

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

**L-HISTIDINA INDUZ DÉFICIT ESTADO DEPENDENTE NA EVOCAÇÃO DA
MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS REEXPOSTOS AO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO.**

Kelly Regina Serafim

**São Carlos - SP
2008**

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

**L- HISTIDINA INDUZ DÉFICIT ESTADO DEPENDENTE NA EVOCÇÃO DA
MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS REEXPOSTOS AO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO.**

Kelly Regina Serafim

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em fisioterapia da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Mestre em
Fisioterapia.**

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Mattioli.

**São Carlos - SP
2008**

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

S481Lh

Serafim, Kelly Regina.

L-Histidina induz déficit estado dependente na evocação da memória em camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado / Kelly Regina Serafim. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Medicina experimental - camundongo. 2. Psicobiologia. 3. L-Histidina. 4. Evocação da memória. 5. Labirinto em cruz elevado I. Título.

CDD: 619.93 (20ª)

***Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião e Olesia,
pelo apoio incondicional ,
por estarem sempre ao meu lado e
pelo verdadeiro amor que sempre me dedicaram.***

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que sempre me ajudou nas horas difíceis e me deu o dom da sabedoria.

À **Profa. Dra. Rosana Mattioli**, pela dedicada orientação científica e pela amizade durante a realização desse trabalho. Sua orientação me fez crescer profissionalmente e pessoalmente, a você minha admiração e meu respeito.

À **Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza** pela gentileza ao abrir às portas do seu laboratório e por ter me ajudado na elaboração desse trabalho.

À banca de qualificação, **Profa. Dra. Cleópatra da Silva Planeta e a Profa. Dra. Carla Christina Medalha** pelas preciosas sugestões que contribuíram intensamente para a finalização desse trabalho.

Amigos do Laboratório de Neurociências: **Fernanda, Marcos, Lú Cofiel, Diogo, Lucas e Nadiesca**. Vocês me ajudaram a superar os momentos mais difíceis, contribuíram intensamente na elaboração desse trabalho e me ensinaram a importância de termos amigos na vida.

Aos meus amigos do LPA: **Vanessa, Cilene, Letícia, Daniela, Fernando, Gabriel, Luciana, Luana e Ila**, eu sou grata pelo carinho ao me receberem nesse laboratório, pela amizade e pelos momentos divertidos que passamos juntos.

À Karina, Mariana e Renata, **minhas companheiras de casa, pelas longas conversas, pelas risadas, pelo companheirismo, enfim pela amizade que surgiu entre nós, tornando a minha caminhada mais leve.**

Ao meu irmão **Kleber**, minha cunhada, **Silvia**, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos novos amigos que conquistei durante o Mestrado: **Marê e Karina Pinto**.

À minha amiga de Pira, **Daniela**, pelo carinho e atenção.

Aos técnicos do Laboratório de Neurociências e do LPA da UFSCar: **Tereza, José**

Carlos Gaban e Adriana Maria Corsi, pelo auxílio técnico.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito da L-Histidina sobre a ansiedade e a evocação da memória em camundongos reexpostos ao labirinto em Cruz Elevado (LCE). O teste foi realizado em dois dias consecutivos. No primeiro dia (T1) os animais receberam injeção i.p. de salina (SAL) ou L-Histidina (LH) (nas doses de 500mg/kg e 200mg/kg) 40 minutos antes da realização do teste, de acordo com os seguintes grupos experimentais: SAL-SAL (n=10-11); SAL-LH (n=10-10); LH-SAL (n=10-13); LH-LH (n=10-15). Em T1 os animais foram colocados no centro do LCE com a face voltada para o braço aberto e tiveram cinco minutos para livre exploração. Em T2 os animais foram reexpostos ao LCE sob as mesmas condições experimentais acima descritas. Todas as sessões de teste foram gravadas por uma câmera posicionada acima e a aproximadamente 50° do labirinto. Durante o teste foram analisadas medidas espaços temporais (número de entradas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF); tempo gasto nos braços abertos (TBA), fechados (TBF) e no centro (TC), e suas respectivas porcentagens - %TBA, %TBF e %TC). As medidas etológicas compreenderam as frequências de esticar, mergulho e levantar. Não houve diferenças significativas entre os grupos SAL-SAL e LH-LH na dose de 200mg/kg nas EBA (Kruskal-Wallis; $p= 0,1537$) e TBA (Kruskal-Wallis; $p= 0,824$) e na dose 500mg/kg, também, não houve diferença significativa nas EBA e TBA ($F_{3,48}= 1.39$; $p>0,05$) e TBA ($F_{3,48}=1,37$; $p>0,05$) observada entre os grupos Sal-Sal e LH-LH em T1, indicando que a LH não apresentou efeito ansiolítico nas doses estudadas. Na dose de 200mg/kg ocorreu uma diminuição das EBA para os grupos SAL-SAL (Wilcoxon; $P= 0,017823$), SAL-LH (Wilcoxon; $P= 0,00021$) e LH-SAL (Wilcoxon; $P= 0,007$) e no TBA somente para os grupos SAL-SAL (Wilcoxon; $P= 0,0166$) e SAL-LH (Wilcoxon; $P= 0,0284$). Na maior dose foi observado que o grupo LH-SAL reduziu as EBA e TBA [$(F(1,48) = 13.01$ e 43.56 ; $p < 0.05$, respectivamente] em T2, indicando que a aquisição e o armazenamento da memória não foram afetados pela LH. Além disso, o grupo LH-LH não reduziu as EBA e o TBA ($p>0.05$), durante a reexposição, em ambos os tratamentos propostos. Todos os resultados acima descritos foram observados sem alterações na atividade locomotora representada pelas EBF ($p>0,05$). A análise dos comportamentos etológicos revelou que em ambas as doses, a frequência de mergulhar diminuiu durante a reexposição ($p< 0,05$). E em ambos os tratamentos, o grupo LH-LH não reduziu a frequência de esticar ($p< 0,05$) indicando um déficit para evocar a memória. Nossos resultados indicam que a LH não apresenta efeito ansiolítico mas induz déficit estado dependente na evocação da memória em camundongos.

