

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**ARILEY DA SILVA QUEIRÓZ**

**O PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS (H1 E H2) NA REGIÃO CA1  
DO HIPOCAMPO NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DISCRIMINATIVA EM  
RATOS**

Porto Alegre 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE – ICBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA.**

**O PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS (H1 E H2) NA REGIÃO CA1  
DO HIPOCAMPO NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DISCRIMINATIVA EM  
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Ariley da Silva Queiróz

Orientador: Prof. Dr. Fernando Benetti

Porto Alegre – RS  
2017

Dedico este trabalho a toda a forma de vida.

## Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Benetti, melhor pesquisador jovem do Brasil, pela oportunidade concedida, pela confiança, ensinamentos e parceria como um amigo desde o início desse trajeto.

À Profa. Dra. Maria Flávia por todos os ensinamentos e pela colaboração com o crescimento deste laboratório.

Aos meus colegas de laboratório Marco e Débora pela valorosa ajuda prestada, amizade e pelos momentos descontraídos.

Aos meus amigos pelo apoio constante e força depositada no meu caminho.

A todo o meu contexto familiar, desde os ancestrais até os membros atuais, que me permitiram usufruir de sua experiência e grandeza.

A minha namorada Suelen, amor da minha vida, minha segunda parte inteira, meu presente e meu futuro.

A toda a vida que com muita gratidão eu continuo a deleitar a cada instante.

*“Para ganhar conhecimento,  
adicione coisas todos os dias.  
Para ganhar sabedoria,  
elimine coisas todos os dias”*

*Lao Tzu*

## **ABSTRACT**

The histaminergic system in the central nervous system is involved in the regulation of learning and memory. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of histamine through histaminergic receptors activation (H1,H2) in discriminative memory reconsolidation in rat hippocampal region CA1. Wistar male rats (n= 154) were used to investigate whether histamine itself or receptor-selective histamine agonist and antagonist given into the CA1 region of this hippocampus immediately post-reactivation can affect the object recognition test (RO) performance. Our results showed an improve in RO test performance seven days after memory reactivation caused by histamine and SKF-98144 infusion. The same test ten days after memory reactivation not show difference between saline and histamine group. H1 agonist did not improve discriminative memory in RO. The enhancing effect of histamine was blocked by the H2 receptor antagonist, ranitidine, but not by the H1 receptor antagonist, pyrilamine. The present results suggest that histamine infusion in rat hippocampal region CA1 post-activation improves discriminative memory in RO trough H2 receptor.

## RESUMO

O sistema histaminérgico no sistema nervoso central (SNC) apresenta funções que modulam o aprendizado e consolidam a memória. O objetivo foi estudar o efeito da histamina através dos receptores histaminérgico (H1 e H2) na reconsolidação da memória discriminativa na região CA1 do hipocampo de ratos. Foram utilizados 153 ratos Wistar submetidos à cirurgia exterotóxica para implantação de cânulas guia na região CA1 do hipocampo. Os animais foram habituados por quatro dias consecutivos no campo aberto durante 20 minutos. Na sessão de treino os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (A e B) por 5 min. Após 24h (reativação), um dos objetos foi trocado para um novo (objeto C), e os ratos foram reexpostos no campo aberto por 5 min. Imediatamente após, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 dos agonistas/antagonistas histaminérgicos. O teste da reconsolidação da memória discriminativa foi realizado na tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Os dados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média para o teste de t-student para  $p < 0,05$  de significância. Foi realizado 3 dias, 7 dias ou 10 dias após a sessão de reativação. Resultados: Nossos dados mostraram que 3 dias após a infusão tanto os grupos salina ( $56.69 \pm 4,651$ ) quanto o grupo histamina ( $61.10 \pm 4,712$ ) exploraram mais o objeto novo (D) em relação ao objeto familiar. Em 7 dias após a reativação os animais tratados com histamina ( $55.96 \pm 7,022$ ) exploraram mais o objeto (D) em relação ao objeto familiar, comparados aos salina ( $39.40 \pm 4,845$ )  $p < 0,01$ . No teste do dia 10 não houve mais diferença estatística entre os grupos  $p > 0,05$ . O SKF 91488 mostrou que o aumento da histamina endógena induz a melhora a memória discriminativa quando testados 7 dias ( $57.60 \pm 5.210$ ) comparado ao salina ( $48.09 \pm 7.582$ ) para  $p < 0,001$ . O agonista H2 Dimaprit ( $56.14 \pm 7.425$ ) também melhorou a memória discriminativa comparado à salina ( $49.04 \pm 9, 309$ )  $p < 0,05$ . O mesmo não ocorreu com o agonista H1 Piridiletiletanolamina ( $52.93 \pm 8.946$ ) e o grupo salina ( $49.04 \pm 9,309$ ). Nas co-infusões os antagonistas e histamina, os animais que receberam Pirilamina + histamina ( $56.41 \pm 6.694$ ) e histamina ( $60.04 \pm 10.16$ ) obtiveram uma taxa exploratória maior do objeto novo comparado a os animais que receberam Ranitidina + histamina ( $51.06 \pm 7.238$ ) e o salina ( $47.04 \pm 4.718$ ) que tiveram a memória bloqueada com significância de  $p < 0,05$ . As doses utilizadas nas infusões intra- CA1 bilaterais foram de (1 $\mu$ l) de salina, Histamina 10mM/ $\mu$ l, SKF 91488 50mM/ $\mu$ l, os agonistas Piridiletiletanolamina (PEA) e Dimaprit nas doses de 10mM/ $\mu$ l e os

antagonistas Pirilamina e Ranitidina nas doses de 50mM/ $\mu$ l. De acordo com os dados obtidos neste estudo pode-se concluir que a histamina infundida na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a reativação melhora a memória discriminativa na tarefa de RO via receptor do tipo H2

Palavras-chave: Histamina. Memória. Memória discriminativa. Reconhecimento de objetos. Hipocampo. Reconsolidação.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico

CA1 – Corno de Amon 1

CREAL – Centro de Experimentação e Reprodução de Animais de Laboratório

cPRH – Córtex perihinal

DAG - 1,2 diacilglicerol

GABBA - acido gama-aminobutírico

HDC - Histidina-descaboxilase

ICBS - Instituto de Ciência Básicas da Saúde

mPFC - Córtex pré-frontal medial

NMDA - N-metil-D-aspartato

nTM – Núcleo túbero mamilar

PEA - Piridiletiletanolamina

PKA - Proteína cinase A

PKC - Proteína cinase C

RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro

RO - Reconhecimento de Objetos

SNC – Sistema nervoso central

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sistema Histaminérgico no encéfalo humano: origem e projeções .....	14
<b>Figura 2:</b> Síntese, transporte e metabolismo da histamina em neurônios do nTM... ..	15
<b>Figura 3:</b> Vias intracelulares ativadas por receptores histaminérgicos. ....	18
<b>Figura 4:</b> Ilustração do encéfalo de ratos .....	22
<b>Figura 5:</b> Aparelho estereotáxico utilizado nas cirurgias para implantação de cânulas .....	23
<b>Figura 6:</b> Organograma demonstrando os experimentos comportamentais.....	27
<b>Figura 7:</b> Efeitos da histamina 3 dias após a infusão. ....	30
<b>Figura 8:</b> Efeitos da histamina como um neurotransmissor pró-mnésico 7 dias após a infusão.....	30
<b>Figura 9:</b> Efeitos da histamina 10 dias após a infusão. ....	31
<b>Figura 10:</b> Efeito da histamina endógena na manutenção da memória discriminativa 7 dias após a infusão. ....	32
<b>Figura 11:</b> Participação dos receptores H1 e H2 com o uso de antagonistas histaminérgicos 7 dias após a infusão.....	34
<b>Figura 12:</b> Participação dos receptores H1 e H2 com o uso de agonistas histaminérgicos 7 dias após a infusão .....	33

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	9
1.1	MEMÓRIA	9
1.1.2	<b>Reconsolidação da Memória</b>	10
1.1.3	<b>Memória discriminativa</b>	12
1.1	SISTEMA HISTAMINÉRGICO	13
1.2.1	<b>Anatomia do Sistema Histaminérgico</b>	13
1.2.2	<b>Histamina</b>	14
1.2.3	<b>Receptores Histaminérgicos</b>	16
1.2.4	<b>Efeitos do Sistema Histaminérgico na Memória</b>	18
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b>	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	20
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>4</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b>	20
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	20
4.2	CIRURGIAS ESTEREOTÁXICAS	21
4.3	DROGAS	23
4.4	PARADIGMAS DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	24
4.4.1	<b>Protocolo de reconsolidação da memória discriminativa em RO</b>	25
4.5	DESENHO DO ESTUDO	27
4.5.1	<b>DESCARTE DE MATERIAIS E RESÍDUOS</b>	27
4.5.2	<b>MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA</b>	28
4.6	ASPECTOS ÉTICOS	28
4.7	EUTANÁSIA	28
<b>5</b>	<b>CALCULO AMOSTRAL</b>	28
<b>6</b>	<b>ESTATÍSTICA</b>	29
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b>	29

7.1 EFEITOS DA HISTAMINA COMO UM NEUROTRANSMISSOR PRÓ-MNÉSICO .....	29
7.2 EFEITO DA HISTAMINA ENDÓGENA NA MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA DISCRIMINATIVA EM RO .....	31
7.3 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H1 E H2 COM O USO DE ANTAGONISTAS HISTAMINÉRGICOS .....	32
7.4 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H1 E H2 COM O USO DE AGONISTAS HISTAMINÉRGICOS .....	33
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>9 CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MEMÓRIA

Memória pode ser descrita como a capacidade de reter informações oriundas de novas experiências sensoriais com o meio ou internas (cognição, emoções), para que baseadas em experiências prévias possam organizar melhor nossas condutas, representando, portanto, a base de nossa identidade (IZQUIERDO, 2011). Ao longo da evolução das espécies, a memória surgiu como uma capacidade evolutiva formidável, possibilitando que os seres vivos se beneficiassem de experiências passadas para resolver problemas do ambiente (SUCHOW, 2017). Seguindo essa lógica observa-se na escala filogenética que seres mais antigos como os invertebrados já apresentam capacidade mnemônica, sugerindo que a memória poderia ser considerada uma propriedade do sistema nervoso desde o seu surgimento com a evolução (SILVA, 2005).

Em seres humanos o aprendizado e a memória tornam-se elementos ainda mais importantes, frente à complexidade, e desafios da vida cotidiana, nos possibilitando reter uma enorme gama de informações que nos levará ao aprendizado. Dessa forma, o aprendizado é o processo decorrente da aquisição de uma nova informação. Somente após o aprendizado, ocorre a retenção da informação através do processo chamado de consolidação que inicia imediatamente após a aquisição.

A consolidação da memória é um processo no qual uma nova informação adquirida é codificada, armazenada e se torna estável na memória por determinado período de tempo (MCGAUGH, 1996; IZQUIERDO, 1989; MCGAUGH, 2015; JOCKWITZ *et al.*, 2017), para que possa posteriormente ser evocada. Este processo é dependente de síntese protéica (NADER *et al.*, 2000). Quanto ao intervalo de tempo a memória pode ser de curta duração como alguns minutos ou de longa duração como anos. Portanto, a memória pode ser classificada de acordo ao tempo que ela persiste. Com isso, a capacidade de manter representações atuais e transitórias, de informações importantes para realização de determinadas tarefas, é o que chamamos de memória de trabalho (NADEL *et al.*, 2000; KANDEL, 2014). Quando as informações são sustentadas por um maior período, no entanto em um

intervalo curto (minutos até algumas horas) são classificadas como memórias de curta duração e por último, quando a manutenção de determinada informação é maior (horas ou anos) são denominadas como memórias de longa duração. De todas as informações captadas pelo sistema nervoso central (SNC), apenas algumas são consolidadas como memórias de longa duração. Normalmente consolidam-se mais facilmente as informações com mais carga emocional, mais focalizada pela atenção. (CORONA *et al.*, 2016; MCGAUGH, 2000; PARSONS; RESSLER, 2013).

