



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

HISTAMINA AUMENTA A CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS
AVERSIVAS ATRAVÉS DE UM MECANISMO DEPENDENTE DA
ATIVACÃO DE RECEPTORES H_2

Dissertação de Mestrado

Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

Orientador

Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo

Co-orientadora

Profa. Dra. Lia Rejane Muller Bevilaqua

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

**HISTAMINA AUMENTA A CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS
AVERSIVAS ATRAVÉS DE UM MECANISMO DEPENDENTE DA
ATIVACÃO DE RECEPTORES H₂**

Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Ivan Antonio Izquierdo

Co-orientadora: Profa. Dra. Lia Rejane Müller Bevilaqua

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre, Novembro de 2005

Dedico esta dissertação a minha Grande Mãe,

Naisa Augusta Nunes da Silva

Por todo o grande amor e sabedoria com que me criou.

Graças a ela, não só cheguei até aqui, como posso ir ainda mais alto.

Mamãe, te amo !

Agradecimentos

Em primeiro lugar à minha família: Mamãe (Naisa Augusta Nunes da Silva), Júlia Maria Nunes da Silva (minha tia que eu amo muito, sempre me deu forças para nunca desistir, e me ensinou a superar qualquer obstáculo, por maior que fosse), Tecla Cirino Nunes da Silva (minha tia que amo como uma mãe), Francisco Cirino Nunes da Silva (meu tio que o amo muito), Eva Cirino Nunes da Silva Saumell e José Aníbal Saumell (tia que também amo muito, e meu já falecido tio, com quem aprendi bastante), Jesuína Cirino Nunes da Silva (minha mãe, que também me ajudou muito) e Helder Newton Nunes da Silva (meu irmão, a quem desejo muita felicidade e sucesso na vida). A todos eles dedico esta dissertação.

Aos Profs. Martín Cammarota e Lia Bevilaqua, pela excelente orientação (tanto é que vou continuar com eles em meu doutorado), conselhos e sobretudo pela grande amizade e confiança com que me acolheram.

Ao Prof. Iván Izquierdo, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela credibilidade depositada em mim, pelo convívio fraterno e, sendo o grande cientista que é, admiravelmente ser humilde e atencioso com todos a sua volta, o que demonstra a grande nobreza de seu coração.

A Juliana Sartori Bonini, minha namorada e amiga a quem amo muito, e que muito me ajudou não só neste trabalho (sem ela teria sido deveras mais difícil), mas em minha vida aqui em Porto Alegre, me dando força preciosa e inestimável nos momentos mais difíceis. Ju, também te dedico esta dissertação.

Aos meus grandes amigos de São Paulo, que me brindaram com sua inestimável e valorosa amizade, confiança e dedicação. Dentre estes amigos, não posso deixar de citar aqui, pois me ajudaram decisivamente em momentos cruciais de minha vida, Leo Kei Iwai e Laércio Marques, bem como aqueles cuja amizade já demonstrou ser resistente ao tempo e a distância: Carlos Henrique, Danilo Policastro, Diego Zubrycky, Elvis Medeiros, Erik Montagna, Hiroshi Odo, Isaías Glezer e Marco Aurélio. Estes amigos são como irmãos pra mim.

Aos meus grandes amigos de Porto Alegre, que sempre estiveram a meu lado, inclusive no momento em que eu mais me senti só nesta cidade, brindando-me com excelentes conversas, confiança e companheirismo: Cristiano André Kohler e André Ferrer Carvalho. Estes amigos são como irmãos pra mim.

Aos meus amigos do laboratório, Janine Rossato, Carol Garrido Zinn, Fernando Benetti, Daniel Gelain (o Geléia), a Duda, Grace Pereira, Charles Haineki, Jociane Myskyw, Cristiane Furini, Cássio Konrath, Eduardo Cruz, e outros, pela amizade, convivência fraterna e apoio constante.

A Ângela, que definitivamente me agilizou muito a vida durante a execução deste trabalho, em um momento de grande dificuldade de recursos. Ângela, muitíssimo obrigado por sua indispensável e inesquecível ajuda !!!

A Cleia Bueno, por sua dedicação e constante pré-disposição a nos ajudar sempre que contamos com ela.

A todos os demais que, de alguma forma, tenham contribuído para minha formação profissional e como pessoa.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento de minha bolsa, sem a qual minha vinda e moradia em Porto Alegre teria sido impossível.

Muito Obrigado

Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

“TEMET NOSCE”

Inscrição presente na entrada do Oráculo de Delfos.

Significa “Conhece a Ti Mesmo”.

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo	pg. 3
Abstract	pg. 4
Siglas e Abreviaturas	pg. 5
Capítulo I: Introdução	pg. 8
I.1. Memória: Definição e Importância	pg. 8
I.2. Classificação das Memórias	pg. 10
I.3. Mecanismos Celulares e Moleculares	pg. 11
I.3.1. Breve Histórico	pg. 11
I.3.2. Paralelo entre a Potenciação de Longa Duração e a Consolidação da Memória	pg. 13
I.3.3. Modulação da Memória	pg. 16
I.4. Sistema Histaminérgico	pg. 18
I.4.1. Anatomia do sistema histaminérgico	pg. 18
I.4.2. Metabolismo e renovação neuronal da histamina	pg. 19
I.4.3. Receptores histaminérgicos	pg. 21
I.5. Efeitos do sistema histaminérgico na modulação da memória	pg. 23
I.5.1. Plasticidade sináptica	pg. 23
I.5.2. Aprendizado e memória	pg. 24
Capítulo II: Objetivos	pg. 28
II.1. Objetivo Geral	pg. 28
II.3. Objetivos Específicos	pg. 28
Capítulo III: Materiais e Métodos	pg. 30

III.1. Animais Experimentais	pg. 30
III.2. Procedimento Cirúrgico	pg. 30
III.3. Manipulação dos Animais	pg. 32
III.4. Esquiva Inibitória (EI)	pg. 32
III.5. Tratamento Farmacológico	pg. 34
III.6. Controle histológico da localização das cânulas-guia e do local de infusão	pg. 35
III.7. Campo Aberto	pg. 36
III.8. Labirinto em Cruz Elevado	pg. 37
III.9. Fármacos Utilizados	pg. 37
III.10. Análise Estatística dos Dados	pg. 38
Capítulo IV: Resultados	pg. 39
Capítulo V: Discussão	pg. 47
Capítulo VI: Conclusões	pg. 51
Capítulo VII: Artigo Científico	pg. 53
Referências Bibliográficas	pg. 54
Anexo	pg. 64

RESUMO

Várias evidências sugerem que a histamina cerebral está envolvida no processo de consolidação de memórias, mas a real participação do sistema histaminérgico neste processo permanece controversa. Aqui nós mostramos que, quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente pós-treino em esquivas inibitórias (EI), mas não depois, a histamina produz um efeito pró-mnésico dose-dependente, sem alterar a atividade locomotora, exploratória, o estado de ansiedade ou a expressão da resposta aversiva. O efeito facilitatório da histamina intra-CA1 foi mimetizado pelo inibidor da histamina N-metil-transferase, SKF-91844, e pelo agonista H₂, dimaprit, mas foi totalmente bloqueado pelo antagonista H₂, ranitidina, mas não pelo antagonista H₁ pirilamina, antagonista H₃, tioperamida, ou pelo antagonista do sítio das poliaminas do NMDAr, ifenprodil. Nenhum destes antagonistas, ranitidina, pirilamina, tioperamida ou ifenprodil, afetaram a consolidação da memória para EI. Nossos resultados indicam que, quando infundida bilateralmente intra-CA1 dorsal, a histamina aumenta a consolidação de memória para EI através de um mecanismo que envolve a ativação de receptores H₂; contudo, a histamina endógena presente na região CA1 do hipocampo dorsal parece não participar da consolidação da memória para EI, pelo menos no intervalo de tempo pós-treino que foi analisado.

ABSTRACT

Several evidences suggest that brain histamine is involved in memory consolidation but the actual contribution of the hippocampal histaminergic system to this process remains controversial. Here we show that when infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately after training in an inhibitory avoidance task, but not later, histamine induced a dose-dependent promnesic effect without altering locomotor activity, exploratory behavior, anxiety state or expression of the aversive response. The facilitatory effect of intra-CA1 histamine was mimicked by the histamine N-methyltransferase inhibitor SKF-91844 as well as by the H₂ receptor agonist dimaprit but it was blocked completely by the H₂ receptor antagonist ranitidine and unaffected by the H₁ receptor antagonist pyrilamine, the H₃ receptor antagonist, thioperamide and the NMDAr polyamine-binding site antagonist ifenprodil. By themselves, ranitidine, pyrilamine, thioperamide and ifenprodil did not affect IA memory consolidation. Our data indicate that, when given into CA1, histamine enhances memory consolidation through a mechanism that involves activation of H₂ receptors; however, endogenous CA1 histamine does not seem to participate in the consolidation of IA memory at least at the post-training times analyzed.

SIGLAS E ABREVIATURAS

a.a.	resíduos de aminoácidos componentes de uma proteína
AC	adenilil ciclase
AC1 e AC8	isoformas 1 e 8 da adenilil ciclase
ADP e ATP	adenosilil-difostato e adenosilil trifostato, respectivamente, do inglês <i>adenosylyl diphosphate</i> e <i>adenosylyl triphosphate</i>
AMPA	ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol propiônico, do inglês <i>α-amino-3-hidroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid</i>
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 alguma representações de Amon, rei dos deuses da cidade de Tebas, na mitologia do Antigo Egito.
CaMKII	proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina isoforma II, do inglês <i>calcium/calmoduline dependent protein kinase II</i>
cAMP	adenosilil monofostato cíclico, do inglês <i>cyclic adenosylyl 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
EI	Esquiva Inibitória
ERK1/2	proteína cinase regulada por sinal extracelular, isoformas 1 e 2, do inglês <i>extracellular signal-regulated protein kinase 1/2</i>
GDP e GTP	guanosilil-difostato e guanosilil trifostato, respectivamente, do inglês <i>guanosylyl diphosphate</i> e <i>guanosylyl triphosphate</i>
hnRNA	RNA nuclear “grande”, por conter éxons e íntrons. Do inglês high-nuclear RNA .
IP ₃	inositol trifostato, do inglês <i>inositol trisphosphate</i>
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>
NMDA	N-metil-D-aspartado, do inglês <i>N-methyl-D-aspartate</i>
NMDAr	receptor NMDA, do inglês <i>NMDA receptor</i>
NOS	NO sintase
nTM	núcleo túbero-mamilar
PA	potencial de ação
PIP ₂	fosfatidil-inositol bisfosfato, do inglês <i>phosphatidil-inositol biphosphate</i>
PKA	proteína cinase A, do inglês <i>protein kinase A</i>
PKC	proteína cinase C, do inglês <i>protein kinase C</i>
PLC	fosfolipase C, do inglês <i>phospholipase C</i>
PPSE	potencial pós-sináptico excitatório

Rap1	proteína associada a Ras, isoforma 1, do inglês <i>Ras associated protein 1</i>
Rsk2	proteína cinase S6-ribossomal, isoforma 2, do inglês <i>ribosomal S6 protein kinase 2</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
STM	Memória de Curta Duração, do inglês Short-Term Memory
VMAT-2	enzima vesicular transportadora de monoaminas, isoforma 2, do inglês <i>vesicular monoamine-transporter 2</i>

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

I.1 Memória - Definição e Importância

Define-se por memória a capacidade de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente. No curso da evolução da vida na Terra, o surgimento dessa capacidade permitiu que os seres vivos se beneficiassem de experiências passadas para resolver problemas apresentados pelo meio ambiente, deste modo tornando estes seres mais adaptáveis a mudanças. Coerentemente, verifica-se que os seres mais antigos na escala filogenética, como os invertebrados, já apresentam alguma capacidade mnemônica. Essa característica filogeneticamente conservada sugere que a memória poderia ser considerada como uma propriedade intrínseca do sistema nervoso, presente nele desde seu surgimento na natureza, nos primeiros organismos multicelulares.

No caso específico dos seres humanos, a memória reveste-se de uma importância ainda maior. Em 1637, o grande filósofo francês René Descartes proferiu sua famosa sentença “Cogito ergo sum” – “Penso, logo existo”, talvez a citação mais conhecida em toda a filosofia ocidental. Descartes utilizou esta frase com o intuito de enfatizar a separação entre a mente e o corpo, pois ele considerava a atividade mental como sendo completamente independente da atividade corpórea. Porém, atualmente há boas evidências de que todas as atividades mentais emergem como resultado do funcionamento de nosso sistema nervoso central. Em sendo nosso sistema nervoso central indiscutivelmente composto de matéria, e existindo como tal, e dito que as atividades mentais, como o pensamento, emergem do funcionamento deste sistema material, então o pensamento passa a ser considerado como uma consequência do existir, o inverso da sentença de Descartes. Portanto, “Existo, logo penso”, adequa-se

melhor ao conhecimento atual sobre a ontogênese das funções mentais. Esta proposta foi primeiramente sugerida pelo neurologista português Antonio Damásio em seu livro *O Erro de Descartes* ⁽³⁸⁾. Mas ainda discutindo a sentença de Descartes, não somos o que somos porque pensamos, mas muito mais que isso, somos o que somos porque lembramos o que pensamos. Não podemos fazer aquilo que não sabemos fazer, ou usar como base para planejar e projetar nossos futuros possíveis aquilo que nunca aprendemos ou esquecemos. É o acervo de nossas memórias que faz com que cada um de nós seja um indivíduo único, com personalidade única, não existindo e nem havendo possibilidade de existir outro idêntico. Voltando então a sentença de Descartes, “Penso, logo existo”, pode-se adequá-la a estes conceitos de um modo ainda melhor do que adequa-se “Existo, logo penso”, sendo então reescrita da seguinte maneira: “Existo, logo lembro, logo penso” !

Mas de que modo o sistema nervoso consegue exercer esta importantíssima função? Para que uma memória se forme no sistema nervoso dos seres vivos, primeiramente tem que haver a aquisição da informação relativa a esta memória, seja de fontes externas (experiências sensoriais oriundas da interação com o ambiente) ou internas (cognição, emoção). Esta etapa de aquisição corresponde à aprendizagem. Após a aprendizagem, segue a retenção da informação, que pode ser de curta ou de longa duração. Enquanto estiver retida, a informação pode ser recuperada, e esta etapa é também chamada de evocação, sinônimo de lembrança. A retenção de curta duração (minutos, horas) pode ser convertida em retenção de longa duração (dias, semanas, anos), pelo processo denominado consolidação, que se inicia imediatamente após a aquisição. Por fim, com o passar do tempo, mesmo as informações mais consolidadas podem desaparecer: trata-se do esquecimento.

De todas as informações que entram no sistema nervoso, apenas algumas são de fato retidas por longos prazos, sendo que a maioria nem sequer é adquirida, sendo filtradas por mecanismos atencionais e emocionais. Das que são adquiridas, apenas algumas são consolidadas como memórias de longa duração, e dentre estas muitas são esquecidas. Apenas perduram aquelas informações realmente mais relevantes para a cognição, mais marcantes emocionalmente, mais focalizadas pela atenção ou mais fortes sensorialmente. Vale citar aqui o grande escritor argentino Jorge Luis Borges (1899-1986), que em seu conto “Funes, o Memorioso”⁽²²⁾, diz que “(Funes) Tinha aprendido sem esforço o inglês, o francês, o português, o latim. Suspeito, entretanto, que não era muito capaz de pensar. Pensar é esquecer diferenças, é generalizar, abstrair. No abarrotado mundo de Funes não havia senão pormenores, quase imediatos.”. Portanto, vale frisar que o esquecimento, muito longe de ser reduzido a apenas um vilão ou anormalidade das funções mnemônicas do sistema nervoso, na verdade desempenha um papel muito importante como mecanismo de prevenção de sobrecarga nos sistemas cerebrais dedicados a memorização. Sem esquecer, torna-se impossível ignorar detalhes para generalizar alguma coisa, deste modo limitando o pensamento e o raciocínio.

I.2 Classificação das Memórias

As memórias podem ser classificadas quanto ao tempo de retenção de informação armazenada ou quanto à natureza de seu conteúdo^(70,116,117), conforme sumarizado nos **Quadros 1 e 2**, respectivamente.

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

Tempo de Retenção	Características
Ultra-rápida	Dura de frações de segundos a alguns segundos; memória sensorial.
Curta duração	Dura minutos ou horas; garante o sentido de continuidade do presente.
Longa duração	Dura horas, dias ou anos; garante o registro do passado autobiográfico e dos conhecimentos do indivíduo.

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

Tipo de Memória quanto ao conteúdo	Subtipos	Características	Principais regiões cerebrais envolvidas em sua formação
Declarativa ou Explícita (pode ser descrita por meio de palavras)	• Episódica (eventos)	Tem uma referência temporal; memória de fatos seqüenciados.	• Lobo Medial Temporal • Diencefalo
	• Semântica (fatos)	Envolve conceitos atemporais; memória cultural.	
Não-declarativa ou Implícita (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
Operacional		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 Breve histórico

Uma vez que as informações sejam continuamente selecionadas e armazenadas no sistema nervoso central, o que muda exatamente neste quando aprendemos e posteriormente lembramos?

O primeiro grande *insight* na resolução desta pergunta surgiu em 1893, graças ao brilhante neuroanatomista espanhol Don Santiago Ramón y Cajal. Ramón y Cajal (1852 – 1934), observou que as células nervosas estão interconectadas em padrões surpreendentemente precisos. Hoje sabe-se que essa precisão é construída no SNC pela expressão correspondentemente precisa, tanto espacial quanto temporalmente, de vários genes durante o desenvolvimento. Essa precisão nas conexões neurais apresenta um paradoxo interessante: em se presumindo que as células nervosas sofram algum tipo de mudança quando aprendemos ou lembramos, como se dariam estas mudanças se as conexões entre os neurônios estão arranjadas de forma tão precisa? Com uma notável percepção, Ramón y Cajal propôs uma solução para este dilema, formulando a hipótese da plasticidade sináptica, que diz que a intensidade das conexões sinápticas (facilidade com que um potencial de ação em um neurônio excita o neurônio alvo pós-sináptico) não é fixa, mas plástica e modificável ⁽¹⁰⁷⁾. Especificamente, postulou que a intensidade sináptica podia ser modificada pela atividade neural, além de ter sugerido que o aprendizado poderia utilizar essa maleabilidade sináptica. O aprendizado produziria mudanças prolongadas na intensidade das conexões sinápticas, por meio do crescimento de novos processos sinápticos, e a persistência dessas alterações poderia servir como mecanismo para memória. O conceito atualmente vigente é o de que Ramón y Cajal, mais de um século atrás, tinha razão.

