

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

CLARICE KRÁS BORGES DA SILVEIRA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS NA CONSOLIDAÇÃO  
DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM RATOS**

**PORTO ALEGRE**

**2011**

CLARICE KRÁS BORGES DA SILVEIRA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS NA CONSOLIDAÇÃO  
DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM RATOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção de grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de concentração Neurociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Iván Antônio Izquierdo

**Porto Alegre**

**2011**

CLARICE KRÁS BORGES DA SILVEIRA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS NA CONSOLIDAÇÃO  
DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM RATOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Faculdade de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Dr. Fernando Benetti - PUCRS

---

Dra. Jociane Carvalho Myskiw - PUCRS

---

Dra. Júlia Helena Rosauo Clarke - PUCRS

---

Dra. Pâmela Billig Mello Carpes – UNIPAMPA

Dedico esta tese ao meu marido, meu irmão e meus pais,  
pelo constante apoio e incentivo nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Martin Cammarota pelo acolhimento, conselhos e ensinamentos no laboratório.

Ao professor Ivan Izquierdo, orientador e mestre, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela atenção e carinho nesta caminhada.

Às professoras Janine Rossato e Lia Bevilaqua pela confiança. A nine, em especial, pelo exemplo, força e orientação em todos os momentos no laboratório.

Ao meu esposo, Rubens, pelo amor e total apoio em mais esta etapa da nossa vida.

Aos meus pais, queridos, pela confiança e dedicação nesses anos todos.

Ao meu irmão, pela sabedoria e apoio, mesmo que de longe.

Aos colegas de laboratório um obrigado muito especial pelo apoio, compreensão e ajuda na realização dos experimentos e deste trabalho. Quero fazer um agradecimento especial a Cristiane, minha “irmã” de reconhecimento de objetos, pelas milhares de horas passadas na sala de experimentos. A Siomara pela amizade, apoio e pela ajuda no desenvolvimento do trabalho. A Jociane pelos ensinamentos e conversas na salinha do *fear* e pelo suporte técnico que só tu sabes. Ao Cristiano pelos ensinamentos estatísticos e pela parceria nas muitas idas ao Idéia. Ao Fernando pelos papos histaminérgicos no lab 64. À Juliana, Weber, Ramón, Natália, Pâmela, Júlia, Andressa, Dagieli, Jéssica, Gabriela e Lucas que estiveram presentes nessa caminhada e deram o apoio necessário para que eu pudesse concluí-la. Muuuuito obrigada!

A todos os colegas, amigos, professores e orientadores que fizeram parte e contribuíram para a minha caminhada.

Aos membros do Instituto de Pesquisas Biomédicas-IPB pela atenção e ajuda constante.

À secretaria da pós-graduação da Medicina, principalmente à Vanessa e ao Ernesto pela infinita paciência e presteza.

Ao CNPq por financiar meus estudos.

Muito Obrigada,  
Clarice

## RESUMO

A histamina cerebral tem sido relacionada ao estado de estímulo, excitação e reforço. Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que os receptores de histamina localizados no hipocampo modulam o aprendizado e a memória da extinção do medo e de processos aversivos. Portanto, para determinar o papel dos receptores histaminérgicos na consolidação da memória, ratos Wistar machos adultos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de reconhecimento de objetos que envolve a exposição do rato a dois diferentes objetos. Imediatamente, 30, 120 ou 360 min após o treino os animais foram infundidos (1 µl/lado) com agonistas ou antagonistas dos receptores histaminérgicos. 24 horas após o treino, os animais foram expostos a um objeto familiar e um objeto novo, para avaliar a consolidação das memórias. A ranitidina, antagonista do receptor H<sub>2</sub> e o imetit, agonista do receptor H<sub>3</sub>, bloquearam a consolidação da memória quando infundidos na janela de tempo de 30 a 120 min. No entanto não afetaram o comportamento exploratório, estado de ansiedade ou funcionalidade do hipocampo. Nossos dados indicam que o sistema histaminérgico está envolvido na consolidação da memória de reconhecimento de objetos em ratos.

**Palavras chave:** Memória. Consolidação. Histamina. Hipocampo. Reconhecimento de Objetos.

## ABSTRACT

The histamine system of the brain has been implicated in both arousal and reinforcement. Previous evidence from our laboratory has shown that histamine receptors located into the hippocampus modulate learning and memory on the fear extinction and aversive processes. Therefore, to determine the role of hippocampal histaminergic receptors on recognition memory, adult male Wistar rats with infusion cannulae stereotaxically aimed to the CA1 region of dorsal hippocampus were trained in an object recognition learning task involving exposure to two different stimulus objects. Immediately, 30, 120 or 360 min after training, they received (1µl/side) agonist and antagonist from histamine receptors. Memory retention was assessed 24 hours after training. In the test session, one of the objects presented during training was replaced by a novel one. When infused in the CA1 region the ranitidine, H2 receptor antagonist, and imetit, H3 receptor agonist, blocked long-term memory retention in a time-,dose-dependent manner (30 to 120 min) without affecting exploratory behavior, anxiety state or the functionality of the hippocampus. Our data indicate that histaminergic system is involved in consolidation of object recognition memory.

**Key words:** Histamine. Memory. Consolidation. Histamine. Hippocampus. Object Recognition.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Sistema histaminérgico e suas principais projeções no SNC vistos em uma secção sagital do encéfalo de rato .....	16
<b>Figura 2</b> Síntese, transporte e metabolismo de histamina em neurônios.....	18
<b>Figura 3</b> Dinâmica da histamina neuronal. ....	19
<b>Figura 4</b> Aparato utilizado na cirurgia de esterotaxia.....	24
<b>Figura 5</b> Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de RO.....	25
<b>Figura 6</b> Esquema ilustrativo dos protocolos de tr e teste do paradigma de RO .....	26
<b>Figura 7</b> Fotografia de um rato explorando o campo aberto.....	27
<b>Figura 8</b> Fotografia de um rato sendo submetido à tarefa de Labirinto em Cruz Elevado .....	28
<b>Figura 9</b> Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas.....	29
<b>Figura 10</b> Desenho do cérebro de rato mostrando a localização da implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. ....	30
<b>Figura 11</b> Pirilamina não prejudica a consolidação da memória de RO .....	32
<b>Figura 12</b> Thioperamida não prejudica a consolidação da memória de RO. ....	32
<b>Figura 13</b> Ranitidina prejudica a consolidação da memória de RO .....	34
<b>Figura 14</b> Imetit prejudica a consolidação da memória de RO .....	34



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram.....	12
<b>Tabela 2</b> Classificação das MLD de acordo com o conteúdo .....	13
<b>Tabela 3</b> Infusão na região CA1 do hipocampo dorsal de agonistas e antagonistas de receptores histaminérgicos.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – acetilcolina

AP – Antero-posterior

CA1, CA2 e CA3 – Corno de Amon 1, 2, e 3

DA – Doença de Alzheimer

DV – Dorso ventral

EI – Esquiva Inibitória

GABA - Ácido Gama-Aminobutírico

5-HT1A – subtipo do receptor 5-HT serotonina

LL – Latero-lateral

LTP – Potenciação de Longa Duração

M1 – Receptor muscarínico

nTM – núcleo túbero-mamilar

SNC – Sistema Nervoso Central

Tr – Treino

Min – minutos

MCD – Memória de curta duração

MLD – Memória de longa duração

RO – Reconhecimento de Objetos

Vmat-2 – Enzima Vesicular Transportadora de Monoaminas, Isoforma 2,

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	Memória.....	11
1.2	Classificações das Memórias .....	12
1.3	O hipocampo e seu papel na formação de memórias.....	14
1.4	Sistema Histaminérgico .....	16
1.5	A tarefa de Reconhecimento de Objetos .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	23
3.1	Experimentos comportamentais .....	23
3.1.1	Animais Experimentais .....	23
3.1.2	Cirurgia Estereotáxica.....	23
3.1.3	Manipulação .....	24
3.1.4	Paradigma de reconhecimento de objetos.....	24
3.1.5	Protocolo de treino do paradigma de reconhecimento de objetos .....	26
3.1.6	Campo Aberto.....	26
3.1.7	Labirinto em Cruz Elevado.....	27
3.1.8	Tratamentos farmacológicos.....	28
3.1.9	Controle histológico da região estudada.....	29
3.2	Análise Estatística.....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	31
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
	<b>ANEXO</b> .....	48

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Memória

A memória caracteriza-se pela aquisição, formação, conservação e evocação de informações, sendo que o acervo de memórias é que faz de cada indivíduo um ser único, no qual o conjunto de memórias, proporcionadas pela experiência de vida, determina o que chamamos de personalidade (Izquierdo, 2002). O conjunto de memórias é que faz com que sejamos aquilo que recordamos, pois só podemos fazer e expressar algo que temos conhecimento, que está em nossa memória.

Entretanto, de todas as informações processadas pelo sistema nervoso, apenas algumas são de fato retidas por longos períodos. A maioria nem sequer é adquirida, sendo filtrada por mecanismos atencionais e emocionais. Dentre aquelas que são adquiridas, apenas algumas são consolidadas e mesmo dentre estas, muitas são esquecidas. Apenas as informações mais relevantes, mais marcantes emocionalmente, mais focalizadas pela atenção ou mais fortes sensorialmente são as que perdurarão por um tempo maior. Estes aspectos farão com que o acervo de informações que constitui a memória se diferencie de acordo com vários critérios como função, conteúdo e tempo de duração, no qual as memórias armazenadas por poucas horas são chamadas de curta duração, as que permanecem por horas, dias ou anos são as de longa duração (Tabela 1).

Pode-se dizer que não existe memória sem que antes aconteça o aprendizado ou fase de aquisição. A fase de aquisição refere-se ao momento em as informações, habilidades ou experiências a respeito do mundo são adquiridas (Squire e Petersen, 1987). Os eventos ocorridos no passado orientam a percepção do presente e são estratégias determinantes de adaptação e sobrevivência de todas as espécies, e indispensáveis para determinar a individualidade e personalidade do indivíduo (Izquierdo, 2002; Szapiro *et al.*, 2002). No caso específico dos seres humanos, a memória exerce um papel ainda mais nobre, funcionando como uma arca que armazena nossa história pessoal tornando possível o crescimento e as mudanças ao longo da vida (Kandel *et al.*, 2000).

**Tabela 1** Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram

	<b>Tempo de permanência</b>	<b>Características</b>
<b>Memórias Sensoriais</b>	Poucos segundos.	Retêm a breve impressão de um estímulo após este ter desaparecido, ou seja, depois que o sistema sensorial correspondente deixa de enviar informação ao cérebro.
<b>Memórias de Curta Duração (MCD)</b>	Menos de 3 horas.	Permite manter “na mente” e em um estado ativo e facilmente acessível, uma pequena quantidade de informação.
<b>Memórias de Longa Duração (MLD)</b>	Dias, meses, anos,.	Contêm informações de índole diversa, os quais se encontram armazenados de maneira mais ou menos permanente constituindo um sistema de arquivo dinâmico.

(Izquierdo, 2002; ver também McGaugh, 2000)

## 1.2 Classificações das Memórias

Quanto ao seu conteúdo, as memórias são chamadas declarativas e explícitas se forem referentes a fatos, eventos ou conhecimentos que possam ser contados ou relatados e são adquiridas com plena intervenção da consciência; e não-declarativas ou implícitas, quando forem referentes a capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais difíceis de serem declaradas ou descritas (Tabela 2). As memórias declarativas podem ser subdividas em episódicas ou semânticas. As episódicas são aquelas referentes a eventos aos quais assistimos ou participamos, ou seja, são as memórias autobiográficas. As memórias semânticas carregam informações que são de conhecimento geral, como nosso conhecimento sobre medicina, língua portuguesa ou história. As memórias, no entanto, não são adquiridas imediatamente na sua forma definitiva, e durante os primeiros minutos ou horas são suscetíveis à interferência por outras experiências, drogas ou tratamentos (McGaugh, 2000; Izquierdo *et al.*, 2006).

**Tabela 2** Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo

	Características	Subdivisões e características	
<b>Explícitas/ Declarativas</b>	Informações que usualmente sabemos que possuímos e a qual temos acesso consciente.	<i>Episódicas</i>	Guardam informações acerca de nossa própria vida e eventos.
		<i>Semânticas</i>	Armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos.
<b>Implícitas/ Não-declarativas</b>	Informações às quais não temos acesso consciente, tal como a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles derivados pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação.	<i>Representação perceptual</i>	Representações (imagens, sons) sem significado aparente conhecido, mas úteis como dicas facilitatórias da evocação de informações inerentes; memória pré-consciente (priming).
		<i>Procedimentos</i>	Hábitos, habilidades, regras.
		<i>Associativa</i>	Associa dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma resposta (condicionamento operante).
		<i>Não associativa</i>	Atenua uma resposta (habituação) ou a aumenta (sensibilização) através da repetição de um mesmo estímulo.

(Izquierdo, 2002)

A formação desses dois tipos de memória depende de diferentes estruturas encefálicas. Enquanto as memórias explícitas requerem a integridade do lobo temporal medial, que compreende o hipocampo, o giro denteado e o complexo subicular juntamente com os córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal; as memórias implícitas envolvem diferentes estruturas como a amígdala, os gânglios da base e o cerebelo (Albright *et al.*, 2000; Lees, Jones e Kandel, 2000; Izquierdo, 2002; Squire *et al.*, 2007).

### 1.3 O hipocampo e seu papel na formação de memórias

O hipocampo é uma estrutura encefálica bilateral localizada no lobo temporal e é um importante componente do sistema límbico, desempenhando um papel fundamental na formação de memórias de curto e longo prazo (Izquierdo *et al.*, 1998a), sendo que diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com o mesmo para regular a aquisição e o armazenamento de nova informação (Izquierdo *et al.*, 1998b).