As memórias consolidadas podem ser acessadas voluntariamente ou até mesmo de forma espontânea em processo chamado de evocação (MOURÃO JÚNIOR E FARIA, 2015). Durante a reativação de uma lembrança evocada, a memória sofre uma desestabilização, possibilitando a adição de novas informações a memória original ou extinção dos traços de memória originais (AGREN, *et al.*, 2012; 2014; BAKER, K. D., MCNALLY, G. P.; RICHARDSON, R., 2013). Com isso, o termo reconsolidação surgiu para definir o processo onde atualizamos ou fortalecemos uma memória antiga, como por exemplo, quando estudamos algum conteúdo de nosso interesse ou reforçamos alguma lembrança importante que não devemos esquecer.

### **1.1.2 Reconsolidação da Memória**

A memória possui uma propriedade dinâmica, não sendo uma entidade fixa, mesmo com nossa forte tendência em vê-la como uma descrição precisa de eventos passados, dessa forma a reativação e a expressão de uma memória existente geram um estado lábil, o que significa que a memória reativada torna-se vulnerável a interferência, com isso, na prática, uma nova experiência pode entrelaçar com a memória reativada e modificar suas próximas reativações (LEE *et al.*, 2017). Contudo, esse dinamismo natural da memória só seria comprovado em 1968 através de um estudo utilizando o modelo de condicionamento aversivo em ratos, que demonstrou que o choque eletroconvulsivo imediatamente após a reativação da memória tinha um efeito amnésico, como acontecia quando aplicado na janela da consolidação (MISANIN, R. J. *et al.*, 1968). Portanto, a reativação poderia induzir a memória a um estado instável e vulnerável a interferências, sendo necessário um novo período para estabilização.

No entanto, o termo reconsolidação surgiu apenas após um artigo de 1979, no qual o psicólogo Donald Lewis publicou um resumo de seus principais experimentos explicando a hipótese da “memória ativa” e “memória inativa”, onde a memória após a reativação passava de um estado inativo para um estado ativo, onde é suscetível a interferência. Após algumas horas, essa memória se reestabiliza e entra num estado inativo, onde os tratamentos de interferência não teriam mais efeito (LEWIS, 1979). Baseado nisso, labilizar as memórias a ponto de adicionar informações à memória original, aumentando a possibilidade de armazená-las por um tempo maior é chamado de reconsolidação. Desse modo, ao que recentes estudos nos indicam, trata-se de uma atualização da consolidação, pelo fato de desestabilizar esta memória, reativando todos os mecanismos de retenção, e de consolidação como a síntese protéica (NADER *et al.*, 2000; RICCIO *et al.*, 2006; BALDERAS, RODRIGUEZ-ORTIZ, BERMUDEZ-RATTONI, 2013) isto é, a recuperação da memória pode levar à desestabilização da memória exigindo um processo de reconsolidação para restabelecê-lo.

Nesse sentido, evidências vêm surgindo, demonstrando a possibilidade de manipulação da memória original, tanto prejudicando como aprimorando o seu desempenho. Além disso, a natureza bidirecional da modulação da plasticidade sináptica permite que memórias reativadas sejam potencializadas por intervenções farmacológicas ou processos celulares (TRONSON, N.C. *et al.*, 2006), e esta fase de reconsolidação da memória, oferece uma oportunidade para apagar (NADER *et al.*, 2000; RICCIO *et al.*, 2006) ou modificar (INDA, 2011) a memória existente, durante o período de reestabilização. Por exemplo, o desempenho pode ser prejudicado se tratamentos amnésicos, como um choque eletroconvulsivo ou uma aprendizagem concorrente, ocorrerem após a reativação da memória (MISANIN, J.R. *et al.*, 1968; WALKER, M.P. *et al.*, 2003; JAMES, ELLA L. *et al.*, 2015); ou ainda pode ser prejudicada pela administração de anisomicina (inibidor da síntese protéica) (MORRIS, 2006) porém a retenção das novas informações pode ser reforçada pela administração de compostos pró-cognitivos após a reativação (GORDON, W.C., 1977). A liberação de neurotransmissores atua modulando os processos de reconsolidação da memória como, por exemplo, a dopamina na reconsolidação da memória de medo (FURINI *et al.*, 2014), e memória de reconhecimento de objetos (ROSSATO *et al.*, 2015). A acetilcolina é outro neurotransmissor que atua modulando a reconsolidação da memória discriminativa na tarefa de reconhecimento de objetos

(BERMUDEZ-RATTONI, 2014). Portanto, a labilização de uma memória já consolidada é necessária para a reconsolidação e esta labilização quando impedida, interfere prejudicando a reconsolidação (MORRIS, 2006; DA SILVEIRA, 2013).

### **1.1.3 Memória discriminativa**

Um tipo importante de memória é a memória discriminativa que pode ser explicada como a habilidade que o indivíduo possui em discriminar um objeto familiar de um objeto novo, e este tipo de memória está relacionado com o lobo temporal medial, em estruturas como os córtex pré-frontal medial (mPFC), perirrinal (cPRH), parahipocampal, insular e hipocampal (CA1) (BALDERA *et al.*, 2014). Atualmente uma das formas mais usada para avaliar a memória discriminativa é a tarefa de reconhecimento de objetos (RO), que mostra a capacidade natural de um roedor discriminar um objeto já conhecido de um novo, baseando-se na tendência de um roedor em explorar preferencialmente sempre um novo objeto ao invés de um já conhecido chamado também de familiar (GRAYSON *et al.*, 2014).

O protocolo de reconsolidação da memória discriminativa na tarefa de RO, quando gera a aquisição de novas informações relacionadas com a memória original, ativa a participação do hipocampo (BALDERAS, RODRIGUEZ-ORTIZ, BERMUDEZ-RATTONI, 2014).

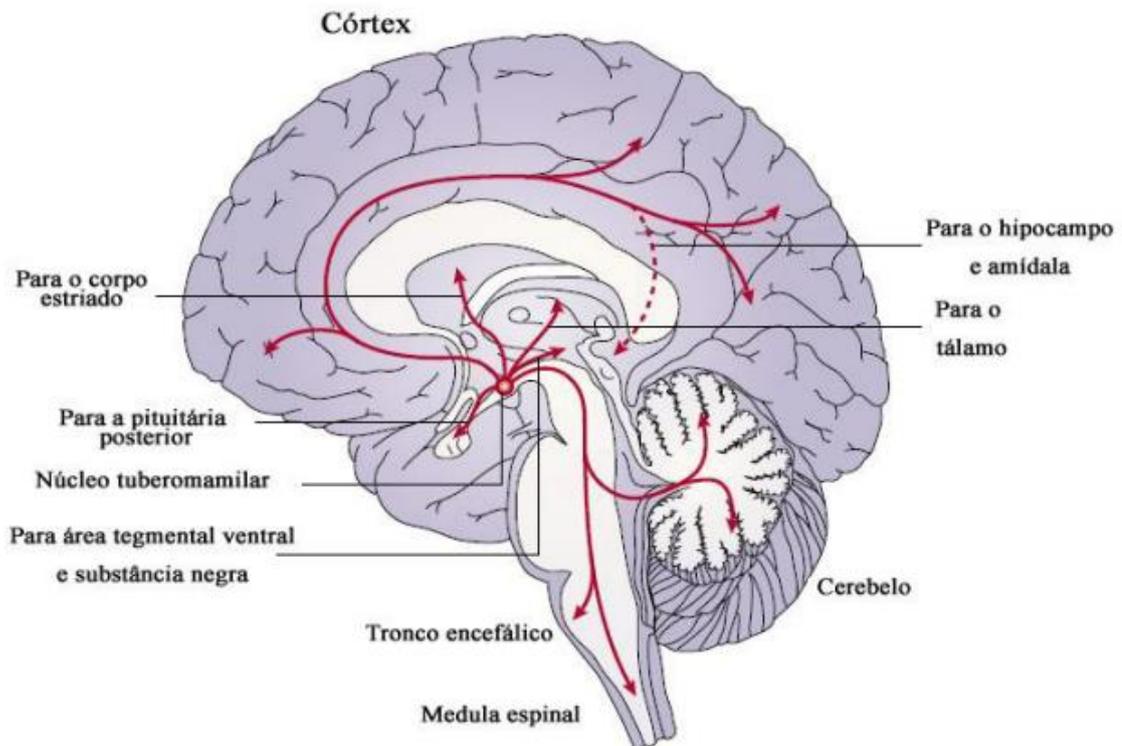
O entendimento dos mecanismos moleculares, celulares e genéticos da reconsolidação pode ser de grande importância para a aplicação a uma variedade de estratégias terapêuticas (BOWER, 2017; STERN & ALBERINI, 2013). Estes mecanismos estão presentes em uma enorme gama de animais e tipos de memória. Outros neurotransmissores podem estar envolvidos, como a serotonina, o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a histamina. No entanto, o papel do sistema histaminérgico nesta tarefa bem como sua participação na reconsolidação da memória discriminativa na tarefa de reconhecimento de objetos de tem sido pouco estudado, e é o nosso foco de estudo neste trabalho.

## 1.1 SISTEMA HISTAMINÉRGICO

### 1.2.1 Anatomia do Sistema Histaminérgico

As primeiras descobertas envolvendo o sistema histaminérgico, em 1970, sugeriram que a histamina exercia um efeito estimulatório no SNC (MONNIER *et al.*, 1970), entretanto os estudos sobre o sistema histaminérgico foram negligenciados, porque os ensaios que revelavam sua identidade anatômica não conseguiam determinar a localização dos neurônios histaminérgicos no sistema nervoso central (SNC)., Somente em 1974, foi identificado, a localização aproximada de uma fonte de neurônios histaminérgicos no SNC (SCHWARTZ J. *et al.*, 1974). Entretanto, apenas em 1984, através de um ensaio de imuno-histoquímica, demonstrando que o núcleo túbero mamilar (nTM) era a estrutura que continha os neurônios histaminérgicos no cérebro, e que também projetava uma ampla distribuição de eferências histaminérgicas, que o sistema histaminérgico ganhou relevância (PANULA P., YANG, H. Y., & COSTA E., 1984; WATANABE, T. *et al.*, 1984). Com isso, as principais terminações nervosas das eferências histaminérgicas, diferem levemente entre diferentes espécies, contudo elas cobrem essencialmente todas as áreas do SNC, havendo inervação de moderada a densa do córtex cerebral, amígdala, substância negra, estriado, hipocampo e tálamo (INAGAKI *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). Os receptores histaminérgicos estão amplamente distribuídos por todo o SNC.

