

Several experimental works have demonstrated that fear as an adaptive response is crucial to survival. Therefore, fear-related or aversive memories are solidly stored in the brain, allowing animals to recognize and properly respond to threatening situations. Parallel to the importance of forming and keeping memories associated to aversive situations, the ability to inhibit and extinguish memories related to learned fear when they are no longer relevant is crucial. Difficulties in that inhibition process constitute the basis of anxiety-related psychiatric disorders, which have increasing prevalent social repercussions (Jeffrey & Jay, 1998; Quirk & Gehler, 2003; Myers & Davis, 2002). Extinction of memories constitutes a new learning that involves neuroanatomic, cellular, and molecular substrates, besides requiring genic expression and protein synthesis in distinct brain areas. Both the medial prefrontal cortex and the entorhinal cortex, the basolateral amygdala and the hippocampus play a crucial role in that process (Cammara et al, 2007). Histamine controls several neurobiological and behavioral functions. Based on those facts, it is necessary to find ways to improve extinction or inhibition of aversive memories, as well as to study which signaling pathway it takes place through. The role played by the histaminergic system at the CA1 region of the dorsal hippocampus was examined in the extinction of memories related to the step-down inhibitory avoidance task. We have used three-month-old male Wistar rats trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance task (IA) according to Lattal & Abel (2001). In that task, during the first (training) day the animal placed in the avoidance box exhibited an inborn exploratory response. After it stepped down from the platform inside the box, towards the metallic floor, it learned to associate that move with a light footshock applied to its four legs. In the second (training) day, the animal was allowed to explore the box for a maximum of 600 seconds. Afterwards, it was taken from the box and histamine receptor H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, and H<sub>3</sub> agonists and antagonists were infused into bilateral cannulas placed at the CA1 region of the dorsal hippocampus, according to guidelines obtained from the Paxinos and Watson Atlas (1986). Immediately after that the animal was returned to its living box. On the third day, the animals were once again placed in the avoidance box and latency time (i. e., the time it took for the animal to come down from the platform) was checked. The difference between the times the animal remained over the platform in the test session and in the training session was the value used as a learning measure. Learning in IA involved several abilities, including spatial and visual perception, sensitivity to pain, and an emotional component widely modulated by stress-related hormones (Izquierdo & Medina, 1997). We have found that histamine improve the extinction of aversive memories, and such effect seems to be mediated by the H<sub>2</sub> receptor.

**KEY WORDS:** AVERSIVE MEMORY; MEMORY / drug effects; HISTAMINE ; STEP-DOWN INHIBITORY AVOIDANCE LEARNING.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
AC	adenilil ciclase
CA1, CA2, CA3	Corno de Amon 1, 2, ou 3, regiões do hipocampo, que os primeiros anatomistas julgaram ter formato semelhante ao chifre presente em algumas representações de Amon, rei dos deuses da cidade de Tebas, na mitologia do Antigo Egito.
cAMP	adenosilil monofosfato cíclico, do inglês <i>cyclic adenosyl monophosphate</i>
CCA	córtex cingulado anterior
CE	córtex entorrinal
CP	córtex parietal
CPF	córtex pré-frontal
CPP	córtex parietal posterior
CRE	elemento responsivo ao cAMP, do inglês <i>cAMP responsive element</i>
CREB	proteína ligante ao CRE, do inglês <i>CRE binding protein</i>
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetilsulfóxido
EI	Esquiva Inibitória
ERA	Reação Aguda ao Estresse
ERK1/2	proteína cinase regulada por sinal extracelular, isoformas 1 e 2, do inglês <i>extracellular signal-regulated protein kinase 1/2</i>
5-HT1A	receptor serotoninérgico
i.c.v.	intra-cérebro-ventricular
LTM	Memória de Longa Duração, do inglês <i>Long-Term Memory</i>
LTP	Potenciação de Longa Duração, do inglês <i>Long-Term Potentiation</i>
MAPK	proteína cinase ativada por mitógenos, do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
M1	receptor muscarínico
mRNA	RNA mensageiro
NMDA	N-metil-D-aspartado, do inglês <i>N-methyl-D-aspartate</i>



NMDAr	receptor NMDA, do inglês <i>NMDA receptor</i>
NR2B	subunidade do receptor NMDA
nTM	<b>n</b> úcleo <b>t</b> úbero- <b>m</b> amilar
PKA	proteína cinase A, do inglês <i>protein kinase A</i>
PKC	proteína cinase C, do inglês <i>protein kinase C</i>
SNC	<b>S</b> istema <b>N</b> ervoso <b>C</b> entral
STM	Memória de Curta Duração, do inglês <b>S</b> hort- <b>T</b> erm <b>M</b> emory
TEPT	Transtorno do Estresse Pós-Traumático
Tr	Treino
TT1	Sessão de teste sem reforço (extinção)
TT2	Sessão de teste
VMAT-2	enzima vesicular transportadora de monoaminas, isoforma 2, do inglês <i>vesicular monoamine-transporter 2</i>

# SUMÁRIO

<b>I: INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
I.1 MEMÓRIA - DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA .....	11
I.2 CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS .....	11
I.3 MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES .....	12
1.3.1 Modulação da memória .....	12
1.3.2 Memórias aversivas .....	15
1.3.3 Inibição de memória: Extinção .....	16
I.4 SISTEMA HISTAMINÉRGICO .....	19
1.4.1 Anatomia do sistema histaminérgico .....	19
1.4.2 Metabolismo da histamina .....	20
1.4.3 Receptores histaminérgicos .....	22
I.5 EFEITOS DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA .....	24
1.5.1 Plasticidade sináptica .....	24
1.5.2 Aprendizado e memória .....	25
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
II.1 OBJETIVO GERAL .....	28
II.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	28
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
III. 1 – ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	29
III. 2 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	29
III. 3 – MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS .....	30
III. 4 – ESQUIVA INIBITÓRIA (EI) .....	31
III. 5 – TRATAMENTO FARMACOLÓGICO .....	33
III. 6 – CONTROLE HISTOLÓGICO DA LOCALIZAÇÃO DAS CÂNULAS-GUIA E DO LOCAL DE INFUSÃO. ....	34
III. 7 – FÁRMACOS UTILIZADOS .....	35
III. 8 – ESTUDOS COMPORTAMENTAIS COMPLEMENTARES .....	35
III. 9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	37
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>VI. CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## **I: INTRODUÇÃO**

### ***1.1 Memória - Definição e Importância***

A memória é a capacidade de armazenamento de todas as formas de conhecimento adquirido pelo homem em suas relações com o meio ambiente (Kandel et al, 2000). É a capacidade de aprender coisas novas, relacioná-las com outras informações já armazenadas e construir novas idéias das quais nos lembraremos depois. A memória nos possibilita recordar fatos ocorridos desde os mais tenros anos de nossas vidas até o momento atual. Quando a memória é perdida, ficamos incapazes de dar sentido aos eventos passados e trabalhar mentalmente com idéias, impressões e imagens, construindo significados estáveis e duradouros (Squire & Kandel, 2003).

Podemos distinguir três etapas no processamento mnemônico: aquisição, consolidação e evocação. A aquisição consiste tanto da percepção dos estímulos, sejam estes provenientes de fontes externas (experiências sensoriais da interação com o ambiente) ou internas (cognição, emoção) bem como da distribuição da informação percebida até os centros de análise e integração. Durante a fase de consolidação, a informação adquirida sofre um processo gradual de filtragem e fixação. A evocação é o processo mediante o qual a informação consolidada é recuperada e expressada.

### ***1.2 Classificação das Memórias***

As memórias podem ser classificadas quanto ao tempo de retenção da informação armazenada ou quanto à natureza de seu conteúdo (Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003; Squire & Zola, 1996), conforme resumido nos **Quadros 1 e 2**, respectivamente.

**Quadro 1:** Classificação das memórias quanto ao tempo de retenção.

Tempo de Retenção	Características
Muito curta	Permanece por frações de segundos a alguns segundos; memória sensorial.
Curta	Permanece por minutos ou horas; garante o sentido de continuidade do presente.
Longa	Permanece por dias, semanas ou anos; garante o registro do passado autobiográfico e conhecimentos do indivíduo.

**Quadro 2:** Classificação das memórias quanto à natureza de seu conteúdo.

Tipo de Memória (quanto ao conteúdo)	Subtipos	Características	Regiões cerebrais envolvidas na sua formação
<b>Declarativa ou Explícita</b> (pode ser descrita por meio de palavras)	• Episódica (eventos)	Tem uma referência temporal; memória de fatos seqüenciados.	• Lobo Medial Temporal
	• Semântica (fatos)	Envolve conceitos atemporais; memória cultural.	• Diencefalo
<b>Não-declarativa ou Implícita</b> (não pode ser descrita por meio de palavras)	• De representação perceptual	Representações (imagens, sons) sem significado aparente conhecido, mas úteis como dicas facilitatórias da evocação de informações inerentes; memória pré-consciente ( <i>priming</i> ).	• Neocórtex
	• De procedimentos	Hábitos, habilidades, regras.	• Estriado • Cerebelo
	• Associativa	Associa dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma resposta (condicionamento operante).	• Amígdala (respostas emocionais) • Cerebelo (respostas musculares esqueléticas)
	• Não associativa	Atenua uma resposta (habituação) ou a aumenta (sensibilização) através da repetição de um mesmo estímulo.	• Reflexos
<b>Operacional</b>		Processamento contínuo ( <i>on-line</i> ) das informações recém-adquiridas e/ou recém-evocadas; permite o raciocínio e o planejamento do comportamento.	• Córtex pré-frontal • Córtex parietal posterior

### ***I.3 Mecanismos Celulares e Moleculares***

#### **I.3.1 Modulação da memória**

Todas as funções do Sistema Nervoso Central (SNC) podem ser moduladas, de modo que suas funções podem ser ativadas ou desativadas, aceleradas ou freadas, fortalecidas ou enfraquecidas de acordo com a necessidade de cada momento. Logo, a memória, uma função

do SNC, pode ser modulada por situações que ocorrem nos momentos de sua formação (Cahill & McGaugh, 1998).

Os sistemas moduladores consistem em diversos conjuntos de fibras que terminam de modo difuso em vastas áreas do SNC. Essas fibras se originam de núcleos localizados no tronco encefálico, no diencéfalo e no prosencéfalo basal e atuam por meio de neurotransmissores clássicos e bem conhecidos, especialmente as aminas e a acetilcolina. O **Quadro 3** sintetiza os principais sistemas moduladores e qual a sua influência na formação e na evocação das memórias (Barros et al, 2001; Cahill & McGaugh, 1998; Izquierdo & McGaugh, 2000).

O papel das vias sinalizadoras intracelulares, envolvendo a atividade de moléculas mensageiras e finalizando na modulação da atividade de enzimas foi caracterizado. Entre estas últimas, as proteínas quinases, responsáveis por modificações covalentes em substratos neuronais específicos, demonstraram a importância do processo de fosforilação para a sinalização intracelular e para a manutenção temporária da facilitação da transmissão sináptica subjacente à plasticidade (Micheau & Riedel, 1999).

Analisando-se o **Quadro 3**, um fato que chama a atenção é que não há uma descrição do papel do sistema histaminérgico sobre os processos de extinção de memórias aversivas. O que já é conhecido é o seu papel na facilitação da formação de memórias (Silva et al, 2006).

**Quadro 3:** Sistemas moduladores da formação da memória .

Neurotransmissor	Localização dos corpos neuronais de origem	Projeção	Função geral	Envolvimento na modulação da memória
Noradrenalina	Lócus ceruleus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ascendente: todo o prosencéfalo e mesencéfalo;</li> <li>• Descendente: rombencéfalo e medula.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulação da excitabilidade cortical e subcortical;</li> <li>• Regulação do ciclo sono-vigília.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitação da formação de LTM, agindo sobre CA1, CE e CP, imediatamente após a aquisição, e 3-6 horas mais tarde;</li> <li>• Facilitação da evocação, agindo simultaneamente sobre CA1, CE, CP e CCA.</li> </ul>
Dopamina	Substância Negra e área tegmentar ventral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ascendente: núcleos da base e regiões límbicas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coordenação motora;</li> <li>• Modulação emocional;</li> <li>• Comportamentos motivados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitação da memória operacional, agindo sobre o CPF;</li> <li>• Inibição da formação de STM, agindo sobre CA1 e CE;</li> <li>• Facilitação da formação de LTM, agindo sobre CA1, CE e CP, durante as primeiras 6 horas após a aquisição;</li> <li>• Facilitação da evocação, agindo simultaneamente sobre CA1, CE, CP e CCA.</li> </ul>
Serotonina	Núcleos da rafe pontina e mesencefálica (grísea periaquedutal)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ascendente: todo o prosencéfalo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulação da excitabilidade cortical e subcortical.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitação da formação de STM, agindo sobre CA1, e inibição simultânea por ação sobre o CE;</li> <li>• Inibição da formação de LTM, agindo sobre CA1, CP, e CE, durante as primeiras 6 horas após a aquisição;</li> <li>• Inibição da evocação, agindo simultaneamente sobre CA1, CE, CP e CCA.</li> </ul>
Acetilcolina	Núcleo basal de Meynert, área septal, núcleos da banda diagonal, núcleos pontinos rostrais e formação reticular mesencefálica.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ascendente: todo o córtex cerebral, diencéfalo e mesencéfalo;</li> <li>• Descendente: tronco cerebral.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulação da excitabilidade cortical;</li> <li>• Manutenção da vigília;</li> <li>• Iniciação do sono paradoxal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitação da memória operacional, agindo sobre o CPF;</li> <li>• Facilitação da formação de STM e LTM, agindo sobre CA1, CE e CPP nos momentos iniciais de sua formação;</li> <li>• Facilitação da evocação, agindo sobre CA1, CE, CP e CCA.</li> </ul>
Histamina	Núcleo túbero-mamilar do hipotálamo posterior	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ascendente: todo o prosencéfalo;</li> <li>• Descendente: rombencéfalo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manutenção da vigília;</li> <li>• Controle do nível de alerta comportamental.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitação da formação de LTM agindo sobre CA1 imediatamente após a aquisição.</li> <li>• Ausência na literatura a respeito do seu pape na extinção de memórias.</li> </ul>

### 1.3.2 Memórias aversivas

Um indivíduo que vivenciou, presenciou ou tomou conhecimento de um fato traumático pode desenvolver quadros clínicos psiquiátricos como Reação Aguda ao Estresse (ERA), Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) e/ou Alterações Permanentes de Personalidade Após Experiência Catastrófica (Quevedo et al, 2003). Alterações fisiológicas e neuroquímicas estão relacionadas à reação aguda ao estresse e ao TEPT. Apesar da resposta ao estresse ser importante à sobrevivência, pode também resultar na formação de redes neuronais que facilitam memórias intrusivas e sintomas associados de hipervigilância: resposta de sobressalto exagerada, labilidade afetiva, ansiedade, perturbação e hiperreatividade do sistema nervoso autônomo. Essa rede neuronal pode ser ativada por estímulos sensoriais externos ou internos, como estímulos cognitivos, afetivos ou somáticos (Cahill, L., 1995a).

