

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**“Aprendizagem, memória e estresse em *Danio rerio*”**

**Luciana Pereira do Vale Cofiel**

**SÃO CARLOS  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**“Aprendizagem, memória e estresse em *Danio rerio*”**

**LUCIANA PEREIRA DO VALE COFIEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fisioterapia.

**Orientadora: Profa. Dra. Rosana Mattioli**

SÃO CARLOS  
2008

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

C675am

Cofiel, Luciana Pereira do Vale.

Aprendizagem, memória e estresse em *Danio rerio* /  
Luciana Pereira do Vale Cofiel. -- São Carlos : UFSCar,  
2008.

92 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2008.

1. Aprendizagem. 2. Clorfeniramina. 3. Histamina. 4.  
Estresse. 5. Peixe. I. Título.

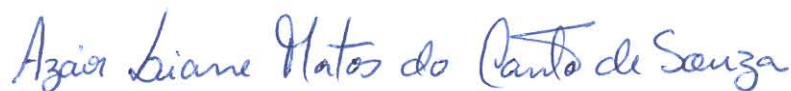
CDD: 153.15 (20<sup>a</sup>)

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE LUCIANA PEREIRA DO VALE COFIEL APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE OUTUBRO DE 2008**

**BANCA EXAMINADORA:**




Rosana Mattioli  
(UFSCar)



Azair L. M. do Canto de Souza  
(UFSCar)



Silvio Morato de Carvalho  
(USP/Ribeirão Preto),



Gilson Luiz Volpato  
(UNESP/Botucatu)



Flávia Roberta Faganello Navega  
(UNESP/Marília)

Para meus pais,  
que estiveram presentes  
em todos os momentos

## **Agradecimentos**

À professora Rosana pela orientação deste trabalho e por possibilitar mais esta etapa de minha formação. Muito obrigada pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis e por sempre me dizer o que eu precisava ouvir.

Aos Professores Doutores Cosme Salas e Fernando Rodríguez por me receberem no Laboratório de Psicobiología e por toda cordialidade, respeito e paciência com que me trataram durante a realização de meu estágio no exterior.

Aos Professores Doutores Azair Liane Matos do Canto de Souza, Flávia Roberta Faganello Navega, Gilson Luiz Volpato e Silvio Morato de Carvalho, por participarem de minha banca de doutorado e pela contribuição enriquecedora dada na avaliação deste trabalho.

Aos meus pais, Alberto e Mercedes, que sempre incentivaram meus estudos e priorizaram minha educação. Obrigada por todo o carinho e apoio.

Aos meus irmãos, Renata e Fernando, pelo companheirismo e apreciação sincera de meu trabalho.

Ao Flávio, meu namorado, por todo apoio, amizade e principalmente pela paciência e pelo carinho que você sempre me dedicou!

Aos meus novos e antigos amigos do Laboratório de Neurociências: Fer, Kelly, Nadi, Miagui, Carol, Diogo, Lucas, Tereza, Fernanda, Glesler, Flávia, Érika, Carla, Fabi, João e Aline. Muito obrigada pelos momentos compartilhados, idéias trocadas e sugestões dadas.

Às minhas “alunas” Fernanda e Martha, pude aprender muito trabalhando com vocês. Obrigada.

Aos meus colegas de república e amigos de São Carlos: Gramani, Rê, Kelly, Berabinha, Tati, Ana Cláudia, Paula, Moa, Fer, Karina Nogueira, Marcelo, Flávia, e Mare. Muito obrigada pelos momentos de diversão e pela amizade. Vou sentir saudades!

Aos professores, colegas e funcionários do PPG-FT pela convivência e pela colaboração em minha formação.

À Ana Paula e Kelly, secretárias do PPG-Ft que sempre estavam dispostas a ajudar.

Aos meus amigos de SP, que apesar da distância, sempre estiveram presentes e interessados em meu trabalho.

Ao auxílio concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp, processo 04/10659-0.

À Bolsa de Doutorado-Sanduiche concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*Os três primeiros estudos deste trabalho foram desenvolvidos no laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob orientação da Profa. Dra. Rosana Mattioli. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. Este trabalho contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 04/10659-0). O quarto estudo foi desenvolvido através do programa de Bolsa-Sanduíche da Capes no laboratório de Psicobiologia da Universidade de Sevilla, Espanha, sob orientação do Prof. Dr. Cosme Salas. Este estudo está em finalização e nesta tese serão apresentados resultados parciais.*



## SUMÁRIO

<b><u>CONTEXTUALIZAÇÃO: SISTEMA HISTAMINÉRGICO, APRENDIZAGEM E</u></b>	
<b><u>ESTRESSE</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b><u>ESTUDO I – CLORFENIRAMINA INIBE A APRENDIZAGEM APENAS EM DANIO</u></b>	
<b><u>RERIO NÃO ESTRESSADO</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b>RESUMO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b><u>ESTUDO II - BLOQUEIO DO RECEPTOR H<sub>2</sub> INIBE A APRENDIZAGEM EM</u></b>	
<b><u>PAULISTINHAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b>RESUMO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b><u>ESTUDO III - L-HISTIDINA FACILITA A APRENDIZAGEM EM PAULISTINHAS</u></b>	
<b><u>ESTRESSADOS E NÃO ESTRESSADOS</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b>RESUMO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b><u>ESTUDO IV – PAPEL DO TELENCEFALO MEDIAL NO CONDICIONAMENTO DE</u></b>	
<b><u>MEDO AO CONTEXTO EM PEIXES DA ESPÉCIE CARASSIUS AURATUS</u></b>	<b><u>ERRO!</u></b>
	<b><u>INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b><u>RESUMO</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b><u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b><u>ANEXOS – ESTUDO I</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b><u>ANEXOS – ESTUDO II</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>
<b><u>ANEXOS – ESTUDO III</u></b>	<b><u>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</u></b>



## **Contextualização: Sistema Histaminérgico, Aprendizagem e Estresse**

A aprendizagem e a memória são meios importantes pelos quais o ambiente exerce influência no comportamento animal. A aprendizagem é o processo através do qual os conhecimentos são adquiridos, enquanto a memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, armazenado e posteriormente resgatado (KANDEL, 1995).

As alterações comportamentais decorrentes da aprendizagem e memória se dão através da plasticidade neural. Kandel e colaboradores (1995) definiram a plasticidade como sendo alterações na transmissão sináptica, em curtos ou longos períodos de tempo, estimuladas pela atividade neural envolvida nos processos de aprendizagem.

De modo geral, os mecanismos cerebrais da memória e aprendizagem estão também associados aos processos neurais responsáveis pela atenção, percepção, motivação e outros processos neuropsicológicos, de forma que perturbações em qualquer um destes podem afetar a aprendizagem e a memória (BRANDÃO, 1995). O estresse é um fator que pode interferir na aprendizagem e memória. Por exemplo, peixes submetidos a estresse decorrente de isolamento social apresentaram déficit de aprendizagem (LAUDIEN, 1986).

O estresse é caracterizado por alterações bioquímicas, comportamentais e fisiológicas típicas, que são emitidas em resposta a situações que ameaçam a homeostasia do organismo. Uma das primeiras alterações fisiológicas é a hipersecreção de catecolaminas e glicocorticosteróides (cortisol e corticosterona). Esses hormônios são responsáveis pela mobilização de energia a ser utilizada no restabelecimento da homeostasia (CHAROUSOS e GOLD, 1992).

Há grande interesse na pesquisa sobre as bases neurais da aprendizagem e da memória. Sabe-se que existem diferentes regiões do encéfalo, e também diferentes

sistemas neurotransmissores envolvidos em tais processos. Um dos sistemas envolvidos é o sistema histaminérgico.

A histamina é uma amina biogênica, presente no cérebro em mastócitos e neurônios e é sintetizada a partir da L-histidina. No sistema nervoso central, a histamina atua em 3 tipos de receptores, que diferem em localização e resposta celular mediada (LEURS et al, 1995), sendo os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> pós-sinápticos, e o receptor H<sub>3</sub> pré-sináptico, que controla a síntese e liberação de histamina (SCHWARTZ et al., 1991). Um quarto tipo de receptor histaminérgico foi identificado, o receptor H<sub>4</sub>, porém este só foi observado em tecidos periféricos de rato (NGUYEN et al., 2001).

Em todos os vertebrados estudados, a organização geral do sistema histaminérgico é muito semelhante, com os corpos celulares dos neurônios localizados no núcleo túbero-mamilar no hipotálamo posterior, com projeções à quase todo o encéfalo e medula (PANULA et al., 1984; WANATABE et al., 1984).

A característica morfológica do sistema central histaminérgico, com um compacto grupo de células e uma vasta distribuição de fibras, assemelha-se aos sistemas de outras aminas biogênicas, como a dopamina e a serotonina, sugerindo que esse sistema possa atuar como um centro regulatório da atividade de todo o cérebro (WADA et al., 1991).

De fato, sabe-se que a histamina está envolvida na regulação de diversas funções fisiológicas, como o controle cardiovascular (MONTI, 1993), mecanismos homeostáticos (WADA et al., 1991), ingestão alimentar (FUJISE et al., 1998), regulação de temperatura (CLARK e LIPTON, 1985) e alterações neuroplásticas associadas com a recuperação funcional após lesão (WEILER et al., 1990; 1992). A histamina também está envolvida em processos cognitivos (PASSANI et al., 2000), tais

como a aprendizagem e memória, apresentando tanto efeitos facilitadores como inibidores.

O papel facilitador da histamina nos processos de aprendizagem e memória foi observado pela primeira vez quando a administração intracerebroventricular de histamina melhorou o desempenho de ratos em teste de esquiva ativa (DE ALMEIDA e IZQUIERDO, 1986). Miyazaki e colaboradores (1997; 1995) também observaram que a administração do antagonista H<sub>3</sub>, clobempropit, foi capaz de reverter o déficit de memória causado pela escopolamina. A aplicação de tioperamida, antagonista do receptor H<sub>3</sub>, também melhorou o desempenho de ratos tanto em um paradigma de esquiva inibitória (KOMATER et al., 2003) como de reconhecimento de lugar (ORSETTI et al., 2002).

Em peixes da espécie *Danio rerio*, a administração de  $\alpha$ -fluorometilhistidina, um inibidor da histidina descarboxilase que causa a diminuição de histamina cerebral, teve efeito prejudicial para a consolidação de memória de longa duração (PEITSARO et al., 2003).

No entanto, também são encontrados na literatura dados que indicam efeito inibidor da histamina para os processos de aprendizagem e memória.

Foi observado que a administração intracerebroventricular de antagonistas do receptor H<sub>1</sub>, pirilamina, e do receptor H<sub>2</sub>, cimetidina, melhorou a retenção da memória em ratos em um teste de esquiva inibitória, enquanto a administração de histamina prejudicou a retenção da memória (EIDI et al., 2003).

A histamina também está relacionada com o estresse. A maior densidade de fibras histaminérgicas é encontrada no hipotálamo, onde a histamina está envolvida na regulação de funções autonômicas e neuroendócrinas (BROWN et al., 2001), inclusive da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical. Foi sugerido que a histamina

esteja envolvida na mediação da ativação deste eixo no estresse induzido, uma vez que foi observada a inibição da secreção de ACTH em resposta ao estresse induzido por hipoglicemia, tanto pela diminuição da síntese histaminérgica após a administração  $\alpha$ -fluorometilhistidina como pela administração de agonistas do receptor  $H_3$  e antagonistas dos receptores  $H_1$  e  $H_2$  (KJAER et al., 1993).

Os peixes da espécie *Danio rerio* pertencem à classe dos teleósteos, peixes com esqueleto ósseo. Esta espécie é utilizada em estudos de diferentes áreas, sobretudo em estudos genéticos, devido ao seu rápido ciclo de vida, fácil manuseio e manipulação genética (GUO, 2004). Recentemente, esses animais passaram a ser utilizados também em estudos comportamentais (PEITSARO et al., 2003; ENGESZER et al., 2004).

Os peixes são particularmente interessantes para o estudo da aprendizagem e memória, pois além de possuírem amplo repertório comportamental, apresentam um sistema nervoso central mais elementar quando comparado ao de mamíferos, com menor número de vias envolvidas em um mesmo processo, o que pode facilitar o entendimento do mesmo.

A resposta ao estresse em peixes teleósteos apresenta similaridades àquelas dos vertebrados terrestres, inclusive na função, envolvendo a estimulação de consumo e transferência de oxigênio, mobilização de substratos energéticos, diminuição do uso da energia para o crescimento e a reprodução e principalmente efeitos supressivos de funções imunes (BONGA, 1997). Os peixes respondem aos estressores com a liberação de hormônios como catecolaminas e cortisol e ambos aumentam a produção de glicose em peixes (VIJAYAN et al., 1997). Deste modo, podemos utilizar índices plasmáticos de glicose como indicativos de estresse nestes animais (MARCONDES, 2002).

Com relação ao sistema histaminérgico, foi observada grande semelhança entre esse sistema de peixes, répteis e mamíferos, o que indica que ele foi conservado nos

vertebrados durante a evolução (INAGAKI et al., 1991; KASLIN e PANULA, 2001). O fato de os peixes da espécie *Danio rerio* não apresentarem histamina periférica (ERIKSSON, 1998) e a ausência de uma variação circadiana evidente dos níveis de histamina cerebral (PEITSARO et al., 2003) tornam esta espécie particularmente interessante para o estudo desse sistema. Em adição, teleósteos apresentam uma única via histaminérgica ascendente ao telencéfalo (EKSTRÖM et al., 1995).

Considerável atenção está voltada hoje para a importância da histamina sobre os processos de aprendizagem e memória, no entanto, os estudos realizados até o presente momento ainda mostram resultados contraditórios. Segundo Blandina e colaboradores (2004) o efeito facilitador ou inibidor da histamina nos processos de aprendizagem e memória pode estar relacionado, entre outros fatores, à estrutura cerebral envolvida e a natureza da tarefa realizada. Assim, a análise dos efeitos da ablação em teleósteos pode contribuir para o entendimento das funções da histamina na aprendizagem e memória.

Com base no exposto, o presente trabalho teve por objetivo verificar o envolvimento do sistema histaminérgico nos processos de aprendizagem e estresse em *Danio rerio*, e verificar o envolvimento do telencéfalo de peixes na aprendizagem emocional de *Carassius auratus*. Para isso, foram realizados 4 estudos. Nos 3 primeiros, foi realizado o bloqueio dos receptores histaminérgicos com o antagonista do receptor H<sub>1</sub>, a clorfeniramina, do receptor H<sub>2</sub>, a zolantidina e do receptor H<sub>3</sub>, tioperamida, bem como a estimulação dos mesmos através da L-histidina, a fim de avaliar o papel da histamina na aprendizagem de paulistinhas.

Uma vez que já foi observado que o confinamento de peixes teleósteos é capaz de gerar déficits de aprendizagem e elevar o nível de glicose plasmática (MARCONDES, 2002), também utilizamos o confinamento como estressor para peixes

da espécie *Danio rerio* de modo a verificar o papel do sistema histaminérgico no estresse.

O quarto estudo deste trabalho, desenvolvido no laboratório de Psicobiología da Universidade de Sevilha com o apoio do programa de Bolsa Doutorado-Sanduiche CAPES, visou estudar o efeito de lesões telencefálicas em peixes da espécie *Carassius auratus* em um modelo de medo ao contexto. Estudos e dados relativos aos estudos estão apresentados a seguir.



## **ESTUDO I – Clorfeniramina inibe a aprendizagem apenas em *Danio rerio* não estressado**

### **Resumo**

O sistema neurotransmissor histaminérgico é um dos maiores sistemas aminérgicos e está envolvido na aprendizagem, memória e estresse através dos receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>. O objetivo deste estudo foi testar a eficiência de um modelo experimental para o estudo da aprendizagem, memória e estresse para paulistinhas, e utilizá-lo para verificar o envolvimento do receptor H<sub>1</sub> em tais funções. O experimento foi realizado em 5 dias consecutivos (T1, T2, T3, T4 e T5), sob duas condições experimentais: na presença e na ausência de estresse. Nos treinos, os animais deveriam associar a interrupção no fornecimento de ar com a oferta de comida. Uma vez que um grupo controle foi capaz de associar estes eventos, este modelo foi utilizado para o estudo do envolvimento do receptor H<sub>1</sub>, na aprendizagem de paulistinhas estressadas e não-estressadas. Os peixes não-estressados receberam injeção intraperitoneal de clorfeniramina nas doses de 1 ou 8 mg/kg, ou salina após as sessões de treino. Animais estressados receberam as drogas e então eram submetidos a uma sessão de estresse de confinamento de 1 hora de duração antes de serem submetidos ao procedimento de aprendizagem. O tempo de aproximação ao comedouro foi medido (em segundos) e considerado como indicativo de aprendizagem. Animais tratados com clorfeniramina em ambas as apresentaram atraso de aprendizagem. Animais estressados tratados com salina aprenderam a tarefa apesar do estresse, entretanto, inibição da aprendizagem foi observada. A clorfeniramina não afetou a aprendizagem de animais estressados. Análise de concentração de glicose sanguínea foi realizada a fim de observar uma possível resposta ao estresse de confinamento. Esta análise indicou que o confinamento causou um aumento da concentração de glicose sanguínea e que o tratamento com clorfeniramina não teve efeito sobre aumento de glicose causado pelo estresse. Estes resultados indicam um envolvimento do sistema histaminérgico através do receptor H<sub>1</sub> na aprendizagem de *Danio rerio* não estressado.

## **Introdução**

A exposição a condições hostis (estressores) dá início a respostas organizadas que aumentam a probabilidade de sobrevivência. Estas respostas são compostas por alterações do comportamento, função autonômica e a secreção de múltiplos hormônios (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003). Uma das primeiras alterações fisiológicas é a hipersecreção de catecolaminas e glicocorticosteróides (cortisol e corticosterona). Outras alterações fisiológicas decorrentes do estresse são a mobilização de energia para a manutenção da função cerebral e muscular, aumento da taxa de perfusão cerebral e da utilização de glicose cerebral local e direcionamento da atenção para a ameaça (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003). Em mamíferos estas alterações já estão bem descritas e se dão através da ativação do eixo hipotálamo- pituitária- adrenal, enquanto em peixes, os corticoesteróides, principalmente o cortisol são liberados pelas células intra-renais (MOREIRA e VOLPATO, 2004).

Apesar da importância das respostas ao estresse durante eventos aversivos, a exposição prolongada a glicocorticóides ou ao estresse pode ter efeitos deletérios, como o desenvolvimento de hipertensão e diabetes insulino-dependente (SAPOLSKY et al., 2000). Também pode haver prejuízos de aspectos da cognição dependente do hipocampo, tais como a memória explícita (em humanos e ratos), tanto na fase de consolidação como na evocação da informação (SAPOLSKY, 2003).

A histamina é uma amina biogênica, presente no encéfalo em mastócitos e neurônios e é sintetizada a partir da L-histidina. No sistema nervoso central, a histamina atua em 3 tipos de receptores, que diferem em localização e resposta celular mediada (LEURS et al, 1995), sendo os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> pós-sinápticos, e o receptor H<sub>3</sub> pré-sináptico, que controla a síntese e liberação de histamina (SCHWARTZ et al., 1991).

Um quarto tipo de receptor histaminérgico foi identificado, o receptor H<sub>4</sub>, porém este só foi observado em tecidos periféricos de rato (NGUYEN et al., 2001).

Em todos os vertebrados estudados, a organização geral do sistema histaminérgico é muito semelhante, com os corpos celulares dos neurônios localizados no núcleo túbero-mamilar no hipotálamo posterior com projeções à quase todo o encéfalo e medula (PANULA et al., 1984; WANATABE et al., 1984).

A característica morfológica do sistema central histaminérgico, com um compacto grupo de células e uma vasta distribuição de fibras, assemelha-se ao sistema de outras aminas biogênicas, como a dopamina e a serotonina, sugerindo que esse sistema possa atuar como um centro regulatório da atividade de todo o cérebro (WADA et al., 1991).

De fato, sabe-se que a histamina está envolvida na regulação de diversas funções fisiológicas, como o controle cardiovascular (MONTI, 1993), mecanismos homeostáticos (WADA et al., 1991), ingestão alimentar (FUJISE et al., 1998), regulação de temperatura (CLARK e LIPTON, 1985) e alterações neuroplásticas associadas com a recuperação funcional após lesão (WEILER et al., 1990; 1992). A histamina também está envolvida em processos cognitivos (PASSANI et al., 2000), tais como a aprendizagem e memória, apresentando tanto efeitos facilitadores como inibidores.

O papel facilitador da histamina nos processos de aprendizagem e memória foi observado pela primeira vez quando a administração intracerebroventricular de histamina melhorou o desempenho de ratos em teste de esQUIVA ativa (DE ALMEIDA e IZQUIERDO, 1986). Desde então, muitos estudos foram realizados com o intuito de esclarecer o papel do sistema histaminérgico na aprendizagem e memória, mas os resultados são contraditórios.

A histamina também está relacionada com o estresse. A maior densidade de fibras histaminérgicas é encontrada no hipotálamo, onde a histamina está envolvida na regulação de funções autonômicas e neuroendócrinas (BROWN et al., 2001), inclusive da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical. Foi sugerido que a histamina esteja envolvida na mediação da ativação deste eixo no estresse induzido, uma vez que foi observada a inibição da secreção de ACTH em resposta ao estresse induzido por hipoglicemia, tanto pela diminuição da síntese histaminérgica após a administração  $\alpha$ -fluorometilhistidina como pela administração de agonistas do receptor  $H_3$  e antagonistas dos receptores  $H_1$  e  $H_2$  (KJAER et al., 1993).