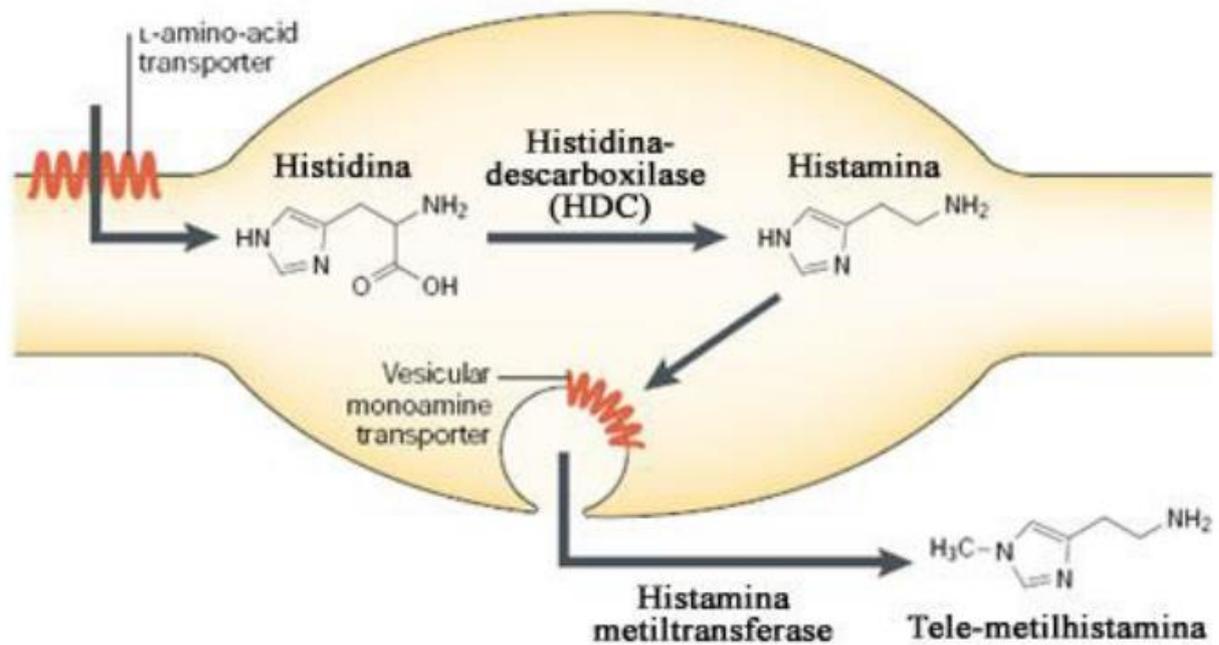
Sobre as aferências o nTM recebe projeções difusas originadas de muitas áreas diferentes, incluindo o córtex infralímbico, o septo lateral, o núcleo pré-óptico e grupos neuronais do tronco cerebral. (ERICSON *et al.*, 1989; ERICSON *et al.*, 1991; PANULA & NUUTINEN, 2013). Desde então, diversos estudos demonstraram que o sistema histaminérgico está intimamente relacionado com várias funções especiais do SNC, entre elas a regulação da temperatura do corpo, ciclo sono-vigília e atividades cognitivas que modulam desde os estados de atenção do indivíduo bem como o aprendizado e memória (BROWN, 2000; PASSANI M.B. & BLANDINA P., 2011; BENETTI *et al.* 2015; BLANDINA *et al.*, 2004).



**Figura 1: Sistema Histaminérgico no encéfalo humano: origem e projeções.** Fonte: modificado de Haas *et al.*, 2008.

### 1.2.2 Histamina

A histamina pode ser descrita como um neurotransmissor, sintetizado no SNC, em uma região chamada núcleo túbero mamilar no hipotálamo, no qual os corpos celulares destes neurônios se projetam para diferentes regiões do SNC incluindo o hipocampo dorsal, amígdala basolateral e córtex pré-frontal medial, amígdala, substância negra, estriado, e tálamo, (HAAS *et al.*, 2003). Este neurotransmissor é sintetizado a partir da descarboxilação do aminoácido histidina, através da enzima histidina-descaboxilase (HDC) (Fig. 2), a molécula da histamina é então armazenada em vesículas sinápticas e liberada na fenda sináptica através de um mecanismo cálcio-dependente. Na fenda sináptica a histamina é degradada pela enzima N-metiltransferase (HAAS e PANULA, 2003; HAAS, SERGEEVA E SELBACH, 2008).



**Figura 2: Síntese, transporte e metabolismo da histamina em neurônios do nTM.** Fonte: Haas *et al.*, 2003.

A atividade regulatória sobre a síntese e liberação da histamina está sob controle de receptores inibitórios muscarínicos M1 (PRAST, H.; FISCHER, H.P.; PRAST, M.; PHILIPPU, 1994), adrenorreceptores  $\alpha 2$  (GULAT MARNAY C. *et al.*, 1989; (PRAST, H.; HEISTRACHER, M.; PHILLIPU, A., 1991), 5-HT1A (OISHI, R.; ITOH, Y.; SAEKI, K., 1992), opióides k-receptores (GULAT MARNAY C. *et al.*, 1990), receptores de galanina (ARRANG, 1991), e receptores facilitatórios opióides  $\mu$  (ITOH *et al.*, 1988), além dos autorreceptores H3 localizados no corpo e nos terminais axonais dos neurônios histaminérgicos (NIETO-ALAMILLA, G. *et al.*, 2016) Experimentos *in-vivo* mostraram a participação do óxido nítrico inibindo a liberação de histamina no hipotálamo (PRAST, H.; LAMBERTI, C.; FISCHER, H.; TRAN, M.H.; PHILIPPU, A., 1996).

Nesse sentido, a liberação da histamina demonstra periodicidade muito clara, seguindo paralelamente o ritmo circadiano com mudança de padrão de disparo dos neurônios histaminérgicos que ocorrem durante o ciclo sono-vigília (MOCHIZUKI *et al.*, 1991). Os neurônios histaminérgicos do nTM atuam como marca-passo, disparando potenciais de ação em uma baixa frequência (< 3 Hz). Estudos com registros eletrofisiológicos desses neurônios em gatos indicam que sua

atividade é elevada durante a vigília e menor ou ausente durante o sono (SCHERIN et al, 1996; STEININGER et al, 2001).

### 1.2.3 Receptores Histaminérgicos

Ao todo foram revelados quatro subtipos de receptores para histamina, H1, H2, H3 e H4. Os dois primeiros exercendo um papel pró-cognitivo, o terceiro de auto-regulação da secreção de histamina e o quarto pouco presente no cérebro e ainda pouco estudado. (HASS, *et al.*, 2008; PASSANI M.B. & BLANDINA, 2011). Os receptores histaminérgicos conhecidos, H1, H2, H3 e H4, são receptores associados à proteína G e vários segundos mensageiros, e são amplamente expressos no SNC com exceção do H4 que é bem menos abundante. (HAAS *et al.*, 2008; HILL *et al.*, 1997). As ações pró-cognitivas da histamina, normalmente envolvem um aumento da ativação dos receptores pós-sinápticos H1 e/ou H2, ambos em geral excitam os neurônios ou potencializam suas ações (MCCORMICK E WILLIAMSON, 1991; MUNAKATA E AKAIKE, 1994). O receptor H3 é pré-sináptico e atua como autorreceptor, regulando a síntese e a liberação da histamina neuronal e de outros neurotransmissores, como acetilcolina, norepinefrina, dopamina, serotonina, glutamato e GABBA (HAAS *et al.*, 2003; HAAS, SERGEEVA E SELBACH, 2008). O receptor H4 está relacionado ao sistema imunológico, mas sua atividade no SNC é muito pouco conhecida (CONNELLY et al., 2009; STRATHOVA et al., 2009).

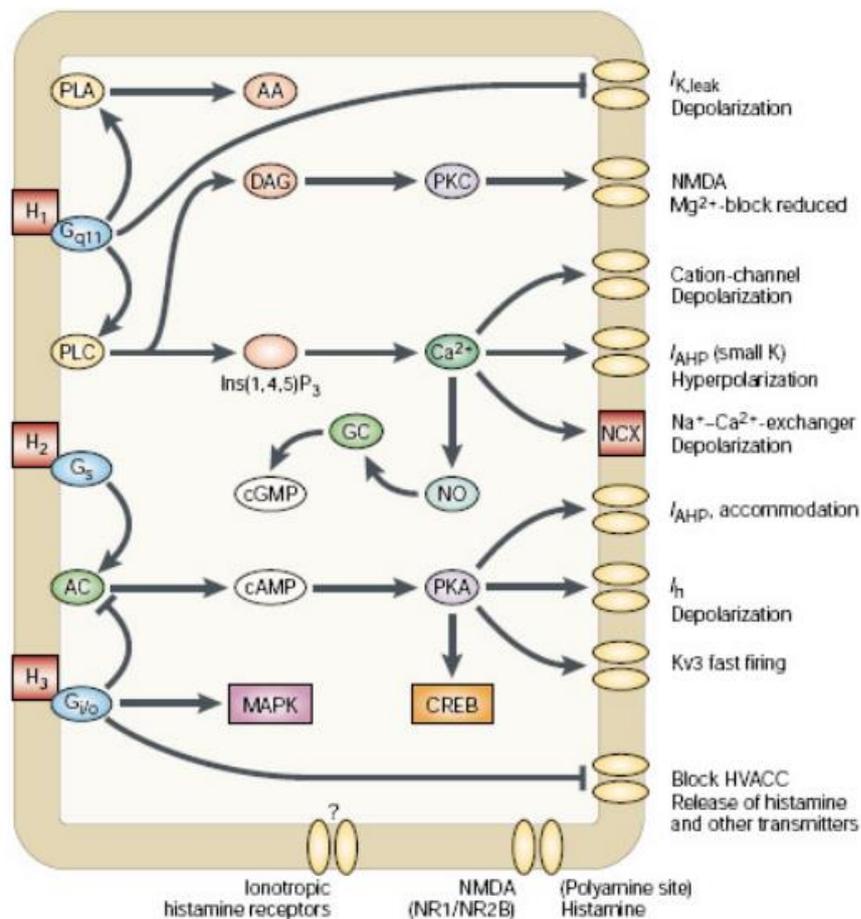
Os receptores H1 estão presentes no córtex, hipocampo, amígdala, hipotálamo, tálamo corpo estriado e no cerebelo (LINTUNEN *et al.*, 1998). A ativação do receptor H1, ativa a enzima chamada fosfolipase C via proteína G estimulatória, que atua na formação dos segundos mensageiros 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG) resultando no aumento dos níveis de cálcio intracelular. Dessa forma, reduz o bloqueio dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) pelo Mg<sup>2+</sup>, por meio da ação da proteína cinase C (PKC), facilitando a ativação deste receptor (SCHNEIDER E. H., NEUMANN D, SEIFERT R, 2014). A estimulação deste receptor, também induz a produção de mensageiros retrógrados, como ácido araquidônico e óxido nítrico (BROWN, STEVENS E HAAS, 2001; HAAS e PANULA 2003; DRINGENBERG, 2006 PANULA E NUUTINEN, 2013).

Os receptores H2 estão localizados nos núcleos da base, amígdala, hipocampo, córtex e cerebelo. A ativação dos receptores H2 ativa a enzima

adenilato ciclase via acoplamento da proteína G estimulatória, induzindo o aumento do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que por sua vez estimula a proteína cinase A (PKA) resultando na transcrição de genes e tradução do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) em proteínas (KANDEL, E.R, 1993; BROWN, STEVENS E HAAS, 2001; HAAS e PANULA 2003; PANULA E NUUTINEN, 2013).

Já os receptores H3 são encontrados nos dendritos e terminais axonais dos neurônios do núcleo acumbente, núcleo estriado, substância negra, hipocampo, amígdala, córtex e cerebelo. A ativação deste receptor gera a inibição da ativação da adenilato ciclase e conseqüentemente a redução da formação do segundo mensageiro AMPc (BROWN, STEVENS E HAAS, 2001; HAAS e PANULA 2003; PANULA E NUUTINEN, 2013). Contudo, o receptor H3, juntamente com o receptor H4, foram excluídos deste estudo, o primeiro por ser um autorregulador da secreção histaminérgica e o segundo por ser ainda muito pouco estudado e menos presente no SNC.

A **figura 3** expõem as principais vias de sinalização intracelular de cada um dos principais subtipos de receptores histaminérgicos (HAAS & PANULA, 2003). Somando-se aos seus efeitos diretos a histamina pode também, regular a atividade cortical estimulando neurônios colinérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos (WESTERINK B. H. *et al.*, 2002; STRECKER R. E. *et al.*, 2002).



