

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia**

**Efeitos de antagonistas histaminérgicos H1 e H2 sobre a ansiedade e a memória emocional de camundongos**

**Marcos Seizo Kishi**

São Carlos  
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia**

**Efeitos de antagonistas histaminérgicos H1 e H2 sobre a ansiedade e a memória emocional de camundongos**

**Marcos Seizo Kishi**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Fisioterapia.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosana Mattioli

São Carlos  
2009

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

K61ea

Kishi, Marcos Seizo.

Efeitos de antagonistas histaminérgicos H1 e H2 sobre a ansiedade e a memória emocional de camundongos / Marcos Seizo Kishi. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 75 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.


1. Ansiedade. 2. Memória - fisiologia. 3. Clorfeniramina. 4. Zolantidina. 5. Histamina. 6. Labirinto em cruz elevado. I. Título.

CDD: 615.78 (20<sup>a</sup>)

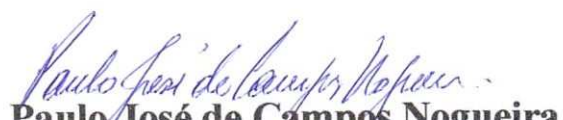
**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE Marcos Seizo Kishi, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 07 DE AGOSTO DE 2009.**

**BANCA EXAMINADORA:**

  
**Rosana Mattioli**  
(UFSCar)

  
**Keiko Okino Nonaka**  
(UFSCar)

  
**Flávia Roberta Faganello Navega**  
(UNESP)

  
**Paulo José de Campos Nogueira**  
(UNESP)

  
**Silvio Morato de Carvalho**  
(USP/FFCLRP)

Dedico esse trabalho à minha esposa, Elaine, e à  
minha filha Sarah.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, Luiz e Ester, pela educação e pelo apoio em todos os momentos de minha vida;

Aos meus irmãos Sérgio, Nádia e César, pelo apoio e pela amizade;

À minha esposa, Elaine, e à minha filha, Sarah. Vocês dão sentido para minha vida, e a força que me permitiu concluir esse trabalho;

À Profa. Rosana Mattioli, pela orientação, pela compreensão e pela oportunidade de realizar esse doutorado em seu laboratório;

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Flávia, Prof. Paulo e Prof. Silvio, pela contribuição valorosa para o artigo da qualificação. Agradecimento especial ao Prof. Silvio, pela disponibilidade em revisar o inglês do artigo;

À Profa. Azair do Canto de Souza, por permitir que os dados desse estudo fossem coletados no Laboratório de Psicologia da Aprendizagem, e pelo auxílio na redação dos artigos;

Aos amigos do Laboratório de Neurociências: Teresa, Fabiana Abrahão, Flávia Faganello, Fernanda Romaguera, Luciana Cofiel, Kelly, Nadiesca, Diogo, Carol, Lucas, Fernanda Daher e Glesler, pela amizade e pela contribuição nas discussões científicas. Agradecimento especial à Carol, pela revisão da introdução, e à Kelly, pela parceria em todas as fases da realização desse trabalho;

Aos amigos do Alojamento UFSCar: Andre, Rogério, Rodrigo, Maurício e Noel. Desde 1996 compartilhamos momentos, às vezes alegres, outras nem tanto, mas que tornaram nossa amizade realmente especial.

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da clorfeniramina e da zolantidina, antagonistas  $H_1$  e  $H_2$  respectivamente, sobre a ansiedade e a memória emocional de camundongos, por meio de dois experimentos. No primeiro experimento, utilizou-se três grupos de camundongos que foram determinados pelo tratamento farmacológico recebido por meio de injeções intraperitoneais (i.p.) de 16 mg/kg de clorfeniramina (CPA – n=13), 20 mg/kg de zolantidina (ZOL – n=14) ou de salina (SAL – n=14). No primeiro dia de teste (T1) cada camundongo foi testado por 5 minutos no labirinto em cruz elevado (LCE) e recebeu o tratamento farmacológico imediatamente após o teste e, 24 h depois, os animais foram re-expostos ao LCE (T2). A análise estatística dos resultados revelou uma redução em T2, com relação a T1, de todas as variáveis avaliadas: entradas nos braços abertos, tempo nos braços abertos, percentual de entradas nos braços abertos e percentual de tempo nos braços abertos e tais resultados nos permitem concluir que, tanto a clorfeniramina quanto a zolantidina não apresentaram efeitos sobre a consolidação da memória emocional de camundongos. No segundo experimento, uma amostra de 123 camundongos foi dividida em 6 grupos que receberam injeções i.p. de zolantidina na dose de 20 mg/kg ou clorfeniramina nas doses de 8,0 mg/kg ou 16 mg/kg, cada qual com seu respectivo grupo controle que recebia o salina. Quarenta minutos após a injeção os camundongos foram expostos pela primeira vez ao LCE (T1) e após 24 horas, cada um dos grupos foi subdividido em dois novos grupos que recebiam novamente a injeção de uma das drogas ou de salina, 40 minutos antes da re-exposição ao labirinto (T2). Em ambos os dias foram avaliados comportamentos relacionados à ansiedade (percentual de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos em T1); índices de aprendizagem e memória (redução de percentual de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos em T2); atividade locomotora (entradas no braço fechado). A zolantidina não afetou a ansiedade ou a memória emocional dos camundongos, enquanto que a clorfeniramina apresentou efeito ansiogênico somente na dose de 16 mg/kg e tal efeito não permitiu que processos de aprendizagem e memória ligados ao LCE fossem devidamente desenvolvidos.

Palavras-chave: clorfeniramina, zolantidina, ansiedade, memória, histamina, labirinto em cruz elevado.

## **Abstract**

The aim of present work was to evaluate the effect of chlorpheniramine and zolantidine, histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> antagonist respectively, on anxiety and on emotional memory in mice, through of two experiments. In the first experiment, forty-one male mice were divided into three groups, according to the pharmacological treatment consisting of intraperitoneal injections of 16 mg/kg of chlorpheniramine (CPA – n=13), 20 mg/kg of zolantidine (ZOL – n=14) or saline (SAL – n=14). In the first day (T1), each mouse was tested for 5 minutes in an elevated plus-maze (EPM). The mice received the pharmacological treatment immediately after test, and 24 h later the animals were resubmitted to EPM (T2). Measures of learning and memory (open arm entries, open arm time, % open arm entries, and % open arm time) were analyzed. Two-way ANOVA showed significant differences within groups in % open arm entries and % open arm time. The student-Newmann-Keuls test for multiple comparisons revealed that both variables were reduced during Trial 2 for the animals treated with SAL, ZOL or CPA, thus indicating decreased open arm activity. In the conditions of the first experiment, chlorpheniramine and zolantidine were shown to have no effect on the consolidation of emotional memory in mice. In the second experiment we used 123 mice which were initially divided into 6 groups and which received i.p. injections of zolantidine (20 mg/kg) or chlorpheniramine at doses of 8.0 mg/kg or 16 mg/kg, each with its respective control (saline). Forty minutes after the injection the mice were for the first time exposed to EPM (T1). After 24 hours (T2), each group was subdivided into two new groups which were re-injected with one of the drugs or saline before re-exposure to the maze. In the two days it were evaluated behaviors related to anxiety (percentage of entries and length of stay in the open arms in T1), rates of learning and memory (reduction of percentage of entries and of length of stay in the open arms in T2), locomotor activity (entries in the closed arms). Zolantidine at a dose of 20 mg/kg, and chlorpheniramine at a dose of 8.0 mg/kg, showed no differences concerning the control, both in T1 and as in the comparison of data from T1 and T2. Furthermore, chlorpheniramine at a dose of 16 mg/kg, reduced activity in the open arms already in T1 and SAL-CPA and CPA-CPA showed no reduction of activity in the open arms in T2. The results suggest that zolantidine has no effect on anxiety or emotional memory, while chlorpheniramine presents an anxiogenic effect at a dose of 16 mg/kg.

Key-words: chlorpheniramine, zolantidine, anxiety, memory, histamine, elevated plus-maze.



## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação da organização do Sistema Histaminérgico com suas origens e projeções (reproduzido de Haas e Panula, 2003) .....	16
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos .....	32
<b>Figura 3:</b> Esquema de realização do Experimento 1 .....	33
<b>Figura 4:</b> Média ( $\pm$ EPM) de entradas nos braços abertos (painel A), percentual de entradas nos braços abertos (painel B), tempo nos braços abertos (painel C) e percentual de tempo nos braços abertos (painel D). A ANOVA de duas vias não revelou diferenças entre os grupos com relação a essas variáveis, mas revelou diferenças entre T1 e T2. Os asteriscos indicam a diferença entre T1 e T2 por meio do teste Student-Newmann-Keuls, dos grupos tratados com SAL, ZOL e CPA imediatamente após T1 .....	37
<b>Figura 5:</b> Formação dos grupos experimentais durante a realização do experimento 2. Inicialmente, foram formados seis grupos em T1 e cada um desses grupos deu origem a dois novos grupos em T2 .....	43
<b>Figura 6:</b> Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) em T1 para os grupos tratados com 20 mg/kg de ZOL ou SAL antes da exposição ao LCE. O teste <i>T-student</i> não evidenciou diferenças entre os grupos para nenhuma das variáveis .....	45
<b>Figura 7:</b> Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) em T1 para os grupos tratados com 8,0 mg/kg de CPA ou SAL antes da exposição ao LCE. O teste <i>T-student</i> não evidenciou diferenças entre os grupos para nenhuma das variáveis .....	46
<b>Figura 8:</b> Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) em T1 para os grupos tratados com CPA, na dose de 16mg/kg, ou SAL antes da exposição ao LCE. O grupo CPA evidenciou menores valores em ambas as variáveis. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas entre os grupos verificadas por meio do teste <i>T-student</i> ( $p < 0,05$ ) .....	46
<b>Figura 9:</b> Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) dos grupos formados a partir da divisão em T2, tratados com 20 mg/kg de ZOL ou SAL. A ANOVA para medidas repetidas revelou diferenças entre T1 e T2. Os asteriscos indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre T1 e T2 por meio do teste LSD de Fisher para todos os grupos experimentais .....	47
<b>Figura 10:</b> Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) dos grupos formados a partir da divisão em T2, tratados com 8,0 mg/kg de CPA ou SAL. A ANOVA para medidas repetidas revelou diferenças entre T1 e T2. Os asteriscos indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre T1 e T2 por meio do teste LSD de Fisher para todos os grupos experimentais .....	48
<b>Figura 11:</b> Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e	

%TBA (percentual de tempo nos braços abertos) para os grupos formados a partir da divisão em T2 e tratados com CPA, na dose de 16 mg/kg, ou SAL. A ANOVA para medidas repetidas revelou diferenças entre T1 e T2. Os asteriscos indicam diferenças ( $p \leq 0,05$ ) por meio do teste LSD de Fisher, entre T1 e T2 para os grupos SAL-SAL e SAL-CPA, mas não para os grupos CPA-SAL e CPA-CPA ..... 49

## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Média ( $\pm$ EPM) da atividade nos braços fechados, em T1 e T2, dos grupos tratados com SAL, ZOL e CPA após a exposição ao LCE em T1. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças entre os grupos ou entre T1 e T2 para EBF (entradas nos braços fechados) e para %EBF (percentual de entradas nos braços fechados) ..... 37
- Tabela 2:** Grupos experimentais, com os respectivos números de sujeitos, formados a partir da divisão em T2 dos animais que receberam de zolantidina (ZOL), na dose de 20mg/kg, ou clorfeniramina (CPA) nas doses de 8mg/kg ou 16mg/kg antes da exposição e da re-exposição ao LCE ..... 44

## Lista de abreviaturas e siglas

%EBA	Percentual de entradas nos braços abertos
%TBA	Percentual de tempo nos braços abertos
CPA	Clorfeniramina
DAG	Diaglicerol
EBA	Entradas nos braços abertos
EBF	Entradas nos braços fechados
HDC	Histidina descarboxilase
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
PLA	Fosfolipase A
PLC	Fosfolipase C
SAL	Salina
T1	Teste 1
T2	Teste 2
TBA	Tempo nos braços abertos
ZOL	Zolantidina

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1. O Sistema Histaminérgico</b> .....	15
<i>1.1.1. Receptores histaminérgicos</i> .....	17
<b>1.2. O Sistema Histaminérgico e a aprendizagem e a memória</b> .....	20
<b>1.3. O Sistema Histaminérgico e a ansiedade</b> .....	23
<b>1.4. O Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</b> .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	29
<b>2.2. Objetivo Específico do Experimento 1</b> .....	29
<b>2.3. Objetivo Específico do Experimento 2</b> .....	29
<b>3. EXPERIMENTO 1: Efeitos da clorfeniramina e da zolantidina sobre a consolidação da memória emocional</b> .....	30
<b>3.1. Materiais e Métodos</b> .....	30
<i>3.1.1. Sujeitos</i> .....	30
<i>3.1.2. Drogas e tratamento</i> .....	30
<i>3.1.3. Aparato experimental e procedimento geral</i> .....	31
<i>3.1.4. Planejamento Experimental</i> .....	33
<i>3.2.5. Análise dos comportamentos</i> .....	33
<i>3.2.6. Local de realização dos experimentos</i> .....	34
<i>3.2.6. Análise estatística</i> .....	35
<b>3.2. Resultados do Experimento 1</b> .....	36
<b>3.3. Discussão do Experimento 1</b> .....	38
<b>4. EXPERIMENTO 2: Efeito da clorfeniramina e da zolantidina sobre a ansiedade e sobre a aquisição e recuperação da memória emocional</b> .....	41
<b>4.1. Materiais e Métodos</b> .....	41
<i>4.1.1. Sujeitos</i> .....	41

<i>4.1.2. Drogas</i> .....	41
<i>4.1.3. Aparato experimental e procedimento geral</i> .....	41
<i>4.1.4. Planejamento Experimental</i> .....	41
<i>4.1.5. Análise dos comportamentos</i> .....	44
<i>4.1.6. Análise Estatística</i> .....	45
<b>4.2. Resultados do Experimento 2</b> .....	45
<i>4.2.1. Análise dos resultados da exposição</i> .....	45
<i>4.2.2. Análise dos resultados da exposição e re-exposição</i> .....	47
<b>4.3. Discussão do Experimento 2</b> .....	50
<b>6. CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
<b>ANEXO A:</b> Dados Brutos do Experimento 1 .....	64
<b>ANEXO B:</b> Dados Brutos do Experimento 2 – CPA 8 mg/kg .....	67
<b>ANEXO C:</b> Dados Brutos do Experimento 2 – CPA 16 mg/kg .....	70
<b>ANEXO D:</b> Dados Brutos do Experimento 2 – Zolantidina 20 mg/kg .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Sistema Histaminérgico

A histamina é uma substância pertencente ao grupo das aminas biogênicas, grupo do qual também fazem parte outros neurotransmissores tais como a serotonina e as catecolaminas. Há muito tempo foi reconhecida como um autacóide, ativo quando liberado por mastócitos na reação inflamatória e no controle do sistema vascular, do músculo liso e de glândulas exócrinas (Kandel et al., 2003).

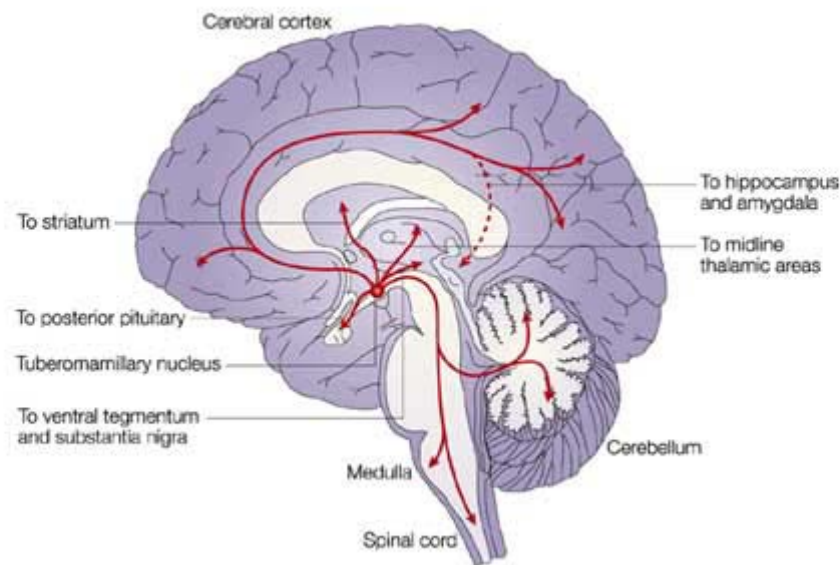
Para desempenhar suas funções em tecidos periféricos a histamina é armazenada principalmente em mastócitos e basófilos. No sistema digestório, a histamina estimula a secreção de ácido clorídrico pelas células parietais pela interação com receptores específicos, permitindo a secreção de suco gástrico de alta acidez, e a histamina armazenada em mastócitos apresenta um importante papel na patogênese de várias condições alérgicas. Após a degranulação dos mastócitos, a liberação da histamina dá início a vários dos conhecidos sintomas da alergia (Ring et al., 1985; Barnes, 1991).

Porém, após estudos como o de Schwartz e colaboradores (1991) tornou-se claro que a histamina não atua no organismo somente como mediador de funções fisiológicas ou patológicas, mas também como neurotransmissor. De acordo com Yanai e Tashiro (2007) a existência de um sistema neural histaminérgico foi descrita pela primeira vez por Watanabe e colaboradores (1983 apud Yanai e Tashiro, 2007). Desde então, o sistema histaminérgico tem sido descrito como um grupo de neurônios filogeneticamente antigo que projeta suas fibras a muitas estruturas do sistema nervoso central (Haas e Panula, 2003; Onodera et al., 1994).

No encéfalo, a histamina é encontrada tanto em neurônios específicos quanto em mastócitos (Garbarg et al., 1976). Os mastócitos são relativamente raros no encéfalo em

comparação com outros tecidos, e suas funções não parecem tão claras. Pode ser observado um número significativo dessas células no hipotálamo e na hipófise, mas na maior parte das regiões encefálicas pode se entender que a histamina atuante tem origem a partir da liberação por neurônios (Hough, 1988). Nos vertebrados, tais como roedores e humanos, os neurônios produtores de histamina estão localizados no núcleo túberomamilar, que é parte do hipotálamo posterior (Panula et al., 1984; Watanabe et al., 1984).

O termo “núcleo túberomamilar” deriva do termo anatômico tuber cinéreo, denotando uma intumescência localizada rostralmente aos corpos mamilares e caudalmente ao quiasma óptico, formando o assoalho do terceiro ventrículo na altura do hipotálamo (Kruger et al., 1995). A localização anatômica do sistema histaminérgico está representada na Figura 1.



**Figura 1:** Representação da organização do Sistema Histaminérgico com suas origens e projeções (reproduzido de Haas e Panula, 2003).

A histamina é sintetizada no encéfalo a partir de  $L$ -histidina por meio da enzima histidina descarboxilase (HDC). Atualmente, nenhum estudo verificou a existência de um sistema específico para a recaptção da histamina e assim, o término de sua ação no encéfalo parece depender de seu catabolismo para telemetilhistamina pela enzima histamina N-



metiltransferase. A tele-metilhistamina é degradada a ácido tele-metilimidazoleacético pela ação combinada da monoaminaoxidase B e de uma aldeído-desidrogenase (Lin et al., 1991).

De forma semelhante a outros sistemas de neurotransmissores, o sistema histaminérgico é regulado por um sistema de retroalimentação, no caso exercido pelo receptor  $H_3$ . O receptor  $H_3$  é um autorreceptor pressináptico localizado no corpo celular e nos terminais axonais de neurônios histaminérgicos, que tem a função de regular a síntese e a liberação da histamina (Arrang et al., 1983; Prast et al., 1994). Segundo Brown e colaboradores (2001), vários estudos têm demonstrado que a liberação de histamina nos tecidos alvo está sob controle inibitório do receptor muscarínico  $M_1$ , adrenoceptores  $\alpha_2$ ,  $5-HT_{1A}$ , receptores opióides  $\kappa$  e receptores galanínicos, e sob controle facilitatório dos receptores opióides  $\mu$ .