Palavras-chaves: L-Histidina, camundongo, evocação da memória, labirinto em cruz elevado

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effects of L-Histidine (a histaminergic precursor) on anxiety and memory retrieval in mice using the elevated plus maze (EPM). The test was performed on two consecutive days. On the first day (T1), the animals received an i.p injection of saline (SAL) or L-Histidine (LH), 40 minutes before the test at dose of 200mg/kg and 500mg/kg. The following experimental groups were formed: SAL-SAL (n=10-11); SAL-LH (n=10-10); LH-SAL (n=10-13) and LH-LH (n=10-15). Testing begun by placing the subjects on the central platform of the maze facing an open arm and test sessions were 5 min in duration. A similar procedure was carried out for animals in the retest condition (T2) (i.e prior maze experience). During the test we analyzed behavioural parameters that comprised both conventional and ethological measures. All sessions were video-recorded by a camera positioned above and ~50 ° to the maze. Conventional measures were the frequencies of total, open (OAE) and closed arm entries, time spent in open (OAT) and closed (CAT) and central parts (CT) of the maze, and its respectively percentage %OAT, %CAT and %TC. Ethological measures comprised frequency scores for rearing; head-dipping (Dip) and stretched-attend postures (SAP). No significant differences were found, at the 200mg/kg dose, in open arm entries (Kruskall-Wallis; $P=0,1537$) and open arm time (Kruskall-Wallis; $P=0,824$), and at 500mg/kg dose no significant differences were observed in OAE and OAT [$F(1,48)=43,56$; $13,01$, $p<0,05$, respectively) between the Sal-Sal and LH-LH groups in T1, indicating that L-histidine had no anxiolytic effect. At 200mg/kg dose a decreased of OA entries was observed for the SAL-SAL (Wilcoxon; $P=0,017823$), SAL-LH (Wilcoxon; $P=0,00021$) and LH-SAL (Wilcoxon; $P=0,007$) groups and in the OA time only for the SAL-SAL (Wilcoxon, $P=0,0166$) and SAL-LH (Wilcoxon; $P=0,0284$) groups. At the highest dose the LH-Sal group reduced open arm time and entries ($[F(1,48)=13,01$ and $43,56$; $p<0,05$) on the second trial, indicating that acquisition and storage was not affected by LH. Further, the LH-LH group did not reduce exploration time of the open arms during re-exposure, in both days indicating an inability to evoke memory. No alteration in the locomotor activity represented by CAE was observed ($p>0,05$). Regarding a ethological behaviors, in both doses, the frequencies of Dipping was decreased ($p<0,05$) in the reexposure. In both treatment, the LH-LH group did not reduce the ratio of SAP during the retest, indicative of failure to evoke memory ($p<0,05$). Therefore, our results indicating that LH did not show anxiolytic effects but induces a state-dependent memory retrieval deficit in mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sistema Neural Histaminérgico	15
Figura 2. camundongos da cepa suíço-albino	24
Figura 3. Labirinto em Cruz Elevado	26
Figura 4. Efeito da LH (200mg/kg) ou SAL injetadas i.p, pré T1 e pré T2 em camundongos expostos e re-expostos ao LCE. As colunas representam as médias e erro padrão das médias (M+EPM) das entradas nos braços abertos do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1 (Wilcoxon)	31
Figura 5. Efeito da LH (200mg/kg) ou SAL injetadas i.p, pré T1 e pré T2 em camundongos expostos e re-expostos ao LCE. As colunas representam as médias e erro padrão das médias (M+EPM) do tempo gasto nos braços abertos do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1 (Wilcoxon)	31