**Figura 3: 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. A ativação do receptor H1, ativa a enzima chamada fosfolipase C via proteína G estimulatória, que atua na formação dos segundos mensageiros 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG) resultando no aumento dos níveis de cálcio intracelular. Dessa forma, reduz o bloqueio dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) pelo Mg<sup>2+</sup>, por meio da ação da proteína cinase C (PKC), facilitando a ativação deste receptor. A ativação do receptor H2 ativa a enzima adenilato ciclase via acoplamento da proteína G estimulatória, induzindo o aumento do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que por sua vez estimula a proteína cinase A (PKA) resultando na transcrição de genes e tradução do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) em proteínas. A ativação do receptor H3 gera a inibição da ativação da adenilato ciclase e conseqüentemente a redução da formação do segundo mensageiro AMPc. Fonte: Haas & Panula, 2003.

#### 1.2.4 Efeitos do Sistema Histaminérgico na Memória

Como descrito previamente, a neurotransmissão histaminérgica possui uma ampla distribuição no SNC, e está envolvida em várias funções cerebrais, dentre elas atuando na aprendizagem e memória (HAAS e PANULA, 2003). Entretanto, a secreção de histamina pelo núcleo túbero mamilar varia conforme o estado

comportamental momentâneo, exercendo um papel pro-cognitivo e estando relacionado ao comportamento de atenção e ciclo sono vigília (MOCHIZUKI *et al.*, 1991; PARMENTIER R. *et al.*, 2002;). Além disso, esta influência do sistema histaminérgico na modulação da aprendizagem e memória vem ganhando muito destaque, sendo alvo de diversos estudos através de intervenções farmacológicas ou lesões do nTM (NETTO e IZQUIERDO, 1985; KLAPDOR, HASENOHRL e HUSTON 1994) e de outras estruturas encefálicas como amígdala, hipocampo e cerebelo (DA SILVA, 2006; ALVAREZ, 2002; ALVAREZ e ALVAREZ, 2008; PASSANI *et al.*, 2011; SERAFIM *et al.*, 2010, 2012 e 2013; GIANLORENCO *et al.*, 2014; CANTO-DE-SOUZA *et al.*, 2015).

Alguns outros estudos já demonstraram que a histamina modula a formação de alguns tipos de memória, como por exemplo, na reversão do déficit cognitivo na consolidação da memória, induzido em ratos pela privação materna (BENETTI *et al.*, 2011), e quando infundida na amígdala basolateral melhora a consolidação de memória de esquivas inibitórias (BENETTI *et al.*, 2014). Um estudo demonstrou que antagonistas histaminérgicos para receptores tipos H1 e H2, e agonista H3, quando infundidas na região CA1 do hipocampo prejudicaram a consolidação de memória de reconhecimento de objetos (DA SILVEIRA *et al.*, 2013). Entretanto os mecanismos de reconsolidação da memória discriminativa envolvendo o sistema histaminérgico ainda são pouco estudados.

## **2 HIPÓTESE**

Observando a importância do sistema histaminérgico para a memória relacionada ao medo nos animais, e da ampla participação da histamina via receptores H1 e H2 na consolidação de diversos outros tipos de memória, hipotetizamos que a histamina e seus análogos quando infundidos na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos exercerá atividade modulatória sobre a memória discriminativa.

### 3 OBJETIVOS GERAIS

Estudar o papel do sistema histaminérgico na reconsolidação da memória discriminativa e quais receptores na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos podem estar envolvidos no armazenamento deste tipo de memória.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a histamina exerce um papel modulatório na reconsolidação da memória discriminativa na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos.
- Verificar se o SKF 91488 apresenta um efeito modulatório na reconsolidação da memória de em ratos.
- Verificar a participação dos receptores H1 e H2 com o uso dos agonistas histaminérgicos Piridiletiletanolamina (PEA) e Dimaprit e dos antagonistas histaminérgicos Pirlamina e Ranitidina na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos.

### 4 MATERIAS E MÉTODOS

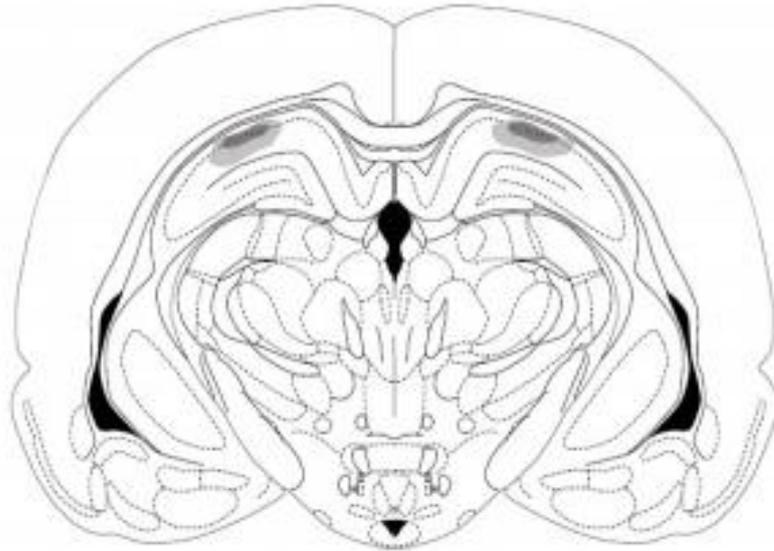
#### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foi utilizada uma amostra de 153 ratos Wistar machos oriundos do (CREAL/UFRGS) com três meses de idade e/ou pesando em média 300g. Os animais foram mantidos em caixas moradias (dimensões: 50 x 40 x 23 cm) de acrílico com tampa em forma de grade de metal (inox). Cada caixa continha um número máximo de 3 animais por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de  $\pm 21^{\circ}\text{C}$ ), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida a vontade. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication Nº 85-23, revised, 1996) e de acordo com a Lei de Procedimentos para o uso científico de animais – Lei n. 11.794 (CONCEA, 2008) e da portaria Número 1.332, de 3 de dezembro de 2014 (publicada no Diário Oficial da União, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Gabinete do Ministro - cito endereço eletrônico para consulta:

[http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0235/235860.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0235/235860.pdf)). Todos os animais foram transferidos por equipe técnica responsável do (CREAL/UFRGS) e mantidos no biotério setorial do Instituto de Ciência Básicas da Saúde (ICBS) até possuírem 90 dias de vida e em torno de 300g. Após este período os animais passaram pelo procedimento cirúrgico estereotáxico, para a colocação das cânulas em região CA1 no hipocampo dorsal, para posterior administração das drogas histaminérgicas ou salina. Os animais permaneceram vivos por cerca de 30 dias a contar do início dos experimentos.

#### 4.2 CIRURGIAS ESTEREOTÁXICAS

Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) pH = 5.5 e ketamina (100 mg/kg) pH entre 3.5 e 5.0 (Fish et al, 1997) via intraperitoneal em solução com volume de 1ml/kg do peso corporal. A cirurgia consiste em varias etapas, a começar pela fixação do animal no aparelho de estereotaxia (Fig. 5), em seguida, uma incisão remove uma porção aproximada de 1 cm da pele na região dorsal do crânio. Com o auxílio de uma tesoura o experimentador expõe a calota craniana. Após a completa remoção de tecido, o osso exposto permite visualizar o bregma (área de encontro entre a sutura sagital e coronal) que serve como ponto de referência para medir as coordenadas onde cânulas foram implantadas bilateralmente. As cânulas-guia de calibre 27 de 0.9 mm foram posicionadas 1.0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (região alvo na infusão de fármacos), de acordo com as coordenadas obtidas do Atlas “the rat brain in stereotaxic coordinates” sendo elas as seguintes: Antero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) =  $\pm$  3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 1,8 mm; Inclinação Latero Lateral (INCL LL) = 0° (Fig. 4). Todas as coordenadas são em relação ao Bregma (Paxinos G, and Watson C, 1986).



**Figura 4: Ilustração do encéfalo de rato** - A ilustração mostra a localização da implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. Fonte: Atlas de Paxinos e Watson, 1986.

Após o término do implante das cânulas, foi confeccionado um capacete com a utilização de dois parafusos, fixados no crânio, e cimento acrílico, para que não houvesse ocorrido o deslocamento das mesmas. Antes dos ratos acordarem foi aplicada uma injeção intraperitoneal de cloridrato de tramadol com intervalo entre aplicações de 12/12 horas por 72 horas após a cirurgia, na dose mínima de 5mg/Kg (<http://chemicaland21.com/lifescience/phar/TRAMADOL%20HCl.htm>). Entretanto, neste procedimento experimental de cirurgia o grau de severidade é moderado. O experimentador foi previamente treinado, porém mesmo com experiência no procedimento cirúrgico previu-se uma perda de animais em torno de 3 a 5% do total dos grupos experimentais, isso equivale a um número entre 10 a 22 animais do total que foi solicitado para o Creal/UFRGS.



**Figura 5: Aparelho estereotáxico utilizado nas cirurgias para implantação de cânulas.**

No dia seguinte ao procedimento cirúrgico o experimentador iniciou a manipulação diária (4 dias) de cada animal individualmente como pré-requisito para iniciar qualquer procedimento comportamental. Esta manipulação diária foi realizada pelo experimentador responsável, munido de jaleco e luvas, onde os animais foram manuseados gentilmente, sendo tocados, apanhados pelo experimentador e simulando situações de infusão de fármacos, bem como os manuseios necessários para as tarefas comportamentais. De maneira geral, esta manipulação consiste em habituar o rato ao experimentador por várias vezes ao longo de três a cinco minutos durante quatro dias. Neste procedimento experimental de manipulação o grau de severidade é leve.

#### 4.3 DROGAS

As drogas foram adquiridas da Sigma - Aldrich (EUA), Tocris Cookson Ltd (UK). Os fármacos foram dissolvidos em DMSO 1% (Dimaprit, Piridiletetanolamina) ou solução salina (Histamina, SKF 91488, Pirlamina, ranitidina) em soluções mães e

fracionadas em alíquotas de no máximo 1ml soluções de trabalho em concentrações de 100mM e armazenadas a temperatura de -20°C. Antes de usar as dosagens foram diluídas para a concentração ideal para o trabalho e foram infundidas com à temperatura ambiente com pH 7,2, utilizando uma seringa Hamilton com volume 10µl em escala 1:1. As doses utilizadas (vide item 4.4.1) foram baseadas em experiências-piloto (DA SILVA et al, 2006) e em estudos que mostram seu efeito sobre as variáveis comportamentais e fisiológicas (ÁLVAREZ & RUARTE, 2002; BENETTI et al, 2009; 2012; 2014; 2015).

#### 4.4 PARADIGMAS DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Os roedores quando colocados à frente de objetos familiares e novos, apresentam uma tendência a dispor de um tempo maior para explorar o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos (RO) (A. ENNACEUR E DELACOUR, 1988), que vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (ROBINSON et al, 2014). O instrumento para estudar memória de RO consistiu em um campo aberto retangular (dimensões: 60 cm x 40 cm x 50 cm), que se encontrava em uma sala com luminosidade regulada (40 lux) e isolada acusticamente. A parte frontal do campo aberto era construída de vidro, transparente, para a melhor observação do animal. Antes de serem submetidos à tarefa de RO, os animais foram submetidos individualmente a um processo de habituação ao campo aberto que teve duração de quatro dias com 20min de habituação diária, com livre atividade exploratória (BENETTI et al 2009, 2012, 2013, 2014, 2015) (KELLY et al, 2003). Os objetos-estímulo que foram utilizados na tarefa de reconhecimento eram confeccionados em metal, vidro ou plástico, suas dimensões eram menores que um cubo de 10 cm (altura x comprimento) (ENNACEUR, 1988); (ROSSATO et al, 2007). Nenhum dos objetos possuía significância comportamental para os animais experimentais. Cada objeto foi fixado ao assoalho do campo aberto pela base. As arenas do campo aberto assim como os objetos-estímulo foram limpas com uma solução de etanol a 70 % entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas. A exploração foi definida como cheirar ou tocar os objetos de estímulo com o focinho ou as patas dianteiras.