Pelo fato de comportamentos motivados pelo medo serem respostas adaptativas cruciais para a sobrevivência, as memórias aversivas são solidamente armazenadas no cérebro, permitindo que animais reconheçam e respondam adequadamente a situações ameaçadoras.

Paralelo a importância de formar e manter memórias associadas a situações aversivas, a inibição de respostas de medo apreendidas quando estas não são mais relevantes também é crucial (Jeffrey & Jay, 1998; Quirk & Gehler, 2003; Myers & Davis, 2002).

Os mecanismos envolvidos no aprendizado da memória têm participação paralela e seqüencial de várias cascatas bioquímicas. Grande parte das quais são iniciadas por receptores de glutamato (NMDA) no hipocampo e estruturas relacionadas anatomicamente. Algumas destas cascatas, no hipocampo, córtex entorrinal e córtex parietal posterior, resultam na formação de memórias de curta duração que perduram de 3 a 6 horas. Outras cascatas

paralelas no hipocampo, córtex entorrinal, amígdala basolateral e várias áreas do córtex cingular resultam em consolidação de memória de longa duração (Cammarota et al, 2007).

Modelos experimentais para a inibição dos comportamentos motivados pelo medo são conhecidos desde Pavlov e embora suas bases neurais ainda não estejam plenamente caracterizadas, seus princípios comportamentais são empregados no tratamento psiquiátrico em humanos. Quando Pavlov descreveu o processo de extinção pela inibição aprendida, sugeriu a base biológica para o tratamento das desordens relacionadas ao medo e à ansiedade. Inaugurada por Sigmund Freud (1920) no tratamento de fobias, as terapias cognitivas buscam aliviar os sintomas das desordens de ansiedade e mais recentemente também do estresse-pós-traumático (Beckett, 2002; Rothbaum & Schwartz, 2002).

O renovado interesse pelas bases biológicas do processo de extinção de memórias tem sido guiado pelo aumento da prevalência de desordens relacionadas com o medo e a ansiedade entre a população mundial e pela busca de mecanismos biológicos que constituam substratos para o tratamento efetivo destes transtornos (Myers & Davis, 2002).

### **1.3.3 Inibição de memória: Extinção**

Quando o animal é exposto a dois estímulos, o estímulo condicionado (caixa da esquiva inibitória) e ao estímulo incondicionado (choque nas patas, simultaneamente), essa exposição permite que o animal forme uma memória associativa, de condicionamento.

A extinção de um condicionamento se dá pela exposição sucessiva a um dos estímulos anteriormente associados, geralmente o estímulo condicionado, sem a repetição do estímulo incondicionado. Desta forma a evocação da memória previamente formada é seguida de um novo aprendizado, que representa a nova situação à qual o animal foi exposto. A extinção iniciada pela evocação sem reforço comportamental leva à formação de um novo



conceito, que prevalece sobre o aprendizado inicial por representar de maneira mais adequada à resposta comportamental apropriada.

Por constituir um novo aprendizado, o processo de extinção envolve substratos neuroanatômicos, celulares e moleculares similares àqueles inicialmente recrutados para o condicionamento associativo. Experimentos mostram que diferentes modelos de aprendizado envolvem diferentes estruturas cerebrais. Isso ocorre tanto para o condicionamento inibitório, que envolve o processo de extinção, como para modelos envolvidos no condicionamento excitatório original (Chan et al, 2001; Dudai, 2003).

O hipocampo é apontado como a estrutura central no processamento de informações contextuais e é crucial para a aquisição, a consolidação e a evocação de memórias aversivas baseadas no condicionamento associativo (Phillips & Ledoux, 1992; Eichenbaum, 1996; Lorenzini et al, 1996; Izquierdo & Medina, 1997). O papel central do hipocampo nos processos cognitivos estende-se ao fenômeno de extinção, como foi demonstrado há várias décadas por Douglas (1967) e Kimble (1968) e replicadas por Benoit e colaboradores (1999), utilizando lesões hipocâmpais que prejudicavam a inibição de comportamentos previamente aprendidos em roedores.

Outras áreas corticais têm sido implicadas no processo de extinção, entre estas, o córtex pré-frontal (Milad & Quirk, 2002), além de regiões como o córtex insular (Dudai et al, 1995), relacionados com aspectos específicos do condicionamento apetitivo aversivo.

O núcleo basolateral da amígdala, estrutura central no processamento de informações cognitivas relacionadas ao medo, também participa da formação e da extinção de respostas condicionadas aversivas (Davis, 1992; Maren & Fanselow, 1996; Cahill et al, 1995; McIntyre et al, 2003). No entanto, ainda se discute sobre seu caráter modulador (McIntyre et al, 2003) ou central (Schafe et al, 1999) na formação de memórias armazenadas em outras áreas cerebrais.

O hipocampo e a amígdala encontram-se estrategicamente conectados a regiões cerebrais que lhes permitem processar informações relacionadas ao aprendizado, integrá-las e modificar seu significado e a resposta comportamental adequada aos diferentes tipos de aprendizado. O hipocampo conecta-se através do subiculum e do córtex entorrinal a amígdala e ao neocortex (Iijima et al, 1996, Hyman et al, 1990). A amígdala, por sua vez, recebe projeções de áreas corticais associativas e sensoriais, incluindo o córtex pré-frontal e, ainda de componentes de sistema límbico e do lobo temporal medial, enviando projeções aos núcleos da base, as regiões corticais e ao hipocampo (Van Hoesen, 1985).

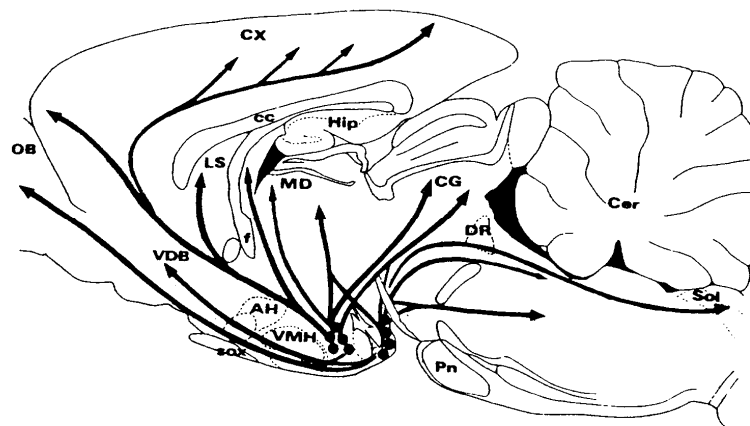
Quando descreveu o processo de extinção, Pavlov (1927) já sugeria que este constituía um novo aprendizado, portanto paralelo ao aprendizado inicial (Rescola, 1988). Atualmente evidências experimentais reforçam os preceitos de Pavlov e Konorski (1948). Elas sugerem que as memórias formadas para o aprendizado original e para o comportamento resultante do processo de extinção são armazenadas paralelamente e evocadas de acordo com a relação de hierarquia estabelecida entre elas (Rescorla, 1988; Pearce & Bouton, 2001; Bouton, 2002).

A extinção não envolve esquecimento, mas a inibição da expressão da memória original agregada a um novo aprendizado. Este novo aprendizado forma uma relação entre a dica e a ausência do estímulo que originou a primeira associação. A memória original parece reaparecer rapidamente após a re-exposição ao estímulo incondicionado, ou simplesmente, com o passar do tempo (recuperação espontânea). A extinção requer ativação de diferentes vias de sinalização neuronal, incluindo expressão gênica e síntese de proteínas, em diferentes áreas do cérebro. Estas vias de sinalização variam com a tarefa, mas estudos sugerem que tanto o córtex pré-frontal medial como o córtex entorrinal, a amígdala basolateral e o hipocampo entre outras áreas, desempenham um papel fundamental neste processo (Cammarota et al, 2007).

## ***1.4 Sistema Histaminérgico***

### **1.4.1 Anatomia do sistema histaminérgico**

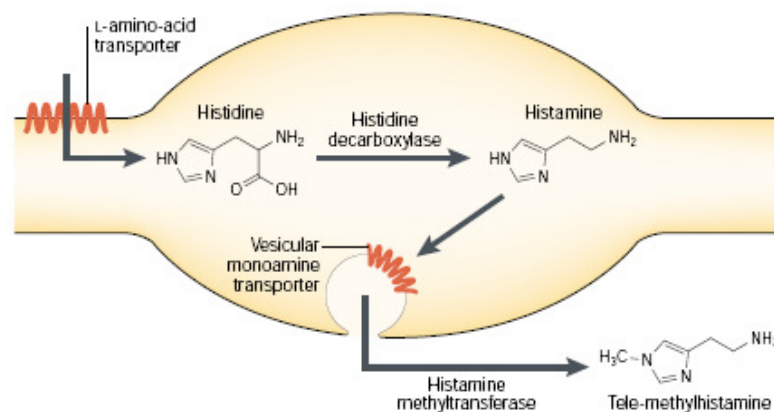
Nos vertebrados, os neurônios produtores de histamina localizam-se no núcleo túbero-mamilar (nTM), que faz parte do hipotálamo posterior (Haas & Panula, 2003; Schwartz et al, 1991). As principais terminações nervosas das projeções histaminérgicas diferem levemente entre as diferentes espécies, mas elas cobrem essencialmente todas as áreas do SNC, havendo inervação de moderada a densa do córtex cerebral, amígdala, substância negra, estriado, hipocampo e tálamo (Inagary et al, 1998; Panula & Pirvola, 1989; Schwartz et al, 1991) (**Figura 1**). A retina e a medula espinhal também recebem fibras provenientes do nTM, e já foi demonstrado existir inervações recíprocas entre neurônios histaminérgicos e outros aminérgicos (Kaslin & Panula, 2001). Existe uma ampla distribuição de receptores histaminérgicos por todo o SNC. O nTM recebe projeções aferentes difusas originadas de muitas áreas diferentes, incluindo o córtex infralímbico, o septo lateral, o núcleo pré-óptico e grupos neuronais do tronco cerebral (Ericson et al, 1989; Ericson et al, 1991a).



**Fig. 1: Sistema histaminérgico e suas principais projeções no SNC vistos em uma secção sagital do encéfalo de rato.** AH, área hipotalâmica anterior; Arc, núcleo arqueado; cc, corpo caloso; Cer, cerebelo; CG, núcleo cinzento central; CX, córtex cerebral; DR, núcleo dorsal da rafe; f, fórnix; Hip, hipocampo; LS, septo lateral; MD, tálamo médio-dorsal; MMn, parte mediana do núcleo mamilar medial; OB, bulbo olfatório; Pn, núcleos pontinos; Sol, núcleo do trato solitário; Sox, decussação supraóptica; sum, núcleo supramamilar; TMdiff, parte difusa do núcleo túbero-mamilar; TMVr, parte rostral do núcleo túbero-mamilar ventral; VDB, núcleo do braço vertical da banda diagonal; VMH, núcleo hipotalâmico ventro-medial. Fonte: Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

### I.4.2 Metabolismo da histamina

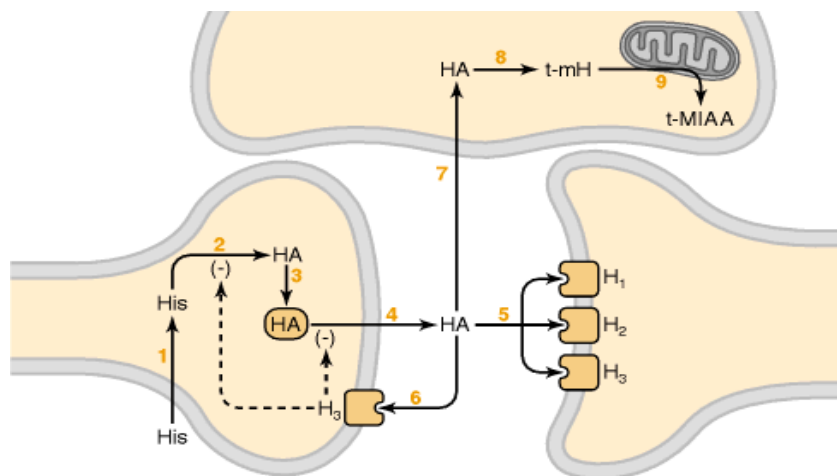
A síntese da histamina ocorre nos neurônios a partir do aminoácido L-histidina. A L-histidina é transportada para o neurônio pelo transportador de L-aminoácidos presente na membrana celular. Uma vez no citoplasma, a L-histidina é descarboxilada pela enzima específica histidina descarboxilase (**Figura 2**), originando então a histamina. A histamina recém produzida é transportada para as vesículas pela enzima vesicular transportadora de monoaminas (VMAT-2). Quando a vesícula se funde com a membrana pré-sináptica após a chegada de um potencial de ação, ocorre liberação de histamina pela terminação axônica. No espaço extracelular, a histamina é metilada pela enzima histamina metil-transferase, localizada nas regiões pós-sinápticas e na glia. Desta metilação resulta a tele-metil-histamina, um metabólito sem atividade biológica conhecida. Como não há nenhum sistema de recaptação de alta afinidade para a histamina, a metilação é o principal mecanismo de inativação da histamina liberada. A velocidade de renovação da histamina neuronal é bastante alta, e sua meia-vida, que normalmente gira em torno de 30 minutos, pode mudar rapidamente dependendo da atividade neuronal. Por exemplo, em situações estressantes, como imobilização forçada ou choque nas patas de ratos, a velocidade de renovação de histamina neuronal aumenta (Ericson, Köhler & Blomqvist, 1991b).