Esta hipótese da plasticidade sináptica só pode ser verificada experimentalmente 75 anos após ter sido proposta, tempo durante o qual ganhou importantes reforços, como o do psicólogo canadense Donald Hebb (1904 – 1985). Em 1949, Donald Hebb publicou um livro no qual propôs uma teoria para a memória com base na plasticidade sináptica de Ramón y Cajal, sendo que nesta época ainda não se tinha comprovado a existência das sinapses ⁽⁶²⁾. Segundo Hebb, a transmissão de informações entre dois

neurônios deveria ser facilitada e tornar-se estável quando ocorresse coincidência (sincronia) entre os disparos do primeiro e do segundo neurônio. Desse modo, a transmissão de mensagens entre os neurônios poderia ser regulada, sendo modulável de acordo com as circunstâncias, ao invés de um fenômeno rígido e imutável. Esta teoria permaneceu mais de 30 anos sem grande repercussão, até que os neurocientistas começassem a descobrir fenômenos comportamentais e celulares que poderiam ser explicados por ela. Atualmente, ela se tornou um modelo celular e molecular da memória ⁽²¹⁾.

I.3.2 Paralelo entre a Potenciação de Longa Duração e a Consolidação da Memória

O primeiro exemplo de plasticidade sináptica específica ocorrendo entre um neurônio pré e um pós-sináptico, como apresentado pelo modelo da sinapse hebbiana, foi descrito em 1973 pelos pesquisadores noruegueses Timothy Bliss e Terje Lømo ⁽²⁰⁾. Trata-se da potenciação de longa duração, conhecido mais freqüentemente pela sigla inglesa LTP (do inglês *long-term potentiation*). Este fenômeno foi descrito pela primeira vez no hipocampo, justamente uma região do SNC diretamente envolvida com a formação da memória. Posteriormente verificou-se que este fenômeno também ocorre em outras regiões do córtex cerebral, principalmente durante o período crítico do desenvolvimento ⁽⁸⁴⁾. O hipocampo é composto por duas áreas principais: o corno de Amón (subdividido em quatro campos numerados de 1 a 3 e abreviados CA1, CA2, CA3), e o giro denteado (GD). Os aferentes vindos de fora do hipocampo são as fibras perfurantes, que fazem sinapses com as células granulares do giro denteado. Os axônios das células granulares se estendem até a região CA3, onde estabelecem sinapses com os dendritos das células piramidais. Estas, por sua vez, projetam seus axônios para fora do hipocampo, mas enviam também colaterais para a região CA1 (os colaterais de

Schaffer), que fazem sinapses com os dendritos de outras células piramidais aí situadas, cujos axônios projetam para fora do hipocampo. O que Bliss e Lømo fizeram foi aplicar uma estimulação elétrica repetitiva (tetânica) nas fibras colaterais de Schaffer, e registraram com microeletrodos a atividade resultante nas células piramidais de CA1 (**Figura 1**). Comparando o potencial pós-sináptico excitatório (PPSE) obtido com o que ocorria antes da estimulação tetânica, verificaram um expressivo aumento do PPSE na célula piramidal, o que não acontecia quando estimulavam outros aferentes da mesma célula piramidal. E verificaram também que esse aumento do PPSE se mantinha durante várias horas, ou até mesmo por dias depois de interrompida a estimulação tetânica.

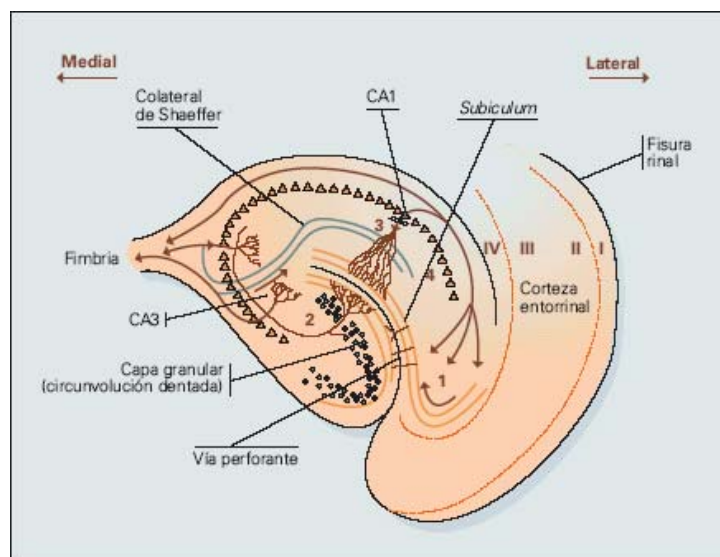


Fig. 1: Esquema da organização interna do hipocampo. Os números de 1 a 4 indicam a seqüência de ativação do circuito. Os números romanos indicam as camadas celulares do córtex entorrinal.

Mas quais são os eventos moleculares que explicam a LTP? O **Quadro 3** apresenta, de modo resumido, a seqüência de eventos moleculares característicos do processo de LTP ^(8,29,47,65,72,84).

Quadro 3: Principais mecanismos moleculares que até o presente momento já foram demonstrados subjazerem a LTP na região CA1 do hipocampo ^(a).

- 1) Chegada dos primeiros potenciais de ação (PA) nos terminais pré-sinápticos dos colaterais de Schaffer, e indução da fusão das vesículas contendo glutamato (o principal neurotransmissor excitatório do SNC) com a membrana, resultando em liberação de glutamato na fenda sináptica;
- 2) Ligação do glutamato aos receptores AMPA, resultando na abertura do canal deste receptor, permitindo a entrada na célula de íons Na^+ ;
- 3) A estimulação repetitiva dos colaterais de Schaffer determina PPSEs na espinha dendrítica pós-sináptica, que se somam temporalmente, mantendo a despolarização. Quando esta atinge um limiar crítico, o receptor NMDA muda de conformação, havendo então a liberação do íon Mg^{2+} que bloqueia seu canal iônico. Este canal desbloqueado se abre desde que o glutamato da fenda se ligue em seu sítio específico no receptor NMDA. Trata-se portanto de um mecanismo de detecção de atividade simultânea na pré e na pós-sinapse;
- 4) A abertura do canal iônico do NMDA permite a entrada de Ca^{2+} na espinha dendrítica elevando o nível intracelular de Ca^{2+} ;
- 5) O aumento do nível intracelular de Ca^{2+} ativa na espinha dendrítica a enzima NOS. Esta produz NO a partir de l-arginina presente na célula;
- 6) O NO difunde-se ao longo de poucos diâmetros celulares, de modo que embora possa se mover livremente, seu raio de ação é limitado. Ao penetrar na terminação pré-sináptica, induzirá um aumento na probabilidade de liberação de vesículas contendo glutamato em resposta a um determinado potencial de ação, mas se, e apenas se, conseguir atingir a terminação em tempo de coincidir com a atividade ainda em curso de chegada de potenciais de ação nesta terminação. Resulta disso que a ação do NO é atividade-dirigida, atuando apenas naquelas sinapses que estiverem ativas no momento do desencadeamento da LTP, e ação sobre sinapses vizinhas pode ter a vantagem de amplificar a LTP em curso. Esta fase caracteriza a chamada fase imediata da LTP;
- 7) O glutamato presente na fenda também se liga a receptores do tipo metabotrópicos, mGlu1 e mGlu5. Ativados, estes receptores ligam-se a uma proteína G (G_q). Esta muda de conformação, e sua subunidade α_q diminui sua afinidade por GDP, trocando-o por GTP. Uma vez com GTP, a subunidade α separa-se das outras duas subunidades ($\beta\gamma$);
- 8) A subunidade α_q -GTP difunde-se pela face citoplasmática da membrana e liga-se a PLC, ativando-a. Esta ativação cessa quando a subunidade α hidroliza o GTP, devido sua atividade GTPásica intrínseca;
- 9) A PLC hidrolisa um lipídio de membrana, o PIP_2 , originando DAG e IP_3 . O primeiro difunde-se pela membrana, até se ligar a PKC. O segundo, IP_3 , difunde-se pelo citosol, ligando-se a um canal na membrana do retículo endoplasmático, que se abre e permite a saída de Ca^{2+} estocado em seu interior, aumentando o nível citoplasmático de Ca^{2+} ;
- 10) O Ca^{2+} presente no citoplasma liga-se a calmodulina, e o complexo Ca^{2+} /calmodulina ativa as AC1 e AC8, a CaMKII e, juntamente com o DAG, ativa a PKC. A CaMKII e a PKC fosforilam e ativam outras proteínas, dentre as quais as enzimas da via das MAPK;
- 11) A AC sintetiza cAMP a partir de ATP. O cAMP liga-se a subunidade regulatória da PKA, que então se separa da subunidade catalítica desta proteína. A subunidade catalítica da PKA, então desinibida, ativa no citosol a Rap1, e/ou migra para o núcleo, onde fosforila o fator de transcrição CREB, ativando-o;
- 12) A Rap1 fosforila no citoplasma a ERK1/2. A ERK1/2 fosforilada migra para o núcleo e fosforila a Rsk2, e/ou fosforila o fator de transcrição Elk-1. A Rsk2, então ativada, fosforila o fator de transcrição CREB.
- 13) CREB liga-se ao DNA numa seqüência de bases específica denominada CRE, que se situa nos promotores de um conjunto específico de genes, dentre eles um grupo de genes imediatos, ativando a transcrição destes genes. Já Elk-1 ativa a transcrição de um outro conjunto de genes, alguns deles pertencente ao conjunto que é ativado por CREB.
- 14) Os genes imediatos codificam mRNA para outros fatores de transcrição, que então se ligarão aos promotores de um outro conjunto de genes, os chamados genes tardios, ativando sua transcrição.
- 15) Os genes tardios codificam mRNA para proteínas estruturais, de adesão ou receptores (AMPA, NMDA, metabotrópicos), que serão requisitadas para a produção de novos sítios sinápticos que irão reforçar especificamente as sinapses que desencadearam todo este processo. Esta última etapa caracteriza a chamada fase tardia da LTP, que dura de dias a semanas.

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

A LTP apresenta diversas características que a tornam uma candidata muito apropriada para o mecanismo de armazenamento de longa duração. Primeiro, ocorre em cada uma das vias principais por onde a informação flui no hipocampo: a via das colaterais de Schaffer, como demonstrado pioneiramente por Bliss e Lømo, e também

nas vias perforantes e das fibras musgosas. Segundo, é induzida rapidamente, de tal modo que uma única série de estímulos elétricos de alta frequência pode dobrar a efetividade de uma conexão sináptica. E finalmente, uma vez induzida, é estável por horas ou mesmo dias, dependendo do número de vezes que o tétano é aplicado. Além disso, é muito tentador correlacionar-se o sucesso na passagem da fase inicial da LTP para a fase tardia da LTP com a passagem da memória de curta para a de longa duração. Assim como a fase inicial da LTP, a memória de curta duração é transitória, não necessita de alterações morfológicas para ser mantida e não necessita de nova síntese protéica. Já a fase tardia da LTP é estável e auto-sustentável, implica alterações morfológicas e necessita de nova síntese de mRNA e de proteína. Ainda, um dos fatores determinantes na conversão da fase inicial da LTP na fase tardia é a repetição do estímulo, havendo uma proporcionalidade direta entre a quantidade de repetição e probabilidade de conversão. O mesmo vale para a consolidação, pois a repetição do aprendizado aumenta a consolidação.

Entretanto, essas características que a LTP apresenta não provam por si que ela seja o mecanismo de consolidação da memória em seres vivos, mas indicam fortemente que ela é uma importante engrenagem constituinte dos mecanismos que subjazem o processo de consolidação ^(21,84).

I.3.3 Modulação da memória

Todas as funções do SNC podem ser moduladas, de modo que suas funções podem ser ativadas ou desativadas, aceleradas ou freadas, fortalecidas ou enfraquecidas de acordo com as necessidades de cada momento. A memória, uma função do SNC, não escapa a esta regra, podendo ser modulada por situações que permeiam os momentos de sua formação ⁽²⁸⁾. Os sistemas moduladores consistem em conjuntos diversos 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 certos neurotransmissores já clássicos e bem conhecidos, especialmente as aminas e a acetilcolina. O **Quadro 4** apresenta uma síntese dos principais sistemas moduladores e sua influência na formação e evocação da memória ^(10,28,72).

Quadro 4: Sistemas moduladores da formação da memória ^(a).

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

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

Analisando-se o Quadro 4, um fato que chama a atenção é que não há uma descrição do papel do sistema histaminérgico sobre os processos de formação e evocação de memórias. Na literatura, o que há é bastante controvérsia a respeito deste tema ⁽²⁶⁾. Daí a idéia do tema de pesquisa apresentado nesta dissertação, visando ajudar a esclarecer esta lacuna presente no conhecimento sobre a modulação da memória. Segue então uma breve descrição sobre o sistema histaminérgico, e em seguida uma rápida revisão sobre o que já existe na literatura a respeito do papel deste sistema na modulação da memória.

I.4 Sistema Histaminérgico

I.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 ^(60,113). 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 ^(66,96,113) (**Figura 2**). A retina e a medula espinhal também recebem fibras provenientes do nTM, e já se demonstrou a existência de inervações recíprocas entre neurônios histaminérgicos e outros aminérgicos ⁽⁷⁶⁾. Correspondentemente, há uma ampla distribuição de receptores histaminérgicos por todo o SNC. O nTM recebe difusas projeções aferentes originadas de muitas áreas diferentes. As principais fontes de aferências são o córtex infralímbico, septo lateral, núcleo pré-óptico e grupos neuronais do tronco cerebral ^(44,45).

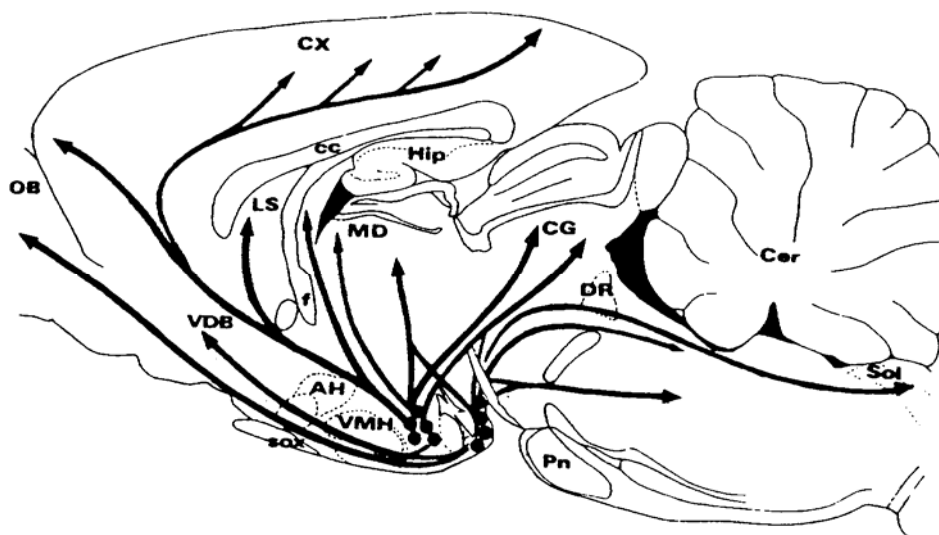


Fig. 2: Sistema histaminérgico e suas principais projeções no SNC, visto numa secção sagital do encéfalo de rato. AH, área hipotalâmica anterior; Arc, núcleo arqueado; cc, corpo caloso; Cer, cerebelo; CG, núcleo cinzento central; CX, córtex cerebral; DR, núcleo dorsal da rafe; f, fórnix; Hip, hipocampo; 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 ventromedial.

Fonte: Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2002.

I.4.2 Metabolismo e renovação neuronal da histamina

A histamina é sintetizada nos neurônios a partir de L-histidina. A L-histidina é transportada para dentro do 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 3**), originando então a histamina. A histamina recém produzida é então transportada para dentro de 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 histaminérgica. Como não há nenhum sistema de recaptção de alta afinidade para a

histamina, a metilação é o principal mecanismo de inativação da histamina liberada. A velocidade de renovação para a 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 (46).

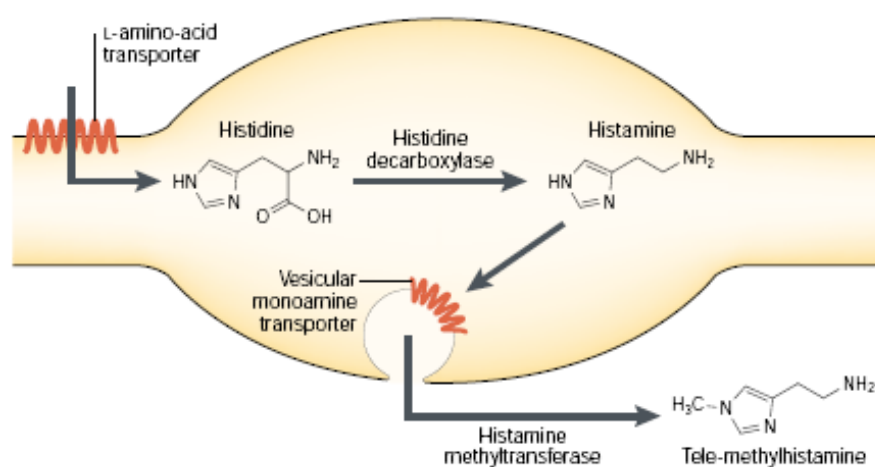


Fig. 3: Síntese, transporte e metabolismo de histamina em neurônios.
Fonte: referência 60.

A síntese e a liberação de histamina está sob o controle de autoreceptores H_3 localizados no soma e nos terminais axônicos dos neurônios histaminérgicos (6,68,104). A liberação de histamina também sofre ação regulatória de receptores inibitórios muscarínicos $M1$ (7,56,104), $\alpha 2$ -adrenoreceptores (7,55,103), 5-HT1A (93), opióides κ -receptores (7,57), galanin receptors (7) e de receptores facilitatórios opióides μ (67). Experimentos *in-vivo* mostraram que o óxido nítrico inibe a liberação de histamina no hipotálamo (105).