A resposta ao estresse em peixes teleósteos apresenta similaridades àquelas dos vertebrados terrestres, inclusive na função, envolvendo a estimulação de consumo e transferência de oxigênio, mobilização de substratos energéticos, diminuição do uso da energia para o crescimento e a reprodução e principalmente efeitos supressivos de funções imunes (BONGA, 1997). Os peixes respondem aos estressores com a liberação de hormônios como catecolaminas e cortisol e ambos aumentam a produção de glicose em peixes (VIJAYAN et al., 1997). Deste modo, podemos utilizar índices plasmáticos de glicose como indicativos de estresse nestes animais (MARCONDES, 2002).

O fato dos peixes da espécie *Danio rerio* não apresentarem histamina periférica (ERIKSSON, 1998) e a ausência de uma variação circadiana evidente dos níveis de histamina cerebral (PEITSARO et al., 2003) tornam esta espécie particularmente interessante para o estudo desse sistema.

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi elaborar um modelo experimental para o estudo da aprendizagem e memória e estresse em *Danio rerio* (paulistinha), e utilizar este modelo experimental para verificar o papel do receptor  $H_1$  histaminérgico nessas funções.

## **Metodologia**

### **Procedimentos**

Neste estudo, foi desenvolvido um modelo experimental de aprendizagem e memória para paulistinhas. Os animais foram pesados e colocados individualmente nos aquários dois dias antes do início do experimento e não receberam alimentação durante este período. Os animais permaneceram nos aquários durante todo o período de experimento.

O experimento foi realizado em cinco dias consecutivos (treino 1, 2, 3, 4 e 5), em duas condições experimentais distintas: na presença e na ausência de estresse. Na primeira condição experimental, a bomba de ar era desligada e após 30 segundos a comida era oferecida no comedouro. Animais que não comeram no primeiro treino foram excluídos (15 peixes). O tempo que o peixe levava para entrar na área de alimentação após o momento em que o fornecimento de ar era desligado foi registrado em segundos e considerado como indicativo de aprendizagem. Uma vez que se observou que o grupo de animais que não recebeu qualquer tipo de tratamento farmacológico (grupo não injetado, n=15) foi capaz de associar o corte no fornecimento de ar do aquário com a oferta de comida, este modelo foi utilizado para verificar o envolvimento do receptor  $H_1$  na aprendizagem de peixes paulistinhas submetidos a este modelo de aprendizagem.

O experimento foi realizado tal como descrito acima, sendo que os animais recebiam o tratamento farmacológico (CPA1: n=13, CPA8: n=15) ou salina (SAL: n=13) 5 minutos após cada sessão de treino.

No segunda condição experimental (na presença de estresse), os animais recebiam a injeção intraperitoneal com uma das doses de clorfeniramina (CPA1: n=20;

CPA8: n=22) ou salina (SAL: n=19) e cinco minutos após eram confinados por uma hora em uma área correspondente a 8% do total do aquário, que era delimitada por uma barreira plástica. Uma hora após o confinamento, os animais eram submetidos ao procedimento de treino tal como descrito acima.

Foi realizada uma análise sanguínea de animais submetidos ao procedimento de estresse a fim de se verificar eficácia do confinamento como estressor e possíveis efeitos das drogas sobre a resposta ao estresse. Os animais foram decapitados e o sangue foi coletado em tiras de análise da glicose sanguínea Accu-Check Advantage II. A leitura da concentração sanguínea de glicose foi realizada utilizando-se o monitor Accu-Check Advantage (Roche Diagnostics, Alemanha).

Esta foi realizada após o treino no primeiro (SAL: n=10; CPA1: n=9; CPA8: n=10) e quinto dia de confinamento (SAL: n=13; CPA1: n=8; CPA8: n=10). Também foi realizada análise da glicose sanguínea de animais não estressados e não injetados (CON: grupo controle) no primeiro (n=6) e quinto dia (n=7) de experimento e utilizada como controle.

## **Animais**

Foram utilizados cento e dezessete paulistinhas de sexo e idade desconhecidos. Um intervalo mínimo de uma semana de aclimatização foi respeitado entre a compra dos peixes e início do experimento. Neste período, os animais foram colocados em aquários de 30L (30 animais por aquário), a 18-22°C com aeração e filtragem constantes, ciclo natural de luz e alimentados cinco vezes por semana com comida em flocos (Wardly Corporation, NJ, USA). Os animais foram selecionados aleatoriamente para os diferentes grupos experimentais.

Os experimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociência Comportamento (SBNeC), baseadas no Guia de cuidados e uso de animais de laboratório do US National Institutes of Health (US National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animais).

### **Aquário experimental**

Os aquários usados este experimento possuíam 25 cm de comprimento, 11,5 cm de largura e 15 cm de altura e a água era constantemente aerada (Figura 1). A seis centímetros de um dos lados do aquário uma barreira plástica transparente foi fixada, limitando a área de alimentação. Dentro desta área havia um cilindro plástico (2,5cm de diâmetro e 5cm de altura) transparente, onde a comida (ração flutuante) era oferecida durante os experimentos. Este cilindro ficava fixado em uma das laterais do aquário, sendo que sua extremidade inferior permanecia submersa meio centímetro abaixo do nível da água.

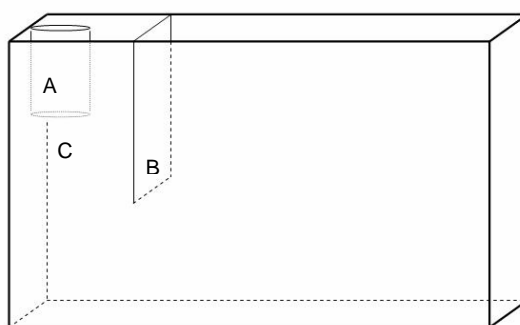


Figura 1. Aquário experimental. A: comedouro; B: barreira, C: área de alimentação.

## **Drogas**

A droga utilizada em ambos os experimentos deste trabalho foi a clorfeniramina dissolvida em solução salina nas concentrações de 0.5 e 4 mg/ml (CPA1 e CPA8) (Sigma, USA). A droga foi administrada em um volume de injeção de 2 ml/kg de peso corporal, utilizando-se uma seringa de 10 µl (Hamilton, modelo 7105KH). O animal era capturado e imobilizado utilizando-se uma rede de captura de peixes, retirado da água e a droga injetada intraperitonealmente.

Solução salina foi utilizada como controle. A droga em ambas as concentrações e o controle foram colocadas em tubos eppendorf codificados em refrigeração. O experimentador desconhecia a codificação no momento dos testes.

## ***Análise estatística***

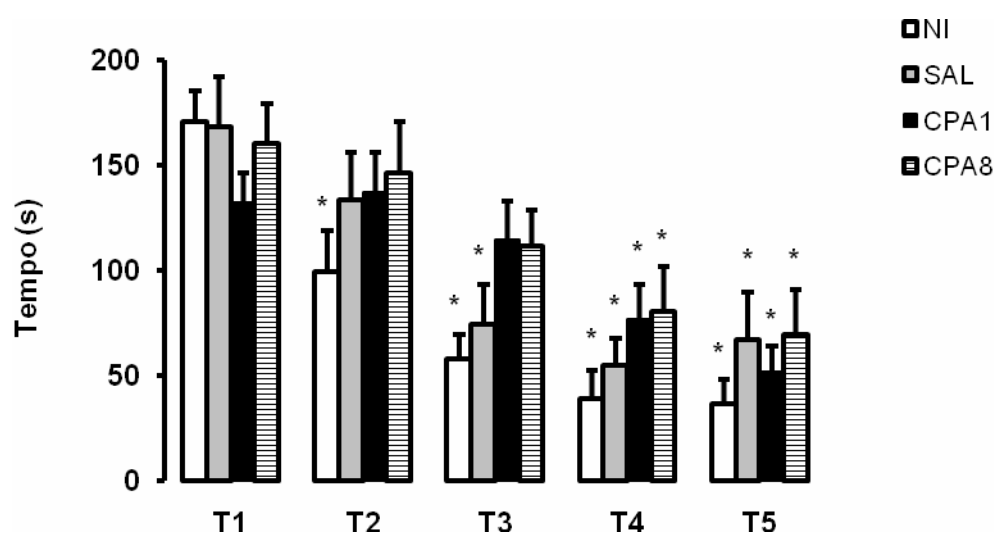
Todos os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Dados com variância homogênea e aderentes à curva normal foram analisados utilizando-se o teste de Análise de Variância de duas vias (Anova), seguido do teste de comparações múltiplas de Student Newman Keuls. Dados que não obedeciam a estes critérios foram analisados utilizando-se o teste não paramétrico de Friedman.  $P < 0,05$  foi considerado como sendo estatisticamente significativo.

## ***Resultados***

As latências de entrada na área de alimentação nos 5 dias de treino dos animais não estressados estão representados na Figura 2. Animais não injetados apresentaram diminuição da latência de entrada na área de alimentação, com diferença



estatisticamente significativa a partir de T2 com relação a T1. Animais que receberam salina apresentaram diminuição estatisticamente significativa a partir de T3 em relação a T1. Já os animais tratados com CPA na dose de 1 mg/kg e 8 mg/kg apresentaram um prejuízo da aprendizagem, uma vez que se observou diminuição significativa somente em T4 e T5 em relação a T1, respectivamente (Anova de duas vias, fator dias:  $F=31.20$ ,  $GL=4$ ,  $P<0.0001$ ; fator drogas:  $F=1,52$ ,  $GL= 3$ ,  $P=0,21$ ; interação entre fatores:  $F= 1,23$ ,  $GL=12$ ,  $P=0,2644$ ; Student Newman Keuls  $P<0.05$ ).



**Figura 2.** Média ( $\pm$ E.P.M.) das latências de entrada na área de alimentação dos animais não injetados (NI), dos animais tratados com salina (SAL), clorfeniramina na dose de 1mg/kg (CPA1) e 8 mg/kg (CPA8) após os cinco dias de treino (T1, T2, T3, T4 e T5). Anova de duas vias, fator dias,  $F=31,20$ ,  $DF=4$ ,  $P<0,0001$ ; fator drogas,  $F=1,52$ ,  $DF=3$ ,  $P=0,21$ ; interação entre fatores:  $F= 1,23$ ,  $GL=12$ ,  $P=0,2644$ ; Student Newman Keuls  $P<0.05$ . \* Indica diferença estatisticamente significativa em relação a T1 do mesmo grupo.

Latências de entrada na área de alimentação dos animais submetidos ao estresse de confinamento estão representados na Figura 3. O teste de Friedman indicou que os animais submetidos ao procedimento de estresse tratados com salina (Friedman,  $P=0,0002$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=21,8316$ ), CPA na dose de 1 (Friedman,  $P=0,0177$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=11,95$ ) e na dose de 8 mg/kg (Friedman,  $P=0,016$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=17,4727$ ), foram capazes de aprender apesar do procedimento de estresse.

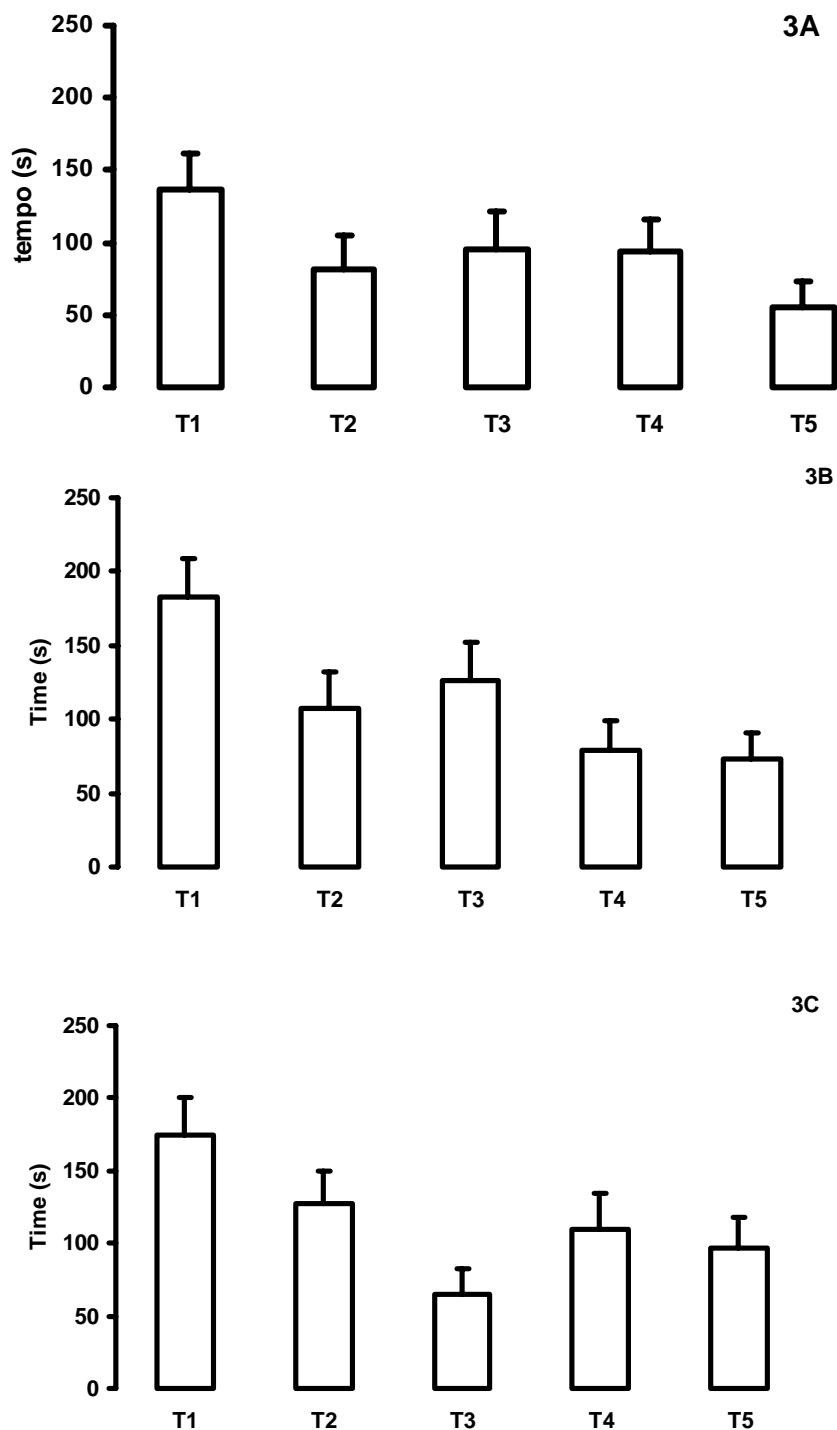


Figura 3. Média ( $\pm$ E.P.M.) das latências de entrada na área de alimentação dos animais submetidos ao procedimento de estresse nos 5 dias de treino (T1, T2, T3, T4 e T5). 3A. Animais tratados com salina (n= 19, Friedman,  $P=0,0002$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=21,8316$ ). 3B. Animais tratados com clorfeniramina na dose de 1mg/kg (Friedman,  $P=0,0177$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=11,95$ ). 3C. Animais tratados com clorfeniramina na dose de 8 mg/kg (Friedman,  $P=0,016$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=17,4727$ ).

## Efeito do estresse na glicose sanguínea

O teste Anova de duas vias indicou diferença entre os tratamentos ( $P=0,0025$ ,  $DF=6$ ,  $F=3,95162$ ), dias de tratamento ( $P=0,0024$ ,  $DF=1$ ,  $F=9,99836$ ) e interação entre fatores ( $P<0,01$ ,  $DF=6$ ,  $F=7,27104$ ) (Figura 4). O teste de Student Newman Keuls indicou que os animais submetidos ao procedimento de estresse e tratados com salina apresentaram maior nível de glicose sanguínea comparado aos animais controle que não foram submetidos ao estresse e não receberam tratamento farmacológico. Animais tratados com ambas as doses de clorfeniramina apresentaram nível de glicose similar aos animais tratados com salina, no primeiro e no quinto dia de teste.

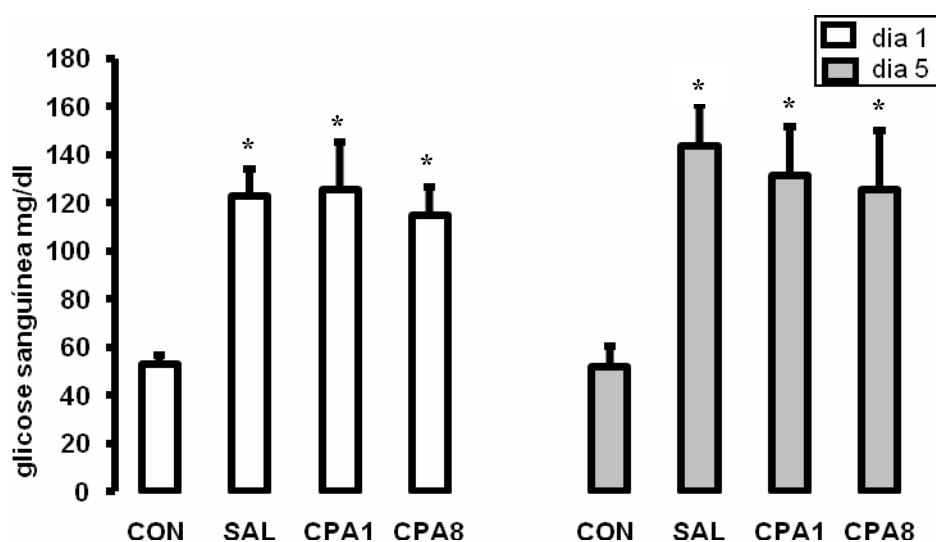


Figura 4. Média ( $\pm$ E.P.M.) da glicose sanguínea dos animais submetidos a uma (dia 1) ou 5 sessões de confinamento (dia 5) e pré-tratados com salina (SAL), clorfeniramina na dose de 1 mg/kg (CPA1) ou 8 mg/kg (CPA8). Também foi realizada a análise de um grupo de animais não injetado e não estressado para servir como controle (CON), após 1 e cinco dias de permanência no aquário experimental. Anova de duas vias, fator dias,  $P=0,0025$ ,  $DF=6$ ,  $F=3,95162$ , Student Newman Keuls,  $p<0,05$ . \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle referente ao mesmo dia de análise.

## **Discussão**

No primeiro experimento deste trabalho, foi observado que os animais foram capazes de associar o fornecimento de comida com o desligamento da bomba de ar. Este modelo foi inicialmente utilizado para o estudo da aprendizagem em tilápia do Nilo (MARCONDES, 2002) e se mostrou útil também para o estudo da aprendizagem em paulistinha.

Este modelo apresenta algumas vantagens. Os procedimentos são realizados em cinco dias consecutivos e durante este período os animais permanecem no próprio aquário experimental, reduzindo consideravelmente a manipulação dos mesmos e diminuindo um possível fator de estresse.

Nos resultados observamos um leve prejuízo da aprendizagem dos animais tratados com salina em comparação aos animais não injetados. Esta inibição da aprendizagem pode ser decorrente do estresse do procedimento de injeção. O tratamento com clorfeniramina em ambas as doses também retardou a aprendizagem, indicando uma ação facilitadora da histamina através do receptor  $H_1$ .

A clorfeniramina também inibiu a aprendizagem de peixes dourados em diferentes modelos experimentais (FAGANELLO e MATTIOLI, 2007). Este e outros antagonistas do receptor  $H_1$  também bloquearam a memória de trabalho e a memória de referência em ratos (MASUOKA e KAMEI, 2007; MASUOKA et al., 2007). Camundongos “knockout” do gene do receptor  $H_1$  apresentaram pior desempenho que animais sem a mutação em tarefa de aprendizagem espacial e na tarefa de reconhecimento de objeto (YANAI et al., 2008).

No entanto, um efeito facilitador desta droga também foi observado em peixes dourados, em um modelo de aprendizagem apetitiva e de esquia inibitória (MEDALHA e MATTIOLI, 2007; COFIEL e MATTIOLI, 2006). Em ratos, a injeção

pós-treino de clorfeniramina na região do núcleo basal magnocelular, facilitou a aquisição de esquiva (PRIVOU et al., 1999) e a infusão da mesma droga intraventricularmente facilitou a aprendizagem no labirinto aquático (HASENOHRL et al., 1999).

Uma vez que nos artigos citados acima foram utilizados diferentes modelos experimentais para se estudar o efeito da clorfeniramina na aprendizagem em diferentes espécies, as diferenças metodológicas podem ser responsáveis pelos resultados discrepantes. Em adição a isso, Yanai e colaboradores (2008) propuseram que a atuação da histamina se dê de maneira estado dependente, e isso levaria a observação dos efeitos facilitadores e inibidores observados desta droga.

No segundo experimento, a clorfeniramina não teve efeito sobre a aprendizagem de animais submetidos ao estresse, apesar de ter inibido a aprendizagem de animais não-estressados. Este achado está de acordo com a hipótese de Yanai e colaboradores (2008) de que a histamina atua sobre a aprendizagem de maneira estado-dependente.