**Fig. 2: Síntese, transporte e metabolismo de histamina em neurônios.** Fonte: Haas & Panula, 2003.

A histamina controla uma ampla variedade de funções neurobiológicas e comportamentais, incluindo o ciclo sono-vigília, o consumo de água, a atividade motora e a sensibilidade à dor (Brown et al, 2001; Haas & Panula, 2003).

A síntese e a liberação de histamina estão sob o controle de autoreceptores  $H_3$  localizados no soma e nos terminais axônicos dos neurônios histaminérgicos (Arrang et al, 1983; Itoh et al, 1991; Prast et al, 1994) (**Figura 3**). A liberação de histamina também sofre ação regulatória de receptores muscarínicos  $M1$  (Arrang et al, 1991; Gulat Marnay et al, 1989b; Prast et al, 1994),  $\alpha 2$ -adrenérgicos (Arrang et al, 1991; Gulat Marnay et al, 1989a; Prast et al, 1991), 5-HT $1A$  (Oishi et al, 1992),  $\kappa$ - e  $\mu$ -opiíides (Itoh et al, 1988; Arrang et al, 1991; Gulat Marnay et al, 1990), e de receptores para galanina (Arrang et al, 1991). Experimentos *in-vivo* mostraram que o óxido nítrico inibe a liberação de histamina no hipotálamo (Prast et al, 1996).



**Fig. 3. Dinâmica da histamina neuronal.** Passos da síntese, liberação e metabolismo da histamina são mostrados: 1, L-histidina (*His*) transporte para dentro da terminação nervosa; 2, histamina (*HA*) sintetizada pela histidina decarboxylase; 3, formação de vesículas contendo histamina; 4, histamina liberada por exocitose; 5, ativação de receptores pós-sinápticos; 6, inibição por feedback da síntese e liberação de histamina pelos autoreceptores  $H_3$ ; 7, transporte de histamina pelos astrócitos (re-captção pela terminação nervosa não tem sido encontrada); 8, metabolismo pela histamina-*N*-metiltransferase (*HMT*); 9, oxidação da *t-MH* pela monoamina oxidase-B. A localização celular para os passos 7–9 permanece pouco compreendida. *t-MH*, *tele*-metilhistamina; *t-MIAA*, *tele*-metilimidazoleacético ácido. Fonte: Basic Neurochemistry

A liberação de histamina demonstra clara periodicidade, seguindo um ritmo circadiano paralelo à mudança de padrão de disparo dos neurônios histaminérgicos que ocorre durante o

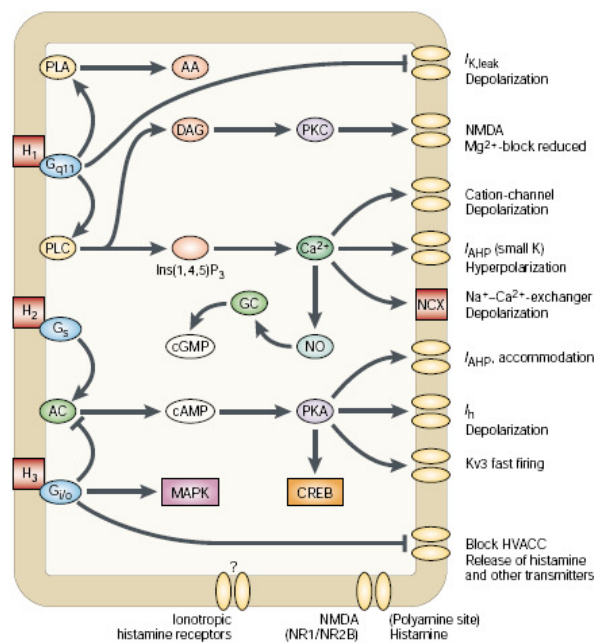
ciclo sono-vigília (Mochizuki et al, 1992). Os neurônios histaminérgicos do núcleo túberomamilar atuam como marca-passo, disparando potenciais de ação a uma baixa frequência (< 3 Hz). Registros eletrofisiológicos diretos desses neurônios em gatos indicam que sua atividade é maior durante a vigília e menor ou ausente durante o sono (Scherin et al, 1996; Steininger et al, 2001).

### **I.4.3 Receptores histaminérgicos**

As ações da histamina são mediadas por proteínas G e vários segundos-mensageiros, através de sua ligação a quatro tipos de receptores já identificados até o presente momento (H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>). Destes, três são predominantemente expressos no tecido nervoso (H<sub>1</sub>-H<sub>3</sub>), enquanto o receptor H<sub>4</sub>, descoberto recentemente (Nguyen et al, 2001), é expresso predominantemente na periferia, por exemplo, na medula óssea e nos leucócitos. Os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> em geral excitam os neurônios ou potencializam impulsos excitatórios (McCormick & Williamson, 1991; Munakata & Akaike, 1994; Reiner & Kamondi, 1994). Já a ativação dos receptores H<sub>3</sub> causa auto-inibição dos neurônios do nTM e inibe a síntese e a liberação de histamina, além de inibir a liberação de outros neurotransmissores, incluindo o glutamato, a acetilcolina e a noradrenalina (Brown & Haas, 1999 ; Schlicker et al, 1992).

O receptor H<sub>1</sub> é uma proteína de 486-491 resíduos de aminoácidos, codificada por um gene sem íntrons (Yamashita et al, 1991), e sua sinalização intracelular inicia-se pela ativação da proteína G<sub>q/11</sub>, seguido da fosfolipase C (PLC) (Brown, Stevens & Haas, 2001). O receptor H<sub>2</sub> também é codificado por um gene sem íntrons, e consiste de uma proteína de 358-359 resíduos de aminoácidos (Black et al, 1972; Gantz et al, 1991). Sua sinalização intracelular inicia-se pela ativação da proteína G<sub>s</sub>, seguido da adenilil-ciclase (Brown, Stevens & Haas, 2001). Há várias isoformas do receptor H<sub>3</sub> (Coge et al, 2001; Drutel et al, 2001), cujas proteínas consistem de 326-445 resíduos de aminoácidos e são derivadas da expressão

de um único gene através de processamento de mRNA (splicing) alternativo. A sinalização intracelular do receptor  $H_3$  inicia-se pela ativação da proteína  $G_i/G_o$ , seguido da inibição da adenilil-ciclase (Brown, Stevens & Haas, 2001) controlando a liberação e a síntese de histamina (Morisset et al, 2000). O receptor  $H_3$  também participa da ativação da via das MAPK (Drutel et al, 2001). O **Quadro 4** expõe resumidamente as propriedades dos três principais subtipos de receptores histaminérgicos. A **Figura 4** expõe as principais vias de sinalização intracelular ativadas pelos seus respectivos receptores.



**Fig. 4: Vias intracelulares ativadas por receptores histaminérgicos.** Os receptores histaminérgicos e suas respectivas proteínas G estão ilustrados a esquerda. O esquema contém as vias sinalizadoras e seus alvos intracelulares. **AA**, ácido araquidônico; **AC**, adenilil ciclase; **CREB**, proteína ligante ao (CRE) elemento responsivo ao cAMP; **DAG**, diacilglicerol; **GC**, guanilil ciclase; **HVACC**, corrente de  $Ca^{2+}$  ativada por alta voltagem;  **$I_{AHP}$** , pequena corrente de  $K^+$  dependente da condutância ao  $Ca^{2+}$ ;  **$I_h$** , corrente catiônica ativada por hiperpolarização;  **$I_{Kleak}$** , corrente de  $K^+$  fraca; **Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>**, inositol-1,4,5-trisfosfato; **MAPK**, proteína cinase ativada por mitógenos; **NCX**, trocador de  $Na^+Ca^{2+}$ ; **NMDA**, N-metil-D-aspartato; **PKA**, proteína cinase A; **PKC**, proteína cinase C; **PLA**, fosfolipase A; **PLC**, fosfolipase C.

Fonte: Haas & Panula, 2003.

**Quadro 4:** Propriedades dos três principais subtipos de receptores histaminérgicos<sup>(a)</sup>.

Receptores	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>
Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 86 a.a. (rato)</li> <li>• 488 a.a. (porco da índia)</li> <li>• 491 a.a. (bovino)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 358 a.a. (rato)</li> <li>• 359 a.a. (cachorro, humano, porco da índia)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 445 a.a. (humano)</li> <li>• H<sub>3L</sub> 445 a.a., H<sub>3S</sub> 415 a.a. (porco da índia)</li> <li>• H<sub>3L</sub> 445 a.a., H<sub>3S</sub> 413 a.a. (rato)</li> </ul>
Localização cromossômica	3p25	5	20qTEL
Distribuição mais densa no cérebro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tálamo</li> <li>• Cerebelo</li> <li>• Hipocampo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estriado</li> <li>• Córtex cerebral</li> <li>• Amígdala</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estriado</li> <li>• Córtex frontal</li> <li>• Substância Negra</li> </ul>
Auto-receptor	Não	Não	Sim
Afinidade por histamina	micromolar	micromolar	nanomolar
Proteína G	G <sub>q</sub> /11	G <sub>s</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>
Segundos Mensageiros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• produção de IP<sub>3</sub></li> <li>• produção de ácido araquidônico</li> <li>• potenciação da produção de cAMP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• produção de cAMP</li> <li>• aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></li> <li>• inibição da produção do ácido araquidônico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inibição da produção do cAMP</li> <li>• inibição da produção de IP<sub>3</sub></li> <li>• diminuição da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></li> <li>• produção de ácido araquidônico</li> </ul>

(a) – O significado das abreviaturas está exposto na parte Siglas e Abreviaturas.

## ***1.5 Efeitos do sistema histaminérgico na modulação da memória***

### **1.5.1 Plasticidade sináptica**

Um dos efeitos já descritos da ativação de receptores H<sub>1</sub> é reduzir o bloqueio dos receptores NMDA pelo Mg<sup>2+</sup>, por meio da ação da PKC, facilitando a ativação deste receptor (Payne & Neuman, 1997). A histamina também facilita diretamente a ativação do receptor NMDA através de sua ligação ao sítio modulatório das poliaminas presente neste receptor (Bekkers, 1993; Vorobjev et al, 1993), sendo esta ligação sensível ao pH e seletiva para receptores NMDA que contém a subunidade NR2B (Williams, 1994).

Já o receptor H<sub>2</sub> é um potente estimulador da via do cAMP, que é necessária para a fase tardia da LTP (potenciação de longa duração: fenômeno referente à plasticidade sináptica que ocorre entre um neurônio pré e um pós- sináptico) dependente de NMDAr (Frey, Huang & Kandel, 1993) e para a indução da LTP nas fibras musgosas hipocampais (Weisskopf et al,



1994). O receptor  $H_2$  pode também aumentar as correntes iônicas geradas pelo NMDAr ativo, através do bloqueio de canais de potássio cálcio-dependentes (Haas, 1984) e possivelmente mediante a promoção da fosforilação do próprio NMDAr pela PKA (Raman, Tong & Jahr, 1996).

Os receptores  $H_3$  podem reduzir a liberação de vários neurotransmissores incluindo o glutamato, podendo afetar a plasticidade sináptica no hipocampo e no estriado (Brown & Haas, 1999; Doreulee et al, 2001). No giro denteado, por exemplo, além de reduzir a transmissão sináptica, à ativação dos receptores  $H_3$  também reduz a facilitação induzida por pulsos pareados, uma forma de plasticidade sináptica de curta duração (Brown & Reymann, 1996).

### **I.5.2 Aprendizado e memória**

No hipocampo a histamina diminui a condutância de cálcio (Haas & Konnerth, 1983), aumenta a excitabilidade neuronal (Selbach, Brown & Haas, 1997), controla oscilações de alta frequência (Knoche et al, 2003; Ponomarenko et al, 2003) e modula respostas mediadas pelo receptor NMDA (Bekkers, 1993; Vorobjev et al, 1993). Porém, até o presente momento, as evidências sobre o papel da histamina no processo de aprendizagem e formação de memórias ainda são bastante contraditórias.