A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais que compreendem diversas fases e requerem um longo período de tempo. Enquanto esses processos não estiverem concluídos, as memórias de longa duração encontram-se em estado lábil. O conjunto desses processos e o seu resultado final são chamados consolidação. Os mecanismos neurofisiológicos e neuroquímicos dos processos mnemônicos são objeto de estudo de pesquisadores há muito tempo (Izquierdo, 2002; Nader, Schafe e LeDoux , 2000).

A modulação da aquisição e das fases iniciais da consolidação ocorre basicamente ao mesmo tempo, tornando-se difícil distinguir uma da outra. Ela envolve dois aspectos: o primeiro que distingue as memórias com maior carga emocional das demais e faz com que sejam mais bem gravadas, e a segunda, que em determinadas situações, acrescenta informações neuro-humorais ao conteúdo das memórias (McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002).

Sabe-se que a formação de memórias envolve alterações na representação neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre os neurônios. Estes eventos plásticos podem incluir alterações na estrutura, distribuição e no número de sinapses e também alterações morfológicas (Rusakov *et al.*, 1997; Geinisman, 2000).

A consolidação é considerada a etapa final onde o traço mnemônico é convertido em memória de longa duração (Izquierdo, 1989; McGaugh, 2000; Izquierdo *et al.*, 1993, 2006). Durante muito tempo se acreditou que o processo de consolidação acontecia uma única vez para cada traço mnemônico e, conseqüentemente, assumia-se que após consolidadas, as memórias de longa duração se tornavam incapazes de serem modificadas. Porém, na década de 60,

Misanin e colaboradores (1968) apresentaram evidências experimentais sugerindo que ao serem reativadas durante a sua expressão, as memórias de longa duração voltavam a serem susceptíveis à ação amnésica de diversos tratamentos como o eletro choque e o trauma craniano. Estes relatos foram resgatados por Susan Sara e seu grupo que mostraram que as memórias de longa duração, após evocação sem reforço, voltam a serem lábeis e que, para persistirem, necessitam atravessar um processo dependente da síntese protéica, denominado reconsolidação (Nader *et al.*, 2000; Eisenberg e Dudai, 2004; Sara e Hars, 2006). As novas memórias são criadas a partir de experiências passadas, então cada consolidação, ou melhor, reconsolidação, serve para atualizar e reforçar as memórias após a sua evocação (Sara, 2010).

Múltiplas estruturas cerebrais e diversos neurotransmissores e/ou neuromoduladores, como a histamina, estão envolvidos na indução e regulação de estímulos e suas conseqüências comportamentais (Miller e O'Callaghan, 2006). Estudos farmacológicos sugerem que a integridade hipocampal é necessária para a aquisição e armazenamento de informações (Balderas *et al.*, 2008).

O hipocampo é uma das estruturas mais estudadas com relação ao mecanismo da plasticidade sináptica no cérebro (Izquierdo, 2002; Izquierdo *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2008). Participa como veremos, de maneira crucial na consolidação tanto de memórias aversivas como não aversivas, incluindo memória espacial e de reconhecimento de objetos (Broadbent *et al.*, 2009; Clarke *et al.*, 2010). Por isso e devido ao fato do sistema histaminérgico, presente no hipocampo, ter uma atuação importante no sistema nervoso central, optou-se pela escolha desta estrutura e pelo estudo de quais efeitos o sistema histaminérgico exerce sobre a modulação da formação das memórias de longa duração na tarefa de reconhecimento de objetos como base deste estudo.

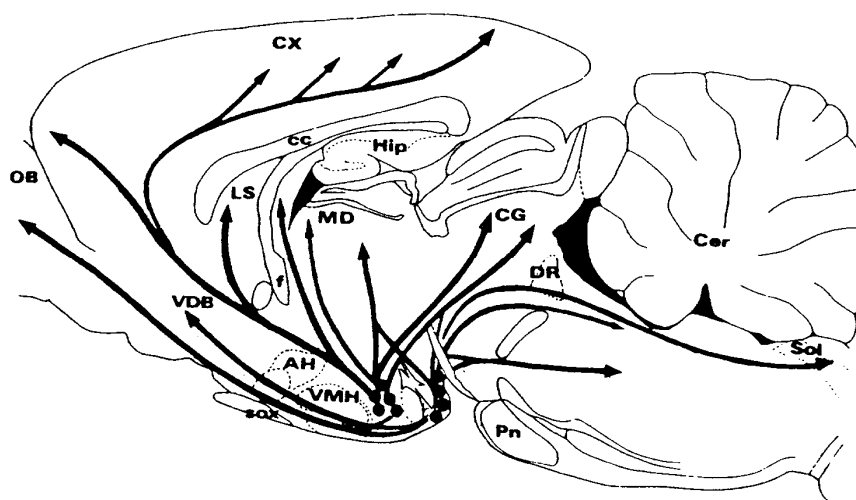
Trabalhos mostram três evidências que indicam que o hipocampo tem um papel chave na memória de reconhecimento de objetos em roedores. Primeiro: lesões seletivas desta estrutura impedem a formação desse tipo de memória (Broadbent *et al.*, 2009). Segundo: a inibição de síntese protéica tanto ribossomo-dependente (Vianna *et al.*, 2003; Rossato *et al.*, 2007) como ribossomo-independente (Myskiw *et al.*, 2007) inibe também a formação dessa memória. Terceiro: como em outras tarefas (Izquierdo *et al.*, 2006), a formação da memória de reconhecimento de objetos gera potenciação de longa duração na sinapse CA3-CA1



do hipocampo, e é ocluída por esta se a mesma é realizada antes da aquisição (Clarke *et al.*, 2010).

#### 1.4 Sistema Histaminérgico

Nos vertebrados, os neurônios produtores de histamina localizam-se no núcleo túberomamilar (nTM), que faz parte do hipotálamo posterior (Haas e Panula, 2003; Haas *et al.*, 2008). As principais terminações nervosas das projeções histaminérgicas diferem levemente entre as espécies, mas elas cobrem essencialmente todas as áreas do sistema nervoso central (SNC), havendo inervação de moderada a densa do córtex cerebral, amígdala, substância negra, estriado, hipocampo e tálamo (Panula e Pirvola, 1989, 1990) (Figura 1).

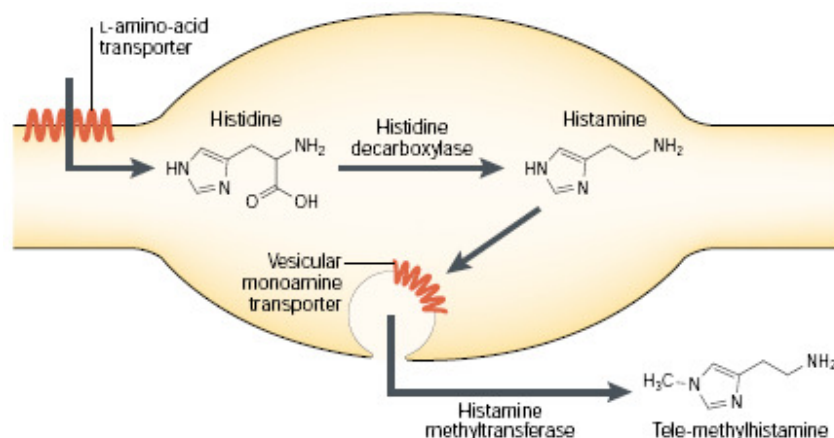


**Figura 1 Sistema histaminérgico e suas principais projeções no SNC vistos em uma secção sagital do encéfalo de rato.** AH, área hipotalâmica anterior; Arc, núcleo arqueado; cc, corpo caloso; Cer, cerebelo; CG, núcleo cinzento central; CX, córtex cerebral; DR, núcleo dorsal da rafe; f, fórnix; Hip,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

As ações da histamina são mediadas por receptores acoplados a proteínas G e diversos segundo-mensageiros, através de quatro tipos de receptores já identificados até o presente momento (H1-H4). Destes, três são expressos abundantemente no cérebro (H1-H3), enquanto o receptor H4, descoberto por Nguyen *et al.* em 2001, é expresso principalmente nos tecidos periféricos, como por exemplo, na medula óssea e nos leucócitos (Haas *et al.*, 2008).

A síntese da histamina ocorre nos neurônios do nTM a partir do aminoácido L-histidina. A L-histidina é transportada para o neurônio pelo transportador de L-aminoácidos presente na membrana celular. Uma vez no citoplasma, a L-histidina é descarboxilada pela enzima específica histidina descarboxilase (Figura 2), originando então a histamina. Esta amina recém produzida é transportada para as vesículas pela enzima vesicular transportadora de monoaminas (VMAT-2). Quando a vesícula se funde com a membrana pré-sináptica após a chegada de um potencial de ação, ocorre liberação de histamina pela terminação axônica. No espaço extracelular, a histamina é metilada pela enzima histamina metil-transferase, localizada nas regiões pós-sinápticas e na glia. Desta metilação resulta a tele-metil-histamina, um metabólito sem atividade biológica conhecida. A velocidade de renovação da histamina neuronal é bastante alta, e sua meia-vida, que normalmente gira em torno de 30 minutos, pode mudar rapidamente dependendo da atividade neuronal. Por exemplo, em situações estressantes, como imobilização forçada ou choque nas patas de ratos, a velocidade de renovação de histamina neuronal aumenta (Ericson, Köhler e Blomqvist, 1991b). A taxa de liberação da histamina, ao contrário de outras aminas biogênicas, é determinada pela biodisponibilidade do seu precursor histidina (Haas *et al.*, 2008).

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 (Brown *et al.*, 2001; Haas e Panula, 2003; Haas *et al.*, 2008). Esta amina também está envolvida na consolidação e extinção de memórias aversivas e no controle de ansiedade (Da Silva *et al.*, 2006; Bonini *et al.*, 2011).



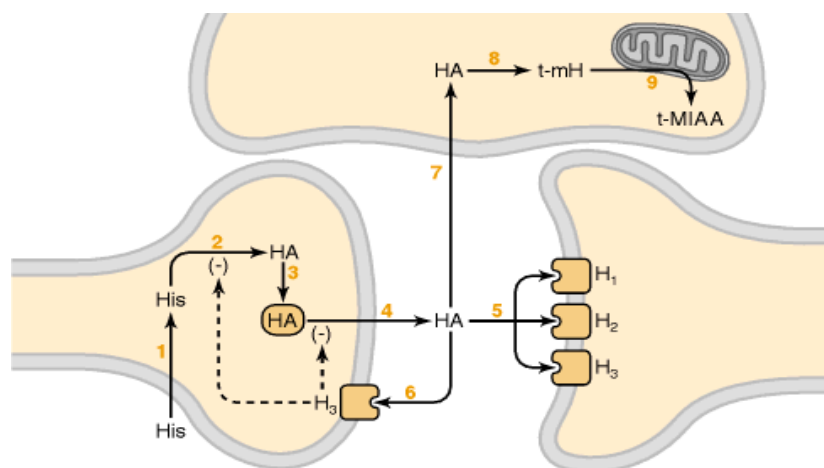
**Figura 2 Síntese, transporte e metabolismo de histamina em neurônios.** A histidina é captada em uma varicosidade e descarboxilada; a histamina é transportada dentro da vesícula, liberada e metilada. Fonte: Haas *et al.*, 2008.

O receptor  $H_1$  é encontrado em todo o corpo e sistema nervoso central com variações entre as espécies. Altas densidades são encontradas em regiões do cérebro com relação ao controle do estado nutricional, comportamental e neuroendócrino, como o hipotálamo, núcleos colinérgicos e aminérgicos do cerebelo, tálamo e córtex. A histamina através dos receptores  $H_1$  consegue excitar neurônios em várias regiões do cérebro incluindo o cerebelo, hipotálamo, tálamo, amígdala, septo, hipocampo, bulbo olfatório e o córtex (Haas *et al.*, 2008). Mesmo sendo bem conhecido que o efeito sedativo de anti-histamínicos produz um declínio na cognição humana através do bloqueio do receptor  $H_1$  (Yanai *et al.*, 1995) o seu efeito tanto na facilidade quanto na inibição do aprendizado e da memória tem sido estudado em animais.

A distribuição do receptor  $H_2$  no cérebro de roedores é generalizada, porém mais consistente do que as projeções histaminérgicas do receptor  $H_1$ , indicando que o receptor  $H_2$  controla um amplo número de ações pós-sinápticas da histamina. No entanto, a co-localização dos receptores  $H_1$  e  $H_2$  em algumas áreas, pode ser responsável pelas interações sinérgicas entre esses subtipos de receptores (Haas *et al.*, 2008). Camundongos deficientes do receptor  $H_2$  exibiram seletivo déficit cognitivo junto com dano de potenciação de longa duração hipocampal (Dai *et al.*, 2007).

Os receptores  $H_3$  são autoreceptores pré-sinápticos encontrados no soma e nos terminais axônicos que regulam a síntese e inibem a liberação de histamina dos neurônios histaminérgicos de ratos (Arrang *et al.*, 1983 - Figura 3). Sabe-se que os

receptores H3 podem funcionar como heteroreceptores (Van der e Timmerman, 1989) e podem regular a inibição induzida pela histamina de neurotransmissores como serotonina, noradrenalina, dopamina e acetilcolina de regiões do cérebro que são cruciais para a manutenção do estado de alerta e de estoques de informação (Brown *et al.*, 2001). A liberação de histamina também sofre ação regulatória de receptores muscarínicos M1 (Gulat Marnay *et al.*, 1989b; Arrang *et al.*, 1991; Prast *et al.*, 1994),  $\alpha$ 2-adrenérgicos (Gulat Marnay *et al.*, 1989a; Arrang *et al.*, 1991; Prast *et al.*, 1991), 5-HT1A (Oishi *et al.*, 1992),  $\kappa$ - e  $\mu$ -opióides (Itoh *et al.*, 1988; Gulat Marnay *et al.*, 1990, Arrang *et al.*, 1991), e de receptores para galanina (Arrang *et al.*, 1991). Experimentos *in-vivo* mostram que o óxido nítrico inibe a liberação de histamina no hipotálamo (Prast *et al.*, 1996).