### ***1.1.1. Receptores histaminérgicos***

A histamina é um dos neurotransmissores que atuam por meio de receptores acoplados à proteína G. Esses receptores são proteínas que ativam a proteína G por meio da ativação de ligantes apropriados, e assim, dão início a respostas que vão regular a atividade de enzimas intracelulares ou canais iônicos. Uma vez que existem vários tipos diferentes de proteínas G e várias proteínas alvo, a classe de receptores acoplados à proteína G influencia a atividade celular de várias formas distintas (Leurs et al., 1995).

Atualmente, sabe-se que os efeitos da histamina sobre os sistemas biológicos são mediados pela ativação específica de quatro tipos de receptores:  $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  e  $H_4$  (Strakhova et al., 2009; Brown et al., 2001; Haas e Panula, 2003). A ativação molecular desses receptores de membrana produzem vários tipos de respostas biológicas uma vez que estão acoplados a uma série de modalidades de mediadores de proteína-G, tais como  $G_{q/11}$ ,  $G_s$ ,  $G_{\alpha_i/O}$  e  $G_{i/O}$  que estão ligados a vários tipos de sistemas complexos intermediários efetores

tais como a fosfolipase C (PLC), fosfolipase A (PLA) a adenilciclase (Haas e Panula, 2003; Brown et al., 2001). As diversas cascatas de moléculas intermediárias que são ativadas pelos complexos efetores permitem um variado espectro de respostas que podem ativar ou inibir funções neuronais (Smith e Armstrong, 1996; Haas e Konnerth, 1983). Talvez, essa seja uma das razões pelas quais podemos verificar um vasto número de estudos apontando atividades opostas para a histamina em algumas funções encefálicas (Alvarez e Banzan, 2008).

Com relação aos receptores  $H_1$ , a excitação verificada ao nível celular é adquirida por meio da ativação dos mediadores  $G_{q/11}$  e PLC, que levam a formação de dois segundos mensageiros, diaclicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (Haas e Panula, 2003). Em geral, os receptores  $H_1$  medeiam ações excitatórias sobre a atividade de todo o cérebro. Os antihistamínicos clássicos atuam como antagonistas  $H_1$ , e assim, a administração de medicamentos com essa ação costumam apresentar um efeito sedativo (Izumi et al., 2008; Adelsberg, 1997; Goldberg et al., 1987). O alerta é mantido pela interação, ou pela coordenação de diferentes neurotransmissores químicos, tais como as células histaminérgicas, além de células colinérgicas, serotoninérgicas e adrenérgicas (Passani et al., 2007). Coletivamente, esses neurônios de promoção do alerta são denominados sistema ativador ascendente, e a participação do sistema histaminérgico ocorre por meio das interações excitatórias com neurônios colinérgicos corticopetais originados na base do prosencéfalo, bem como com o tegmento mesopontino colinérgico que se projeta ao tálamo e ao hipotálamo que em seguida afetam a excitabilidade cortical (Passani et al., 2007). Adicionalmente, sabemos que a participação do sistema histaminérgico sobre a regulação de comportamentos emocionais ocorre principalmente por meio dos receptores  $H_1$  (Onodera et al., 1994; Yuzurihara et al., 2000).

Os receptores  $H_2$  são acoplados à  $G_s$ , adenilciclase e proteinaquinase, que fosforila proteínas e ativa o fator de transcrição elemento de resposta ao AMP-cíclico. A

ação direta na membrana neuronal é usualmente excitatória ou potencializa a excitação. Como outros neurotransmissores que utilizam essa via de sinalização (noradrenalina, serotonina), a histamina bloqueia os canais de potássio do tipo pequeno. Essa condução causa uma hiperpolarização duradoura e afeta a acomodação do potencial de ação. Dessa forma, o número de potenciais de ação iniciados em resposta a uma simples despolarização é grandemente aumentada sob a influência da histamina (Haas e Panula, 2003). Dessa forma, a transmissão sináptica no hipocampo é potencializada e o potencial de ação de vários tipos de neurônios é mantido por muitas horas após eles terem sido expostos à impromidina, que é um antagonista  $H_2$ , mesmo que por poucos minutos (Haas e Panula, 2003). Porém, em algumas áreas do encéfalo a ativação dos receptores  $H_2$  levam a uma depressão nos potenciais de ação, mas ainda sabe-se pouco sobre a natureza dessa inibição (Brown et al., 2001).

Os receptores  $H_3$  estão acoplados ao  $G_{i/o}$  e aos canais de  $Ca^{2+}$  de alta voltagem, que, em conjunto, configuram um mecanismo típico de regulação da liberação de neurotransmissores. Esses receptores estão localizados no corpo celular, dendritos e axônios, tanto de células histaminérgicas quanto de outros tipos de neurônios (Leurs et al., 1995). Em todos esse tipos de neurônios os receptores  $H_3$  irão promover uma retroalimentação negativa para restringir a síntese e a liberação de histamina, e a liberação de outros neurotransmissores tais como o glutamato, a acetilcolina e a noradrenalina (Schlicker et al., 1992). Ao contrário dos receptores  $H_1$  e  $H_2$ , que apresentam predominantemente um papel excitatório em neurônios, potencializando a transmissão de sinais excitatórios, os receptores  $H_3$  provocam a auto-inibição dos neurônios do núcleo túberomamilar e a inibição da liberação dos neurotransmissores (Haas e Panula, 2003).

O receptor histaminérgico  $H_4$  foi clonado simultaneamente por vários grupos e é predominantemente expresso em células de origem hematopoiética (Liu et al., 2001; Morse et al., 2001) e, dessa forma, vários estudos chegaram a cogitar que esse receptor mediasse

funções exclusivamente periféricas (Lim et al., 2005; Morse et al., 2001; Gantner et al., 2002). É um receptor acoplado à  $G\alpha_{i/O}$ , e dentre suas funções podemos citar a mediação da mobilização de cálcio e a quimiotaxia de mastócitos e basófilos (Ling et al., 2004). Além dessas funções, foram descobertas propriedades antinociceptivas e antipruríticas dos antagonistas  $H_4$ , sugerindo sua possível presença em neurônios periféricos e o envolvimento na regulação da hiperalgesia térmica (Coruzzi et al., 2007; Dunford et al., 2007).

Recentemente, Strakhova e colaboradores (2009) verificaram a presença de receptores  $H_4$  por todo o sistema nervoso central de ratos com exceção ao hipocampo e o hipotálamo, sendo que os níveis de expressão desses receptores no cerebelo e no córtex cerebral excederam aqueles verificados no baço e no fígado. No mesmo estudo, a análise em seres humanos demonstrou a existência dos receptores  $H_4$  em todas as regiões no sistema nervoso analisadas, incluindo o hipocampo, o córtex cerebral, o tálamo e a amígdala, com altos níveis de expressão na medula espinhal. A partir desses achados, os autores sugeriram que devido a essa distribuição os receptores  $H_4$  poderiam estar envolvidos em mecanismos relacionados à dor e às parestesias (Strakhova et al., 2009).

## **1.2. O Sistema Histaminérgico e a aprendizagem e a memória**

A aprendizagem é definida como a alteração de comportamento de um organismo como resultado de uma experiência, enquanto que memória é definida como o processo pelo qual uma informação é adquirida, consolidada e, posteriormente, evocada (Kolb e Wishaw, 2002; Kandel et al., 2003; Brandão, 2003).

Segundo Placzek e colaboradores (2009) os processos de aprendizagem e memória estão intimamente ligados ao hipocampo e estão relacionados à distribuição de receptores colinérgicos em células hipocampais. Interações anormais entre o sistema

colinérgico e outros sistemas neurotransmissores podem causar efeitos aditivos ou sinérgicos sobre a cognição (Blandina et al., 2009). Nesse sentido, o sistema histaminérgico ganha atenção, uma vez que, estudos indicam que o mesmo afeta a aprendizagem e a memória por meio da modulação da liberação da acetilcolina, embora algumas funções histaminérgicas ocorram de forma independente à acetilcolina (Passani et al., 2000). Por exemplo, a administração de histamina não afeta a liberação de acetilcolina pelo hipocampo, porém melhora processos relacionados à memória de medo pela ativação da proteína quinase 1 ativada por mitógeno (ERK2) via receptores H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub> em células da região CA3 do hipocampo.

Tanto em ratos quanto em humanos, as projeções do núcleo basal magnocelular fornecem a maior parte das inervações colinérgicas ao córtex. Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a aplicação local de histamina diminui o tônus colinérgico no córtex por meio da ativação dos receptores H<sub>3</sub> (Blandina et al., 1996). Por meio dessa interação, a administração sistêmica de agonistas histaminérgicos prejudica o desempenho de ratos no reconhecimento de objetos e na tarefa de esQUIVA passiva, nas mesmas doses que reduzem a liberação de acetilcolina no córtex de ratos. Dessa forma, pôde-se observar que a redução da disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica pode resultar em prejuízos cognitivos (Quirion et al., 1995).

Corroborando os estudos relacionando os sistemas colinérgico e histaminérgico com processos de aprendizagem e memória, vários estudos apontam para a importância do sistema histaminérgico sobre tais funções (Da Silva et al., 2006; De Almeida e Izquierdo, 1986). No entanto, o papel desse neurotransmissor durante a aquisição e retenção da informação e na recuperação da memória se mantém contraditório (Serafim et al., *submetido*). Alguns trabalhos descrevem efeitos inibitórios da histamina (Huston et al., 1997; Spieler et al., 1999), enquanto outros estudos demonstram um papel facilitatório da histamina na

aprendizagem e na memória (Prast, et al.; 1996, De Almeida e Izquierdo, 1986).

Diante disso, nosso laboratório iniciou pesquisas sobre o sistema histaminérgico utilizando o peixe da espécie *Carassius auratus* como modelo animal (Medalha et al., 2003; Coelho et al., 2001; Cofiel e Mattioli, 2006), supondo que alguns desses aspectos contraditórios pudessem ser desvendados por meio do uso de uma espécie com um único local de projeção do sistema histaminérgico ao telencéfalo (Ekström et al., 1995). Diferentes modelos foram utilizados em nosso grupo de trabalho (esquiva inibitória, localização espacial e condicionamento por preferência de lugar) apresentando resultados discrepantes (Faganello e Mattioli, 2007; Medalha e Mattioli, 2007; Coelho et al., 2001; Medalha et al, 2000; Mattioli et al., 1998).

Adicionalmente, trabalhos recentes como o de Portavela e Vargas (2005) têm sugerido a existência de diferentes sistemas de aprendizagem em peixes tais como a aprendizagem emocional. De acordo com Faganello e Mattioli (2007), uma possível interpretação dos resultados contraditórios verificados em estudos com peixes seria a existência de modulação de algum componente emocional da aprendizagem pelo sistema histaminérgico. No entanto, tem sido difícil desenvolver estratégias comportamentais para analisar a aprendizagem emocional em peixes.

A memória é um processo cognitivo crítico para se estabelecer uma identidade do indivíduo e é necessária para desenvolver os vários processos nos quais nossas experiências passadas são usadas para interpretar e agir sobre nossas experiências futuras (Curran e Mintzer, 2006). Estudos comportamentais realizados com animais têm investigado o papel das emoções sobre a memória, uma vez que há fortes indícios sobre a interação desses componentes.

A memória emocional está envolvida com algum componente emocional como, por exemplo, o medo e a ansiedade e, segundo LeDoux (2000), as respostas expressas

durante as experiências com forte estimulação emocional (por ex: defesa contra um perigo e luta com um predador) mostram-se essenciais para a sobrevivência do indivíduo e de sua espécie. Outros estudos comportamentais sugerem ainda que a liberação de hormônios relacionados com o estresse, durante as experiências emocionais, desempenha um papel importante em mediar os efeitos duradouros da estimulação emocional sobre a memória (MacGaugh, 2004). Sendo assim, a memória emocional seria evocada mais facilmente em experiências futuras que apresentem um forte componente emocional.

### **1.3. O Sistema Histaminérgico e a ansiedade**

De acordo com Cisler e colaboradores (2009), pesquisas recentes sugerem que o medo seja uma resposta defensiva a uma ameaça existente, e que a ansiedade é uma resposta preparatória para contextos em que uma ameaça pode ocorrer ao organismo, ou seja, condições de risco latente. Com exceção a essas condições consideradas normais, a ansiedade é considerada um sinal cardinal de muitas desordens psiquiátricas e é um componente quase inevitável de muitas condições médicas e cirúrgicas (Kumar et al., 2007).

Em um estudo de revisão sobre o sistema histaminérgico, Brown e colaboradores (2001) constataram que poucos estudos se concentraram sobre a participação do sistema histaminérgico sobre a ansiedade. Posteriormente, outros estudos foram conduzidos e, de modo geral, verifica-se que há uma prevalência de estudos que apresentam um aumento da ansiedade mediado pela histamina (Kumar et al., 2007; Rostami et al., 2006; Privou et al., 1998; Frisch et al., 1998), além de um certo predomínio de atuação dos receptores H<sub>1</sub> sobre a regulação de comportamentos emocionais (Yuzurihara et al., 2000; Onodera et al., 1994).

Kumar e colaboradores (2007) verificaram a existência de um efeito ansiogênico em camundongos que receberam injeções intraperitoneal de L-histidina, um precursor de histamina, antes da exposição ao LCE. Tal efeito foi antagonizado pela injeção prévia de pirilamina (antagonista H<sub>1</sub>) e não pela aplicação de zolantidina ou de tioperamida (antagonistas H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>, respectivamente), o que sugere que a ação ansiogênica provocada pela elevação dos níveis de histamina tenha sido mediada via receptores H<sub>1</sub>.

Estudos realizados com injeções em regiões encefálicas tais como o hipocampo ventral (Rostami et al., 2006) e septo lateral (Zarrindast et al., 2008) indicaram um efeito ansiogênico induzido pelo aumento dos níveis centrais de histamina. De forma semelhante, Frisch e colaboradores (1998) verificaram que a lesão da região E2 do núcleo túberomamilar de ratos provocou um comportamento parecido com ansiolítico, devido à morte de neurônios histaminérgicos, o que acarretaria menor atividade desse sistema. Adicionalmente, um estudo de Privou e colaboradores (1998) verificou que a administração de CPA e de ranitidina na região do núcleo basal magnocelular apresentou efeito ansiolítico em ratos.

Por outro lado, Zarrindast e colaboradores (2006) verificaram que administração de histamina na região CA1 do hipocampo provocou efeito ansiolítico em ratos submetidos ao LCE e que tal efeito foi antagonizado pela administração de pirilamina e ranitidina na mesma região. Assim, esse estudo sugeriu a existência de um efeito ansiogênico de antagonistas H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> nessa região.

Hirano e colaboradores (2006) verificaram que a CPA reduziu de forma significativa e dose-dependente a duração da imobilidade de camundongos diabéticos e não-diabéticos no modelo de suspensão. Em contraste, o antagonista H<sub>1</sub> epinastina aboliu a imobilidade em camundongos diabéticos, mas não alterou a imobilidade em camundongos não diabéticos. Esses resultados reforçaram a hipótese de que alterações metabólicas possam afetar o efeito de neurotransmissores sobre funções cognitivas.



#### 1.4. O Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é considerado um dos mais populares testes *in vivo* em uso atualmente (Carobrez e Bertoglio, 2005). Embora seja frequentemente utilizado como ferramenta para observar efeitos ansiolíticos de drogas, atualmente seu uso tem se estendido para o entendimento de bases biológicas de componentes emocionais relacionados à aprendizagem e memória, dor, hormônios, adicção e abstinência, bem como para o entendimento de várias modalidades de desordens de ansiedade, tais como ansiedade generalizada, fobias e estresse pós-traumático (Carobrez e Bertoglio, 2005; Rodgers et al., 1996).

De acordo com Rodgers e Cole (1994), o modelo deriva de um trabalho de Montgomery, em 1955, sobre a relação entre medo e comportamento exploratório de ratos, e a premissa básica do modelo se baseia na idéia de que a novidade ambiental evoca o medo e a curiosidade, criando desse modo um conflito típico de aproximação-esquiva. Usando a exploração da gaiola moradia dos animais, Montgomery verificou que os ratos consistentemente mostravam maior nível de exploração de passagens fechadas do que de passagens abertas e, quando se viam diante da escolha de um tipo de passagem no labirinto em “Y” elevado, consistentemente eles preferiam os braços fechados. Essas informações foram interpretadas como indicadores de que os braços abertos gerassem um maior nível de medo do que os braços fechados, levando a aumentar o comportamento de evitá-los (Rodgers e Cole., 1994).

Inicialmente, discutia-se que a relutância dos animais em explorar os braços abertos fosse uma combinação da aversão demonstrada por roedores a espaços abertos em conjunto com a aversão à altura do labirinto (Lister, 1990). Porém, estudos como o de Treit e colaboradores (1993) demonstraram que a altura isoladamente não poderia ser considerada

um estímulo suficientemente ansiogênico, e assim, a sugeriu-se que a aversão aos espaços abertos estaria relacionada à dificuldade de tigmotaxia, uma reação em que o animal permanece próximo a referências verticais para que possa se orientar por meio de suas vibríças (Treit et al., 1993). Por outro lado, recentes descobertas têm indicado que as vibrissas não apresentam um papel determinante para que sejam verificados os comportamentos relacionados ao modelo, mas sim as informações visuais distais (Martinez et al., 2002).

A popularidade da utilização desse modelo é devida à vasta lista de vantagens que incluem: economia, rapidez, simplicidade de desenho e sensibilidade bidirecional a drogas, aliado ao fato de não requerer longos períodos de treinamento ou o uso de privação de água ou comida, ou o uso de estímulos aversivos tais como o choque elétrico (Rodgers e Dalvi, 1997; Pellow et al., 1985).

De forma a contribuir para a consistência do modelo, várias evidências foram consideradas para a sua validação. A esquivia dos braços abertos é consistente com a visão de que essas áreas evocam uma forte reação de medo em relação aos braços fechados, desse modo provendo ao modelo a validade de face, e possivelmente de construto (Rodgers e Cole, 1994). Em um estudo específico para validação do modelo do LCE, Pellow e colaboradores (1985) verificaram que nos braços abertos os ratos apresentam maior nível de comportamentos relacionados ao medo, como a imobilidade e a defecação, caracterizando uma validação comportamental. Além disso, foi verificado um nível duas vezes maior de corticosterona no plasma de ratos confinados aos braços abertos em relação a ratos confinados aos braços fechados, conferindo uma validação fisiológica ao modelo (Pellow et al., 1985).

De forma semelhante, Lister (1987) realizou um experimento para a validação do modelo do LCE para camundongos. Nesse experimento foi verificado que o drogas ansiolíticas aumentavam o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que drogas ansiogênicas reduziam essa variável. Nesse mesmo experimento, também foi verificado que

uma experiência prévia no labirinto reduzia substancialmente o efeito do clordiazepóxido, um ansiolítico clássico, sobre o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, praticamente abolindo o efeito ansiolítico esperado.

A partir desses estudos para validação do modelo, diversos trabalhos têm utilizado o LCE para avaliar o efeito de drogas sobre a ansiedade, partindo do pressuposto de que drogas que aumentem a atividade nos braços abertos são consideradas ansiolíticas enquanto que drogas que reduzam a exploração dos braços abertos são consideradas ansiogênicas (Kumar et al., 2007; Mendes-Gomes, 2005; Rodgers e Johnson, 1995; Griebel, 1993; Lister, 1987).