O efeito da manipulação do sistema histaminérgico na formação de memórias tem sido analisado em vários modelos comportamentais. De acordo com Tasaka et al. (1985), a injeção intra-cérebro-ventricular (i.c.v.) de histamina ou agonistas  $H_1$  inibe a formação de memória para a tarefa de esQUIVA ativa. De forma similar, Alvarez e Banzan, (1995 e 1996) mostraram que a injeção de histamina diretamente no hipocampo ventral prejudica o desempenho na tarefa de esQUIVA ativa mediante um mecanismo dependente da ativação de receptores  $H_1$ . Ainda no modelo de esQUIVA ativa, a depleção de histamina cerebral através da

administração de  $\alpha$ -FMH, um inibidor da enzima histidina-descarboxilase, revelou ter um efeito tanto pró-mnésico (Kamei et al, 1993; Tasaka et al, 1985) quanto amnésico (Cacabelos & Alvarez, 1991). Na tarefa de labirinto radial, mostrou-se que administração de  $\alpha$ -FMH é pró-mnésica (Sakai et al, 1998) ou amnésica (Che net al, 1999). Já na tarefa de esQUIVA inibitória, a histamina revelou-se pró-mnésica quando injetada i.c.v. (de Almeida & Izquierdo, 1986).

Agonistas H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> injetados no septum melhoraram o desempenho de camundongos na tarefa de labirinto em T, enquanto que os antagonistas destes receptores tiveram o efeito oposto (Flood et al, 1998). Já se mostrou que a tioperamida (antagonista H<sub>3</sub>) aumenta a retenção para a tarefa de reconhecimento de objetos, quando administrada após a aquisição (Orsetti, Ghi & Di Carlo, 2001), e facilita a consolidação em camundongos na tarefa de esQUIVA inibitória, de um modo dose-dependente, também quando administrada após a aquisição (Bernaerts & Lambert, 2004). Em duas tarefas de aprendizado espacial, o labirinto aquático de Morris e o labirinto circular de Barnes, mostraram que antagonistas H<sub>3</sub> (tioperamida e ciproxifan) reverteram o efeito amnésico da escopolamina na primeira tarefa, e apenas parcialmente na segunda (apenas ciproxifan), indicando que o papel dos receptores H<sub>3</sub> na memória espacial pode ser tarefa-dependente (Komater et al, 2004). A ativação de receptores H<sub>3</sub> na amígdala aumenta a consolidação de memórias aversivas, enquanto que antagonistas destes receptores produzem o efeito oposto (Baldi et al, 2005; Passani et al, 2000). A administração sistêmica de R- $\alpha$ -metil-histamina (agonista H<sub>3</sub>) facilita a formação de memória espacial em ratos (Rubio, Santini & Arias, 2002).

Estudos sugerem um papel pró-mnésico para a histamina, devido ao seu efeito de promover o aumento dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, da indução e da manutenção da LTP e da sua interação positiva com receptores NMDA (Haas et al, 1995).

O grupo do nosso laboratório já comprovou em estudos feitos com ratos que a histamina age na consolidação de memórias aversivas quando infundida imediatamente após a aquisição (Silva et al. 2006).

Com o intuito de verificar a relação da histamina e dos seus receptores histaminérgicos (agonistas e antagonistas) na extinção de memórias aversivas, surgiu o tema desta dissertação de mestrado que visa contribuir para o conhecimento sobre a modulação da memória. Com tal propósito, o presente trabalho teve como objetivos:

## **II. OBJETIVOS**

### ***II.1 Objetivo Geral***

Analisar a influência do sistema histaminérgico na região CA1 do hipocampo dorsal na extinção da memória de longa duração.

### ***II.2 Objetivo Específico***

Investigar o efeito da infusão intrahipocampal de histamina e de distintas drogas histaminérgicas, incluindo agonistas e antagonistas seletivos para os diferentes subtipos de receptores de histamina bem como o inibidor da degradação desta amina, na extinção de memória de longa duração no modelo de esQUIVA inibitória.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### *III. 1 – Animais Experimentais*

Para a realização dos estudos, utilizaram-se ratos Wistar machos adultos, pesando entre 225 e 350 gramas, provenientes do Biotério da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde). Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha. Receberam água e comida à vontade, e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7h e escuro a partir das 19h), e temperatura ambiente em torno de 22 ° C. As caixas foram trocadas a cada 3 dias. Foram tomadas precauções com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

#### *III. 2 – Procedimento Cirúrgico*

Para administração dos fármacos em regiões cerebrais específicas os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guia de 0,2 mm de diâmetro e 9,0 mm de comprimento, posicionadas 1,0 mm acima da região da camada piramidal da região CA1 do hipocampo dorsal (**Figura 5**). As coordenadas utilizadas para a cirurgia estereotáxica foram adaptadas do Atlas anatômico de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 1986), sendo elas as seguintes em relação ao bregma: Antero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (ML) =  $\pm$  3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 2,0 mm; Inclinação Cabeça (INCL CAB) = -3,3 mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0°.



**Fig. 5: Cirurgia estereotáxica.** Implantam-se estereotaxicamente no crânio dos animais cânulas-guia direcionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal destes animais, conforme coordenadas adaptadas do Atlas anatômico de Paxinos e Watson (1986).

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com Ketamina 75mg/kg e Xilazina e 10mg/kg intra-peritoneal. As cânulas-guia descritas acima foram fixadas com acrílico junto ao osso parietal do crânio dos ratos. As cânulas utilizadas para a infusão dos fármacos possuem 0,05mm de diâmetro e 10,0mm de comprimento, de modo que sua extremidade dirige-se para 1,0mm além das cânulas-guia, quando introduzidas no interior destas, permitindo a infusão do fármaco exatamente na região desejada, com o mínimo possível de danos mecânicos.

### ***III. 3 – Manipulação dos Animais***

Dois a quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por duas a três sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos foram conduzidos, retirados de sua caixa e manuseados durante 2 minutos de um modo semelhante ao realizado durante o treino de esqui inibitória.

### ***III. 4 – Esquiva Inibitória (EI)***

Na tarefa de EI o animal primeiramente foi exposto a um estímulo condicionável (a caixa de esquiva) e exibiu uma resposta inata exploratória, também condicionável. Após descer da plataforma no interior da caixa, rumo ao assoalho metálico, aprendeu a associar a descida da plataforma (resposta exploratória, condicionável, perante um estímulo condicionável, a caixa de esquiva), com um leve choque aplicado nas quatro patas (estímulo incondicionável). Com isso, na segunda exposição à caixa de esquiva, o rato evitou expressar sua resposta inata exploratória, ou seja, evitou descer da plataforma. Esta inibição da expressão de sua resposta inata reflete o condicionamento desta resposta à associação aprendida.

O aprendizado em EI envolve várias habilidades, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade à dor, e um componente emocional amplamente modulado por hormônios relacionados ao estresse (Gold, 1986; Izquierdo, 1989; Izquierdo & Medina, 1997).

O aparelho utilizado para a EI de uma única sessão consiste em uma caixa de madeira de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm (comprimento x profundidade x altura), com a parte frontal feita de acrílico. O assoalho do aparelho é formado por barras paralelas de aço inoxidável com 3,0 mm de diâmetro e afastadas 1,0 cm umas das outras. No lado esquerdo da caixa há uma plataforma de 2,5 cm de altura, por 7,0 cm de largura (**Figura 6**).



**Fig. 6: Vista superior de uma caixa de esquivas inibitória.**

### **Aplicação do protocolo:**

Após três a quatro dias da cirurgia, os animais foram manipulados para que se habituassem à presença do pesquisador, não ocorrendo assim resposta de estresse e ansiedade por parte do animal quando fossem iniciados os experimentos.

No primeiro dia (treino), os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treinamento individual, na qual eram gentilmente colocados sobre a plataforma fixa na lateral esquerda da caixa de EI, sendo então permitido explorar a mesma. Quando desciam da plataforma com as quatro patas na grade metálica constituinte do assoalho da caixa, recebiam um choque elétrico de 0,4 mA por 2 segundos (Bevilaqua et al, 2003; Cammarota et al, 2003).

No segundo dia (teste), foi avaliada a memória de longa duração formada durante a sessão de treino proporcionando o processo de extinção. Os animais foram novamente colocados na caixa da EI, sobre a plataforma. O procedimento na sessão de teste foi idêntico à sessão treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebeu choque. Foi permitido ao animal explorar a caixa por um tempo máximo de 600 segundos. Após, o animal era retirado da caixa e infundiu-se na região CA1 do hipocampo a droga estipulada ou salina para o grupo controle. Logo em seguida, o animal era devolvido à sua caixa de moradia.



A diferença entre o tempo que o animal permaneceu sobre a plataforma na sessão de teste (latência de teste) e o tempo que permaneceu sobre a mesma na sessão de treino (latência de treino) foi o valor utilizado como medida de aprendizagem (latência).

No terceiro dia, os animais foram novamente colocados na caixa da esQUIVA e foi verificado o tempo de latência (tempo em que o animal demorou a descer da plataforma).

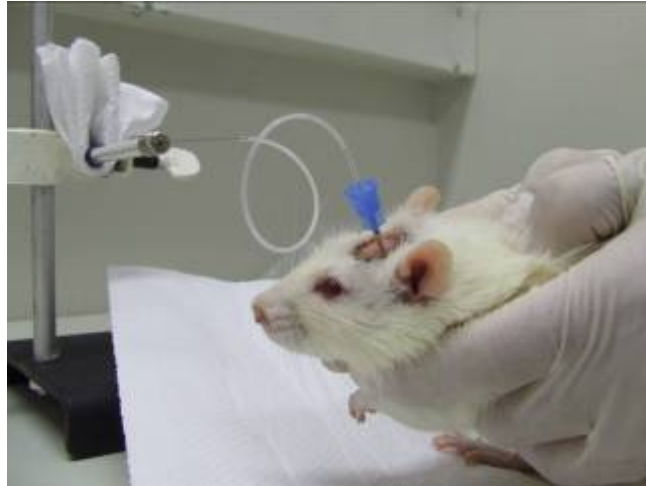
A EI é uma tarefa ideal para estudar processos de memória iniciados durante e após o treino por que em geral pode ser aprendida com uma única sessão de treino, não é contaminada por sessões prévias ou subsequentes, como ocorre nas tarefas de labirinto aquático, labirinto radial ou esQUIVA ativa (Gold, 1986; Izquierdo, 1989), não é um aprendizado inato e a neuroquímica e a farmacologia envolvida na sua modulação são bastante conhecidas (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo & McGaugh, 2000).

Apesar de não ser possível extrapolar diretamente os resultados da EI para outros comportamentos, principalmente os complexos comportamentos humanos, diferentes evidências apontam para o fato de que os mecanismos básicos da aquisição, consolidação, evocação e extinção são essencialmente os mesmos nos diferentes tipos de memória (Carew, 1996; Izquierdo & McGaugh, 2000).

### ***III. 5 – Tratamento Farmacológico***

No segundo dia de teste na EI, pós-TT1 (sessão de extinção) os animais receberam infusões bilaterais de 1µL de solução salina com ou sem fármacos dissolvidos, através de suas cânulas guias diretamente na região CA1 do hipocampo dorsal. Para tanto se utilizou uma cânula de infusão (0.05mm de diâmetro e 10,0mm de comprimento), conectada a uma micro-seringa Hamilton por um tubo de polietileno. Esse aparato era carregado logo antes da infusão com o material a ser infundido. Após a introdução da cânula de infusão na luz da cânula-guia, iniciava-se a infusão lentamente, durante 40 segundos em cada lado. Ao término de cada

infusão, o aparato era deixado no local por 40 segundos adicionais para evitar refluxo pela cânula (**Figura 7**).



**Fig. 7: Infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas.** A cânula de infusão, 1,0 mm maior em comprimento do que a cânula-guia é introduzida na luz desta, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco ou salina sejam infundidos.

### ***III. 6 – Controle histológico da localização das cânulas-guia e do local de infusão.***

A verificação anatômica do posicionamento das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada *post mortem*. Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, estes receberam 0,8  $\mu$ l de uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas como descrito acima. Quinze minutos depois disto foram sacrificados e seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias. Após, procedeu-se à análise histológica. Somente animais onde a localização da mancha de azul de metileno encontrava-se dentro de um raio de 2 mm do local desejado foram considerados na análise estatística dos dados (**Figura 8**).



**Fig. 8: Representação esquemática de um corte histológico de hemisfério cerebral.** A parte grifada mostra a área alvo das infusões realizadas nos experimentos apresentados nesta dissertação. Animais nos quais a infusão de azul de metileno, realizada durante a verificação de posicionamento das cânulas, estava fora da área indicada acima não foram considerados durante a análise dos dados.

### ***III. 7 – Fármacos Utilizados***

Neste estudo, os fármacos utilizados nas infusões intra-CA1 foram: histamina, pirilamina, ranitidina, espermidina e imetit, obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); tioperamida, ifenprodil, dimaprit e SKF 91488, obtidas da Tocris Cookson Ltd. (Avonmouth, Bristol, UK). Todas as drogas foram dissolvidas em salina, exceto o ifenprodil, que foi dissolvido em DMSO 50%. Todas foram infundidas a temperatura ambiente, e pH 7,2. As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos pilotos e em estudos prévios mostrando o efeito da histamina sobre o aprendizado e a memória, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas (Alvarez & Banzan, 1995 e 1996; Alvarez et al, 2001; Baldi et al, 2005; Giovannini et al, 2003; Knoche et al, 2003; Orsetti et al, 2001).