Sentar-se no objeto ou permanecer ao redor dele não foi considerado comportamento exploratório. O tempo empregado explorando cada objeto foi medido por um observador. Os resultados foram expressos como percentagem do tempo total de exploração de cada um dos objetos apresentados. Neste procedimento experimental, o grau de severidade é leve.

#### 4.4.1 Protocolo de reconsolidação da memória discriminativa em RO

No dia 1 (fase aquisição das informações - aprendizado), os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (A e B) por 5 min. Vinte e quatro horas mais tarde (fase de reativação), um dos objetos foi trocado de forma aleatória para um novo (um objeto C), e os ratos foram colocados novamente no campo aberto para 5 minutos. Imediatamente após a fase de reativação, os animais receberam infusões intra-CA1 bilaterais (1 $\mu$ l) de salina ou Histamina 10mM/ $\mu$ l (n= 74). A partir daí os animais foram separados em grupos. Cada grupo foi testado separadamente em dias distintos. Nos tempos de 3, 7 e 10 dias após a reativação cada grupo de animais foi testado, desta vez substituindo o objeto (C) por um novo (D), e submetidos a 5 minutos de exploração no campo aberto. Por sabermos que o tempo de ação mais longo da histamina foi 7 dias, optamos por usar este intervalo de tempo nos testes com o SKF 91488, e os agonistas e antagonistas histaminérgicos. O SKF 91488 50mM/ $\mu$ l, os agonistas Piridiletiletanolamina (PEA) e Dimaprit nas doses de 10mM/ $\mu$ l ou antagonistas Pirilamina e Ranitidina nas doses de 50mM/ $\mu$ l, foram divididos em grupos distintos conforme sua respectiva infusão e foram somente testados quanto a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos no tempo de 7 dias após a reativação. Baseado nestas informações nossos quatro grupos experimentais estão descritos abaixo:

- **Grupo 01 (n= 20):** Imediatamente após a sessão de reativação os animais foram infundidos com salina (n=12), histamina (n=8), Três dias após a sessão de reativação os animais foram reportados a sala de teste e tiveram a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos avaliada durante 5 minutos.

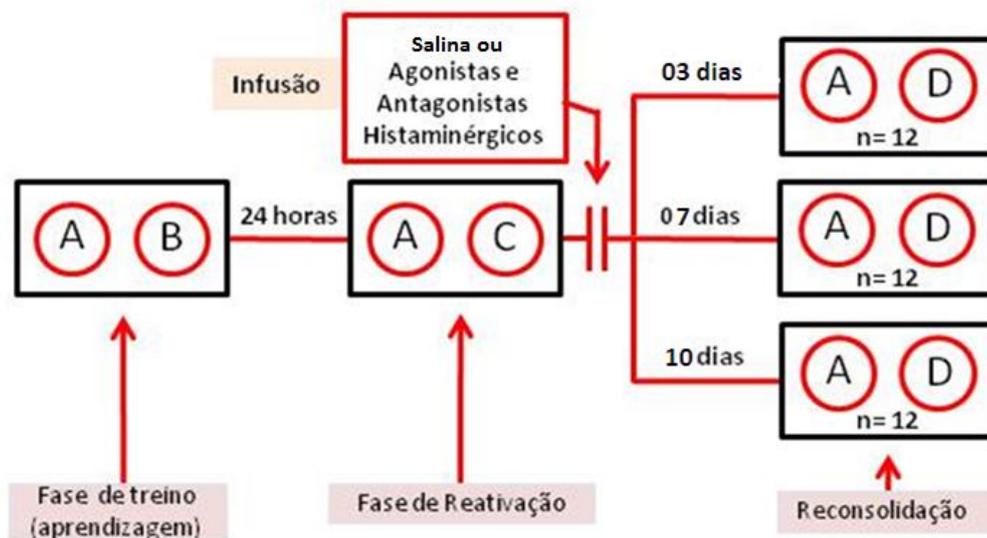
- **Grupo 2 (n= 35):** Imediatamente após a sessão de reativação os animais foram infundidos com salina (n=17), histamina (n=18), Sete dias após a sessão de reativação os animais foram reportados a sala de teste e terão a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos avaliada durante 5 minutos.

- **Grupo 3 (n= 19):** Imediatamente após a sessão de reativação os animais foram infundidos com salina (n=9), histamina (n=10), e devolvidos a sua caixa residência. Dez dias após a sessão de reativação os animais foram reportados a sala de teste e terão a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos avaliada durante 5 minutos.

Após a definição da duração da manutenção da memória de reconhecimento de objetos com a infusão da histamina, ocorreram os testes com o SKF 91488, e os agonistas e antagonistas histaminérgicos.

- **Grupo 4 (n= 79):** Imediatamente após a sessão de reativação os animais foram infundidos com salina (n=26), histamina (n=8) SKF 91488 (n=8), PEA (n=10), Dimaprit (n=11), Pirilamina + histamina (n=8), Ranitidina + Histamina (n=8) e devolvidos a sua caixa residência. Sete dias após a sessão de reativação os animais foram reportados a sala de teste e terão a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos avaliada durante 5 minutos.

#### 4.5 DESENHO DO ESTUDO



**Figura 6: Organograma exemplificando os experimentos comportamentais** - Primeiramente todos os animais foram submetidos a uma fase de treino (A + B; n= 153), 24 horas após estes animais foram expostos a uma fase reativação com um dos objetos diferentes (A + C; n=153) e imediatamente após a sessão de reativação foram infundidos com salina, histamina, SKF91488, agonistas ou antagonistas histaminérgicos (nas doses descritas anteriormente) e com volume de 1µl/bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos. Após a reativação os animais foram divididos em 4 grupos para melhor avaliar a persistência deste tipo de memória. Os grupos salina e histamina foram testados nos três tempos, 3, 7 ou 10 dias, para avaliar a persistência da memória. Após a definição do tempo de manutenção da memória discriminativa em RO com o uso da histamina o SKF91488, os agonistas e os antagonistas histaminérgicos foram testados apenas no tempo de 7 dias.

##### 4.5.1 DESCARTE DE MATERIAIS E RESÍDUOS

Os tecidos oriundos dos animais, assim como suas carcaças e outros resíduos como materiais contaminados e luvas, foram depositados em sacolas brancas para transporte de material infectante. Os materiais perfuro cortantes foram descartados em caixas de papelão amarelo, específicas para esse tipo de resíduo (Descarpack®), e identificadas como material infectante. O lixo biológico e materiais perfuro cortantes foram recolhidos pela empresa terceirizada responsável pelo recolhimento da UFRGS. Resíduos químicos e vidrarias contaminadas foram encaminhadas ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos, no Instituto de Química da UFRGS.

#### **4.5.2 MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA**

Foram aplicadas todas as Normas de Segurança e Procedimentos de Boas Práticas de Laboratório, assim como todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “Principles of laboratory animal care” (NIH publication Nº 85-23, revised 1996). Foram utilizadas luvas de látex e jalecos para o trabalho em bancada. Todas as medidas de proteção aos pesquisadores foram asseguradas, inclusive medidas de proteção a fim de evitar contato cutâneo com os reagentes utilizados.

#### **4.6 ASPECTOS ÉTICOS**

Posteriormente à aprovação pela Comissão de Pesquisa da UFRGS, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética para Uso de Animais da UFRGS. Apenas após a apreciação e aprovação do CEUA, o presente estudo foi executado.

#### **4.7 EUTANÁSIA**

A eutanásia dos animais utilizados em todos os experimentos foi realizada por decapitação. A decapitação foi realizada por um experimentador experiente em uma sala limpa, silenciosa e separada dos outros animais. Um animal por vez foi levado à sala de decapitação, evitando o estresse dos demais animais. Cada grupo de animais foi decapitado imediatamente após o término de todo o protocolo experimental.

### **5 CALCULO AMOSTRAL**

O número de animais empregados para os protocolos experimentais que compreendem este estudo foram escolhido considerando estudos prévios da literatura que utilizam a administração de drogas e realizam estes testes comportamentais, sendo estimado entre 8 e 16 animais por grupo experimental (IZQUIERDO et al, 1986; IZQUIERDO E MEDINA 1996; BLANDINA et al, 1996; AISA et al, 2008, 2009, BLANDINA et al, 2006; BENETTI et al, 2009; 2012, 2013a,

2013b, FIORENZA et al, 2012; MACGAUGH, 2004, 2006; MELLO et al., 2009; BENETTI e IZQUIERDO, 2013).

## 6 ESTATÍSTICA

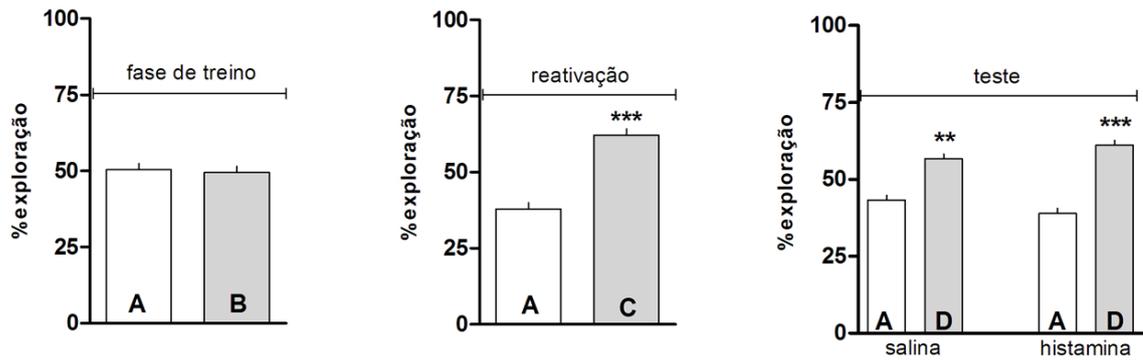
Para a análise estatística desta pesquisa proposta, foi utilizado o programa Excel for Windows® e Prism version 5 (GraphPad Software®, San Diego, CA). Os dados foram apresentados em médias  $\pm$  Erro Padrão e analisados por Teste t-Student, seguido de pós-teste de Tukey para um  $P < 0,05$ . O nível de significância considerado em todas as análises será de  $P < 0,05$ . \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$  no teste t-Student onde a média de cada coluna representa a diferença significativa de um valor hipotético (acima ou abaixo de 50% do percentual de exploração para cada objeto).

## 7 RESULTADOS

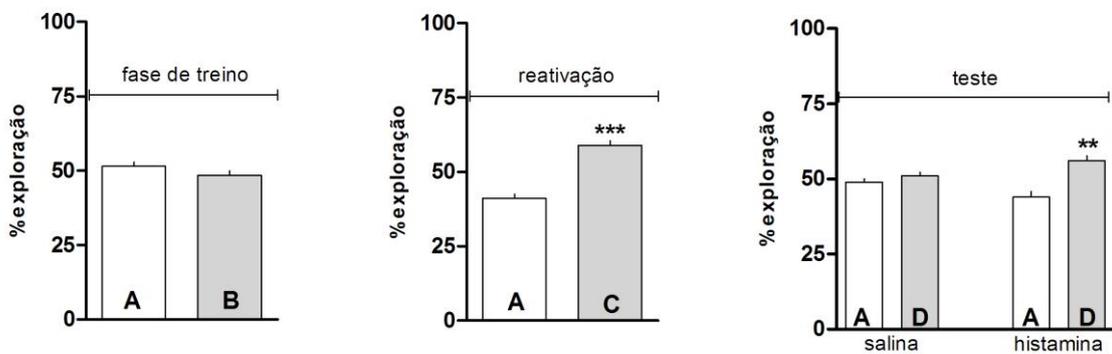
### 7.1 EFEITOS DA HISTAMINA COMO UM NEUROTRANSMISSOR PRÓ-MNÉSICO

Buscando verificar o papel dos receptores histaminérgicos na reconsolidação da memória discriminativa em RO, foi estabelecida uma linha temporal para determinar se, e por quanto tempo este sistema poderia estar envolvido no processo de reconsolidação. Como descrito anteriormente foi realizado o teste da reconsolidação da memória discriminativa em RO para cada grupo experimental de ratos infundidos com histamina ou salina, no tempo de 3, 7 ou 10 dias.