Figura 6. Efeito da LH (500mg/kg) ou SAL injetadas i.p, pré T1 e pré T2 em camundongos expostos e re-expostos ao LCE. As colunas representam as médias e erro padrão das médias (M+EPM) das entradas nos braços abertos do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1 (ANOVA seguido do teste de Fisher's LSD) **32**

Figura 7. Efeito da LH (500mg/kg) ou SAL injetadas i.p, pré T1 e pré T2 em camundongos expostos e re-expostos ao LCE. As colunas representam as médias e erro padrão das médias (M+EPM) do tempo gasto nos braços abertos do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1 (ANOVA seguido do teste de Fisher's LSD) **32**

Figura 8. Efeito da LH (200mg/kg) ou SAL injetadas i.p, pré T1 e pré T2 em camundongos expostos e re-expostos ao LCE. As colunas representam as médias e erro padrão das médias (M+EPM) do tempo gasto nos braços fechados do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1 (Wilcoxon) **34**

Figura 9. Efeito da LH (500mg/kg) ou SAL injetadas i.p, pré T1 e pré T2 em camundongos expostos e re-expostos ao LCE. As colunas representam as médias e erro padrão das médias (M+EPM) do tempo gasto nos braços fechados do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1 (ANOVA seguido do teste de Fisher's LSD). **34**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Efeito da LH (200mg/kg) ou salina administrada i.p, pré T1 e T2, nos comportamentos de camundongos submetidos ao LCE. **36**
- Tabela 2. Efeito da LH (500mg/kg) ou salina administrada i.p pré T1 e T2, nos comportamentos de camundongos submetidos ao LCE. **37**

LISTA DE ABREVIATURAS

BAs – braços abertos
CPA – clorferinamina
DPM – desvio padrão da média
EBA – entrada nos braços abertos
% EBA – percentagem de entradas nos braços abertos
EBF – entrada nos braços fechados
% EBF - percentagem de entradas nos braços fechados
EPM – erro padrão da média
HA - Histamina
i.c.v - intracerebroventricular
i.p – intraperitoneal
Kg - kilograma
LH - L-Histidina
LCE – labirinto em cruz elevado
M+EPM – média + erro padrão da média
mg – miligrama
n – número de sujeitos
Sal – salina
T1 - teste 1
T2 –teste 2
TBA – tempo gasto nos braços abertos
% TBA – percentagem de tempo gasto nos braços abertos
TBF – percentagem de tempo gasto nos braços abertos
% TBF – percentagem de tempo gasto nos braços fechados
TC – tempo gasto no centro do labirinto
% TC – percentagem de tempo gasto no centro do labirinto
TE – total de entradas
TM – núcleo tuberomamilar
SNC – sistema nervoso central
SNH – sistema neural histaminérgico

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisa e Aprendizagem (LPA) do departamento de Psicologia da UFSCar, sob orientação da Profa. Dra. Rosana Mattili e da profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós- Graduação em Fisioterapia. Este trabalho contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Comportamentos emocionais	12
1.2 Histamina e os receptores histaminérgicos	13
1.3 Sistema neural histaminérgico, aprendizagem e memória	16
1.4 Atuação do sistema histaminérgico na modulação da ansiedade e da memória emocional	19
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Sujeitos	23
3.2 Drogas	24
3.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	24
3.4 Procedimento	25
3.5 Análise Comportamental	26
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5 RESULTADOS	29
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
APÊNDICES	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comportamentos emocionais

A memória é um processo cognitivo crítico para se estabelecer uma identidade como indivíduo e é necessária para percorrer os vários caminhos, nos quais nossas experiências passadas são usadas para interpretar e agir sobre nossas experiências futuras (CURRAN & MINTZER, 2006). O amplo espectro envolvido nos processos de memória (memória para eventos, indivíduos, fatos, comportamento motor e emoções) é extremamente importante para a sobrevivência, bem-estar e adaptação dos organismos mais complexos (TRONSON & TAYLOR, 2007).