### ***III. 8 – Estudos comportamentais complementares***

Com o objetivo de confirmar a especificidade dos dados comportamentais obtidos na tarefa de esQUIVA inibitória e descartar efeitos secundários dos fármacos utilizados, os animais foram submetidos às tarefas de Exploração ao Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado para avaliarmos respectivamente os efeitos dos tratamentos sobre a locomoção e a orientação

espacial, ou ainda sobre a ansiedade. Os animais foram tratados com fármaco, de maneira idêntica à utilizada nos experimentos de memória, 24 horas antes do início das tarefas complementares, uma vez que nos experimentos de EI o efeito do fármaco foi testado 24 horas depois.

O aparato da tarefa de “exploração ao campo aberto” era uma caixa retangular com dimensões de 40 x 30 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com uma parede frontal de vidro. O assoalho da caixa é dividido por linhas que formam 12 retângulos idênticos (**figura 9**). Durante o experimento, o animal é colocado gentilmente na caixa e deixado ali para explorá-la livremente por 5 minutos. O número de cruzamentos das linhas foi avaliado como índices de exploração locomotora e o número de elevações (rearings) como índices padrões.



**Figura 9: Campo aberto**

O “labirinto em cruz elevado” consiste em um aparato em forma de cruz, elevado 1 metro do chão e formado por quatro braços de 40 cm de comprimento e 10 cm de largura (**figura 10**). Dois braços opostos eram fechados por paredes de 26 cm de altura, enquanto os outros dois permaneciam abertos. Os animais previamente tratados eram colocados na arena central e permitidos explorar o aparato por 5 minutos durante os quais foram contabilizados as

entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados além das respostas de elevação (rearings). Quanto mais ansioso estiver o animal, maior é o tempo de permanência nos braços fechados e maior é o número de entradas nestes braços. Assim como nos experimentos de campo aberto, os experimentos no labirinto em cruz elevado foram realizados 24 horas após a infusão do fármaco.



**Figura 10: Labirinto em cruz elevado**

### ***III. 9 – Análise Estatística dos Dados***

As latências para a descida da plataforma nas sucessivas sessões de teste da tarefa de EI correspondem a um tempo máximo de 600 segundos de permanência na plataforma. Como a maioria dos animais não atinge o teto (600s), o resultado da variação do erro entre os ratos segue o padrão normal, permitindo o uso de análise estatística paramétrica. Utilizou-se o software Graph-Pad Prism para esta análise estatística. As latências das sessões de teste da EI foram analisadas utilizando-se o test t de student. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

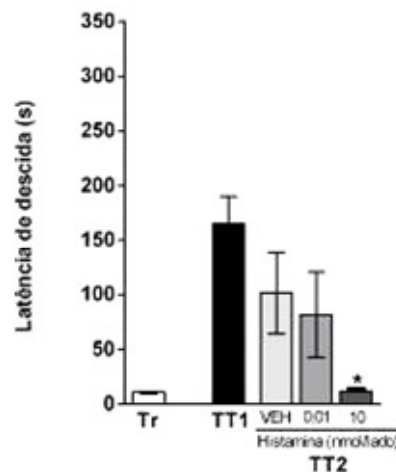
Os dados paramétricos obtidos nas tarefas de habituação ao campo aberto e labirinto em cruz elevado foram submetidos à comparação estatística utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnet e submetidos aos mesmos critérios de significância.

## IV. RESULTADOS

Para analisarmos a participação do sistema histaminérgico hipocampal na extinção de memórias aversivas, ratos Wistar machos foram treinados na tarefa de EI de uma única sessão, como já descrito acima.

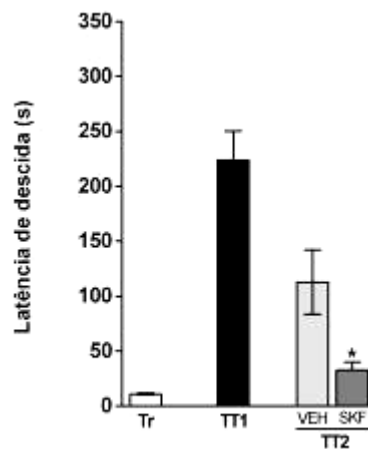
A histamina (10 pmol/lado e 10 nmol/lado) infundida imediatamente após sessão de teste não reforçada (TT1), 24h após o treino, diminui a latência de descida de maneira dose-dependente (10 nmol/lado) (\* $p < 0.05$  vs VEH, na comparação de test *t* de Student, **Figura 11**), mostrando que a histamina nesta concentração melhora a extinção de memórias aversivas relativas à EI.

Nos gráficos que seguem, as siglas significam: Tr treino, TT1 sessão de teste não reforçada (extinção) e TT2 teste, de acordo com o protocolo explicado anteriormente.



**Fig. 11: A infusão intrahipocampal de histamina melhora a extinção da memória de esQUIVA INIBITÓRIA.** Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de histamina (10pmol ou 10nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n = 11$  por grupo; \* $p < 0.05$  vs VEH no teste *t* de Student.

Condizente com o resultado acima, quando infundido na região CA1 imediatamente após uma sessão de teste não reforçado (TT1), o inibidor da histamina N-metil-transferase, SKF-91844 (50 nmol/lado), o qual aumenta a concentração de histamina endógena através do bloqueio de sua inativação metabólica, também melhora a extinção da memória de EI (\* $p < 0.05$  vs VEH no teste  $t$  de Student, **Figura 12**), mimetizando o efeito da histamina.



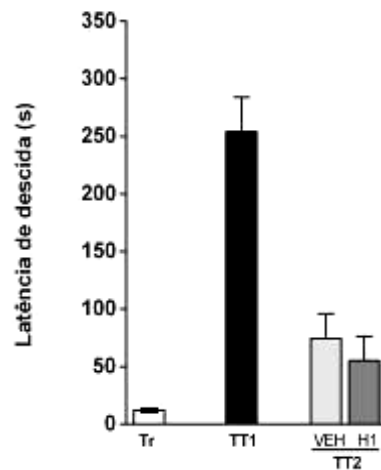
**Fig.12:** A infusão intrahipocampal de SKF-91844, inibidor da enzima histamina N-metil-transferase, melhora a extinção da memória de esquivas inibitórias. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de SKF-91844 (50 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n = 11$  por grupo; \* $p < 0.05$  vs VEH no teste  $t$  de Student.

A histamina pode interagir com os receptores  $H_1$ ,  $H_2$  ou  $H_3$ , todos expressos na formação hipocampal, além de também poder ligar-se ao sítio de união das poliaminas no receptor NMDA. Analisou-se a participação individual de cada receptor sobre o efeito da melhora da extinção provocada pela histamina.

Com relação aos agonistas: 2-tiazoliletilamina (agonista  $H_1$ ), espermidina (agonista do sítio das poliaminas do receptor NMDA), dimaprit (agonista  $H_2$ ) e imetit (agonista  $H_3$ ), apenas o dimaprit (10 nmol/lado) melhora significativamente a extinção de memórias

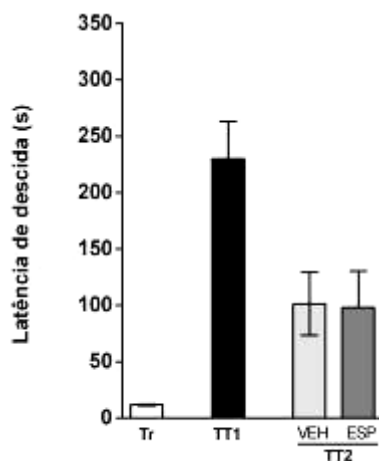
aversivas relativa à EI, quando infundido intra-CA1 imediatamente pós-TT1 (\*  $p < 0.05$  vs VEH; **Figura 15**), mimetizando a ação da histamina.

No entanto, o agonista  $H_3$ , Imetit, mostra exercer um efeito bloqueador sobre a extinção de memórias aversivas quando comparado ao veículo (**Figura 16**), mostrando claramente que os animais não extinguíram.

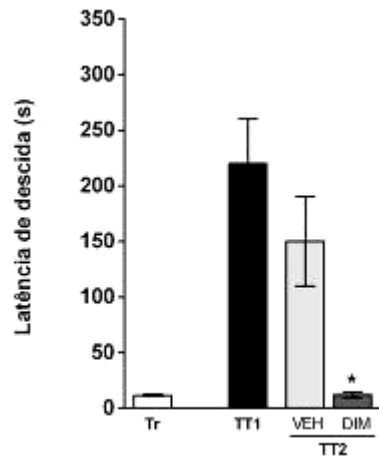


**Fig. 13: A infusão intrahipocampal de 2-tiazoliletilamina (agonista  $H_1$ ) não tem efeito sobre a extinção da memória de esquiva inibitória.** Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou do agonista  $H_1$  (10 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n = 11$  por grupo.

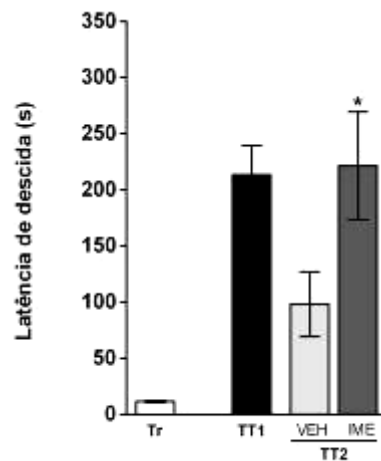




**Fig. 14:** A infusão intrahipocampal de espermidina (agonista do NR2B) não tem efeito sobre a extinção da memória de esquiiva inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de espermidina (ESP 10 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2), n= 11 por grupo.

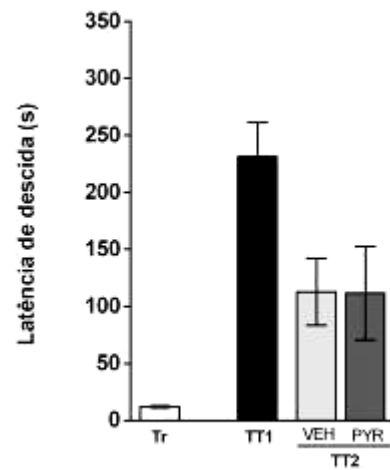


**Fig. 15:** A infusão intrahipocampal do Dimaprit (agonista H<sub>2</sub>) melhora a extinção da memória de esquiiva inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de dimaprit (DIM 10 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2), n= 11 por grupo; \*p<0.05 vs VEH no teste *t* de Student.



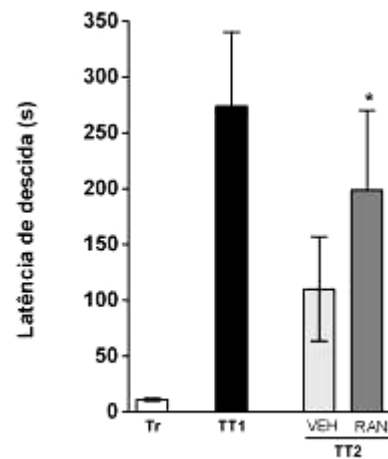
**Fig. 16: A infusão intrahipocampal de Imetit (agonista  $H_3$ ) mostra um efeito bloqueador sobre a extinção da memória de esquiva inibitória.** Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de imetit (IME 10 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n=11$  por grupo; \* $p<0.05$  vs VEH no teste  $t$  de Student.

Nenhum dos antagonistas utilizados seja a pirilamina (antagonista  $H_1$ , 50 nmol /lado), a tioperamida (antagonista  $H_3$ , 50 nmol/lado) ou o ifenprodil (antagonista do sítio das poliaminas do receptor NMDA, 50 nmol/lado), afetam a extinção de memória de longa duração relativa à EI quando infundidos intra-CA1 imediatamente pós-TT1 (**Figuras 17,19 e 20**).

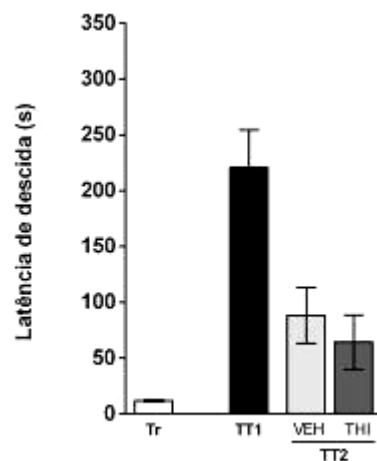


**Fig. 17: A infusão intrahipocampal de Pirilamina (antagonista  $H_1$ ) não afeta a extinção da memória de esquiiva inibitória.** Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de pirilamina (PYR 50 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n = 11$  por grupo.

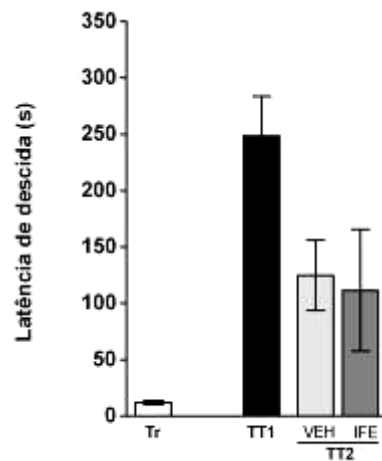
Apenas a ranitidina (antagonista do receptor  $H_2$ ), bloqueia a extinção de memórias aversivas relativas à EI (\* $p < 0.05$  vs VEH no test  $t$  de Student, **Figura 18**).