A liberação de histamina demonstra uma clara periodicidade, seguindo um ritmo circadiano paralelo a mudança de padrão de disparo dos neurônios histaminérgicos que ocorre durante o ciclo sono-vigília (88). Os neurônios histaminérgicos do núcleo túbero-

mamilar 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 ^(115,118). Ainda, a liberação de histamina segue um ritmo mais rápido, ultradiano, que se correlata com as bandas delta e teta em registros eletroencefalográficos ⁽¹⁰¹⁾.

I.4.3 Receptores histaminérgicos

No sistema nervoso dos vertebrados, a maioria das terminações axônicas histaminérgicas (varicosidades) não estabelecem um contato íntimo com os sítios pós-sinápticos ⁽⁴⁰⁾. Este padrão é similar ao já descrito para as outras aminas biogênicas. As ações da histamina são mediadas por proteínas G e vários segundos-mensageiros, através de sua ligação a quatro receptores já identificados até o presente momento (H₁-H₄). Destes, três são proeminentemente expressos no tecido nervoso (H₁-H₃), enquanto o receptor H₄, descoberto recentemente ⁽⁹¹⁾, é expresso predominantemente na periferia, por exemplo, na medula óssea e nos leucócitos. Os receptores H₁ e H₂ em geral excitam os neurônios ou potencializam impulsos excitatórios ^(86,90,108). Já a ativação dos receptores H₃ causa auto-inibição dos neurônios do nTM e inibe a síntese e a liberação de histamina, e também inibe a liberação de outros neurotransmissores, incluindo o glutamato, a acetilcolina e a noradrenalina ^(24,112).

O receptor H₁ é uma proteína de 486-491 resíduos de aminoácidos, codificada por um gene sem íntrons ⁽¹²⁴⁾, e sua sinalização intracelular inicia-se pela ativação da proteína G_{q/11} e subsequentemente da fosfolipase C (PLC) ⁽²⁶⁾. O receptor H₂ também é codificado por um gene sem íntrons, e consiste de uma proteína de 358-359 resíduos de aminoácidos ^(19,51). Sua sinalização intracelular inicia-se pela ativação da proteína G_s e subsequentemente da adenilil-ciclase ⁽²⁶⁾. Há várias isoformas do receptor H₃ ^(36,42),

cujas proteínas consistem de 326-445 resíduos de aminoácidos, e são derivadas da expressão de um único gene através de processamento de hnRNA (splicing) alternativo. A sinalização intracelular do receptor H₃ inicia-se pela ativação da proteína G_i/G_o, e a subsequente inibição da adenilil-ciclase ⁽²⁶⁾ controlando a liberação e a síntese de histamina ⁽⁸⁹⁾. Também participa da ativação da via das MAPK ⁽⁴²⁾. O **Quadro 5** expõe resumidamente as propriedades dos três principais subtipos de receptores histaminérgicos, e a **Figura 4** expõe as principais vias de sinalização intracelular ativadas por cada receptor.

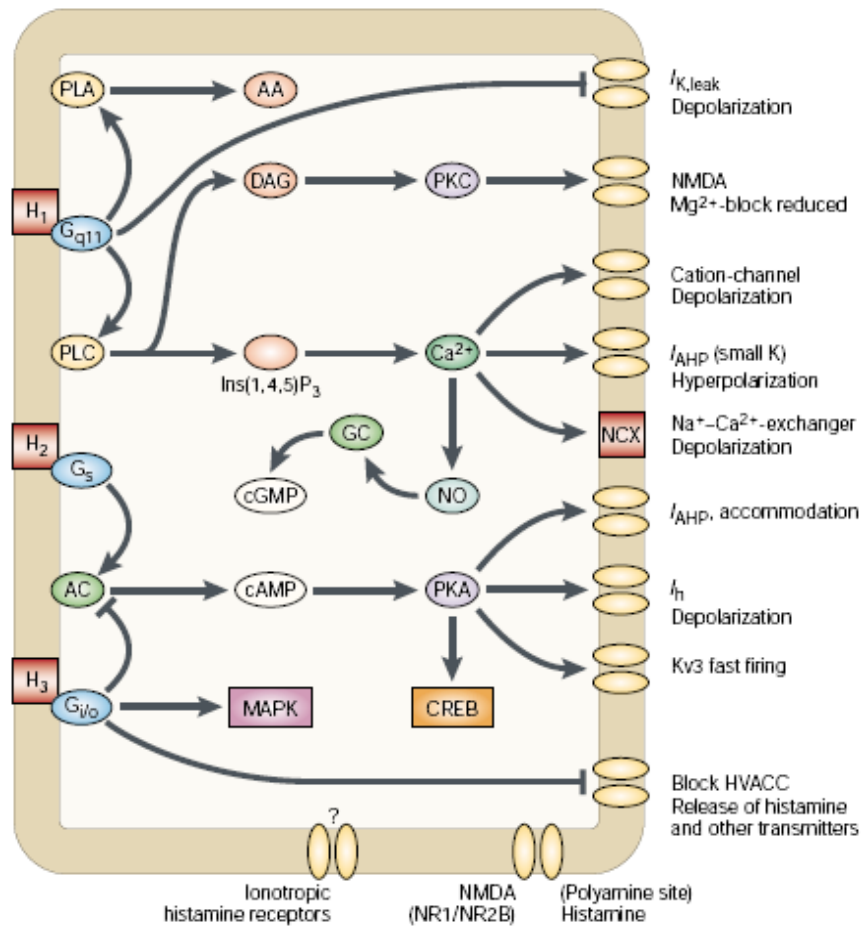


Fig. 4: Vias intracelulares ativadas por receptores histaminérgicos. Os receptores histaminérgicos e suas respectivas proteínas G estão ilustrados a esquerda. O esquema contém as vias sinalizadoras e seus alvos intracelulares. AA, ácido araquidônico; AC, adenilil ciclase; CREB, proteína ligante ao (CRE) elemento responsivo ao cAMP; DAG, diacilglicerol; GC, guanilil ciclase; HVACC, corrente de Ca²⁺ ativada por alta voltagem; I_{AHP}, pequena corrente de K⁺ dependente da condutância ao Ca²⁺; I_h, corrente catiônica ativada por hiperpolarização; I_{Kleak}, corrente de K⁺ fraca; Ins(1,4,5)P₃, inositol-1,4,5-trisfosfato; MAPK, proteína cinase ativada por mitógenos; NCX, trocador de Na⁺-Ca²⁺; NMDA, N-metil-D-aspartato; PKA, proteína cinase A; PKC, proteína cinase C; PLA, fosfolipase A; PLC, fosfolipase C. Fonte: referência 60.

Quadro 5: Propriedades dos três principais subtipos de receptores histaminérgicos^(a).

Receptores	H ₁	H ₂	H ₃
Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • 86 a.a. (rato) • 488 a.a. (porco da índia) • 491 a.a. (bovino) 	<ul style="list-style-type: none"> • 358 a.a. (rato) • 359 a.a. (cachorro, humano, porco da índia) 	<ul style="list-style-type: none"> • 445 a.a. (humano) • H_{3L} 445 a.a., H_{3S} 415 a.a. (porco da índia) • H_{3L} 445 a.a., H_{3S} 413 a.a. (rato)
Localização cromossômica	3p25	5	20qTEL
Distribuição mais densa no cérebro	<ul style="list-style-type: none"> • Tálamo • Cerebelo • Hipocampo 	<ul style="list-style-type: none"> • Estriado • Córtex cerebral • Amígdala 	<ul style="list-style-type: none"> • Estriado • Córtex frontal • Substância Negra
Auto-receptor	Não	Não	Sim
Afinidade por histamina	micromolar	micromolar	nanomolar
Proteína G	G _{q/11}	G _s	G _i /G _o
Segundos Mensageiros	<ul style="list-style-type: none"> • produção de IP₃ • produção de ácido araquidônico • potenciação da produção de cAMP 	<ul style="list-style-type: none"> • produção de cAMP • aumento da [Ca²⁺]_i • inibição da produção do ácido araquidônico 	<ul style="list-style-type: none"> • inibição da produção do cAMP • inibição da produção de IP₃ • diminuição da [Ca²⁺]_i • produção de ácido araquidônico

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

I.5 Efeitos do sistema histaminérgico na modulação da memória

I.5.1 Plasticidade sináptica

Um dos efeitos já descritos da ativação de receptores H₁ é reduzir o bloqueio dos receptores NMDA pelo Mg²⁺, por meio da ação da PKC, facilitando a ativação deste receptor⁽¹⁰⁰⁾. A histamina também causa uma facilitação direta da ativação do receptor NMDA através de sua ligação ao sítio modulatório das poliaminas presente neste receptor^(13,121), sendo esta ligação sensível ao pH e seletiva para as subunidades NR1/NR2B do receptor NMDA⁽¹²³⁾. Já o receptor H₂ é um potente estimulador da via do cAMP, que é necessária para a fase tardia da LTP dependente de NMDAr⁽⁴⁹⁾ e para a indução da LTP nas fibras musgosas hipocâmpais⁽¹²²⁾. O receptor H₂ pode também aumentar as correntes iônicas geradas pelo NMDAr ativo, através do bloqueio de canais de potássio cálcio-dependentes⁽⁵⁸⁾ e possivelmente por promover a fosforilação do próprio NMDAr pela PKA, que é ativada como consequência da ativação do receptor

H₂ ⁽¹⁰⁶⁾. Em CA3, a histamina promove a geração de salvas sincrônicas de potenciais de ação ⁽¹²⁵⁾, atividade que já se sabe ser um estímulo natural para a ocorrência de LTP em CA1 ⁽²¹⁾. Já em CA1, perante uma baixa concentração de Ca²⁺ e alta concentração de Mg²⁺, histamina causa uma potenciação duradoura da excitabilidade neuronal, ação esta mediada principalmente por receptores H₂ e a subsequente ativação da via cAMP/PKA, e modulada por receptores H₁ e NMDAr ⁽¹¹⁴⁾. Assim, a histamina favorece a LTP de, no mínimo, duas maneiras: via receptores H₁, promove a indução da LTP através do aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺, o qual é responsável pelo desencadeamento da LTP; e via receptores H₂, agindo através da ativação da via cAMP/PKA, envolvida na manutenção da LTP ^(23,60).

Os receptores H₃ podem reduzir a liberação de vários neurotransmissores, incluindo o glutamato, podendo afetar a plasticidade sináptica no hipocampo e no estriado ^(24,41). No giro denteado, por exemplo, além de reduzir a transmissão sináptica, a ativação dos receptores H₃ reduz a plasticidade pulso-pareada, um forma de plasticidade sináptica de curta duração ⁽²⁵⁾.

I.5.2 Aprendizado e memória

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 nocicepção ^(26,60). Visto que já se sabe que no hipocampo a histamina diminui a condutância membranal cálcio-dependente ⁽⁵⁹⁾, aumenta a excitabilidade neuronal ⁽¹¹⁴⁾, controla oscilações de alta frequência ^(80,102) e pode aumentar respostas mediadas pelo receptor NMDA ^(13,121), é de se surpreender que, até o presente momento, as evidências sobre o papel da histamina no processo de aprendizagem e formação de memórias sejam bastante contraditórias.

O efeito da manipulação do sistema histaminérgico na formação de memórias tem sido analisado em vários paradigmas comportamentais. De acordo com Tasaka et al. ⁽¹¹⁹⁾, a injeção intra-cérebro-ventricular (i.c.v.) de histamina ou agonistas H₁ inibiu a formação de memória para a tarefa de esquiva ativa. Similarmente, Alvarez e Banzan ^(3,4) mostraram que a injeção de histamina diretamente no hipocampo ventral prejudicou o desempenho dos ratos submetidos a tarefa de esquiva ativa, e que esta ação da histamina era devida a ativação de receptores H₁. Ainda no paradigma de esquiva ativa, a depleção de histamina cerebral através da administração de α -FMH, um inibidor da enzima histidina-descarboxilase, revelou ter um efeito tanto pró-mnésico ^(75,119) quanto amnésico ⁽²⁷⁾. Na tarefa de labirinto radial, mostrou-se que administração de α -FMH é pró-mnésica ⁽¹¹¹⁾ ou amnésica ⁽³³⁾. Já na tarefa de esquiva inibitória, a histamina revelou-se pró-mnésica quando injetada i.c.v. ⁽²⁾.

Agonistas H₂ e H₃ injetados dentro da região do septo de camundongos melhoraram o desempenho destes na tarefa de labirinto em T, enquanto que os antagonistas destes receptores tiveram o efeito oposto ⁽⁴⁸⁾. Já se mostrou que a tioperamida, um antagonista H₃, aumenta a retenção para a tarefa de reconhecimento de objetos, quando administrada após a aquisição ⁽⁹⁵⁾, e facilita a consolidação em camundongos na tarefa de esquiva inibitória, de um modo dose-dependente, também quando administrada após a aquisição ⁽¹⁶⁾. Em duas tarefas de aprendizado espacial, labirinto aquático de Morris e labirinto circular de Barnes, foi mostrado que antagonistas H₃ (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 H₃ na memória espacial pode ser tarefa-dependente ⁽⁸¹⁾. A ativação de receptores H₃ na amígdala aumenta a consolidação de memórias aversivas, e antagonistas H₃ produzem o efeito oposto ^(9,97). A administração

sistêmica de R- α -metil-histamina, um agonista H₃, facilita a formação de memória espacial em ratos ⁽¹¹⁰⁾.

Lesões excitotóxicas (eletrolíticas ou através da administração de ácido ibotênico) dirigidas a região do nTM produziram um aumento do desempenho de ratos na aprendizagem de vários paradigmas, a saber: habituação, esQUIVA inibitória, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris ^(3,43,50,64,79,126). Contudo, baseando-se apenas neste resultado, não há como assegurar que o sistema histaminérgico exerce uma influência negativa sobre o aprendizado e a formação de memórias, devido a grande dificuldade de restringir a lesão do nTM apenas aos neurônios histaminérgicos, visto que este núcleo também possui outros neurônios, por exemplo neurônios inibitórios GABAérgicos ^(1,46).

Em experimentos com camundongos transgênicos, mostrou-se que nocautes duplos para o receptor H₃ (H₃ -/-) apresentam um melhor desempenho na formação de memória no labirinto aquático de Morris e no labirinto circular de Barnes ⁽¹⁰⁹⁾. Já em camundongos nocautes para a enzima histidina descarboxilase, verificou-se um melhor desempenho em duas versões do labirinto aquático de Morris, uma com a plataforma submersa e a outra com a plataforma destacavelmente visível, e um pior desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos ⁽³⁹⁾.

Estudos in-vitro dos principais neurônios do hipocampo tendem a sugerir um papel pró-mnésico para a histamina, devido, como já visto antes, seu efeito promovendo o aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺, a indução e a manutenção da LTP e a sua interação com receptores NMDA facilitando a ativação destes ⁽⁶¹⁾.

Conclui-se do exposto até aqui que muito ainda resta ser esclarecido para que se possa descrever de modo preciso e detalhado o papel do sistema histaminérgico nos

processos de aquisição, consolidação e evocação de memórias. Visando contribuir para tal propósito, o presente trabalho cumpriu os objetivos descritos a seguir.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

II.1 Objetivo Geral

Analisar, especificamente na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, o papel do sistema histaminérgico nos processos de aquisição, consolidação e evocação de memória de longa duração testada 24 horas pós-treino na tarefa de esQUIVA inibitória (EI).

II.2 Objetivos Específicos

1) – Investigar o efeito de diferentes doses de histamina, infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal imediatamente pós-treino em EI, sobre a memória de longa duração testada 24 horas pós-treino.

2) – Investigar o efeito da dose ótima de histamina (aquela com maior efeito sobre a consolidação, item II.2.1) sobre a memória de longa duração para EI quando infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal a diferentes intervalos de tempo pós-treino (0, 30, 90, 180 e 360 minutos).

3) – Investigar o efeito do aumento dos níveis endógenos de histamina liberada pelas terminações axônicas na área CA1 do hipocampo sobre a memória de longa duração para EI, através da infusão bilateral intra-CA1 dorsal do antagonista da enzima histamina metil-transferase, SKF-91844, nos mesmos intervalos de tempo pós-treino nos quais a histamina exógena tenha mostrado algum efeito.

4) – Investigar o efeito da histamina e do SKF-91844 sobre a evocação de memória de longa duração para EI, quando infundidos bilateralmente intra-CA1 dorsal quinze minutos antes do teste.

5) – Investigar qual(is) o(s) receptor(es) responsável pelas possíveis ações da histamina e do SKF-91844 sobre a consolidação de memória de longa duração para EI, através da co-infusão bilateral intra-CA1 dorsal de antagonistas específicos para os receptores H₁, H₂, H₃ ou para o sítio das poliaminas do receptor NMDA, na tentativa de reverter tal efeito, nos intervalos de tempo pós-treino em que a histamina tenha mostrado algum efeito.

6) – Investigar se os antagonistas possuem efeito *per se* na consolidação de memória de longa duração para EI, quando infundidos bilateralmente intra-CA1 dorsal nos mesmos intervalos de tempo pós-treino nos quais a histamina tenha mostrado algum efeito.

7) – Mimetizar o efeito da histamina sobre a consolidação de memória de longa duração para EI, infundindo-se bilateralmente intra-CA1 dorsal um agonista específico para o(s) receptor(es) responsável por tal efeito, nos mesmos intervalos de tempo pós-treino nos quais a histamina tenha mostrado este efeito.

8) – Verificar se as substâncias que tenham afetado a retenção da memória relativa a EI possuem algum efeito sobre a atividade locomotora, exploratória ou sobre o estado de ansiedade dos animais, 24 horas após a infusão bilateral intra-CA1 destas substâncias.

CAPÍTULO 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 do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais eram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha. Recebiam água e comida à vontade, e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 h e escuro a partir das 19:00 h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22 ° C. As caixas eram trocadas a cada 3 dias. O máximo de precaução foi deliberado 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 a 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 alvo, neste caso a 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 ⁽⁹⁹⁾, sendo elas as seguintes: Antero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) = ± 3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 1,3 mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0°.