Nossos dados mostraram que os animais testados 3 dias após a infusão, tanto o grupo salina ( $56.69 \pm 4,651$ ) quanto histamina ( $61.10 \pm 4,712$ ) exploraram mais o objeto novo D em relação ao objeto familiar A (Fig. 7). Já nos animais testados no prazo de 7 dias após a reativação o grupo tratado com histamina ( $55.96 \pm 7,022$ ) explorou mais o objeto D em relação ao objeto familiar A, comparados ao grupo salina ( $39.40 \pm 4,845$ )  $P < 0,05$  (Fig. 8) sugerindo um papel na manutenção deste tipo de memória (efeito pró-mnésico). Nos animais testados 10 dias após a reativação não houve mais diferença estatística na taxa exploratória entre os grupos  $P > 0,05$  (Fig. 9).

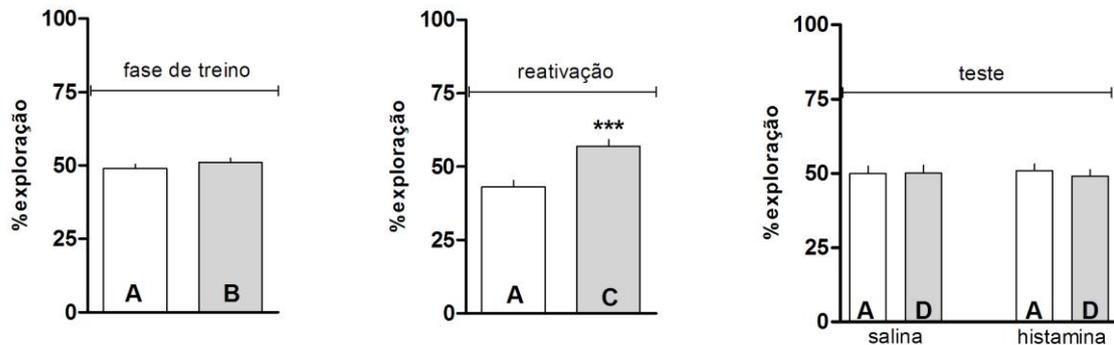


**Figura 7: Efeitos da histamina 3 dias após a infusão** - A histamina infundida na região CA1 do hipocampo de ratos imediatamente após a reativação mantém a memória discriminativa no RO em ratos testados 3 horas após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B (A+B; n=20) na qual o animal poderia explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas depois, os animais foram expostos a uma fase de reativação que consistia em substituir um objeto familiar por um terceiro objeto novo, o objeto C (A+C; n =20). Imediatamente após a sessão de reativação foi infundida uma dose de 10 mM de histamina (n=8) e salina (n=12) bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal dos ratos. Três dias após, os animais foram testados no campo aberto, substituindo o objeto C, por um novo objeto D. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para  $P < 0,05$  de significância. \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$  no teste t-Student.



**Figura 8: Efeitos da histamina como um neurotransmissor pró-mnésico 7 dias após a infusão.** A histamina infundida na região CA1 do hipocampo de ratos imediatamente após a reativação mantém a memória discriminativa no RO em ratos testados 7 dias após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B (A+B; n=35) na qual o animal poderia explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos a uma fase de reativação que consistia em substituir um objeto familiar por um terceiro objeto novo, o objeto C (A+C; n =35). Imediatamente após a sessão de reativação foi infundida uma dose de 10 mM de histamina (n= 18) e salina (n=17) bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal dos ratos. Após a sessão da reativação e da infusão da salina ou histamina, os animais retornavam para a caixa moradia e para a rotina do biotério. Sete dias após, os animais foram testados no campo aberto, substituindo o objeto C, por um novo objeto D. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média da

porcentagem de tempo total de exploração para  $P < 0,05$  de significância. \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$  no teste t-Student.

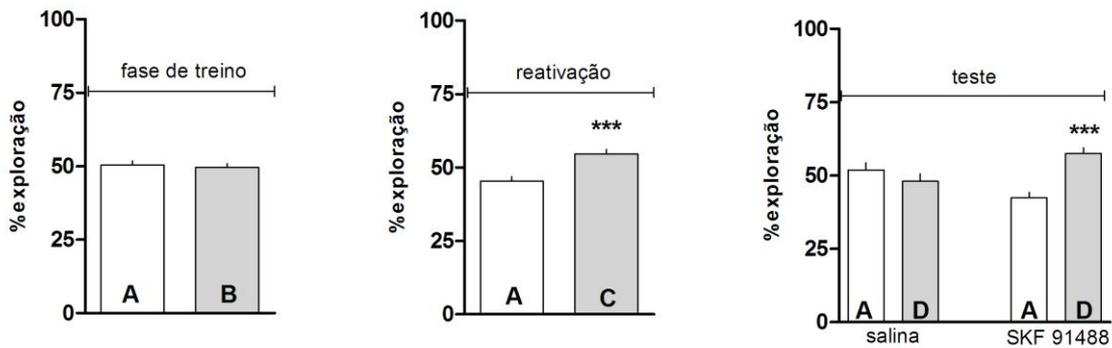


**Figura 9: Efeitos da histamina 10 dias após a infusão** - A histamina infundida na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a reativação não mantém a memória discriminativa no RO em ratos testados 10 dias após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B (A+B; n=19) na qual o animal poderia explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos a uma fase de reativação que consistia em substituir um objeto familiar por um terceiro objeto novo, o objeto C (A+C; n =19). Imediatamente após a sessão de reativação foi infundida uma dose de 10 mM de histamina (n= 10) e salina (n= 9) bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal dos ratos. Após a sessão da reativação e da infusão da salina ou histamina, os animais retornavam para a caixa moradia e para a rotina do biotério. Dez dias após, os animais foram testados no campo aberto, substituindo o objeto C, por um novo objeto D. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para  $P < 0,05$  de significância. \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$  no teste t-Student.

## 7.2 EFEITO DA HISTAMINA ENDÓGENA NA MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA DISCRIMINATIVA EM RO 7 DIAS APÓS A INFUSÃO

Após nossos resultados sugerirem uma ação da histamina no período de 7 dias após a reativação da memória discriminativa na tarefa de RO, utilizamos este tempo para os testes envolvendo o SKF 91488, os agonistas e antagonistas.

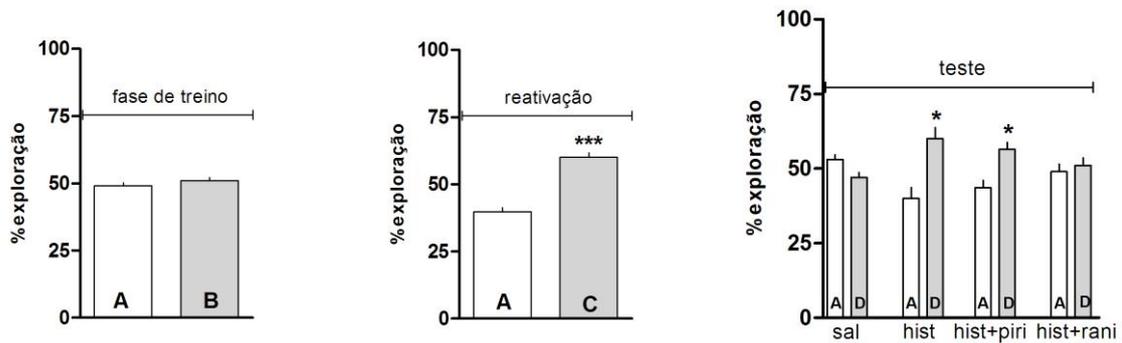
Dessa forma, a fim de analisar o efeito da administração de SKF 91488 imediatamente após a etapa de reativação sobre a modulação na reconsolidação da memória discriminativa, os animais foram testados 7 dias após a etapa de reativação no campo aberto, com a substituição do objeto familiar C para um novo objeto D. O SKF 91488 mostrou que o aumento da histamina endógena induz a melhora do desempenho na tarefa de RO quando testados 7 dias ( $57.60 \pm 5.210$ ) comparado ao salina ( $48.09 \pm 7.582$ ) para  $P < 0,001$  (Fig. 10).



**Figura 10: Efeito da histamina endógena na manutenção da memória discriminativa 7 dias após a infusão** - O SKF-91488 infundido na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a reativação mantém a memória discriminativa no RO em ratos testados 7 dias após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B (A+B; n= 17) na qual o animal poderia explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos a uma fase de reativação que consistia em substituir um objeto familiar por um terceiro objeto novo, o objeto C (A+C; n =17). Imediatamente após a sessão de reativação foi infundida uma dose de 50 mM de SKF 91488 (n=8) e salina (n= 9) bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal dos ratos. Após a sessão da reativação e da infusão da salina ou histamina, os animais retornavam para a caixa moradia e para a rotina do biotério. Sete dias após, os animais foram testados no campo aberto substituindo o objeto C, por um novo objeto D. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para  $P < 0,05$  de significância. \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$  no teste t-Student.

### 7.3 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H1 E H2 COM O USO DE ANTAGONISTAS HISTAMINÉRGICOS 7 DIAS APÓS A INFUSÃO

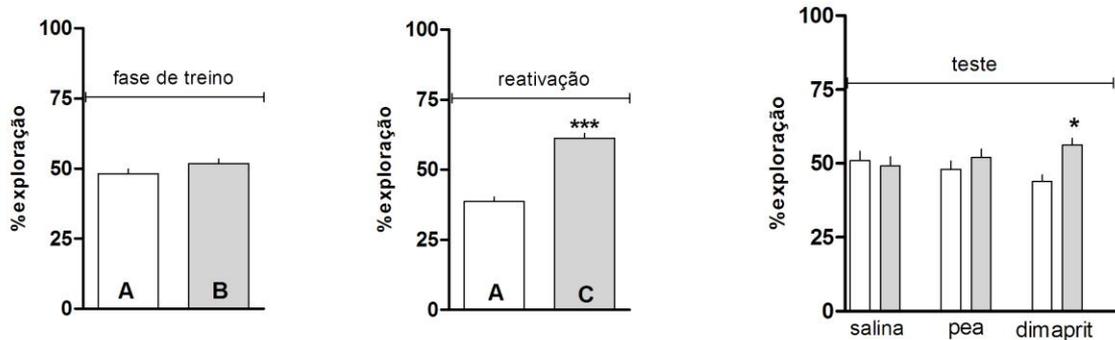
Para verificar a participação dos receptores H1 e H2 com o uso de antagonistas histaminérgicos, foi realizada co-infusões dos antagonistas + histamina imediatamente após a reativação na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos. Estes grupos assim como no experimento anterior foram testados no período de 7 dias após a reativação, pela prévia observação dos resultados com a histamina. Os animais que receberam Pirilamina + histamina ( $56.41 \pm 6.694$ ) e histamina ( $60.04 \pm 10.16$ ) lembraram-se do objeto familiar comparado a os animais que receberam Ranitidina + histamina ( $51.06 \pm 7.238$ ) e a salina ( $47.04 \pm 4.718$ ) onde não houve diferença estatística na latência de exploração para o período de sete dias após a reativação, com significância de  $P < 0,05$ .



**Figura 11: Participação dos receptores H1 e H2 com o uso de antagonistas histaminérgicos 7 dias após a infusão** - O antagonista-H2 ranitidina infundido na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a reativação bloqueou a memória do reconhecimento de objetos em ratos testados 7 dias após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B (A+B; n=32) na qual o animal poderia explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos a uma fase de reativação que consistia em substituir um objeto familiar por um terceiro objeto novo, o objeto C (A+C; n =32). Imediatamente após a sessão de reativação foi infundida uma dose de 10 mM de histamina (n= 8), 50 mM do antagonista-H1 pirilamina + histamina (n= 8), 50 mM do antagonista-H2 ranitidina + histamina (n= 8) e salina (n= 8) bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal dos ratos. Após a sessão da reativação e da infusão da salina ou agonistas, os animais retornavam para a caixa moradia e para a rotina do biotério. Sete dias após, os animais foram testados no campo aberto substituindo o objeto C, por um novo objeto D. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para  $P < 0,05$  de significância. \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$  no teste t-Student.