**Fig. 18: A infusão intrahipocampal de Ranitidina (antagonista  $H_2$ ) bloqueia a extinção da memória de esquiiva inibitória.** Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de ranitidina (RAN 50 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n = 11$  por grupo; \* $p < 0.05$  vs VEH no teste  $t$  de Student.

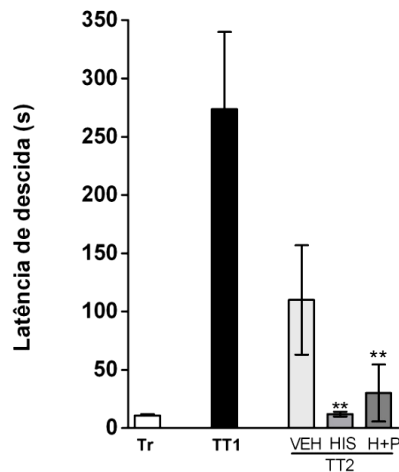


**Fig. 19: A infusão intrahipocampal de Tioperamida (antagonista  $H_3$ ) não afeta a extinção da memória de esquiiva inibitória.** Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de Tioperamida (THI 50 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n = 11$  por grupo.

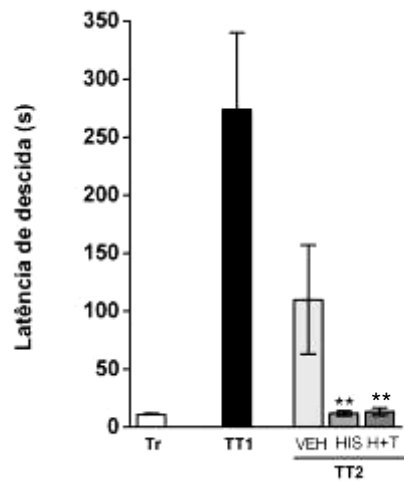


**Fig. 20:** A infusão intrahipocampal de Ifenprodil (antagonista do sítio das poliaminas do receptor NMDA) não afeta a extinção da memória de esquiiva inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de ifenprodil (IFE 50 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2), n= 11 por grupo.

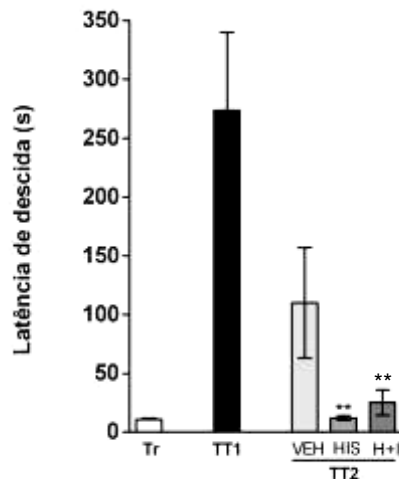
Concordando com os resultados acima, observou-se que a ranitidina (50 nmol/lado), reverte completamente o efeito de extinção da histamina (\*\* $p < 0.01$  vs VEH na comparação do test *t* de student), quando co-infundida com esta monoamina imediatamente pós-TT1 na tarefa de EI (**Figura 24**). O mesmo não ocorreu quando outros antagonistas como a pirilamina, a tioperamida ou o ifenprodil, foram co-infundidos com a histamina (**Figuras 21, 22 e 23**).



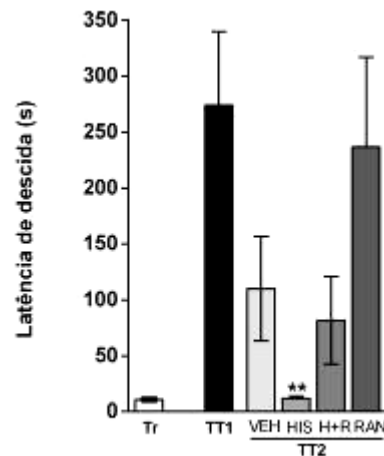
**Fig. 21: A infusão intrahipocampal de pirilamina (antagonista  $H_1$ ) não bloqueia a ação da histamina na extinção da memória de esquila inibitória.** Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de histamina (HIS 10 nmol) ou de histamina mais pirilamina (H 10 nmol + P 50 nmol) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n= 11$  por grupo;  $**p<0.01$  vs VEH no teste  $t$  de Student.



**Fig. 22: A infusão intrahipocampal de Tioferamida (antagonista  $H_3$ ) não bloqueia a ação da histamina na extinção da memória de esquila inibitória.** Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de histamina (HIS 10 nmol) ou de histamina mais tioferamida (H 10 nmol + T 50 nmol) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n= 11$  por grupo;  $**p<0.01$  vs VEH no teste  $t$  de Student.



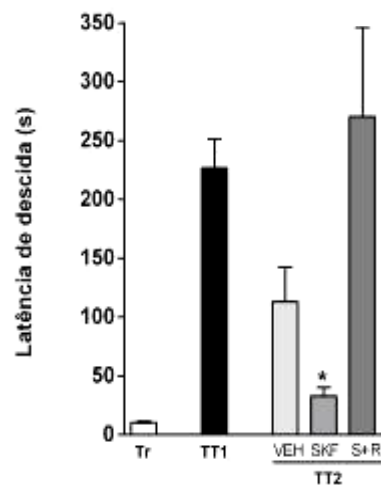
**Fig. 23:** A infusão intrahipocampal de Ifenprodil (antagonista das poliaminas do NMDAr) não bloqueia a ação da histamina na extinção da memória de esQUIVA inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1 µl/lado) de veículo (VEH) ou de histamina (HIS 10 nmol) ou de histamina mais ifenprodil (H 10 nmol + I 50 nmol) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n=11$  por grupo;  $**p<0.01$  vs VEH no teste  $t$  de Student.



**Fig. 24:** A infusão intrahipocampal de ranitidina (antagonista  $H_2$ ) bloqueia a ação da histamina na extinção da memória de esQUIVA inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1 µl/lado) de veículo (VEH) ou de histamina (HIS 10 nmol) ou de histamina mais ranitidina (H 10 nmol + R 50 nmol) ou de ranitidina (RAN 50 nmol) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n=11$  por grupo;  $**p<0.01$  vs no teste  $t$  de Student.

De todos os antagonistas testados junto com a histamina, apenas a ranitidina reverte o efeito da histamina quando co-infundida com esta amina.

Reforçando esta hipótese, verificou-se que a ranitidina (50 nmol/lado) quando co-infundida com SKF-91844 (50 nmol) intra-CA1 imediatamente pós-TT1, também bloqueia o efeito de extinção do SKF-91844 (\* $p < 0.05$  vs VEH na comparação de teste *t* de student, **Figura 25**).



**Fig. 25:** A infusão intrahipocampal de ranitidina (antagonista  $H_2$ ) bloqueia a ação do SKF-91844 na extinção da memória de esquila inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão localizadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de EI e, 24 h após o treino, submetidos a uma sessão de teste não reforçada (i.e. na ausência do choque elétrico). Imediatamente após a sessão de teste os animais receberam uma infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou de SKF-91844 (50 nmol) ou de SKF-91844 + ranitidina (S 50 nmol + R 50 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em uma segunda sessão de teste não reforçada (TT2) realizada 24 h após a primeira. As barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de descida durante a sessão de treino (Tr) e durante as duas sessões de teste (TT1 e TT2),  $n = 11$  por grupo; \* $p < 0.05$  vs VEH no teste *t* de Student.

Verificou-se que a histamina possui a capacidade de melhorar a extinção de memórias aversivas. Porém, quando a histamina foi co-infundida com a ranitidina (antagonista  $H_2$ ), a ranitidina bloqueou o efeito de extinção da histidina demonstrando que a ranitidina prejudica ou dificulta o efeito da histamina na melhora da extinção de memórias aversivas. Este efeito não foi visto quando a histamina foi co-infundida com outros antagonistas.



A **Tabela 1** mostra os resultados encontrados nas tarefas de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.

**Tabela 1:** Histamina (HIS 10nmol/lado) ou salina foram infundidas (1 $\mu$ l) bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes dos ratos serem submetidos às tarefas de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.

	VEH (n = 10)	HIS (n = 10)
Elevações	17.2 $\pm$ 2.9	16.1 $\pm$ 2.7
Cruzamentos	58.0 $\pm$ 9.4	57.9 $\pm$ 12.6
Tempo gasto nos braços abertos (min.)	1.7 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2
Número de entradas nos braços abertos	5.0 $\pm$ 1.1	4.6 $\pm$ 0.9
Número total de entradas	10.0 $\pm$ 1.8	9.6 $\pm$ 1.4

## V. DISCUSSÃO

A extinção é causada pela presença repetida ao estímulo condicionado, na ausência do estímulo incondicionado. Há duas importantes áreas cerebrais envolvidas na extinção que são o hipocampo e a amígdala basolateral (Myers & Davis, 2002), embora em alguns casos, outras áreas possam desempenhar esta função como o córtex insular (Berman & Dudai, 2001).

As manipulações do sistema histaminérgico em alguns modelos de aprendizado modificam o comportamento do animal. No entanto, estes resultados são freqüentemente contraditórios, e tanto efeitos facilitatórios como inibitórios da histamina têm sido descritos (Blandina et. al., 2004).

A histamina afeta processos cognitivos pela modulação de funções neuronais em todo o cérebro, indicando que o sistema histaminérgico influencia diretamente processos neurobiológicos que sustentam o aprendizado e a memória (Passine et. al., 2007).

Nossos resultados mostraram que a histamina (10 nmol/lado), quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente pós-TT1 (sessão de teste não reforçada), melhora de maneira dose-dependente a extinção de memórias aversivas relativas à tarefa de esquivar inibitória. Esse efeito foi mimetizado pela inibição da enzima histamina N-metil-transferase com SKF-91844 (50 nmol/lado).

Experimentos prévios de nosso laboratório indicaram que a infusão de histamina em tempos variados não mostra diferença em relação à consolidação de memórias aversivas, exceto quando a histamina foi infundida imediatamente após a aquisição (Silva, et al. 2006). Além disso, a histamina não afeta a LTM relativa à EI quando administrada bilateralmente intra-córtex occipital mediolateral, local situado logo acima de CA1, mostrando que o seu efeito deve-se especificamente a sua ação na região CA1 do hipocampo dorsal, e não como uma consequência de difusão a outras áreas adjacentes (Silva, et al. 2006). Estudos utilizando inibidores farmacológicos específicos têm mostrado que a expressão gênica, a síntese protéica

e as vias de ERK e PKA são requeridas no hipocampo e na amígdala basolateral para a extinção de LTM em EI (Cammarota et.al.,2005). Além disso, a extinção da memória relativa a EI requer a funcionalidade normal dos receptores NMDA, e pode ser melhorada por agonistas do sítio de ligação das poliaminas do NMDAr (Berlese, et. al., 2005).

Os receptores H<sub>1</sub> têm ampla distribuição no SNC. Altas densidades deste receptor estão presentes no sistema límbico, incluindo hipotálamo, núcleo septal, amígdala medial e algumas áreas do hipocampo. Em muitos neurônios a ativação do receptor H<sub>1</sub> leva a despolarização e/ou ao aumento da frequência de disparos (Brown, Stevens & Haas, 2000) ativando a inervação histaminérgica.

No entanto os resultados não mostram diferença significativa após a ativação do receptor H<sub>1</sub> com relação ao veículo, depois da infusão de seu agonista.

Além disso, mesmo que a ativação do receptor H<sub>1</sub> reduza o bloqueio exercido pelo Mg<sup>2+</sup> sobre o canal iônico do NMDAr (Payne, G.W & Neuman, R.S., 1997); da histamina facilitar diretamente a ativação do NMDAr através de sua ligação ao sítio modulatório das poliaminas situado na subunidade NR2B do NMDAr (Bekkers, J.M., 1993; Vorobjev, et. al., 1993); e, dos agonistas H<sub>3</sub> poderem aumentar a ativação de ERK1/2 em neurônios da região CA3 (Giovannini, et. al., 2003), nenhum dos antagonistas específicos para estes receptores (pirilamina, ifenprodil e tioperamida, respectivamente) foram capazes de reverter o efeito da histamina quando infundidos intra-CA1. Apenas a ranitina (antagonista H<sub>2</sub>) foi capaz de reverter tal efeito.

Dos agonistas testados, o dimaprit (10 nmol/lado) mostrou um efeito facilitador da extinção, como a histamina. Os outros agonistas (2-tiazoliletilamina, imetit e espermidina) não mostraram esse efeito. Pode-se sugerir então, que a extinção de memórias aversivas, melhorada pela histamina, é regulada via receptor H<sub>2</sub>.

No cérebro as respostas desencadeadas pela ativação dos receptores  $H_2$  são mediadas pela estimulação da adenilato-ciclase, seguido do aumento dos níveis intracelulares de cAMP e da ativação da PKA (Baudry, M.; Martres, M.P.Schwartz, J.C., 1975). Portanto, na região CA1 do hipocampo, a via do cAMP-PKA é um possível efetor intracelular responsável pelo efeito facilitador da histamina dependente de  $H_2$  sobre a extinção. A ativação dos receptores  $H_2$  induz uma hiperpolarização duradoura e regula os disparos de potenciais de ação em neurônios hipocampais piramidais, aumentando o número de potenciais de ação gerados em resposta a uma despolarização típica através de mecanismos dependentes de PKA e de cAMP (Hass & Konnerth, 1983).