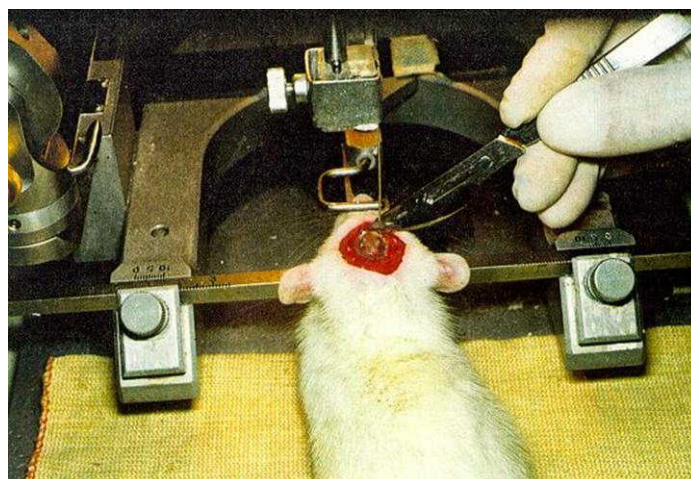


Fig. 5: Cirurgia estereotáxica. Implanta-se estereotaxicamente no crânio dos animais cânulas-guia direcionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal destes animais, conforme coordenadas adaptadas do Atlas anatômico de Paxinos e Watson ⁽⁹⁹⁾.

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com tionembutal (30 mg/kg, intra-peritonial). 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 0,05 mm de diâmetro e 10,0 mm de comprimento, de modo que sua extremidade dirige-se para 1,0 mm 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.

Utilizou-se também, como controle, animais submetidos a cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guia de 0,2 mm de diâmetro e 6,0 mm de comprimento, posicionadas 2,0 mm acima da região alvo (coordenada DV = - 0,3 mm). Para a introdução nestas cânulas-guia preparam-se cânulas de infusão com 0,05 mm de diâmetro e 7,0 mm de comprimento, deste modo direcionadas a uma localização 1,0 mm acima da região-alvo, portanto no córtex occipital. Estes controles foram denominados como não-alvo.

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 seriam conduzidos, retirados de sua caixa e manuseados durante 2 minutos de um modo parecido com os movimentos que são realizados durante o treino de esquiva inibitória.

III.4 – Esquiva Inibitória (EI)

Na tarefa de EI o animal primeiramente é exposto a um estímulo condicionável, a caixa de esquiva, e exibirá uma resposta inata exploratória, que também é condicionável. Após descer da plataforma no interior da caixa, rumo a um assoalho metálico, aprende a associar a descida da plataforma (resposta exploratória, condicionável, perante um estímulo condicionável, a caixa de esquiva), com um leve choque aplicado nas patas (estímulo incondicionado). Com isso, em uma segunda exposição a caixa de esquiva, o rato evitará expressar sua resposta inata exploratória, ou seja, evitará descer da plataforma. Esta inibição da expressão de sua resposta inata reflete o condicionamento desta resposta à associação aprendida. Este é o chamado condicionamento clássico, descrito pioneiramente pelo fisiologista russo Ivan Pavlov (1849-1936) ⁽⁹⁸⁾. O aprendizado em EI envolve várias habilidades, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade a dor, e um componente emocional amplamente modulado por hormônios relacionados ao estresse ^(54,69,71).

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 de aço inoxidável, paralelas, 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 frontal de uma caixa de esquiwa inibitória.

No dia seguinte à última sessão de manipulação 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 0,5 mA por 2 segundos ^(17,30). Posteriormente eram retirados e infundidos com diferentes fármacos caso houvesse necessidade de administração 0 minutos pós treino, ou retornavam para a caixa de morada.

Para avaliar a memória de longa duração formada durante a sessão de treino, os animais eram submetidos a sessão de teste vinte e quatro horas após o treino. O procedimento na sessão de teste é idêntico à sessão treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebe choque. Para ambas as sessões foram adotados tempos máximos de descida, sendo 20 s para a sessão de treino e 180 s para a sessão de teste, após os quais o animal era devolvido à sua caixa de morada. A diferença entre o tempo que o animal permanece sobre a plataforma na sessão de teste (latência de teste) e o

tempo que permanece sobre a mesma na sessão de treino (latência de treino) é o valor utilizado como medida de aprendizagem (latência).

A EI é uma tarefa ideal para estudar processos de memória iniciados durante e após o treino porque:

- a) em geral pode ser aprendida com uma única sessão de treino;
- b) não é contaminada por sessões prévias ou subseqüentes, como ocorre nas tarefas de labirinto aquático, labirinto radial ou esquiva ativa ^(54,69);
- c) não é um aprendizado inato;
- d) a neuroquímica e a farmacologia envolvida na sua modulação é bastante conhecida ^(71,72).

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 e evocação são essencialmente os mesmos nos diferentes tipos de memória ^(32,72).

III.5 – Tratamento Farmacológico

Em diferentes intervalos de tempo (0, 30, 90, 180 ou 360 min) pós-treino na EI os animais receberam infusões bilaterais de 0,8 µL 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 (0,05 mm de diâmetro e 10,0 mm 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, inicia-se infusão lentamente, durante 30 segundos em um lado e depois no outro. Ao término de

cada infusão a cânula foi deixada no local por 30 segundos adicionais para evitar refluxo (**Figura 7**).



Fig. 7: Aparato para 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 seja infundido.

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 μ 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 4 a 7 dias. Após isto se procedeu a 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**).

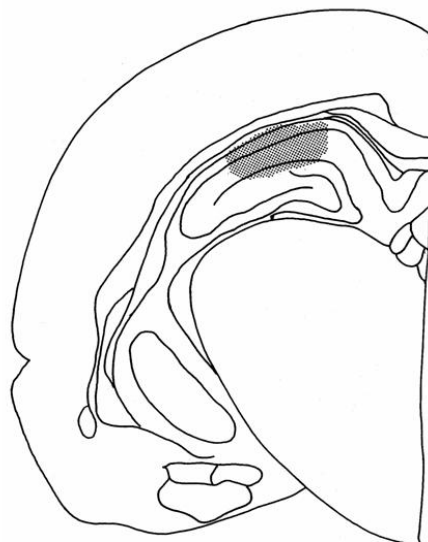


Fig. 8: Representação esquemática de um corte histológico de hemisfério cerebral. A parte grifada mostra a área alvo das infusões realizadas nos experimentos apresentados nesta dissertação. Animais nos quais a infusão de azul de metileno, realizada durante a verificação de posicionamento das cânulas,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

III.7 - Campo Aberto

Buscando avaliar o efeito da infusão dos fármacos aqui utilizados na atividade locomotora e no comportamento exploratório dos animais, utilizou-se a tarefa denominada campo aberto. O aparelho utilizado nesta tarefa consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 40 x 30 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente. O assoalho da caixa é dividido em 12 quadrantes iguais (3 x 4 quadrantes). Durante o experimento, o animal é gentilmente colocado no quadrante esquerdo posterior, de frente para a parede posterior, e deixado ali para explorar a caixa livremente por 5 minutos. Registra-se então o número de linhas cruzadas e o número de elevações (em inglês *rearings*), comportamentos que nos roedores denotam exploração^(73,120). Os experimentos de campo aberto foram realizados 24 horas após a infusão dos fármacos, já que nos experimentos de EI o efeito dos

fármacos foi verificado na memória de longa duração, que foi igualmente testada 24 horas pós-treino.

III.8 - Labirinto em Cruz Elevado

Para verificar possíveis alterações causadas pela infusão dos fármacos no estado de ansiedade dos animais, utilizou-se a tarefa de labirinto em cruz elevado. Este labirinto consiste em uma plataforma em cruz com 40 centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura. Dois braços contralaterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. O animal é solto no centro da plataforma e deixado livre para explorá-la por 5 minutos. Registra-se então o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos, o mesmo nos fechados, e o número de elevações (*rearings*). Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados (menos ansiogênicos) e o número de entradas nestes braços ^(11,18). Assim como explicado para os experimentos de campo aberto, os experimentos de labirinto em cruz elevado foram realizados 24 horas após a infusão dos fármacos.

III.9 – Fármacos Utilizados

Neste estudo, os fármacos utilizados nas infusões intra-CA1 foram: histamina, pirilamina e ranitidina, 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% em salina. 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 aprendizado e memória, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas. (3,4,5,9,53,80,95).

III.10 – Análise Estatística dos Dados

As latências para a descida da plataforma nas sucessivas sessões de teste da tarefa de EI obedeciam a um tempo máximo de 180 segundos de permanência na plataforma, desta forma impondo a necessidade de utilização de estatística não-paramétrica para análise destes dados. Utilizou-se o software Graph-Pad Prism para esta análise estatística. As latências das sessões de teste da EI foram analisadas utilizando-se a análise de variância de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Mann-Whitney. Os dados do campo aberto e do labirinto em cruz elevado foram analisados utilizando-se ANOVA seguida de teste de Dunnet. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Para analisar o efeito da administração intra-hipocampal da histamina na consolidação de uma memória aversiva, ratos Wistar foram treinados em EI numa única sessão, como descrito no capítulo anterior, e então receberam infusões bilaterais intra-CA1 de veículo (salina) ou histamina, há diferentes intervalos de tempo pós-treino. A retenção da memória foi verificada em uma sessão de teste sem reforço (apresentação do choque) realizada 24 horas após a sessão única de treino. Quando infundida imediatamente após o treino, a histamina (0,01-10 nmol/lado) aumentou a latência de descida de uma maneira dose-dependente ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ vs veículo a 1 e 10 nmol/lado, respectivamente, em comparação de Dunn após o teste de Kruskal-Wallis, **Figura 9**).

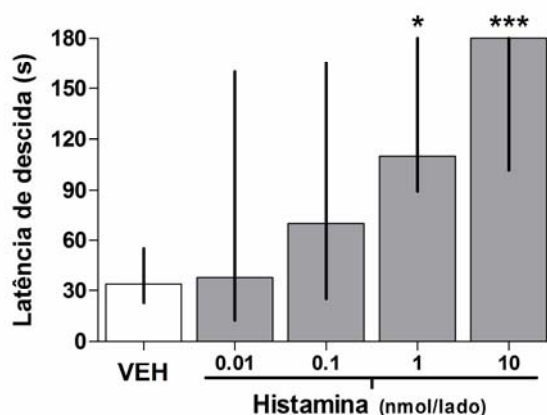


Fig. 9: Infusão intra-CA1 dorsal de histamina imediatamente pós-treino aumenta a consolidação da memória de longa duração relativa à tarefa de esquivar inibitória. Histamina (HIS; 0,01, 0,1, 1 ou 10 nmol/lado) foi bilateralmente infundida (0,8 μ l) diretamente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino em EI. Barras representam mediana (\pm intervalo interquartil) das latências de descida durante o teste de retenção de memória realizado 24 horas pós-treino, $n=14$ por grupo; * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ vs veículo (VEH) na comparação de Dunn pós-teste de Kruskal-Wallis.

Não se observou nenhum efeito sobre a retenção de memória relativa à tarefa de EI quando a histamina (10 nmol/lado) foi infundida intra-CA1 dorsal a 90, 180 ou 360 minutos pós-treino (**Figura 10**), ou quando foi infundida imediatamente pós-treino no córtex occipital mediolateral, a região cortical situada imediatamente acima de CA1 dorsal. (**Figura 11**).

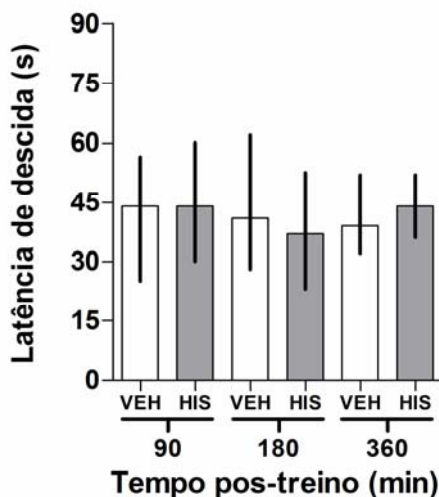


Fig. 10: Infusão intra-CA1 dorsal de histamina a 90, 180 ou 360 min pós-treino não afeta a consolidação da memória de longa duração relativa à tarefa de esquiva inibitória. Histamine (HIS; 10 nmol/lado) foi infundida bilateralmente (0,8 μ l) intra-CA1 dorsal a diferentes intervalos de tempo (90, 180 e 360 min) pós-treino em EI. Barras representam mediana (\pm intervalo interquartil) das latências de descida durante o teste de retenção de memória realizado 24 horas pós-treino, n=10-12 por grupo.

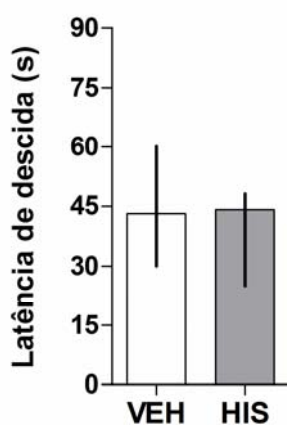


Fig. 11: Infusão intra-córtex occipital mediolateral de histamina imediatamente pós-treino não afeta a consolidação da memória de longa duração relativa à tarefa de esquiva inibitória. Histamina (HIS; 10 nmol/lado) foi bilateralmente infundida (0,8 μ l) diretamente no córtex occipital mediolateral imediatamente após o treino em EI. Barras representam mediana (\pm intervalo interquartil) das latências de descida durante o teste de retenção de memória realizado 24 horas pós-treino, n=8 por grupo.

Coerentemente com os resultados acima, 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 por esta enzima ^(52,63,78,82,85), também aumentou a retenção da LTM relativa a EI quando infundido intra-CA1 dorsal imediatamente pós-treino em EI ($p < 0,01$ vs veículo no teste em U de Mann-Whitney, **Figura 12**).

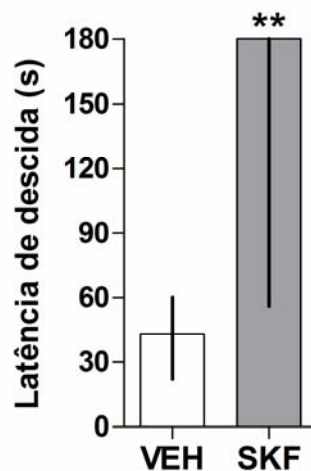


Fig. 12: Infusão intra-CA1 dorsal do inibidor da histamina N-metil-transferase, SKF-91844, aumenta a consolidação da memória de longa duração relativa a tarefa de esQUIVA inibitória. SKF-91844 (SKF; 50 nmol/lado) foi infundido bilateralmente (0,8 μ l) intra-CA1 dorsal imediatamente pós-treino em EI. Barras representam mediana (\pm intervalo interquartil) das latências de descida durante o teste de retenção de memória realizado 24 horas pós-treino, $n=10$ por grupo; ** $p < 0,01$ vs veículo (VEH) no teste em U de Mann-Whitney.

A histamina (10 nmol/lado) e o SKF-91844 (50 nmol/lado) não afetaram a evocação da LTM relativa a EI quando infundidos intra CA1-dorsal 15 minutos antes do teste, realizado 24 h pós-treino (**Figura 13**).

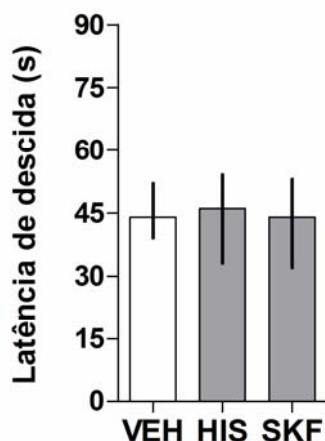


Fig. 13: Infusão intra-CA1 dorsal de histamina ou SKF-91844 15 min pré-teste de retenção 24 h pós-treino não afeta a evocação da memória de longa duração relativa à tarefa de esquiava inibitória. Animais foram treinados em EI e histamina (10 nmol/lado) ou SKF-91844 (SKF; 50 nmol/lado) foram infundidos bilateralmente (0,8 µl) intra-CA1 dorsal 15 min antes do teste de retenção 24 h pós treino para a LTM relativa à EI. Barras representam mediana (± intervalo interquartil) das latências de descida durante o teste de retenção de memória realizado 24 horas pós-treino, n=9-10 por grupo.

Como visto na introdução, a histamina pode interagir com receptores H₁, H₂ ou H₃, todos expressos na formação hipocampal⁽⁸³⁾, além de também poder ligar-se ao sítio das poliaminas no NMDAr^(26,92,123). Uma vez que a ativação dos receptores H₁, H₂ e H₃ pode induzir respostas neuronais opostas⁽⁶⁰⁾, e que a ativação do sítio das poliaminas do NMDAr tem um papel facilitatório sobre a LTP hipocampal, podendo portanto modular positivamente a aquisição de memórias^(34,35,37,77,87), resolvemos então estudar a participação individual desses receptores no efeito facilitatório provocado pela histamine infundida intra-CA1.

Nenhum dos antagonistas utilizados, seja a pirilamina (antagonista H₁, 10-50 nmol/lado), a ranitidina (antagonista H₂, 10-50 nmol/lado), a tioperamida (antagonista H₃, 10-50 nmol/lado) ou o ifenprodil (antagonista do sítio das poliaminas do NMDAr, 10-50 nmol/lado), afetaram a retenção da LTM relativa a EI quando infundidos intra-CA1 imediatamente pós-treino em EI (**Figura 14**).

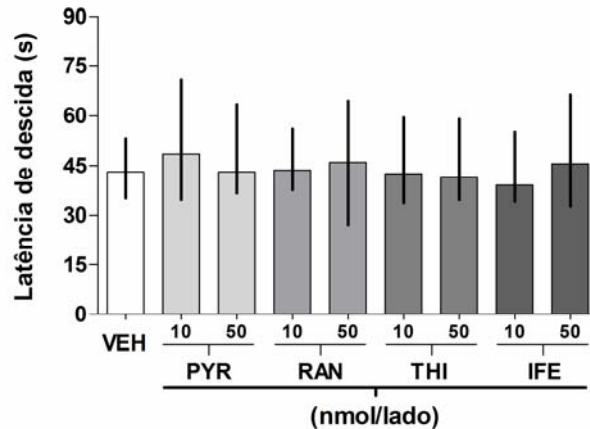


Fig. 14: Antagonistas dos receptores H₁, H₂ e H₃ ou do sítio de ligação das poliaminas no NMDAr não afetam a consolidação da memória de longo prazo relativa a tarefa de esquiva inibitória. O antagonista H₁ pirilamina (PYR), o antagonista H₂ ranitidina (RAN), o antagonista H₃ tioperamida (THI) ou o antagonista do sítio das poliaminas do NMDAr ifenprodil (IFE) foram infundidos bilateralmente (0,8 µl) intra-CA1 dorsal imediatamente pós-treino em EI, a 10-50 nmol/lado. Barras representam mediana (± intervalo interquartil) das latências de descida durante o teste de retenção de memória realizado 24 horas pós-treino, n=8-9 por grupo; VEH = veículo.