A análise da glicose plasmática confirmou o confinamento como fator de estresse para os animais, mostrando aumento da concentração da glicose sanguínea dos animais estressados em comparação aos não estressados. O tratamento com clorfeniramina não alterou o nível de glicose sanguínea, indicando que o receptor H<sub>1</sub> não está envolvido com as respostas fisiológicas ao estresse em paulistinha. No entanto, alguns artigos já indicaram o envolvimento do sistema histaminérgico neste tipo de resposta. A diminuição da histamina cerebral teve efeito ansiolítico em zebrafish (PEITSARO et al., 2003). Camundongos “knockout” com mutação do receptor H<sub>1</sub> apresentaram atenuação das anormalidades comportamentais induzidas pelo estresse decorrente do isolamento social, como diminuição na locomoção e prejuízo na aprendizagem e memória (DAI et al., 2005). Assim, novos estudos devem ser realizados

a fim de se verificar o envolvimento do receptor  $H_1$  nos processos de estresse em paulistinha.

Os resultados deste trabalho indicam um efeito facilitador da histamina nos processos de aprendizagem e memória de paulistinha, através de receptores  $H_1$ . No entanto, esse receptor parece não estar envolvido nos processos de aprendizagem em situações de estresse. Nossos resultados também indicam uma possível ação da histamina de maneira estado-dependente.

## **ESTUDO II - Bloqueio do receptor H<sub>2</sub> inibe a aprendizagem em paulistinhas submetidos ao estresse.**

### **Resumo**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a aprendizagem e o impacto do estresse sobre a aprendizagem de paulistinhas. O experimento foi realizado em 5 dias consecutivos (T1, T2, T3, T4 e T5), sob duas condições experimentais: na presença e na ausência de estresse. Nos treinos, os animais deveriam associar a interrupção no fornecimento de ar com a oferta de comida. Os peixes não-estressados receberam injeção intraperitoneal de zolantidina na dose de 20 mg/kg, ou salina após as sessões de treino. Animais estressados receberam a droga ou salina e então eram submetidos a uma sessão de estresse de confinamento de 1 hora de duração e então eram submetidos ao procedimento de aprendizagem. Tempo de aproximação ao comedouro foi medido (em segundos) e foi considerado como indicativo de aprendizagem. Diminuição nas latências de entrada foram observadas nos animais não estressados tratados com salina. Animais estressados tratados com salina aprenderam a tarefa apesar do procedimento de estresse. Zolantidina inibiu a aprendizagem de animais estressados, no entanto não foi observado efeito desta droga sobre os animais não estressados. Estes resultados indicam envolvimento do receptor H<sub>2</sub> nos processos de aprendizagem e memória em paulistinhas estressados.

## Introdução

A exposição a condições hostis resulta em uma série de respostas coordenadas organizadas para aumentar a probabilidade de sobrevivência. Estas respostas coordenadas, comumente chamadas de “respostas ao estresse”, são compostas por alterações no comportamento, função autonômica e secreção de diferentes hormônios (VAN DE KAR e BLAIR, 1999).

As respostas ao estresse em peixes teleósteos apresentam características semelhantes àquelas dos vertebrados terrestres. Estas similaridades dizem respeito à: 1- os principais mensageiros dos eixos cérebro-simpático-células cromafin (equivalente ao eixo cérebro-simpático-medula adrenal) e cérebro-pituitária-interrenal (equivalente ao eixo cérebro-pituitária-adrenal); bem como: 2- outras funções, envolvendo estimulação do consumo e transferência de oxigênio, mobilização de substratos energéticos, diminuição do uso de energia para crescimento e reprodução, e principalmente efeitos supressivos em funções imunes (para revisão, ver BONGA, 1997).

A histamina está envolvida em diferentes mecanismos regulatórios cerebrais, como a regulação de funções corporais básicas, incluindo o ciclo sono-vigília, homeostasia endócrina e energética, plasticidade e aprendizagem (HASS e PANULA, 2003; BROWN et al., 2001).

Evidências também implicam o envolvimento deste sistema neurotransmissor nos processos de estresse. Miklós e Kovács (2003) observaram que o corpo de células histaminérgicas localizadas no hipotálamo respondem de modo específico a estressores, contribuindo para as respostas autonômicas e comportamentais a diferentes desafios. Em adição, foi sugerido que a histamina atua como um mediador central da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal induzida pelo estresse (KJAER et al., 1994).



O sistema histaminérgico em *Danio rerio* (paulistinha) se assemelha ao de outros vertebrados (KASLIN e PANULA, 2001; ERIKSSON et al., 1998) e sítios de ligação para os ligantes de H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> foram identificados no cérebro de paulistinha em áreas correspondentes à de mamíferos (PEITSARO et al., 2007). O paulistinha é um modelo excepcionalmente adequado para os estudos de funções deste sistema neurotransmissor, uma vez que histamina não-neuronal é indetectável nesta espécie (ERIKSSON et al., 1998).

Apesar de estudos terem sido conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito do estresse e aprendizagem em teleósteos, para o nosso conhecimento, até o presente momento, um estudo envolvendo o sistema histaminérgico (particularmente o receptor H<sub>2</sub>), estresse e aprendizagem em paulistinha não foi realizado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com o antagonista H<sub>2</sub> zolantidina na aprendizagem de animais submetidos e não submetidos ao estresse de confinamento na aprendizagem do teleósteo paulistinha. Também foi observado o efeito desta droga sobre o nível de glicose sanguínea.

## **Metodologia**

### **Procedimentos**

O experimento foi realizado em cinco dias consecutivos (treino 1, 2, 3, 4 e 5) de duração e sob duas condições experimentais distintas: na presença e na ausência de estresse. Na primeira condição, a bomba de ar era desligada e após 30 segundos a comida era oferecida no comedouro. Animais que não comeram no primeiro treino foram excluídos (15 animais). O tempo que o peixe levava para entrar na área de alimentação após o momento em que o fornecimento de ar era desligado foi registrado

em segundos e considerado como indicativo de aprendizagem. Os animais receberam zolantidina ou salina 5 minutos após cada sessão de treino.

No segunda condição experimental (sob estresse), os animais recebiam a injeção intraperitoneal de zolantidina ou salina e cinco minutos após eram confinados por uma hora em uma área correspondente a 8% do total do aquário, delimitada por uma barreira plástica. Uma hora após o confinamento, os animais eram submetidos ao procedimento de treino tal como descrito acima. Os grupos experimentais estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos grupos experimentais.

<b>Condição Experimental</b>	<b>N</b>	<b>Droga</b>	<b>Dose</b>	<b>Peso</b>
Estresse ausente	16	Salina	-	0.45±0.02
Estresse ausente	19	Zolantidina	20 mg/kg	0.55±0.02
Estresse presente	18	Salina	-	0.49±0.03
Estresse presente	21	Zolantidina	20 mg/kg	0.54±0.02

Grupos experimentais, experimento, número de animais por grupos, droga e doses utilizadas, peso (média±E.P.M) dos animais nos diferentes grupos.

Foi realizada uma análise sanguínea de animais submetidos ao procedimento de estresse a fim de se verificar eficácia do confinamento como estressor e possíveis efeitos das drogas sobre a resposta ao estresse. Os animais foram decapitados e o sangue foi coletado em tiras de análise da glicose sanguínea Accu-Check Advantage II. A leitura da concentração sanguínea de glicose foi realizada utilizando-se o monitor Accu-Check Advantage (Roche Diagnostics, Alemanha). Animais submetidos à análise de glicose foram distribuídos nos grupos experimentais descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Descrição dos grupos de análise da glicose sanguínea.

<b>Estresse de Confinamento</b>	<b>Droga</b>	<b>Dose</b>	<b>Dia de análise</b>	<b>n</b>
Não	-	-	Dia 1	6
Sim	Salina	-	Dia 1	10
Sim	Zolantidina	20 mg/kg	Dia 1	8
Não	-	-	Dia 5	7
Sim	Salina	-	Dia 5	13
Sim	Zolantidina	20 mg/kg	Dia 5	8

## **Animais**

Oitenta e sete paulistinhas de sexo indeterminado foram utilizados. O intervalo mínimo de uma semana de aclimatização foi permitido entre a compra dos peixes e início dos experimentos. Os animais foram colocados em aquários de 30 L (30 animais por aquário), temperatura da água entre 18-22°C com filtragem e aeração constante, ciclo natural de luz e alimentados cinco vezes por semana com ração em flocos (Wardly Corporation, NJ, USA).

Os experimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociência Comportamento (SBNeC), baseadas no Guia de cuidados e uso de animais de laboratório do US National Institutes of Health (US National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animais).

## **Aquário experimental**

Os aquários utilizados neste experimento possuíam 25 cm de comprimento, 11,5 cm de largura e 15 cm de altura e a água recebia aeração constante. A seis centímetros de um dos lados do aquário havia uma barreira plástica transparente, delimitando a área

de alimentação. Dentro desta área havia um cilindro plástico transparente, onde a comida era oferecida durante os experimentos.

## **Drogas**

A droga usada em ambos os experimentos deste trabalho foi o antagonista do receptor  $H_2$  zolantidina (ZOL) (Sigma, USA) dissolvida em solução salina na concentração de 10 mg/ml. A droga foi administrada intraperitonealmente em um volume de injeção de 2 ml/kg de peso corporal. Esta dose foi escolhida com base em experimento prévio deste laboratório (COFIEL e MATTIOLI, 2006).

Solução salina foi utilizada como controle. Droga e controle foram colocados em recipientes codificados sob refrigeração. O código não era conhecido pelo experimentador no momento dos testes.

A administração da droga foi realizada intraperitonealmente, utilizando-se uma seringa de 5  $\mu$ l (Hamilton, model 7105KH).

## ***Análise estatística***

Todos os resultados descritos estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Teste de Levene indicou que dados de ambos os experimentos não apresentavam homogeneidade e, portanto, a análise foi feita utilizando-se o teste não paramétrico de Friedman.  $P < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. Uma vez que os dados do experimento de análise de glicose eram homogêneos, o teste paramétrico Anova de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Student Newman Keuls foi utilizado.

## Resultados

Os animais tratados após o treino com salina (SAL, Figura 5A) e zolantidina (ZOL, figura 5B) apresentaram uma diminuição significativa das latências de entrada na área de alimentação (SAL: Friedman,  $P < 0,0001$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=27,23$ ; ZOL: Friedman,  $P=0,0314$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=10,6$ ).

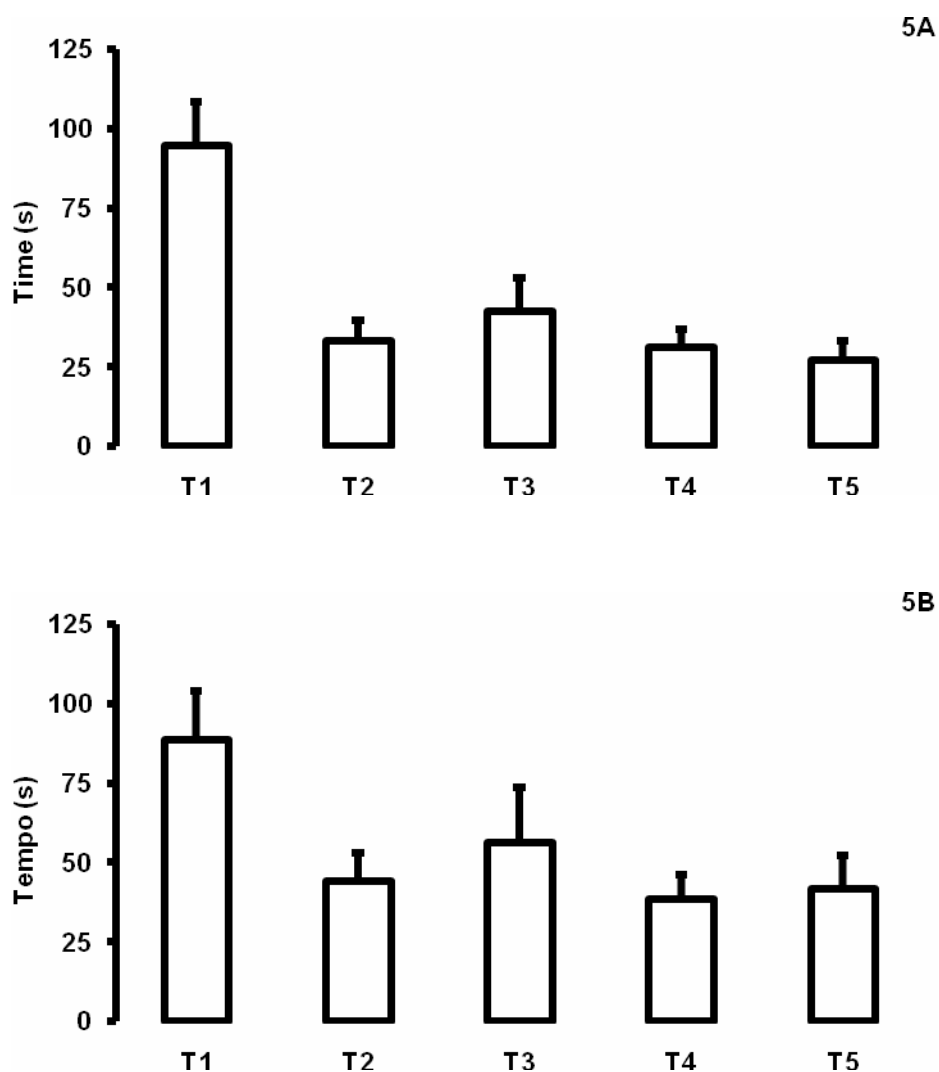


Figura 5. Média ( $\pm$  E.P.M) das latências de entrada na área de alimentação de animais não estressados tratados com salina (SAL, 5A;  $P < 0,0001$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=27,23$ ) ou zolantidina (ZOL, 5B, Friedman;  $P=0,0314$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=10,6$ ) antes do treino nos 5 dias de experimento (T1, T2, T3, T4 e T5).

Os animais submetidos ao procedimento de estresse tratados com salina (Friedman,  $P=0,0002$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=22,2111$ ), apresentaram uma diminuição nas latências de entrada na área de alimentação (figura 6A). Os animais que receberam zolantidina não apresentaram uma diminuição nas latências de entrada na área de alimentação (Friedman,  $P=0,7533$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=1,9048$ ) (figura 6B), indicando inibição da aprendizagem.

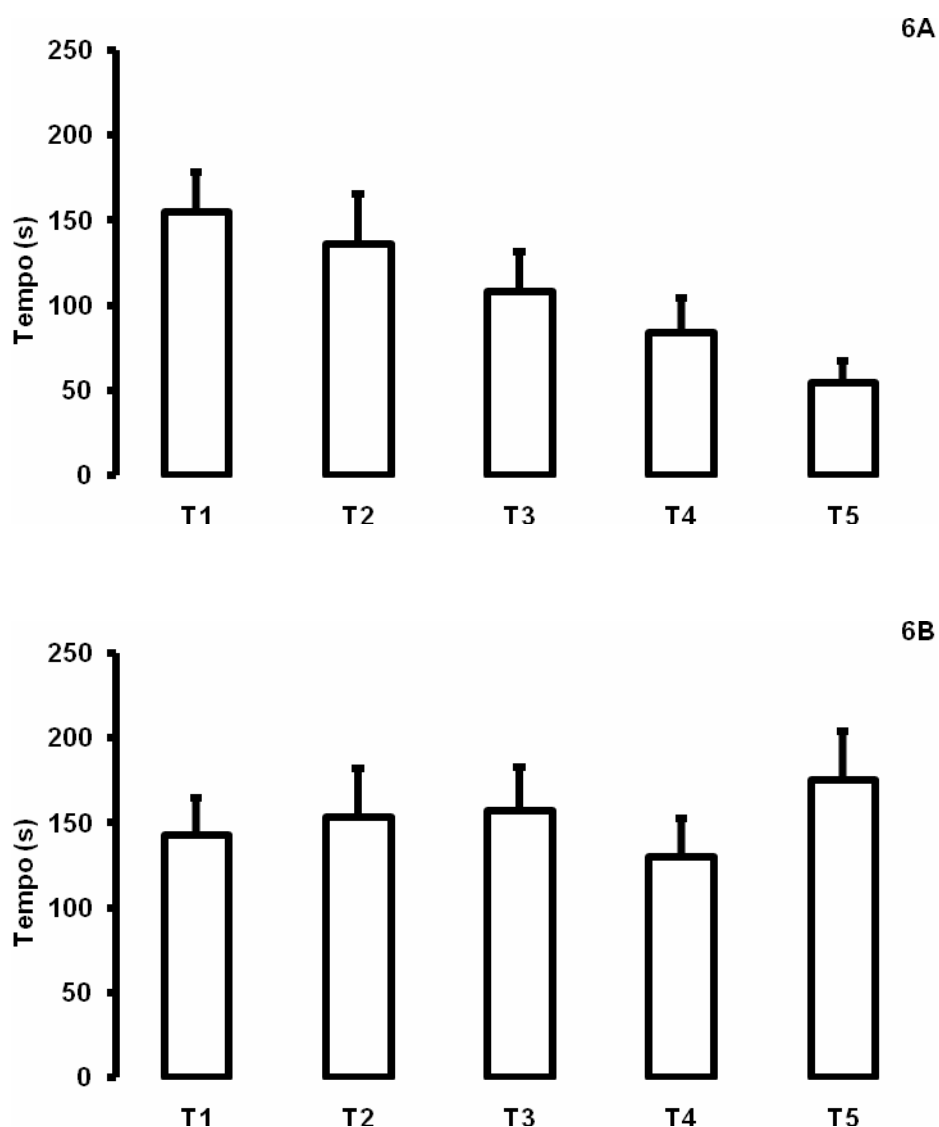


Figura 6. Média ( $\pm$  E.P.M) das latências de entrada na área de alimentação de animais estressados e tratados com salina (2A, Friedman,  $P=0,0002$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=22,2111$ ) ou zolantidina 20 mg/kg (2B, Friedman,  $P=0,7533$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=1,9048$ ) nos 5 dias de treino (T1, T2, T3, T4 e T5).

O teste Anova de duas vias indicou diferença na concentração de glicose sanguínea dos animais tratados com salina e zolantidina ( $P=0,0025$ ,  $DF=6$ ,  $F=3,95162$ ), entre os dias de análise ( $P=0,0024$ ,  $DF=1$ ,  $F=9,99836$ ) e interação entre fatores ( $P<0,01$ ,  $DF=6$ ,  $F=7,27104$ ) (Tabela 3). O teste de Student Newman Keuls indicou que os animais submetidos ao procedimento de estresse e tratados com salina e tratados com zolantidina apresentaram concentração de glicose sanguínea mais elevada no primeiro e quinto dia de experimento comparado aos animais controle que não foram submetidos ao estresse e não receberam tratamento farmacológico.

Tabela 3. Concentração de glicose sanguínea.

<b>Grupo</b>	<b>Glicose sanguínea (mg/dl)</b>
Controle - Dia 1	53 ± 3.5
Salina - Dia 1	122,6±11,54*
Zolantidina - Dia 1	113,13±13.22*
Controle – Dia 5	52±8,47
Salina - Dia 5	143,38±16,98*
Zolantidina - Dia 5	104,50±8,37*

Média ( $\pm$  E.P.M.) da concentração de glicose sanguínea de animais selecionados do experimento 2, submetidos a uma ou cinco sessões de estresse de confinamento, tratados com salina ou zolantidina 20 mg/kg. Dados foram analisados utilizando-se o teste de Anova de duas vias e o teste de comparações múltiplas de Student Newman Keuls. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle do mesmo dia de análise.

## **Discussão**

O sistema histaminérgico tem sido implicado em diferentes funções cerebrais, incluindo a aprendizagem, memória e resposta ao estresse. Uma vez que o estresse pode interferir no processo de aprendizagem, o objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre ambos os processos e o receptor  $H_2$  histaminérgico em paulistinhas.

A aprendizagem em paulistinhas foi relatada em diferentes modelos experimentais (BILOTTA et al., 2005; XU et al., 2007; COLWILL et al., 2005). Os animais submetidos ao procedimento de aprendizagem que receberam salina e zolantidina apresentaram diminuição das latências de entrada na área de alimentação, indicando que os animais foram capazes de aprender a tarefa. Este modelo experimental já foi utilizado em estudos prévios deste laboratório e se mostrou apropriado para o estudo do processo de aprendizagem em zebrafish (COFIEL & MATTIOLI, submetido).

No segundo experimento, os animais foram submetidos ao estresse de confinamento antes do condicionamento de aprendizagem. Os animais tratados com salina foram capazes de aprender a tarefa, porém observou-se que as latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados apresentam certo atraso em comparação às latências dos animais não-estressados. Trabalho prévio deste laboratório também indicou que este procedimento de estresse inibiu a aprendizagem (COFIEL e MATTIOLI, submetido). Outros trabalhos já mostraram que diferentes tipos de estresse são capazes de atrasar ou impedir a aprendizagem. Exposição ao estresse crônico leve impediu a memória no teste de reconhecimento de novo objeto em camundongos (ELIZALDE et al., 2008) e o estresse agudo e crônico teve um efeito deletério na aprendizagem de reconhecimento em ratos (MELLO et al., 2008). Enquanto o estresse retardou a aprendizagem nos peixes tratados com salina, em animais tratados com zolantidina, a aprendizagem foi bloqueada. Este efeito deletério pode indicar um envolvimento do sistema histaminérgico através deste subtipo de receptor nos processos de aprendizagem em situação de estresse.