Além da utilização do LCE para a avaliação da ansiedade, vários laboratórios têm empregado esse modelo para avaliar mecanismos relacionados à aprendizagem e à memória, por meio do protocolo Teste 1/Teste 2 (T1/T2) (Bertoglio e Carobrez, 2000; Espejo, 1997; Treit et al., 1993). Essa abordagem se fundamenta no fato de que uma primeira exposição ao LCE altera de forma significativa as respostas comportamentais duráveis, tais como a atividade nos braços abertos do labirinto (número de entradas e tempo nos braços abertos) em exposições subsequentes. Os resultados de alguns experimentos (Dal-Cól et al., 2003; Bertoglio e Carobrez, 2002; File et al., 1993) sugeriram que após uma exploração inicial do aparato os roedores seriam capazes de adquirir, consolidar e recuperar algum tipo de memória relacionada às áreas potencialmente perigosas do labirinto, os braços abertos.

Conforme já exposto anteriormente, Lister (1987) também já havia verificado que uma experiência prévia no LCE reduzia substancialmente o efeito do clordiazepóxido sobre o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, praticamente abolindo o efeito ansiolítico esperado para esse procedimento. Posteriormente, outros trabalhos observaram resultados semelhantes (Bertoglio e Carobrez, 2002; Holmes e Rodgers, 1999; Rodgers e

Shepherd, 1993) e esse fenômeno passou a ser referido como “Tolerância a um primeiro teste” (One Trial tolerance) (File et al., 1990).

Dessa forma, diversos estudos foram conduzidos para explicar essa perda de efeito ansiolítico por benzodiazepínicos, sugerindo hipóteses como habituação locomotora (Dawson et al., 1994), sensibilização do medo dos braços abertos (Rodgers e Shepherd, 1993), e mudança qualitativa no estado emocional na segunda exposição ao LCE (Holmes e Rodgers, 1999).

A fim de estudar tais hipóteses, Roy e colaboradores (2009) conduziram um estudo comparando ratos forçados a explorar o LCE com ratos que exploraram livremente o aparato, além de verificar o efeito do clordiazepóxido sobre esses animais. A partir dos resultados desse estudo, os pesquisadores sugeriram que o aumento da esquia dos braços abertos seria uma tendência incondicionada e não dependente de aprendizagem, uma vez que os animais que exploraram livremente o LCE apresentaram comportamento semelhante ao do grupo com exploração forçada. Assim, o aumento da esquia dos braços abertos estaria diretamente ligado a questões ambientais como a ausência de tigmotaxia ou o contraste de luminosidade entre os braços abertos e fechados. Porém, mesmo neste caso, para que a atividade nos braços abertos do animal se inicie baixa durante a exposição ao labirinto no segundo dia, seria necessário evocar a memória destas características ambientais, o que caracteriza aprendizagem.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho teve por objetivo geral verificar o efeito da clorfeniramina e da zolantidina sobre a ansiedade e memória emocional de camundongos expostos e re-expostos ao Labirinto em Cruz-Elevado.

Para esse propósito foram realizados dois experimentos com seus respectivos objetivos específicos.

### **2.2. Objetivo Específico do Experimento 1**

O experimento 1 teve por objetivo verificar os efeitos da clorfeniramina e da zolantidina sobre a consolidação da memória emocional em camundongos expostos e re-expostos ao Labirinto em Cruz-Elevado.

### **2.3. Objetivo Específico do Experimento 2**

O experimento 2 teve por objetivo verificar os efeitos da clorfeniramina e da zolantidina sobre a ansiedade e recuperação da memória emocional em camundongos expostos e re-expostos ao Labirinto em Cruz-Elevado.

### **3. EXPERIMENTO 1: Efeitos da clorfeniramina e da zolantidina sobre a consolidação da memória emocional**

#### **3.1. Materiais e métodos**

##### **3.1.1. Sujeitos**

Foram utilizados 41 camundongos machos, adultos, experimentalmente ingênuos, da cepa Suíço-albino (Universidade Federal de São Carlos- SP- Brasil), pesando 30-35g a época dos experimentos. Estes habitavam gaiolas (41 x 34 x 16 cm) em grupos de 10 animais em ambientes com ambos, temperatura ( $24 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e luz (ciclos com 12h de luz e 12 h escuro, com início da fase clara às 7:00h da manhã) controlados. Todos os testes foram conduzidos durante a fase de luz do ciclo, entre 9:00 e 16:00h. A comida e água eram disponibilizadas livremente, com exceção ao breve período de realização dos testes. Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (028/2007). Foram realizados todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais.

##### **3.1.2. Drogas e tratamento**

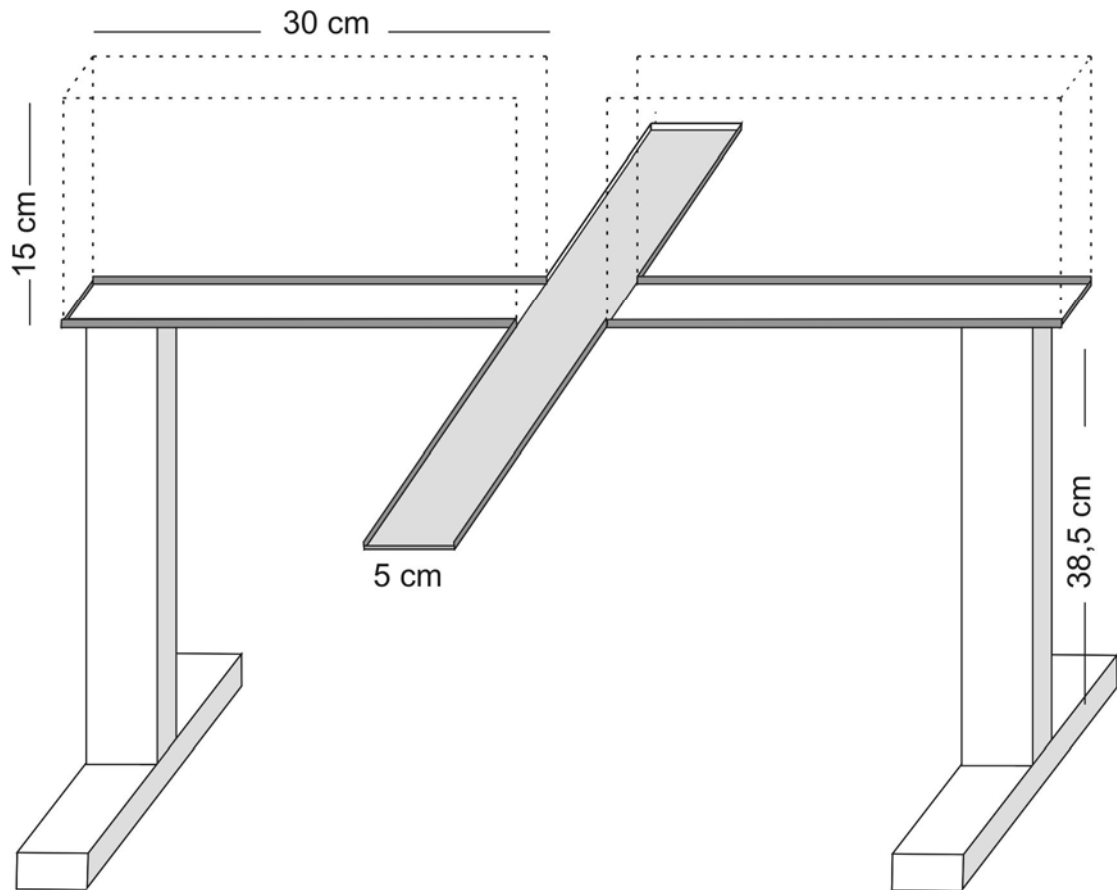
O antagonista do receptor  $H_1$ , clorfeniramina (CPA) (Sigma, EUA) e o antagonista do receptor  $H_2$ , zolantidina (ZOL) (Sigma, EUA) foram dissolvidos em salina às concentrações de 8 e 10 mg/kg respectivamente. Essas drogas atravessam a barreira hematoencefálica e assim, foram administradas intraperitonealmente (i.p.) a um volume de 2 ml/kg de peso corporal, de tal forma que as doses finais utilizadas foram de 16 mg/kg de CPA e 20 mg/kg de ZOL. Essas doses foram escolhidas com base em experimentos anteriores (Cofiel e

Mattioli, 2006; Faganello e Mattioli, 2008; Faganello e Mattioli, 2007;). Injeções de salina (SAL) de mesmo volume foram utilizadas como controle.

Tanto as drogas como a salina foram colocadas em tubos Eppendorf codificados e mantidos sob refrigeração. Essa codificação era desconhecida do pesquisador durante a realização dos testes e da análise comportamental.

### ***3.1.3. Aparato experimental e procedimento geral***

O aparato utilizado para os testes foi o Labirinto em Cruz Elevado que foi modificado de modelos validados para ratos (Pellow et al., 1985) e camundongos (Lister, 1987). O LCE foi construído em madeira com as paredes dos braços fechados construídas com vidros transparentes. O Labirinto consistia de quatro braços, dois abertos (30cm x 5cm x 0,25 cm) e dois braços fechados (30cm x 5cm x 15cm), estendidos a partir de uma plataforma central (5cm x 5cm) e elevado do solo a uma altura de 38,5 cm (Figura 2). Todos os testes foram conduzidos sob iluminação moderada (77lx) medida na plataforma central do LCE, durante a fase clara do ciclo de luz.



**Figura 2:** Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos.

Para facilitar a adaptação, os animais foram transportados a uma sala do laboratório iluminada de forma moderada no dia do teste, e mantidos sem perturbação por pelo menos 1 hora antes do início dos testes. Os experimentos foram realizados em dois dias consecutivos: Teste 1 (T1) e Teste 2 (T2).

Em ambos os dias de teste, a sessão se iniciava com a colocação do sujeito na plataforma central do LCE, com a face voltada para um dos braços abertos e foram permitidos 5 minutos de exploração do labirinto. Após cada sessão de teste realizada com os animais, o labirinto era completamente limpo com álcool 20% (v/v). O comportamento dos animais foi gravado por uma câmera posicionada acima e a 50° do labirinto, para permitir a discriminação e documentação dos comportamentos que foram analisados. O sinal de vídeo foi também observado em tempo real, em um monitor posicionado em outra sala para controlar a

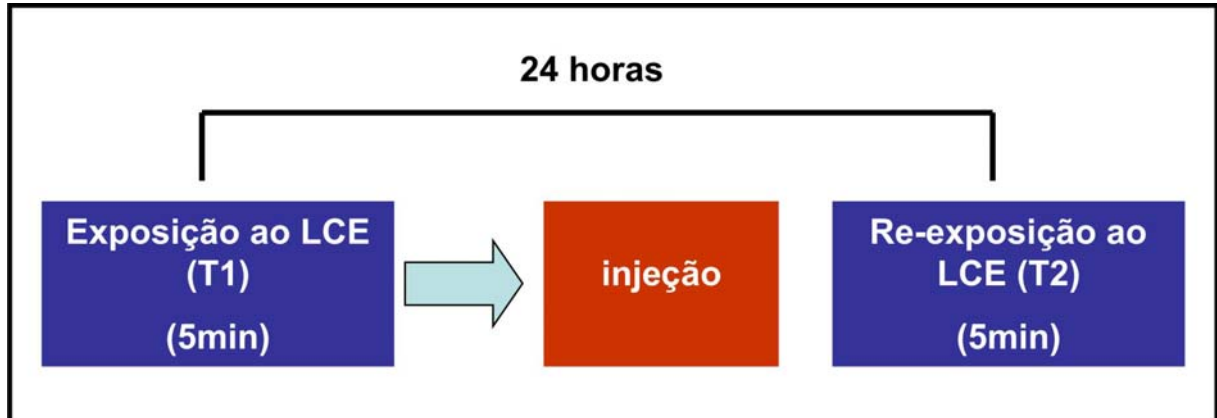


realização dos testes.

### 3.1.4. Planejamento Experimental

De acordo com a injeção recebida pelos sujeitos, foram formados três grupos: o grupo CPA (n=13) que recebeu uma injeção de CPA (16 mg/kg), grupo ZOL (n=14) que recebeu uma injeção de ZOL (20 mg/kg) e grupo SAL (n=14) que recebeu uma injeção de salina.

No início do experimento, cada animal era exposto ao LCE individualmente, de acordo com o descrito no procedimento geral, e logo em seguida recebia uma das injeções de acordo com o grupo ao qual pertencia. Após 24 horas, o animal era novamente exposto ao LCE. O esquema do planejamento experimental está ilustrado na Figura 3.



**Figura 3:** Esquema de realização do Experimento 1.

### 3.1.5. Análise dos comportamentos

As imagens dos testes foram assistidas por um observador treinado utilizando um *software* de análise comportamental denominado X-Plot-Rat versão 3.0 (Garcia et al., 2005). As variáveis comportamentais analisadas foram definidas de acordo com estudos

anteriores (Rodgers e Johnson, 1995; Nunes-de-Souza et al., 2008). Dessa forma, foram avaliadas: as entradas nos braços abertos e fechados (EBA e EBF) (as entradas nos braços foram definidas como todas as quatro patas dentro do braço do labirinto), total de entradas e tempo de permanência dentro dos braços abertos e fechados e na plataforma central. Essas medidas foram utilizadas para calcular o percentual de entradas nos braços abertos  $\{\%EBA; [(EBA/\text{total de entradas}) \times 100]\}$  e percentual de tempo de permanência nos braços abertos  $\{\%TBA; [(TBA/300) \times 100]\}$ .

Os índices de ansiedade e memória foram avaliados através do paradigma T1/T2 (Bertoglio et al., 2006; Dal-Cól et al., 2003). Os índices de ansiedade compreenderam %EBA e %TBA em T1. Durante a re-exposição, a diminuição da atividade nos braços abertos (entradas e tempo gasto nos braços abertos) foi definida como índice de aprendizagem e memória. A atividade locomotora foi avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (Carobrez e Bertoglio, 2005; Menard e Treit, 1999; Rodgers et al., 1997).

### ***3.1.6. Local de realização dos experimentos***

A manutenção dos animais pertencentes à amostra dos experimentos e os testes comportamentais foram realizados no laboratório do Grupo de Psicobiologia do Departamento de Psicologia da Universidade Federal de São Carlos, por meio de uma colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Azair L. M. do Canto de Souza.

A análise das imagens e os demais procedimentos para a conclusão do presente estudo foram realizados no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

### ***3.1.7. Análise estatística***

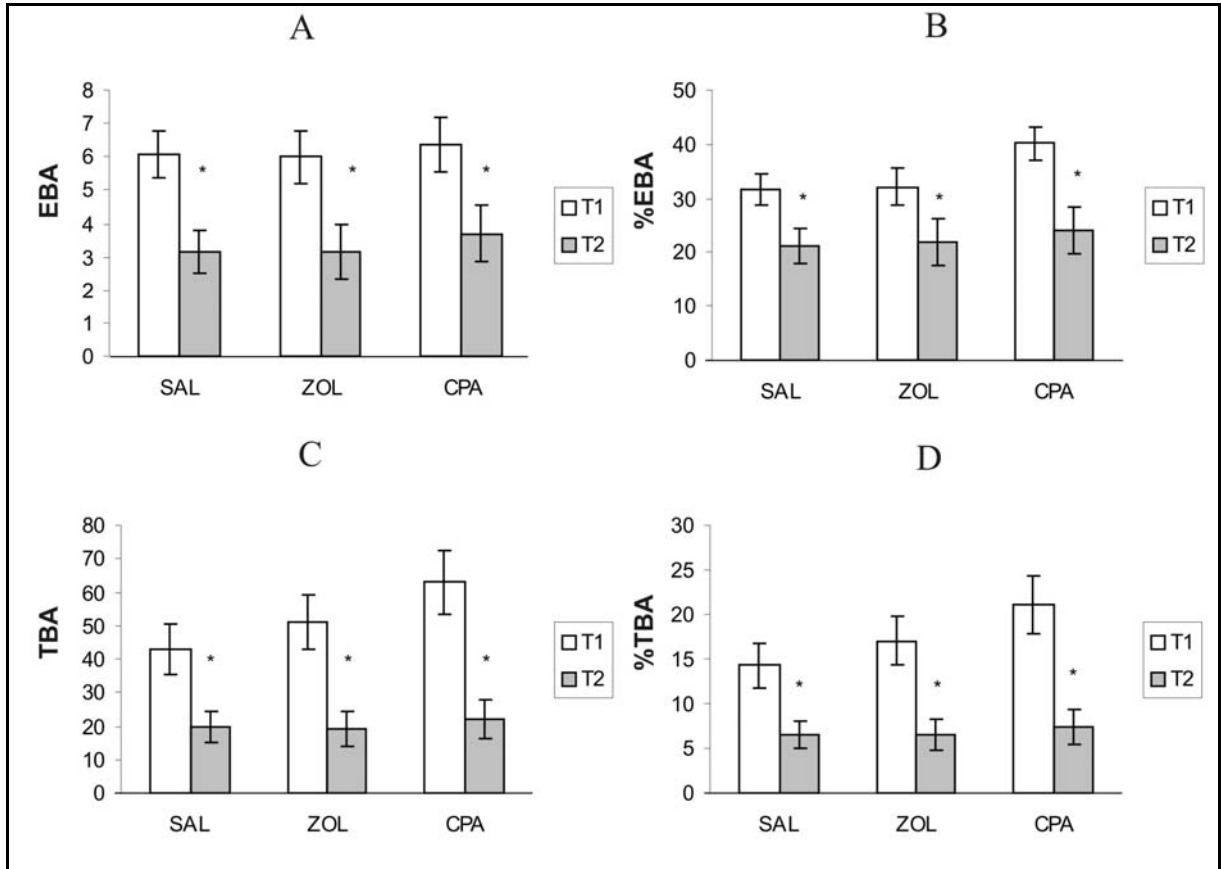
Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade de variância.

Os resultados foram comparados por meio da ANOVA de duas vias com medidas repetidas (fator A: tratamento, fator B: dias de teste) e, quando apropriado, foi realizado o teste post-hoc Student-Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Todos os testes foram realizados pelo programa GB-STAT.

### 3.2. Resultados do Experimento 1

A Figura 4 apresenta os resultados de EBA (painel A), %EBA (painel B), TBA (painel C) e %TBA (painel D) exibidos pelos camundongos dos três grupos experimentais em T1 e T2. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças entre os grupos com relação a nenhuma das variáveis tanto em T1 quanto em T2: EBA ( $F_{3,41}=0,17287$ ;  $p=0,8419$ ), %EBA ( $F_{3,41}=1,6889$ ;  $p=0,1983$ ), TBA ( $F_{3,41}=1,01667$ ;  $p=0,3714$ ) e %TBA ( $F_{3,41}=1,01673$ ;  $p=0,3714$ ).

No entanto, a ANOVA de duas vias evidenciou diferenças significativas entre os resultados de T1 e T2 com relação a todas as variáveis: EBA ( $F_{3,41}=27,90115$ ;  $p<0,0001$ ), %EBA ( $F_{3,41}=671,24876$ ;  $p<0,0001$ ), TBA ( $F_{3,41}=42,75455$ ;  $p<0,0001$ ) e %TBA ( $F_{3,41}=42,75445$ ;  $p<0,0001$ ). O teste para comparações múltiplas Student-Newmann-Keuls revelou que todas as variáveis se reduziram em T2 para os animais tratados com SAL, ZOL ou CPA, portanto apresentando redução da atividade nos braços abertos.



**Figura 4:** Média ( $\pm$ EPM) de EBA – entradas nos braços abertos (painel A), %EBA – percentual de entradas nos braços abertos (painel B), TBA – tempo nos braços abertos (painel C) e %TBA – percentual de tempo nos braços abertos (painel D). A ANOVA de duas vias não revelou diferenças entre os grupos com relação a essas variáveis, mas revelou diferenças entre T1 e T2. Os asteriscos indicam a diferença entre T1 e T2 por meio do teste Student-Newmann-Keuls, dos grupos tratados com SAL, ZOL e CPA imediatamente após T1.