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

A liberação de histamina demonstra periodicidade, seguindo um ritmo circadiano paralelo à mudança de padrão de disparo dos neurônios histaminérgicos que ocorre durante o ciclo sono-vigília (Mochizuki *et al.*, 1992)

Efeito na melhora da memória pela histamina tem sido sustentado pela administração de histidina, um precursor da histamina, no déficit na memória

induzido pela escopolamina em ratos na tarefa de labirinto em cruz elevado (Miyazaki *et al.*, 1995). Tem-se relatado o papel do receptor H3 na cognição e este mecanismo pode estar associado à interação dos sistemas histaminérgico-colinérgico (Passani *et al.*, 2000).

Experimentos utilizando a tarefa de esQUIVA inibitória mostram que a histamina, quando administrada na região CA1 do hipocampo após sessão de evocação sem reforço, facilita a extinção de memórias. Efeito reproduzido pelo aumento dos níveis de histamina endógenos através da inibição da enzima histidina N-metiltransferase, pela administração de dimaprit, um agonista do receptor H2 (Bonini *et al.*, 2011).

Alguns neurônios histaminérgicos estocam outras substâncias neuroativas e enzimas relacionadas como ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato decarboxilase, adenosina deaminase, substância P e galanina, de maneira específica. No entanto, a liberação destas substâncias dos terminais histaminérgicos não tem sido ainda demonstrada e o significado funcional desta co-localização ainda é desconhecido (Passani *et al.*, 2000).

De Almeida e Izquierdo (1986) encontraram que a administração intracerebroventricular de histamina facilita a retenção da memória na tarefa de esQUIVA inibitória. Porém, Huston e colaboradores (1997) relataram que lesões no nTM de ratos melhora o desempenho em diversos paradigmas de aprendizado e memória. Possivelmente, os efeitos da histamina variam conforme a tarefa e o sítio de injeção (Alvares, 2009).

## **1.5 A tarefa de Reconhecimento de Objetos**

A tarefa de reconhecimento de objetos (RO) é baseada na curiosidade natural dos roedores pela novidade, conferindo aos animais a habilidade de distinguir entre objetos novos e familiares (Myskiw *et al.*, 2007; Rossato *et al.*, 2007).

Berlyne (1955) destacou os fatores novidade e curiosidade como prováveis determinantes do comportamento exploratório de roedores incluindo o reconhecimento de lugares ou objetos explorados. Anos mais tarde, Ennaceur e Delacour (1988) basearam-se nestas observações para propor um paradigma para o

estudo deste tipo de memórias. Recentemente foi descrito um protocolo específico de treinamento na tarefa de RO que, ao contrário de grande parte dos protocolos utilizados previamente, mostrou-se capaz de induzir a formação de uma memória robusta em animais normais, capaz de durar até 5 dias (Rossato *et al.*, 2007).

Esta tarefa mostra-se útil para a avaliação da retenção da memória de reconhecimento, possuindo várias vantagens como, não depende de nenhum sistema de recompensa; não possui estímulos aversivos como choque, não requer restrição a alimento ou água, pode-se utilizar uma grande variedade de aparatos e objetos, ser feita tanto com ratos como camundongos; e não necessita de um treinamento preliminar extenso já que o aprendizado se dá após uma única sessão (Bevins e Besheer, 2006).

A memória de RO permite discriminar características, elementos, situações e/ou artefatos familiares e novos, sendo que estas podem ser de um item individual como um objeto, de um ambiente completo ou mesmo de uma cena constituída de um arranjo espacial de muitos itens, uma capacidade significativa no que diz respeito à sobrevivência (Wan *et al.*, 1999).

Análises neurofisiológicas de pacientes acometidos de amnésia e experimentos comportamentais realizados em animais de laboratório sugerem que a integridade funcional do lobo temporal, mais especificamente da formação hipocampal, é essencial para codificar e armazenar memórias de reconhecimento (Ennaceur e Delacour, 1988; Logothetis e Sheinberg, 1996; Clark *et al.*, 2000; Riesenhuber e Poggio, 2002), como na Doença de Alzheimer (DA) em que a dificuldade para reconhecer itens familiares ou para discriminá-los de novos elementos, é um dos sintomas iniciais do declínio cognitivo (Laatu *et al.*, 2003; Budson *et al.*, 2005; Dudas *et al.*, 2005). Em concordância com estas observações, estudos prévios mostram que a consolidação da memória de RO depende da síntese de proteínas no hipocampo tanto por processos dependentes de transcrição do DNA a RNAm (Vianna *et al.*, 2003; Rossato *et al.*, 2007), como por processos presumivelmente dendríticos que utilizem RNAm pré-existentes (Cammarota *et al.*, 2003; Myskiw *et al.*, 2007).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar o papel do sistema histaminérgico no processo de consolidação da memória de reconhecimento de objetos na região CA1 do hipocampo dorsal em ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Verificar a participação do receptor H1 no processo de consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

Verificar a participação do receptor H2 no processo de consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

Verificar a participação do receptor H3 no processo de consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

Avaliar se a manipulação dos receptores histaminérgicos altera a atividade locomotora, exploratória e o estado de ansiedade dos animais.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Experimentos comportamentais

##### 3.1.1 Animais Experimentais

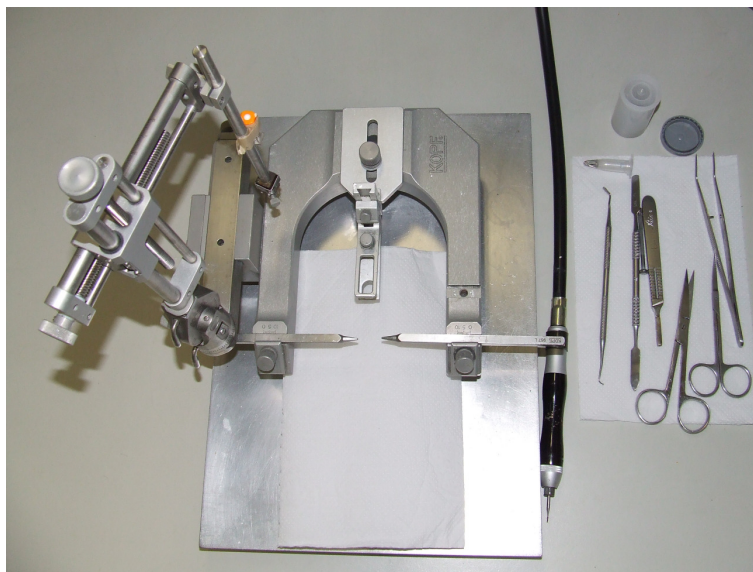
Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando em média 300 g. Os animais foram mantidos em caixas moradias em número de 5 por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23° C), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*; que foram adquiridos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e mantidos no biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

##### 3.1.2 Cirurgia Estereotáxica

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica (Figura 4) para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas (AP -4,2,mm; LL  $\pm$ 3,0 mm; DV -2,0 mm) do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

Os procedimentos foram realizados com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com Xilazina, que é um sedativo/miorrelaxante/analgésico (“Coopazine”; Coopers), administrados intra-peritonealmente (*i.p.*), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Uma vez recuperados da anestesia, os animais eram recolocados em suas caixas-moradia, e não houve troca entre os animais em cada caixa ao longo de todo o experimento.





**Figura 4** Aparato utilizado na cirurgia de esterotaxia.

### 3.1.3 Manipulação

Quatro dias após a cirurgia, os animais foram submetidos a duas sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da caixa moradia e manuseados durante 5 minutos.

### 3.1.4 Paradigma de reconhecimento de objetos

Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles despendem um tempo maior para explorar o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de RO (Ennaceur e Delacour, 1988), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (Reed *et al.*, 1999; Mandolesi *et al.*, 2003, Moses *et al.*, 2005; Myskyw *et al.*, 2007; Rossato *et al.*, 2007).

O aparelho para estudar memória de RO consiste de um campo aberto retangular com 60 cm de comprimento por 40 cm de profundidade e 50 cm de altura o qual se encontra em uma sala com baixa luminosidade e isolada acusticamente. A parte frontal do campo aberto é construída de vidro, para a melhor observação do

animal (Figura 5). Antes de serem submetidos à tarefa de RO, os animais foram submetidos a um processo de habituação ao dispositivo experimental que teve duração de 4 dias e foi constituída de uma sessão comportamental diária de 20 min, na qual os animais foram colocados individualmente no campo aberto para explorarem livremente (Kelly *et al.*, 2003; Akirav e Maroun, 2006).

Os objetos-estímulo utilizados na tarefa de reconhecimento são confeccionados em metal, vidro ou cerâmica e suas dimensões são menores que um cubo de 10 cm de lado (Ennaceur e Delacour, 1988; Hasenöhrl e Huston, 2004; Myskiw *et al.*, 2007; Rossato *et al.*, 2007; Broadbent *et al.*, 2009; Clarke *et al.*, 2010). Nenhum dos objetos possui significância comportamental para os animais experimentais os quais não demonstraram nenhuma preferência por algum dos objetos apresentados durante estudos piloto realizados anteriormente. Cada objeto foi preso ao assoalho do campo aberto pela base. A arena do campo aberto assim como os objetos-estímulo foram limpos com uma solução de etanol a 70 % entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas. A exploração foi definida como cheirar ou tocar os objetos de estímulo com o focinho ou as patas dianteiras. Sentar-se no objeto ou permanecer ao redor dele não foi considerado comportamento exploratório. O tempo empregado explorando cada objeto foi medido por um observador e expresso como porcentagem do tempo total de exploração.



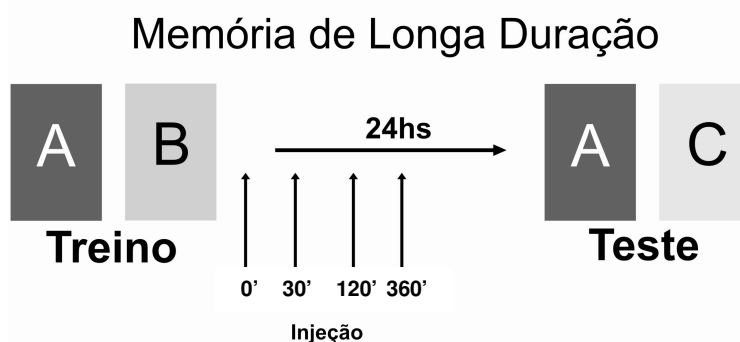
**Figura 5** Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de reconhecimento de objetos

### 3.1.5 Protocolo de treino do paradigma de reconhecimento de objetos

No dia 1 (Sessão de treino), os ratos foram individualmente colocados no campo aberto contendo 2 objetos diferentes (A e B) sendo-lhes permitido explorá-los livremente durante 5 minutos (Figura 6).

Imediatamente, 30, 120, ou 360 min após o treino, os animais foram infundidos com agonistas ou antagonistas (1 µl/lado) dos diferentes receptores histaminérgicos.

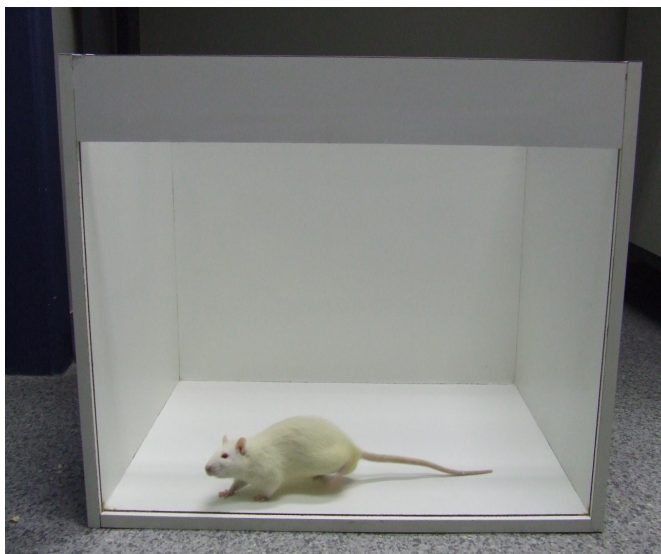
O teste de retenção foi realizado 24 horas após a sessão de treino para analisar a memória de longa duração. Nestas sessões de teste de 5 min de duração, os ratos foram individualmente re-introduzidos no campo aberto onde um dos objetos apresentados durante o treino foi aleatoriamente substituído por um objeto novo (A e C).



**Figura 6** Esquema ilustrativo dos protocolos de treino e teste no paradigma de reconhecimento de objetos

### 3.1.6 Campo Aberto

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais, utilizou-se a tarefa denominada de campo aberto. O aparelho utilizado nesta tarefa consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a parede frontal de vidro transparente, o assoalho da caixa dividido em 12 quadrantes iguais (Figura 7). Durante o experimento, o animal é gentilmente colocado na arena do campo aberto e deixado ali para explorar a caixa livremente por 5 minutos. Foram registrados o número de linhas cruzadas e o número de elevações, comportamentos que nos roedores denotam exploração.



**Figura 7** Fotografia de um rato explorando o campo aberto

### 3.1.7 Labirinto em Cruz Elevado

Para avaliar o estado de ansiedade dos animais, utilizou-se a tarefa do 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 que possuem paredes elevadas são denominados fechados, e os outros dois que não possuem paredes, denominam-se abertos (Figura 8). O animal foi colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5 minutos. Registrou-se o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior é o número de entradas nos braços fechados e maior é o tempo de permanência neles, pois proporcionam menor sensação de ansiedade ao animal (Bevilaqua *et al.*, 2003; Kerr *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2006).