Apesar de nossos resultados não terem indicado um envolvimento do receptor H<sub>2</sub> na aprendizagem em paulistinhas não submetidos ao estresse, alguns estudos já



mostraram que esse receptor pode exercer um papel importante nos processos de aprendizagem. Em peixes dourados, o antagonista do receptor H<sub>2</sub> zolantidina impediu a aprendizagem de esquiva inibitória (COFIEL e MATTIOLI, 2006) e a ranitidina, outro antagonista H<sub>2</sub>, bloqueou completamente o efeito facilitador na esquiva inibitória, após injeção de histamina na região CA1 do hipocampo de ratos (DA SILVA et al., 2006). Tanto o procedimento de esquiva ativa, como o de esquiva inibitória envolve certo grau de estresse para os animais. No presente trabalho, a zolantidina apenas teve efeito na aprendizagem de animais submetidos ao estresse. Assim, é possível que este subtipo de receptor esteja mais relacionado à aprendizagem onde exista algum fator estressor envolvido.

Após um evento estressante, um aumento rápido nas catecolaminas plasmáticas é observado, indicando um alarme não específico ou ativação da resposta, levando a uma rápida mobilização dos substratos energéticos e aumento do consumo e transferência de oxigênio. O aumento no cortisol circulante se segue mais lentamente e de forma mantida, facilitando ou moderando os efeitos das catecolaminas (BONGA, 1997).

Neste trabalho, observamos a concentração de glicose sanguínea como um indicativo do estresse. Esta análise indicou que uma sessão de estresse de confinamento foi capaz de aumentar o nível de glicose de animais submetidos ao estresse de confinamento, e, portanto provando a eficiência deste procedimento experimental. Barcellos et al. (1999) observaram que a exposição de Tilapia do Nilo a um estresse agudo resultou no aumento do nível de glicose plasmática e a exposição do peixe a um estresse crônico aumentou o nível de cortisol plasmático.

No presente trabalho, o pré-tratamento com zolantidina não teve efeito sobre a concentração de glicose plasmática. Animais que receberam esta droga apresentaram

aumento da concentração de glicose tal como observado nos animais que receberam salina, indicando que a histamina não está envolvida nas respostas ao estresse através do receptor H<sub>2</sub> em paulistinha. No entanto, outros estudos já mostraram o envolvimento do sistema histaminérgico através deste receptor na resposta ao estresse.

Miklós e Kováks (2003) observaram que neurônios histaminérgicos se tornam ativados durante o estresse de restrição. Estes autores sugeriram que, através da projeção para o núcleo hipotalâmico paraventricular (PVH) e/ou para a eminência média, eles podem contribuir para a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical (HPA).

Já foi observado que o bloqueio do receptor H<sub>2</sub> inibiu o aumento de corticosterona em resposta ao estresse causado pela histamina e pelos agonistas H<sub>2</sub> 4-metilhistamina e dimaprit (BUGAJSKI e GADEK, 1983). O antagonista H<sub>2</sub> ranitidina suprimiu o aumento da secreção de noradrenalina induzida pelo estresse, enquanto o antagonista H<sub>1</sub> triprolidina não alterou a resposta secretória, indicando que os neurônios centrais histaminérgicos, através da ativação do receptor H<sub>2</sub>, estejam envolvidos na resposta secretória de noradrenalina ao estresse de imobilização (KUZMIN et al., 1999). Deste modo, novos estudos devem ser feitos a fim de se observar o envolvimento deste receptor na resposta ao estresse em paulistinha.

Nossos dados confirmam uma ação facilitatória da histamina nos processos de aprendizagem, sugerindo o envolvimento dos receptores H<sub>2</sub> na aprendizagem de paulistinha em situação de estresse.

## **ESTUDO III - L-histidina facilita a aprendizagem em paulistinhas estressados e não estressados**

### **Resumo**

O sistema neuroreceptor histaminérgico é um dos maiores sistemas aminérgicos exercendo funções neurológicas chave como aprendizagem e estresse através dos receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do precursor histaminérgico l-histidina e do antagonista do receptor H<sub>3</sub> tioperamida nos processos de aprendizagem de paulistinhas submetidos ou não ao estresse de confinamento. O experimento foi realizado em 5 dias consecutivos (T1, T2, T3, T4 e T5), sob duas condições experimentais: na presença e na ausência de estresse. Os animais deveriam associar a interrupção no fornecimento de ar com a oferta de comida. Os peixes não-estressados receberam injeção intraperitoneal de l-histidina na dose de 100 mg/kg, tioperamida na dose de 10 mg/kg ou salina após as sessões de treino. Animais estressados receberam uma das drogas ou salina e então eram submetidos a uma sessão de estresse de confinamento de 1 hora de duração antes de serem submetidos ao procedimento de aprendizagem. Tempo de aproximação ao comedouro foi medido (em segundos) e foi considerado como indicativo de aprendizagem. Uma diminuição no tempo de entrada na área de alimentação foi observado no grupo salina (T1:141.92±13.57; T3:55±13.54), indicando aprendizagem. Animais estressados tratados com salina aprenderam a tarefa apesar do estresse, entretanto um atraso da aprendizagem foi observado (T1:217.5±25.66). A l-histidina facilitou a aprendizagem em animais estressados (T1:118.68±13.9; T2:45.88±8.2) e não estressados (T1:151.11±19.20; T5:62±14.68), enquanto que o tratamento com tioperamida inibiu a aprendizagem em animais não estressados (T1:110.38±9.49; T4:58.79±16.83) e estressados (T1:167.3±26,39; T5:172.15±27.35). Análise da glicose sanguínea foi realizada a fim de se observar uma possível resposta ao estresse de confinamento. A l-histidina preveniu o aumento de concentração de glicose após uma sessão de estresse de confinamento (l-histidina:65.88mg/dl±4.50; controle:53mg/dl±3.50). Em resumo, os presentes resultados mostraram que o sistema histaminérgico facilita a aprendizagem e modulam as respostas ao estresse em zebrafish.

## **Introdução**

Neurônios histaminérgicos são encontrados no hipotálamo caudal, enviando axônios que inervam a maior parte do sistema nervoso central. Foi demonstrado que os vertebrados possuem um sistema histaminérgico bem conservado (PANULA et al., 1984; AIRAKSINEN et al., 1989; AIRAKSINEN e PANULA, 1990; PANULA et al., 1984).

Nos peixes da espécie *Danio rerio* (paulistinhas), todos os neurônios histaminérgicos estão concentrados nas proximidades do recesso posterior do hipotálamo. A morfologia, armazenamento intracelular, padrões de distribuição e projeção cerebrais parecem ser altamente conservados através da evolução, ou ao menos entre teleósteos e mamíferos (KASLIN e PANULA, 2001).

O sistema histaminérgico está envolvido em diferentes processos fisiológicos e comportamentais, como ciclo sono-vigília, controle de apetite, aprendizagem, memória e emoção (HAAS e PANULA, 2003).

O sistema de estresse coordena as respostas adaptativas do organismo à estressores de diferentes tipos. A ativação do sistema de estresse leva a alterações comportamentais e periféricas que aumentam a capacidade do organismo a ajustar a homeostasia e aumentar as chances de sobrevivência (TSIGOS e CHROUSOS, 2002). Uma das primeiras alterações fisiológicas é a secreção de glicocorticóides e catecolaminas. Estes hormônios são responsáveis pela mobilização de energia que será utilizada no restabelecimento da homeostasia (CHROUSOS e GOLD, 1992).

A resposta ao estresse em teleósteos apresenta similaridades às dos vertebrados terrestres, incluindo função, com elevado consumo e transferência de oxigênio,

mobilização de substratos energéticos, diminuição do uso de energia para o crescimento e reprodução e supressão de funções imunes (BONGA, 1997). Peixes respondem aos estressores com a liberação de glicocorticóides e catecolaminas e com o aumento da liberação de glicose (VIJAYAN et al., 1997), portanto a glicose sanguínea pode ser útil para indicar estresse em peixes.

Diferentes estudos mostraram que a manipulação do sistema central histaminérgico resulta na modificação do comportamento animal em diferentes paradigmas de aprendizagem, entretanto os resultados são contraditórios (DE ALMEIDA e IZQUIERDO, 1986; MIYAZAKI et al., 1997; EIDI et al, 2003).

Evidências sugerem que existe uma relação entre prejuízo de aprendizagem e estresse. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do precursor histaminérgico l-histidina e do antagonista do receptor H<sub>3</sub> tioperamida no processo de aprendizagem de paulistinhas submetidos e não submetidos ao estresse de confinamento.

Os experimentos realizados neste estudo estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), baseadas nas Normas de Uso e Cuidado de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano (US National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals).

## ***Metodologia***

### **Procedimentos**

O experimento foi realizado em cinco dias consecutivos (treino 1, 2, 3, 4 e 5), um peixe por vez, em duas condições experimentais distintas: na presença e na ausência de estresse. Na primeira condição experimental, a bomba de ar era desligada e após 30

segundos a comida era oferecida no comedouro. Animais que não comeram no primeiro treino foram excluídos (18 animais). O tempo que o peixe levava para entrar na área de alimentação após o momento em que o fornecimento de ar era desligado foi registrado em segundos e considerado como indicativo de aprendizagem. Os animais receberam o tratamento farmacológico ou salina 5 minutos após cada sessão de treino.

No segunda condição experimental (sob estresse), os animais recebiam a injeção com uma das drogas ou salina e cinco minutos após eram confinados por uma hora em uma área correspondente a 8% do total do aquário, delimitada por uma barreira plástica. Uma hora após o confinamento, os animais eram submetidos ao procedimento de treino tal como descrito acima. Os animais foram distribuídos em grupos experimentais descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Descrição dos grupos experimentais.

Experimento	N	Droga	Dose	Peso
1	26	Salina	-	0,45±0,03
1	25	LH	100 mg/kg	0,49±0,03
1	24	TIO	10 mg/kg	0,44±0,03
2	18	Salina	-	0,54±0,03
2	18	LH	100 mg/kg	0,48±0,05
2	22	TIO	10 mg/kg	0,43±0,03

LH:l-histidina; TIO:tioperamida.

Foi realizada uma análise sanguínea de animais submetidos ao procedimento de estresse a fim de se verificar eficácia do confinamento como estressor e possíveis efeitos das drogas sobre a resposta ao estresse. Os animais foram decapitados e o sangue foi coletado em tiras de análise da glicose sanguínea Accu-Check Advantage II. A leitura da concentração sanguínea de glicose foi realizada utilizando-se o monitor Accu-Check Advantage (Roche Diagnostics, Alemanha). Descrição dos grupos de animais submetidos a esta análise se encontra na Tabela 5.

Table 5. Descrição dos grupos nos quais a análise de glicose sanguínea foi realizada.

<b>Estresse de Confinamento</b>	<b>Droga</b>	<b>Dose</b>	<b>Dia da análise</b>	<b>n</b>
Não	-	-	Dia 1	6
Não	-	-	Dia 5	7
Sim	Salina	-	Dia 1	10
Sim	Salina	-	Dia 5	13
Sim	L-histidina	100 mg/kg	Dia 1	8
Sim	L-histidina	100 mg/kg	Dia 5	10
Sim	Tioperamida	10 mg/kg	Dia 1	9
Sim	Tioperamida	10 mg/kg	Dia 5	10

### **Animais**

Cento e trinta e três paulistinhas de sexo desconhecido foram utilizados. Um intervalo mínimo de uma semana de aclimatização foi respeitado entre a compra dos peixes e início do experimento. Os animais foram colocados em aquários de 30L (30 animais por aquário), a 18-22°C com aeração e filtragem constantes, ciclo natural de luz e alimentados cinco vezes por semana com comida em flocos (Wardly Corporation, NJ, USA).

### **Aquário experimental**

Os aquários usados neste experimento possuíam 25 cm de comprimento, 11,5 cm de largura e 15 cm de altura e a água era constantemente aerada. A seis centímetros de um dos lados do aquário uma barreira plástica transparente foi fixada, limitando a área de alimentação. Dentro desta área havia um cilindro plástico transparente, onde a comida era oferecida durante os experimentos.

### **Drogas**

As drogas utilizadas em ambos os experimentos deste trabalho foram o precursor histaminérgico l-histidina (LH) dissolvida em solução salina na concentração de 50 mg/ml e o antagonista do receptor H<sub>3</sub>, tioperamida (TIO) (Sigma, USA) dissolvido em solução salina na concentração de 5 mg/ml. As drogas foram administradas intraperitonealmente em um volume de injeção de 2 ml/kg de peso corporal, utilizando-se uma seringa de 10 µl (Hamilton, modelo 7105KH). Estas doses foram escolhidas com base em experimentos prévios (COFIEL e MATTIOLI, 2006; KOMATER et al., 2005; MATTIOLI et al., 1998).

Salina foi utilizada como controle. Ambas as drogas e veículo foram colocadas sob refrigeração em tubos eppendorf codificados. O experimentador desconhecia a codificação no momento dos testes.

### ***Análise estatística***

Todos os resultados estão expressos em média  $\pm$ erro padrão da média (EPM). Dados de ambos os experimentos possuíam distribuição não homogênea e não eram aderentes à curva normal, portanto foram analisados utilizando-se o teste não paramétrico de Friedman seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, quando apropriado. Com o intuito de se verificar se o confinamento afetou a aprendizagem dos animais, uma comparação entre as latências de entrada na área de aproximação dos animais tratados com salina nos experimentos 1 e 2 foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney.  $P < 0,05$  foi considerado como sendo estatisticamente significativo. Uma vez que os dados da análise da glicose eram homogêneos, estes foram analisados utilizando-se o teste paramétrico Anova de duas vias seguido pelo teste de comparações múltiplas de Student Newman Keuls.



## **Resultados**

Dados referentes aos animais não estressados estão representados na figura 7. Animais tratados após o treino com salina apresentaram uma diminuição significativa das latências de entrada na área de aproximação após o terceiro dia (Friedman,  $P < 0,0001$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=35,752$ ; Dunn,  $P < 0,05$ ). Animais que receberam tioperamida apresentaram uma diminuição significativa das latências de entrada após o dia 4 (Friedman,  $P < 0,0001$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=30,025$ ; Dunn,  $P < 0,05$ ), enquanto o grupo tratado com l-histidina apresentou uma diminuição significativa das latências de entrada na área de alimentação após o dia 2 (Friedman,  $P < 0,0001$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=30,744$ ; Dunn,  $P < 0,05$ ).

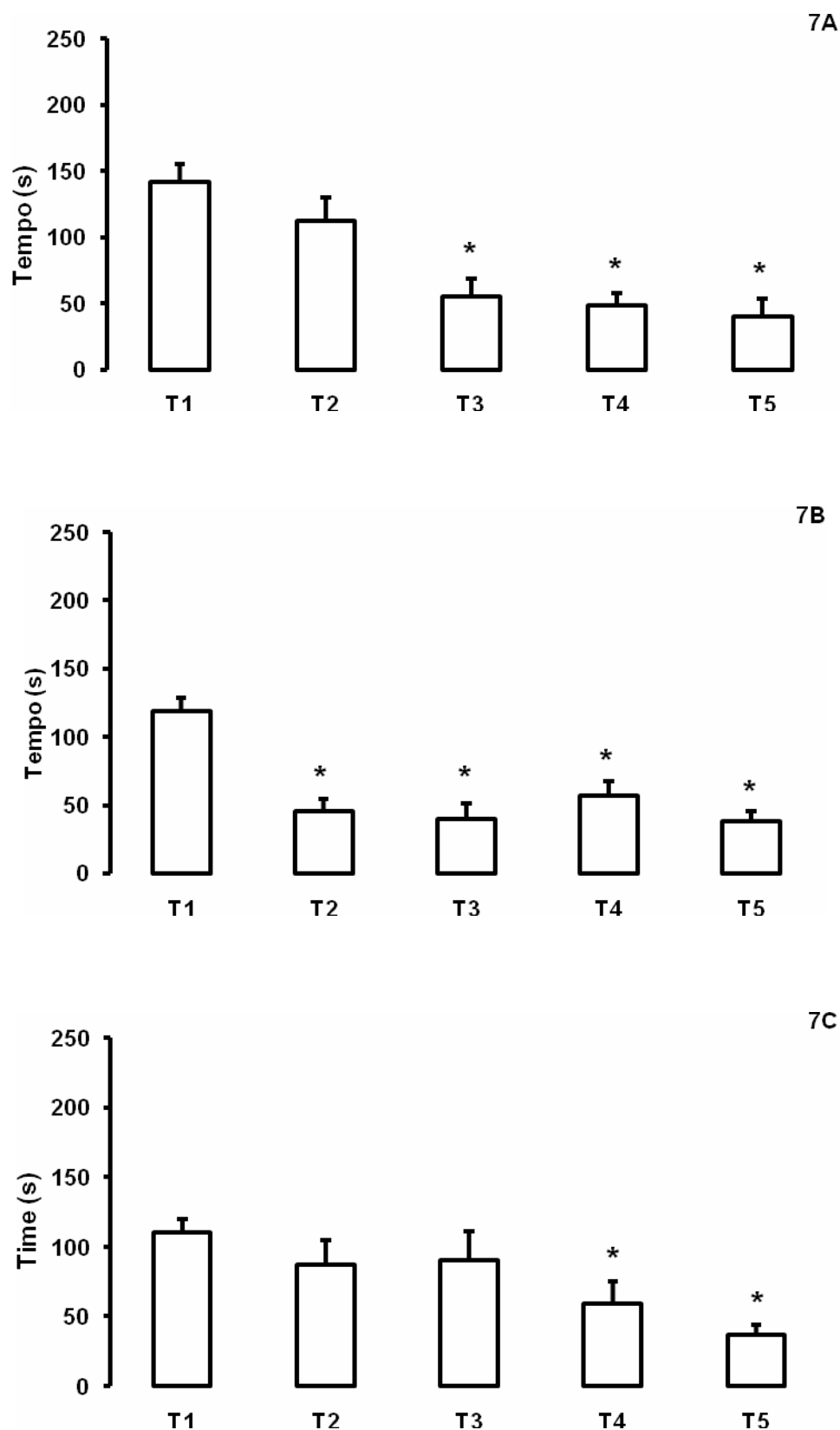


Figura 7. Média ( $\pm$  E.P.M) das latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com salina (7A, Friedman,  $P < 0,0001$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=35,752$ ), l-histidina (7B, Friedman,  $P < 0,0001$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=30,744$ ) e tioperamida (7C, Friedman,  $P < 0,0001$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=30,025$ ) nos 5 dias de treino (T1, T2, T3, T4 e T5). Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação a T1 (Dunn,  $P < 0.05$ ).

Dados referentes aos animais submetidos ao estresse de confinamento estão representados na figura 8. Animais submetidos ao procedimento de estresse tratados com salina apresentaram diminuição nas latências de entrada (Friedman,  $P=0,0482$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=9,5778$ ), entretanto, o teste de comparações múltiplas de Dunn não indicou diferenças entre os dias de treino. Animais tratados com l-histidina apresentaram diminuição significativa das latências de aproximação, com diferença estatística entre os dias 1 e 5 (Friedman,  $P=0,0012$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=17,9889$ ; Dunn,  $P<0,05$ ). Animais que receberam tioperamida não apresentaram diminuição na latência de entrada na área de alimentação como observado nos animais tratados com salina e l-histidina (Friedman,  $P=0,6172$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=2,6545$ ).

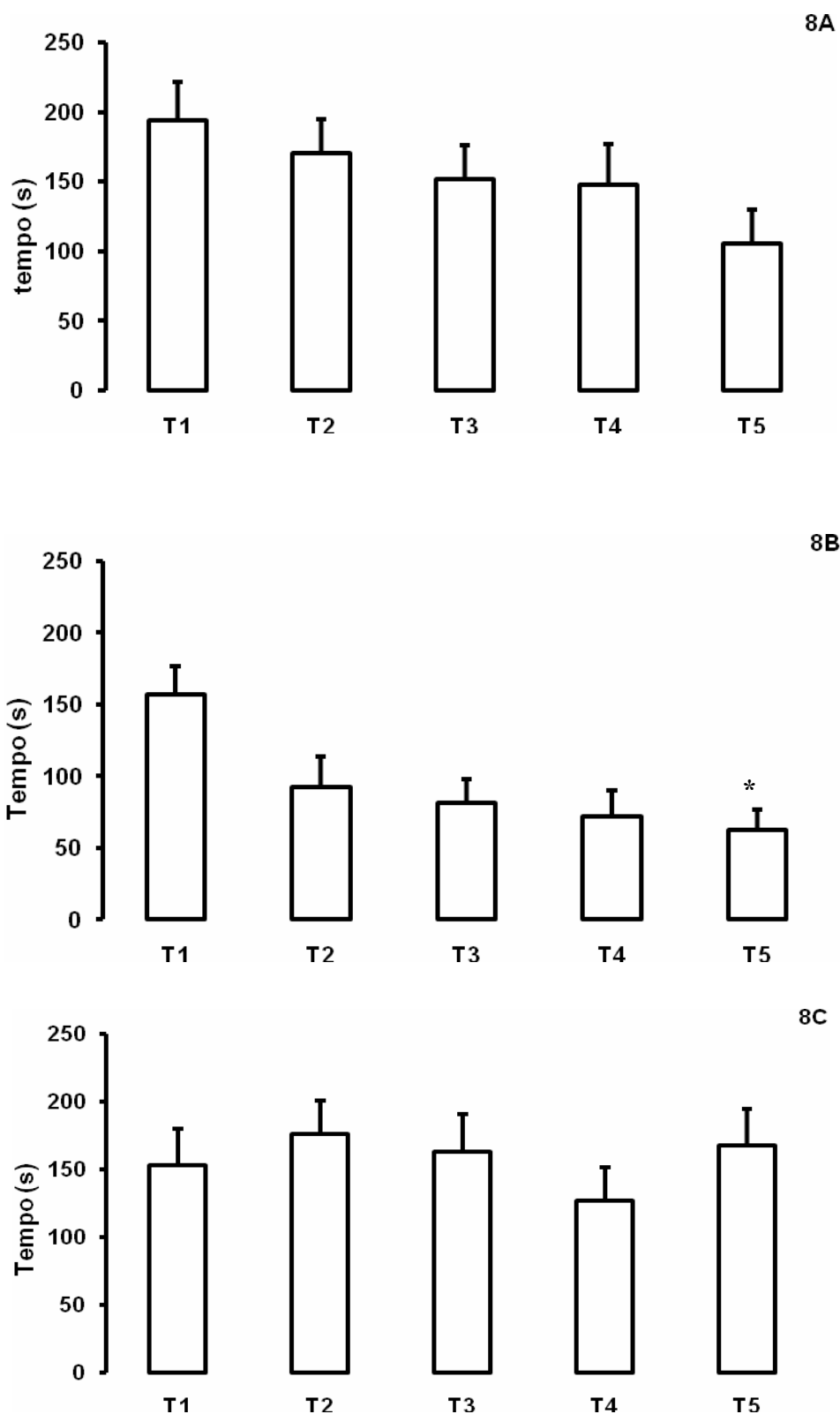


Figura 8. Média ( $\pm$  E.P.M) das latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com salina (2A,  $P=0,0482$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=9,5778$ ), l-histidina (2B, Friedman,  $P=0,0012$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=17,9889$ ) e tioperamida (3B, Friedman,  $P=0,6172$ ,  $DF=4$ ,  $\chi^2=2,6545$ ) nos 5 dias de treino (T1, T2, T3, T4 e T5). Dados foram analisados utilizando-se o teste de Friedman seguido do teste de Dunn quando apropriado. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação a T1 ( $P < 0,05$ ).