A atividade nos braços fechados está representada na Tabela 1. A ANOVA de duas vias não evidenciou diferenças entre os grupos para as entradas nos braços fechados ( $F_{3,41}=1,04875$ ;  $p=0,3603$ ) e percentual de entradas nos braços fechados ( $F_{3,41}=1,20568$ ;  $p=0,3107$ ). Da mesma forma, não houve diferenças nas entradas nos braços fechados entre os resultados de T1 e T2, portanto, não houve alteração da atividade locomotora desses animais.

**Tabela 1:** Média ( $\pm$ EPM) da atividade nos braços fechados, em T1 e T2, dos grupos tratados com SAL, ZOL e CPA após a exposição ao LCE em T1. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças entre os grupos ou entre T1 e T2 para EBF (entradas nos braços fechados) e para %EBF (percentual de entradas nos braços fechados).

Variável	SAL		ZOL		CPA	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
EBF	12,71 $\pm$ 0,97	10,64 $\pm$ 1,62	12,00 $\pm$ 0,71	9,93 $\pm$ 1,25	10,00 $\pm$ 1,16	9,00 $\pm$ 1,25
%EBF	68,86 $\pm$ 2,80	78,78 $\pm$ 3,29	67,86 $\pm$ 3,50	78,10 $\pm$ 4,18	59,75 $\pm$ 3,05	75,81 $\pm$ 4,35

### 3.3. Discussão do Experimento 1

No experimento 1, os grupos tratados com CPA e ZOL apresentaram um comportamento semelhante ao apresentado pelos animais do grupo controle, uma vez que, ambos diminuíram a atividade nos braços abertos entre T1 e T2. Essa redução na atividade nos braços abertos é atribuída, entre outras hipóteses, ao fato de que os espaços abertos provoquem comportamentos relacionados ao medo nesses animais (Pellow et al. 1985).

Estudos utilizando protocolos de exposição e re-exposição do animal ao LCE já verificavam que a redução da atividade nos braços abertos verificada ao longo da primeira exposição se mantinha em uma segunda exposição (File et al., 1990; Espejo, 1997; Bertoglio e Carobrez, 2000). Assim, alguns pesquisadores passaram a relacionar essa diminuição da atividade nos braços abertos (entradas e tempo de permanência nos braços abertos) durante a re-exposição como índice de aprendizagem e memória (Bertoglio et al., 2006; Rodgers et al., 1997).

Dessa forma, podemos sugerir que nas condições experimentais apresentadas no experimento 1, os animais tratados tanto com a CPA quanto com a ZOL, nas doses de 16 mg/kg e 20 mg/kg respectivamente, foram capazes de consolidar a informação adquirida na primeira exposição ao LCE. Assim, a administração dessas drogas não alterou de forma significativa os processos de consolidação da memória dos animais referentes ao presente modelo.

Muitos estudos têm verificado os efeitos da histamina e de seus antagonistas na aprendizagem e memória em vertebrados, com resultados contraditórios. Dentre esses estudos verificamos que a administração intracerebroventricular de histamina facilitou a retenção do condicionamento ao teste de esQUIVA inibitória (De Almeida e Izquierdo, 1986) e que aplicação de histamina no hipocampo ventral de ratos prejudicou o condicionamento de

esquiva ativa (Alvarez e Banzan, 2008). Da mesma forma, agonistas histaminérgicos foram capazes de melhorar a recuperação da memória espacial no labirinto aquático (Smith et al. 1994), assim como a administração de CPA, uma antagonista H<sub>1</sub>, foi capaz de facilitar a retenção de memória de esquiva inibitória (Zarrindast et al., 2002). Estudos anteriores em nosso laboratório, também já verificaram um papel facilitador da CPA em experimentos de esquiva inibitória em *Carassius auratus* tanto sobre a aquisição (Cofiel e Mattioli, 2006) quanto sobre a retenção da memória (Medalha et al., 2000).

De forma semelhante, experimentos realizados sobre o receptor H<sub>2</sub> também têm revelado sua atuação em processos de aprendizagem e memória. A administração de zolantidina, antagonista H<sub>2</sub>, apresentou efeito inibitório sobre a aquisição do condicionamento de esquiva inibitória em *Carassius auratus* (Cofiel e Mattioli, 2006). Por outro lado, estudos realizados com a utilização de agonistas histaminérgicos verificaram ação facilitatória via H<sub>2</sub> sobre a retenção de esquiva passiva (Onodera et al., 1998) e sobre a consolidação da esquiva inibitória em ratos (Da Silva et al., 2006).

De acordo com Brandão e colaboradores (2003), os processos preparatórios de orientação ao perigo, medo e esquiva parecem estar ligados à ansiedade. Dessa forma, a facilitação da memória verificada nos estudos de Medalha e colaboradores (2000) e Cofiel e Mattioli (2006), poderia estar ligada a um efeito ansiogênico provocado pela CPA em conjunto com o componente punitivo característico do modelo de esquiva inibitória. Todavia, esses estudos não esclareceram completamente essa relação entre ansiedade e memória ligadas ao sistema histaminérgico. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido de forma a analisar o efeito da CPA sobre um modelo de memória emocional sem a utilização de um estímulo aversivo externo.

No entanto, os dados do experimento 1 não sugerem que os antagonistas H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> provoquem alterações na capacidade dos animais experimentais quanto à consolidação da

memória relacionada ao LCE. Tal característica talvez seja devida às diferenças do modelo experimental, uma vez que o LCE se baseia numa aversão incondicionada que roedores apresentam a espaços abertos, e assim, difere de modelos com esQUIVA inibitória que dependem de um componente punitivo para eliciar alterações comportamentais nos animais expostos ao modelo (Rodgers e Cole, 1994).

Certamente, novos estudos envolvendo as demais fases da memória, além de experimentos envolvendo injeções centrais de drogas histminérgicas em sítios específicos, poderiam elucidar o envolvimento do sistema histaminérgico sobre a aprendizagem emocional relacionada ao LCE.



#### **4. EXPERIMENTO 2:** Efeito da clorfeniramina e da zolantidina sobre a ansiedade e sobre a aquisição e recuperação da memória emocional.

##### **4.1. Materiais e métodos**

###### ***4.1.1. Sujeitos***

Foram utilizados 123 camundongos machos adultos, experimentalmente ingênuos, da cepa Suíço-albino (Universidade Federal de São Carlos- SP- Brasil), pesando 30-35g a época dos experimentos. As mesmas condições ambientais assim como os mesmos procedimentos éticos descritos no Experimento 1 foram mantidos.

###### ***4.1.2. Drogas***

Zolantidina (ZOL) (Sigma, USA) e clorfeniramina (CPA) (Sigma, USA) foram dissolvidas em solução estéril de salina a 0,9%. As injeções foram administradas intraperitonealmente (i.p.) a um volume de 2 ml/kg de peso corporal.

Da mesma forma que no Experimento 1, tanto as drogas como a salina foram colocadas em tubos Eppendorf codificados e mantidos sob refrigeração. Essa codificação era desconhecida do pesquisador durante a realização dos testes e da análise comportamental.

###### ***4.1.3. Aparato experimental e procedimento geral***

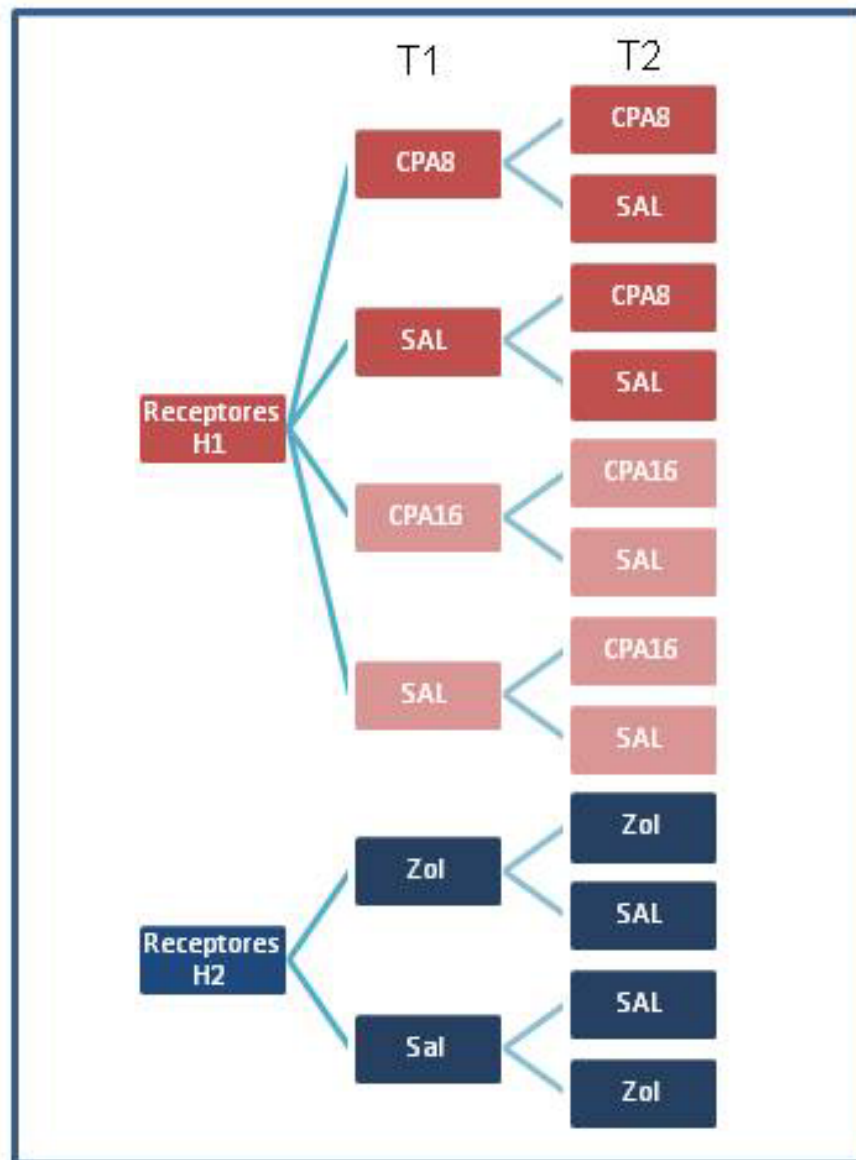
O aparato utilizado no Experimento 2 foi o Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O LCE e os procedimentos gerais para a utilização do mesmo estão descritos no Experimento 1.

###### ***4.1.4. Planejamento experimental***

Os amostra inicial de camundongos foi dividida em seis grupos de acordo com

a injeção *i.p.* administrada: um grupo que recebeu zolantidina na dose de 20 mg/kg, e seu respectivo grupo controle que recebeu salina; um grupo que recebeu clorfeniramina na dose de 8 mg/kg e seu respectivo grupo controle que recebeu salina; e um grupo que recebeu clorfeniramina na dose de 16 mg/kg, também com seu respectivo grupo controle que recebeu salina. Os procedimentos com cada uma das doses de CPA assim como os procedimentos com a zolantidina foram conduzidos de forma independente, o que tornou necessário a utilização de três grupos controle.

No início dos experimentos, cada animal recebia a injeção referente ao grupo a que pertencia e 40 minutos após a injeção, os camundongos eram expostos pela primeira vez ao LCE (T1). Após 24 horas (T2), cada um dos grupos foi subdividido em dois novos grupos que recebiam novamente a injeção de uma das drogas ou de salina antes da re-exposição ao labirinto. A Figura 5 apresenta um esquema com a formação dos grupos experimentais formados em T1 e T2.



**Figura 5:** Formação dos grupos experimentais durante a realização do experimento 2. Inicialmente, foram formados seis grupos em T1 e cada um desses grupos deu origem a dois novos grupos em T2.

Os grupos experimentais formados após a divisão em T2 estão representados na Tabela 2, cada qual com seu respectivo número de indivíduos.

**Tabela 2:** Grupos experimentais, com os respectivos números de sujeitos, formados a partir da divisão em T2 dos animais que receberam de zolantidina (ZOL), na dose de 20mg/kg, ou clorfeniramina (CPA) nas doses de 8mg/kg ou 16mg/kg antes da exposição e da re-exposição ao LCE.

<b>Drogas</b>	<b>Grupos</b>			
ZOL 20mg/kg	SAL-SAL (n=11)	SAL-ZOL (n=9)	ZOL-SAL (n=10)	ZOL-ZOL (n=11)
CPA 8mg/kg	SAL-SAL (n=13)	SAL-CPA (n=10)	CPA-SAL (n=8)	CPA-CPA (n=9)
CPA 16mg/kg	SAL-SAL (n=12)	SAL-CPA (n=10)	CPA-SAL (n=10)	CPA-CPA (n=10)

#### **4.1.5. Análise dos comportamentos**

A análise dos comportamentos e as variáveis consideradas nesse estudo são as mesmas do Experimento 1.

#### **4.1.6. Análise Estatística**

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade de variância.

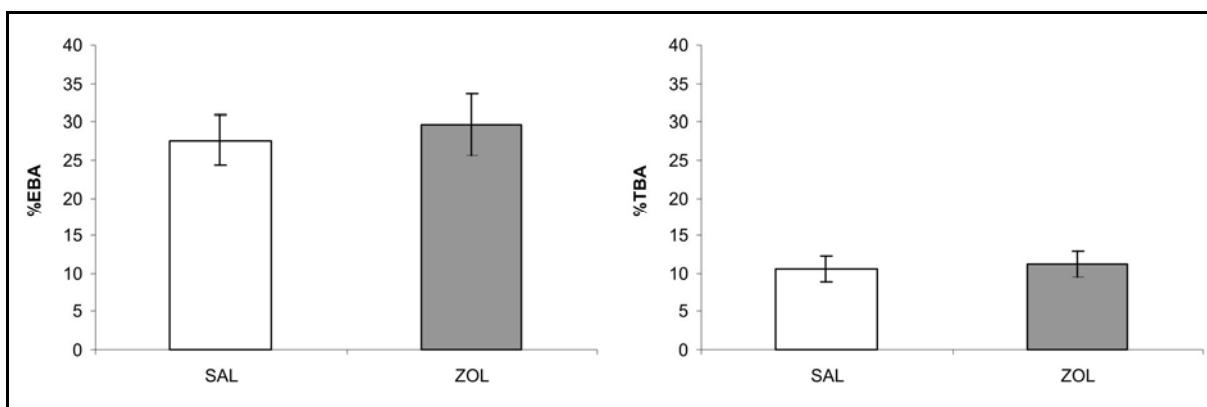
Os dados de T1 foram comparados por meio do teste *T-Student*. Os dados dos grupos formados a partir da divisão em T2 foram comparados por meio da ANOVA para medidas repetidas. Valores significativos de *F* foram seguidos do teste LSD de Fischer (teste T protegido). O nível de significância estatística adotado foi  $p < 0,05$ . Todos os testes foram realizados por meio do programa GB-Stat.

## 4.2. Resultados do Experimento 2

Todos os resultados apresentados nesse capítulo estão expressos por meio da média e Erro Padrão da Média (EPM).

### 4.2.1. Análise dos resultados da exposição

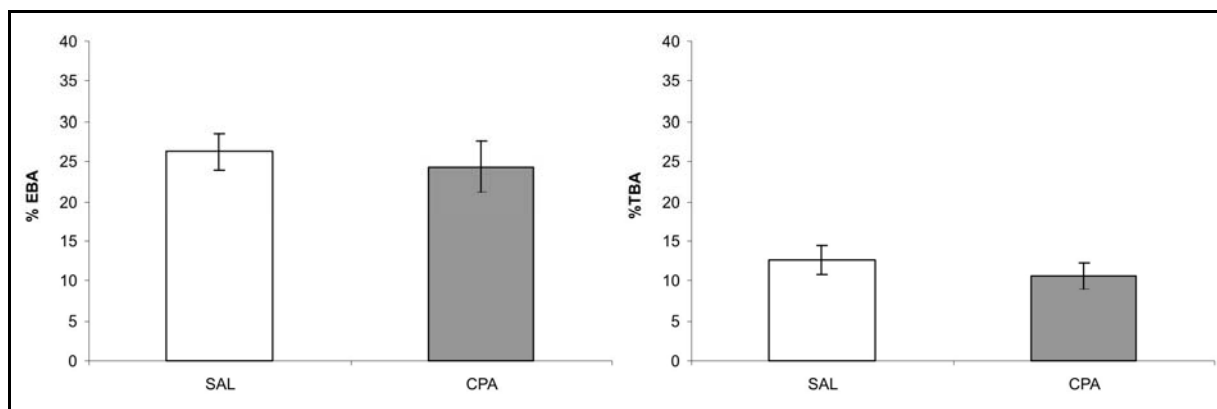
A Figura 6 apresenta os resultados de %EBA e de %TBA obtidos durante a exposição dos grupos tratados com SAL ou ZOL antes da exposição ao LCE. O teste *T-student* não revelou diferenças entre os grupos para %EBA ( $p=0,4676$ ) e %TBA ( $p=0,7965$ ).



**Figura 6:** Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) em T1 para os grupos tratados com 20 mg/kg de ZOL ou SAL antes da exposição ao LCE. O teste *T-student* não evidenciou diferenças entre os grupos para nenhuma das variáveis.

Da mesma forma, não foi verificada diferença com relação a atividade locomotora, uma vez que o teste *T-student* não demonstrou diferença ( $p=0,7307$ ) entre os grupos SAL ( $9,35 \pm 0,66$ ) e ZOL ( $9,67 \pm 0,59$ ) na variável EBF.

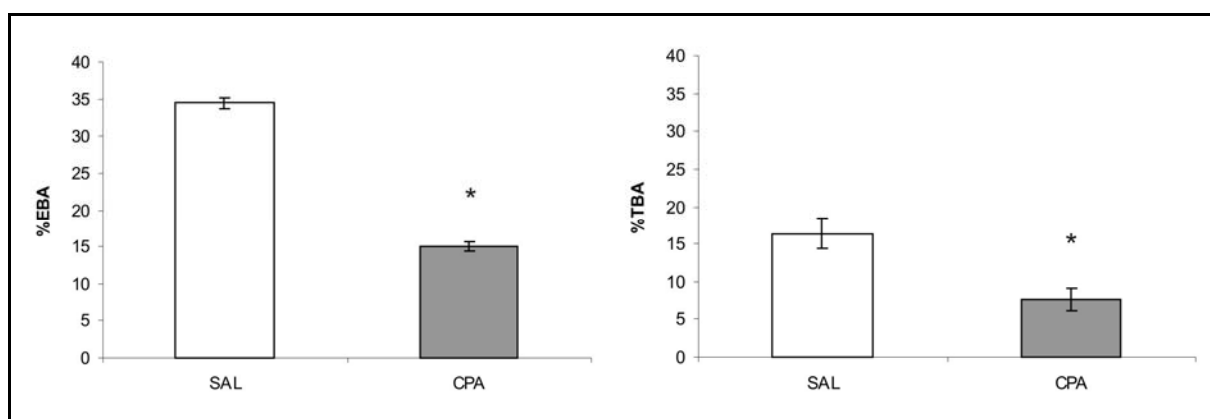
A Figura 7 apresenta os resultados obtidos a partir da exposição dos grupos tratados com SAL ou CPA na dose de 8,0 mg/kg antes da exposição ao LCE. O teste *T-student* não revelou diferenças para %EBA ( $p=0,633$ ) e %TBA ( $p=0,4442$ ).



**Figura 7:** Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) em T1 para os grupos tratados com 8,0 mg/kg de CPA ou SAL antes da exposição ao LCE. O teste *T-student* não evidenciou diferenças entre os grupos para nenhuma das variáveis.