**Figura 8** Fotografia de um rato sendo submetido à tarefa de Labirinto em Cruz Elevado

### 3.1.8 Tratamentos farmacológicos

Neste estudo, os fármacos utilizados nas infusões intra-CA1 foram: pirlamina e ranitidina, obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); tioperamida e imetit obtidas da Tocris Cookson Ltd. (Avonmouth, Bristol, UK). Todas as drogas foram dissolvidas em salina e infundidas a temperatura ambiente com pH 7,2. As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos pilotos e em estudos prévios que mostram o efeito da histamina sobre aprendizado e memória, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas (Alvarez e Banzan, 1995 e 1996; Alvarez *et al.*, 2001; Orsetti *et al.*, 2001; Giovannini *et al.*, 2003; Knoche *et al.*, 2003; Baldi *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2006; Bonini *et al.*, 2011).

Para a realização do tratamento farmacológico utilizou-se uma micro-seringa Hamilton acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). Foram infundidos bilateralmente 1  $\mu$ l/lado de cada uma das drogas utilizadas ou seu veículo (solução salina 0,9%) a uma velocidade de 0,5  $\mu$ l/min (Figura 9). Ao término, a agulha de infusão foi deixada no local por 30-60 segundos adicionais para evitar refluxo.



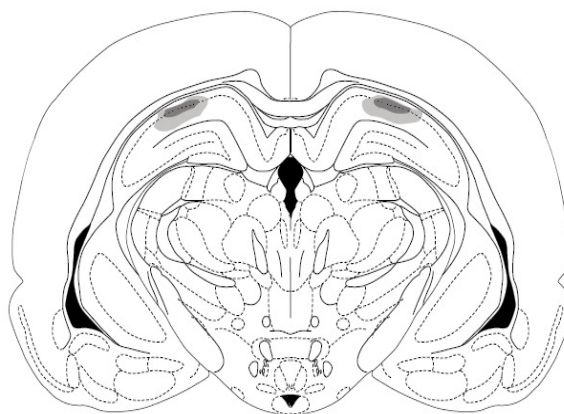
**Figura 9** Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas.

### 3.1.9 Controle histológico da região estudada

Para verificar o posicionamento correto das cânulas, após os procedimentos comportamentais, os animais receberam 1  $\mu$ l/lado de uma solução de azul de metileno 0,1% através das mesmas cânulas utilizadas para a infusão das drogas. Quinze minutos depois os animais foram sacrificados por decapitação, seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias. Posteriormente, realizou-se a análise histológica da região estudada (Figura 10).

Apenas os dados comportamentais de animais que, efetivamente, receberam a correta administração das drogas na região CA1 do hipocampo dorsal foram incluídos na análise estatística final.





**Figura 10** Desenho do cérebro de rato adquirido do Atlas de Paxinos e Watson, 1986, mostrando a localização da implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.

### 3.2 Análise Estatística

A análise foi realizada utilizando os *softwares* Graph-Pad Prisma 4.1 e Microsoft Office Excel.

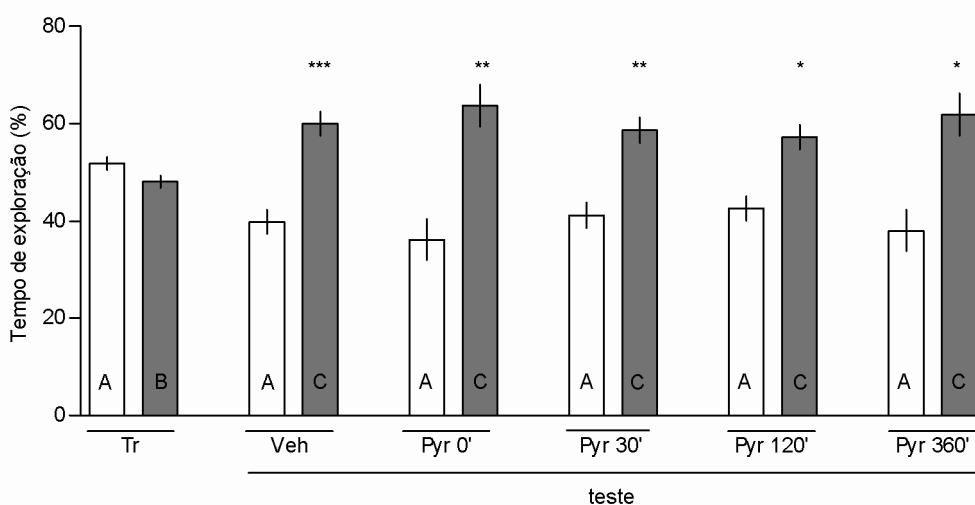
Para a análise dos dados obtidos nas tarefas de reconhecimento de objetos, campo aberto e labirinto em cruz elevado foram utilizados testes de estatística paramétrica (*One Simple test t* de Student e ANOVA de uma via). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Referente à tarefa de RO, os gráficos estão representados como porcentagem do tempo total de exploração de cada objeto naquela sessão de treino ou teste. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADOS

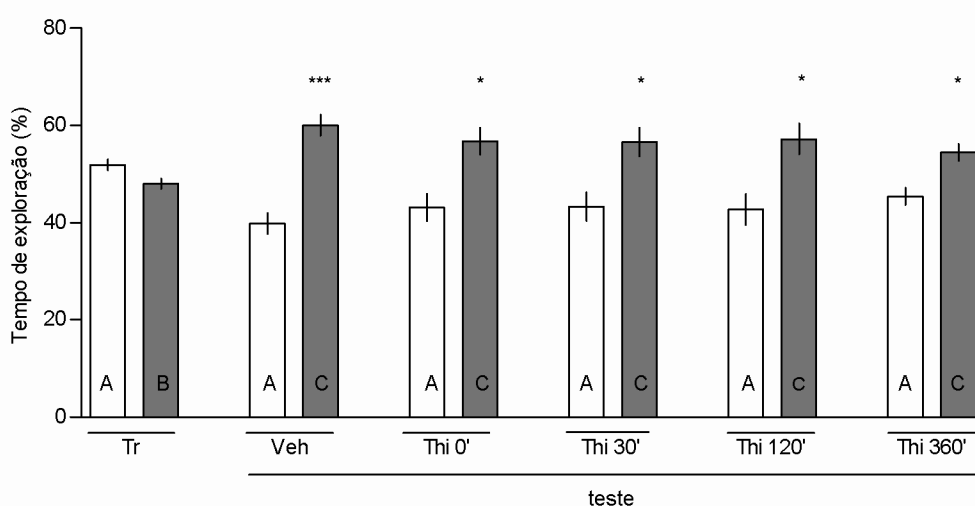
Para determinar o papel dos receptores histaminérgicos na consolidação da memória de reconhecimento de objetos, foi estipulada uma linha de tempo para verificar se, e em qual momento este sistema poderia estar envolvido no processo de consolidação. Para isso, ratos machos Wistar foram treinados na tarefa de RO que envolve a exploração de dois objetos distintos (A e B). Imediatamente, 30, 120 ou 360 min após o treino os animais receberam infusão bilateral na região CA1 do hipocampo dorsal de veículo (Veh) ou pirilamina (Pyr – 50 mM) antagonista do receptor H1 ou ranitidina (Ran – 50 mM) antagonista do receptor H2 ou thioperamida (THI – 50 mM) antagonista do receptor H3 ou imetit (IME – 10 mM) agonista do receptor H3 (1 µl/lado – Da Silva *et al.*, 2006). A consolidação da memória de longa duração foi avaliada em uma sessão de teste com 5 min de duração, realizada 24 horas após o treino. Nesta sessão, substituiu-se um dos objetos familiares por um novo (C).

Como pode ser observado nas figuras 4 e 5, os ratos que receberam Veh, Pyr ou Thi em todos os tempos após a sessão de treino, exploraram o objeto novo por tempo significativamente maior que o objeto conhecido, mostrando que formaram a memória de longa duração para o objeto apresentado na sessão de treino. Estes resultados sugerem que tanto o receptor H1 quanto o receptor H3 não estão envolvidos na consolidação da memória de RO, pois quando estes receptores foram inibidos, os animais ainda assim conseguiram se lembrar do objeto familiar, passando mais tempo explorando o novo (**Fig 11**;  $t_{(17)} = 4.136$ ,  $p < 0.001$  para Veh;  $t_{(6)} = 3.195$ ,  $p < 0.01$  para Pyr 0';  $t_{(6)} = 3.362$ ,  $p < 0.01$  para Pyr 30';  $t_{(7)} = 2.948$ ,  $p < 0.01$  para Pyr 120' e  $t_{(7)} = 2.778$ ,  $p < 0.01$  para Pyr 360' em teste *t* de Student com média teórica = 50) (**Fig.12**;  $t_{(16)} = 4.661$ ,  $p < 0.001$  para Veh;  $t_{(17)} = 2.454$ ,  $p < 0.05$  para Thi 0';  $t_{(16)} = 2.271$ ,  $p < 0.05$  para Thi 30';  $t_{(9)} = 2.269$ ,  $p < 0.05$  para Thi 120' e  $t_{(8)} = 2.645$ ,  $p < 0.05$  para Thi 360' em teste *t* de Student com média teórica = 50).



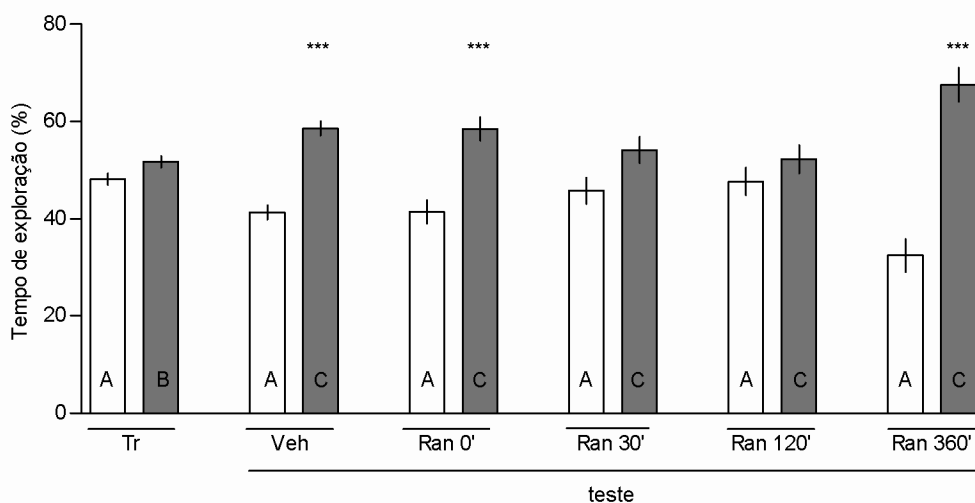


**Figura 11 Pirilamina não prejudica a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de RO. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e imediatamente, 30, 120 ou 360 min após o treino receberam infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (salina) ou pirilamina (Pyr; 50 nmol/lado). 24 horas após o treino os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliar a consolidação das memórias. O tempo de exploração do objeto novo (C) foi maior em todos os grupos. Os dados estão expressos como (média  $\pm$  erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em teste *t* de Student. (n= 7-18 por grupo).



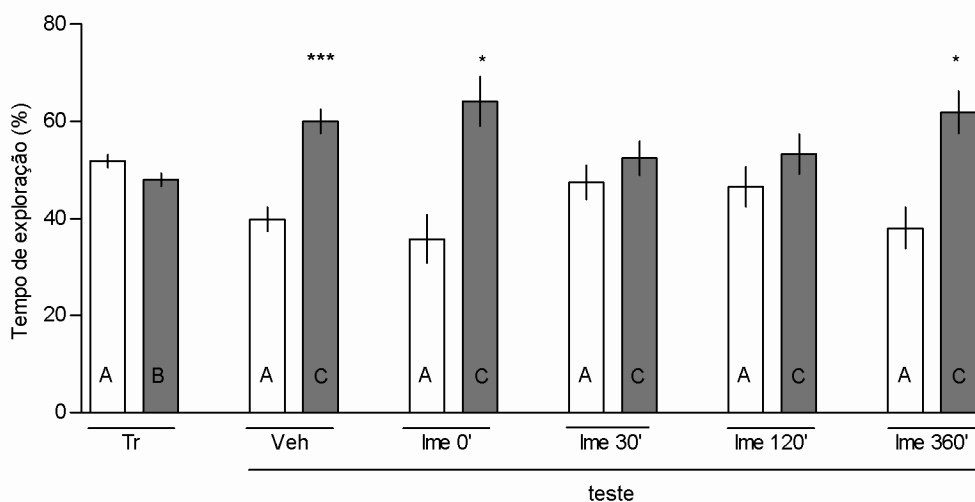
**Figura 12 Thioperamida não prejudica a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de RO. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e imediatamente, 30, 120 ou 360 min após o treino receberam infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (salina) ou thioperamida (Thi; 50 nmol/lado). 24 horas após o treino os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliar a consolidação das memórias. O tempo de exploração do objeto novo (C) foi maior em todos os grupos. Os dados estão expressos como (média  $\pm$  erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em teste *t* de Student. (n= 9-18 por grupo).

No entanto, como pode ser observado nas figuras 6 e 7, quando os animais receberam infusão do antagonista do receptor H2 (Ran) ou do agonista do receptor H3 (lme) 30 ou 120 min após a sessão de treino, estes animais mostraram um comportamento amnésico durante o teste onde eles passaram a mesma quantidade de tempo explorando tanto o objeto novo (C) quanto o objeto familiar (A). Sugerindo que a inibição do receptor H2 e a ativação do receptor H3, bloqueia a retenção da memória de RO. Este período caracterizado pela amnésia pode ser devido ao prejuízo do processo de consolidação causado pela inibição do receptor H2, o qual já foi demonstrado exercer um papel importante na formação e extinção de memória aversiva (Da Silva *et al.*, 2006; Bonini *et al.*, 2011). Porém, este comportamento amnésico não foi observado nos animais que receberam infusão imediatamente ou 360 min após o Tr, sugerindo que este efeito ocorre numa janela de tempo específica. Com relação ao efeito amnésico provocado pelo agonista H3, pode-se relacionar ao fato de quando o receptor H3 pré-sináptico está ativo, ele inibe a síntese e liberação de histamina na fenda sináptica, logo, menos histamina está disponível para ligar-se ao receptor H2, por exemplo, ativando a cascata de sinalização pós-sináptica, auxiliando na consolidação da memória (**Fig 13**;  $t_{(28)} = 5.936$ ,  $p < 0.001$  para veh;  $t_{(24)} = 3.495$ ,  $p < 0.001$  para Ran 0';  $t_{(18)} = 1.533$ ,  $p > 0.05$  para Ran 30';  $t_{(9)} = 0.8075$ ,  $p > 0.05$  para Ran 120';  $t_{(10)} = 5.041$ ,  $p < 0.001$  para Ran 360' em teste *t* de Student com média teórica = 50) (**Fig 14**;  $t_{(17)} = 4.136$ ,  $p < 0.001$  para Veh;  $t_{(5)} = 2.792$ ,  $p < 0.05$  para lme 0';  $t_{(6)} = 0.7082$ ,  $p > 0.05$  para lme 30';  $t_{(5)} = 0.8117$ ,  $p > 0.05$  para lme 120';  $t_{(7)} = 2.778$ ,  $p < 0.05$  para lme 360' em teste *t* de Student com média teórica = 50).