Entretanto, a ranitidina (50 nmol/lado), mas não a pirilamina, tioperamida ou ifenprodil, aboliu completamente o efeito pró-mnésico da histamina quando co-infundida com esta monoamina imediatamente pós-treino em EI ($p < 0,05$ vs veículo na comparação de Dunn pós-teste de Kruskal-Wallis), sugerindo que o efeito facilitatório da histamina sobre a consolidação de LTM relativa a EI é mediado pela ativação de receptores H₂ (**Figura 15**).

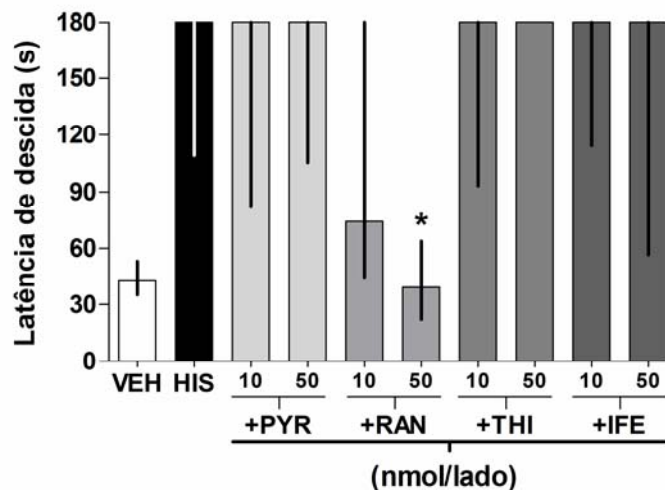


Fig. 15: O efeito pró-mnésico induzido pela infusão intra-CA1 de histamine é bloqueado pelo antagonista H₂, mas não pelos antagonistas H₁, H₃ ou do sítio das poliaminas do NMDAr. Animais treinados em EI receberam infusão bilateral intra-CA1 (0,8 µl) de veículo (VEH), histamina (HIS; 10 nmol/lado) ou histamina (10 nmol/lado) mais duas doses diferentes (10 or 50 nmol/lado) de pirilamina (+PYR), ranitidina (+RAN), tioperamida (+THI) ou ifenprodil (+IFE) imediatamente pós-treino. A memória de longa duração relativa a EI foi avaliada em uma sessão de teste realizada 24 h pós-treino em EI. Barras representam mediana (± intervalo interquartil) das latências de descida, n=9 por grupo; *p<0.05 vs histamine (HIS) na comparação de Dunn pós-teste de Kruskal-Wallis.

Reforçando esta hipótese, nós verificamos que a ranitidina (50 nmol/lado), quando co-infundida intra-CA1 imediatamente pós-treino com SKF-91844 (50 nmol/lado), bloqueou o efeito facilitatório deste ($p < 0.05$ vs SKF-91844 na comparação de Dunn pós-teste de Kruskal-Wallis, **Figura 16**), e que o agonista H₂ dimaprit (10nmol/lado) significativamente aumentou a retenção da LTM relativa a EI quando infundido intra-CA1 imediatamente pós-treino ($p < 0,01$ vs veículo no teste em U de Mann-Whitney; **Figura 17**).

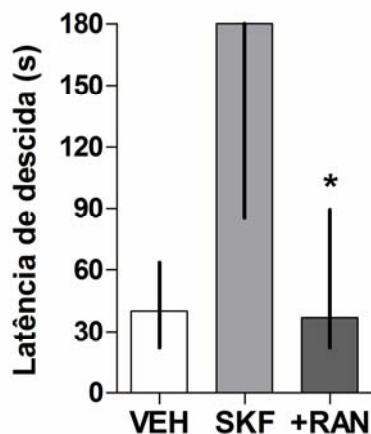


Fig. 16: Ranitidine blocks the facilitatory action of SKF-91844. Animais treinados em EI receberam infusão bilateral intra-CA1 (0,8 μ l) de veículo (VEH), SKF-91844 (SKF; 50 nmol/lado) ou SKF-91844 (50 nmol/lado) mais ranitidina (+RAN; 50 nmol/lado) imediatamente pós-treino. A memória de longa duração relativa a EI foi avaliada em uma sessão de teste realizada 24 h pós-treino em EI. Barras representam mediana (\pm intervalo interquartil) das latências de descida. n=9 por grupo; *p < 0.05 vs SKF na comparação de Dunn pós-teste de Kruskal-Wallis.

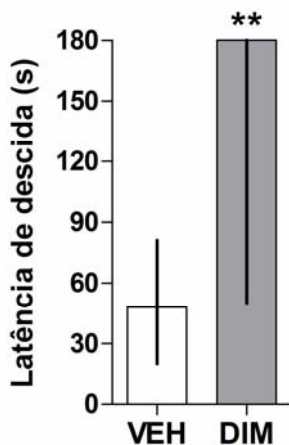


Fig. 17: Infusão intra-CA1 dorsal do agonista H₂ dimaprit aumenta a consolidação da memória de longa duração relativa a tarefa de esqui inibitória. Animais treinados em EI receberam infusão bilateral intra-CA1 (0,8 μ l) de veículo (VEH), ou dimaprit (DIM; 10 nmol/lado) imediatamente pós-treino. A memória de longa duração relativa a EI foi avaliada em uma sessão de teste realizada 24 h pós-treino. Barras representam mediana (\pm intervalo interquartil) das latências de descida. n=11-12 por grupo; **p < 0.01 vs VEH no teste em U de Mann-Whitney.

A histamina (10 nmol/lado) não modificou o número de cruzamentos e elevações (*rearings*) na tarefa de campo aberto (**Figura 18**), e não alterou o número total de entradas dentro dos quatro braços ou o número de entradas e o tempo gasto nos

braços abertos do labirinto em cruz elevado (**Figura 19**), quando infundida intra-CA1 dorsal 24 horas antes das respectivas sessões comportamentais.

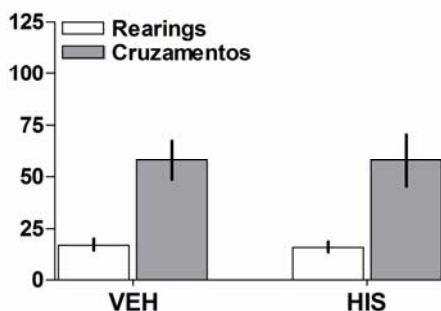


Fig. 17: Infusão de histamina intra-CA1 dorsal não afeta a atividade locomotora e exploratória no intervalo de tempo do teste de retenção. Histamina (HIS; 10 nmol/lado) foi infundida bilateralmente (0,8 μ l) intra-CA1 dorsal 24 h antes de submeter os ratos à tarefa de campo aberto. Barras representam média (\pm SEM) do número de cruzamentos e elevações (*rearings*). n=9 por grupo; VEH = veículo.

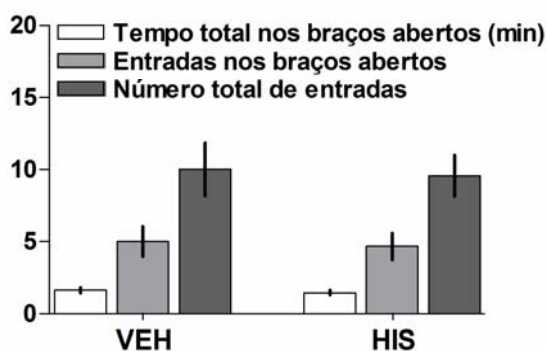


Fig. 17: Infusão de histamina intra-CA1 dorsal não afeta o estado de ansiedade no intervalo de tempo do teste de retenção. Histamina (HIS; 10 nmol/lado) foi infundida bilateralmente (0,8 μ l) intra-CA1 dorsal 24 h antes de submeter os ratos à tarefa de labirinto em cruz elevado. Barras representam média (\pm SEM) do número total de entradas nos 4 braços, do número de entradas e do tempo gasto nos braços abertos. n=9 por grupo; VEH = veículo.

CAPÍTULO V: DISCUSSÃO

Estes resultados mostram que a histamina, quando infundida diretamente na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, aumentou de maneira dose-dependente a retenção da memória de longa duração relativa a EI, um efeito que foi mimetizado pelo aumento dos níveis endógenos de histamina na região CA1 através da inibição da histamina N-metil-transferase com SKF-91844. Este efeito facilitatório foi observado apenas quando a histamina foi administrada imediatamente pós-treino, mas não 90, 180 ou 360 minutos pós-treino, sugerindo que o efeito pró-mnésico desta monoamina se deve a uma melhora tempo-dependente do processo de consolidação, e que não se trata de uma consequência de efeitos tardios sobre a evocação ou sobre as atividades locomotora e exploratória.

Esta afirmação é reforçada pelos resultados que mostram que a histamina e o SKF-91844 não alteram a expressão da LTM relativa a EI quando infundidos bilateralmente intra-CA1 dorsal 15 minutos antes da sessão de teste, e ainda que a histamina não modifica o desempenho dos ratos nas tarefas de campo aberto e labirinto em cruz elevado quando infundida bilateralmente intra-CA1 dorsal 24 horas antes das respectivas sessões comportamentais nestas duas tarefas.

Ainda, o fato de a histamina não ter afetado a consolidação da LTM relativa a EI quando infundida bilateralmente intra-córtex occipital mediolateral, região situada logo acima da região CA1, demonstra que o efeito pró-mnésico induzido se deve especificamente a sua ação na região CA1 do hipocampo dorsal, e não como uma consequência de difusão capilar a outras áreas adjacentes.

Estes resultados diferem de outros publicados anteriormente que indicam que histamina infundida no espaço intra-cérebro-ventricular (i.c.v.) bloqueia a formação de

memória aversiva ^(43,126) ou que esta monoamina prejudica a retenção de memória relativa a tarefa de esQUIVA ativa através de um mecanismo H₁ dependente quando infundida no hipocampo ventral, mas sem apresentar qualquer efeito quando infundida intra-CA1 dorsal ⁽⁵⁾. Entretanto, nossos resultados estão parcialmente em concordância com outros que mostram que a micro-infusão estereotaxicamente localizada de agonistas H₂ e H₃ intra-CA1 dorsal aumenta a retenção de memória associada à tarefa de condicionamento medo-contextual ⁽⁵³⁾. Essas e outras discrepâncias encontradas na literatura sugerem que os efeitos da histamina e de seus agonistas e antagonistas receptores-específicos sobre a consolidação da memória são altamente dependentes da abordagem metodológica, incluindo o intervalo de tempo e a via de administração dos compostos sob investigação, bem como da intensidade, frequência e natureza do reforço e do tipo de resposta condicionada que estão sendo avaliados. Isto está de acordo com o fato já descrito que, em virtude dos efeitos antagônicos produzidos pela ativação de diferentes receptores histaminérgicos, a ação final da histamina devido a ativação desta complexa rede de sinalização não pode ser prontamente prevista, pelo menos não com base apenas em suas ações no nível celular ⁽⁶⁰⁾.

A consolidação da LTM relativa a EI requer a funcionalidade normal dos receptores NMDA, promove a ativação de várias cascatas intracelulares de transdução de sinal acopladas a este receptor na região CA1 dorsal, incluindo a via mediada pela ERK1/2 ^(29,31) e pode ser melhorada por agonistas do sítio de ligação às poliaminas do NMDAr ⁽¹⁴⁾. Contudo, apesar de: (1) a ativação do receptor H₁ reduzir o bloqueio exercido pelo Mg²⁺ sobre o canal iônico do NMDAr ⁽¹⁰⁰⁾, (2) a histamina poder diretamente facilitar a ativação do NMDAr através de sua ligação ao sítio modulatório das poliaminas situado na subunidade NR2B do NMDAr ^(13,121) e (3) os agonistas H₃ poderem aumentar a ativação de ERK1/2 em neurônios da região CA3 ⁽⁵³⁾, nenhum dos

antagonistas específicos para estes receptores (pirilamina, ifenprodil e tioperamida, respectivamente) foi capaz de reverter o efeito facilitatório da histamina infundida intra-CA1. Estes resultados, juntos com aqueles mostrando que o efeito facilitatório induzido pela histamina e pelo SKF-91844 foi bloqueado pela ranitidina e mimetizado pelo dimaprit, indicam claramente que o efeito pró-mnésico da histamina não se deve a sua interação com receptores H₁ e H₃ ou a sua ligação ao sítio das poliaminas do NMDAR, mas ao invés disso, deve-se a ativação direta dos receptores H₂.

Quais efetores intracelulares são responsáveis pelo efeito pró-mnésico H₂-dependente induzido pela histamina na região CA1 ? Uma vez que no cérebro as respostas desencadeadas pela ativação dos receptores H₂ são mediadas pela estimulação da adenilil-ciclase e subsequente aumento dos níveis intracelulares de cAMP e ativação da PKA ⁽¹²⁾, a via do cAMP - PKA é um possível candidato a responder esta questão.

Um fato que se destaca é que a ranitidina, pirilamina, tioperamida e o ifenprodil não tenham afetado a retenção da memória relativa a EI, o que sugere que a histamina endógena não possui um papel crítico na consolidação de memória relativa a EI. Contudo, é possível que, através de uma regulação estimulatória das vias sinalizadoras intracelulares acopladas aos receptores H₂, a histamina exógena induza um aumento no estado de ativação da via sinalizadora da PKA, aumentando subsequentemente a consolidação da memória. A ativação dos receptores H₂ induz, através de um mecanismo cAMP - PKA dependente, uma despolarização duradoura e regula a acomodação do disparo de potenciais de ação em neurônios hipocampais piramidais, aumentando o número de potenciais de ação gerados em resposta a uma despolarização típica decorrente da chegada de PPSEs nestes neurônios piramidais ⁽⁵⁹⁾. De fato, a transmissão sináptica é potencializada por muitas horas em fatias (*slices*) hipocampais após uma curta incubação com histamina ou com o agonista H₂ impromidina ^(26,114). Já

está descrito que o aprendizado da resposta condicionada em EI aumenta rapidamente os níveis de cAMP e ativa a PKA hipocampal. Ainda, a memória relativa a EI é bloqueada por inibidores da PKA e aumentada pela infusão intra-CA1 ou do análogo não hidrolizável do cAMP, 8-Br-cAMP, ou do ativador da adenilil-ciclase, forskolin^(15,74). Experimentos adicionais estão em andamento para aumentar a compreensão das conseqüências bioquímicas da ativação dos receptores H₂ durante a consolidação da memória.

CAPÍTULO VI: CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- 1) A histamina infundida bilateralmente intra-CA1 dorsal em ratos melhora a consolidação da memória de longa duração para EI, de maneira dose-dependente;
- 2) Este efeito pró-mnésico ocorre apenas quando a histamina é infundida imediatamente após o treino;
- 3) O aumento dos níveis endógenos de histamina, provocado pela infusão do antagonista da histamina N-metil-transferase, SKF-91844, imediatamente após o treino, também aumenta a retenção da memória de longa duração para EI;
- 4) O aumento dos níveis de histamina na região CA1 dorsal de hipocampo não possui efeito sobre a evocação de memória de longa duração relativa a EI;
- 5) O efeito pró-mnésico da histamina e do SKF-91844 na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos sobre a consolidação de memória de longa duração relativa a EI é mediado por receptores H₂, pois foi bloqueado pela co-infusão do antagonista H₂ (ranitidina) e mimetizado pela infusão do agonista H₂ dimaprit;
- 6) A histamina endógena, em seu nível fisiológico, parece não possuir um papel crítico na consolidação de memória de longa duração para EI, uma vez que nenhum dos antagonistas teve algum efeito sobre a consolidação desta memória, quando infundidos intra-CA1 dorsal imediatamente pós-treino;
- 7) O efeito pró-mnésico da histamina na região CA1 dorsal do hipocampo se deve especificamente sua ação sobre a consolidação da memória, uma vez a histamina não afetou a atividade locomotora, exploratória ou o estado de ansiedade dos animais 24 h após sua infusão.

Em suma, nossos resultados indicam que o aumento da quantidade de histamina na região CA1 do hipocampo dorsal melhora a consolidação de memórias aversivas através de um mecanismo dependente da ativação de receptores H2, e que este aumento de histamina em CA1 não exerce efeito sobre a evocação. Além disto a histamina endógena não parece ser requisitada para a consolidação de memórias aversivas, pois os antagonistas para seus receptores não tiveram efeito quando administrados sozinhos.

CAPÍTULO VII: ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados apresentados nesta dissertação de mestrado foram aceitos para publicação na revista *Neurobiology of Learning and Memory*, conforme segue abaixo:

Silva, WC; Bonini, J.S.; Bevilaqua, L.R.M.; Izquierdo, I; Cammarota, M. Histamine enhances consolidation of inhibitory avoidance memory through a H₂ receptor dependent mechanism. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2006, *in press*.

Este artigo encontra-se anexo ao final desta dissertação, após Referências Bibliográficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Airaksinen, M.S.; Alanen, S.; Szabat, E.; Visser, T.J.; Panula, P. Multiple neurotransmitters in the tuberomammillary nucleus: comparison of rat, mouse, and guinea pig. *Journal of Comparative Neurology* 323, 103-116, 1992.
- 2) de Almeida, M.A.; Izquierdo, I. Memory facilitation by histamine. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 283 (2), 193-198, 1986.
- 3) 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* 101 (1-3), 201-211, 1995.
- 4) Alvarez, E.O.; Banzan, A.M. Hippocampal histamine receptors: possible role on the mechanisms of memory in the rat, II. *Journal of Neural Transmission* 103 (1-2), 147-56, 1996.
- 5) Alvarez, E.O.; Ruarte, M.B.; Banzan, A.M. Histaminergic systems of the limbic complex on learning and motivation. *Behavioural Brain Research* 124 (2), 195-202, 2001.
- 6) Arrang, J.M.; Garbarg, M.; Schwartz, J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 302, 832-837, 1983.
- 7) 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.
- 8) Arthur, J.S.C.; Fong, A.L.; Dwyer J.M.; Davare, M.; Reese, E.; Obrietan, K.; Impey, S. Mitogen- and stress- activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *The Journal of Neuroscience* 24 (18), 4324-4332, 2004.
- 9) 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* 48 (2), 246-251, 2005.
- 10) 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, β -noradrenergic, serotonergic1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behavioural Brain Research* 124, 1-7, 2001.
- 11) Barros, D.M.; Izquierdo, L.A.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. Bupropion and sertraline enhance retrieval of recent and remote long-term memory in rats. *Behavioural Pharmacology* 13 (3), 215-220, 2002.
- 12) Baudry, M.; Martres, M.P.; Schwartz, J.C. H1 and H2 receptors in the histamine-induced accumulation of cyclic AMP in guinea pig brain slices. *Nature* 253 (5490), 362-364, 1975.