Com relação à EBF, os grupos SAL ( $146,46 \pm 5,84$ ) e CPA ( $145,16 \pm 10,56$ ) não apresentaram diferenças no teste *T-student* ( $p=0,2079$ ). Dessa forma, não há diferença na atividade locomotora desses animais.

Podemos observar na Figura 8 os resultados da exposição, para os grupos tratados com SAL ou CPA na dose de 16 mg/kg antes da exposição ao LCE. O teste *T-student* revelou diferenças entre os grupos em ambas as variáveis: %EBA ( $p<0,0001$ ) e %TBA ( $p=0,0014$ ). Dessa forma, podemos verificar que os animais que receberam CPA nessa dose apresentaram menores valores de %EBA ( $p<0,0001$ ) e %TBA ( $p=0,0014$ ).

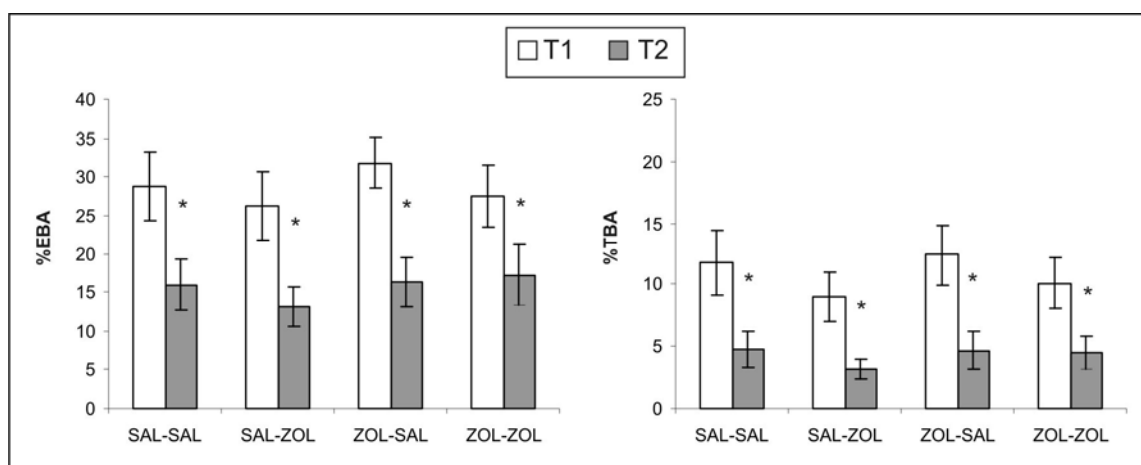


**Figura 8:** Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) em T1 para os grupos tratados com CPA, na dose de 16mg/kg, ou SAL antes da exposição ao LCE. O grupo CPA evidenciou menores valores em ambas as variáveis. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas entre os grupos verificadas por meio do teste *T-student* ( $p<0,05$ ).

Com relação a EBF, o teste *T-student* não verificou diferenças ( $p=0,2079$ ) entre os grupos SAL ( $13,14 \pm 0,87$ ) e CPA ( $16,1 \pm 1,08$ ). Portanto, não há diferença entre a atividade locomotora dos dois grupos experimentais.

#### 4.2.2. Análise dos resultados da exposição e re-exposição

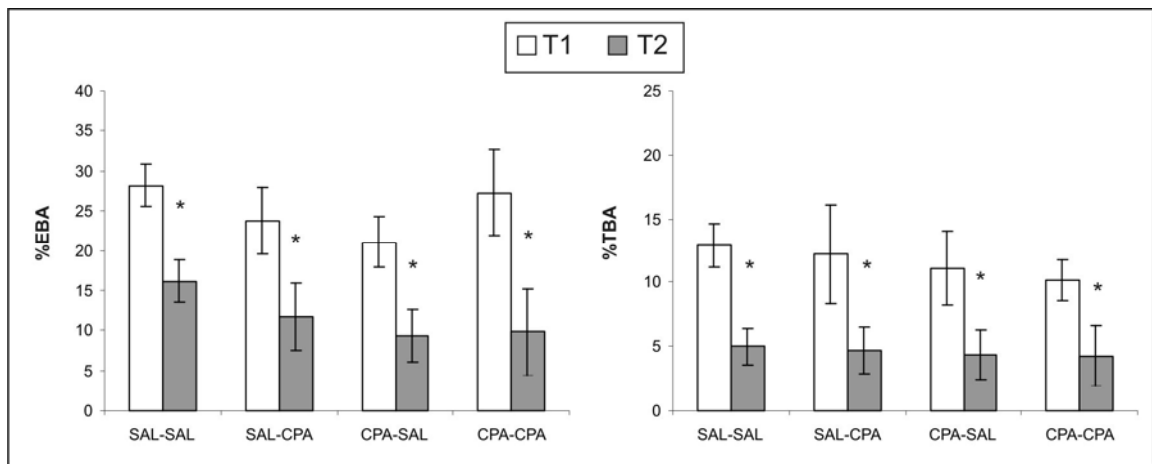
A Figura 9 apresenta os resultados de %EBA e %TBA, em T1 e T2, para os grupos formados a partir da divisão em T2 e que receberam salina ou zolantidina. Na comparação dos resultados entre T1 e T2 a ANOVA para medidas repetidas explicitou diferenças para todos os grupos experimentais em ambas as variáveis: %EBA ( $F=26,38826$ ;  $p<0,0001$ ) e %TBA ( $F=27,34985$ ;  $p=0,000126$ ). O teste LSD de Fisher mostra que ambas as variáveis apresentam uma redução em T2 para animais dos grupos SAL-SAL, SAL-ZOL, ZOL-SAL e ZOL-ZOL demonstrando uma redução da atividade nos braços abertos em relação a T1.



**Figura 9:** Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) dos grupos formados a partir da divisão em T2, tratados com 20 mg/kg de ZOL ou SAL. A ANOVA para medidas repetidas revelou diferenças entre T1 e T2. Os asteriscos indicam diferenças ( $p<0,05$ ) verificadas entre T1 e T2 por meio do teste LSD de Fisher para todos os grupos experimentais.

Na comparação entre T1 e T2 para os grupos que receberam salina ou CPA na dose de 8 mg/kg, formados a partir da divisão em T2 (Figura 10), podemos verificar, por meio

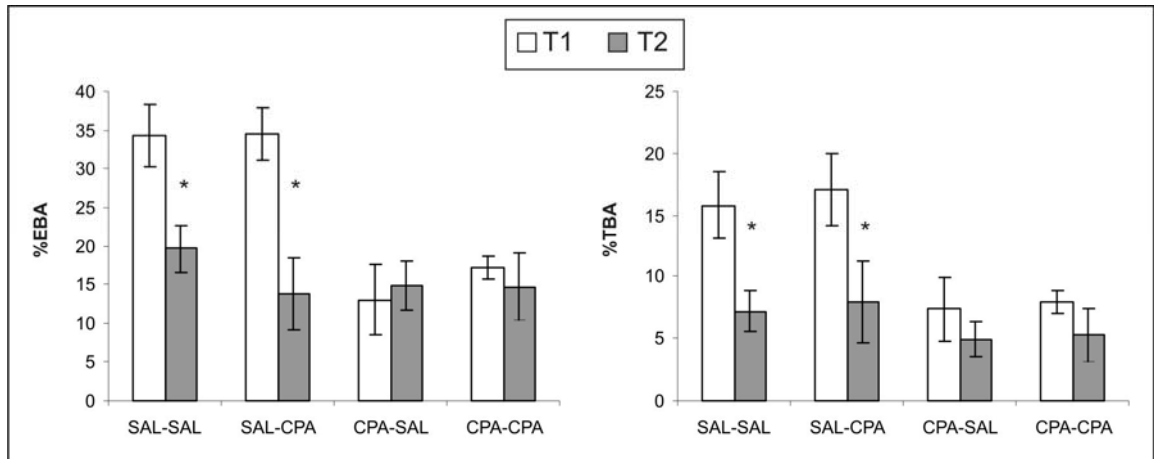
da ANOVA para medidas repetidas, diferenças nas variáveis %EBA ( $F=46,39683$ ;  $p<0,0001$ ) e %TBA ( $F=28,12491$ ;  $p<0,0001$ ). O teste LSD de Fisher evidenciou redução entre T1 e T2 em ambas as variáveis para os grupos SAL-SAL, SAL-CPA, CPA-CPA e CPA-SAL.



**Figura 10:** Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) dos grupos formados a partir da divisão em T2, tratados com 8,0 mg/kg de CPA ou SAL. A ANOVA para medidas repetidas revelou diferenças entre T1 e T2. Os asteriscos indicam diferenças ( $p<0,05$ ) entre T1 e T2 verificadas por meio do teste LSD de Fisher para todos os grupos experimentais.

A Figura 11 apresenta a comparação entre T1 e T2 por meio da ANOVA para medidas repetidas, dos grupos formados a partir da divisão em T2 e que receberam injeções de salina ou CPA na dose de 16 mg/kg. Podemos verificar diferenças em %EBA ( $F=21,91818$ ;  $p<0,0001$ ) e %TBA ( $F=32,5356$ ;  $p<0,0001$ ). O teste LSD de Fischer evidenciou redução tanto em %EBA quanto em %TBA para os grupos SAL-SAL e SAL-CPA, mas não para os grupos CPA-SAL e CPA-CPA. Ou seja, houve redução da atividade nos braços abertos para os grupos que, em T1, receberam SAL, mas não para os grupos que receberam CPA.





**Figura 11:** Média ( $\pm$ EPM) de %EBA (percentual de entradas nos braços abertos) e %TBA (percentual de tempo nos braços abertos) para os grupos formados a partir da divisão em T2 e tratados com CPA, na dose de 16 mg/kg, ou SAL. A ANOVA para medidas repetidas revelou diferenças entre T1 e T2. Os asteriscos indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) verificadas por meio do teste LSD de Fisher, entre T1 e T2 para os grupos SAL-SAL e SAL-CPA, mas não para os grupos CPA-SAL e CPA-CPA.

### 4.3. Discussão do Experimento 2

No experimento 2, pudemos verificar que os animais tratados com a ZOL, na dose de 20 mg/kg, e a CPA, na dose de 8 mg/kg, não apresentaram alteração da atividade nos braços abertos na primeira exposição ao LCE quando comparados ao grupo controle, e assim, sugere-se, que nessas doses, essas drogas não tenham efeito sobre a ansiedade em camundongos.

Por outro lado, verificamos que o grupo tratado com CPA com a dose de 16 mg/kg apresentou uma atividade reduzida nos braços abertos já na primeira exposição ao LCE. Inicialmente, poderíamos associar essa redução da atividade nos braços abertos ao efeito sedativo verificado em trabalhos anteriores sobre antagonistas dos receptores  $H_1$  (Izumi et al, 2008; Adelsberg, 1997; Goldberg, 1987). Tal efeito sedativo reduziria a atividade locomotora dos animais, e assim, faria com que entrassem menos nos braços abertos, mas também nos braços fechados. Porém, podemos verificar que a atividade desses animais nos braços fechados não foi diferente dos animais do grupo controle, e assim, podemos considerar que a atividade locomotora não foi afetada. Assim, a menor atividade nos braços abertos verificada pode ser atribuída à existência de um efeito ansiogênico da CPA, na dose de 16mg/kg, em camundongos.

Kumar e colaboradores (2007) verificaram a existência de um efeito ansiogênico em camundongos que receberam injeções *i.p.* de  $L$ -histidina. Tal efeito foi antagonizado pela pirilamina (antagonista  $H_1$ ), mas não foi antagonizado pela aplicação de zolantidina (antagonista  $H_2$ ) ou de tioperamida (antagonista  $H_3$ ). Em nosso estudo, a zolantidina também não afetou a ansiedade desses animais, corroborando o estudo de Kumar (2007), porém, nossos resultados indicaram a existência de um efeito ansiogênico para a CPA (antagonista  $H_1$ ).

Estudos realizados com injeções de histamina em regiões encefálicas tais como hipocampo ventral (Rostami et al., 2006) e septo lateral (Zarrindast et al., 2008) indicaram um efeito ansiogênico induzido pelo aumento dos níveis centrais de histamina. De forma semelhante, Frisch e colaboradores (1998) verificaram que a lesão da região E2 do núcleo túberomamilar de ratos pode induzir efeito ansiolítico no LCE, devido à morte de neurônios histaminérgicos, o que acarretaria menor atividade desse sistema. Adicionalmente, um estudo de Privou e colaboradores (1998) verificou que a administração de CPA e de ranitidina na região do núcleo basal magnocelular apresentou efeito ansiolítico em ratos também expostos ao LCE.

Por outro lado, Zarrindast e colaboradores (2006) verificaram que administração de histamina na região CA1 do hipocampo provocou efeito ansiolítico em ratos submetidos ao LCE e que tal efeito foi antagonizado pela administração de pirilamina e ranitidina na mesma região. Assim, esse estudo sugeriu a existência de um efeito ansiogênico de antagonistas H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> nessa região. Relacionando os dados de Zarrindast (2006) com os nossos resultados podemos sugerir que a CPA teria uma atividade potencializada em CA1, no modelo do presente estudo, ou seja, uma injeção sistêmica realizada anteriormente à exposição ao LCE. Porém, para que tal hipótese seja comprovada, estudos devem ser conduzidos no sentido de verificar se o efeito ansiogênico da administração de antagonistas H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> em CA1, verificado em ratos, também seja verificado em camundongos.

Além de estudos sobre ansiedade, outra característica importante da utilização do LCE em estudos comportamentais é o fato de que uma experiência anterior do animal ao seu ambiente, reduz de forma significativa a atividade nos braços abertos em uma re-exposição (Rodgers, 1996). Assim, o aumento na esquiava dos braços abertos com a repetição das exposições foi verificado em vários estudos (Dal-Cól et al., 2003; File et al., 1990;

Espejo, 1997; Bertoglio e Carobrez, 2000; Bertoglio et al., 2006; Canto de Souza, 2002) e tal comportamento é associado como índice de aprendizagem emocional (Dal-Cól et al., 2003).

No experimento 2, a comparação dos resultados da exposição e re-exposição dos grupos formados a partir da divisão em T2, mostra que os animais tratados com ZOL ou CPA (8 mg/kg) também não se diferenciaram daqueles tratados somente com SAL. Assim, todos os grupos apresentaram uma redução na atividade nos braços abertos na re-exposição ao LCE. Tal resultado corrobora estudos anteriores que já descreveram essa forma de aprendizagem (Bertoglio et al., 2006; Dal-Cól et al., 2003; Bertoglio e Carobrez, 2000; Espejo, 1997, Rodgers, 1996; File et al., 1990).

Dessa forma, podemos sugerir que nas condições experimentais apresentadas no presente estudo, a ZOL e a CPA (8 mg/kg) não produziram efeitos significativos sobre os processos de aprendizagem e memória emocional desses animais e assim, estes foram capazes de adquirir, consolidar e recuperar a informação aversiva relacionada ao modelo do LCE.

Com relação à dose de 16 mg/kg de CPA, a comparação dos resultados da exposição e re-exposição mostra uma redução na atividade nos braços abertos para os animais que receberam SAL antes da exposição, enquanto que os animais que receberam CPA (16 mg/kg) não alteraram a atividade nos braços abertos entre a exposição e a re-exposição ao LCE. Inicialmente, esse resultado pode ser explicado pelos baixos valores de %EBA e de %TBA verificados para os grupos que receberam CPA (16 mg/kg) antes da primeira exposição ao LCE, e assim, a permanência desses animais nos braços abertos talvez tenha sido insuficiente para iniciar os processos de memória relacionados ao modelo.

Porém, de acordo com Roy e colaboradores (2009) o aumento da esquiva dos braços abertos seria uma tendência incondicionada e não dependente de aprendizagem. Assim, o aumento da esquiva dos braços abertos estaria diretamente ligado a questões ambientais como a ausência de tigmotaxia ou o contraste de luminosidade entre os braços

abertos e fechados. Trabalhos como o de Bertoglio e Carobrez (2002), com uma análise minuto-a-minuto do comportamento de ratos durante a exploração do LCE, evidenciam a existência de um decréscimo da atividade nos braços abertos em relação ao tempo, durante uma primeira exposição do animal ao labirinto, que poderia ser explicada simplesmente como sendo uma resposta incondicionada ao modelo experimental. No entanto, os níveis reduzidos de atividade nos braços abertos verificados logo no início de uma segunda exposição ao labirinto, 24 horas depois da primeira, só poderia ocorrer por meio da evocação da memória das referidas características ambientais, condição que caracteriza aprendizagem. Dessa forma, reforçamos a idéia de que, no presente estudo, os animais que apresentaram uma redução da atividade nos braços abertos, entre T1 e T2, tenham demonstrado esse comportamento devido à formação de um tipo de memória ligada à alteração da novidade ambiental, comprovando a relação entre os processos de aprendizagem e memória e o LCE, já largamente discutida em estudos anteriores (Dal-Cól et al., 2003; Cruz-Morales et al., 2002; File et al., 1993; File, 1990).

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

Concluimos com base nos resultados verificados nas condições experimentais explicitadas no Experimento 1, que a clorfeniramina e a zolantidina não afetaram a consolidação da memória emocional em camundongos.

Concluimos também, com base no Experimento 2, que a zolantidina na dose de 20mg/kg não apresenta efeito sobre a ansiedade ou sobre a memória dos grupos estudados, enquanto que a clorfeniramina apresenta um efeito ansiogênico sobre camundongos somente na dose de 16mg/kg e tal efeito não permitiu que processos de aprendizagem e memória ligados ao LCE fossem devidamente desenvolvidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELSBERG, B. R. Sedation and performance issues in the treatment of allergic conditions. **Archives of Internal Medicine**, v.157, 494-500, 1997.
- ALVAREZ, E. O. The role of histamine on cognition. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 2, p.183-9, maio, 2009.
- ALVAREZ, E. O.; BANZAN, A. M. The activation of histamine-sensitive sites of the ventral hippocampus modulates the consolidation of a learned active avoidance response in rats. **Behavioural Brain Research**, v.189, p. 92-99, 2008.
- ARRANG, J.-M., GARBARG, M., SCHWARTZ, J.-C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. **Nature**, v. 302, p. 832-837, 1983.
- BARNES, P. J. Histamine receptors in the lung. In: **New Perspectives in Histamine Research**, pp. 103-122, Timmerman, H.; Van der Goot, H. (eds.) Birkhuser Verlag, Basel,1991.
- BERTOGLIO, L. J., CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 108, p. 197-203, 2000.
- BERTOGLIO, L. J., CAROBREZ, A. P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 72, p. 449-455, 2002.
- BERTOGLIO, L. J., JOCA, S. L. R., GUIMARÃES, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 175, p. 183-188, 2006.
- BLANDINA, P.; EFOUDEBE, M.; CENNI, G.; MANNAIONI, P.; PASSANI, M. B. Acetylcholine, Histamine, and Cognition: Two Sides of the Same Coin. **Learning & Memory**, v. 11, p. 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. **Br. J. Pharmacol**, v. 119, p. 1656–1664, 1996.
- BRANDÃO, M. L. **As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à Neurociência**, São Paulo: ed. EPU, 2003.
- BRANDÃO, M. L.; TRONCOSO, A. C.; SILVA, M. A. S.; HUSTON, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 225-233, 2003.
- BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HAAS, H.L. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**, v. 63, p.637-72, 2001.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, R. J. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. **Brain Research**, v. 928, n. (1-2):p. 50-9, 2002.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CISLER, J. M.; OLATUNJI, B. O.; LOHR, J. M. Disgust, fear, and the anxiety disorders: A critical review. **Clinical Psychology Review**, v. 29, p. 34-46, 2009.

COELHO, J. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Analysis of the effects of CPA and L-histidine on goldfish test on conditioned place preference model. **Behavioural Brain Research**, v. 124, p. 161-165, 2001.