Segundo Berridge M.J. (1998), a tioperamida (antagonista  $H_3$ ) mostrou melhorar a retenção do aprendizado em camundongos adultos e idosos, enquanto que agonistas do receptor  $H_3$  como o imetit ou a  $\alpha$ -metilhistamina interromperam este processo de aprendizagem. Nos resultados mostrados nesta dissertação, o imetit (agonista  $H_3$ ) mostrou efeito bloqueador sobre a extinção em ratos, sugerindo que esta via também está envolvida de alguma forma na modulação das memórias de EI.

Resumindo, os resultados mostram que o efeito da melhora da extinção induzido pela histamina e pelo SKF-91844 é bloqueado pela ranitidina e mimetizado pelo dimaprit. Isso indica claramente que o efeito da facilitação da extinção pela histamina não se deve a sua interação com os receptores  $H_1$  e  $H_3$  ou com a sua ligação ao sítio das poliaminas do NMDAr, mas ao invés disso, deve-se a ativação direta dos receptores  $H_2$ .

Com relação aos experimentos feitos com a histamina para verificar se havia algum efeito ansiogênico ou dano locomotor, comprovou-se que a histamina (10 nmol/lado) não modificou o número de cruzamentos nem de elevações (rearing) na tarefa de campo aberto. Além de não alterar o número total de entradas nos quatro braços, nem o número de entradas

e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, quando infundida intra-CA1 dorsal, 24 horas antes das respectivas sessões comportamentais.

A preferência por braços abertos pode representar um efeito ansiolítico do tratamento, tornando os animais menos apreensivos em relação ao ambiente novo e à altura do aparato. Enquanto que a exposição excessiva e preferencial por braços fechados pode refletir um efeito ansiogênico do tratamento farmacológico, caracterizado pela permanência em um local fechado e escuro considerado mais seguro pelo animal (Graeff et. al., 1998).

Portanto nossos resultados mostram que o sistema histaminérgico também está envolvido no processo de extinção de memórias aversivas e que esta ação se dá a partir da ativação de receptores  $H_2$ , havendo também a participação mais sutil dos receptores  $H_3$ .

## VI. CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a histamina infundida bilateralmente intra-CA1 dorsal de ratos melhora a extinção de memórias aversivas de longa duração relativas à EI, de maneira dose-dependente. Esses efeitos ocorreram quando a histamina foi infundida imediatamente após a sessão de teste não reforçada (extinção) TT1, 24 horas após o treino.

A melhora da extinção induzida pela histamina e pelo SKF-91844 foi mimetizada pelo dimaprit e bloqueada pela ranitidina.

Os resultados sugerem que o efeito da histamina em melhorar a extinção não é devido a sua interação com os receptores  $H_1$  e  $H_3$  ou com sua ligação a subunidade NR2B do NMDAr, mas sim devido a sua interação com os receptores  $H_2$ .

## VII. REFERÊNCIAS

- Alvarez, E.O.; Banzan, A.M. Effects of localized histamine microinjections into the hippocampal formation on the retrieval of a one-way active avoidance response in rats. **Journal of Neural Transmission, General Section**, v.101, n.1-3, p.201-211, 1995.
- Alvarez, E.O.; Banzan, A.M. Hippocampal histamine receptors: possible role on the mechanisms of memory in the rat, II. **Journal of Neural Transmission**, v.103, n.1-2, p.147-56, 1996.
- Alvarez, E.O.; Ruarte, M.B.; Banzan, A.M. Histaminergic systems of the limbic complex on learning and motivation. **Behavioural Brain Research**, v.124, n.2, p.195-202, 2001.
- Arrang, J.M.; Garbarg, M.; Schwartz, J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. **Nature**, v.302, p.832-837, 1983.
- Arrang, J.M.; Gulat Marnay C.; Defontaine, N.; Schwartz, J.C. Regulation of histamine release in rat hypothalamus and hippocampus by presynaptic galanin receptors. **Peptides**, v.12, p.1113-1117, 1991.
- Baldi, E.; Bucherelli, C.; Schunack, W.; Cenni, G.; Blandina, P.; Passani, M.B. The H3 receptor protean agonist proxyfan enhances the expression of fear memory in the rat. **Neuropharmacology**, v.48, n.2, p.246-251, 2005.
- Barros, D.M.; Mello e Souza, T.; De David, T.; Choi, H.; Aguzzoli, A.; Madche, C.; Ardenghi, P.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1,  $\beta$ -noradrenergic, serotonergic1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behavioural Brain Research**, v.124, p.1-7, 2001.
- Baudry, M.; Martres, M.P.Schwartz, J.C. H1 and H2 receptores in the histamine-induced accumulation of cyclic AMP in guinea pig brains slices. **Nature**, v.253, n.5490, p.362-364, 1975.
- Beckett, W.S. Post-traumatic stress disorder. **New England Journal of Medicine**, v.346, n.19, p.1495-1498, 2002.
- Bekkers, J.M. Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. **Science**, v.261, p.104-106, 1993.
- Benoit, S.C., Davidson, T.L., Chain, K-H, Trigilio, T., Jarrard, L.E. Pavlovian conditioning and extinction of context cues and punctuate CSs in rat with ibotenate lesion of the hippocampus. **Psychobiology**, v.27, p.26-39, 1999.
- Berlese, D.B.; Sauzem, P.D.; Carati, M.C.; Guerra, G.P.; Stiegemeier, J.A.; Mello, C.F.; Rubin, M.A. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.83, n.1, p.48-53, 2005.
- Bernaerts, P.; Lambert, Y.; Tirelli, E. Histamine H3 antagonist thioperamide dose-dependently enhances memory consolidation and reverses amnesia induced by dizocilpine or scopolamine in a one-trial inhibitory avoidance task in mice. **Behavioural Brain Research**, v.154, n.1, p. 211-219, 2004.
- Berridge MJ. Neuronal calcium signalin. **Neuron**, v.21, p.13-26, 1998.

- Bevilaqua, L.R.; Kerr, D.S.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. **European Journal of Neuroscience**, v.17, n.4, p.897-902, 2003.
- Black, J.W.; Duncan, W.A.; Durant, C.J.; Ganellin, C.R.; Parsons, E.M. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. **Nature**, v.236, p.385-390, 1972.
- Blandina P., Efoudebe M., Cenni G., Mannaioni P.F., Passini M.B. Acetylcholine, histamine and cognition: two sides of the same coin. **Learning and Memory**, v.11, n.1, p.1-8, 2004.
- Bliss, T.V.P.; Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v.361, p.31-39, 1993.
- Bouton, M. E. Context, ambiguity and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. **Biological Psychiatry**, v.52, n.10, p.976-86, 2002.
- Brown R.E.; Reymann, K.G. Histamine H<sub>3</sub> receptor-mediated depression of synaptic transmission in the dentate gyrus of the rat in vitro. **Journal of Physiology (London)**, v.496, p.175-184, 1996.
- Brown R.E.; Stevens, D.R.; Haas, H.L. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**, v.63, p.637-672, 2001.
- Brown, R.E.; Fedorov, N.B.; Haas, H.L.; Reymann, K.G. Histaminergic modulation of synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampal slices. **Neuropharmacology**, v.34, n.2, p.181-190, 1995.
- Brown, R.E.; Haas, H.L. On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. **Journal of Physiology (London)**, v.515, p.777-783, 1999.
- Cacabelos, R.; Alvarez, X.A. Histidine decarboxylase inhibition induced by alpha-fluoromethylhistidine provokes learning-related hypokinetic activity. **Agents Actions**, v.33, n.1-2, p.131-134, 1991.
- Cahill, L., Babinsky, R. Markowitsch, H. J., Macgaugh, J.L. The amygdala and emotional memory. **Nature**, v.377, n.6547, p.295-6, 1995.
- Cahill, L. The neurobiology of emotionally influenced memory. **Ann N Y Acad Sci**, v.125, p.238-45, 1995 a.
- Cahill, L.; McGaugh, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v.11, p.294-299, 1998.
- Cammarota, M.; Bevilaqua, L.R.; Ardenghi, P.; Paratcha, G.; Levi de Stein, M.; Izquierdo, I.; Medina, J. H. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning, abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**, v.76, p.36-46, 2000.
- Cammarota, M.; de Stein M.L., Paratcha, G.; Bevilaqua, L. R.; Izquierdo, I.; Medina J.H. Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus. **Neurochemical Research**, v.25, n.5, p.567-572, 2000a.
- Cammarota, M.; Bevilaqua, L.R.; Kerr, D.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. **Journal of Neuroscience**, v.23, n.3, p.737-741, 2003.



Cammarota M., Bevilaqua L., Barros D, Vianna M, Izquierdo L, Medina J, Izquierdo I. Retrieval and the Extinction of Memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.25, p.465-474, 2005.

Camarrota, M., Bevilaqua, L.R., Vianna, M.R., Medina, J.H.; Izquierdo, I. The extinction of conditioned fear: structural and molecular basis and therapeutic use. **Rev. Bras. Psiquiatria**, v.29, n.1, p.80-5, 2007.

Carew, T.J. Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* 16 (1), 5-8, 1996.

Chan, K.H., Morell, J.R., Jarrard, L.E., Davidson, T.L. Reconsideration of role of the hippocampus in learned inhibition. **Behavioral Brain Research**, v.119, n.2, p.111-30, 2001.

Chen, Z.; Sugimoto, Y.; Kamei, C. Effects of intracerebroventricular injection of alpha-fluoromethylhistidine on radial maze performance in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.64, n.3, p. 513-518, 1999.

Coge, F.; Guenin, S.P.; Audinot, V.; Renouard-Try, A.; Beauverger, P.; Macia, C.; Ouvry, C.; Nagel, N.; Rique, H.; Boutin, J.A.; Galizzi, J.P. Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H3 receptor. **Biochemical Journal**, v.355, p.279-288, 2001.

Damasio, A. R. **O erro de Descartes: emoção, razão e o cérebro humano**. 2ª ed., Companhia das Letras, São Paulo, 1996.

Davis, M. The role of amygdala in fear and anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, v.15, p.353-75, 1992.

de Almeida, M.A.; Izquierdo, I. Memory facilitation by histamine. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v.283, n.2, p.193-198, 1986.

Diewald, L.; Heimrich, B.; Busselberg, D.; Watanabe, T.; Haas, H.L. Histaminergic system in co-cultures of hippocampus and posterior hypothalamus: a morphological and electrophysiological study in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v.9, p.2406-2413, 1997.

Doreulee, N.; Yanovsky, Y.; Flaggmeyer, I.; Stevens, D.R.; Haas, H.L.; Brown, R.E. Histamine H3 receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. **Neuropharmacology**, v.40, n.1, p.106-113, 2001.

Douglas, R.J. The hippocampus and behavior. **Psychological Bulletin** 67(6):416-22, 1967.

Drutel, G.; Peitsaro, N.; Karlstedt, K.; Wieland, K.; Smit, M.J.; Timmerman, H.; Panula, P.; Leurs, R. Identification of rat H<sub>3</sub> receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. **Molecular Pharmacology**, v.59, p.1-8, 2001.

Dudai, Y. Neurobiology: Fear thou not. **Nature**, v.421, n.6921, p.325-7, 2003.

Dudai, Y., Rosenblum, K., Meiri, N., Miskin, R. & Schul, R. (1995) in **Plasticity in the Central Nervous System**, eds. McGaugh J. L., Bermúdez-Rattoni, F. & Prado-Alcalá, R Erlbaum, Mahwah NJ, p. 161-170.

Eichenbaum, H. is the rodent hippocampus just for 'place'? **Current Opinion in Neurobiology**, v.6, n.2, p.187-95, 1996.

Elgersma, Y., Silva, A.J. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, v.9, n.2, p.209-13, 1999.

Ericson, H.; Blomqvist, A.; Köhler, C. Brainstem afferents to the tuberomammillary nucleus in the rat brain with special reference to monoaminergic innervation. **Journal of Comparative Neurology**, v.281, p.169-192, 1989.

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

Ericson, H.; Köhler, C.; Blomqvist, A. GABA-like immunoreactivity in the tuberomammillary nucleus: an electron microscopic study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v.305, p.462-469, 1991b.

Flood, J.F.; Uezu, K.; Morley, J.E. Effect of histamine H2 and H3 receptor modulation in the septum on post-training memory processing. **Psychopharmacology (Berlin)**, v.140, n.3, p.279-284, 1998.

Frey, U.; Huang, Y.Y.; Kandel, E.R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. **Science**, v.260, n.5114, p.1661-1664, 1993.

Gantz, I.; Schaffer, M.; DelValle, J.; Logsdon, C.; Campbell, V.; Uhler, M.; Yamada, T. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.88, n.5937, 1991.

Giovannini, M.G.; Efoudebe, M.; Passani, M.B.; Baldi, E.; Bucherelli, C.; Giachi, F.; Corradetti, R.; Blandina P. Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. **Journal of Neuroscience**, v.23, n.27, p.9016-9023, 2003.

Gold, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v.46, p. 87-98, 1986.

Graeff, F.G., Netto, C.F., Zangrossi, H. Jr. The elevated T-maze as a experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehavioral Review**, v.23, n.92, p.237-46, 1998.

Gulat Marnay, C.; Lafitte, A.; Arrang, J.M.; Schwartz, J.C. Modulation of histamine release and synthesis in the brain mediated by alpha 2-adrenoceptors. **Journal of Neurochemistry**, v.53, p.513-518, 1989a.

Gulat Marnay, C.; Lafitte, A.; Arrang, J.M.; Schwartz, J.C. Regulation of histamine release and synthesis in the brain by muscarinic receptors. **Journal of Neurochemistry**, v.52, p.248-254, 1989b.