- 13)** Bekkers, J.M. Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Science* 261, 104-106, 1993.
- 14)** 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* 83 (1), 48-53, 2005.
- 15)** Bernabeu, R.; Bevilaqua, L.; Ardenghi, P.; Bromberg, E.; Schmitz, P.; Bianchin, M.; Izquierdo, I.; Medina J.H. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94 (13), 7041-7046, 1997.
- 16)** 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* 154 (1), 211-219, 2004.
- 17)** 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* 17 (4), 897-902, 2003a.
- 18)** Bevilaqua LR, Rossato JI, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behavioural Pharmacology* 14 (8), 649-652, 2003b.
- 19)** Black, J.W.; Duncan, W.A.; Durant, C.J.; Ganellin, C.R.; Parsons, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 236, 385-390, 1972.
- 20)** Bliss T.V.P.; Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* 232, 331-356, 1973.
- 21)** Bliss, T.V.P.; Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39, 1993.
- 22)** Borges, J.L. Ficções. 5^a ed., Globo, São Paulo, 1989.
- 23)** 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* 34(2), 181-190, 1995.
- 24)** Brown, R.E.; Haas, H.L. On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. *Journal of Physiology (London)* 515, 777-783, 1999.
- 25)** Brown R.E.; Reymann, K.G. Histamine H3 receptor-mediated depression of synaptic transmission in the dentate gyrus of the rat in vitro. *Journal of Physiology (London)* 496, 175-184, 1996.

- 26)** Brown R.E.; Stevens, D.R.; Haas, H.L. The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology* 63, 637-672, 2001.
- 27)** Cacabelos, R.; Alvarez, X.A. Histidine decarboxylase inhibition induced by alpha-fluoromethylhistidine provokes learning-related hypokinetic activity. *Agents Actions* 33 (1-2), 131-134, 1991.
- 28)** Cahill, L.; McGaugh, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosciences* 11, 294-299, 1998.
- 29)** 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* 76, 36-46, 2000.
- 30)** 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 a extinguished conditioned fear response. *Journal of Neuroscience* 23 (3), 737-741, 2003.
- 31)** 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* 25 (5), 567-572, 2000.
- 32)** Carew, T.J. Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* 16 (1), 5-8, 1996.
- 33)** Chen, Z.; Sugimoto, Y.; Kamei, C. Effects of intracerebroventricular injection of alpha-fluoromethylhistidine on radial maze performance in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 64 (3), 513-518, 1999.
- 34)** Chida, N.; Saito, H.; Abe, K. Spermine facilitates the generation of long-term potentiation of evoked potential in the dentate gyrus of anesthetized rats. *Brain Research*, 593 (1), 57-62, 1992.
- 35)** Clayton, D.A.; Mesches, M.H.; Alvarez, E.; Bickford, P.C.; Browning, M.D. A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *Journal of Neuroscience* 22 (9), 3628-3637, 2002.
- 36)** 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* 355, 279-288, 2001.
- 37)** Conway, E.L. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. *Brain Research* 800 (1), 10-20, 1998.

- 38)** Damasio, A. R. O erro de Descartes: emoção, razão e o cérebro humano. 2ª ed., Companhia das Letras, São Paulo, 1996.
- 39)** Dere, E.; De Souza-Silva, M.A.; Topic, B.; Spieler, R.E.; Haas, H.L.; Huston, J.P. Histidine-decarboxylase knockout mice show deficient nonreinforced episodic object memory, improved negatively reinforced water-maze performance, and increased neo- and ventro-striatal dopamine turnover. *Learning & Memory* 10 (6), 510-519, 2003.
- 40)** 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* 9, 2406-2413, 1997.
- 41)** 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* 40 (1), 106-113, 2001.
- 42)** Drutel, G.; Peitsaro, N.; Karlstedt, K.; Wieland, K.; Smit, M.J.; Timmerman, H.; Panula, P.; Leurs, R. Identification of rat H₃ receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Molecular Pharmacology* 59, 1-8, 2001.
- 43)** Eidi, M.; Zarrindast, M.R.; Eidi, A.; Oryan, S.; Parivar K. Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *European Journal of Pharmacology* 465 (1-2), 91-96, 2003.
- 44)** 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* 281, 169-192, 1989.
- 45)** 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* 311, 45-64, 1991.
- 46)** Ericson, H.; Köhler, C.; Blomqvist, A. GABA-like immunoreactivity in the tuberomammillary nucleus: an electron microscopic study in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 305, 462-469, 1991.
- 47)** Ferguson, G.D.; Storm D.R. Why calcium-stimulated adenylyl cyclases ? *Physiology* 19, 271-276, 2004.
- 48)** 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)* 140 (3), 279-284, 1998.
- 49)** Frey, U.; Huang, Y.Y.; Kandel, E.R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260 (5114), 1661-1664, 1993.
- 50)** Frisch, C.; Hasenohrl, R.U.; Haas, H.L.; Weiler, H.T.; Steinbusch, H.W.; Huston, J.P. Facilitation of learning after lesions of the tuberomammillary nucleus region in adult and aged rats. *Experimental Brain Research* 118 (4), 447-456, 1998.

- 51)** 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* 88, 5937, 1991.
- 52)** Gatti, P.J.; Gertner, S.B. The effect of intrahypothalamic injection of homodimaprit on blood pressure. *Neuropharmacology* 23 (6), 663-670, 1984.
- 53)** 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* 23 (27), 9016-9023, 2003.
- 54)** Gold, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology* 46, 87-98, 1986.
- 55)** 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* 53, 513-518, 1989a.
- 56)** 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, 1989b.
- 57)** 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* 55, 248-254, 1990.
- 58)** Haas, H.L. Histamine potentiates neuronal excitation by blocking a calcium-dependent potassium conductance. *Agents Actions* 14, 534-537, 1984.
- 59)** Haas, H.L.; Konnerth, A. Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 302 (5907), 432-434, 1983.
- 60)** Haas, H.; Panula, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews* 4, 121-130, 2003.
- 61)** Haas, H.L.; Sergueeva, O.A.; Vorobjev, V.S.; Sharonova, I.N. Subcortical modulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *Behavioural Brain Research* 66, 41-44, 1995.
- 62)** Hebb, D.O. *Organization of Behavior*. John Wiley, London, 1949.
- 63)** Horton, J.R.; Sawada, K.; Nishibori, M.; Cheng X. Structural basis for inhibition of histamine N-methyltransferase by diverse drugs. *Journal of Molecular Biology* 353 (2), 334-344, 2005.
- 64)** Huston, J.P.; Wagner, U.; Hasenohrl, R.U. The tuberomammillary nucleus projections in the control of learning, memory and reinforcement processes: evidence for an inhibitory role. *Behavioural Brain Research* 83 (1-2), 97-105, 1997.

- 65) Impey, I.; Obrietan, K.; Wong, S.T.; Poser, S.; Yano, S.; Wayman, G.; Deloulme, J.C.; Chan, G.; Storm, D.R. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21, 869-883, 1998.
- 66) Inagaki, N. et al. Organization of histaminergic fibers in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 273, 283-300, 1998.
- 67) 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, 1988a.
- 68) 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* 56, 769-774, 1991.
- 69) Izquierdo, I. Different forms of posttraining memory processing. *Behavioral and Neural Biology* 51, 171-202, 1989.
- 70) Izquierdo, I. Memória. Artmed, Porto Alegre, 2002.
- 71) 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* 68, 285-316, 1997.
- 72) Izquierdo, I.; McGaugh, J.L. Behavioral pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioral Pharmacology* 11, 517-534, 2000.
- 73) Izquierdo, L.A.; Barros, D.M.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. Stress hormones enhance retrieval of fear conditioning acquired either one day or many months before. *Behavioural Pharmacology* 13 (3), 203-213, 2002.
- 74) Izquierdo, L.A.; Vianna, M.; Barros, D.M.; Mello e Souza, T.; Ardenghi, P.; Sant'Anna, M.K.; Rodrigues, C.; Medina, J.H.; Izquierdo I. Short- and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* 73 (2), 141-149, 2000.
- 75) Kamei, C.; Okumura, Y.; Tasaka, K. Influence of histamine depletion on learning and memory recollection in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 111 (3), 376-82, 1993.
- 76) Kaslin, J.; Panula, P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Neurology* 440, 342-377, 2001.
- 77) Kishi, A.; Ohno, M.; Watanabe S. Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. *Neuroscience Letters* 257 (3), 131-134, 1998.

- 78)** Kitanaka, J.; Kitanaka, N.; Tsujimura, T.; Terada, N.; Takemura, M. Histamine N-methyltransferase regulates histamine-induced phosphoinositide hydrolysis in guinea pig cerebellum. *Neuroscience Letters* 308 (1), 5-8, 2001.
- 79)** Klapdor, K.; Hasenohrl, R.U.; Huston, J.P. Facilitation of learning in adult and aged rats following bilateral lesions of the tuberomammillary nucleus region. *Behavioural Brain Research* 61 (1), 113-116, 1994.
- 80)** 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* 13 (2), 273-280, 2003.
- 81)** 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* 159 (2), 295-300, 2004.
- 82)** Lin, J.S.; Sakai, K.; Jouvet M. Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. *Neuropharmacology* 27 (2), 111-122, 1988.
- 83)** Lozada, A.; Munyao, N.; Sallmen, T.; Lintunen, M.; Leurs, R.; Lindsberg, P.J.; Panula P. Postischemic regulation of central histamine receptors. *Neuroscience* 136 (1), 371-379, 2005.
- 84)** Lynch, M.A. Long-term potentiation and memory. *Physiology Reviews* 84, 87-136, 2003.
- 85)** Malmberg-Aiello, P.; Lamberti, C.; Ipponi A.; Hanninen J.; Ghelardini C.; Bartolini A. Effects of two histamine-N-methyltransferase inhibitors, SKF 91488 and BW 301 U, in rodent antinociception. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 355 (3), 354-360, 1997.
- 86)** 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.
- 87)** Mikolajczak, P.; Okulicz-Kozaryn, I.; Kaminska, E.; Niedopad, L.; Polanska, A.; Gebka J. Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. *European Journal of Pharmacology* 444 (1-2), 83-96, 2002.
- 88)** 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* 51, 391-394, 1992.
- 89)** 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* 408 (6814), 860-864, 2000.
- 90)** Munakata, M.; Akaike, N. Regulation of K⁺ conductance by histamine H1 and H2 receptors in neurones dissociated from rat neostriatum. *Journal of Physiology* 480 (2), 233-245, 1994.

- 91)** 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* 59, 427-433, 2001.
- 92)** Nishiga, M.; Kamei, C. Ameliorative effects of histamine on 7-chlorokynurenic acid-induced spatial memory deficits in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 166 (4), 360-365, 2003.
- 93)** 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* 345, 495-499, 1992.
- 94)** Orsetti, M.; Ghi, P.; Di Carlo, G. Histamine H₃-receptor antagonism improves memory retention and reverses the cognitive deficit induced by scopolamine in a two-trial place recognition task. *Behavioural Brain Research* 61, 113-116, 1994.
- 95)** 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* 124 (2), 235-242, 2001.
- 96)** Panula, P.; Pirvola, U., Auvinen, S.; Airaksinen, M.S. Histamine-immunoreactive nerve fibres in the rat brain. *Neuroscience* 28, 585-610, 1989.
- 97)** Passani, M.B.; Bacciottini, L.; Mannaioni, P.F.; Blandina, P. Central histaminergic system and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24, 107-113, 2000.
- 98)** Pavlov, I.P. Lectures on conditioned reflexes. Liveright, New York, 1928.
- 99)** Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2^a ed., Academic Press, San Diego, 1986.
- 100)** Payne, G.W.; Neuman, R.S. Effects of hypomagnesia on histamine H₁ receptor-mediated facilitation of NMDA responses. *British Journal of Pharmacology* 121, 199-204, 1997.
- 101)** Philippu, A.; Prast, H. Patterns of histamine release in the brain. *Agents Actions* 33, 124-125, 1991.
- 102)** 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* 348 (2), 101-104, 2003.
- 103)** 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.
- 104)** 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, 1994b.

- 105)** 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, 1996b.
- 106)** Raman, I.M.; Tong, G.; Jahr, C.E. Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 16 (2), 415-421, 1996.
- 107)** Ramón y Cajal, S. Neue Darstellung vom histologischem Bau des Centralnervius system. *Archives of Anatomical Physiology* 55, 319-428, 1893.
- 108)** Reiner, P.B.; Kamondi, A. Mechanisms of antihistamine-induced sedation in the human brain: H1 receptor activation reduces a background leakage potassium current. *Neuroscience* 59 (3), 579-588, 1994.
- 109)** Rizk, A.; Curley, J.; Robertson, J.; Raber, J. Anxiety and cognition in histamine H3 receptor -/- mice. *European Journal of Neuroscience* 19 (7), 1992-1996, 2004.
- 110)** Rubio, S.; Begega, A.; Santin, L.J.; Arias, J.L. Improvement of spatial memory by R- α -methylhistamine, a histamine H3-receptor agonist, on the Morris water-maze in rat. *Behavioural Brain Research* 129, 77-82, 2002.
- 111)** 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* 62 (11), 989-994, 1998.
- 112)** 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* 345 (4), 489-493, 1992.
- 113)** Schwartz, J.C.; Arrang, J.M.; Garbarg, M.; Pollard, H.; Ruat, M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiological Reviews* 71, 1-51, 1991.
- 114)** Selbach, O.; Brown, R.E.; Haas, H.L. Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP. *Neuropharmacology* 36 (11-12), 1539-1548, 1997.
- 115)** Sherin, J.E.; Shiromani, P.J.; McCarley, R.W.; Saper, C.B. Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271, 216-219, 1996.
- 116)** Squire, L.R.; Kandel, E.R. Memória: da mente às moléculas. Artmed, Porto Alegre, 2003.
- 117)** Squire, L.R.; Zola, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 13515-13522, 1996.
- 118)** 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* 429, 638-653, 2001.

- 119)** Tasaka, K.; Kamei, C.; Akahori, H.; Kitazumi, K. The effects of histamine and some related compounds on conditioned avoidance response in rats. *Life Sciences* 37 (21), 2005-2014, 1985.
- 120)** Vianna, M.R.; Barros, D.M.; Silva, T.; Choi, H.; Madche, C.; Rodrigues, C.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology* 150 (1), 77-84, 2000.
- 121)** 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* 11, 837-844, 1993.
- 122)** Weisskopf, M.G.; Castillo, P.E.; Zalutsky, R.A.; Nicoll, R.A. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* 265 (5180), 1878-82, 1994.
- 123)** Williams, K. Subunit-specific potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors by histamine. *Molecular Pharmacology* 46, 531-541, 1994.
- 124)** 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* 88, 11515-11519, 1991.
- 125)** Yanovsky, Y.; Haas, H.L. Histamine increases the bursting activity of pyramidal cells in the CA3 region of mouse hippocampus. *Neuroscience Letters* 240, 110-112, 1998.
- 126)** Zarrindast, M.R.; Eidi, M.; Eidi, A.; Oryan, S. Effects of histamine and opioid systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *European Journal of Pharmacology* 452 (2), 193-197, 2002.

ANEXO

Artigo Científico Referente a este Trabalho



Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H₂ receptor-dependent mechanism

Weber C. da Silva, Juliana S. Bonini, Lia R.M. Bevilaqua, Iván Izquierdo, Martín Cammarota *

Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
Laboratorio de Neuroreceptores, Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Received 9 November 2005; revised 20 December 2005; accepted 4 January 2006

Abstract

Several evidences suggest that brain histamine is involved in memory consolidation but the actual contribution of the hippocampal histaminergic system to this process remains controversial. Here, we show that when infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately after training in an inhibitory avoidance task, but not later, histamine induced a dose-dependent promnesic effect without altering locomotor activity, exploratory behavior, anxiety state or retrieval of the avoidance response. The facilitatory effect of intra-CA1 histamine was mimicked by the histamine *N*-methyltransferase inhibitor SKF-91844 as well as by the H₂ receptor agonist dimaprit and it was blocked completely by the H₂ receptor antagonist ranitidine. Conversely, the promnesic action of histamine was unaffected by the H₁ receptor antagonist pyrilamine, the H₃ receptor antagonist, thioperamide, and the NMDAR polyamine-binding site antagonist ifenprodil. By themselves, ranitidine, pyrilamine, thioperamide, and ifenprodil did not affect IA memory consolidation. Our data indicate that, when given into CA1, histamine enhances memory consolidation through a mechanism that involves activation of H₂ receptors; however, endogenous CA1 histamine does not seem to participate in the consolidation of IA memory at least at the post-training times analyzed.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Histamine; Hippocampus; CA1; Memory; Learning; Consolidation

1. Introduction

Histamine is synthesized by a small number of neurons located in the tuberomammillary nucleus of the hypothalamus and released from the varicosities of axons that ramify profusely throughout the brain (Panula, Pirvola, Auvinen, & Airaksinen, 1989). Of the four histamine receptors—H₁, H₂, H₃, and H₄—identified so far in vertebrates, only the H₁, H₂, and H₃ subtypes are expressed in the central nervous system whereas H₄ is only detected in the periphery, particularly in bone marrow and leukocytes. H₁ and H₂ receptors excite neurons or potentiate

excitatory inputs (McCormick & Williamson, 1991; Munakata & Akaike, 1994; Reiner & Kamondi, 1994). In contrast, activation of H₃ receptors causes autoinhibition of tuberomammillary nucleus neurons and down-regulates histamine synthesis and release as well as the release of other neurotransmitters, including glutamate, acetylcholine, and noradrenaline (Brown & Haas, 1999; Schlicker, Behling, Lummén, & Gothert, 1992). Histamine controls a variety of neurobiological functions and behavioral responses including sleep–wake cycle, water consumption, motor activity, and nociception (Brown, Stevens, & Haas, 2001; Haas & Panula, 2003). Histamine is also involved in learning and memory but the actual role of this modulatory neurotransmitter during acquisition and storage of information remains highly contradictory. Although some authors reported that

* Corresponding author. Fax: +551 3320 3312.