#### 7.4 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H1 E H2 COM O USO DE AGONISTAS HISTAMINÉRGICOS 7 DIAS APÓS A INFUSÃO

Visando revelar a participação dos receptores H1 e H2, foi realizada a infusão dos agonistas histaminérgicos imediatamente após a sessão de reativação na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos. Como no experimento anterior estes animais foram testados no tempo de 7 dias, por ser o intervalo onde a memória se manteve com a infusão da histamina. O agonista H2 Dimaprit ( $56.14 \pm 7.425$ ) melhorou a memória de RO comparado à salina ( $49.04 \pm 9,309$ )  $P < 0,05$ . O mesmo não ocorreu com o agonista H1 Piridiletiletanolamina ( $52.93 \pm 8.946$ ) e o grupo salina ( $49.04 \pm 9,309$ ).



**Figura 12: Participação dos receptores H1 e H2 com o uso de agonistas histaminérgicos 7 dias após a infusão** - O agonista-H2 dimaprit infundido na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a reativação mantém a memória discriminativa no RO em ratos testados 7 dias após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B (A+B; n=30) na qual o animal poderia explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos a uma fase de reativação que consistia em substituir um objeto familiar por um terceiro objeto novo, o objeto C (A+C; n =30). Imediatamente após a sessão de reativação foi infundida uma dose de 10 mM do agonista H1-pea (n= 10), 10 mM do agonista-H2 dimaprit (n= 11) e salina (n= 9) bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal dos ratos. Após a sessão da reativação e da infusão da salina ou agonistas, os animais retornavam para a caixa moradia e para a rotina do biotério. Sete dias após, os animais foram testados no campo aberto substituindo o objeto C, por um novo objeto D. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para  $P < 0,05$  de significância. \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$  no teste t-Student.

## 8 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que a histamina infundida na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a sessão de reativação aumenta a memória de discriminativa na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos testados em até 7 dias após a sessão de reativação, via receptor H2. Ao longo dos experimentos, os animais que receberam histamina, SKF 91488 e o agonista H2 dimaprit, demonstraram reconhecer o objeto original frente ao objeto novo por até 7 dias, enquanto que, nos animais que receberam histamina + ranitidina foi bloqueado o processo de reconsolidação demonstrando a importância do receptor histaminérgico do tipo H2 visto que as infusões da histamina + ranitidina foram realizadas imediatamente após a sessão de reativação. Sabendo do papel da histamina em uma ampla variedade de publicações presentes na literatura abordam o papel deste sistema nos processos de consolidação de memórias, principalmente a aversiva, nossos resultados

investigaram os mesmos receptores, nas mesmas áreas conhecidas, mas agora com a reconsolidação.

A histamina no SNC, secretada pelas terminações nervosas do nTM do hipotálamo, tem sido associada ao estado de estímulo e excitação, despertar e manutenção do ciclo sono-vigília (LIN, 2000). Segundo Blandina (2009) a histamina é fundamental na promoção de um estado receptivo a estímulos excitatórios. Dessa forma, como um neurotransmissor pró cognitivo podemos também supor seu papel na modulação dos processos neurofisiológicos da formação de memória, como a memória discriminativa. Alguns estudos já demonstraram o papel da histamina em processos mnemônicos, principalmente de memórias do tipo aversiva, ou mesmo na extinção destas memórias (BONINI et al. 2011), seja melhorando o traço mnemônico, ou facilitando a extinção dos processos de memória no córtex pré-frontal e no hipocampo via receptores H1 e H2 (DAI et al., 2007; PASSANI et al, 2017). Outro estudo praticamente pioneiro mostrou que a histamina melhora a consolidação da memória aversiva na tarefa de esquiva inibitória, induzida pelo SKF-91488, e mimetizada pelo agonista H2 dimaprit, e bloqueada pelo antagonista H2 ranitidina, apontando para um efeito pró-mnésico via receptores H2. (DA SILVA et al., 2006). Nesse sentido, nossos dados também apontam para uma participação dos receptores H2 na reconsolidação onde animais que receberam o agonista H2 dimaprit apresentaram uma persistência da memória discriminativa, ao passo que os animais que receberam histamina + ranitidina, não demonstraram diferença exploratória entre os objetos novo e familiar. No entanto, nos dados dos estudos citados acima estão envolvidos com memória de medo e não discriminativa. Outro ponto a ser considerado é que nosso estudo utiliza um protocolo de reconsolidação e não consolidação. No estudo de DA SILVEIRA (2013), também com memória discriminativa, foi revelado que a infusão do antagonista H2 prejudica a consolidação de memórias de RO, sugerindo que este tipo de memória necessita da participação de receptores H2. Entretanto, baseando-se em nossos recursos de busca até aqui, não há na literatura experimentos que tenham utilizado a histamina e seus análogos (agonista e antagonistas) na reconsolidação da memória discriminativa de objetos.

Embora nosso estudo mostre uma curva de dose-resposta análoga aquela também descrita por Da Silva (2006) na qual a dose efeito se equiparam tanto para a infusão da histamina, quanto seus análogos. Decidimos estudar este sistema baseando-se nestas doses farmacológicas. A figura 3 nos mostra as vias clássicas

de eventos intracelulares que são ativadas quando a histamina liga-se a seus receptores específicos. Uma vez conhecida a ação de cada um dos receptores histaminérgicos H1 e H2, estudados aqui na memória discriminativa em RO, podemos sugerir que na reconsolidação provavelmente o processo de ativação via PKC e o aumento do cálcio intracelular tem seu papel, porém farmacologicamente estudados aqui, sugerimos que não mais importante que o aumento da atividade da PKA e conseqüentemente a ativação de toda esta via crucial. Sugerimos este mecanismo, tendo em vista que a ligação da histamina ao receptor H2 induz a ativação da PKA e conseqüentemente esta por sua vez, ativa toda a cascata intracelular para aumentar a fosforilação de CREB, principal marcador de atividade mnemônica (PASSANI M.B. & BLANDINA P., 2011; BITNER, 2012; PANULA E NUUTINEN, 2013; BENETTI *et al.* 2015; ETTCHETO *et al.*, 2017; PASSANI *et al.*, 2017), que por sua vez pode nos fornecer evidências contundentes da ação da histamina como neurotransmissor participante da modulação da reconsolidação da memória discriminativa em RO. Os resultados obtidos com o SKF 91488 respaldaram os resultados comportamentais obtidos com a histamina e corroboram com os resultados de DA Silva (2006) do efeito importante que o aumento da histamina endógena pode exercer nos processos mnemônicos, e aqui respaldando o efeito da histamina na memória discriminativa de objetos. Dados estes que suportam o papel do receptor histaminérgico tipo 2 (H2) visto que o agonista Dimaprit uma vez infundido ao ligar-se a estes receptores mostraram em nossos resultados (fig.11) que os animais discriminam o objeto novo do familiar por até 7 dias.

Baseado nos resultados desta dissertação, e para elucidar esta especulação nosso laboratório já está realizando as coletas de hipocampus e cortex pre-frontal com o objetivo futuro de analisar os dados bioquímicos e moleculares da ação histaminérgica pós-reativação, para verificar a fosforilação de CREB (Fig.3), na região CA1 do hipocampo, mas a priori esta dissertação foi até o estudo farmacológico e comportamental. É sabida na literatura a importância dos receptores H3 no sistema histaminérgico, porém por uma questão cronológica (duração de dois anos de mestrado) este receptor foi excluído deste estudo, mas não do estudo global do projeto, que por hora o entendimento de se tratar de um auto receptor da secreção histaminérgica e inferir em características próprias de ações mnemônicas, outro estudo somente com este receptor merece ser dada atenção específica.

Os resultados obtidos neste estudo embora comportamentais e farmacológicos, nos permitem sugerir que há uma ação do sistema histaminérgico nos processos de reconsolidação de memórias discriminativas. Através dos nossos resultados demonstramos a importante ação modulatório que o sistema histaminérgico também exerce sobre o processo de reconsolidação da memória discriminativa.

Portanto, A histamina quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a sessão de reativação, manteve a memória discriminativa em RO por até 7 dias. Da mesma forma, o SKF 91488 quando infundido na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a sessão de reativação manteve a memória discriminativa em RO por até 7 dias.

O agonista seletivo H1 Piridiletiletanolamina quando infundido na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a sessão de reativação não parece exercer efeito na memória de RO por até 7 dias na dose estudada. Já o agonista seletivo H2 dimaprit quando infundido na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a sessão de reativação manteve a memória discriminativa em RO por até 7 dias.

Os animais que receberam a co-infusão de histamina com o antagonista H1 pirilamina obtiveram um desempenho mnemônico melhor em RO, quando comparado a os animais que receberam a co-infusão do antagonista H2 ranitidina com a histamina e ao grupo controle. Com isto, conclui-se que a histamina via receptores H2 promove o aumento da manutenção da memória de RO, por até 7 dias.

## **9 CONCLUSÃO**

De acordo com os dados obtidos nesta dissertação, podemos dizer que a região CA1 do hipocampo dorsal de ratos quando ativada sob efeitos da infusão da histamina e seus análogos imediatamente após a sessão de reativação, modulam os processos de reconsolidação da memória discriminativa via receptores histaminérgicos do tipo II (H2) nas doses estudadas.

## REFERÊNCIAS

AGREN, Thomas et al. Disruption of reconsolidation erases a fear memory trace in the human amygdala. **Science**, v. 337, n. 6101, p. 1550-1552, 2012

ALVAREZ, Edgardo O.; RUARTE, Marcela B. Histaminergic neurons of the ventral hippocampus and the baso-lateral amygdala of the rat: functional interaction on memory and learning mechanisms. **Behavioural brain research**, v. 128, n. 1, p. 81-90, 2002.

ALVAREZ, Edgardo O.; ALVAREZ, Pablo A. Motivated exploratory behaviour in the rat: the role of hippocampus and the histaminergic neurotransmission. **Behavioural brain research**, v. 186, n. 1, p. 118-125, 2008

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** 12, 1113-1117, 1991.

BAKER, Kathryn D.; MCNALLY, Gavan P.; RICHARDSON, Rick. Memory retrieval before or after extinction reduces recovery of fear in adolescent rats. **Learning & Memory**, v. 20, n. 9, p. 467-473, 2013.

BALDERAS, I.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Retrieval and reconsolidation of object recognition memory are independent processes in the perirhinal cortex. **Neuroscience**, v. 253, p. 398-405, 2013.

BALDERAS, I.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, 285, p. 213-222, 2014.

BENETTI, Fernando et al. Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 59-64, 2009.

BENETTI, Fernando et al. Histamine reverses a memory deficit induced in rats by early postnatal maternal deprivation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 97, n. 1, p. 54-58, 2012.

BENETTI, Fernando et al. Histamine acting on the basolateral amygdala reverts the impairment of aversive memory of rats submitted to neonatal maternal deprivation. **Behavioural brain research**, v. 278, p. 83-89, 2015.

BENETTI, Fernando et al. Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201506109, 2015.

BLANDINA, Patrizio et al. Acetylcholine, histamine, and cognition: two sides of the same coin. **Learning & Memory**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2004.

BLANDINA, P.; EFOUDEBE, M.; CENNI, G.; MANNAIONI, P.; PASSANI, M.B. Acetylcholine, Histamine, and Cognition: Two Sides of the Same Coin. **Learning & Memory**, (11): 1-8, 2009.