**Figura 13 Ranitidina prejudica a consolidação de memória da reconhecimento de objetos.**

Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de RO. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e imediatamente, 30, 120 ou 360 min após o treino receberam infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (salina) ou ranitidina (Rani; 50 nmol/lado). 24 horas após o treino os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliar a consolidação das memórias. Os ratos que foram infundidos 30 ou 120 min após o treino passaram a mesma quantidade de tempo explorando o objeto novo (C) e o objeto familiar (A). Nos demais tempos os animais exploram mais o objeto novo (C). Os dados estão expressos como (média  $\pm$  erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,001$  em teste  $t$  de Student. (n= 10-25 por grupo).



**Figura 14 Imetit prejudica a consolidação de memória da reconhecimento de objetos.**

Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de RO. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e imediatamente, 30, 120 ou 360 min após o treino receberam infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (salina) ou imetit (Ime; 10 nmol/lado). 24 horas após o treino os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliar a consolidação das memórias. Os ratos que foram infundidos 30 ou 120 min após o treino passaram a mesma quantidade de tempo explorando o objeto novo (C) e o objeto familiar (A). Nos demais tempos os animais exploram mais o objeto novo (C). Os dados estão expressos como (média  $\pm$  erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em teste  $t$  de Student. (n= 10-25 por grupo).

Para verificar se a amnésia causada pelo antagonista H2 e pelo agonista H3, nos animais que foram infundidos 30 ou 120 min após Tr, devia-se às suas ações sob o processo de consolidação da memória de RO, e eliminar a possibilidade de que os resultados obtidos com estas e outras drogas infundidas estivessem relacionados com efeitos retardados sobre a ansiedade ou a atividade locomotora e exploratória capaz de prejudicar a evocação da memória de longa duração, ratos foram expostos ao Labirinto em Cruz Elevado e ao Campo Aberto, 24 horas após receberem infusão de cada agentes.

Nenhuma das drogas testadas Pyr, Thi, Ran (50 mM) ou Ime (10 mM) causou alterações no número total de entradas, no número de entradas nos braços abertos ou na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos durante sessão de 5 minutos no Labirinto em Cruz Elevado. Da mesma forma, essas drogas não afetaram o número total de cruzamentos e de elevações em uma sessão de exploração livre com duração de 5 min no Campo Aberto (Tabela 3).

**Tabela 3** Infusão na região CA1 do hipocampo dorsal de agonistas e antagonistas de receptores histaminérgicos não exercem efeito sobre as atividades locomotoras e exploratórias ou do estado de ansiedade de ratos

	VEH	PYR (50 nmol/lado)	RAN (50 nmol/lado)	THI (50 nmol/lado)	IME (10 nmol/lado)
<b>Labirinto em Cruz elevado</b>					
Nº total de entradas	12.63 ± 0.6876	17.90 ± 1.260	14.80 ± 1.263	11,70 ± 1.713	14.80 ± 1.263
Entradas em braços abertos	6.289 ± 0.4754	10.00 ± 1.022	7.111 ± 1.448	6.20 ± 1.245	7.800 ± 0.9978
% Tempo nos braços abertos (s)	33.30 ± 2.742	52.22 ± 3.544	37.11 ± 8.071	38.63 ± 6.487	39.95 ± 5.934
<b>Campo Aberto</b>					
Cruzamentos	62.44 ± 4.322	66.89 ± 11.18	52.38 ± 7.944	41.80 ± 6.487	63.63 ± 7.569
Elevações	20.05 ± 1.375	23.56 ± 3.66	14.13 ± 2.856	12.60 ± 2.262	24.25 ± 3.022

Pyr (50 mM), Ran (50 mM), Thi (50 mM) ou Ime (10 mM) foram infundidos na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes de uma sessão de Campo Aberto ou Labirinto em Cruz Elevado. Dados são expressos como média (± erro padrão) do número total de entradas, número de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos (Labirinto em Cruz; n= 8-10 por grupo) e número total de cruzamentos e elevações (Campo Aberto; n=10 por grupo). VEH = veículo.

## 5 DISCUSSÃO

A memória é um processo complexo e para sua formação são necessários três estágios: aquisição, consolidação e evocação. A consolidação é considerada a etapa onde o traço mnemônico é armazenado como memória de longa duração no cérebro (Izquierdo, 1989; Izquierdo *et al.*, 1993, 2006). Este processo se refere à estabilização progressiva do traço de memória através do tempo (McGaugh, 2000; Carr *et al.*, 2011). Porém, sabe-se que as memórias de longa duração, após serem evocadas tornam-se novamente lábeis e susceptíveis a manipulação farmacológica (Nader *et al.*, 2000; Eisenberg e Dudai, 2004; Sara e Hars, 2006). Nos mamíferos, vários tipos de memória dependem do processamento do hipocampo, e podem durar dias ou semanas (Medina *et al.*, 2008).

O hipocampo é uma região importante para a formação de memórias. Alta densidade de subtipos dos receptores histaminérgicos H1 e H2 foi encontrada na formação hipocampal (Ruat *et al.*, 1991). Além disso, Dai e colaboradores (2007) demonstraram que a histamina neuronal pode melhorar os processos de memória no córtex pré-frontal e no hipocampo através da ativação dos receptores H1 e H2. No cérebro de roedores, dois receptores pós-sinápticos (H1 e H2) e um pré-sináptico (H3) foram identificados. O H1 é abundantemente expresso em várias estruturas cerebrais incluindo o hipocampo (Hasenöhrl e Huston, 2004).

A histamina neuronal, derivada do nTM do hipotálamo posterior, tem sido relacionada ao estado de estímulo e excitação, despertar, manutenção do ciclo sono-vigília (Lin, 2000). Devido a manifestações comuns do tratamento com antagonistas H1 como estado de alerta alterado, tempo de reação diminuídos e sonolência, sugerem que a histamina é necessária na promoção de um estado receptivo a estímulos excitatórios (Blandina *et al.*, 2009). Camundongos H1R-*Knockout* não mostraram preferência pelo objeto novo no teste de preferência condicionada de lugar (CPP) e mostraram prejuízo na tarefa do labirinto em Y. A atividade e o comportamento emocional também ficaram alterados nos camundongos H1R-*Knockout*, porém nada aconteceu no paradigma de RO (Zlomuzica *et al.*, 2008). No presente trabalho, verificou-se que Pyr, o antagonista do receptor H1, não prejudicou a consolidação de memória de RO quando infundidos

na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente, 30, 120 ou 360 min após o treino.

Os ratos que receberam agonista e antagonistas histaminérgicos 24 horas antes de serem expostos as tarefas de Labirinto em Cruz Elevado e Campo aberto não mostraram alteração na atividade locomotora e exploratória nem no estado de ansiedade. Estes resultados demonstram que o efeito amnésico produzido pelo tratamento farmacológico do antagonista H2 e do agonista H3 não é devido à indução de danos permanentes ao hipocampo, mas a um efeito inibitório real sobre o processo de consolidação da memória de RO.

Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório mostram que a histamina melhora a consolidação de memória aversiva na tarefa de esquiva inibitória (EI). Essa facilitação induzida pela histamina e pelo SKF-91844, inibidor da N-metiltransferase, mostradas nos resultados é bloqueada pela Ran, antagonista H2 e mimetizada por dimaprit, agonista H2, indicando que o efeito promnésico deste neurotransmissor é devido à ativação dos receptores H2 (Da silva *et al.*, 2006). Devido a outro recente trabalho do nosso grupo que demonstra que a histamina também facilita a consolidação da extinção de memórias aversivas (Bonini *et al.*, 2011), decidiu-se investigar se o sistema histaminérgico está envolvido na consolidação de memórias de RO. Nossos resultados mostram que a infusão do antagonista H2 prejudica a consolidação de memórias de RO quando infundido 30 ou 120 minutos após o treino, sugerindo que este efeito amnésico desta amina é tempo-dependente e requer a participação dos receptores H2 para acontecer.

Relatos na literatura indicam que a administração de agonistas do receptor H3 causam prejuízo no desempenho de ratos na tarefa de RO, e na resposta à esquiva passiva na mesma dose que reduz a liberação de acetilcolina (ACh) no córtex de ratos (Blandina *et al.*, 1996). Esta evidência mostra o efeito cognitivo da histamina na modulação dos neurônios colinérgicos (Quirion *et al.*, 1995). Experimentos em microdiálise demonstram que o immpip, um agonista do receptor H3, aumenta a liberação de GABA no córtex, e que a bicuculina, antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, reverte a inibição da liberação de ACh induzida pelo immpip (Giogetti *et al.*, 1997). Além disso, Arrang e colaboradores (1983) mostram que os receptores H3 são capazes de regular a síntese, bem como, inibir a liberação de histamina dos neurônios.

Nossos dados mostram que o lme prejudica a consolidação da memória de RO quando infundido na janela de tempo de 30 a 120 minutos após uma sessão de treino. Isso pode acontecer devido à ativação dos autoreceptores pré-sinápticos H<sub>3</sub>, que inibem a liberação de histamina na fenda sináptica, induzindo uma diminuição nos níveis de histamina disponíveis. Este resultado foi demonstrado pelo estado amnésico dos ratos, no qual eles passam a mesma quantidade de tempo explorando os objetos (novo e familiar) na sessão de teste. Além disso, nós observamos que Thi, antagonista H<sub>3</sub>, não exerceu efeito na consolidação de memórias na tarefa de RO.

Os resultados obtidos nesta tese de doutorado corroboram com a importância do sistema histaminérgico na consolidação de memórias. Através dos nossos resultados demonstramos a importante ação modulatória que o sistema histaminérgico exerce sobre o processo de formação da memória de RO.

## 6 CONCLUSÕES

O receptor H1 quando inibido, pela pirilamina, não mostrou efeito no processo de consolidação da memória de RO.

O receptor H2 quando inibido, pela ranitidina, mostrou efeito prejudicial no processo de consolidação da memória de RO.

O receptor H3 quando inibido, pela tioperamida, não mostrou efeito na consolidação da memória, porém quando ativado, pelo imetit, mostrou prejuízo na consolidação da memória de RO.

Os antagonistas e o agonista dos receptores histaminérgicos não mostraram alterações locomotoras, exploratórias ou no estado de ansiedade dos animais.

Logo, conclui-se que o sistema histaminérgico está envolvido na consolidação de memórias de RO através dos receptores H2 e H3 hipocampais.



## REFERÊNCIAS

AKIRAV, I.; MAROUN, M. Ventromedial Prefrontal Cortex Is Obligatory for Consolidation and Reconsolidation of Object Recognition Memory. **Cerebral Cortex**, 16 (12): 1759-65, 2006.

ALBERINI, CM. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **TRENDS in Neuroscience**, (28): 51-56, 2005.

ALBRIGHT, T.D.; KANDEL, E.R.; POSNER, M.I. Cognitive neuroscience. **Current Opinion in Neurobiology**, 10(5):612-24, 2000.

ALVARES, 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**, 101 (1-3), 201-211, 1995.

ALVARES, E.O.; BANZAN, A.M. Hippocampal histamine receptors: possible role on the mechanisms of memory in the rat, II. **Journal of Neural Transmission**. (103):147-156, 1996.

ALVARES, 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.

ALVARES, E.O.. The role of histamine on cognition. **Behavioural Brain Research**. (99): 183-189, 2009.

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.

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.

BALDERAS, I.; RODRIGUES-ORTIZ, C.J.; SALGADO-TONGA, P.; CHAVES-HURTADO, J.; MCGAUGH, J.L.; BERMUDEZ-RATTONI, F. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. **Learning & Memory**, (15): 618-624, 2008.

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):246-251, 2005.

BERLYNE, D.E. The arousal and satiation of perceptual curiosity in the rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, (48): 238-246, 1955.

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, 2003.

BEVINS, R.A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature Protocols** 1(3):1306-11, 2006.

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

BLANDINA, P.; GIORGETTI, M.; BARTOLINI, L.; CECCHI, M. TIMMERMAN, H. LEURS, R.; PEPEU, G.; GIOVANNINI, M.G. Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H3 receptor activation in rats. **British Journal of Pharmacology**, 119(8):1656-64, 1996.

BONINI, J.; DA SILVA, W C.; DA SILVEIRA, C K B.; KOHLER, C A.; IZQUIERDO, I; CAMMAROTA, M. Histamine facilitates consolidation of fear extinction. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, (7): 1-9, 2011.

BROADBENT, N.J.; GASKIN, S.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning & Memory**, 17:5-11, 2009.

BROWN, R.E.; STEVENS, D.R.; HAAS, H.L. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**, (63): 637-672, 2001.

BUDSON, A.E.; DODSON, C.S.; DAFFNER, K.R.; SCHACTER, D.L. Metacognition and false recognition in Alzheimer's disease: further exploration of the distinctiveness heuristic. **Neuropsychology**, 19(2):253-8, 2005.

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.