COFIEL, L. P. V.; MATTIOLI, R. Involvement of histamine receptors in the acquisition of inhibitory avoidance in *Carassius auratus*. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 30, p. 1246-1250, 2006.

CORUZZI, G.; ADAMI, M.; GUAITA, E.; DE ESCH, I. J.; LEURS, R. Antiinflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 563, p. 240-244, 2007.

CRUZ-MORALES, S. E.; SANTOS, N. R.; BRANDÃO, M. L. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behavior in the elevated plus-maze retest in the rat. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 72, p. 973-978, 2002.

CURRAN, H. V.; MINTZER, M. Z. Psychopharmacology of memory. **Psychopharmacology**, v. 188, p. 393-396, 2006.

DA SILVA, W. C.; BONINI, J. S.; BELIVAQUA, L. R. M.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology Learn and Memory**, v. 86, p. 100-106, 2006.

DAL-CÓL, M. L. C.; PEREIRA, L. O.; ROSA, V. P.; CALIXTO, A. V.; CAROBREZ, A. P.; FARIA, M. S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 74, p. 395-400, 2003.

DAWSON, G. R.; CRAWFORD, S. P.; STANHOPE, K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M. D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **Psychopharmacology**, v. 113, v. 570-572, 1994.

DE ALMEIDA, M. A. M. R.; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. **Archives International Pharmacodynamics**, v. 283, p. 193-198, 1986.

DUNFORD, P. J.; WILLIAMS, K. N.; DESAI, P. J.; KARLSSON, L.; MCQUEEN, D.;



- THURMOND, R. L. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 176-183, 2007.
- EKSTRÖM, P.; HOLMQVIST, B. I.; PANULA, P. Histamine-immunoreactive neurons in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. Correlation with hypothalamic tyrosine hydroxylase- and serotonin-immunoreactive neurons. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.8, p. 75-85, 1995.
- ESPEJO, E.F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. **Behavioural Brain Research**, v.87, p. 233-8, 1997.
- FAGANELLO, F. R.; MATTIOLI, R. Anxiolytic-like effect of Chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, p. 269-274, 2007.
- FAGANELLO, F. R.; MATTIOLI, R. Chlorpheniramine facilitates inhibitory avoidance in teleosts submitted to telencephalic ablation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 398-402, 2008.
- FILE, S. E.; MABBUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterization of phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 102, p. 98-101, 1990.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H.; VIANA, M.; GRAEFF, F.G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different of fear? **Psychopharmacology**, v. 111, p. 491-494, 1993.
- FRISCH, C.; HASENÖHRL, R. U.; KRAUTH, J.; HUSTON, J. P. Anxiolytic-like behavior after lesion of the tuberomammillary nucleus E2-region. **Experimental Brain Research**, v. 119, p. 260-264, 1998.
- GANTNER, F.; SAKAI, K.; TUSCHE, M. W.; CRUIKSHANK, W. W.; CENTER, D. M.; BACON, K. B. Histamine H4 and H2 receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8<sub>+</sub> T cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, p. 300-307, 2002.
- GARBARG, M.; BARBIN, G.; BISCHOFF, S.; POLLARD, H.; SCHWARTZ, J. C. Dual localization of histamine in an ascending neuronal pathway and in non-neuronal cells evidenced by lesions in the lateral hypothalamic area. **Brain Research**, v. 106, p. 333-348, 1976.
- GARCIA, A. M. B.; CARDENAS, F. R.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, v. 85, p. 265-270, 2005.
- GOLDBERG, M. J.; SPECTOR, R.; CHIANG, C. K. Transport of diphenhydramine in the central nervous system. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 240, p. 717-22, 1987.
- GRIEBEL, G.; MOREAU, J. L.; JENCK, F.; MARTIN, J. R.; MASLIN, R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. **Behavioural Processes**,

v. 29, p. 37-48, 1993.

HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, p.121-30, 2003.

HAAS, H. L.; KONNERTH, A. Histamine and noradrenaline decrease calciumactivated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. **Nature**, v. 302, p. 432-4, 1983.

HIRANO, S.; MIYATA, S.; ONODERA, K; KAMEI, J. Effects of histamine H1 receptor antagonist on depressive-like behavior in diabetic mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 214-220, 2006.

HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 971-980, 1999.

HOUGH, L.B. Cellular localization and possible functions for brain histamine: recent progress. **Progress in Neurobiology**, v. 30, p. 469-505, 1988.

HUSTON, J. P.; WAGNER, U.; HASENÖHRL, R. U. The tuberomammillary nucleus projections in the control of learning, memory and reinforcement processes; evidence for an inhibitory role. **Behavioural Brain Research**, v. 83, p. 97-105, 1997.

IZUMI, N.; MIZUGUCHI, H.; UMEHARA, H.; OGINO, S.; FUKUI, H. Evaluation of Efficacy and Sedative Profiles of H1 Antihistamines by Large-Scale Surveillance Using the Visual Analogue Scale (VAS). **Allergology International**, v. 57, p. 257-63, 2008.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 9<sup>a</sup> ed. Barueri – SP: Manole, 2003.

KOLB, B.; WISHAW, I. Q. **Neurociência do comportamento**, São Paulo, Editora Manole, p. 1-35, 2002.

KRUGER, L.; SAPORTA, S.; SWANSON, L.W. **Photographic Atlas of the rat brain cell and fibre architecture illustrated in three planes with stereotaxic coordinates**. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

KUMAR, K. V.; KRISHNA, D. R.; PALIT, G. Histaminergic H1 receptors mediate L-histidine-induced anxiety in elevated plus-maze test in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 18, p. 213-217, 2007.

LEURS, R.; SMIT, M.; TIMMERMAN, H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 66, p. 413-463, 1995.

LEDOUX, J. E. Emotional circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155-184, 2000.

LIM, H. D.; VAN RIJN, R. M.; LING, P.; BAKKER, R. A.; THURMOND, R. L.; LEURS, R. Evaluation of Histamine H1-, H2-, and H3-Receptor Ligands at the Human Histamine H4 Receptor: Identification of 4- Methylhistamine as the First Potent and Selective H4 Receptor Agonist. **The Journal of Pharmacology and Experimental**

**Therapeutics**, vol. 314, n. 3, 2005.

LIN, J. S.; FORT, P.; KITAHAMA, K.; PANULA, P.; DENNEY, R. M.; JOUVET, M. Immunohistochemical evidence for the presence of type B monoamine oxidase in histamine-containing neurons in the posterior hypothalamus of cats. **Neuroscience Letters**, v. 128, p. 61-65, 1991.

LING, P.; NGO, K.; NGUYEN, S.; THURMOND, R. L.; EDWARDS, J. P.; KARLSSON, L.; FUNG-LEUNG, W. P. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 161-171, 2004.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n.2, p.180-5, 1987.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 46, p. 321-340, 1990.

LIU, C.; MA, X.; JIANG, X.; WILSON, S. J.; HOFSTRA, C. L.; BLEVITT, J.; PYATI, J.; LI, X.; CHAI, W.; CARRUTHERS, N.; LOVENBERG, T.W. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 420-426, 2001.

MACGAUGH, J. L. The amigdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p. 1-28, 2004.

MARTÍNEZ, J. C.; CARDENAS, F.; LAMPREA, M.; MORATO, S. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. **Behavioural Processes**, v. 60, p. 15-26, 2002.

MATTIOLI, R.; NELSON, C. A.; HUSTON, J. P.; SPIELER, R. E. Conditioned place-preference analysis in the goldfish with the H1 histamine antagonist chlorpheniramine. **Brain Research Bulletin**, v. 45, p. 41-4, 1998.

MEDALHA, C. C.; COELHO, J. L.; MATTIOLI, R. Analysis of the role of histamine in inhibitory avoidance in Goldfish. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 24, p. 295-305, 2000.

MEDALHA, C. C., MATTIOLI, R. Involvement of the histaminergic system on appetitive learning and its interaction with haloperidol in goldfish. **Neuroscience Letters**, v. 418, p. 195-200, 2007.

MEDALHA, C.C., SANTANGELO, E.M., MATTIOLI, R. Neurochemical analysis of brain monoamines after L-histidine and chlorpheniramine administration in goldfish. **Neuroscience Letters**, v. 349, p. 179-82, 2003.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience Biobehavior Review**, v. 23, p. 591-613, 1999.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice.

**Brain Research**, v. 1047, p. 97-104, 2005.

MORSE, K. L.; BEHAN, J.; LAZ, T. M.; WEST JR., R. E.; GREENFEDER, S. A.; ANTHES, J. C.; UMLAND, S.; WAN, Y.; HIPKIN, R. W.; GONSIOREK, W.; SHIN, N.; GUSTAFSON, E. L.; QIAO, X.; WANG, S.; HEDRICK, J. A.; GREENE, J.; BAYNE, M.; MONSMA JR., F.J. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, p. 1058-1066, 2001.

NUNES-DE-SOUZA, V.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, J. R.; CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT<sub>2</sub> receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 187, p. 72–79, 2008.

ONODERA, K.; MIYAZAKI, S.; IMAIZUMI, M. Cognitive involvement by negative modulation of histamine H<sub>2</sub> receptors in passive avoidance task in mice. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 20, p. 307-10, 1998.

ONODERA, K.; YAMATODANI, A.; WATANABE, T.; WADA, H. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 42, n. 6, Apr, p. 685-702, 1994.

PANULA, P.; YANG, H. Y.; COSTA, E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 2572-2576, 1984.

PASSANI, M. B.; BACCIOTTINI, L.; MANNAIONI, P. F.; BLANDINA, P. Central histaminergic system and cognitive processes. **Neuroscience Biobehavior Review**, v. 24, p. 107–114, 2000.

PASSANI, M. B.; GIANNONI, P.; BUCHERELLI, C.; BALDI, E.; BLANDINA, P. Histamine in the brain: beyond sleep and memory. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1113-1122, 2007.

PLACZEK, A. N.; ZHANG, T. A.; DANI, J. A. Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 6, p. 752–760, 2009.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PORTAVELA M., VARGAS, J. P. Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2800-2806, 2005.

PRAST, H.; ARGYRION, A.; PHILIPPU, A. Histaminergic neurons facilitate social memory in rats. **Brain Research**, v. 734, p. 316-318, 1996.

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

599-604, 1994.

PRIVOU, C.; KNOCHE, A.; HASENÖHRL, R. U.; HUSTON, J. P. The H1- and H2-histamine blockers chlorpheniramine and ranitidine applied to the nucleus basalis magnocellularis region modulate anxiety and reinforcement related processes. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 1019-1032, 1998.

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 anM2-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired rats. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 1455–1462, 1995.

RING, J.; SEDLMEIER, F.; VAN DER HELM, H.; MAYR, T.; WALZ, U.; IBEL, H.; RIEPEL, H.; PRZYBILLA, B.; REIMANN, H. J.; DORSCH, W. Histamine and allergic diseases. In: RING, J. (ed.), **New Trends in Allergy**, v. 2, pp. 44-77, Springer Verlag, Berlin. 1985.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: **Ethology and Psychopharmacology**. Cooper S. J.; Hendrie, C. A. (org.). Chichester: J. Wiley, 1994.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defense and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 52, p. 297-303, 1997.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. H. Plus-Maze Retest Profile in Mice: Importance of Initial Stages of Trial 1 and Response to Post-Trial Cholinergic Receptor Blockade. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 54, p. 41-50, 1996.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 52, p. 297-303, 1995.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Influence of prior experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark test of anxiety. **Psychopharmacology**, 113; 237-242, 1993.

ROSTAMI, P.; HAJIZADEH-MOGHADDAM, A.; ZARRINDAST, M. R. The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviours. **Physiology & Behavior**, v. 87, p. 891-896, 2006.

ROY, V.; CHAPILLON, P.; JELJELI, M.; CASTON, J.; BELZUNG, C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretation during test and retest. **Psychopharmacology**, v. 203, p. 131-141, 2009.

SCHLICKER, E.; BEHLING, A.; LUMMEN, G.; GOTHERT, M. Histamine H3A receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. **Naunyn-**

**Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 345, p. 489-493, 1992.

SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M.; GARBARG, M.; POLLARD, H.; RUAT, M. Histaminergic transmission in mammalian brain. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 1-51, 1991.

SERAFIM, K. R.; KISHI, M. S.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. L-histidine provokes state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. (Submitted).

SMITH, B. N.; AMSTRONG, W. E. The ionic dependence of the histamine-induced depolarization of vasopressin neurones in the supraoptic nucleus. **The Journal of physiology** (Lon), v. 495, p. 465-78, 1996.

SMITH, C. P. S.; HUNTER, A. J.; BENNETT, G. W. Effects of (R)- $\alpha$ -methylhistamine and scopolamine on spatial learning in the rat assessed using a water maze. **Psychopharmacology**, v. 114, p. 651-656, 1994.

SPIELER, R. E.; NELSON, C. A.; HUSTON, J. P.; MATTIOLI, R. Post-trial administration of H1 histamine receptor blocker improves appetitive reversal learning and memory in goldfish *Carassius auratus*. **Neuroscience Letters**, v. 277, p. 5-8, 1999.

STRAKHOVA, M. I.; NIKKEL, A. L.; MANELLI, A. M.; HSIEH, G. C.; ESBENSHADE, T. A.; BRIONI, J. D.; BITNER, R. S. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. **Brain Research**, v. 1250, p. 41-48, 2009.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 44, p. 464-469, 1993.

WATANABE, T.; TAGUCHI, Y.; SHIOSAKA, S.; TANAKA, J.; KUBOTA, H.; TERANO, Y.; TOHYAMA, M.; WADA, H. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. **Brain Research**, v. 295, n. 1, p. 13-25, mar, 1984.

WATANABE, T.; TAGUCHI, Y.; HAYASHI, H.; TANAKA, J.; SHIOSAKA, S.; TOHYAMA, M.; KUBOTA, H.; TERANO, Y.; WADA, H. Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis. **Neuroscience Letters**, v. 39, n. 3, p. 249-254, 1983.

YANAI, K.; TASHIRO, M. The physiological and pathophysiological role of neuronal histamine: An insight from human positron emission tomography studies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 1-15, 2007.

YUZURIHARA, M.; IKARASHI, Y.; ISHIGE, A.; SASAKI, H.; KURIBARA, H.; MARUYAMA, Y. Effects of drugs action as histamine releasers or histamine receptor blockers on an experimental anxiety model in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 67, p. 145-150, 2000.

ZARRINDAST MR, AHMADI R, ORYAN S, PARIVAR K, HAERI-ROHANI A. Effects of  $\alpha$ -adrenoceptor agonists and antagonists on histamine-induced impairment of

memory retention of passive avoidance learning in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 454, p. 193-8, 2002.

ZARRINDAST, M.R., TORABI, M., ROSTAMI, P., FAZLI-TABAEI, S. The effects of histaminergic agents in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 85, p. 500-506, 2006.

ZARRINDAST, M.R.; VALIZADEGAN, F.; ROSTAMI, P.; REZAYOF, A. Histaminergic system of the lateral septum in the modulation of anxiety-like behaviour in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, p. 108-114, 2008.

**ANEXO A**  
Dados Brutos do Experimento 1

GRUPO	EBA		EBF		T ENTR		%EBA		%EBF	
	EX	RE	EX	RE	EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL	10	2	11	13	21	15	47,62	13,33	52,38	86,67
SAL	9	4	15	12	24	16	37,50	25,00	62,50	75,00
SAL	4	1	13	16	17	17	23,53	5,88	76,47	94,12
SAL	9	3	13	7	22	10	40,91	30,00	59,09	70,00
SAL	4	7	14	16	18	23	22,22	30,43	77,78	69,57
SAL	2	2	8	6	10	8	20,00	25,00	80,00	75,00
SAL	5	8	21	27	26	35	19,23	22,86	80,77	77,14
SAL	8	4	15	8	23	12	34,78	33,33	65,22	66,67
SAL	10	0	13	6	23	6	43,48	0,00	56,52	100,00
SAL	4	0	11	4	15	4	26,67	0,00	73,33	100,00
SAL	7	5	7	7	14	12	50,00	41,67	50,00	58,33
SAL	5	3	15	11	20	14	25,00	21,43	75,00	78,57
SAL	5	3	14	10	19	13	26,32	23,08	73,68	76,92
SAL	3	2	8	6	11	8	27,27	25,00	72,73	75,00
ZOL	13	5	8	5	21	10	61,90	50,00	38,10	50,00
ZOL	7	2	11	5	18	7	38,89	28,57	61,11	71,43
ZOL	9	8	17	10	26	18	34,62	44,44	65,38	55,56
ZOL	5	0	10	3	15	3	33,33	0,00	66,67	100,00
ZOL	6	3	9	9	15	12	40,00	25,00	60,00	75,00
ZOL	5	2	14	11	19	13	26,32	15,38	73,68	84,62
ZOL	7	1	12	10	19	11	36,84	9,09	63,16	90,91
ZOL	1	3	11	7	12	10	8,33	30,00	91,67	70,00
ZOL	6	1	17	17	23	18	26,09	5,56	73,91	94,44
ZOL	4	1	13	5	17	6	23,53	16,67	76,47	83,33
ZOL	4	6	13	16	17	22	23,53	27,27	76,47	72,73
ZOL	2	1	11	15	13	16	15,38	6,25	84,62	93,75
ZOL	7	10	10	15	17	25	41,18	40,00	58,82	60,00
ZOL	8	1	12	11	20	12	40,00	8,33	60,00	91,67
CPA	2	1	1	3	3	4	66,67	25,00	33,33	75,00
CPA	12	1	14	13	26	14	46,15	7,14	53,85	92,86
CPA	3	2	14	9	17	11	17,65	18,18	82,35	81,82
CPA	3	0	5	3	8	3	37,50	0,00	62,50	100,00
CPA	7	2	11	4	18	6	38,89	33,33	61,11	66,67
CPA	7	1	11	11	18	12	38,89	8,33	61,11	91,67
CPA	7	6	16	13	23	19	30,43	31,58	69,57	68,42
CPA	2	0	4	2	6	2	33,33	0,00	66,67	100,00
CPA	8	6	10	11	18	17	44,44	35,29	55,56	64,71
CPA	7	7	14	16	21	23	33,33	30,43	66,67	69,57
CPA	7	7	10	12	17	19	41,18	36,84	58,82	63,16
CPA	9	7	10	13	19	20	47,37	35,00	52,63	65,00
CPA	9	8	10	7	19	15	47,37	53,33	52,63	46,67