BITNER, R. Scott. Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation: a mechanistic marker in the development of memory enhancing Alzheimer's disease therapeutics. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 6, p. 705-714, 2012.

BROWN, Ritchie E.; STEVENS, David R.; HAAS, Helmut L. The physiology of brain histamine. **Progress in neurobiology**, v. 63, n. 6, p. 637-672, 2001.

BONINI, Juliana Sartori et al. Histamine facilitates consolidation of fear extinction. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 9, p. 1209-1217, 2011.

BOWER, Mark R. et al. Reactivation of seizure-related changes to interictal spike shape and synchrony during postseizure sleep in patients. **Epilepsia**, v. 58, n. 1, p. 94-104, 2017.

CANTO-DE-SOUZA, L. et al. Dorsal hippocampal microinjection of chlorpheniramine reverses the anxiolytic-like effects of l-histidine and impairs emotional memory in mice. **Neuroscience letters**, v. 587, p. 11-16, 2015.

CONNELLY, W. M. et al. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. **British journal of pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 55-63, 2009.

CORONA, R. *et al.* Exposure to young preferentially activates adult-born neurons in the main olfactory bulb of sheep mothers. **Brain structure and function**, 2016. p. 1

DA SILVA, Weber C. et al. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H<sub>2</sub> receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of learning and memory**, v. 86, n. 1, p. 100-106, 2006.

DA SILVEIRA, Clarice Krás Borges et al. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 103, p. 64-71, 2013.

DAI, H.; KANEKO, K.; KATO, H.; FUJII, S.; JING, Y.; XU, A.; SAKURAI, E.; KATO, M.; OKAMURA, A.; YANAI, K. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. **Neuroscience Research**, (57):306, 2007.

DRINGENBERG, Hans; KUO, Min-Ching. Cholinergic, histaminergic, and noradrenergic regulation of LTP stability and induction threshold: cognitive implications. **Neurotransmitter Interactions and Cognitive Function**, p. 165-183, 2006.

ETTCHETO, Miren et al. Early Preclinical Changes in Hippocampal CREB-Binding Protein Expression in a Mouse Model of Familial Alzheimer's Disease. **Molecular neurobiology**, p. 1-11, 2017.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.

ERICSON, Hans; BLOMQUIST, Anders; KÖHLER, Christer. Brainstem afferents to the tuberomammillary nucleus in the rat brain with special reference to monoaminergic innervation. **Journal of comparative neurology**, v. 281, n. 2, p. 169-192, 1989.

ERICSON, Hans; BLOMQUIST, Anders; KÖHLER, Christer. Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. **Journal of comparative neurology**, v. 311, n. 1, p. 45-64, 1991.

GIANLORENCO, A. C. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. **Brain research bulletin**, v. 86, n. 1, p. 134-138, 2011.

GIANLORENÇO, A. C. L. et al. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H 1 but not H 2 receptors. **Brain research bulletin**, v. 89, n. 5, p. 197-202, 2012.

GORDON, William C. Susceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: a time-dependent phenomenon. **Physiology & behavior**, v. 18, n. 1, p. 95-99, 1977

GRAYSON, Ben et al. Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. **Behavioural brain research**, 2014.

GULAT MARNAY, et al., Modulation of histamine release and synthesis in the brain mediated by alpha 2-adrenoceptors. **Journal of Neurochemistry** 53, 513-518, 1989.

GULAT MARNAY, C. et al. Modulation of histamine release in the rat brain by kappa-opioid receptors. **Journal of Neurochemistry** 55, 248-254, 1990.

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** 52, 248-254, 1989.

HAAS, Helmut.L. Histamine potentiates neuronal excitation by blocking a calciumdependent potassium conductance. **Agents Actions** 14, 534-537, 1984.

HAAS, Helmut; PANULA, Pertti. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 121-130, 2003.

HAAS, Helmut L.; SERGEEVA, Olga A.; SELBACH, Oliver. Histamine in the nervous system. **Physiological reviews**, v. 88, n. 3, p. 1183-1241, 2008.

HILL, S. J. et al. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 3, p. 253-278, 1997.

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** 244, 1021-1026, 1988.

INDA, Maria Carmen; MURAVIEVA, Elizaveta V.; ALBERINI, Cristina M. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 1635-1643, 2011.

IZQUIERDO, Ivan; MEDINA, Jorge 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, n. 3, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I. Memórias. **Estudos avançados**, v. 3, n. 6, p. 89–112, 1989.

JAMES, Ella L. et al. Computer game play reduces intrusive memories of experimental trauma via reconsolidation-update mechanisms. **Psychological science**, v. 26, n. 8, p. 1201-1215, 2015

JOCKWITZ, C. *et al.* Influence of age and cognitive performance on resting-state brain networks of older adults in a population-based cohort. **Cortex**, 2017. v. 9.

KASLIN, Jan; PANULA, Pertti. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 440, n. 4, p. 342-377, 2001.

KELLY, Áine; LAROCHE, Serge; DAVIS, Sabrina. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is

required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 5354-5360, 2003.

KLAPDOR, Karin; HASENÖHRL, Rüdiger U.; HUSTON, Joseph P. Facilitation of learning in adult and aged rats following bilateral lesions of the tuberomammillary nucleus region. **Behavioural brain research**, v. 61, n. 1, p. 113-116, 1994.

LEE, Jonathan LC; NADER, Karim; SCHILLER, Daniela. An Update on Memory Reconsolidation Updating. **Trends in Cognitive Sciences**, 2017

LEWIS, D. J. Psychobiology of active and inactive memory. pp 1054-1083  
LIN, JS. Brain structure and mechanism involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. **Sleep Med. Rev.**, 4: 471-503, 2000.

LINTUNEN, Minnamaija et al. Postnatal expression of H1-receptor mRNA in the rat brain: correlation to l-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 2287-2301, 1998.

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** 11 (10), 3188-3199, 1991.

MCGAUGH, James L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.

MCGAUGH, James L.; CAHILL, Larry; ROOZENDAAL, Benno. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13508-13514, 1996.

MCGAUGH, J. L. Consolidating memories. **Annu. rev. psychol**, v. 66, p. 1–24, 2015.

MISANIN, James R.; MILLER, Ralph R.; LEWIS, Donald J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science**, v. 160, n. 3827, p. 554-555, 1968

MOCHIZUKI, T. et al. In vivo release of neuronal histamine in the hypothalamus of rats measured by microdialysis. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 343, n. 2, p. 190-195, 1991.

MONNIER, M.; SAUER, R.; HATT, A. M. The activating effect of histamine on the central nervous system. **International review of neurobiology**, v. 12, p. 265-305, 1970.

- MORRIS, Richard GM et al. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. **Neuron**, v. 50, n. 3, p. 479-489, 2006.
- MOURÃO JÚNIOR, C. A.; FARIA, N. C. Memória. **Psicologia: reflexão e crítica**, v. 28, n. 4, p. 780–788, 2015.
- MUNAKATA, M.; AKAIKE, N. Regulation of K<sup>+</sup> conductance by histamine H1 and H2 receptors in neurones dissociated from rat neostriatum. *Journal of Physiology* 480 (2), 233-245, 1994.
- NADEL, Lynn et al. Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. **Hippocampus**, v. 10, n. 4, p. 352-368, 2000.
- NADER, K. et al. The labile nature of consolidation. **Nature Neuroscience**. p. 216-220, 2000.
- NETTO, Carlos A.; IZQUIERDO, Ivan. Posterior hypothalamic deafferentation abolishes the amnestic effect of electroconvulsive shock in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 10, n. 2, p. 159-163, 1985.
- NIETO-ALAMILLA, G. et al. The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. **Molecular pharmacology**, v. 90, n. 5, p. 649-673, 2016.
- PANULA, P. P. U. A. et al. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. **Neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 585-610, 1989.
- PANULA, P.; YANG, H. Y.; COSTA, E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 8, p. 2572-2576, 1984.
- PANULA, Pertti; SUNDVIK, Maria; KARLSTEDT, Kaj. Developmental roles of brain histamine. **Trends in neurosciences**, v. 37, n. 3, p. 159-168, 2014.
- PANULA, Pertti; NUUTINEN, Saara. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 472, 2013.
- PASSANI, Maria Beatrice et al. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 32 , n. 4 , p. 242 – 249, 2011.
- PASSANI, Maria Beatrice et al. Histamine regulates memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 145, p. 1-6, 2017.
- PAXINOS, G; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Ed 1. San Diego: Academic Press, 1986.

- PARMENTIER, Régis et al. Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep–wake control. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7695-7711, 2002.
- PARSONS, R. G.; RESSLER, K. J. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nature neuroscience**, 2013. v. 16, n. 2, p. 146
- 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** 350, 599-604, 1994.
- PRAST, H.; HEISTRACHER, M.; PHILLIPU, A. In vivo modulation of histamine release in the hypothalamus by adrenoceptor agonists and antagonists. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 344, 183-186, 1991.
- 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** 354, 731-735, 1996.
- RICCIO, David C.; MILLIN, Paula M.; BOGART, Adam R. Reconsolidation: A brief history, a retrieval view, and some recent issues. **Learning & Memory**, v. 13, n. 5, p. 536-544, 2006.
- ROBINSON, Jasper; BONARDI, Charlotte. An associative analysis of object memory. **Behavioural brain research**, 2014.
- ROSSATO, Janine I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & Memory**, v. 14, n. 1-2, p. 36-46, 2007.
- SCHNEIDER, Erich H.; NEUMANN, Detlef; SEIFERT, Roland. Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H<sub>1</sub>R- and H<sub>2</sub>R-deficient mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 42, p. 252-266, 2014.
- SCHWARTZ, J. C. et al. Histaminergic pathway in rat-brain evidenced by hypothalamic-lesions. In: **FEDERATION PROCEEDINGS**. 9650 rockville pike, bethesda, MD 20814-3998: federation amer soc exp biol, 1974. p. 285-285.
- 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.
- SERAFIM, K. R. et al. L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 1, p. 100-106, 2010

SERAFIM, K. R. et al. H<sub>1</sub>-histamine receptors in the amygdala are involved in emotional memory but do not mediate anxiety-related behaviors in mice submitted to EPM testing. **Brain research bulletin**, v. 89, n. 1, p. 1-7, 2012.

SERAFIM, K. R. et al. H<sub>1</sub> but not H<sub>2</sub> histamine antagonist receptors mediate anxiety-related behaviors and emotional memory deficit in mice subjected to elevated plus-maze testing. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 5, p. 440-446, 2013.

SILVA, Weber Cláudio Francisco Nunes da. Histamina aumenta a consolidação de memórias aversivas através de um mecanismo dependente da ativação de receptores H<sub>2</sub>. 2005.

STEININGER, Teresa L. et al. Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. **Journal of Comparative Neurology**, v. 429, n. 4, p. 638-653, 2001.

STERN, Sarah A.; ALBERINI, Cristina M. Mechanisms of memory enhancement. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 37-53, 2013.

STRECKER, R. E. et al. Extracellular histamine levels in the feline preoptic/anterior hypothalamic area during natural sleep–wakefulness and prolonged wakefulness: an in vivo microdialysis study. **Neuroscience**, v. 113, n. 3, p. 663-670, 2002.

SUCHOW, Jordan W.; BOURGIN, David D.; GRIFFITHS, Thomas L. Evolution in Mind: Evolutionary Dynamics, Cognitive Processes, and Bayesian Inference. **Trends in Cognitive Sciences**, 2017.

TRONSON, Natalie C. et al. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 167, 2006

WALKER, Matthew P. et al. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. **Nature**, v. 425, n. 6958, p. 616-620, 2003

WATANABE, Takehiko et al. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. **Brain research**, v. 295, n. 1, p. 13-25, 1984.

WESTERINK, Ben HC et al. Evidence for activation of histamine H<sub>3</sub> autoreceptors during handling stress in the prefrontal cortex of the rat. **Synapse**, v. 43, n. 4, p. 238-243, 2002.