O teste U de Mann-Whitney indicou que os animais do experimento 1 apresentaram latência de entrada na área de alimentação no primeiro dia de treino (T1:  $141,92 \pm 13,57$ ) estatisticamente menor que animais submetidos ao estresse no primeiro dia de treino (T1:  $217,5 \pm 25,66$ ; Mann-Whitney;  $P=0,02$ ).

O teste Anova de duas vias indicou diferença entre os diferentes grupos ( $P=0,0083$ ,  $GL=41$ ,  $F=4,52$ ), dias de tratamento ( $P<0,0001$ ,  $GL=1$ ,  $F=25,72$ ) e interação entre fatores ( $P<0,0001$ ,  $GL=3$ ,  $F=12,7704$ ). O teste de Student Newman Keuls indicou que os animais submetidos ao procedimento de estresse e tratados com salina apresentaram maior nível de glicose sanguínea comparado aos animais controle que não foram submetidos ao estresse e não receberam tratamento farmacológico. O nível de glicose sanguínea de animais que receberam tioperamida era mais alto que o grupo controle, enquanto animais estressados que receberam tioperamida apresentaram um nível similar ao grupo controle (Figura 9).

Após cinco dias de exposição ao estresse, animais tratados com salina, l-histidina e tioperamida apresentaram maior nível de glicose sanguínea quando comparados ao grupo controle.

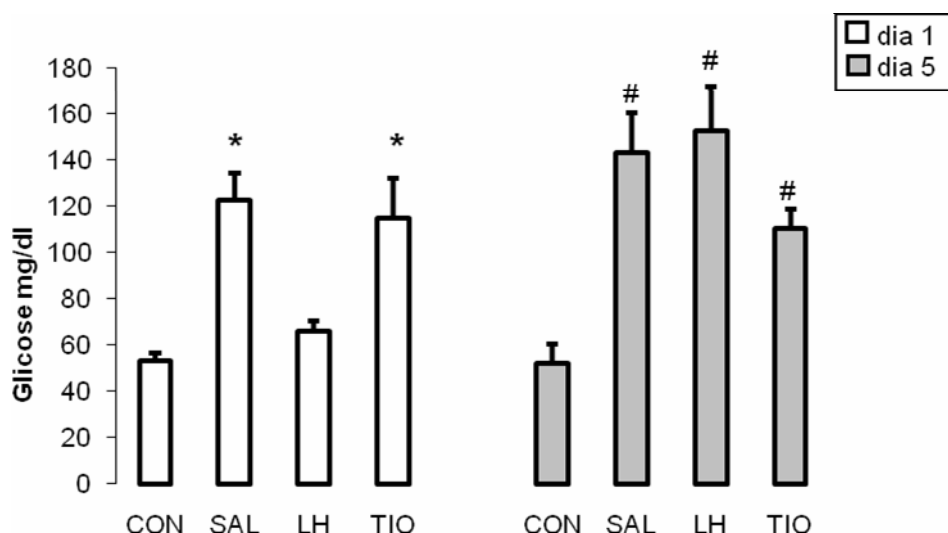


Figura 9. Média ( $\pm$  E.P.M) da concentração de glicose sanguínea de animais pré-tratados com salina (SAL), l-histidina (LH), tioperamida (TIO) submetidos a um (dia 1) ou cinco sessões de estresse de confinamento (dia 5). Animais não submetidos ao estresse de confinamento (NT) que não receberam tratamento farmacológico foram utilizados para controle da glicose sanguínea após 1 e 5 dias de experimento. Dados foram analisados utilizando o teste de Anova de duas vias e o pos-hoc de Student Newman Keuls . \* indica diferença estatisticamente significativa em relação a NT-D1 e # indica diferença estatisticamente significativa em relação a NT-D5 ( $P < 0.05$ ).

## Discussão

Peixes têm sido utilizados em estudos de aprendizagem e memória por muitos anos (COFIEL & MATTIOLI, 2006; DEWSBURY & BERNSTEIN, 1969; LIU & Braud, 1974; FAGANELLO & MATTIOLI, 2007). O paulistinha ganhou atenção por ser útil em estudos genéticos, pelo seu rápido ciclo de vida, fácil manuseio e manipulação genética (GUO, 2004). Recentemente, estes animais vêm sendo utilizados em estudos comportamentais (PEITSARO et al., 2003; ENGESZER, 2004).

Neste estudo, animais submetidos ao procedimento de aprendizagem que receberam salina apresentaram diminuição nas latências de entrada após o quarto dia de treino, indicando que os animais foram capazes de aprender a tarefa.

Os animais tratados com l-histidina apresentaram uma diminuição das latências e foram capazes de aprender a tarefa após o segundo dia de treino, indicando facilitação

da aprendizagem por esta droga. Tanto a injeção intracerebroventricular como a intraperitoneal de histamina e a injeção de histidina apresentaram efeito proativo contra os déficits de memória induzidos pela lesão do núcleo basal em ratos (CHEN e SHEN, 2002). Em peixes dourados, a l-histidina apresentou um efeito facilitador na aprendizagem apetitiva (MEDALHA e MATTIOLI, 2007) bem como um efeito reforçador (COELHO et al., 2001). Comumente, drogas com propriedades reforçadoras melhoram a consolidação da memória, uma vez que uma substância reforçadora usada durante o período de consolidação da memória de curto prazo poderia prolongá-la e, portanto, facilitar a memória de longo prazo (HUSTON e OITZL, 1989).

Em paulistinhas, a injeção do inibidor de histidina descarboxilase,  $\alpha$ -fluorometilhistidina, aumentou significativamente o tempo para encontrar o tanque alvo em um labirinto em T, sugerindo que a diminuição de histamina pode prejudicar a memória de longo prazo (PEITSARO et al., 2003). A l-histidina é um precursor histaminérgico que aumenta o nível cerebral de histamina. Portanto, a facilitação da memória observada no grupo tratado com esta droga pode ser resultante de um aumento no nível cerebral de histamina após a administração de l-histidina.

Animais tratados com tioperamida puderam aprender apenas após o quarto dia de treino, indicando um efeito inibidor na aprendizagem da tarefa. Uma vez que a tioperamida é um antagonista do receptor  $H_3$  que aumenta a histamina cerebral (ARRANG et al., 1987; HILL, 1990), um efeito facilitador desta droga era esperado, como observado no grupo tratado com l-histidina.

Muitos estudos indicaram que o bloqueio do receptor  $H_3$  por antagonistas seletivos melhoram a cognição em diferentes modelos de aprendizagem em camundongos e ratos, como a tarefa de esquiva inibitória de uma tentativa

(BERNAERTS et al., 2004), teste de reconhecimento de lugar de duas tentativas (ORSETTI et al., 2001) e aprendizagem espacial (KOMATER et al., 2005).

Além de ser um auto-receptor histaminérgico, os receptores H<sub>3</sub> também funcionam como heteroreceptor pré-sináptico controlando a liberação de serotonina (FINK et al., 1990), acetilcolina (CLAPHAM e KILPATRICK, 1992) e outros neurotransmissores (SCHLICKER et al., 1993; SCHLICKER et al., 1994). Portanto a ação da tioperamida sobre outros sistemas neurotransmissores, poderia ser responsável pelos resultados contraditórios observados no presente estudo.

Foi demonstrado que antagonistas histaminérgicos H<sub>3</sub> (ciproxifan, clobenpropite e tioperamida), diretamente administrados na amígdala basolateral, diminuíram a liberação espontânea de acetilcolina, um efeito completamente antagonizado pela perfusão simultânea do antagonista H<sub>2</sub> cimetidina. Em adição, ratos que receberam injeções bilaterais intra-amígdala basolateral de antagonistas H<sub>3</sub> em doses similares às que inibiram a liberação espontânea de acetilcolina imediatamente após o condicionamento de medo ao contexto, levaram ao bloqueio da consolidação da memória (PASSANI et al., 2001).

Uma possível inibição da liberação de acetilcolina resultante do tratamento com tioperamida poderia ser responsável pelo déficit de aprendizagem no grupo que recebeu esta droga. Um papel inibidor desta droga também foi observado no processo de recuperação funcional em peixes dourados (PIRATELLO e MATTIOLI, 2007), sendo que os mecanismos de aprendizagem, memória e reforço são similares em aspectos neuroquímicos e morfológicos a alguns de processos de recuperação funcional (COTMAN e LYNCH, 1989; COTMAN et al., 1981).



Evidências sugerem que existe uma relação entre prejuízo de aprendizagem e estresse (ELIZALDE et al., 2008), e que a histamina cerebral esteja relacionada com ambos os processos (HAAS e PANULA, 2003; BROWN et al., 2001). No segundo experimento, os animais foram submetidos ao estresse de confinamento antes de serem submetidos ao procedimento de aprendizagem.

Animais estressados tratados com salina foram capazes de aprender a tarefa, uma vez que as latências de entrada na área de alimentação desses animais diminuíram ao longo das sessões de treino. No entanto, o estresse de confinamento, somado ao estresse do procedimento de injeção foi capaz de atrasar a aprendizagem da tarefa, uma vez que animais submetidos ao estresse apresentaram latências mais altas para entrar na área de alimentação que animais não estressados e não injetados.

Diferentes trabalhos já mostraram que diferentes tipos de estresse são capazes de retardar ou impedir a aprendizagem. Exposição ao estresse crônico leve impediu a consolidação da memória no teste de reconhecimento do novo objeto em camundongo (ELIZALDE et al., 2008). Prejuízo cognitivo induzido por estresse leve crônico em camundongo está relacionado com alterações específicas na homeostasia cerebral envolvendo sistemas neuroimunes e neuroendócrinos, bem como neurogênese (LI et al., 2008).

No presente trabalho, apesar da presença do estresse prejudicar a aprendizagem da tarefa, ele não impediu que ela ocorresse, uma vez que animais estressados que receberam salina foram capazes de aprender a tarefa.

Os animais estressados tratados com l-histidina apresentaram facilitação da aprendizagem, da mesma maneira observada no grupo não estressado que recebeu a mesma droga. Isto indica um efeito facilitador desta droga mesmo na presença de um

evento estressante. A l-histidina também atenuou a interrupção da memória induzida pelo estresse por imobilização (PAUL et al., 2002). Interessante notar que, ao passo que a l-histidina atenuou o prejuízo de aprendizagem causado pelo estresse, esta droga também diminuiu a liberação de glicose decorrente do estresse após uma sessão de confinamento. Este fato indica um efeito ansiolítico da histamina. No entanto, a diminuição da histamina cerebral em paulistinhas decorrente do tratamento com  $\alpha$ -flourometilhistamina teve efeito ansiolítico (PEITSARO et al., 2003). Assim, novos estudos devem ser feitos para se observar o papel da histamina nesta espécie.

Enquanto em animais não estressados a tioperamida retardou a aprendizagem, em animais estressados, ela impediu que esta ocorresse. É possível que uma diminuição da liberação de acetilcolina por esta droga, em adição ao prejuízo à memória pelo estresse pode ter resultado no bloqueio da aprendizagem observado neste grupo.

Em resumo, os resultados deste experimento mostram que o sistema histaminérgico facilita a aprendizagem e modula a resposta ao estresse em paulistinha.

## **ESTUDO IV – Papel do telencéfalo medial no condicionamento de medo ao contexto em peixes da espécie *Carassius auratus***

### **Resumo**

Neste estudo, foi desenvolvido um modelo experimental de medo ao contexto para peixes da espécie *Carassius auratus*. O experimento foi realizado em dois dias consecutivos. No primeiro foram realizadas duas sessões de treino de 15 minutos de duração separadas por intervalo de 2 horas. Os animais receberam 4 estímulos aversivos (descargas elétricas) em cada sessão. No segundo dia de experimento foi realizada uma sessão de teste, na qual o animal era colocado no aquário por cinco minutos sem que nenhuma descarga elétrica fosse liberada. Animais do grupo controle não receberam choque no dia de treino ou teste. Foi observada diferença significativa entre os grupos (Anova,  $p=0,0081$ ) dos animais intactos que receberam e que não receberam choque. O tempo de freezing dos animais que receberam descargas elétricas aumentou significativamente nos treinos em relação à linha de base. No teste, observou-se diferença significativa nos valores de freezing dos animais destes grupos, indicando que os animais de grupo choque se recordavam da experiência aversiva do dia anterior. Observou-se aumento significativo do tempo de permanência em freezing dos animais submetidos à ablação telencefálica total que não receberam choque (Anova de duas vias,  $p=0,0171$ ), em comparação aos animais intactos que não receberam choque, indicando que a lesão causou uma diminuição da atividade espontânea desses animais. Não foram observadas diferenças estatísticas no tempo de freezing entre os animais com ablação telencefálica total que receberam e dos que não receberam descargas elétricas (Anova de duas vias,  $p=0,2026$ ). Os animais com ablação medial do telencéfalo que não receberam choque não apresentaram aumento no tempo de freezing nos treinos em relação à linha de base, indicando que esta lesão não causou prejuízos à atividade locomotora. Não foram observadas diferenças estatísticas em LB, T1, T2 e T entre os animais com ablação do telencéfalo medial que receberam e os que não receberam choque (Mann-Whitney, LB:  $p=0,285$ ; T1:  $p=0,2991$ ; T2:  $p=0,5329$ , T,  $p=0,2556$ ), indicando que a região telencefálica medial está relacionada com o condicionamento de medo ao contexto. Este modelo experimental se mostrou útil para o estudo do medo ao contexto em *Carassius auratus*. A região telencefálica medial parece ser importante para este tipo de condicionamento.

## **Introdução**

Apesar da existência dos diferentes paradigmas de aprendizagem e respostas comportamentais que podem ser utilizadas para o estudo do medo e ansiedade, o “startle” (sobressalto) e o “freezing” (imobilidade) são respostas universais de medo observadas em humanos e também em inúmeras espécies de animais. Esses comportamentos podem ser facilmente condicionados à luz, sons e contextos, utilizando-se paradigmas de condicionamento clássico. Este tipo de condicionamento não é uma aprendizagem meramente associativa, já que envolve o processamento de representações de estímulos e previsões de respostas, possibilitando o estudo de circuitos neurais e processos envolvendo diferentes mecanismos cognitivos. Os comportamentos de freezing e startle também ocorrem em situações de medo incondicionado, e variações dessas respostas em diferentes espécies fazem parte do repertório de reações de defesa específicos de cada espécie (RESCORLA, 1988).

O freezing é uma das respostas primárias à situações de perigo corrente ou antecipatória (ROSEN e SCHULKIN, 1998). Em ratos, o freezing é o aumento da vigilância em resposta ao perigo ou ameaça que reduz a sua detecção por predadores e coloca seu corpo em posição de agachamento, permitindo que o animal responda rapidamente com luta ou fuga caso a situação se torne demasiadamente perigosa (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988 apud ROSEN, 2004). Em peixes, essa resposta foi descrita como imobilidade total do animal, havendo apenas movimentação dos opérculos e olhos (BASS e GERLAI, 2008).

Durante as últimas décadas, novos conhecimentos foram alcançados sobre a neurobiologia do medo. Acredita-se que exista um circuito neuroanatômico para o comportamento e a aprendizagem do medo cuja principal estrutura seria a amígdala

(MAREN, 2005). A amígdala é composta por 13 núcleos, cada um com numerosos subnúcleos. Destes núcleos, sabe-se que o complexo basolateral (composto pelos núcleos lateral, basal e acessório basal) e o núcleo central (composto pelas divisões capsular, lateral e medial) têm papel relacionado com o medo. Estes núcleos funcionam como interface entre as aferências sensoriais e eferências motoras importantes para a aprendizagem e memória do medo e respostas comportamentais importantes (ROSEN, 2004).

No condicionamento de medo ao contexto, no qual o animal recebe uma descarga elétrica quando em determinado ambiente, a informação contextual é codificada pelo hipocampo e é reunida com a informação aversiva no complexo basolateral da amígdala. A plasticidade no complexo amigdalóide basolateral permite a formação e o armazenamento de informação associando a informação ambiental e choque recebido e a passa para o núcleo central da amígdala, cujos eferentes para a matéria cinzenta periaquedutal dão origem à expressão do medo (freezing) (PARE et al., 2004, FANSELOW e LEDOUX, 1999).

A anestesia temporária da amígdala baso-lateral pré-treino bloqueia a aquisição do medo, enquanto a inativação ou lesão dessa região pré-teste abolem completamente a expressão do medo (PARE et al., 2004, FANSELOW e LE DOUX, 1999, KIM e DAVIS, 1993). Lesões da amígdala basolateral, realizadas 1 dia ou 14 meses após a aprendizagem do medo aboliram completamente a expressão do medo, sugerindo que esta região seja um sítio de formação e armazenamento permanente da aprendizagem de memórias emocionais (GALE et al., 2004).

Apesar da dificuldade no estabelecimento de homologias entre áreas corticais de peixes e vertebrados terrestres, uma vez que as vesículas telencefálicas de peixes se

desenvolvem através de um processo distinto ao que ocorre em mamíferos terrestres (BUTLER, 2000), evidências neuroanatômicas sugerem que regiões telencefálicas lateral e medial de peixes possam ser homólogos, respectivamente, ao hipocampo e amígdala de vertebrados terrestres (BUTLER, 2000).

Estudos funcionais parecem corroborar estas homologias entre o telencéfalo de peixes teleósteos com estruturas do sistema límbico de vertebrados superiores, uma vez que a lesão do telencéfalo medial impediu a aprendizagem de esquiva em peixes (PORTAVELLA et al., 2004) e a lesão lateral prejudicou a aprendizagem espacial (PORTAVELLA et al., 2005).

Até o presente momento, não foi descrito na literatura um modelo experimental de medo ao contexto para peixes. Dado à utilidade deste tipo de modelo para o estudo da neurobiologia do comportamento de medo e a possibilidade de seu uso para o estudo de homologias entre o sistema nervoso central de peixes e mamíferos, o objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo de medo ao contexto para peixes da espécie *Carassius auratus*, e posteriormente utilizá-lo para verificar o envolvimento do telencéfalo na aprendizagem emocional.

## **Métodos**

### **Procedimentos**

Este experimento foi realizado em dois dias consecutivos. No primeiro dia, eram realizadas duas sessões de treino de 15 minutos de duração separadas por intervalo de 2 horas. Os animais recebiam 4 estímulos aversivos (descargas elétricas de 20 V) em cada sessão de treino. No treino 1 (T1), os animais eram colocados no aquário e recebiam as descargas elétricas nos minutos quatro, sete, dez e treze. No treino 2 (T2), os choques eram aplicados nos minutos dois, seis, nove e treze. No segundo dia de experimento era realizada uma sessão de teste, na qual o animal era colocado no aquário por cinco minutos sem que nenhuma descarga elétrica fosse liberada. Animais do grupo controle não recebiam choque no dia de treino ou teste.

### **Análise comportamental**

O tempo de freezing durante as sessões de treino e teste foram registradas e consideradas como medidas de medo. O comportamento de freezing foi considerado como a ausência de movimentos visíveis, exceto os necessários para a respiração ou das nadadeiras laterais sem deslocamento visível do animal.

A análise do comportamento foi feita em blocos de vinte segundos nos seguintes momentos:

- Linha de base (LB): Foi observado o comportamento de freezing por 40 segundos, iniciando-se a análise do comportamento 20 segundos após o animal ter sido colocado no aquário em T1. Os primeiros 20 segundos do animal no

aquário não foram considerados, uma vez que alguns animais apresentavam freezing nesse período em decorrência da manipulação pelo experimentador.