E-mail address: mcammara@terra.com.br (M. Cammarota).

intracerebroventricular histamine improves passive and active avoidance conditioning (De Almeida & Izquierdo, 1986, 1988; Kamei & Tasaka, 1993), using similar behavioral protocols others have found that this monoamine actually impairs consolidation and retrieval and that lesion of the tuberomammillary nucleus, which contains the histaminergic cell bodies, in fact facilitates memory (Alvarez & Banzan, 1995; Eidi, Zarrindast, Eidi, Oryan, & Parivar, 2003; Huston, Wagner, & Hasenohrl, 1997; Zarrindast, Eidi, Eidi, & Oryan, 2002). Similarly, depletion of neuronal histamine by systemic or intracerebroventricular α -fluoromethylhistidine has been reported to either facilitate (Sakai et al., 1998) or hinder (Chen, Sugimoto, & Kamei, 1999) memory acquisition. The cause for these discrepancies is not clear but it might be associated with the fact that, as a result of using multi-trial learning paradigms along with intracerebroventricular or systemic administration of pharmacological agents, many of the above mentioned studies could not discriminate between acquisition, consolidation, and retrieval related processes or exclude non-specific behavioral and physiological effects of the drugs under scrutiny.

Evidence indicates that the hippocampus plays an essential role in associative learning (Izquierdo, Cammarota, Medina, & Bevilaqua, 2004; Maren, 2001; Nyberg, 2005) and it is known that histamine, which is present in the hippocampus at concentrations ranging from 0.32 to 0.45 nmol/g of tissue (Hough, Khandelwal, & Green, 1984; Khandelwal, Hough, & Green, 1984; Prell, Hough, Khandelwal, & Green, 1996), regulates the physiological activity of this brain structure. In the hippocampus, histamine decreases calcium-activated potassium conductance (Haas & Konnerth, 1983), increases neuronal excitability (Selbach, Brown, & Haas, 1997), controls high-frequency oscillations (Knoche et al., 2003; Ponomarenko, Knoche, Korotkova, & Haas, 2003), and can enhance *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated responses (Bekkers, 1993; Vorobjev, Sharonova, Walsh, & Haas, 1993). Actually, it has been reported that histamine is able to modulate the threshold for induction of NMDA-dependent long-term potentiation (LTP) in the CA1 region (Brown, Fedorov, Haas, & Reymann, 1995), a form of synaptic plasticity that many consider a cellular correlate of memory formation (Lynch, 2004). Clearly, among the several potential ways in which histamine can regulate learning and memory, modulation of hippocampal functionality is one of the most feasible, thought surprisingly, it is also one of the less profusely studied. Here, we analyzed the effect of the intra-CA1 infusion of histamine and other histaminergic agents, including histamine *N*-methyltransferase inhibitors and histamine-receptor subtype-specific antagonist and agonists, on the consolidation of an aversive memory. To that end we utilized the highly validated, hippocampal-dependent, one-trial, and step-down inhibitory avoidance task (IA) (Bevilaqua, Kerr, Medina, Izquierdo, & Cammarota, 2003; Cammarota, Bevilaqua, Kerr, Medina, & Izquierdo, 2003).

2. Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (3 months of age, 250–280 g of weight) from our own breeding stock were used. Animals were housed in plastic cages and maintained at a constant temperature of 22–23 °C under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) with water and food freely available. Rats were bilaterally implanted under deep thionembutal anesthesia with 27-gauge guides aimed 1.0 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus or into the mediolateral occipital cortex, in accordance with coordinates taken from the atlas of Paxinos and Watson [A-4.2, L \pm 3.0, V 1.4; and A-4.2, L \pm 3.0, V 0.3, respectively (Paxinos & Watson, 1986)]. Animals were allowed to recover for 4 days before submitting them to any other procedure. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. In all experiments the “principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23, revised 1996) were strictly followed.

2.2. Inhibitory avoidance training

Rats were trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance paradigm (IA), a hippocampal-dependent learning task in which stepping-down from a platform present in a given context is associated with a footshock resulting in an increase in step-down latency (Cammarota, Bevilaqua, Kohler, Medina, & Izquierdo, 2005; Cammarota, Bevilaqua, Medina, & Izquierdo, 2004; Cammarota et al., 2005). The IA training apparatus was a 50 \times 25 \times 25 cm Plexiglas box with a 5 cm high, 8 cm-wide, and 25 cm long platform on the left end of a series of bronze bars that constitutes the floor of the box. During training, animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed their four paws on the grid, received a 2-s, 0.5 mA scrambled footshock and were immediately withdrawn from the training box. IA memory retention was evaluated in a test session carried out 24 h after training. At test, trained animals were put back on the training box platform until they eventually stepped down to the grid. The latency to step-down during the test session was taken as an indicator of memory retention. At the time of drug delivery, a 30-gauge infusion cannula was tightly fitted into the guide cannula. Infusions (0.8 μ l/side) were carried out over 60-s, first on one side and then on the other; the infusion cannula was left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. Placement of the cannulae was verified postmortem. Two to four hours after the behavioral test animals received 0.8 μ l of a 4% methylene-blue solution through the implanted cannulae and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as indicative of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given. Only data from animals with correct cannulae implants (440 animals; 94.6% of the total) were included in the statistical analyses. Since a ceiling of 180 s was imposed to step-down latencies during retention tests and this variable neither follows a normal distribution nor fulfills the assumption of homoscedasticity, data are presented as median \pm interquartile range and were analyzed using the Mann–Whitney *U* test or the Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn’s post hoc comparisons as appropriate.

2.3. Open field and plus maze

To analyze their exploratory and locomotor activities, animals were placed on the left rear quadrant of a 50 \times 50 \times 39 cm open field with black plywood walls and a brown floor divided into 12 equal squares. The number of line crossings and the number of rearings were measured over 5 min and taken as an indicative of locomotor and exploratory activities, respectively. To evaluate their anxiety state, rats were exposed to an elevated plus maze exactly as described (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). The total number of entries into the four arms, the number of entries and the time spent into the open arms were recorded over a 5 min session. Twenty-four hours before exposure to the open field or the plus maze, the animals

received bilateral 0.8 μ l infusions into the CA1 region of the dorsal hippocampus. The animals used for inhibitory avoidance training were not reutilized in open field and plus maze experiments.

2.4. Drugs

Histamine, pyrilamine, and ranitidine were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Thioperamide, ifenprodil, dimaprit, and SKF 91488 were obtained from Tocris Cookson Ltd (Avonmouth, Bristol, UK). All drugs were dissolved in saline (except ifenprodil which was dissolved in 50% DMSO) and were infused at room temperature (pH 7.2). The doses utilized were determined based on pilot experiments and on previous studies showing the effect of histamine on learning, memory, and other behavioral and physiological variables (Alvarez & Ruarte, 2002; Baldi et al., 2005; Di Carlo, Ghi, & Orsetti, 2000; Giovannini et al., 2003; Knoche et al., 2003).

3. Results

To analyze the effect of the intrahippocampal administration of histamine in the consolidation of aversive memory, male Wistar rats were trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance task (IA) and, at different

post-training times, received bilateral intra-CA1 infusions of vehicle (saline) or histamine. Memory retention was evaluated in a non-reinforced test session carried out 24 h later. When given immediately after training, histamine (0.01–10 nmol/side) increased test step-down latencies in a dose-dependent way ($p < .05$ and $p < .001$ vs. vehicle at 1 and 10 nmol/side, respectively, in Dunn's comparisons after Kruskal–Wallis test; Fig. 1A). No significant effect on memory retention was observed when histamine (10 nmol/side) was given into dorsal CA1 at 90, 180 or 360 min post-training (Fig. 1B) or when it was administered right after training into the mediolateral occipital cortex, the cortical region immediately over dorsal CA1 (Fig. 1C). In agreement with the above mentioned results, the inhibitor of histamine *N*-methyltransferase SKF-91844 (50 nmol/side), which increases histamine endogenous levels by blocking its metabolic inactivation (Gatti & Gertner, 1984; Horton, Sawada, Nishibori, & Cheng, 2005; Kitanaka, Kitanaka, Tsujimura, Terada, & Takemura, 2001; Lin, Sakai, & Jouvet, 1988; Malmberg-Aiello et al., 1997), also improved LTM reten-

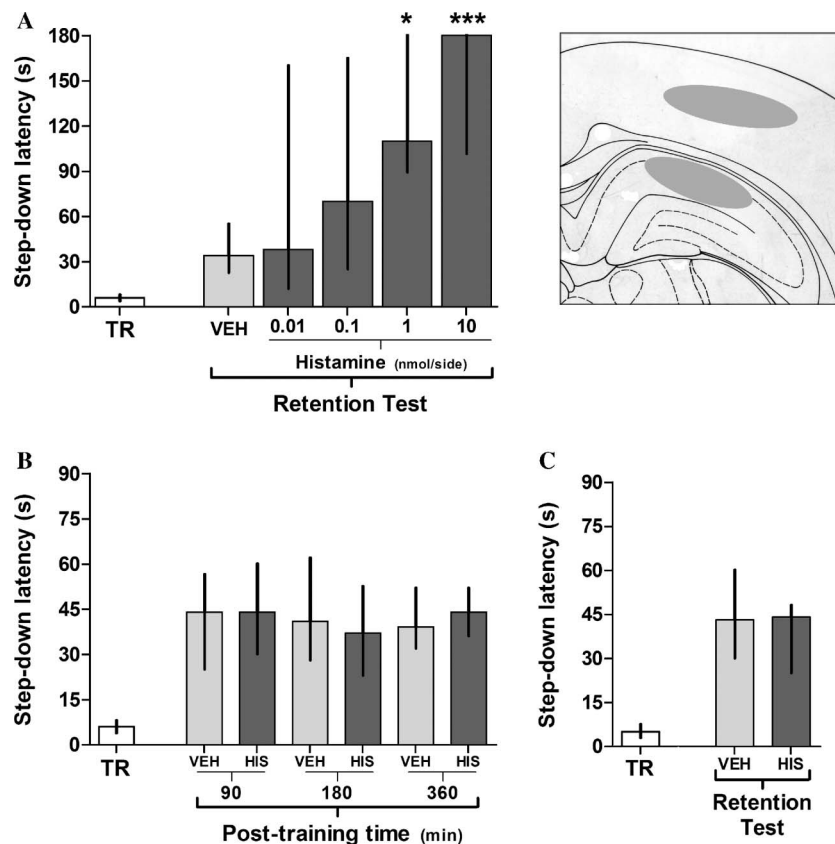


Fig. 1. Infusion of histamine and of the histamine *N*-methyltransferase inhibitor SKF-91844 into the CA1 region of the dorsal hippocampus enhances consolidation of inhibitory avoidance memory. (A) Histamine (0.01, 0.1, 1 or 10 nmol/side) was bilaterally infused (0.8 μ l) into the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately after inhibitory avoidance training. Bars represent median (\pm interquartile range) of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training, $n = 14$ per group; $*p < .05$ and $***p < .001$ vs. vehicle (VEH) in Dunn's comparison after Kruskal–Wallis test. TR = training. The right panel of the figure depicts a schematic drawing taken from the atlas of Paxinos and Watson (1986) showing the location of the infusion sites in the CA1 region of the dorsal hippocampus and in the mediolateral occipital cortex (see C). (B) Histamine (HIS; 10 nmol/side) was bilaterally infused (0.8 μ l) into the CA1 region of the dorsal hippocampus at different times (90, 180, and 360 min) after inhibitory avoidance training. Bars represent median (\pm interquartile range) of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training, $n = 10$ –12 per group. TR = training. (C) Histamine (HIS; 10 nmol/side) was bilaterally infused (0.8 μ l) into the mediolateral occipital cortex immediately after inhibitory avoidance training. Bars represent median (\pm interquartile range) of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training, $n = 8$ per group. TR = training.

tion when infused into CA1 immediately after IA training ($p < .01$ vs. vehicle in Mann–Whitney U test; Fig. 2A). Neither histamine (10 nmol/side) nor SKF-91844 (50 nmol/side) affected IA memory retrieval when given into CA1 15 min before a retention test session carried out 24 h post-training (Fig. 2B). Histamine (10 nmol/side) and SKF-91844 (50 nmol/side) did not modify the number of crossings and rearings in an open field and did not change the total number of entries into the four arms or the number of entries and the time spent into the open arms of an elevated plus maze when given into dorsal CA1 24 h before the respective behavioral session (Table 1).

In the CA1 region, histamine can interact with H_1 , H_2 or H_3 receptors, all of them expressed in the hippocampal formation (Lozada et al., 2005). In addition, histamine

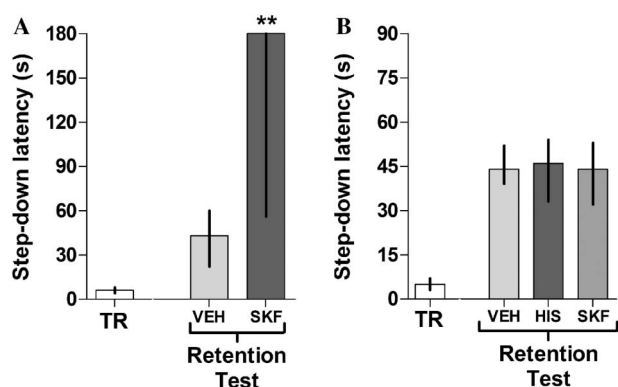


Fig. 2. Infusion of the histamine N -methyltransferase inhibitor SKF-91844 into the CA1 region of the dorsal hippocampus enhances consolidation of inhibitory avoidance memory. (A) SKF-91844 (SKF; 50 nmol/side) was bilaterally infused (0.8 μ l) into the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately after inhibitory avoidance training. Bars represent median (\pm interquartile range) of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training, $n = 10$ per group; ** $p < .01$ vs. vehicle (VEH) in Mann–Whitney U test. TR = training. (B) Animals were trained in IA and histamine (HIS; 10 nmol/side) or SKF-91844 (SKF; 50 nmol/side) were bilaterally infused (0.8 μ l) into the CA1 region of the dorsal hippocampus 15 min before a memory retention test session carried out 24 h after training. Bars represent median (\pm interquartile range) of step-down latencies during that retention test session, $n = 9$ –10 per group. TR = training.

Table 1

Infusion of histamine into the CA1 region of the dorsal hippocampus has no effect on locomotor and exploratory activities or anxiety state at the time of retention testing

	VEH ($n = 9$)	HIS ($n = 9$)
Rearings	17.2 \pm 2.9	16.1 \pm 2.7
Crossings	58.0 \pm 9.4	57.9 \pm 12.6
Time in open arms (min)	1.7 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2
Entries in open arms	5.0 \pm 1.1	4.6 \pm 0.9
Total entries	10.0 \pm 1.8	9.6 \pm 1.4

Histamine (HIS; 10 nmol/side) was bilaterally infused (0.8 μ l) into the CA1 region of the dorsal hippocampus 24 h before submitting rats to open field or plus maze sessions. Data are expressed as mean (\pm SEM) of the number of crossings and rearings (Open field; $n = 9$) and of the total number of entries, the number of entries into the open arms and the time spent in the open arms (Plus maze; $n = 9$). VEH = vehicle. A different set of animals was utilized for each behavioral test.

can directly bind to the polyamine-binding site of the NMDAR (Brown et al., 2001; Nishiga & Kamei, 2003; Williams, 1994). Since activation of H_1 , H_2 , and H_3 receptors can induce opposite neuronal responses (Haas & Panula, 2003) and activation of the NMDAR polyamine-binding site plays a facilitatory role in hippocampal LTP and modulates memory acquisition (Chida, Saito, & Abe, 1992; Clayton, Mesches, Alvarez, Bickford, & Browning, 2002; Conway, 1998; Kishi, Ohno, & Watanabe, 1998; Mikolajczak et al., 2002), we studied the individual participation of these receptors in the facilitatory effect of intra-CA1 histamine. Neither the H_1 antagonist pyrilamine (10–50 nmol/side) nor the H_2 antagonist ranitidine (10–50 nmol/side), the H_3 antagonist thioperamide (10–50 nmol/side) or the antagonist at the polyamine-binding site of the NMDAR ifenprodil (10–50 nmol/side) affected memory retention when injected into CA1 immediately after IA training (Fig. 3). However, intra-CA1 ranitidine (50 nmol/side), but not pyrilamine, thioperamide or ifenprodil, completely abolished the promnesic action of histamine when co-infused with this monoamine immediately post-training ($p < .05$ vs. HIS in Dunn's comparisons after Kruskal–Wallis test), suggesting that the memory enhancing action of histamine is mediated by activation of H_2 receptors (Fig. 4). In full support of this hypothesis we found that, when co-infused into CA1 immediately after training, ranitidine (50 nmol/side) also blocked the facilitatory effect of SKF-91844 (50 nmol/side; $p < .05$ vs. SKF-91844 in Dunn's comparisons after Kruskal–Wallis test; Fig. 5A) and that the H_2 receptor agonist dimaprit (10 nmol/side) significantly increased IA memory retention when given into CA1 right after training ($p < .01$ vs. vehicle in Mann–Whitney U test; Fig. 5B).

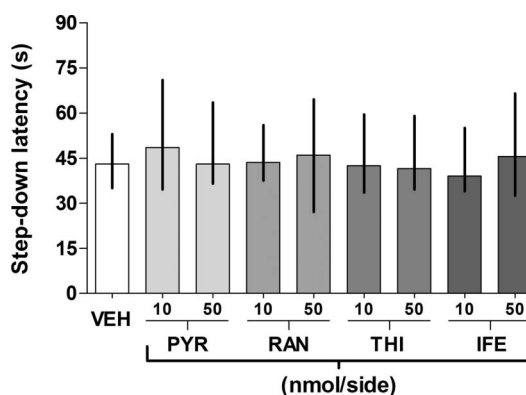


Fig. 3. Antagonists of H_1 , H_2 , and H_3 receptors or of the NMDAR polyamine-binding site have no effect on inhibitory avoidance memory consolidation. The H_1 antagonist pyrilamine (PYR), the H_2 antagonist ranitidine (RAN), and the H_3 antagonist thioperamide (THI) or the antagonist at the polyamine-binding site of the NMDAR ifenprodil (IFE) were bilaterally infused (0.8 μ l) into the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately after inhibitory avoidance training at 10–50 nmol/side. Bars represent median (\pm interquartile range) of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training, $n = 8$ –9 per group; VEH = vehicle.