CARR, M.F.; JADHAV, S.P.; FRANK, L.M. Hippocampal replay in the awake state: A potential substrate for memory consolidation and retrieval. **Nature Neurosciences**, (14):147-153, 2011.

CLARK, R.E.; ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **Journal of Neuroscience** 20 (23): 8853-60, 2000.

CLARKE, J.R.; CAMMAROTA, M.; GRUART, A.; IZQUIERDO, I; DELGADO-GARCIA, J.M. Plastic modifications induced by object recognition memory

processing. **Proceedings of the national academy of sciences**, (107):265-267, 2010.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, (86): 100-6, 2006.

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

DE ALMEIDA, M.A. ; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie**, (283): 193-198, 1986..

DUDAS, R.B.; CLAGUE, F.; THOMPSON, S.A.; GRAHAM, K.S.; HODGES, J.R. Episodic and semantic memory in mild cognitive impairment. **Neuropsychologia**, 43(9):1266-76, 2005.

EISENBERG, M.; DUDAI, Y. Reconsolidation of fresh, remote and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. **European Journal of Neuroscience**, (20):3397-3403, 2004.

ENNAUCEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioral Brain Research** 31 (1): 47-59, 1988.

ERICSON, H.; BLOMQUIST, A.; KÖHLER, C. Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, (1):45-64, 1991.

GEINISMAN, Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. **Cerebral Cortex**, 10(10):952-62, 2000.

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.

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.

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.

GULAT-MARNAY C, LAFITTE A, ARRANG JM, SCHWARTZ JC. Modulation of histamine release in the rat brain by kappa-opioid receptors. **Journal of Neurochemistry**, 55(1):47-53, 1990.

HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. **Nature Reviews**, (4):121-130, 2003.

HAAS, H.; SERGEEVA, O.A.; SELBACH, O. Histamine in the Nervous System. **Physiological Reviews**, (88): 1183-1241, 2008.

HASENÖHRL, R.U.; HUSTON, J.P. Histamine, Memories are Made of These: From Messengers to Molecules. **Landes Bioscience**, 1-23, 2004.

HUSTON, J.P.; WAGNER, U.; HASENÖHRL, R.U. The tuberomammillary nucleus projection in the control of learning, memory and reinforcement processes: evidence for an inhibitory role. **Behavioral Brain Research**, (83):97-105, 1997.

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.

IZQUIERDO I. Different forms of post-training memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, (51): 171-202, 1989.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; BIANCHIN, M.; WALZ, R.; ZANATTA, M.S.; DA SILVA, R.C.; *et al.* Memory processing by the limbic system: role of specific neurotransmitter systems. **Behavioral Brains Research**, (58): 91-98, 1993.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO e SOUZA, T.; de SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393 (6686): 635-6, 1998a.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. On brain lesions, the milkman and Sigmunda. **Trends in Neuroscience**, 21 (10): 423-6, 1998b.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Artmed, Porto Alegre, 92 p. 2002.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. **Trends in Neurosciences**, (29): 496-505. 2006.

KELLY, A.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **The Journal of Neuroscience**, 23 (12): 5354-60, 2003.

KERR, D.S.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATO, J.I.; KOHLER, C.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**, 179 (3): 529-35, 2005.

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.

LAATU, S.; REVONSUO, A.; JÄYKKÄ, H.; PORTIN, R.; RINNE, J.O. Visual object recognition in early Alzheimer's disease: deficits in semantic processing. **Acta Neurologica Scandinavica**, 108(2):82-9, 2003.

LEES, G.V.; JONES, E.G.; KANDEL, E. Expressive genes record memories. **Neurobiology of Disease**, 7(5):533-6., 2000.

LIN, JS. Brain structure and mechanism involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. **Sleep Med. Rev.**, 4: 471-503, 2000.

LOGOTHETIS, N.K.; SHEINBERG, D.L. Visual object recognition. **Annual Reviews in Neuroscience** 19, 577-621, 1996.

MANDOLESI, L.; LEGGIO, M.G.; SPIRITO, F.; PETROSINI, L. Cerebellar contribution to spatial event processing: do spatial procedures contribute to formation of spatial declarative knowledge? **European Journal of Neuroscience**, 19 (6):1674, 2004.

MCGAUGH, J.L. Memory - a century of consolidation. **Science**, 287 (5451): 248-251, 2000.

MEDINA, J.H.; BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behavioral Brain Research**, (192):61-69, 2008.

MILLER, D.B.; O'CALLAGHAN, J.P. The pharmacology of wakefulness. **Metabolism**, (55):13-19, 2006.

MISANIN, J.R.; MILLER, R.R.; LEWIS, D.J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidation memory trace. **Science** 160:554-555, 1968.

MIYAZAKI, S.; IMAIZUMI, M.; ONODERA, K. Ameliorating effects of histidine on scopolamine-induced learning deficits using an elevated plus-maze test in mice. **Life Sciences**, (56):1563-70, 1995.

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.

MOSES, S.N.; COLE, C.; DRISCOLL, I.; RYAN, J.D. Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. **Brain research bulletin**, 67 (1-2): 62-76, 2005.

MYSKIW, J.C.; ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of mTOR in recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 89 (3): 338-51, 2007.

NADER, K.O; SCHAFE, G.E. ; LEDOUX, J.E. The labile nature of consolidation theory. **Nature Reviews Neuroscience**, (1):216-219, 2000.

NEVES, G.; COOKER,A.F.; BLISS,T.V.P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nature review**, 2008.

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.

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.

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.

PANULA, P.; PIRVOLA, U.; AUVINEN, S.; AIRAKSINEN, M.S. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. **Neuroscience**, 28(3):585-61, 1989.

PANULA, P.; AIRAKSINEN, M.S.; PIRVOLA, U.; KOTILAINEN, E. A histamine-containing neuronal system in human brain. **Neuroscience**, 34(1):127-32, 1990.

PASSANI, M.B.; BACCIOTTINI, L.; MANNAIONI, P.F.; BLANDINA, P. Central histaminergic system and cognition. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** (24): 107-113, 2000.

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

PRAST, H.; HEISTRACHER, M.; PHILLIPU, A. In vivo modulation of histamine release in the hypothalamus by adrenoreceptor agonists and antagonists. **Naunyn-Schmiedeberg' s Archives of Pharmacology** (344):183-186, 1991.

PRAST, H.; FISCHER, H.P.; PRAST, M.; PHILIPPU, A. In vivo modulation of histamine release by autoreceptors and muscarinic acetylcholine receptors in the rat anterior hypothalamus. **Naunyn-Schmiedeberg' s Archives of Pharmacology**, (350): 599-604, 1994.

PRAST, H.; LAMBERTI, C.; FISCHER, H.; TRAN, M.H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. **Naunyn-Schmiedeberg' s Archives of Pharmacology** (354): 731-735, 1996.

QUIRION, R.; WILSON, A.; ROWE, W.; AUBERT, I.; RICHARD, J.; DOODS, H.; PARENT, A.; WHITE, N.; MEANEY, M.J. Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M2-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired rats. **Journal of Neuroscience**, (15):1455-1462, 1995.

REED, J.M.; SQUIRE, L.R.; PATALANO, A.L.; SMITH, E.E.; JONIDES, J. Learning about categories that are defined by object-like stimuli despite impaired declarative memory. **Behavioural Neuroscience**, 113 (3): 411-19, 1999.

RIESENHUBER, M.; POGGIO, T. Neural mechanisms of object recognition. **Current Opinion in Neurobiology**, 12 (2): 162-8, 2002.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.P. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning and Memory**, 14(1): 36-46, 2007.

RUAT,M.; TRAIFFORT, E.;BOUTHENET, M.L.; SOULIL,E.; POLLARD, H.; MOREAU,J.; SCHWARTZ, J.C.; MARTINEZ-MIR, I.; PALACIOS, J.M.; HIRSCHFELD, J. Reversible and irreversible labeling of H1 and H2-receptors using novel (125I) probes. **Agents and actions**, 33 Suppl.,123-144, 1991.

RUSAKOV, D.A.; DAVIES, H.A.; HARRISON, E.; DIANA, G.; RICHTER-LEVIN, G.; BLISS, T.V.; STEWART, M.G. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. **Neuroscience**, 80(1):69-77, 1997.

SARA, S.J.; HARS, B. IN memory of consolidation. **Learning & Memory** 13(5):515-21, 2006.

SARA, S.J. Reactivation, retrieval, replay and reconsolidation in and out of sleep: connecting the dots. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, (13):4:185, 2010.

SQUIRE, L.G.; PETERSEN, O.H. Modulation of Ca<sup>2+</sup>- and voltage-activated K<sup>+</sup> channels by internal Mg<sup>2+</sup> in salivary acinar cells. **Biochim Biophys Acta**, (2):171-5.s, 1987.

SQUIRE, L.R.; WIXTED, J.T.; CLARK, R.E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, (11):872-83, 2007.

SZAPIRO, G.; GALANTE, J.M.; BARROS, D.M.; LEVI DE STEIN, M.; VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, L.A.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Molecular mechanisms of memory retrieval. **Neurochemical Research**, 27(11):1491-8, 2002.

VAN DER GOOT, H.; TIMMERMAN, H. SIGNS: new rules should not add to confusion. Identification system for stereoisomeric drugs. **Trends in Pharmacological Sciences**, 10(12):486-7, 1989.

VIANNA, M.R.M.;MÜLLER-IGAZ, L.; COITINHO,A.; MEDINA,J.H.;IZQUIERDO,I. memory extinction requires gene expretion in rats hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, (79):199-203, 2003.

WAN, H.; AGGLETON, J.P.; BROWN, M.W. Different Contributions of the Hippocampus and Perirhinal Cortex to Recognition Memory **The Journal of Neuroscience**,19 (3):1142-1148 , 1999.

YANAI, K.; RYU, J.H.; WATANABE, T.; IWATA, R.; IDO, T.; SAWAI, Y.; ITO, K.; ITOH, M. Histamine H1 receptor occupancy in human brains after single oral doses of histamine H1 antagonists measured by positron emission tomography. **British Journal of Pharmacology**, (116):1649-1655, 1995.

ZLOMUZICA, A.; VIGGIANO, D.; DE SOUZA E SILVA, M.A.; GIRONI CARNEVALE, U.A.; RUOCCO, L.A.; WATANABE, T.; SADILE, A.G.; HUSTON, J.P.; DERE, E. The histamine H1-receptor mediate the motivational effects of novelty. **European Journal of Neuroscience**, (27): 1461-1474, 2008.



## **ANEXO**

## **The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory**

Clarice Krás Borges da Silveira\*, Cristiane Furini, Fernando Benetti, Siomara C Monteiro,  
Janine Rossato, Ivan Izquierdo & Martin Cammarota

Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do  
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

\*Address reprint request to: Clarice Kras Borges da Silveira, [claricekras@gmail.com](mailto:claricekras@gmail.com)

## **Abstract**

The brain's histamine system has been implicated in both arousal and reinforcement. Previous evidence from our laboratory has shown that histamine receptors located into the hippocampus modulate learning and memory on the fear extinction and aversive processes. Therefore, to determine the role of hippocampal histaminergic receptors on recognition memory, adult male Wistar rats with infusion cannulae stereotaxically aimed to the CA1 region of dorsal hippocampus were trained in an object recognition learning task involving exposure to two different stimulus objects. Memory retention was assessed 24 h after training. In the test session, one of the objects presented during training was replaced by a novel one. When infused in the CA1 region immediately, 30, 120 or 360 min after training, the ranitidine, H2 receptor antagonist, and imetit, H3 receptor agonist, blocked long-term memory retention in a time-, dose-dependent manner (30 to 120 min) without affecting exploratory behavior, anxiety state or the functionality of the hippocampus. Our data indicate that histaminergic system is involved in consolidation of object recognition memory.

**Key words:** histamine, memory consolidation, histaminergic system, object recognition

## 1. INTRODUCTION

Memory consolidation has been defined on the basis of the observation that a newly formed memory undergoes a transformation process, becoming stronger and more resilient over time until it is insensitive to disruption (Alberini, 2005). Consolidation of different types of memory, including contextual, spacial, appetitive and fear-based, require distinct brain regions and neurotransmitters that suggest the involvement of distinct memory systems (Lorenzini et al, 1999; Poldrack et al, 2003). Many complex events are necessary in the brain in order to keep a memory process (Alvarez and Banzan, 2008).

The object recognition paradigm (OR) is an adapted memory test based on the natural propensity of the rodent to explore novelty that confers to the animals the ability to discriminate between novel and familiar entities (Romero-Granados et al, 2009). This paradigm is especially suited to test the effects of pharmacological intervention on learning and memory (Dere et al, 2007). Novelty induces arousal and has motivational effects that are used as a reinforcer to induce learning (Bevins and Besheer, 2005). Multiple brain structures, as well as multiple neurotransmitter/neuromodulators like histamine are involved in the induction and regulation of arousal and its behavior consequences (Miller and O'Callaghan, 2006). The difficulty to recognize familiar items or to discriminate them from novel ones is one of the early symptoms of cognitive decline in Alzheimer's disease (Dudas et al, 2005; Budson et al, 2005). Pharmacological studies suggest that the integrity of hippocampal formation is required for acquisition and storage of information (Balderas et al, 2008).

Histamine is synthesized by neurons in the tuberomammillary nucleus whose axons ramify throughout the brain. Of the four histamine receptors identified so far only H1, H2 and H3 subtypes are expressed in the brain. The H4 subtype occurs mainly in peripheral tissues. H1 and H2 receptors potentiate excitatory inputs while H3 receptors down-regulate histamine syntheses and releases and the releases of other neurotransmitters (Hass et al, 2008). Histamine controls the sleep-wake cycle and nociception and modulates the activity of the

hippocampus, (Hass et al, 2008) involved in fear memory consolidation, aversive memory, and control anxiety (Da Silva et al, 2006; Bonini et al, 2011).

Although it is well known that sedative antihistamines induce cognitive decline in human through blockage of H1 receptor (Yanai et al, 1995), both facilitatory and inhibitory effects of neuronal histamine on learning and memory have been described in animal behavior studies.