## Dados Brutos do Experimento 1

GRUPO	TBA		%TBA		TBF	
	EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL	94,82	8,37	31,61	2,79	111,74	218,78
SAL	51,27	13,83	17,09	4,61	171,68	242,09
SAL	27,90	4,05	9,30	1,35	178,67	267,27
SAL	50,45	19,45	16,82	6,48	155,20	264,94
SAL	6,76	56,40	2,25	18,80	183,41	132,87
SAL	13,79	6,87	4,60	2,29	165,94	241,97
SAL	16,77	34,33	5,59	11,44	156,96	145,35
SAL	85,25	42,73	28,42	14,24	123,81	128,68
SAL	82,49	0,00	27,50	0,00	125,94	264,88
SAL	21,91	0,00	7,30	0,00	166,76	271,51
SAL	55,99	34,99	18,66	11,66	145,43	186,20
SAL	41,61	18,41	13,87	6,14	161,18	188,92
SAL	25,95	17,53	8,65	5,84	151,17	214,62
SAL	23,75	17,62	7,92	5,87	207,40	232,94
ZOL	81,10	46,13	27,03	15,38	120,23	165,06
ZOL	65,00	9,68	21,67	3,23	116,06	229,66
ZOL	69,41	46,94	23,14	15,65	150,13	175,16
ZOL	25,70	0,00	8,57	0,00	182,63	293,76
ZOL	82,01	14,57	27,34	4,86	134,01	223,55
ZOL	21,30	13,64	7,10	4,55	181,39	219,15
ZOL	75,96	11,77	25,32	3,92	121,76	234,73
ZOL	11,62	7,83	3,87	2,61	159,71	158,60
ZOL	43,10	5,22	14,37	1,74	146,04	184,05
ZOL	28,35	7,11	9,45	2,37	149,05	276,52
ZOL	64,14	40,95	21,38	13,65	141,84	182,63
ZOL	17,43	2,51	5,81	0,84	201,56	182,99
ZOL	105,42	57,46	35,14	19,15	155,01	148,98
ZOL	24,63	6,56	8,21	2,19	164,01	238,11
CPA	126,17	5,98	42,06	1,99	32,59	41,38
CPA	58,87	1,70	19,62	0,57	119,46	212,28
CPA	15,20	2,77	5,07	0,92	181,11	257,56
CPA	24,66	0,00	8,22	0,00	192,85	288,13
CPA	79,09	13,59	26,36	4,53	149,38	234,67
CPA	90,50	4,16	30,17	1,39	151,50	214,31
CPA	38,27	35,57	12,76	11,86	148,99	135,01
CPA	18,82	0,00	6,27	0,00	252,85	293,06
CPA	94,93	29,27	31,64	9,76	116,35	172,75
CPA	39,00	44,43	13,00	14,81	171,98	164,77
CPA	58,47	41,86	19,49	13,95	100,82	133,27
CPA	60,17	39,19	20,06	13,06	142,55	173,61
CPA	115,74	67,21	38,58	22,40	133,45	118,52

## Dados Brutos do Experimento 1

GRUPO	%TBF		T CENTRO		% T CENTRO	
	EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL	37,25	72,93	93,44	72,85	31,15	24,28
SAL	57,23	80,70	77,05	44,08	25,68	14,69
SAL	59,56	89,09	93,43	28,68	31,14	9,56
SAL	51,73	88,31	94,35	15,61	31,45	5,20
SAL	61,14	44,29	109,83	110,73	36,61	36,91
SAL	55,31	80,66	120,27	51,17	40,09	17,06
SAL	52,32	48,45	126,26	120,32	42,09	40,11
SAL	41,27	42,89	90,94	128,59	30,31	42,86
SAL	41,98	88,29	91,58	35,12	30,53	11,71
SAL	55,59	90,50	111,33	28,49	37,11	9,50
SAL	48,48	62,07	98,58	78,81	32,86	26,27
SAL	53,73	62,97	97,21	92,67	32,40	30,89
SAL	50,39	71,54	122,88	67,85	40,96	22,62
SAL	69,13	77,65	68,86	49,43	22,95	16,48
ZOL	40,08	55,02	98,68	88,80	32,89	29,60
ZOL	38,69	76,55	118,94	60,66	39,65	20,22
ZOL	50,04	58,39	80,46	77,91	26,82	25,97
ZOL	60,88	97,92	91,67	6,24	30,56	2,08
ZOL	44,67	74,52	83,98	61,88	27,99	20,63
ZOL	60,46	73,05	97,31	67,21	32,44	22,40
ZOL	40,59	78,24	102,28	53,51	34,09	17,84
ZOL	53,24	52,87	128,67	133,57	42,89	44,52
ZOL	48,68	61,35	110,86	110,73	36,95	36,91
ZOL	49,68	92,17	122,60	16,37	40,87	5,46
ZOL	47,28	60,88	94,02	76,42	31,34	25,47
ZOL	67,19	61,00	81,01	114,50	27,00	38,17
ZOL	51,67	49,66	39,57	93,55	13,19	31,18
ZOL	54,67	79,37	111,36	55,33	37,12	18,44
CPA	10,86	13,79	141,24	252,64	47,08	84,21
CPA	39,82	70,76	121,67	86,02	40,56	28,67
CPA	60,37	85,85	103,70	39,67	34,57	13,22
CPA	64,28	96,04	82,50	11,87	27,50	3,96
CPA	49,79	78,22	71,52	51,74	23,84	17,25
CPA	50,50	71,44	58,01	81,53	19,34	27,18
CPA	49,66	45,00	112,75	129,42	37,58	43,14
CPA	84,28	97,69	28,33	6,94	9,44	2,31
CPA	38,78	57,58	88,73	97,98	29,58	32,66
CPA	57,33	54,92	89,01	90,81	29,67	30,27
CPA	33,61	44,42	140,71	124,86	46,90	41,62
CPA	47,52	57,87	97,28	87,21	32,43	29,07
CPA	44,48	39,51	50,81	114,27	16,94	38,09

**ANEXO B**  
**Dados Brutos do Experimento 2 – CPA 8 mg/kg**

GRUPOS	SS	EBA		EBF		TOTAL ENTR		%EBA	
		EX	RE	EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL-SAL	1	4	0	11	11	15	11	26,67	0,00
SAL-SAL	2	2	0	11	4	13	4	15,38	0,00
SAL-SAL	3	9	6	9	19	18	25	50,00	24,00
SAL-SAL	4	5	1	13	9	18	10	27,78	10,00
SAL-SAL	5	3	0	10	12	13	12	23,08	0,00
SAL-SAL	6	5	1	10	12	15	13	33,33	7,69
SAL-SAL	7	4	3	10	11	14	14	28,57	21,43
SAL-SAL	8	4	2	14	8	18	10	22,22	20,00
SAL-SAL	9	3	4	17	15	20	19	15,00	21,05
SAL-SAL	10	8	8	13	16	21	24	38,10	33,33
SAL-SAL	11	4	2	13	7	17	9	23,53	22,22
SAL-SAL	12	5	3	12	7	17	10	29,41	30,00
SAL-SAL	13	5	1	10	4	15	5	33,33	20,00
SAL-CPA	1	2	1	12	23	14	24	14,29	4,17
SAL-CPA	2	2	0	15	2	17	2	11,76	0,00
SAL-CPA	3	3	0	15	3	18	3	16,67	0,00
SAL-CPA	4	16	7	15	17	31	24	51,61	29,17
SAL-CPA	5	5	1	15	18	20	19	25,00	5,26
SAL-CPA	6	4	1	12	10	16	11	25,00	9,09
SAL-CPA	7	2	3	13	9	15	12	13,33	25,00
SAL-CPA	8	3	4	14	18	17	22	17,65	18,18
SAL-CPA	9	3	0	13	8	16	8	18,75	0,00
SAL-CPA	10	6	4	8	11	14	15	42,86	26,67
CPA-SAL	1	8	3	18	21	26	24	30,77	12,50
CPA-SAL	2	2	0	15	4	17	4	11,76	0,00
CPA-SAL	3	4	1	12	17	16	18	25,00	5,56
CPA-SAL	4	4	2	12	17	16	19	25,00	10,53
CPA-SAL	5	2	0	15	10	17	10	11,76	0,00
CPA-SAL	6	7	5	18	17	25	22	28,00	22,73
CPA-SAL	7	1	0	12	10	13	10	7,69	0,00
CPA-SAL	8	6	3	15	10	21	13	28,57	23,08
CPA-CPA	1	8	0	17	16	25	16	32,00	0,00
CPA-CPA	2	5	6	10	15	15	21	33,33	28,57
CPA-CPA	3	2	0	13	8	15	8	13,33	0,00
CPA-CPA	4	3	2	16	20	19	22	15,79	9,09
CPA-CPA	5	5	4	17	14	22	18	22,73	22,22
CPA-CPA	6	2	1	1	11	3	12	66,67	8,33
CPA-CPA	7	5	1	18	14	23	15	21,74	6,67
CPA-CPA	8	3	2	12	13	15	15	20,00	13,33
CPA-CPA	9	3	0	12	12	15	12	20,00	0,00

## Dados Brutos do Experimento 2 – CPA 8 mg/kg

GRUPOS	SS	%EBF		TBA		TBF		T NO CENTRO	
		EX	RE	EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL-SAL	1	73,33	100,00	40,14	0,00	167,52	197,46	92,34	102,54
SAL-SAL	2	84,62	100,00	7,95	0,00	128,33	274,70	163,71	25,30
SAL-SAL	3	50,00	76,00	75,85	41,47	153,31	159,70	70,84	98,83
SAL-SAL	4	72,22	90,00	30,62	2,95	156,17	247,53	113,20	49,51
SAL-SAL	5	76,92	100,00	53,47	0,00	152,27	215,99	94,27	84,01
SAL-SAL	6	66,67	92,31	60,52	13,33	94,28	176,31	145,20	110,36
SAL-SAL	7	71,43	78,57	27,94	23,72	179,59	170,30	92,48	105,98
SAL-SAL	8	77,78	80,00	31,22	7,91	160,92	231,64	107,86	60,45
SAL-SAL	9	85,00	78,95	15,06	30,59	143,20	130,16	141,73	139,25
SAL-SAL	10	61,90	66,67	56,64	45,53	100,52	133,41	142,84	121,06
SAL-SAL	11	76,47	77,78	38,97	13,88	182,19	217,08	78,84	69,05
SAL-SAL	12	70,59	70,00	36,45	10,42	160,72	250,78	102,82	38,80
SAL-SAL	13	66,67	80,00	29,52	4,00	147,61	269,06	122,88	26,94
SAL-CPA	1	85,71	95,83	6,55	0,81	196,91	158,71	96,53	140,48
SAL-CPA	2	88,24	100,00	7,67	0,00	142,63	288,96	149,70	11,05
SAL-CPA	3	83,33	100,00	33,28	0,00	172,90	287,84	93,82	12,16
SAL-CPA	4	48,39	70,83	115,02	23,58	92,06	144,98	92,92	131,44
SAL-CPA	5	75,00	94,74	52,63	10,49	131,48	160,81	115,89	128,71
SAL-CPA	6	75,00	90,91	19,44	2,59	142,50	228,28	138,06	69,13
SAL-CPA	7	86,67	75,00	10,44	18,38	172,08	197,98	117,49	83,64
SAL-CPA	8	82,35	81,82	22,94	43,89	137,09	156,79	139,97	99,32
SAL-CPA	9	81,25	100,00	13,00	0,00	146,37	225,20	140,63	74,80
SAL-CPA	10	57,14	73,33	84,67	41,60	108,03	154,39	107,30	104,01
CPA-SAL	1	69,23	87,50	71,03	10,83	119,31	160,66	109,66	128,51
CPA-SAL	2	88,24	100,00	9,05	0,00	115,97	268,80	174,98	31,20
CPA-SAL	3	75,00	94,44	22,85	6,00	175,50	189,93	101,65	104,07
CPA-SAL	4	75,00	89,47	60,97	15,16	164,03	204,08	75,00	80,77
CPA-SAL	5	88,24	100,00	10,50	0,00	180,38	172,47	109,12	127,53
CPA-SAL	6	72,00	77,27	42,23	47,61	115,89	144,13	141,88	108,26
CPA-SAL	7	92,31	100,00	6,00	0,00	178,30	255,42	115,70	44,58
CPA-SAL	8	71,43	76,92	44,19	24,23	137,96	188,72	117,85	87,05
CPA-CPA	1	68,00	100,00	63,80	0,00	105,05	239,52	131,15	60,48
CPA-CPA	2	66,67	71,43	28,33	65,84	100,34	128,50	171,33	105,65
CPA-CPA	3	86,67	100,00	16,36	0,00	141,53	270,89	142,12	29,11
CPA-CPA	4	84,21	90,91	30,14	17,35	119,88	128,87	149,98	153,79
CPA-CPA	5	77,27	77,78	38,28	19,79	159,23	177,24	102,49	102,97
CPA-CPA	6	33,33	91,67	16,41	2,28	271,47	218,93	12,13	78,79
CPA-CPA	7	78,26	93,33	31,36	2,49	98,81	128,43	169,83	169,09
CPA-CPA	8	80,00	86,67	22,78	7,17	171,31	226,00	105,91	66,83
CPA-CPA	9	80,00	100,00	26,47	0,00	112,67	235,00	160,86	65,00

## Dados Brutos do Experimento 2 – CPA 8 mg/kg

GRUPOS	SS	%TBA		%TBF		%T CENTRO	
		EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL-SAL	1	13,38	0,00	55,84	65,82	30,78	34,18
SAL-SAL	2	2,65	0,00	42,78	91,57	54,57	8,43
SAL-SAL	3	25,28	13,82	51,10	53,23	23,61	32,94
SAL-SAL	4	10,21	0,98	52,06	82,51	37,73	16,50
SAL-SAL	5	17,82	0,00	50,76	72,00	31,42	28,00
SAL-SAL	6	20,17	4,44	31,43	58,77	48,40	36,79
SAL-SAL	7	9,31	7,91	59,86	56,77	30,83	35,33
SAL-SAL	8	10,41	2,64	53,64	77,21	35,95	20,15
SAL-SAL	9	5,02	10,20	47,73	43,39	47,24	46,42
SAL-SAL	10	18,88	15,18	33,51	44,47	47,61	40,35
SAL-SAL	11	12,99	4,63	60,73	72,36	26,28	23,02
SAL-SAL	12	12,15	3,47	53,57	83,59	34,27	12,93
SAL-SAL	13	9,84	1,33	49,20	89,69	40,96	8,98
SAL-CPA	1	2,18	0,27	65,64	52,90	32,18	46,83
SAL-CPA	2	2,56	0,00	47,54	96,32	49,90	3,68
SAL-CPA	3	11,09	0,00	57,63	95,95	31,27	4,05
SAL-CPA	4	38,34	7,86	30,69	48,33	30,97	43,81
SAL-CPA	5	17,54	3,50	43,83	53,60	38,63	42,90
SAL-CPA	6	6,48	0,86	47,50	76,09	46,02	23,04
SAL-CPA	7	3,48	6,13	57,36	65,99	39,16	27,88
SAL-CPA	8	7,65	14,63	45,70	52,26	46,66	33,11
SAL-CPA	9	4,33	0,00	48,79	75,07	46,88	24,93
SAL-CPA	10	28,22	13,87	36,01	51,46	35,77	34,67
CPA-SAL	1	23,68	3,61	39,77	53,55	36,55	42,84
CPA-SAL	2	3,02	0,00	38,66	89,60	58,33	10,40
CPA-SAL	3	7,62	2,00	58,50	63,31	33,88	34,69
CPA-SAL	4	20,32	5,05	54,68	68,03	25,00	26,92
CPA-SAL	5	3,50	0,00	60,13	57,49	36,37	42,51
CPA-SAL	6	14,08	15,87	38,63	48,04	47,29	36,09
CPA-SAL	7	2,00	0,00	59,43	85,14	38,57	14,86
CPA-SAL	8	14,73	8,08	45,99	62,91	39,28	29,02
CPA-CPA	1	21,27	0,00	35,02	79,84	43,72	20,16
CPA-CPA	2	9,44	21,95	33,45	42,83	57,11	35,22
CPA-CPA	3	5,45	0,00	47,18	90,30	47,37	9,70
CPA-CPA	4	10,05	5,78	39,96	42,96	49,99	51,26
CPA-CPA	5	12,76	6,60	53,08	59,08	34,16	34,32
CPA-CPA	6	5,47	0,76	90,49	72,98	4,04	26,26
CPA-CPA	7	10,45	0,83	32,94	42,81	56,61	56,36
CPA-CPA	8	7,59	2,39	57,10	75,33	35,30	22,28
CPA-CPA	9	8,82	0,00	37,56	78,33	53,62	21,67

**ANEXO C**  
**Dados Brutos do Experimento 2 – CPA 16 mg/kg**

GRUPOS	SS	EBA		EBF		T ENTR		%EBA		%EBF	
		EX	RE	EX	RE	EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL-SAL	1	2	3	14	13	16	16	12,50	18,75	87,50	81,25
SAL-SAL	2	4	3	14	16	18	19	22,22	15,79	77,78	84,21
SAL-SAL	3	4	2	20	12	24	14	16,67	14,29	83,33	85,71
SAL-SAL	4	4	1	11	21	15	22	26,67	4,55	73,33	95,45
SAL-SAL	5	12	5	14	11	26	16	46,15	31,25	53,85	68,75
SAL-SAL	6	12	8	8	15	20	23	60,00	34,78	40,00	65,22
SAL-SAL	7	8	5	11	13	19	18	42,11	27,78	57,89	72,22
SAL-SAL	8	5	0	8	13	13	13	38,46	0,00	61,54	100,00
SAL-SAL	9	10	3	10	11	20	14	50,00	21,43	50,00	78,57
SAL-SAL	10	3	2	7	13	10	15	30,00	13,33	70,00	86,67
SAL-SAL	11	6	5	14	13	20	18	30,00	27,78	70,00	72,22
SAL-SAL	12	9	7	15	20	24	27	37,50	25,93	62,50	74,07
SAL-SAL	1	3	0	13	11	16	11	18,75	0,00	81,25	100,00
SAL-SAL	2	9	4	9	9	18	13	50,00	30,77	50,00	69,23
SAL-SAL	3	6	0	14	7	20	7	30,00	0,00	70,00	100,00
SAL-SAL	4	7	0	11	1	18	1	38,89	0,00	61,11	100,00
SAL-SAL	5	9	4	19	20	28	24	32,14	16,67	67,86	83,33
SAL-SAL	6	6	1	12	10	18	11	33,33	9,09	66,67	90,91
SAL-SAL	7	11	24	7	24	18	48	61,11	50,00	38,89	50,00
SAL-SAL	8	7	10	12	12	19	22	36,84	45,45	63,16	54,55
SAL-SAL	9	4	0	10	12	14	12	28,57	0,00	71,43	100,00
SAL-SAL	10	6	2	23	29	29	31	20,69	6,45	79,31	93,55
SAL-SAL	11	17	12	14	16	31	28	54,84	42,86	45,16	57,14
SAL-SAL	12	11	11	18	24	29	35	37,93	31,43	62,07	68,57
CPA-SAL	1	0	2	17	12	17	14	0,00	14,29	100,00	85,71
CPA-SAL	2	11	7	22	17	33	24	33,33	29,17	66,67	70,83
CPA-SAL	3	0	10	22	5	22	15	0,00	66,67	100,00	33,33
CPA-SAL	4	1	1	17	19	18	20	5,56	5,00	94,44	95,00
CPA-SAL	5	2	2	18	9	20	11	10,00	18,18	90,00	81,82
CPA-SAL	6	0	0	16	8	16	8	0,00	0,00	100,00	100,00
CPA-SAL	7	4	4	22	16	26	20	15,38	20,00	84,62	80,00
CPA-SAL	8	10	3	13	17	23	20	43,48	15,00	56,52	85,00
CPA-SAL	9	0	0	14	13	14	13	0,00	0,00	100,00	100,00
CPA-SAL	10	3	5	13	12	16	17	18,75	29,41	81,25	70,59
CPA-SAL	11	1	4	30	20	31	24	3,23	16,67	96,77	83,33
CPA-CPA	1	1	1	6	5	7	6	14,29	16,67	85,71	83,33
CPA-CPA	2	11	0	18	11	29	11	37,93	0,00	62,07	100,00
CPA-CPA	3	2	0	15	13	17	13	11,76	0,00	88,24	100,00
CPA-CPA	4	2	1	11	14	13	15	15,38	6,67	84,62	93,33
CPA-CPA	5	4	0	17	12	21	12	19,05	0,00	80,95	100,00
CPA-CPA	6	3	1	13	14	16	15	18,75	6,67	81,25	93,33
CPA-CPA	7	5	1	17	13	22	14	22,73	7,14	77,27	92,86
CPA-CPA	8	4	1	17	12	21	13	19,05	7,69	80,95	92,31
CPA-CPA	9	10	2	11	13	21	15	47,62	13,33	52,38	86,67
CPA-CPA	10	4	7	15	10	19	17	21,05	41,18	78,95	58,82
CPA-CPA	11	1	4	16	16	17	20	5,88	20,00	94,12	80,00
CPA-CPA	12	4	11	13	16	17	27	23,53	40,74	76,47	59,26