Gulat Marnay, C.; Lafitte, A.; Arrang, J.M.; Schwartz, J.C. Modulation of histamine release in the rat brain by kappa-opioid receptors. **Journal of Neurochemistry**, v.55, p.248-254, 1990.

Haas, H.L.; Konnerth, A. Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. **Nature**, v.302, n.5907, p.432-434, 1983.

Haas, H.L. Histamine potentiates neuronal excitation by blocking a calcium-dependent potassium conductance. **Agents Actions**, v.14, p.534-537, 1984.

Haas, H.L.; Sergueeva, O.A.; Vorobjev, V.S.; Sharonova, I.N. Subcortical modulation of synaptic plasticity in the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v.66, p.41-44, 1995.

Haas, H.; Panula, P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. **Nature Reviews**, v.4, p.121-130, 2003.

Hebb, D.O. **Organization of Behavior**. John Wiley, London, 1949.

- Hyman, B.T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. **Neurology**, v.40, n.11, p.1721-30, 1990.
- Iijima, T., Witter, M. P., Ichikawa, M. Tominaga, T., Kajiwara, R., Masumoto, G. Entorhinal-hippocampal interactions revealed by real-time imaging. **Science**, v.272, n.5265, p.1176-9, 1996.
- Inagaki, N. et al. Organization of histaminergic fibers in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v.273, p.283-300, 1998.
- Itoh, Y.; Oishi, R.; Nishibori, M.; Saeki, K. Involvement of Mu receptors in the opioid-induced increase in the turnover of mouse brain histamine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.244, p.1021-1026, 1988.
- Itoh, Y.; Oishi, R.; Nishibori, M.; Saeki, K. Characterization of histamine release from the rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.56, p.769-774, 1991.
- Izquierdo, I. Different forms of posttraining memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, v.51, p.171-202, 1989.
- Izquierdo, I., Medina, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.68, p.285-316, 1997.
- Izquierdo, I.; McGaugh, J.L. Behavioral pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioral Pharmacology**, v.11, p.517-534, 2000.
- Izquierdo, I. Memória. Artmed, Porto Alegre, 2002.
- Jeffrey, R. B., Jay, S. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological review**, v.105, n.2, p.325-350, 1998.
- Kamei, C.; Okumura, Y.; Tasaka, K. Influence of histamine depletion on learning and memory recollection in rats. **Psychopharmacology (Berlin)**, v.111, n.3, p.376-82, 1993.
- Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M. **Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**. Tradução de: Charles A. Esbérard. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. 519 p. (Aprendizado e Memória).
- Kaslin, J.; Panula, P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 440, p.342-377, 2001.
- Kimble, D.P. Hippocampus and internal inhibition. **Psychological Bulletin**, v.70, n.5, p.285-95, 1968.
- Knoche, A.; Yokoyama, H.; Ponomarenko, A.; Frisch, C.; Huston, J.; Haas, H.L. High-frequency oscillation in the hippocampus of the behaving rat and its modulation by the histaminergic system. **Hippocampus**, v.13, n.2, p.273-280, 2003.
- Komater, V.A.; Buckley, M.J.; Brownman, K.E.; Pan, J.B.; Hancock, A.A.; Decker, M.W.; Fox, G.B. Effects of histamine H3 receptor antagonists in two models of spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v.159, n.2, p.295-300, 2004.
- Konorski, J. **Conditioned Reflexes and Neuronal Organization**. London: University Press, 1948.

- Lang, T.A., Secic, M. **How to report statistics in medicine**. Philadelphia: ACP Press, 1997.
- Lattal KM, Abel T Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. **J Neurosci**, v.21, p.5773-5780, 2001.
- Lorenzini, C.A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. **Brain Research**, v.730, n.1-2, p.32-9, 1996.
- Maren, S., Fanselow, M. S. The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? **Neuron**, v.16, n.2, p.237-40, 1996.
- Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, v.24, p.897-931, 2001.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G.M. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. **Annual Review of Neuroscience**, v.23, p.649-711, 2000.
- McCormick, D.A.; Williamson, A. Modulation of neuronal firing mode in cat and guinea pig LGNd by histamine: possible cellular mechanisms of histaminergic control of arousal. **Journal of Neuroscience**, v.11, n.10, p.3188-3199, 1991.
- McGaugh, J.L. Memory – A century of consolidation. **Science**, v. 287, p.248-251, 2000.
- McIntyre, C.K., power, A.E., Roozendaal, B., McGaugh, J.L. Role of the basolateral amygdala em memory concolidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.985, p.273-93, 2003.
- Micheau, J., Riedel, G. Protein Kinases: which one is the memory molecule? **Cellular and Molecular Life Science**, v.55, n.4, p.534-48, 1999.
- Milad, M.R., Quirk, G.J. Neurons in medial prefrontal cortex signals memory for fear extinction. **Nature**, v.420, p.70-74, 2002.
- Mochizuki, T.; Yamatodani, A.; Okakura, K.; Horii, A.; Inagaki, N.; Wada, H. Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. **Physiology & Behavior**, v.51, p.391-394, 1992.
- Morisset, S.; Rouleau, A.; Ligneau, X.; Gbahou, F.; Tardivel-Lacombe, J.; Stark, H.; Schunack, W.; Ganellin, C.R.; Arrang, J.M. High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. **Nature**, v.408, n.6814, p.860-864, 2000.
- Munakata, M.; Akaike, N. Regulation of K<sup>+</sup> conductance by histamine H1 and H2 receptors in neurones dissociated from rat neostriatum. **Jounal of Physiology**, v.480, n.2, p.233-245, 1994.
- Myers, K.M., Davis, M. Behavioral and neural analysis of extinction. **Neuron**, v.36, n.4, p.67-84, 2002.
- Nguyen, T.; Shapiro, D.A.; George, S.R.; Setola, V.; Lee, D.K.; Cheng, R.; Rauser, L.; Lee, S.P.; Lynch, K.R.; Roth, B.L.; O'Dowd, B.F. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. **Molecular Pharmacology**, v.59, p.427-433, 2001.
- Oishi, R.; Itoh, Y.; Saeki, K. Inhibition of histamine turnover by 8-OH-DPAT, buspirone and 5-hydroxytryptophan in the mouse and rat brain. **Naunyn-Schmiedeberg' s Archives of Pharmacology**, v.345, p.495-499, 1992.

Orsetti, M.; Ghi, P.; Di Carlo, G. Histamine H(3)-receptor antagonism improves memory retention and reverses the cognitive deficit induced by scopolamine in a two-trial place recognition task. **Behavioural Brain Research**, v.124, n.2, p.235-242, 2001.

Panula, P.; Pirvola, U., Auvinen, S.; Airaksinen, M.S. Histamine-immunoreactive nerve fibres in the rat brain. **Neuroscience**, v.28, p.585-610, 1989.

Passani, M.B.; Bacciottini, L.; Mannaioni, P.F.; Blandina, P. Central histaminergic system and cognition. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.24, p.107-113, 2000.

Passani B.P., Giannoni P., Bucherelli C., Baldi E., Blandina P. Histamine in the brain: Beyond sleep and memory. **Biochemical Pharmacology**, v.73, p.1113-1122, 2007.

Pavlov, I.P. **Conditioned Reflexes: An Investigation of Physiological Activity of the Cerebral Cortex**. London:Oxford University Press, 1927.

Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>a</sup> ed., Academic Press, San Diego, 1986.

Payne, G.W.; Neuman, R.S. Effects of hypomagnesia on histamine H1 receptor-mediated facilitation of NMDA responses. **British Journal of Pharmacology**, v.121, p.199-204, 1997.

Pearce, J.M., Bouton, M. E. theories of associative learning in animals. **Annual Review of Psychology**, v.52, p.111-39, 2001.

Pergher, G.K., Stein, L.M. Compreendendo o esquecimento: teorias clássicas e seus fundamentos experimentais. **Psicol. USP** v.14, n.1, São Paulo, 2003.

Philippu, A.; Prast, H. Patterns of histamine release in the brain. **Agents Actions**, v.33, p.124-125, 1991.

Phillips, R.G., LeDoux, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v.106, n.2, p.274-85, 1992.

Ponomarenko, A.A.; Knoche, A.; Korotkova, T.M.; Haas, H.L. Aminergic control of high-frequency (approximately 200 Hz) network oscillations in the hippocampus of the behaving rat. **Neuroscience Letters**, v.348, n.2, p.101-104, 2003.

Prast, H.; Heistracher, M.; Philippu, A. In vivo modulation of histamine release in the hypothalamus by adrenoreceptor agonists and antagonists. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.344, p.183-186, 1991.

Prast, H.; Fischer, H.P.; Prast, M.; Philippu, A. In vivo modulation of histamine release by autoreceptors and muscarinic acetylcholine receptors in the rat anterior hypothalamus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.350, p.599-604, 1994.

Prast, H.; Lamberti, C.; Fischer, H.; Tran, M.H.; Philippu, A. Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.354, p.731-735, 1996.

Quevedo, J., Feier, G., Agostinho, F.R., Martins M.R., Roesler, R., Consolidação da memória e estresse pós-traumático. **Rev. Bras. Psiquiatria**, v.25, n.I, p.25-30, 2003.

Quirk, G.J., Gehlert, D.R. Inhibition of the amygdala: key to pathological states? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.985, p.263-72, 2003.

Raman, I.M.; Tong, G.; Jahr, C.E. Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. **Neuron**, v.16, n.2, p.415-421, 1996.

- Ramón y Cajal, S. Neue Darstellung vom histologischem Bau des Centralnervius system. **Archives of Anatomical Physiology**, v.55, p.319-428, 1893.
- Reiner, P.B.; Kamondi, A. Mechanisms of antihistamine-induced sedation in the human brain: H1 receptor activation reduces a background leakage potassium current. **Neuroscience**, v.59, n.3, p.579-588, 1994.
- Rescorla, R.A. Behavioral studies of Pavlovian conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, v.11, p.329-52, 1988.
- Rothbaum, B. O., Schwartz, A.C. Exposure therapy for posttraumatic stress disorder. **American Journal of Psychotherapy**, v.56, n.1, p.59-75, 2002.
- Rubio, S.; Begega, A.; Santin, L.J.; Arias, J.L. Improvement of spatial memory by R- $\alpha$ -methylhistamine, a histamine H3-receptor agonist, on the Morris water-maze in rat. **Behavioural Brain Research**, v.129, p.77-82, 2002.
- Sakai, N.; Sakurai, E.; Sakurai, E.; Yanai, K.; Mirua, Y.; Watanabe T. Depletion of brain histamine induced by alpha-fluoromethylhistidine enhances radial maze performance in rats with modulation of brain amino acid levels. **Life Sciences**, v.62, n.11, p.989-994, 1998.
- Schafe, G.E, Thiele, T.E., Bernstein, I.L. Conditioning method dramatically alters the role of amygdala in taste aversion learning. **Learning & Memory**, v.5, n.6, p.481-92, 1999.
- Schlicker, E.; Behling, A.; Lummen, G.; Gothert, M. Histamine H3A receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.345, n.4, p.489-493, 1992.
- Schwartz, J.C.; Arrang, J.M.; Garbarg, M.; Pollard, H.; Ruat, M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. **Physiological Reviews**, v.71, p.1-51, 1991.
- Selbach, O.; Brown, R.E.; Haas, H.L. Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP. **Neuropharmacology**, v.36, n.11-12, p.1539-1548, 1997.
- Sherin, J.E.; Shiromani, P.J.; McCarley, R.W.; Saper, C.B. Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. **Science**, v.271, p.216-219, 1996.
- Silva, W. C.; Bonini, J; Bevilaqua, L.; Izquierdo, I; Cammarota, M. Histamina enhances inhibitory avoidance memory consolidatios through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2006.
- Squire, L.R.; Zola, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.93, p.13515-13522, 1996.
- Squire, L.R.; Kandel, E.R. **Memória: da mente às moléculas**. Tradução de: Carla Dalmaz e Jorge A. Quillfeldt. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- Steininger, T.L.; Gong, H.; McGinty, D; Szymusiak R. Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. **Journal of Comparative Neurology**, v.429, p.638-653, 2001.
- Tasaka, K.; Kamei, C.; Akahori, H.; Kitazumi, K. The effects of histamine and some related compounds on conditioned avoidance response in rats. **Life Sciences**, v.37, n.21, p.2005-2014, 1985.

Terje Lømo. The discovery of long-term potentiation. **Phil. Trans. Royal Society Lond. B**, v.358, p.617–620, 2003.

Van Hoesen, G.W. Neural systems of the non-human primate forebrain implicated in memory. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.444, p.97-112, 1985.

Vianna, M.R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M.L., Medina, J.H., Izquierdo, I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a non-associative learning task in the rat. **Learning and Memory**, v.7, n.5, p.333-40, 2000.

Vorobjev, V.S.; Sharonova, I.N.; Walsh, I.B.; Haas, H.L. Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. **Neuron**, v.11, p.837-844, 1993.

Weisskopf, M.G.; Castillo, P.E.; Zalutsky, R.A.; Nicoll, R.A. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. **Science**, v.265, n.5180, p.187818-82, 1994.

Williams, K. Subunit-specific potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors by histamine. **Molecular Pharmacology**, v.46, p.531-541, 1994.

Yamashita, M.; Fukui, H.; Sugama, K.; Horio, Y.; Ito, S.; Mizuguchi, H.; Wada, H. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.88, p.11515-11519, 1991.

Yanovsky, Y.; Haas, H.L. Histamine increases the bursting activity of pyramidal cells in the CA3 region of mouse hippocampus. **Neuroscience Letters**, v.240, p.110-112, 1998.