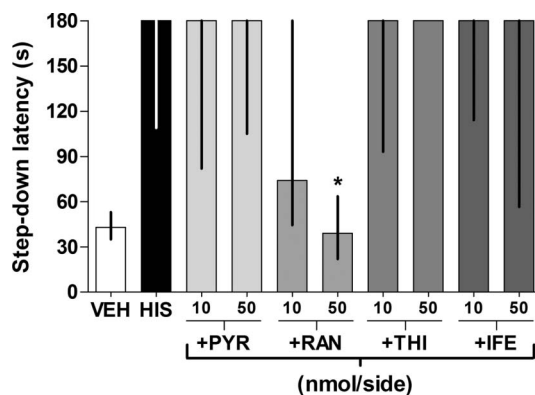


Fig. 4. The promnesic effect induced by the intra-CA1 infusion of histamine is blocked by H_2 but not H_1 , H_3 or NMDAR polyamine binding site antagonists. Animals trained in the inhibitory avoidance task received bilateral intra-CA1 infusions (0.8 μ l) of vehicle (VEH), histamine (HIS; 10 nmol/side) or histamine (10 nmol/side) plus two different doses (10 or 50 nmol/side) of pyrilamine (+PYR), ranitidine (+RAN), thioperamide (+THI) or ifenprodil (+IFE) immediately after training. Memory was evaluated in a retention test session carried out 24 h thereafter. Bars represent median (\pm interquartile range) of test step-down latencies. $n = 9$ per group; * $p < .05$ vs. HIS in Dunn's comparison after Kruskal–Wallis test.

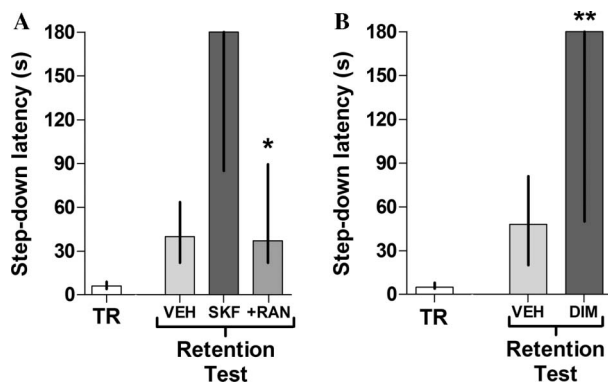


Fig. 5. Ranitidine blocks the facilitatory action of SKF-91844 which is mimicked by the H_2 receptor agonist dimaprit. (A) Animals trained in the inhibitory avoidance task received bilateral intra-CA1 infusions (0.8 μ l) of vehicle (VEH), SKF-91844 (SKF; 50 nmol/side) or SKF-91844 (50 nmol/side) plus ranitidine (+RAN; 50 nmol/side) immediately after training. Memory retention was evaluated in a retention test session carried out 24 h thereafter. Bars represent median (\pm interquartile range) of test step-down latencies. $n = 9$ per group; * $p < .05$ vs. SKF in Dunn's comparison after Kruskal–Wallis test. TR = training. (B) Animals trained in the inhibitory avoidance task received bilateral intra-CA1 infusions (0.8 μ l) of vehicle (VEH), or dimaprit (DIM; 10 nmol/side) immediately after training. Memory retention was evaluated in a retention test session carried out 24 h thereafter. Bars represent median (\pm interquartile range) of test step-down latencies. $n = 11$ –12 per group; ** $p < .01$ vs. VEH in Mann–Whitney U test. TR = training.

4. Discussion

Our data show that, when infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus, histamine improved IA memory retention in a dose-dependent manner, an effect mimicked by increasing endogenous histamine levels in the CA1

region through inhibition of histamine N -methyltransferase with SKF-91844. This facilitatory action was only observed when histamine was administered immediately but not 90, 180 or 360 min after training suggesting that the promnesic effect of this amine is due to a time-dependent enhancement of the consolidation process and not a consequence of a delayed action on memory retrieval or of a tardy effect on locomotor and exploratory activities. This assertion is further reinforced by results showing that histamine did not alter IA memory expression when given into CA1 15 min before a retrieval test and did not modify the performance in an elevated plus maze and in open field when administered 24 h before the respective behavioral session. In addition, the fact that histamine did not affect memory consolidation when infused into the mediolateral occipital cortex, right above CA1 and in the same cannula track, demonstrates that the histamine-induced promnesic effect is specifically due to its action on the dorsal CA1 region of the hippocampus and not the result of capillary diffusion of the infusate to adjacent areas.

Our results differ from previous reports indicating either that intracerebroventricular histamine blocks aversive memory formation (Eidi et al., 2003; Zarrindast et al., 2002) or that this biogenic amine impairs active avoidance memory retention through a H_1 receptor-dependent mechanism when given into the ventral hippocampus but has no effect whatsoever when infused into dorsal CA1 (Alvarez, Ruarte, & Banzan, 2001). However, our data are in partial agreement with others showing that the stereotaxically localized micro-infusion of H_2 and H_3 agonist in the CA3 region of the hippocampus improves retention of the memory associated with a contextual fear conditioning procedure (Giovannini et al., 2003). These and other discrepancies found in the literature suggest that the effects of histamine and histamine-receptor specific agonists and antagonists on memory consolidation are highly dependent on methodological issues, including time and way of administration of the compounds under scrutiny as well as strength, frequency, and nature of the reinforcer and type of conditioned response that is being evaluated, something that is surely related to the fact that, in view of the opposite effects produced by activation of the different histamine-receptor subtypes, the final action of histamine in a network is not clearly predictable, at least not on the basis of individual cellular actions alone (Haas & Panula, 2003).

IA memory consolidation requires the normal functionality of the NMDAR, promotes the activation of several signaling cascades coupled to this receptor in dorsal CA1, including the ERK1/2 mediated pathway, (Cammarota et al., 2000; Cammarota et al., 2000) and it can be enhanced by agonist at the NMDAR polyamine-binding motif (Berlese et al., 2005). However, despite the fact that (a) H_1 receptor activation reduces the Mg^{2+} block of the NMDAR (Payne & Neuman, 1997), (b) histamine can also cause a direct facilitation of NR2B subunit containing receptors through its polyamine modulatory site (Bekkers, 1993; Vorobjev et al., 1993), and (c) H_3 receptor agonists may

increase ERK1/2 activation in CA3 neurons (Giovannini et al., 2003), neither the H₁ antagonist pyrilamine nor the polyamine binding site inhibitor ifenprodil or the H₃ blocker thioperamide reversed the facilitatory action of intra-CA1 histamine. These results, together with those others showing that the facilitation induced by histamine and SKF-91844 was blocked by ranitidine and mimicked by dimaprit, clearly indicate that the promnesic effect of this neurotransmitter is not due to its interaction with H₁ and H₃ receptors or binding to the polyamine-binding site of the NMDAR but, rather, to the direct activation of H₂ receptors.

What intracellular effectors are responsible for the H₂ receptor-dependent memory enhancement induced by intra-CA1 histamine? Since in the brain H₂ receptor-mediated responses occur through stimulation of adenylyl cyclase and the subsequent increase in cAMP intracellular levels and PKA activation (Baudry, Martres, & Schwartz, 1975), a likely candidate is the cAMP/PKA pathway. Although it is noteworthy that when infused alone ranitidine, pyrilamine, thioperamide, and ifenprodil did not affect memory retention which suggests that endogenous histamine does not play a critical role in IA memory consolidation, it is possible that through upregulation of the signaling pathways coupled to H₂ receptors, exogenous histamine induced an upward shift in the activation state of the PKA cascade enhancing memory consolidation. H₂ receptor activation induces a long-lasting hyperpolarization and regulates the accommodation of action potential firing in hippocampal pyramidal neurons, increasing the number of action potentials fired in response to a typical depolarization through a cAMP and PKA-dependent mechanism (Haas & Konnerth, 1983). Indeed, synaptic transmission is potentiated for many hours in hippocampal slices after a short incubation with histamine or the H₂ receptor agonist impromidine (Brown et al., 2001; Selbach et al., 1997). It is known that learning of the IA response rapidly increase cAMP levels and activates hippocampal PKA. Moreover, IA memory consolidation is blocked by PKA inhibitors and enhanced by intra-CA1 infusions of both the non-hydrolyzable cAMP analog 8-Br-cAMP and the adenylyl cyclase activator forskolin (Bernabeu et al., 1997; Izquierdo et al., 2000). Further experiments are in due course to comprehend the biochemical consequences of hippocampal H₂ receptors activation during memory consolidation.

Acknowledgments

This work was supported by ANPCyT and CONICET, Argentina and CNPq, FAPERGS, and CAPES, Brazil.

References

Alvarez, E. O., & Banzan, A. M. (1995). 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*, *101*, 201–211.

- Alvarez, E. O., & Ruarte, M. B. (2002). Histaminergic neurons of the ventral hippocampus and the baso-lateral amygdala of the rat: Functional interaction on memory and learning mechanisms. *Behavioural Brain Research*, *128*, 81–90.
- Alvarez, E. O., Ruarte, M. B., & Banzan, A. M. (2001). Histaminergic systems of the limbic complex on learning and motivation. *Behavioural Brain Research*, *124*, 195–202.
- Baldi, E., Bucherelli, C., Schunack, W., Cenni, G., Blandina, P., & Passani, M. B. (2005). The H3 receptor protean agonist proxyfan enhances the expression of fear memory in the rat. *Neuropharmacology*, *48*, 246–251.
- Baudry, M., Martres, M. P., & Schwartz, J. C. (1975). H1 and H2 receptors in the histamine-induced accumulation of cyclic AMP in guinea pig brain slices. *Nature*, *253*, 362–364.
- Bekkers, J. M. (1993). Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Science*, *261*, 104–106.
- Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Carati, M. C., Guerra, G. P., Stiegemeier, J. A., Mello, C. F., et al. (2005). Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *83*, 48–53.
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., et al. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, *94*, 7041–7046.
- Bevilacqua, L. R., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2003). 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*, *17*, 897–902.
- Brown, R. E., Fedorov, N. B., Haas, H. L., & Reymann, K. G. (1995). Histaminergic modulation of synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology*, *34*, 181–190.
- Brown, R. E., & Haas, H. L. (1999). On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. *Journal of Physiology (London)*, *515*, 777–783.
- Brown, R. E., Stevens, D. R., & Haas, H. L. (2001). The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology*, *63*, 637–672.
- Cammarota, M., de Stein, M. L., Paratcha, G., Bevilacqua, L. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2000). Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus. *Neurochemical Research*, *25*, 567–572.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Ardenghi, P., Paratcha, G., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., et al. (2000). 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*, *76*, 36–46.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Kerr, D., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). 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*, *23*, 737–741.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Kohler, C., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Learning twice is different from learning once and from learning more. *Neuroscience*, *132*, 273–279.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2004). Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning and Memory*, *11*, 572–578.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Rossato, J. I., Ramirez, M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, *84*, 25–32.
- Chen, Z., Sugimoto, Y., & Kamei, C. (1999). Effects of intracerebroventricular injection of alpha-fluoromethylhistidine on radial maze performance in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *64*, 513–518.
- Chida, N., Saito, H., & Abe, K. (1992). Spermine facilitates the generation of long-term potentiation of evoked potential in the dentate gyrus of anesthetized rats. *Brain Research*, *593*, 57–62.
- Clayton, D. A., Mesches, M. H., Alvarez, E., Bickford, P. C., & Browning, M. D. (2002). A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related

- changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *Journal of Neuroscience*, 22, 3628–3637.
- Conway, E. L. (1998). Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. *Brain Research*, 800, 10–20.
- De Almeida, M. A., & Izquierdo, I. (1986). Memory facilitation by histamine. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 283, 193–198.
- De Almeida, M. A., & Izquierdo, I. (1988). Intracerebroventricular histamine, but not 48/80, causes post-training memory facilitation in the rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 291, 202–207.
- Di Carlo, G., Ghi, P., & Orsetti, M. (2000). Effect of R(-)-alpha-methylhistamine and thioperamide on in vivo release of norepinephrine in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacological and Biological Psychiatry*, 24, 275–284.
- Eidi, M., Zarrindast, M. R., Eidi, A., Oryan, S., & Parivar, K. (2003). Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *European Journal of Pharmacology*, 465, 91–96.
- Gatti, P. J., & Gertner, S. B. (1984). The effect of intrahypothalamic injection of homodimiprit on blood pressure. *Neuropharmacology*, 23, 663–670.
- Giovannini, M. G., Efooudebe, M., Passani, M. B., Baldi, E., Bucherelli, C., Giachi, F., et al. (2003). Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *Journal of Neuroscience*, 23, 9016–9023.
- Haas, H., & Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 121–130.
- Haas, H. L., & Konnerth, A. (1983). Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. *Nature*, 302, 432–434.
- Horton, J. R., Sawada, K., Nishibori, M., & Cheng, X. (2005). Structural basis for inhibition of histamine N-methyltransferase by diverse drugs. *Journal of Molecular Biology*, 353, 334–344.
- Hough, L. B., Khandelwal, J. K., & Green, J. P. (1984). Histamine turnover in regions of rat brain. *Brain Research*, 291, 103–109.
- Huston, J. P., Wagner, U., & Hasenohrl, R. U. (1997). The tuberomammillary nucleus projections in the control of learning, memory and reinforcement processes: Evidence for an inhibitory role. *Behavioural Brain Research*, 83, 97–105.
- Izquierdo, I., Cammarota, M., Medina, J. H., & Bevilaqua, L. R. (2004). Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: A general view. *Neural Plasticity*, 11, 159–189.
- Izquierdo, L. A., Vianna, M., Barros, D. M., Mello e Souza, T., Ardenghi, P., Sant'Anna, M. K., et al. (2000). Short- and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 73, 141–149.
- Kamei, C., & Tasaka, K. (1993). Effect of histamine on memory retrieval in old rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 16, 128–132.
- Khandelwal, J. K., Hough, L. B., & Green, J. P. (1984). Regional distribution of the histamine metabolite, tele-methylimidazoleacetic acid, in rat brain: Effects of pargyline and probenecid. *Journal of Neurochemistry*, 42, 519–522.
- Kishi, A., Ohno, M., & Watanabe, S. (1998). Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. *Neuroscience Letters*, 257, 131–134.
- Kitanaka, J., Kitanaka, N., Tsujimura, T., Terada, N., & Takemura, M. (2001). Histamine N-methyltransferase regulates histamine-induced phosphoinositide hydrolysis in guinea pig cerebellum. *Neuroscience Letters*, 308, 5–8.
- Knoche, A., Yokoyama, H., Ponomarenko, A., Frisch, C., Huston, J., & Haas, H. L. (2003). High-frequency oscillation in the hippocampus of the behaving rat and its modulation by the histaminergic system. *Hippocampus*, 13, 273–280.
- Lin, J. S., Sakai, K., & Jouvett, M. (1988). Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. *Neuropharmacology*, 27, 111–122.
- Lozada, A., Munyao, N., Sallmen, T., Lintunen, M., Leurs, R., Lindsberg, P. J., et al. (2005). Postischemic regulation of central histamine receptors. *Neuroscience*, 136, 371–379.
- Lynch, G. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84, 87–136.
- Malmberg-Aiello, P., Lamberti, C., Ipponi, A., Hanninen, J., Ghelardini, C., & Bartolini, A. (1997). Effects of two histamine-N-methyltransferase inhibitors, SKF 91488 and BW 301 U, in rodent antinociception. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 355, 354–360.
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 897–931.
- McCormick, D. A., & Williamson, A. (1991). 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, 3188–3199.
- Mikolajczak, P., Okulicz-Kozaryn, I., Kaminska, E., Niedopad, L., Polanska, A., & Gebka, J. (2002). Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, 444, 83–96.
- Munakata, M., & Akaike, N. (1994). Regulation of K⁺ conductance by histamine H1 and H2 receptors in neurones dissociated from rat neostriatum. *Journal of Physiology (London)*, 480, 233–245.
- Nishiga, M., & Kamei, C. (2003). Ameliorative effects of histamine on 7-chlorokynurenic acid-induced spatial memory deficits in rats. *Psychopharmacology*, 166, 360–365.
- Nyberg, L. (2005). Any novelty in hippocampal formation and memory? *Current Opinion in Neurology*, 18, 424–428.
- Panula, P., Pirvola, U., Auvinen, S., & Airaksinen, M. S. (1989). Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience*, 28, 585–610.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, USA: Academic Press.
- Payne, G. W., & Neuman, R. S. (1997). Effects of hypomagnesia on histamine H1 receptor-mediated facilitation of NMDA responses. *British Journal of Pharmacology*, 121, 199–204.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149–167.
- Ponomarenko, A. A., Knoche, A., Korotkova, T. M., & Haas, H. L. (2003). Aminergic control of high-frequency network oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuroscience Letters*, 348, 101–104.
- Prell, G. D., Hough, L. B., Khandelwal, J., & Green, J. P. (1996). Lack of a precursor-product relationship between histamine and its metabolites in brain after histidine loading. *Journal of Neurochemistry*, 67, 1938–1944.
- Reiner, P. B., & Kamondi, A. (1994). Mechanisms of antihistamine induced sedation in the human brain: H1 receptor activation reduces a background leakage potassium current. *Neuroscience*, 59, 579–588.
- Sakai, N., Sakurai, E., Sakurai, E., Yanai, K., Mirua, Y., & Watanabe, T. (1998). Depletion of brain histamine induced by alpha-fluoromethylhistidine enhances radial maze performance in rats with modulation of brain amino acid levels. *Life Sciences*, 62, 989–994.
- Schlicker, E., Behling, A., Lummen, G., & Gothert, M. (1992). Histamine H3A receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 345, 489–493.
- Selbach, O., Brown, R. E., & Haas, H. L. (1997). Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP. *Neuropharmacology*, 36, 1539–1548.
- Vorobjev, V. S., Sharonova, I. N., Walsh, I. B., & Haas, H. L. (1993). Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron*, 11, 837–844.
- Williams, K. (1994). Subunit-specific potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors by histamine. *Molecular Pharmacology*, 46, 531–541.
- Zarrindast, M. R., Eidi, M., Eidi, A., & Oryan, S. (2002). Effects of histamine and opioid systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *European Journal of Pharmacology*, 452, 193–197.