- Treino 1 (T1): Foi observado o comportamento de freezing por 40 segundos, iniciando-se 20 segundos após cada uma das 4 descargas elétricas. Os 20 segundos imediatamente após cada descarga foram descartados, pois alguns animais apresentavam comportamento de fuga nesse período.
- Treino 2 (T2): A análise foi realizada como descrito para T1.
- Teste (T): O comportamento foi registrado nos primeiros 3 minutos da sessão, descartando-se os 20 segundos iniciais.

Os dados brutos em segundos foram transformados em porcentagem, representando assim a porcentagem de tempo que os animais permaneciam em freezing durante o tempo analisado em LB, T1, T2 e T.

### **Animais**

Neste experimento foram utilizados 56 peixes dourados, *Carassius auratus*, com 10-14 cm de comprimento, obtidos em um fornecedor local. Os animais foram alojados em pequenos grupos em aquários de 200 l, em água filtrada e aerada, a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclo claro-escuro de 14/10h.

### **Aquário experimental**

Neste experimento, foi utilizado um aquário quadrado (21 cm de lado e 21,5 cm de altura) de paredes opacas. Duas placas metálicas (20,5cm de altura e 40 cm de



largura) foram utilizadas como eletrodos para liberar choques elétricos como estímulos aversivos (20 V, 150  $\mu$ s). Cada placa metálica foi dobrada na metade, em um ângulo de 90 graus e adaptada a duas paredes adjacentes do aquário, cobrindo-as completamente. O aquário foi coberto por uma tampa de vidro durante os procedimentos. As sessões experimentais foram gravadas através de uma câmera de vídeo colocada 65 cm acima da superfície do aquário, permitindo análise posterior do comportamento dos animais.

### **Cirurgia**

Os animais eram anestesiados por imersão em uma solução (0,2g/l) de tricaina metassulfonato (MS222, Sigma), e então imobilizados em um suporte cirúrgico. Uma bomba de água assegurava um fluxo contínuo de água aerada e com anestésico através das guelras.

A pele era cuidadosamente removida e então era feita uma pequena abertura no crânio. O tecido adiposo no interior do crânio era cuidadosamente aspirado para expor o cérebro.

No grupo ablação telencefálica (TEL), ambos os lobos telencefálicos foram cuidadosamente aspirados através de uma micropipeta de vidro conectada a um sistema de vácuo manual. Após a ablação, o pedaço de crânio retirado era recolocado em sua posição original e fixado com cola de cianocrilato. Animais do grupo ablação medial (AM) eram submetidos ao mesmo tipo de cirurgia, no entanto apenas a região medial telencefálica era retirada.

Após a cirurgia os animais eram recolocados em seus aquários originais, e havia um período de recuperação de ao menos 4 dias antes do início dos experimentos. Os grupos experimentais estão descritos na tabela 6:

Tabela 6: descrição dos grupos experimentais

<b>Grupo</b>	<b>cirurgia</b>	<b>n</b>	<b>choque</b>
Intacto – controle (IN-COM)	-	8	não
Intacto – choque (IN-CH)	-	9	sim
Ablação total – controle (AT-CON)	Ablação telencefálica total	10	não
Ablação total – choque (AT-CH)	Ablação telencefálica total	13	sim
Ablação medial – controle (AM-COM)	Ablação telencéfalo medial	4	não
Ablação medial – choque (AM-CH)	Ablação telencéfalo medial	12	sim

### **Histologia**

Após o término do experimento, os animais foram anestesiados profundamente em solução de tricaina metassulfonato (0,4g/l) e perfundidos transcardiacamente com fixador formol salino. Os cérebros foram cuidadosamente removidos e armazenados no fixador formol.

Os cérebros eram então colocados por 24h em solução de sacarose (30%) e então seccionados no plano coronal a 40µm em criostato. Os cortes cerebrais foram tingidos com cresil violeta, e a extensão da lesão analisadas em microscópio. Cérebros com ablação total do telencéfalo deveriam mostrar remoção completa dos lobos telencefálicos sem a lesão de áreas pré-ópticas ou de trato-óptico. Lesões mediais afetaram a porção ventral do telencéfalo dorsomedial e colateralmente o telencéfalo dorsocentral e telencéfalo ventral supracommisural.

## **Análise estatística**

Os dados brutos em segundos transformados em porcentagem foram utilizados na realização da análise estatística.

A Anova de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Student Newman-Keuls foi utilizada para a análise dos dados dos animais intactos e dos animais com ablação total do telencéfalo. Os dados dos animais com ablação medial foram analisados utilizando-se os testes não-paramétricos de Friedman e de Mann-Whitney, uma vez que não eram homogêneos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar LB, T1, T2 e T entre animais intactos que receberam o estímulo aversivo, e animais intactos que não receberam estímulo aversivo. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Animais intactos**

Foi observada diferença significativa entre os grupos (Anova de duas vias,  $p=0,0081$ , d.f.=1,  $F=9,29$ ) e interação entre os fatores ( $p=0,0114$ , d.f.=3,  $F=4,12$ ) dos animais intactos que receberam e que não receberam choque (figura 10), mas não foram observadas diferenças entre as sessões ( $P=0,6366$ ,  $GL=3$ ,  $F=0,57158$ ). O tempo de freezing dos animais que receberam descargas elétricas aumentou significativamente em T1 e T2, o que não aconteceu nos animais controle. Também se observou que o tempo de permanência em freezing dos animais que receberam choque é significativamente maior nos animais que receberam choque durante os treinos. No teste, observa-se

diferença significativa nos valores de freezing entre os animais que receberam e que não receberam choque (Figura 10).

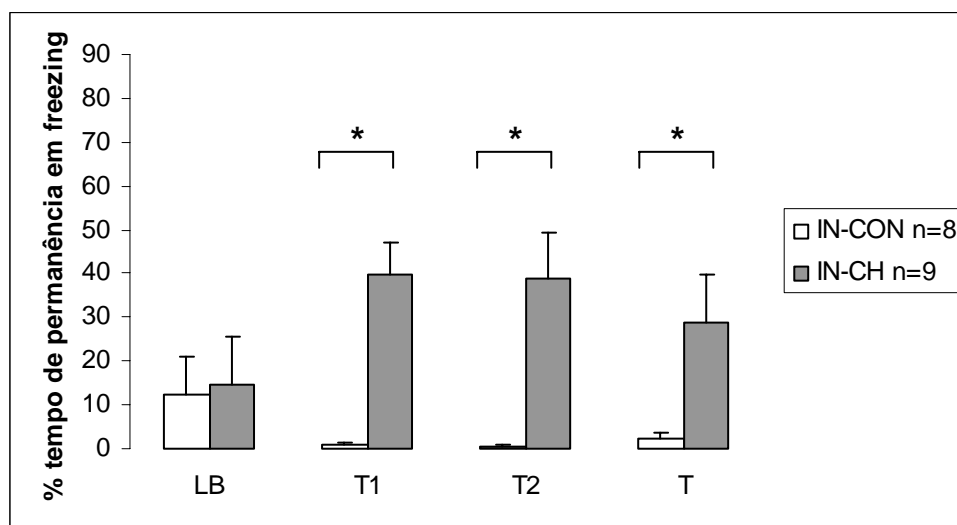


Figura 10. Média  $\pm$  E.P.M da porcentagem de tempo em freezing dos animais intactos controle (IN-CON) e submetidos ao choque (IN-CH) na linha de base (LB), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T). Anova  $p=0,0081$ , Student-Newman Keuls,  $p<0.05$ . \*: T1, T2 e T IN-CON diferente de T1, T2 e T IN-CH, respectivamente.

### Ablação telencefálica total

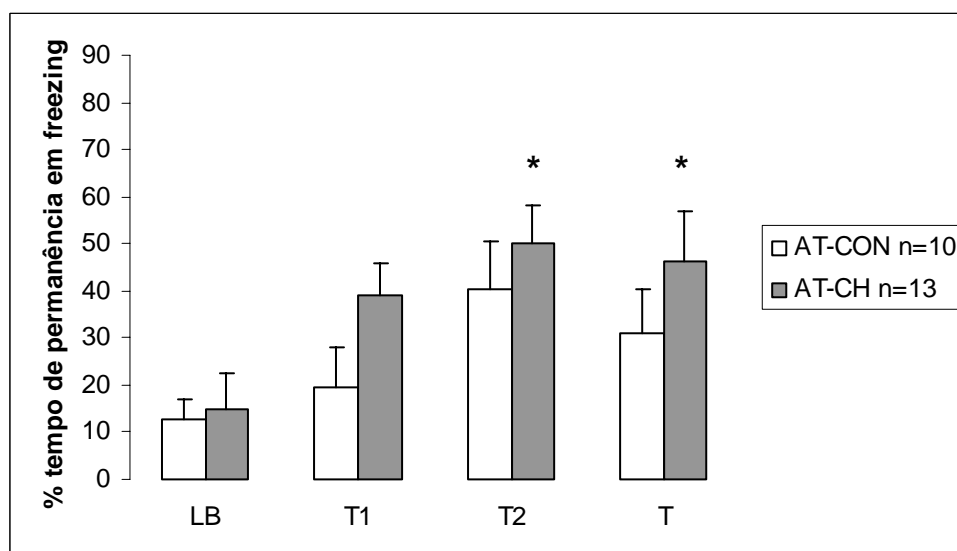
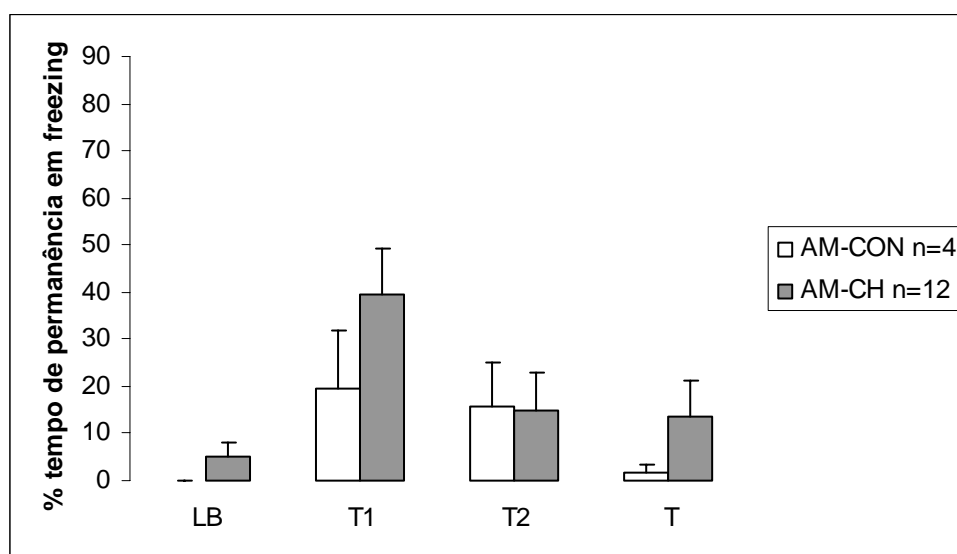


Figura 11. Média  $\pm$  E.P.M da porcentagem de tempo em freezing dos animais com ablação total do telencefalo controle (AT-CON) e dos que receberam descarga elétrica durante o treino (AT-CH) na linha de base (LB), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T). Anova  $p=0,2026$ . Student-Newman Keuls,  $p<0.05$ . \* diferente de LB do mesmo grupo.

Não foram observadas diferenças estatísticas no tempo de freezing entre os animais com ablação telencefálica total dos animais que receberam (grupo choque) e dos que não receberam descargas elétricas (grupo controle) (Anova de duas vias,  $p=0,2026$ , d.f.=1,  $F=1,73$ ), nem interação entre os fatores (Anova de duas vias,  $p=0,7135$ , d.f.=3,  $F=0,45$ ) (figura 11).

Foi observada diferença estatística significativa entre os dias (Anova de duas vias:  $p=0,0011$ , d.f.=3,  $F=6,08$ ), sendo que T2 e T do grupo choque é diferente de LB (Newman-Keuls,  $p<0,05$ ).

#### Ablação do telencéfalo medial



**Figura 12.** Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de tempo em freezing dos animais com ablação medial do telencéfalo controle (AM-CON) e dos que receberam descarga elétrica durante o treino (AM-CH) na linha de base (BL), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T). Mann-Whitney, LB:  $p=0,285$ ; T1:  $p=0,2991$ ; T2:  $p=0,5329$ , T,  $p=0,2556$ .

Não foram observadas diferenças estatísticas em LB, T1, T2 e T entre os animais com ablação do telencéfalo medial que receberam (AM-CH) e os que não receberam

choque (AM-CH) (Mann-Whitney, LB:  $p=0,285$ ; T1:  $p=0,2991$ ; T2:  $p=0,5329$ , T,  $p=0,2556$ ) (Figura 12).

## **Discussão**

O tempo de freezing dos animais durante o experimento foi considerado como indicativo de medo. Os animais intactos controle (que não receberam choques) permaneceram pouco tempo em freezing em LB, T1 e T2. Este fato indica que o aquário experimental por si só não é aversivo aos animais e que o comportamento padrão destes animais, uma vez colocados no aquário, é de explorá-lo.

Os animais intactos-choque (que receberam descargas elétricas nos treinos), apresentaram aumento estatístico no tempo em que permaneceram em freezing em T1 e T2 em relação à LB. Isso indica que essas descargas elétricas eram aversivas aos animais e eram capazes de induzir freezing. Já no teste, o tempo gasto em freezing neste grupo foi significativamente maior que o dos animais controle, indicando que estes animais se recordavam da experiência aversiva do dia anterior. Enquanto o tempo de freezing aumenta no decorrer do experimento nos animais que receberam choque, o tempo de freezing dos animais controle tende a zero após a LB. Assim, este modelo se mostrou eficaz para o estudo de medo ao contexto em peixes dourado.

Animais com lesão telencefálica total que não receberam estímulo aversivo durante os treinos apresentaram tempo de freezing significativamente maiores que os apresentados por animais intactos que também não receberam estímulos aversivos nos treinos (Anova de duas vias,  $p= 0,0171$ ). A ablação telencefálica total impede o desempenho de comportamentos agressivos e reprodutivos (DE BRUIN, 1980), bem como diversos tipos de aprendizagem, como esquivas ativa de duas vias e aprendizagem espacial (LOPEZ et al., 2000, PORTAVELLA et al., 2003).

Já foi observado que a ablação telencefálica total diminuiu a atividade espontânea dos animais, levando a uma menor atividade locomotora (FAGANELLO & MATTIOLI, 2007). A diminuição da atividade espontânea também foi observada em nosso trabalho e se refletiu no aumento do tempo de freezing dos animais com ablação telencefálica total na ausência de estímulos aversivos. Em adição, a ablação telencefálica total resultou na diminuição da resposta de sobressalto em *Carassius auratus* (COLLINS e WALDECK, 2006).

Assim, no caso da ablação total do telencéfalo, o aumento no tempo de freezing, tanto nos treinos como no teste, não pode ser considerado como indicativo de medo.

Os animais com ablação telencefálica total que receberam descargas elétricas também apresentaram aumento de tempo de freezing em T1, T2 e T. Uma vez que não se observou diferença significativa entre este grupo experimental e seu controle, acreditamos que esse aumento também seja devido à depressão das atividades cognitivas nestes animais e não consequência das descargas elétricas. No entanto, uma vez que os prejuízos observados após a ablação telencefálica total possam ser resultantes da soma da lesão de diversos sistemas comportamentais especializados relacionados ao telencéfalo, e que lesões parciais desta região tem papel importante no estudo de diferentes sistemas de memória que possam estar sediados no telencéfalo, foi feita a ablação medial do telencéfalo, a fim de se testar a hipótese de homologia desta região com a amígdala de mamíferos.

Os animais com ablação medial do telencéfalo que não receberam choque apresentaram um padrão de comportamento similar aos animais do grupo intacto-controle, não sendo observado aumento de freezing de T1, T2 e T em relação à LB, indicando que esta lesão parcial no telencéfalo não causou alterações na atividade

locomotora desses animais. Os animais com ablação do telencéfalo medial que receberam choques durante o treino também não apresentaram aumento de tempo de permanência em freezing em T1 e T2 em relação à LB, indicando que esta lesão inibiu a expressão de comportamento de medo logo após a apresentação do estímulo aversivo.

Assim como a lesão do telencéfalo medial inibiu o freezing durante os treinos, a lesão pré e pós-treino do núcleo central da amígdala bloqueou diversas expressões de medo, incluindo o freezing e o startle. Acredita-se que este núcleo esteja relacionado com atenção durante situações de medo (GALLAGHER e HOLLAND, 1994) e funcione como um portão de entrada de aferências do núcleo lateral da amígdala para modular a expressão de medo aprendido (DAVIS et al., 1994). Assim, parece haver uma homologia funcional destas duas estruturas.

Em adição, os animais do grupo ablação medial-choque pareceram também não recordar da experiência aversiva do dia anterior, uma vez que não se observou diferença no tempo de freezing no teste entre ambos os grupos. Já foi dito que o comportamento de freezing faz parte de uma resposta antecipatória ao perigo e ameaça (ROSEN e SCHULKIN, 1998). Assim, quando o animal é recolocado no aquário experimental no dia do teste e se recorda da experiência aversiva do dia anterior, ele apresenta uma resposta antecipada à ameaça e perigo que o aquário representa, que é o freezing. A ausência deste comportamento no grupo ablação medial-choque no dia do teste indicou que a lesão inibiu a aprendizagem de medo ao contexto neste grupo.

Lesões do núcleo lateral da amígdala impediram o condicionamento de medo e a expressão de respostas comportamentais condicionadas ao medo (WALLACE e ROSEN, 2001; CAHILL et al., 1999). Essa homologia funcional indica que tal como a amígdala (MAREN, 2003; CAHILL et al., 1999), o telencéfalo medial é um local



importante para a plasticidade e armazenamento do condicionamento de medo e mediadora de respostas comportamentais como o freezing (CAHILL et al., 1999).

A ablação telencefálica medial também impediu a aprendizagem emocional em outro modelo experimental. Portavella e colaboradores (2004, 2005) observaram que a lesão do telencéfalo medial bloqueou a aprendizagem de esquiva de duas vias em *Carassius auratus*.

Os resultados deste trabalho, bem como de trabalhos anteriores (PORTAVELLA et al., 2004; 2005), apontam para um papel importante do telencéfalo medial de peixes na aprendizagem emocional, e também a existência de homologia funcional entre esta região e a amígdala de mamíferos.

## Considerações Finais

No primeiro estudo deste trabalho, um modelo de aprendizagem desenvolvido para Tilápia do Nilo foi adaptado para peixes paulistinhas. Este modelo experimental parecia particularmente interessante para a utilização em estudos com paulistinhas. Nele, os animais residem no próprio aquário experimental, reduzindo consideravelmente a manipulação dos animais, o que poderia ser uma fonte de estresse durante a realização do experimento.

Neste modelo, os animais deveriam associar, dia após dia, o corte na aeração do aquário com a oferta de alimento. Observou-se que animais não injetados e animais tratados com salina apresentaram diminuição das latências de entrada na área de alimentação, indicando aprendizagem. Este modelo experimental foi utilizado nos três primeiros estudos deste trabalho e se mostrou útil para o estudo da aprendizagem e memória em paulistinhas.

Foi então estudado o efeito do estresse sobre a aprendizagem dos animais neste modelo experimental. Os peixes eram estressados por uma hora diária antes do procedimento de aprendizagem. Observou-se que apesar de um atraso na aprendizagem, esta não era completamente bloqueada. Além de retardar a aprendizagem, o confinamento aumentou a glicose sanguínea dos animais, confirmando que esta é uma fonte de estresse para os animais.

Uma vez que se observou que os animais eram capazes de aprender a tarefa e que o confinamento se mostrou uma fonte de estresse para os animais, foi estudado o efeito do bloqueio do receptor  $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$ , bem como a estimulação desses receptores através do precursor l-histidina na aprendizagem de paulistinhas estressados e não estressados.

O bloqueio do receptor H<sub>1</sub> pela clorfeniramina (estudo 1) inibiu a aprendizagem de animais não estressados. No entanto, esta droga não apresentou efeito sobre a aprendizagem de animais estressados. Estes resultados indicam que a histamina possui um papel facilitador nos processos de aprendizagem em paulistinhas somente em animais não estressados, fato que corrobora uma possível ação da histamina de maneira estado-dependente.

O bloqueio do receptor H<sub>2</sub> (estudo 2), inibiu a aprendizagem de paulistinhas estressados, no entanto, não teve efeito sobre a concentração de glicose plasmática secundária ao confinamento. O resultado deste estudo nos indicou uma possível ação da histamina através de receptores H<sub>2</sub> em situações de estresse.

O terceiro estudo deste trabalho confirmou um papel facilitador da histamina nos processos de aprendizagem e memória, uma vez que o precursor histaminérgico l-histidina facilitou a aprendizagem dos animais estressados e não estressados. No entanto, o antagonista do receptor H<sub>3</sub>, a tioperamida prejudicou a aquisição da tarefa, também em animais estressados e não estressados. Uma vez que a tioperamida é um antagonista do autoreceptor H<sub>3</sub> e causa o aumento da concentração de histamina, era esperado que os resultados dos animais tratados com esta droga fossem similares aos observados nos animais que receberam l-histidina. Uma possível explicação é o fato de que o receptor H<sub>3</sub> também regula a liberação de outros neurotransmissores, como a acetilcolina e a serotonina. Alterações na transmissão desses neurotransmissores causadas pela tioperamida poderiam causar o resultado contraditório encontrado em nosso estudo.