De Almeida and Izquierdo (1986) found that intracerebroventricular administration of histamine facilitates the retention of step-down inhibitory avoidance behavior. However, Huston and collaborators (1997) reported that bilateral lesion of the tuberomammillary nuclei improves performance in several learning and memory paradigm.

In this work, we investigated the role of histaminergic system on consolidation of OR memory, a well-established learning paradigm for studying declarative memory in rats, analyzing the possible interplay between the different subtypes of histaminergic receptors.

## 2. METHODS

### 2.1. Animals preparation surgery and drugs infusion procedure

Male Wistar rats (3-month-old 250–280 g) raised in our own facilities or bought at FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil) were used. The animals were housed 5 to a cage and kept with free access to food and water under a 12/12 light/dark cycle, with light onset at 7:00 AM. The temperature of the animal's room was maintained at 22–24 °C. To implant them with indwelling cannulae, rats were deeply anesthetized with thiopental (i.p., 30–50 mg/kg) and 27-gauge cannulae stereotaxically aimed to the CA1 region of the dorsal hippocampus, in accordance with coordinates (AP - 4.0, LL  $\pm$ 3.0, VD -1.8) taken from the atlas of (Paxinos and Watson, 1986). Animals were allowed to recover from surgery for 4 days before submitting them to any other procedure.

At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulae were tightly fitted into the guides. Infusions (1  $\mu$ l/side) were carried out over 60 s and the cannulae were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. The placement of the cannulae was verified postmortem: 2–4 h after the last behavioral test, 1  $\mu$ l/side of a 4% methylene-blue solution were infused as described above and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct cannulae implants were analyzed. All procedures were conducted in accordance with the 'Principles of laboratory animal care' (NIH publication No. 85-23, revised 1996). Every effort was made to reduce the number of animals used and to minimize their suffering.

### 2.2. Drugs

Drugs were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA; pyrilamine, ranitidine and imetit); or Tocris Cookson Ltd. (Avonmouth, Bristol, UK; thiperamide). They were dissolved in saline and stored at -20°C. Before use aliquots were diluted to working concentration with vehicle

(saline). The doses used were based on previous work of our group (Da Silva et al, 2006; Bonini et al, 2011).

## 2.3 Behavioral procedures

### 2.3.1. Object recognition paradigm

The object recognition task was conducted in an open field arena (60 x 40 x 50 cm) built of polyvinyl chloride plastic, plywood and transparent acrylic as described by Myskiw et al., 2007 and Rossato et al., 2007. Before training, animals were habituated to the experimental arena by allowing them to freely explore it during 20 min per day for 4 days in the absence of any other behaviorally relevant stimulus. The stimulus objects were made of metal, glass or glazed ceramic. There were several copies of each object, which were used interchangeably. Glued to the base of each object was a round piece of velcro, which was used to fix the object to the arena's floor. The role (familiar or novel) as well as the relative position of the 2 stimulus objects were counterbalanced and randomly permuted for each experimental animal. The open field arena and the stimulus objects were cleaned thoroughly between trials to ensure the absence of olfactory cues. Exploration was defined as sniffing or touching the stimulus object with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the objects was not considered exploratory behavior. A video camera was positioned over the arena and the rats' behavior was recorded using a video tracking and analysis system for later evaluation. The experiments were performed by an observer blind to the treatment condition of the animals. For training, rats were placed in the open field containing two different objects and left to freely explore them for 5 min. The test session was performed 24 h after training. In the test sessions one of the familiar objects was randomly replaced by a novel one, and rats were reintroduced into the open field for five additional minutes. The compounds to be tested were bilaterally infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus (1µl/side) immediately after training, 30, 120 or 360 min

### 2.3.2. Open field and plus maze

To analyze exploratory and locomotor activities, the animals were placed on the left rear quadrant of a 60 x 40 x 50cm open field with white plywood walls and a 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 indicator of locomotor and exploratory activities, respectively.

To evaluate anxiety state, rats were exposed to an elevated plus maze as detailed in Pellow et al, 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. In the open field and plus maze paradigms the animals received a bilaterally infusion of drugs into the CA1 region of dorsal hippocampus (1µl/side) 24h before tests.

### 2.4 Statistical analyses

Data were analyzed using one-sample Student's *t* test or one-way ANOVA.



### 3. RESULTS

To determine the role of hippocampal histaminergic receptors in recognition memory, adult male Wistar rats were trained in an OR task involving exploration of two different objects. Immediately, 30, 120 or 360 min later they received bilateral intra-CA1 infusions of the H<sub>1</sub>-receptor antagonist, pyrillamine (Pyr - 50mM), the H<sub>2</sub>-receptor antagonist, ranitidine (Ran - 50mM), the H<sub>3</sub>-receptor antagonist, thioperamide (Thi - 50mM), or the H<sub>3</sub>-receptor agonist imetit (Ime - 10mM) (1µl/side; Da Silva et al, 2006).

Rats that received vehicle, Pyr (Fig 1;  $t_{(17)}=4.136$ ,  $p<0.001$  for Veh;  $t_{(6)}=3.195$ ,  $p<0.01$  for Pyr 0';  $t_{(6)}=3.362$ ,  $p<0.01$  for Pyr 30';  $t_{(7)}=2.948$ ,  $p<0.01$  for Pyr 120' and  $t_{(7)}=2.778$ ,  $p<0.01$  for Pyr 360' in one-sample Student's *t* test with theoretical mean=50), or Thi (Fig.2;  $t_{(16)}=4.661$ ,  $p<0.001$  for Veh;  $t_{(17)}=2.454$ ,  $p<0.05$  for Thi 0';  $t_{(16)}=2.271$ ,  $p<0.05$  for Thi 30';  $t_{(9)}=2.269$ ,  $p<0.05$  for Thi 120' and  $t_{(8)}=2.645$ ,  $p<0.05$  for Thi 360' in one-sample Student's *t* test with theoretical mean=50) explored the novel object (C) significantly longer than the familiar one (A). However, animals that received Ran (Fig 3;  $t_{(28)}=5.936$ ,  $p<0.001$  for veh;  $t_{(24)}=3.495$ ,  $p<0.001$  for Ran 0';  $t_{(18)}=1.533$ ,  $p>0.05$  for Ran 30';  $t_{(9)}=0.8075$ ,  $p>0.05$  for Ran 120';  $t_{(10)}=5.041$ ,  $p<0.001$  for Ran 360' in one-sample Student's *t* test with theoretical mean=50) or Ime (Fig 4;  $t_{(17)}=4.136$ ,  $p<0.001$  for Veh;  $t_{(5)}=2.792$ ,  $p<0.05$  for Ime 0';  $t_{(6)}=0.7082$ ,  $p>0.05$  for Ime 30';  $t_{(5)}=0.8117$ ,  $p>0.05$  for Ime 120';  $t_{(7)}=2.778$ ,  $p<0.05$  for Ime 360' in one-sample Student's *t* test with theoretical mean=50) spent the same amount of time exploring the novel (C) and the familiar object (A). This suggests that in this period the amnesia was due an impairment of consolidation process caused by an inhibition on H<sub>2</sub>-receptor by ranitidine demonstrating an involvement of this system receptor. The same occur with Ime, an H<sub>3</sub>-receptor agonist, suggesting a participation of this specific receptor in a regulation of the histamine availability on synaptic cleft.

To investigate whether the amnesia caused by posttraining administration of Ran and Ime was actually due to impairment of the consolidation process or, instead, it was induced by a delayed action on hippocampal function, anxiety and/or exploratory activity able to hinder

retrieval of OR memory consolidation, rats received bilateral intra-CA1 infusion of Pyr, Ran, Ime or Thi 24 h before exposure to a plus maze or an open field arena (Table 1). None of these compounds had any effect in the total number of entries, in the number of entries into the open arms, or in the percentage of time spent in the open arms during the plus maze session. Likewise these compounds did not affect the number of crossing and rearings during a 5-min long free-exploration session of the open field arena.

#### 4. DISCUSSION

The hippocampus has long been thought to be an important region for associative learning and memory. High density of H1 and H2 receptor subtypes was found in hippocampal formation (Pollard and Bouthenet, 1992). Besides, Dai and collaborators (2007) demonstrated that neuronal histamine can enhance learning and memory processes in the frontal cortex and hippocampus through activation of H1 and H2 receptors. In the rodent brain two postsynaptic histamine receptors (H1 and H2) and one presynaptic autoreceptor (H3) have been identified. The H1 is expressed abundantly in various cerebral structures including hippocampus (Hasenöhrl and Huston, 2004).

Neuronal histamine, derived from the nucleus tuberomammillaris of the posterior hypothalamus, has been implicated in arousal, awakening, and maintenance of wakefulness and sleep-wake cycles (Lin, 2000). Diminished alertness, slowed reaction times, and somnolence are common manifestation of treatment with H1 antagonists, thus suggesting that histamine is required for arousal (Blandina et al, 2009). H1R-Knockout (KO) mice did not exhibit novel object-induced conditioned place-preference (CPP) and showed impaired novelty-induced alteration in the Y-maze. The activity and emotional behavior was likewise altered in the H1R-KO mice, but no change happened in one-trial object-place recognition (Zlomuzica et al, 2008). We found that Pyr, an H1 receptor antagonist, does not impair the consolidation of the OR memory when infused in CA1 region of the dorsal hippocampus immediately, 30, 120 or 360 min. after training session. The behavior on plus maze or open field paradigms was unaffected.

Our group found that histamine enhances consolidation of aversive memory in a one-trial step-down inhibitory avoidance task (IA). These results showed that the facilitation induced by histamine and SKF-91844 was blocked by Ran, a H2 receptor antagonist, and mimicked by dimaprit, a H2 receptor agonist, indicating that the promnesic effect of this neurotransmitter is due to the direct activation of H2 receptors (Da Silva et al, 2006). Since we recently demonstrated that histamine facilitates consolidation of fear extinction (Bonini et

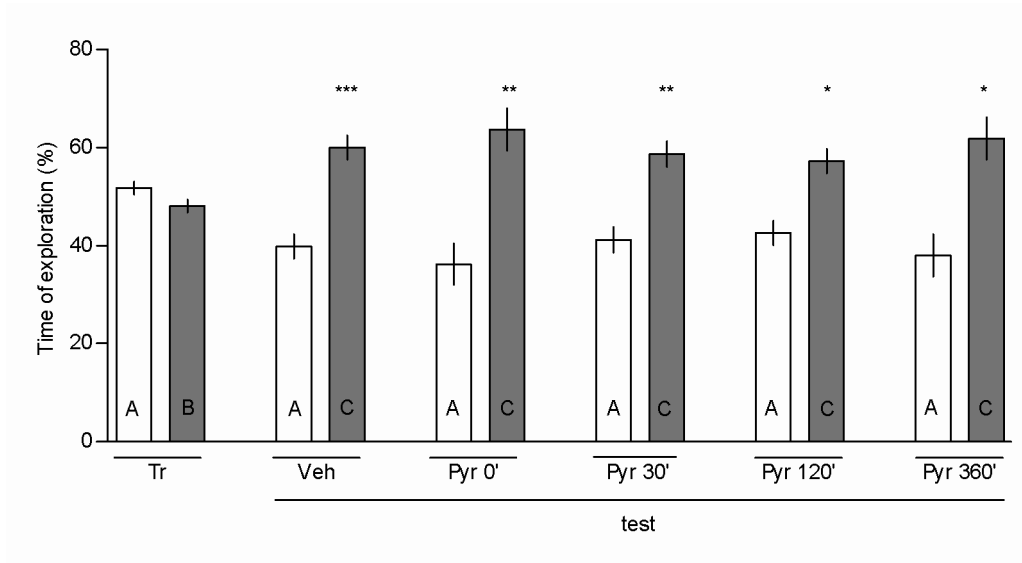
al, 2011) we decided to investigate whether this receptor is involved in the consolidation of OR memory. Our results agreed with previous reports showing that Ran impairs consolidation of OR memory and that was only observed when histamine was administered in 30 to 120 min. after training, suggesting that the amnesia effect of this amine is due to a time-dependent enhancement of the consolidation process that requires hippocampal H2-receptors to happen.

Reports from the literature indicate that the administration of H3 receptor agonist impairs rat performance in OR and in a passive avoidance response at the same doses that reduced acetylcholine (ACh) release from freely moving rat cortex (Blandina et al, 1996). This evidence related the cognitive effects of histamine to modification of cholinergic neurotransmission (Quirion et al, 1995). Microdialysis experiment demonstrated that immpip, an H3 receptor agonist, increases GABA release from the cortex, and bicuculline, a GABA receptor antagonist, reverses the inhibition of ACh release induced by immpip (Giogetti et al, 1997). Thus, H3 heteroreceptors facilitate GABA release, which, in turn, inhibits ACh release. Our data agree with reports showing that lme impairs OR consolidation memory when H3 agonist receptor was infused in the time window (30 to 120 min.) after training session. It might happen because the activation of presynaptic autoreceptor H3, which inhibits histamine release on the synaptic cleft, induces to a decrease in the histamine levels. This result was demonstrated by the amnesia state of rats that spend the same amount of time exploring both the new and familiar objects. Moreover, we observed that Thi, H3 receptor antagonist, had no effects on consolidation of OR memory.