## Dados Brutos do Experimento 2 – CPA 16 mg/kg

GRUPOS	SS	TBA		TBF		T CENTRO	
		EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL-SAL	1	11,91	14,12	158,97	218,75	129,12	67,14
SAL-SAL	2	34,57	15,70	157,85	174,98	107,58	109,32
SAL-SAL	3	26,89	4,96	159,18	234,28	113,94	60,77
SAL-SAL	4	39,29	5,61	157,46	184,44	103,25	109,95
SAL-SAL	5	75,45	33,63	131,62	201,58	92,93	64,79
SAL-SAL	6	109,11	53,54	91,99	159,52	98,90	86,95
SAL-SAL	7	65,15	30,20	135,61	185,08	99,24	84,72
SAL-SAL	8	32,21	0,00	122,99	215,39	144,81	84,61
SAL-SAL	9	56,96	11,78	139,22	176,98	103,82	111,24
SAL-SAL	10	7,96	11,48	94,15	189,02	199,68	99,50
SAL-SAL	11	54,29	49,62	98,66	178,31	147,05	72,07
SAL-SAL	12	54,35	27,75	134,60	131,33	111,06	140,92
SAL-SAL	1	9,18	0,00	168,50	175,65	122,32	124,35
SAL-SAL	2	93,45	47,48	131,60	184,89	74,95	67,64
SAL-SAL	3	47,79	0,00	158,85	254,88	93,36	45,12
SAL-SAL	4	53,01	0,00	166,98	298,62	80,02	1,38
SAL-SAL	5	61,04	21,13	134,01	165,42	104,95	113,45
SAL-SAL	6	42,02	3,22	126,49	141,42	131,50	155,34
SAL-SAL	7	148,67	109,11	123,92	134,06	27,42	56,82
SAL-SAL	8	39,59	71,68	149,03	133,20	111,38	95,12
SAL-SAL	9	17,88	0,00	183,57	144,21	98,55	155,79
SAL-SAL	10	20,73	3,10	158,17	172,03	121,09	124,86
SAL-SAL	11	96,87	95,19	98,58	110,27	104,55	94,55
SAL-SAL	12	69,30	68,58	134,67	122,18	96,03	109,24
CPA-SAL	1	0,00	8,77	143,34	243,09	156,66	48,14
CPA-SAL	2	60,75	39,37	138,64	148,29	100,61	112,35
CPA-SAL	3	0,00	108,92	174,87	42,81	125,13	148,27
CPA-SAL	4	2,56	4,93	185,42	192,52	112,02	102,56
CPA-SAL	5	8,75	6,00	154,97	239,74	136,28	54,26
CPA-SAL	6	0,00	0,00	209,86	259,60	90,14	40,40
CPA-SAL	7	18,01	30,31	163,57	166,28	118,42	103,41
CPA-SAL	8	66,91	16,07	140,92	217,38	92,18	66,54
CPA-SAL	9	0,00	0,00	173,45	227,82	126,55	72,18
CPA-SAL	10	44,86	24,35	135,68	131,24	119,46	144,41
CPA-SAL	11	19,05	18,49	193,34	180,69	87,61	100,83
CPA-CPA	1	14,12	8,09	236,30	271,13	49,58	20,78
CPA-CPA	2	63,60	0,00	108,33	174,94	128,07	125,06
CPA-CPA	3	13,74	0,00	173,78	190,34	112,48	109,66
CPA-CPA	4	23,36	3,45	140,47	154,28	136,17	142,27
CPA-CPA	5	21,34	0,00	162,81	217,96	115,85	82,05
CPA-CPA	6	32,06	3,66	177,03	249,13	90,91	47,21
CPA-CPA	7	22,88	2,23	144,22	237,47	132,90	60,30
CPA-CPA	8	34,16	6,29	153,59	228,61	112,26	65,10
CPA-CPA	9	53,43	9,36	131,89	181,09	114,68	109,55
CPA-CPA	10	40,33	62,49	134,87	119,75	124,81	117,76
CPA-CPA	11	8,69	25,98	138,66	136,30	152,65	137,73
CPA-CPA	12	28,17	46,85	97,98	120,40	173,85	132,75

## Dados Brutos do Experimento 2 – CPA 16 mg/kg

GRUPOS	SS	%TBA		%TBF		% T CENTRO	
		EX	RE	EX	RE	EX	RE
SAL-SAL	1	3,97	4,71	52,99	72,92	43,04	22,38
SAL-SAL	2	11,52	5,23	52,62	58,33	35,86	36,44
SAL-SAL	3	8,96	1,65	53,06	78,09	37,98	20,26
SAL-SAL	4	13,10	1,87	52,49	61,48	34,42	36,65
SAL-SAL	5	25,15	11,21	43,87	67,19	30,98	21,60
SAL-SAL	6	36,37	17,85	30,66	53,17	32,97	28,98
SAL-SAL	7	21,72	10,07	45,20	61,69	33,08	28,24
SAL-SAL	8	10,74	0,00	41,00	71,80	48,27	28,20
SAL-SAL	9	18,99	3,93	46,41	58,99	34,61	37,08
SAL-SAL	10	2,65	3,83	31,38	63,01	66,56	33,17
SAL-SAL	11	18,10	16,54	32,89	59,44	49,02	24,02
SAL-SAL	12	18,12	9,25	44,87	43,78	37,02	46,97
SAL-SAL	1	3,06	0,00	56,17	58,55	40,77	41,45
SAL-SAL	2	31,15	15,83	43,87	61,63	24,98	22,55
SAL-SAL	3	15,93	0,00	52,95	84,96	31,12	15,04
SAL-SAL	4	17,67	0,00	55,66	99,54	26,67	0,46
SAL-SAL	5	20,35	7,04	44,67	55,14	34,98	37,82
SAL-SAL	6	14,01	1,07	42,16	47,14	43,83	51,78
SAL-SAL	7	49,56	36,37	41,31	44,69	9,14	18,94
SAL-SAL	8	13,20	23,89	49,68	44,40	37,13	31,71
SAL-SAL	9	5,96	0,00	61,19	48,07	32,85	51,93
SAL-SAL	10	6,91	1,03	52,72	57,34	40,36	41,62
SAL-SAL	11	32,29	31,73	32,86	36,76	34,85	31,52
SAL-SAL	12	23,10	22,86	44,89	40,73	32,01	36,41
CPA-SAL	1	0,00	2,92	47,78	81,03	52,22	16,05
CPA-SAL	2	20,25	13,12	46,21	49,43	33,54	37,45
CPA-SAL	3	0,00	36,31	58,29	14,27	41,71	49,42
CPA-SAL	4	0,85	1,64	61,81	64,17	37,34	34,19
CPA-SAL	5	2,92	2,00	51,66	79,91	45,43	18,09
CPA-SAL	6	0,00	0,00	69,95	86,53	30,05	13,47
CPA-SAL	7	6,00	10,10	54,52	55,43	39,47	34,47
CPA-SAL	8	22,30	5,36	46,97	72,46	30,73	22,18
CPA-SAL	9	0,00	0,00	57,82	75,94	42,18	24,06
CPA-SAL	10	14,95	8,12	45,23	43,75	39,82	48,14
CPA-SAL	11	6,35	6,16	64,45	60,23	29,20	33,61
CPA-CPA	1	4,71	2,70	78,77	90,38	16,53	6,93
CPA-CPA	2	21,20	0,00	36,11	58,31	42,69	41,69
CPA-CPA	3	4,58	0,00	57,93	63,45	37,49	36,55
CPA-CPA	4	7,79	1,15	46,82	51,43	45,39	47,42
CPA-CPA	5	7,11	0,00	54,27	72,65	38,62	27,35
CPA-CPA	6	10,69	1,22	59,01	83,04	30,30	15,74
CPA-CPA	7	7,63	0,74	48,07	79,16	44,30	20,10
CPA-CPA	8	11,39	2,10	51,20	76,20	37,42	21,70
CPA-CPA	9	17,81	3,12	43,96	60,36	38,23	36,52
CPA-CPA	10	13,44	20,83	44,96	39,92	41,60	39,25
CPA-CPA	11	2,90	8,66	46,22	45,43	50,88	45,91
CPA-CPA	12	9,39	15,62	32,66	40,13	57,95	44,25



**ANEXO D**  
**Dados Brutos do Experimento 2 – Zolantidina 20 mg/kg**

GRUPOS	SS	EBA		EBF		T ENTRA		%EBA		%EBF	
		EXP	RE	EXP	RE	EXP	RE	EXP	RE	EXP	RE
SAL-SAL	1	1	1	12	8	13	9	7,69	11,11	92,31	88,89
SAL-SAL	2	8	5	16	18	24	23	33,33	21,74	66,67	78,26
SAL-SAL	3	3	1	9	5	12	6	25,00	16,67	75,00	83,33
SAL-SAL	4	7	6	11	9	18	15	38,89	40,00	61,11	60,00
SAL-SAL	5	3	0	8	14	11	14	27,27	0,00	72,73	100,00
SAL-SAL	6	1	0	9	4	10	4	10,00	0,00	90,00	100,00
SAL-SAL	7	4	1	4	3	8	4	50,00	25,00	50,00	75,00
SAL-SAL	8	5	3	7	13	12	16	41,67	18,75	58,33	81,25
SAL-SAL	9	6	2	6	9	12	11	50,00	18,18	50,00	81,82
SAL-SAL	10	2	1	10	13	12	14	16,67	7,14	83,33	92,86
SAL-SAL	11	2	3	11	15	13	18	15,38	16,67	84,62	83,33
SAL-ZOL	1	6	1	9	11	15	12	40,00	8,33	60,00	91,67
SAL-ZOL	2	2	2	7	10	9	12	22,22	16,67	77,78	83,33
SAL-ZOL	3	1	2	7	9	8	11	12,50	18,18	87,50	81,82
SAL-ZOL	4	2	2	8	15	10	17	20,00	11,76	80,00	88,24
SAL-ZOL	5	6	0	7	6	13	6	46,15	0,00	53,85	100,00
SAL-ZOL	6	4	2	9	8	13	10	30,77	20,00	69,23	80,00
SAL-ZOL	7	6	2	7	7	13	9	46,15	22,22	53,85	77,78
SAL-ZOL	8	1	0	15	15	16	15	6,25	0,00	93,75	100,00
SAL-ZOL	9	2	4	15	15	17	19	11,76	21,05	88,24	78,95
ZOL-SAL	1	3	4	11	10	14	14	21,43	28,57	78,57	71,43
ZOL-SAL	2	3	1	13	11	16	12	18,75	8,33	81,25	91,67
ZOL-SAL	3	2	4	8	11	10	15	20,00	26,67	80,00	73,33
ZOL-SAL	4	6	4	7	10	13	14	46,15	28,57	53,85	71,43
ZOL-SAL	5	4	0	7	3	11	3	36,36	0,00	63,64	100,00
ZOL-SAL	6	6	2	9	9	15	11	40,00	18,18	60,00	81,82
ZOL-SAL	7	2	1	9	5	11	6	18,18	16,67	81,82	83,33
ZOL-SAL	8	5	0	6	4	11	4	45,45	0,00	54,55	100,00
ZOL-SAL	9	7	5	12	15	19	20	36,84	25,00	63,16	75,00
ZOL-SAL	10	7	2	13	15	20	17	35,00	11,76	65,00	88,24
ZOL-ZOL	1	6	1	11	13	17	14	35,29	7,14	64,71	92,86
ZOL-ZOL	2	6	2	8	5	14	7	42,86	28,57	57,14	71,43
ZOL-ZOL	3	6	0	10	14	16	14	37,50	0,00	62,50	100,00
ZOL-ZOL	4	4	1	7	4	11	5	36,36	20,00	63,64	80,00
ZOL-ZOL	5	0	0	9	8	9	8	0,00	0,00	100,00	100,00
ZOL-ZOL	6	2	3	8	9	10	12	20,00	25,00	80,00	75,00
ZOL-ZOL	7	4	2	6	7	10	9	40,00	22,22	60,00	77,78
ZOL-ZOL	8	2	3	8	4	10	7	20,00	42,86	80,00	57,14
ZOL-ZOL	9	6	2	14	15	20	17	30,00	11,76	70,00	88,24
ZOL-ZOL	10	1	1	13	18	14	19	7,14	5,26	92,86	94,74
ZOL-ZOL	11	7	4	14	11	21	15	33,33	26,67	66,67	73,33

## Dados Brutos do Experimento 2 – Zolantidina 20 mg/kg

GRUPOS	SS	TBA		TBF		T CENTRO	
		EXP	RE	EXP	RE	EXP	RE
SAL-SAL	1	7,19	7,47	138,99	139,47	153,82	153,06
SAL-SAL	2	52,38	31,79	138,36	158,82	109,26	109,39
SAL-SAL	3	44,70	4,84	147,15	216,35	108,16	78,81
SAL-SAL	4	70,46	49,37	126,46	132,17	103,08	118,46
SAL-SAL	5	65,87	0,00	108,06	210,12	126,08	89,87
SAL-SAL	6	2,73	0,00	209,85	279,38	87,42	20,62
SAL-SAL	7	39,93	12,54	193,58	256,67	66,50	30,79
SAL-SAL	8	69,01	21,20	110,10	132,99	120,89	145,81
SAL-SAL	9	22,27	5,92	209,96	216,67	67,77	77,41
SAL-SAL	10	9,34	2,91	156,18	216,00	134,48	81,08
SAL-SAL	11	4,65	22,02	192,77	180,39	102,59	97,59
SAL-ZOL	1	49,05	2,84	124,68	186,38	126,27	110,78
SAL-ZOL	2	18,46	9,77	181,28	191,85	100,26	98,38
SAL-ZOL	3	7,09	22,20	223,38	194,12	69,53	83,68
SAL-ZOL	4	12,89	12,71	164,47	197,50	122,65	89,79
SAL-ZOL	5	42,09	0,00	110,51	244,01	147,40	55,99
SAL-ZOL	6	48,98	21,18	127,40	203,69	123,62	75,13
SAL-ZOL	7	52,32	8,56	122,69	80,52	125,00	210,92
SAL-ZOL	8	7,91	0,00	141,17	156,76	150,92	143,24
SAL-ZOL	9	5,21	9,74	178,83	140,59	115,97	149,67
ZOL-SAL	1	16,77	30,49	158,63	210,66	124,60	58,85
ZOL-SAL	2	33,23	4,15	153,11	227,60	113,66	68,26
ZOL-SAL	3	22,84	18,71	108,98	105,87	168,18	175,42
ZOL-SAL	4	91,37	45,31	133,24	157,81	75,39	96,89
ZOL-SAL	5	18,32	0,00	133,02	279,30	148,66	20,70
ZOL-SAL	6	64,76	20,95	126,61	128,87	108,63	150,18
ZOL-SAL	7	12,91	0,92	117,51	159,24	169,58	139,84
ZOL-SAL	8	47,90	0,00	146,34	245,75	105,76	54,25
ZOL-SAL	9	41,13	17,00	129,72	185,40	129,15	97,60
ZOL-SAL	10	22,29	2,72	159,89	190,03	117,82	107,24
ZOL-ZOL	1	38,83	7,26	140,46	191,27	120,71	101,47
ZOL-ZOL	2	76,97	3,66	138,68	213,79	84,35	82,56
ZOL-ZOL	3	47,63	0,00	128,44	190,93	123,94	109,07
ZOL-ZOL	4	18,55	8,39	184,69	247,98	96,77	43,63
ZOL-ZOL	5	0,00	0,00	208,75	155,47	91,25	144,53
ZOL-ZOL	6	32,49	12,47	82,81	166,13	184,71	121,40
ZOL-ZOL	7	30,57	14,51	71,88	194,95	197,55	90,54
ZOL-ZOL	8	22,61	33,76	106,19	195,37	171,20	70,87
ZOL-ZOL	9	35,38	7,70	190,65	203,48	73,97	88,82
ZOL-ZOL	10	2,39	19,71	189,68	162,43	107,93	117,86
ZOL-ZOL	11	27,09	41,24	152,38	109,87	120,52	148,87

## Dados Brutos do Experimento 2 – Zolantidina 20 mg/kg

GRUPOS	SS	%TBA		%TBF		%T CENTRO	
		EXP	RE	EXP	RE	EXP	RE
SAL-SAL	1	2,40	2,49	46,33	46,49	51,27	51,02
SAL-SAL	2	17,46	10,60	46,12	52,94	36,42	36,46
SAL-SAL	3	14,90	1,61	49,05	72,12	36,05	26,27
SAL-SAL	4	23,49	16,46	42,15	44,06	34,36	39,49
SAL-SAL	5	21,96	0,00	36,02	70,04	42,03	29,96
SAL-SAL	6	0,91	0,00	69,95	93,13	29,14	6,87
SAL-SAL	7	13,31	4,18	64,53	85,56	22,17	10,26
SAL-SAL	8	23,00	7,07	36,70	44,33	40,30	48,60
SAL-SAL	9	7,42	1,97	69,99	72,22	22,59	25,80
SAL-SAL	10	3,11	0,97	52,06	72,00	44,83	27,03
SAL-SAL	11	1,55	7,34	64,26	60,13	34,20	32,53
SAL-ZOL	1	16,35	0,95	41,56	62,13	42,09	36,93
SAL-ZOL	2	6,15	3,26	60,43	63,95	33,42	32,79
SAL-ZOL	3	2,36	7,40	74,46	64,71	23,18	27,89
SAL-ZOL	4	4,30	4,24	54,82	65,83	40,88	29,93
SAL-ZOL	5	14,03	0,00	36,84	81,34	49,13	18,66
SAL-ZOL	6	16,33	7,06	42,47	67,90	41,21	25,04
SAL-ZOL	7	17,44	2,85	40,90	26,84	41,67	70,31
SAL-ZOL	8	2,64	0,00	47,06	52,25	50,31	47,75
SAL-ZOL	9	1,74	3,25	59,61	46,86	38,66	49,89
ZOL-SAL	1	5,59	10,16	52,88	70,22	41,53	19,62
ZOL-SAL	2	11,08	1,38	51,04	75,87	37,89	22,75
ZOL-SAL	3	7,61	6,24	36,33	35,29	56,06	58,47
ZOL-SAL	4	30,46	15,10	44,41	52,60	25,13	32,30
ZOL-SAL	5	6,11	0,00	44,34	93,10	49,55	6,90
ZOL-SAL	6	21,59	6,98	42,20	42,96	36,21	50,06
ZOL-SAL	7	4,30	0,31	39,17	53,08	56,53	46,61
ZOL-SAL	8	15,97	0,00	48,78	81,92	35,25	18,08
ZOL-SAL	9	13,71	5,67	43,24	61,80	43,05	32,53
ZOL-SAL	10	7,43	0,91	53,30	63,34	39,27	35,75
ZOL-ZOL	1	12,94	2,42	46,82	63,76	40,24	33,82
ZOL-ZOL	2	25,66	1,22	46,23	71,26	28,12	27,52
ZOL-ZOL	3	15,88	0,00	42,81	63,64	41,31	36,36
ZOL-ZOL	4	6,18	2,80	61,56	82,66	32,26	14,54
ZOL-ZOL	5	0,00	0,00	69,58	51,82	30,42	48,18
ZOL-ZOL	6	10,83	4,16	27,60	55,38	61,57	40,47
ZOL-ZOL	7	10,19	4,84	23,96	64,98	65,85	30,18
ZOL-ZOL	8	7,54	11,25	35,40	65,12	57,07	23,62
ZOL-ZOL	9	11,79	2,57	63,55	67,83	24,66	29,61
ZOL-ZOL	10	0,80	6,57	63,23	54,14	35,98	39,29
ZOL-ZOL	11	9,03	13,75	50,79	36,62	40,17	49,62