No quarto estudo foi desenvolvido um modelo de medo ao contexto para peixes da espécie *Carassius auratus*. O reduzido tamanho dos peixes da espécie *Danio rerio*

impossibilitou que eles fossem utilizados neste último estudo. Uma vez desenvolvido o modelo experimental, foram realizadas ablação telencefálica total e lesões do telencéfalo medial para se verificar possíveis prejuízos à formação da memória emocional. Observou-se que a ablação telencefálica total causou uma diminuição na atividade locomotora dos animais e que a lesão medial impediu o condicionamento de medo ao contexto, corroborando a hipótese de que esta região seria homóloga à amígdala de mamíferos.

Nota-se que o grupo controle com ablação do telencéfalo medial possui um número reduzido de elementos. Uma reforma do laboratório no período do estágio impediu que este grupo fosse completado. Este grupo experimental deverá ser aumentado antes que possamos tirar esta conclusão de homologia da região telencefálica medial de teleósteos e amígdala de mamíferos com segurança. Em adição a isso, o efeito da ablação do telencéfalo lateral na aprendizagem de medo ao contexto também deve ser estudada.

Assim, os três primeiros estudos deste trabalho confirmaram o envolvimento do sistema histaminérgico na aprendizagem de paulistinhas. Também foi observado que a histamina parece atuar sobre os receptores  $H_1$  facilitando a memória em animais não estressados, mas em situações de estresse a histamina parece atuar via receptor  $H_2$  do confinamento.

Os resultados do quarto estudo deste trabalho corroboram a hipótese de que o telencéfalo medial de teleósteos seja homóloga à amígdala de mamíferos. Novos estudos devem ser realizados a fim de se estudar separadamente o papel dos receptores  $H_1$  e  $H_2$  nas diferentes regiões telencefálicas.

## Referências

- AIRAKSINEN, M.S.; FLÜGGE, G.; FUCHS, E.; PANULA, P. Histaminergic system in the tree shrew brain. **J Comp Neurol.** 286(3):289-310, 1989.
- AIRAKSINEN, M.S.; PANULA, P. Comparative neuroanatomy of the histaminergic system in the brain of the frog *Xenopus laevis*. **J Comp Neurol.** 292(3):412-23, 1990.
- ARRANG, J.M.; GARBARG, M.; LANCELOT, J.C.; LECONT, J.M.; POLLARD, H.; ROBBA, M.; SCHUNACK, W.; SCHWARTZ, J.C. Highly-potent and selective ligands for histamine—H3 receptors. **Nature** 327: 117–123, 1987.
- BARCELLOS, L.J.G; NICOLAIEWSKY, S.; DE SOUZA, S.M.G.; LULHIER, F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquac. Res.** 30: 437-444, 1999.
- BASS, S.L.S.; GERLAI, R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: The effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. **Behavioural Brain Research**, 186:107-17, 2008.
- BERNAERTS, P.; LAMBERTY, Y.; TIRELLI, E. Histamine H3 antagonisttioperamidose-dependently enhances memory consolidation and reverses amnesia induced by dizocilpine or scopolamine in a one-trial inhibitory avoidance task in mice. **Behav Brain Res** 154(1):211-9, 2004.
- BILOTTA, J.; RISNER, M.L.; DAVIS, E.C.; HAGGBLOOM, S.J. Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish. **Zebrafish** 2: 259-68, 2005.
- BLANDINA, p; EFOUDEBE, M.; CENNI, G.; MANNAIONI, P.; PASSANI, M.B. Acetylcholine, histamine and cognition: Two sides of the same coin. **Learning and memory** 11:1-8, 2004.
- BONGA, S.E.W. The stress response in fish. **Physiological Reviews** 77:591-625, 1997.
- BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia**. São Paulo, Editora Atheneu, 1995.
- BROWN, R.E.; STEVENS, D.R.; HASS, H.L. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology** 63:637-672, 2001.
- BUGAJSKI, J.; GADEK, A. Central H1 and H2 histaminergic stimulation of pituitary-adrenocortical response under stress in rats. **Neuroendocrinology** 36:424-430, 1983.
- BUTLER, A.B. Topography and topology of the teleost telencephalon: a paradox resolved. **Neurosci Lett.** 293: 95-98, 2000.
- CAHILL, L.; WEINBERGER, N.M.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Is the amygdala a locus of “conditioned fear”? **Neuron** 23, 227-228, 1999.
- CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol.** 463(1-3):235-72, 2003.

- CHEN, Z.; SHEN, Y.J. Effects of brain histamine on memory deficit induced by nucleus basalis-lesion in rats. **Acta Pharmacol Sin** 23(1):66-70, 2002.
- CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concept of stress and stress system disorders. **Journal of American Medical Association** 267: 1244-1252, 1992.
- CLAPHAM, J.; KILPATRICK, G.J. Histamine H3 receptors modulate the release of [3H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H3 receptor subtypes. **Br. J. Pharmacol.** 107: 919–923, 1992.
- CLARK, W.G.; LIPTON, J.M. Changes in body temperature after administration of amino acids, peptides, dopamine, neuroleptics and related agents: II. **Neurosci Biobehav Rev** 9, 299-371, 1985.
- COELHO, J.L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLI, R. Analysis of the effects of CPA and L-histidina on goldfish tested on a conditioned place preference model. **Behav Brain Res.** 124(2):161-5, 2001.
- COFIEL, L.P.; MATTIOLI, R. Involvement of histamine receptors in the acquisition of inhibitory avoidance in *Carassius auratus*. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 30(7):1246-50, 2006.
- COFIEL, L.P.V.; R. MATTIOLI. L-histidine enhances learning in stressed and non-stressed zebrafish, submetido.
- COLLINS, L.E.; WALDECK, R.F. Telencephalic ablation results in decreased startle response in goldfish. **Brain Res** 1111: 162-5, 2006.
- COLWILL, R.M.; RAYMOND, M.P.; FERREIRA, L.; ESCUDERO, H. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav. Processes** 70: 19-31, 2005.
- COTMAN, C.; NIETE-SAMPEDRO, M.; HARRIS, E.W. Synapse replacement in the central nervous system of adult vertebrates. **Physiol. Rev.** 61: 684–784, 1981.
- COTMAN, C.W.; LYNCH GS. The neurobiology of learning and memory. *Cognition* 33: 201–241, 1989.
- DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiol Learn Mem** 86: 100-106, 2006.
- DAI, H.; KANEKO, K.; KATO, H.; FUJII, S.; JING, Y.; XU, A.; SAKURAI, E.; KATO, M.; OKAMURA, N.; KURAMASU, A.; YANAI, K. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. **Neurosci. Res.** 57: 306-313, 2007.
- DAI, H.; OKUDA, T.; SAKURAI, E.; KURAMASU, A.; KATO, M.; JIA, F.; XU A.J.; IINUMA, K.; SATO, I.; YANAI, K. Blockage of histamine H1 receptor attenuates social isolation-induced disruption of prepulse inhibition: a study in H1 receptor gene knockout mice. **Psychopharmacology** 183: 285–293, 2005.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends in Neurosciences**, 17: 208-214, 1994.

DE ALMEIDA, M. A. M. R.; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. **Archives of International Pharmacodynamic** 283: 193-198, 1986.

DEWSBURY, D.A.; BERNSTEIN, J.J. Role of the telencephalon in performance of conditioned avoidance responses by goldfish. **Exp Neurol**. 23(4):445-56, 1969.

EIDI, M.; ZARRINDAST, M.; EIDI, A.; ORYAN S.; PARIVAR, K. Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. **Eur jour pharm**, 465, 91-96, 2003.

EKSTRÖM, P.; HOLMQVIST, B.I.; PANULA, P. Histamine immunoreactive neurons in the brain in the teleost *Gasterosteus aculeatus*. Correlation with hypothalamic tyrosine-hydroxylase and serotonin-immunoreactive neurons. **Journal of Chemical neuroanatomy** 8:75-85, 1995.

ELIZALDE, N.; GIL-BEA, F.J.; RAMÍREZ, M.J.; AISA, B.; LASHERAS, B.; DEL RIO, J.; TORDERA, R.M. Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment, **Psychopharmacology**, *in press*, 2008.

ENGESZER, R.E.; RYAN, M.J.; PARICHY, D.M. Learned social preference in zebrafish. **Current Biology**, 14:881-884, 2004.

ERIKSSON, K.S.; PEITSARO, N.; KARLSTEDT, K.; KASLIN, J.; PANULA, P. Development of the histaminergic neurons and expression of histidine decarboxylase mRNA in the zebrafish brain in the absence of all peripheral histaminergic systems. **European Journal of Neuroscience**, 10 (12): 3799-3872; 1998.

FAGANELLO, F.R.; MATTIOLI, R. Anxiolytic-like effect of Chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 31: 269-274, 2007.

FANSELOW, M.S.; LEDOUX, J.E. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. **Neuron** 23: 229-232, 1999.

FINK, K.; SCHLICKER, E.; NEISE, A.; GOTHERT, M. Involvement of presynaptic H3 receptor in the inhibitory effect of histamine on serotonin release in the rat brain cortex. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 342: 513-519, 1990.

FRISCH, C.; HASENOHRL, R.U.; KRAUTH, J.; HUSTON, J.P. Anxiolytic-like behaviour after lesion of the tuberomammillary nucleus E2-region. **Exp Brain Res**, 119,260-264, 1998.

FUJISE, T.; YOSHIMATSU, H.; KUROKAWA, M.; OOHARA, A.; KANG, M.; NAKATA, M.; SAKATA, T. Satiation and masticatory function modulated by brain histamine in rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, 217, 228-234, 1998.

GALE, G.D.; ANAGNOSTARAS, S.G.; GODSIL, B.P.; MITCHELL, S.; NOZAWA, T.; SAGE, J.R.; WILTGEN, B.; FANSELOW, M.S. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. **J Neurosci** 24: 3810–3815, 2004.

GALLAGHER, M.; HOLLAND, P.C. The amygdala complex: Multiple roles in associative learning and attention. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91: 11771-11776, 1994.

GUO, S. Linking genes to behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? **Genes, Brain and Behaviour** 3:63-74, 2004.

HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Nat. Rev. Neurosci.** 4:121-130, 2003.

HASENOHRL, R.U.; WETH, K.; HUSTON, J.P.; Intraventricular infusion of the histamine H(1) receptor antagonist chlorpheniramine improves maze performance and has anxiolytic-like effects in aged hybrid Fischer 344xBrown Norway rats. **Exp Brain Res** 128: 435–440, 1999.

Hill, S.J. Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptor. **Pharmacol. Rev.** 42:45–83, 1990.

Huston, J.P.; Oitzl, M.S. The relationship between reinforcement and memory: parallels in the rewarding and mnemonic effects of the neuropeptide Substance P. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 13:171–180, 1989.

INAGAKI, N.; PANULA, P.; YAMATODANI, A.; WADA, H. Organization of the histaminergic system in the brain of teleost *Trachurus trachurus*. **Journal Comparative Neurology**, 310: 94-102, 1991.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H. **Principles of Neural Science**. Elsevier, New York 1995.

KASLIN, J.; PANULA, P. Comparative Anatomy of the Histaminergic and Other Aminergic Systems in Zebrafish (*Danio rerio*). **The Journal of Comparative Neurology**, 440: 342-377, 2001.

KIM, M.; DAVIS, M. Electrolytic lesions of the amygdala block acquisition and expression of fear-potentiated startle even with extensive training but do not prevent reacquisition. **Behav Neurosci** 107: 580–595, 1993.

KJAER, A.; KNIGGE, U.; MADSEN, E.L.; SOE-JENSEN, P.; BACH, F.W.; WARBERG, J. Insulin/hypoglycemia-induced adrenocorticotropin and beta-endorphin release: involvement of hypothalamic histaminergic neurons. **Endocrinology**, 132:2213-2220, 1993.

KJAER, A.; LARSEN, P.J.; KNIGGE, U.; WARBERG, J. Histaminergic activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, 135(3):1171-7, 1994.



- KOMATER, V.A.; BUCKLEY, M.J.; BROWMAN, K.E.; PAN, J.B.; HANCOCK, A.A.; DECKER, M.W.; FOX, G.B. Effects of histamine H3 receptor antagonists in two models of spatial learning. **Behav Brain Res.** 159(2):295-300, 2005.
- KOMATER, V.A.; BROWMAN, K.E.; CURZON, P.; HANCOCK, A.A.; DECKER, M.W.; FOX, G.B. H3 receptor blockade by thioperamide enhances cognition in rats without inducing locomotor sensitization. **Psychopharmacology**, 167:363-372, 2003.
- KUZMIN, A.I.; ZARETSKY, D.V.; KALENIKOVA, E.I.; ZARETSKAJA, M.V.; MEDVEDEV, O.S.; CHAZOV, E.I. The effect of histamine receptor antagonists on stress-induced catecholamine secretion: an adrenomedullary microdialysis study in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 378:311-316, 1999.
- LAUDIEN, H.; FREYER, J.; ERB, R.; DZER, D. Influence of isolation stress and inhibited biosynthesis on learning and memory in goldfish. **Physiology and Behaviour**, 38, 621-628, 1986.
- LEURS, R.; SMIT, M.; TIMMERMAN, H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. **Pharmacological Therapeutics**, 66: 413- 463, 1995.
- LI, S.; WANG, C.; WANG, W.; DONG, H.; HOU, P.; TANG, Y. Chronic mild stress impairs cognition in mice: From brain homeostasis to behavior. **Life Sci.** 82: 934–942, 2008.
- LIU, Y.; BRAUD, W.G. Modification of learning and memory in goldfish through the use of stimulant and depressant drugs. **Psychopharmacologia.** 35(2):99-112, 1974.
- LÓPEZ, J.C.; BINGMAN, V.P.; RODRÍGUEZ, F.; GÓMEZ, Y.; SALAS, C. Dissociation of place and cue learning by telencephalic ablation in goldfish. **Behav Neurosci** 114: 687–99, 2000.
- MARCONDES, A. L. Estresse e habilidade de aprendizado na Tilápia-do-Nilo. Botucatu, 2002. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Centro de Zoologia, UNESP.
- MAREN, S. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. **Neuron.** 47: 783-6, 2005.
- MAREN, S. The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. **Annals of the New York Academy of Science**, 985, 106-113, 2003.
- MASUOKA, T.; KAMEI, C. Role of hippocampal H1 receptors in radial maze performance and hippocampal theta activity in rats. **Brain Res Bull.** 73(4-6):231-7, 2007.
- MASUOKA, T.; MIKAMI, A.; YASUDA, M.; SHINOMIYA, K.; KAMEI, C. Effects of histamine H(1) receptor antagonists on hippocampal theta rhythm during spatial memory performance in rats. **Eur J Pharmacol.** 576(1-3):77-82, 2007.
- 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**, 45 (1):41-44, 1998.

MEDALHA, C.C.; MATTIOLI, R. Involvement of the histaminergic system on appetitive learning and its interaction with haloperidol in goldfish. **Neurosci Lett** 418(2):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**, 349: 179-182, 2003.

MELLO, P.; BENETTI, F.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **An. Acad. Bras. Cienc.** 80:301-309, 2008.

MIKLÓS, I.H.; KOVÁCS, K.J. Functional heterogeneity of the responses of histaminergic neuron subpopulations to various stress challenges. **Eur. J. Neurosci.** 18: 3069-3079, 2003.

MIYAZAKI, S.; IMAIZUMI, M.; ONODERA, K. Effects of clobenpropit (VUF-9153), a histamine H<sub>3</sub>-receptor antagonist, on learning and memory, and on cholinergic and monoaminergic systems in mice. **Life Sciences**, 61(4): 355-361, 1997.

MIYAZAKI, S.; IMAIZUMI, M.; ONODERA, K. Effects of thioperamide, a histamine H<sub>3</sub>-receptor antagonist, on a scopolamine-induced learning deficit using an elevated plus-maze test in mice. **Life Sciences**, 57 (23): 2137-2144, 1995.

MONTI, J.M. Involvement of histamine in the control of waking state. **Life Sci**, 53:1331-8, 1993.

MOREIRA, P.S.A.; VOLPATO, G.L. Conditioning of Stress in Nile tilapia. *Journal of Fish Biology* 64:961-969, 2004.

NGUYEN, T.; SHAPIRO, D.A.; GEORGE, S.R.; SETOLA, V.; LEE, D.K; CHENG, R.; RAUSER, L.; LEE, S.P.; LYNCH, K.R.; ROTH, B.L.; O'DOWD, B.F. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. **Molecular Pharmacology**, 59:427-433, 2001.

ORSETTI, M.; GHI, P.; DI CARLO, G. Histamine H<sub>3</sub>-receptor antagonism improves memory retention and reverses the cognitive deficit induced by scopolamine in a two-trial place recognition task. **Behav Brain Res.** 124(2):235-42, 2001.

ORSETTI, M.; FERRETTI, C.; GAMALERO, S.R.; GHI, P. Histamine H<sub>3</sub>-receptor blockade in the rat nucleus basalis magnocellularis improves place recognition memory. **Psychopharmacology**, 159:133-137, 2002.

PANULA, P.; YANG, H.Y.T.; COSTA, E. Histamine – Containing neurons in rat hypothalamus. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 81, p. 2572-2576, 1984.

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

- PARE, D.; QUIRK, G.J.; LEDOUX, J.E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **J Neurophysiol** 92:1–9, 2004.
- PASSANI, M.B.; CANGIOLI, I.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C.; MANNAIONI, P.F.; BLANDINA, P. Histamine H3 receptor-mediated impairment of contextual fear conditioning and in-vivo inhibition of cholinergic transmission in the rat basolateral amygdala. **Eur J Neurosci**. 14(9):1522-32, 2001.
- PASSANI, M.B.; BACCIOTTINI, L.; MANNAIONI, P.F.; BLANDINA P. Central histaminergic system and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**. 24:107-113, 2000.
- PAUL, V.N.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S.K. Histaminergic modulation of stress-induced analgesia and cognitive dysfunction, **Methods Find Exp Clin Pharmacol** 24: 413-419, 2002.
- PEITSARO, N.; KASLIN, J.; ANICHTCHIK, O.V.; PANULA, P. Modulation of the histaminergic system and behaviour by  $\alpha$ -fluoromethylhistidine in zebrafish. **Journal of Neurochemistry**, 86:432-441, 2003.
- PEITSARO, N.; SUNDVIK, M.; ANICHTCHIK, O.V.; KASLIN, J.; PANULA, P. Identification of zebrafish histamine H1, H2 and H3 receptors and effects of histaminergic ligands on behavior. **Biochem. Pharmacol**. 73: 1205-1214, 2007.
- PIRATELLO, A.C.; MATTIOLI, R. Thioperamide delays vestibular compensation in goldfish **Neurosci Lett**. 415:146–148, 2007.
- PORTAVELLA, M.; VARGAS, J.P. Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. **European Journal of Neuroscience**, 21: 2800–2806, 2005.
- PORTAVELLA, M.; TORRES B.C.; SALAS, C.; PAPINI, M.R. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). **Neuroscience Letters**, 362:75–78, 2004.
- PRIVOU, C.; LI, J.S.; HASENÖHRL, R.U.; Huston, J.P. Enhanced learning by posttrial injection of H1-but not H2-histaminergic antagonists into the nucleus basalis magnocellularis region. **Neurobiol Learn Mem**. 71(3):308-24, 1999.
- RESCORLA, R.A. Pavlovian Conditioning: It's Not What You Think It Is. **American Psychologist**, 43: 151-160, 1988.
- ROSEN, J.B.; SCHULKIN J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychol Rev**. 105: 325-50, 1998.
- ROSEN, J.B. The Neurobiology of Conditioned and Unconditioned Fear: A Neurobehavioral System Analysis of the Amygdala. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, 3: 23-41, 2004.
- SALAS, C.; BROGLIO, C.; DURÁN, E.; GÓMEZ, A.; OCAÑA, F.M.; JIMÉNEZ-MOYA, F.; RODRÍGUEZ, F. Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. **Zebrafish** 3(2):157-71, 2006.

SAPOLSKY, R.M. Stress and plasticity in the limbic system. **Neurochemical Research**, 28:1735-42, 2003.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr. Rev.** 21: 55-89, 2000.

SCHLICKER, E.; FINK, K.; DETZNER, M.; GOTHERT, M. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H3 receptors. **J. Neural Trans.** 93: 1-10, 1993.

SCHLICKER, E.; KATHMANN, M.; DETZER, M.; EXNER, H.J.; GOTHERT, M.H. H3 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release: An investigation into the involvement of Ca<sup>++</sup> and K<sup>+</sup> ions and adenylase cyclase. **Naunyn Schmiedebergs, Arch. Pharmacol.** 350: 34-41, 1994.

SCHWARTZ, J.C.; ARRANG, J.M.; GARBARG, M.; POLLARD, H. & RUAT, M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. **Physiological Reviews**, v.71, p.1-51.6, 1991.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res.** 53(4):865-71, 2002.

VAN DE KAR L.D.; BLAIR, M.L. Forebrain pathways mediating stress induced hormone secretion. **Front. Neuroendocrinol** 20:1-48, 1999.

VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C. GRAU, E.G. & IWAMA, G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in Tilapia: the role of cortisol. **Comp Biochem Phisiol**, 116C:89-95, 1997.