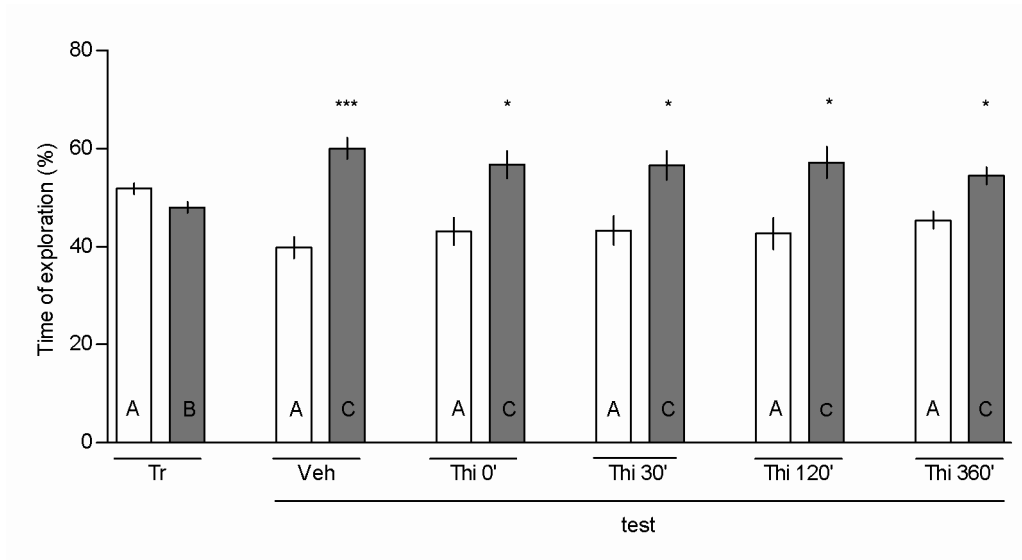
Consistent with previous findings, this study supports the importance of histaminergic system on consolidation of OR memory. In conclusion, our results show that histamine neural systems exert important modulation action on learning and memory functions in the brain.

We conclude that Ran, a H2 antagonism has an amnesic effect on memory consolidation and that lme, a H3 agonist also impairment consolidation memory in the time window of 30 to 120 min. on the object recognizing task.

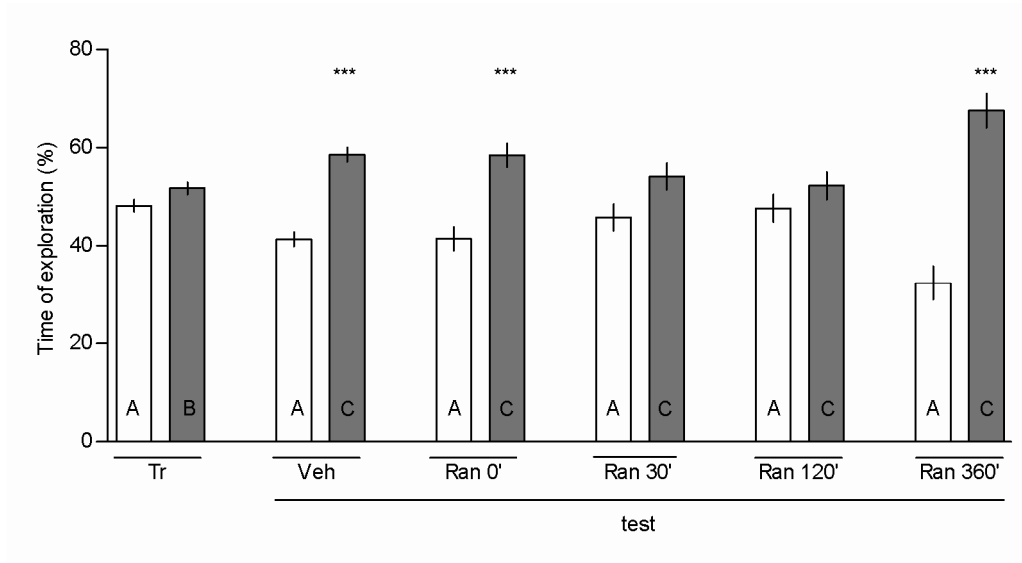
**Fig. 1**



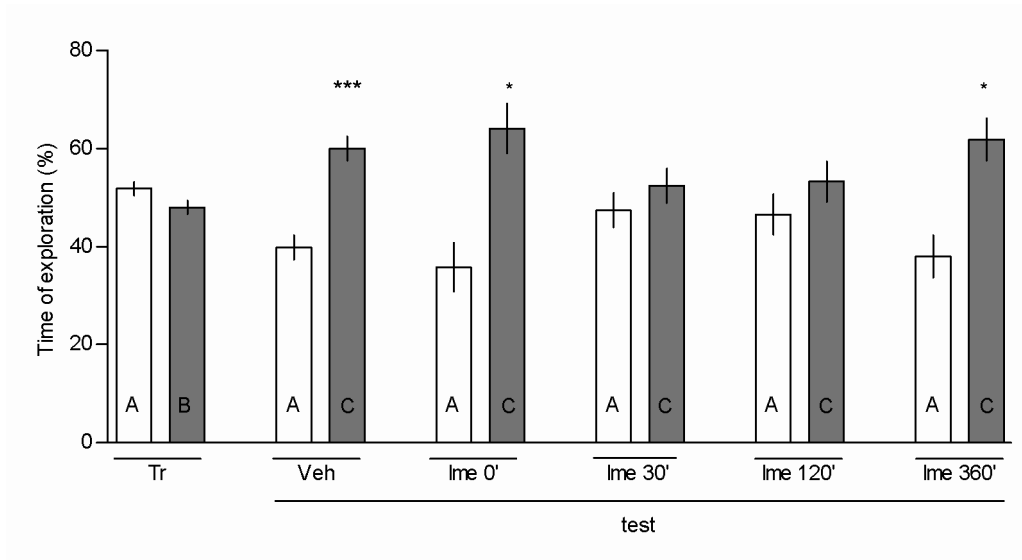
**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Table 1**

	<b>VEH</b>	<b>PYR</b> (50 nmol/side)	<b>RAN</b> (50 nmol/side)	<b>THI</b> (50 nmol/side)	<b>IME</b> (10 nmol/side)
<b>Pluz maze</b>					
Total entries	12.63 ± 0.6876	17.90 ± 1.260	14.80 ± 1.263	11,70 ± 1.713	14.80 ± 1.263
Entries in open arms	6.289 ± 0.4754	10.00 ± 1.022	7.111 ± 1.448	6.20 ± 1.245	7.800 ± 0.9978
Time in open arms (s)	33.30 ± 2.742	52.22 ± 3.544	37.11 ± 8.071	38.63 ± 6.487	39.95 ± 5.934
<b>Open field</b>					
Crossings	62.44 ± 4.322	66.89 ± 11.18	52.38 ± 7.944	41.80 ± 6.487	63.63 ± 7.569
Rearings	20.05 ± 1.375	23.56 ± 3.66	14.13 ± 2.856	12.60 ± 2.262	24.25 ± 3.022

## References

Alberini CM. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *TRENDS in Neuroscience*, 2005; 28: 51-56.

Alvarez EO, Banzan AM. The activation of histamine-sensitive sites on the ventral hippocampus modulates the consolidation of a learned active avoidance response in rats. *Behavioural Brain Research*, 2008; 189: 92-99.

Balderas I, Rodrigues-Ortiz CJ, Salgado-Tonga P, Chaves-Hurtado J, McGaugh JL and Bermudez-Rattoni F. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning and Memory*, 2008; 15: 618-624.

Bennis RA, and Besheer J. Novelty reward as a measure of anhedonia. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2005; 29:707-714.

Blandina P, Efoudebe M, Cenni G, Mannaioni P and Passani MB. Acetylcholine, Histamine, and Cognition: Two Sides of the Same Coin. *Learning and Memory*, 2009; 11: 1-8.

Bonini JS, Da Silva WC, Da Silveira CK, Köhler CA, Izquierdo I and Cammarota M. Histamine facilitates consolidation of fear extinction. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2010; 1-9.

Budson AE, Dodson CS, Daffner KR and Schacter DL. Metacognition and false recognition in Alzheimer's disease: Further exploration of the distinctiveness heuristic. *Neuropsychologia*, 2005; 19: 253-258.



Da Silva WC, Bonini JS, Bevilaqua LRM, Izquierdo I, et al. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H<sub>2</sub> receptor-dependent mechanism. *Hippocampus*, 2006; 86: 100-106.

De Almeida MA, Izquierdo I. Memory facilitation by histamine. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie*, 1986; 283: 193-198.

Dere E, Huston JP and De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 2007; 31: 673-704.

Dudas RB, Clague F, Thompson SA, Graham KS and Hodges JR. Episodic and semantic memory in mild cognitive impairment. *Neuropsychologia*, 2005; 43: 1266-1276.

Giorgetti M, Bacciottini L, Bianchi L, Giovannini MG, Cecchi M, and Blandina P. GABAergic mechanism in histamine from rat cortex in vivo. *Inflam. Res.*, 1997; 46:3-4.

Hasenöhr RU, and Huston JP. *Histamine, Memories are Made of These: From Messengers to Molecules*. Landes Bioscience, 2004; 1-23.

Hass HL, Sergeeva OA and Selbach O. Histamine in the Nervous System. *Physiol Rev*, 2008; 88: 1183-1241.

Huston JP, Wagner U and Hasenöhr RU . The tuberomammillary nucleus projection in the control of learning, memory and reinforcement processes: evidence for an inhibitory role. *Behav. Brain Res*, 1997; 83:97-105.

Lin JS. Brain structure and mechanism involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. *Sleep Med. Rev.*, 2000; 4: 471-503.

Lorenzini A et al. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn. Mem.*, 1999; 71: 1-18.

Miller DB, and O'Callaghan JP. The pharmacology of wakefulness. *Metabolism*, 2006; 55:13-19.

Paxinos G, and Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press: San Diego, 1986; pp. 119.

Poldrack RA and Packard MG. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, 2003; 41: 245-251.

Pollard H, and Bouthenet ML. Autoradiographic visualization of the three histamine receptor subtypes in the brain. *The Histamine Receptors*, 1992; 179-192.

Quirion R, Wilson A, Rowe W, Aubert I, Richard J, Doods H, Parent A, White N, and Meaney MJ. Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M2-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired rats. *J. Neurosci.*, 1995; 15:1455-1462.

Romero-Granados R, Fontán-Lozano A, Gelgado-García JM and Carrión AM. From Learning to Forgetting: Behavioral, Circuitry, and Molecular Properties Define the Different Functional States of the Recognition Memory Trace. *Hippocampus*, 2009.

Yanai K, Ryu JH, Watanabe T, Iwata R, Ido T, Sawai Y, Ito K, and Itoh M. Histamine H1 receptor occupancy in human brains after single oral doses of histamine H1 antagonists measured by positron emission tomography. *Br. J. Pharmacol.*, 1995; 116:1649-1655.

Zlomuzica A, Viggiano D, De Souza e Silva MA, Gironi Carnevale UA, Ruocco LA, Watanabe T, Sadile AG, Huston JP and Dere E. The histamine H1-receptor mediate the motivational effects of novelty. *European Journal of Neuroscience*, 2008; 27: 1461-1474.

## Legends

**Figure 1. Pyrilamine does not impair consolidation of object recognition memory.** Male Wistar rats were implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the hippocampus. Five days later they were submitted to a training session (Tr) in the object recognition paradigm, rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately, 30, 120 or 360 min after that received bilateral intra-CA1 infusions (1 µl/side) of vehicle (Veh) or of the H<sub>1</sub>-receptor antagonist Pyrilamine (50 mM, Pyr). Twenty-four hours after training, the animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) (Test). Data are expressed as mean ± S.E.M. of the percentage of the exploration time for each object with respect to the total exploration time of both objects. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 in a one sample t test versus a theoretical mean of 50. n = 7-18 per group.

**Figure 2. Thioperamide does not impair consolidation of object recognition memory.** Male Wistar rats were implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the hippocampus. Five days later they were submitted to a training session (Tr) in the object recognition paradigm, rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately, 30, 120 or 360 min after that received bilateral infusions (1 µl/side) in CA1 region of the dorsal hippocampus of vehicle (Veh) or H<sub>3</sub>-receptor antagonist Thioperamide (50 mM, Thi). Twenty-four hours after the training session, the animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) (Test). Data are expressed as mean ± S.E.M. of the percentage of the exploration time for each object with respect to the total exploration time of both objects. \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001 in a one sample t test versus a theoretical mean of 50. n = 9-18 per group.

**Figure 3. Ranitidine impairs consolidation of object recognition memory.** Male Wistar rats were implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the hippocampus. Five days later they were submitted to a training session (Tr) in the object recognition paradigm, rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately, 30, 120 or 360

min after that received bilateral infusions (1µl/side) in CA1 region of the dorsal hippocampus of vehicle (Veh) or H<sub>2</sub>-receptor antagonist Ranitidine (50 mM, Ran). Twenty-four hours after the training session, the animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) (Test). Rats spent the same amount of time exploring the novel and the familiar object, in the time window of 30 to 120 min. Data are expressed as mean ± S.E.M. of the percentage of the exploration time for each object with respect to the total exploration time of both objects. \*\*\* p < 0,001 in a one sample t test versus a theoretical mean of 50. n = 10-25 per group.

**Figure 4. Imetit impairs consolidation of object recognition memory.** Male Wistar rats were implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the hippocampus. Five days later they were submitted to a training session (Tr) in the object recognition paradigm, rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately, 30, 120 or 360 min after that received bilateral infusions (1µl/side) in CA1 region of the dorsal hippocampus of vehicle (Veh) or H<sub>3</sub>-receptor agonist Imetit (10 mM, Ime). Twenty-four hours after the training session, the animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) (Test). Data are expressed as mean ± S.E.M. of the percentage of the exploration time for each object with respect to the total exploration time of both objects. \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001 in a one sample t test versus a theoretical mean of 50. n = 6-18 per group.

**Table 1. Bilateral intra-CA1 infusion of Ime, Pyr, Ran or Thi has no effect on anxiety, locomotor and exploratory activities.** Vehicle (Veh), Pyr (1µl/side 50mM), Ran (1µl/side 50mM), Thio (1µl/side 50mM) or Ime (1µl/side 10mM) were infused into dorsal CA1 24 h before an open field or a plus maze session. Data are expressed as mean (± S.E.M.) of the total number of entries, the number of entries into the open arms or of the percentage of time spent in the open arms (Plus maze; n=10 per group), and the number of crossing and rearing (Open field; n= 8-10 per group).