VOLPATO G.L.; BARRETO, R.E. Environmental blue light prevents estresse in the fish Nile tilapia, Braz. J. Med. Biol. Res. 34 1041-1045, 2001.

WADA H., INAGAGAKI N., YAMATODANI A., WANATABE T. Is the histaminergic neuron system a regulatory center for the hole brain activity? **Tds Neurol Sci**, 14:415-418, 1991.

WALLACE, K.J.; ROSEN, J.B. Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear, but not unconditioned fear of a predator odor: Comparison to electrolytic lesions. **Journal of Neuroscience**, 21: 3619-3627, 2001.

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 immunohistochemistry of histidine decarboxilase as a marker. **Brain Research**, 295:13-25, 1984.

WEILER, H.T.; WAGNER, U.; HUSTON, J.P. Plasticity in crossed and uncrossed tuberomamillary nucleus striatal projections in relation to recovery form behavioural asymetries induced by hemivibrissotomy, **Neuroscience**, 37:463-467, 1990.

WEILER, H.T.; WAGNER, U.; HUSTON, J.P. Unilateral lesion in the tuberomammillary nucleus region: Behavioural asymmetries and effects of histamine precursor. **Behavioural Brain Research**, 49:167-173, 1992.

XU, X.; SCOTT-SCHEIERN, T.; KEMPKER, L.; SIMONS, K. Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurobiol Learn Mem** 87:72-77, 2007.

YANAI, K.; DAI, H.; SAKURAI E.; WATANABE T. The roles of histamine H1 receptors on cognition. **Infl amm. res.** 57, *Supplement 1*, S39–S40, 2008.

## ANEXOS – ESTUDO I

TABELA 7 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais não injetados do experimento 1. T1: Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T: Teste.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	140	29	12	17	2
2	131	35	20	2	1
3	144	37	28	2	13
4	133	65	37	3	5
5	158	37	50	119	1
6	220	263	129	15	43
7	210	112	94	114	34
8	228	110	91	164	87
9	320	14	56	21	19
10	155	107	2	7	31
11	120	21	41	3	130
12	208	153	81	52	5
13	120	228	135	5	127
14	118	140	12	20	16
15	153	137	85	43	36
Média	170,53	99,20	58,20	39,13	36,67
EPM	14,51	19,65	10,94	13,29	11,24

TABELA 8 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com salina do experimento 1. T1: Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T: Teste.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	82	109	21	18	28
2	168	43	4	4	5
3	186	163	97	62	86
4	215	66	241	43	105
5	148	132	137	65	11
6	87	123	77	25	1
7	297	250	102	147	279
8	272	174	4	11	1
9	101	120	36	37	36
10	327	62	8	55	92
11	78	329	107	62	160
12	130	78	68	150	32
13	97	89	66	34	38
Média	168,31	133,69	74,46	54,85	67,23
EPM	23,85	22,38	18,39	12,76	22,11

TABELA 9 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com clorfeniramina na dose de 1 mg/kg do experimento 1. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T: Teste.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	159	39	8	3	10
2	158	54	142	99	187
3	113	66	55	3	31
4	130	212	195	82	23
5	72	65	170	93	57
6	129	68	94	68	135
7	159	225	159	83	36
8	169	280	220	120	42
9	59	123	14	3	14
10	279	150	47	35	58
11	142	160	182	209	33
12	134	227	172	189	45
13	99	117	68	88	27
14	135	155	150	58	35
15	44	118	48	19	40
Média	132,07	137,27	114,93	76,80	51,53
EPM	14,37	18,95	18,14	16,14	12,24

TABELA 10 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com clorfeniramina na dose de 8 mg/kg do experimento 1. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T: Teste.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	239	232	108	173	47
2	76	117	10	27	11
3	231	194	153	5	165
4	142	32	130	15	275
5	107	289	148	232	19
6	185	272	134	184	11
7	86	40	49	82	55
8	226	176	153	75	116
9	247	30	205	147	40
10	105	134	98	33	78
11	156	97	16	37	48
12	225	185	178	9	18
13	58	102	69	22	18
Média	160,23	146,15	111,62	80,08	69,31
EPM	19,14	24,21	16,82	21,51	21,23

TABELA 11 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados e tratados com salina do experimento 2. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	68	41	29	6	3
2	230	16	330	179	165
3	95	59	38	33	41
4	298	111	4	230	3
5	58	42	36	36	35
6	290	50	36	66	40
7	330	5	1	15	1
8	115	15	38	32	1
9	36	74	110	310	53
10	219	33	44	52	47
11	65	6	16	35	63
12	47	40	30	37	15
13	78	81	64	35	33
14	40	37	39	41	24
15	330	303	330	292	119
16	95	167	93	91	45
17	20	97	195	115	5
18	146	330	314	140	324
19	36	54	53	40	31
Média	136,63	82,16	94,74	93,95	55,16
EPM	25,05	22,22	26,97	22,69	18,70

TABELA 12 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados e tratados com clorfeniramina na dose de 1 mg/kg do experimento 2.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	208	5	204	330	330
2	210	52	327	46	43
3	330	60	330	25	40
4	42	33	35	38	51
5	45	44	34	36	56
6	22	42	31	34	30
7	295	63	74	63	68
8	50	46	40	68	35
9	330	330	330	313	122
10	210	280	246	49	238
11	82	65	104	23	9
12	137	235	92	75	44
13	314	282	45	33	54
14	184	43	98	67	83
15	35	18	35	30	31
16	46	82	330	133	81
17	330	36	5	22	19
18	228	56	64	123	51
19	330	37	37	36	45
20	224	330	55	35	33
Média	182,6	106,95	125,8	78,95	73,15
EPM	26,03	25,04	26,67	19,75	17,38



TABELA 13 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados e tratados com clorfeniramina na dose de 8 mg/kg do experimento 2. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	330	112	294	330	1
2	330	330	1	330	1
3	1	330	61	81	10
4	198	204	80	116	143
5	199	330	1	1	165
6	40	162	1	105	201
7	82	40	46	53	229
8	49	40	17	10	40
9	252	40	30	35	33
10	54	44	32	73	73
11	127	84	111	156	143
12	330	241	115	89	245
13	26	230	184	140	188
14	330	134	206	14	194
15	249	5	191	330	1
16	106	111	15	125	330
17	289	73	15	8	108
18	330	169	6	321	3
19	291	45	1	42	3
20	5	19	1	17	9
21	180	19	3	7	2
22	41	34	16	33	1
Média	174,5	127,09	64,86	109,82	96,50
EPM	26,44	23,01	17,86	24,44	21,72

TABELA 15 – Concentração de glicose sanguínea dos peixes não estressados e não injetados no primeiro ou quinto dia de experimento.

Peixe	T1	T5
1	49	32
2	38	87
3	59	74
1	56	52
2	54	44
3	62	23
Média	53	52
EPM	3,50	8,47

TABELA 16 – Concentração de glicose sanguínea dos peixes tratados com salina no primeiro ou quinto dia de experimento.

Peixe	T1	T5
1	138	187
2	62	99
3	163	121
4	155	157
5	84	113
6	167	93
7	126	251
8	140	104
9	87,00	134
10	104	243
11	-	207
12	-	101
13	-	54
Média	122,60	143,38
EPM	11,54	16,98

TABELA 16 – Concentração de glicose sanguínea dos peixes tratados com clorfeniramina na dose de 1 mg/kg no primeiro ou quinto dia de experimento.

Peixe	T1	T5
1	83	146
2	71	117
3	201	80
4	237	84
5	78	130
6	131	121
7	79	262
8	115	111
9	137	-
Média	125,78	131,38
EPM	19,58	20,22

TABELA 17 – Concentração de glicose sanguínea dos peixes tratados com clorfeniramina na dose de 8 mg/kg no primeiro ou quinto dia de experimento.

peixe	T1	T5
8	119	79
9	60	126
10	88	48
4	171	107
5	79	276
6	143	28
1	130	223
2	103	135
3	159	155
4	99	77
Média	115,1	125,4
EPM	11,33	24,38

## ANEXOS – ESTUDO II

TABELA 18 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com salina do experimento 1. T1: Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	234	36	16	70	15
2	54	39	165	2	30
3	123	1	17	45	10
4	96	5	1	31	2
5	108	107	38	69	47
6	109	31	70	31	30
7	118	39	40	31	88
8	150	50	80	50	31
9	93	45	39	38	7
10	38	42	5	1	28
11	124	3	1	10	1
12	38	14	33	4	66
13	113	44	91	34	31
14	37	31	16	54	27
15	37	7	34	9	19
16	45	35	33	17	3
Média	94,81	33,06	42,44	31,00	27,19
EPM	13,32	6,44	10,55	5,66	5,94

TABELA 19 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com zolantidina na dose de 20 mg/kg do experimento 1. T1: Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	31	102	239	14	82
2	67	98	33	28	4
3	121	19	1	1	59
4	303	12	6	6	15
5	81	60	276	132	200
6	62	135	36	43	51
7	54	65	91	104	34
8	32	1	21	16	31
9	161	22	80	21	8
10	129	90	28	33	40
11	102	10	16	18	39
12	44	34	50	66	7
13	159	36	20	42	3
14	98	5	1	35	2
15	86	38	32	48	11
16	38	31	33	31	48
17	41	17	66	47	40
18	33	34	10	26	86
19	41	30	33	22	32
Média	88,58	44,16	56,42	38,58	41,68
EPM	15,32	8,62	17,27	7,44	10,52

TABELA 20 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados tratados com salina do experimento 1. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4
1	60	8	16	4
2	187	305	330	176
3	142	217	205	185
4	117	54	31	102
5	175	67	60	30
6	204	245	185	120
7	37	34	34	30
8	53	43	37	40
9	330	287	49	50
10	330	330	215	7
11	138	61	107	65
12	77	330	91	187
13	215	70	61	34
14	149	7	10	15
15	40	9	2	20
16	330	255	202	330
17	35	39	33	40
18	168	90	270	75
Média	154,83	136,17	107,67	83,89
EPM	23,46	29,17	23,63	20,32

TABELA 21 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados e tratados com zolantidina na dose de 20 mg/kg do experimento 2. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T
1	101	330	330	229	330
2	330	330	220	171	118
3	330	330	119	99	45
4	144	40	37	70	22
5	91	59	42	45	42
6	202	330	330	228	186
7	53	106	208	66	195
8	276	202	235	149	185
9	249	62	42	36	36
10	238	330	252	195	330
11	163	330	211	287	64
12	63	330	238	330	330
13	67	41	61	100	128
14	204	97	330	330	330
15	172	49	10	15	330
16	57	54	70	154	330
17	79	43	310	43	290
18	37	42	37	31	13
19	64	15	37	20	30
20	69	44	170	92	330
21	16	50	12	37	8
Média	143,10	153,05	157,19	129,86	174,86
EPM	21,36	29,12	25,59	22,32	28,96

TABELA 22 – Concentração de glicose sanguínea dos peixes tratados com zolantidina na dose de 20 mg/kg no primeiro ou quinto dia de experimento.

Peixe	T1	T5
1	128	76
2	104	91
3	138	124
4	66	132
5	82	105
6	87	83
7	126	137
8	174	88
Média	113,13	104,5
EPM	12,44	8,37

### ANEXOS – Estudo III

TABELA 23 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com salina do experimento 1. T1: Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	235	275	330	41	85
2	93	99	6	78	1
3	89	84	83	99	4
4	41	35	34	21	1
5	137	330	92	65	52
6	164	14	31	38	41
7	208	218	131	106	101
8	221	54	27	22	7
9	299	134	8	37	11
10	71	29	22	33	27
11	117	88	25	35	24
12	111	117	32	43	40
13	125	92	4	14	4
14	126	159	33	33	3
15	82	4	6	16	30
16	86	89	26	5	7
17	89	80	62	10	4
18	155	24	46	162	30
19	236	123	14	7	35
20	110	133	25	9	16
21	33	23	38	54	30
22	125	292	139	163	330
23	160	68	27	83	40
24	213	209	64	10	9
25	222	36	70	36	67
Média	141,92	112,36	55	48,8	39,96
EPM	13,57	18,01	13,54	8,87	13,19

TABELA 24 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com l-histidina na dose de 100 mg/kg do experimento 1. T1: Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	98	41	37	108	40
2	121	8	5	15	1
3	101	10	7	68	7
4	73	25	55	40	22
5	93	130	105	85	30
6	50	55	27	22	11
7	127	38	48	15	25
8	204	6	2	1	25
9	119	37	122	26	15
10	96	92	46	330	43
11	68	35	92	35	40
12	293	63	83	330	330
13	195	1	5	20	4
14	280	34	31	6	38
15	62	35	6	35	41
16	76	30	46	16	4
17	152	194	45	10	24
18	194	33	30	11	35
19	156	36	20	23	34
20	61	33	42	25	11
21	127	48	25	71	25
22	32	35	31	31	25
23	34	32	33	35	34
24	64	32	11	33	56
25	91	64	34	32	42
Média	118,68	45,88	39,52	56,92	38,48
EPM	13,90	8,20	6,33	17,19	12,48

TABELA 25 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais tratados com tioperamida na dose de 10 mg/kg do experimento 1. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	76	35	26	36	41
2	163	330	41	3	8
3	85	38	30	31	3
4	117	36	98	258	70
5	89	58	185	2	1
6	126	51	330	77	41
7	85	101	69	5	82
8	93	115	8	51	59
9	107	90	45	133	45
10	115	39	39	7	5
11	110	6	7	16	12
12	204	175	200	41	60
13	38	21	12	15	5
14	101	146	233	61	125
15	72	36	8	12	1
16	186	36	60	39	30
17	49	51	22	19	1
18	41	330	262	152	76
19	112	106	2	26	11
20	105	19	9	41	12
21	84	50	36	10	9
22	133	41	7	3	14
23	141	132	196	43	38
24	217	44	244	330	125
Média	110,38	86,92	90,38	58,79	36,42
EPM	9,49	17,66	20,63	16,83	7,67



TABELA 26 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados tratados salina do experimento 2. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	1	127	120	96	46
2	85	120	78	60	227
3	253	326	207	330	42
4	120	96	38	43	43
5	119	59	74	37	51
6	189	83	330	330	131
7	330	148	103	129	24
8	309	120	123	92	48
9	153	76	19	99	35
10	290	330	330	330	172
11	154	174	68	33	69
12	152	92	14	72	5
13	330	330	330	330	5
14	5	330	185	205	93
15	31	136	146	37	169
16	330	60	221	330	330
17	330	330	226	25	330
18	305	125	114	86	83
Média	193,67	170,11	151,44	148,00	105,72
EPM	27,99	24,90	24,49	29,08	24,00

TABELA 27 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados e tratados com l-histidina na dose de 100 mg/kg do experimento 2. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	68	41	29	6	3
2	230	16	330	179	165
3	95	59	38	33	41
4	298	111	4	230	3
5	58	42	36	36	35
6	290	50	36	66	40
7	330	5	1	15	1
8	115	15	38	32	1
9	36	74	110	310	53
10	219	33	44	52	47
11	65	6	16	35	63
12	47	40	30	37	15
13	78	81	64	35	33
14	40	37	39	41	24
15	330	303	330	292	119
16	95	167	93	91	45
17	20	97	195	115	5
18	146	330	314	140	324
19	36	54	53	40	31
Média	136,63	82,16	94,74	93,95	55,16
EPM	25,05	22,22	26,97	22,69	18,70

TABELA 28 - Latências de entrada na área de alimentação dos animais estressados e tratados com tioperamida dose de 10 mg/kg do experimento 2. T1:Treino 1; T2: Treino 2; T3: Treino 3; T4: Treino 4; T5: Treino 5.

Peixe	T1	T2	T3	T4	T5
1	307	235	236	330	190
2	22	41	136	57	57
3	60	125	55	122	330
4	330	270	330	330	111
5	330	330	330	330	330
6	30	114	6	9	288
7	169	56	66	40	40
8	69	44	40	50	37
9	1	214	86	63	54
10	15	123	178	146	196
11	190	330	236	260	330
12	42	72	33	34	35
13	50	58	46	53	48
14	91	145	243	22	258
15	330	330	330	330	330
16	57	58	7	20	24
17	223	66	130	103	54
18	53	188	65	65	38
19	330	81	330	112	193
20	250	330	330	3	330
21	83	330	330	131	103
22	330	330	53	184	317
Média	152,82	175,91	163,45	127,00	167,86
EPM	27,02	24,45	26,72	24,58	26,60

TABELA 29 – Concentração de glicose sanguínea dos peixes tratados com l-histidina na dose de 100 mg/kg no primeiro ou quinto dia de experimento.

Peixe	T1	T5
1	66	277
2	66	111
3	71	159
4	92	201
5	47	111
6	68	151
7	66	73
8	51	157
9	-	95
10	-	195
Média	65,88	153,00
EPM	4,80	19,09

TABELA 30 – Concentração de glicose sanguínea dos peixes tratados com tioperamida na dose de 10 mg/kg no primeiro ou quinto dia de experimento.

Peixe	T1	T5
1	74	171
2	251	121
3	86	84
4	113	121
5	96	103
6	84	81
7	136	101
8	78	124
9	114	105
10	-	93
Média	114,67	110,4
EPM	18,32	8,25

Em seg, 30/6/08, Brazilian Journal of Medical and Biological Research  
<bjournal@fmrp.usp.br> escreveu:

De: Brazilian Journal of Medical and Biological Research <bjournal@fmrp.usp.br>

Assunto: MS7433

Para: mattioli@ufscar.br

Data: Segunda-feira, 30 de Junho de 2008, 9:46

Ref.: MS7433 L-Histidine Enhances learning in stressed and non-stressed zebrafish. L.P.V.  
Cofiel; R. Mattioli

Prezada Dra.,

Temos a satisfação de comunicar a V.Sa. o recebimento do artigo acima mencionado, o qual foi registrado com o número de referência MS7433. Favor utilizar o número da referência em futuras correspondências.

Daremos prosseguimento ao processo junto ao Editor.

Atenciosamente,

Maristela Cardoso

Secretaria

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Av. Bandeirantes 3900

14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil

fax/phone: 55+16-3630-2778

fax/phone: 55+16-3602-3173

fax/phone: 55+16-3633-3825

E-mails: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)

[bjournal@terra.com.br](mailto:bjournal@terra.com.br)

On Line Version - <http://www.bjournal.com.br/>

[www.scielo.br/bjmbr](http://www.scielo.br/bjmbr)

## ANEXOS – Estudo IV

Tabela 31: Tempo de permanência em freezing (em segundos) dos animais intactos-controle na linha de base (LB), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T).

PEIXE	BL	T1	T2	T
1	24	7	5	7
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	16	0	0	3
8	0	4	0	0
9	0	0	0	11
Média	5	1,38	0,63	2,63
EP	9,50	2,67	1,77	4,21
EPM	3,36	0,94	0,63	1,49

Tabela 25: Tempo de permanência em freezing (em segundos) dos animais intactos choque na linha de base (LB), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T).

PEIXE	BL	T1	T2	T
1	0	52	14	0
2	11	90	35	32
3	0	80	103	68
4	0	52	61	0
5	40	108	160	78
6	0	97	106	158
7	2	75	40	0
8	0	9	21	14
9	0	126	107	67
Média	5,89	76,56	71,89	46,33
EP	13,29	35,03	49,45	52,51
EPM	4,43	11,68	16,48	17,50

Tabela 26: Tempo de permanência em freezing (em segundos) dos animais do grupo ablação telencefálica total - controle na linha de base (LB), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T).

PEIXE	BL	T1	T2	T
1	7	26	40	21
2	0	38	18	0
3	5	28	131	27
4	0	0	38	5
5	0	10	160	128
6	0	29	101	38
7	11	23	40	133
8	0	0	0	3
9	18	160	120	121
10	10	0	0	17
Média	10,42	46,20	71,92	66,33
EP	13,67	56,50	59,46	63,89
EPM	3,32	13,70	14,42	15,50

Tabela 27: Tempo de permanência em freezing (em segundos) dos animais do grupo ablação telencefálica total - choque na linha de base (LB), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T).

PEIXE	BL	T1	T2	T
1	25	107	113	160
2	0	92	89	160
3	0	80	37	21
4	0	7	22	0
5	0	40	7	100
6	0	121	120	43
7	0	105	136	21
8	25	37	80	160
9	0	99	140	64
10	27	46	20	114
11	0	54	47	0
12	0	0	136	0
13	0	20	95	118
Média	10,28	58,89	83,39	65,45
EP	15,35	43,20	48,66	64,37
EPM	3,72	10,48	11,80	15,61

Tabela 28: Tempo de permanência em freezing (em segundos) dos animais do grupo ablação telencefálica medial - controle na linha de base (LB), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T).

PEIXE	BL	T1	T2	T
1	0	88	66	11
2	0	31	7	0
3	0	0	0	0
4	0	5	27	0
Média	0	31	25	2,75
DP	0	40,36	29,63	5,50
EPM	0	17,47	12,83	2,38

Tabela 29: Tempo de permanência em freezing (em segundos) dos animais do grupo ablação telencefálica medial – choque na linha de base (LB), treino 1 (T1), treino 2 (T2) e teste (T).

PEIXE	BL	T1	T2	T
1	7	129	0	0
2	0	120	56	0
3	0	48	14	14
4	0	0	0	11
5	0	111	155	148
6	7	135	14	21
7	11	8	7	47
8	0	74	0	0
9	0	40	18	18
10	0	91	19	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
Média	2,08	63,00	23,58	21,58
DP	3,90	53,67	44,33	42,22