Durante a primeira metade do século XX, teve início uma série de pesquisas relacionadas com o comportamento emocional. Esses comportamentos são assim definidos por estarem envolvidos com algum componente emocional como, por exemplo, a ansiedade e o medo. As respostas emocionais exibidas durante as experiências com estimulação emocional (por ex: defesa contra um perigo e luta com um predador) mostram-se essenciais para a sobrevivência do indivíduo e de sua espécie (LEDOUX, 2000). Adicionalmente, a análise dos estados emocionais em animais é realizada em diferentes áreas de pesquisas, e o objetivo final dessas investigações é verificar e estabelecer estados e reações emocionais que ocorrem diante de um estímulo específico ou de situações que envolvam emoção (PAUL et al., 2005).

Uma ampla variedade de métodos tem sido empregada para se avaliar estados emocionais em animais de diferentes espécies. Entretanto, maior atenção tem sido depreendida para a análise das reações emocionais em mamíferos (HAUG & WHALEN, 1999). Outra consideração relevante é que a maioria das investigações realizadas em animais tem focalizado os estados emocionais negativos, como medo, ansiedade e estresse (PAUL et., al., 2005).

A ansiedade e o medo estão relacionados com a memória emocional, e segundo Graeff (1989) e Blanchard et al (1990) o medo é uma reação emocional desencadeada por situações específicas de perigo e ameaça, e é também, uma força motivacional para comportamentos defensivos. Enquanto a ansiedade é desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial. Segundo, Misslin (2003), o medo é comportamento inato e defensivo que representa uma parte do repertório comportamental espécie-específico cujo objetivo é a sobrevivência de indivíduos e espécies, protegendo, assim, os seres vivos dos perigos, ameaças e estímulos aversivos.

O maior foco das investigações dos processos cognitivos está relacionado com o processo de aprendizagem e memória. Alguns estudos têm sido direcionados para o fato de que algumas experiências vivenciadas pelo animal no seu ambiente podem influenciar no seu comportamento emocional. Segundo Zhu e colaboradores (2006) a estimulação ambiental causa mudanças neuroquímicas, neuroanatômicas e comportamentais. Além disso, as memórias formadas durante as experiências emocionais (memória emocional) são recordadas durante as nossas vidas mais facilmente (CURRAN & MINTZER, 2006). Alguns estudos ainda sugerem que a liberação de hormônios do estresse durante experiências emocionais desempenha um papel importante na mediação dos efeitos da estimulação emocional na memória de longa duração (MCGAUGH, 2004).

Devido às evidências da importância da relação entre os processos de aprendizagem e memória com as experiências emocionais, estudos farmacológicos têm sido realizados com o objetivo de investigar a função dos neurotransmissores sobre esses processos cognitivos. Entre os neurotransmissores estudados, a Histamina (HA) tem sido alvo de muitas pesquisas, uma vez que está relacionada a uma série de funções cerebrais, incluindo a aprendizagem e memória (HAAS & PANULA, 2003).

1.2 Histamina e os receptores histaminérgicos

A HA é uma amina (4-(2-ominoetio) imizadol (O β imidazolelitamina) sintetizada e transportada no cérebro da maioria das espécies animais. Segundo Almeida & Beaven (1981) a quantidade de HA neuronal não é igual entre as espécies. Nos vertebrados filogeneticamente mais antigos, que apresentam córtex e cerebelo menos desenvolvidos, a HA aparece em maior quantidade quando comparados com os mamíferos. Por outro lado, a distribuição geral do sistema neural histaminérgico (SNH) é similar em todos os vertebrados estudados (PANULA et al., 1990).

Os neurônios histaminérgicos estão confinados numa pequena região do hipotálamo posterior no núcleo tuberomamilar (TM) (YANAY & TASHIRO, 2007) e a presença do SNH foi reportada pela primeira vez através de estudos realizados por Watanabe e colaboradores (1983). A precisa localização e distribuição desse sistema foram demonstradas no cérebro de ratos usando um anticorpo para a enzima L-histidina descarboxilase (enzima responsável pela formação da histamina) em 1984 (WATANABE et al., 1984) (Figura 1).

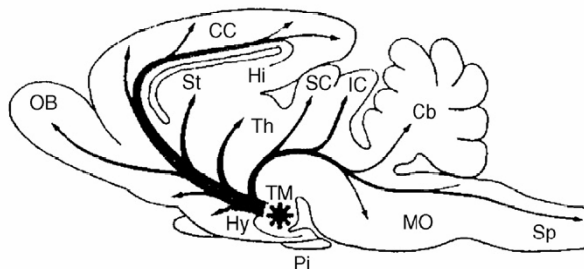


Figura 1. Figura esquemática da distribuição das fibras nervosas histaminérgicas nos cérebros de ratos (secção sagital). Abreviações: Cb: cerebellum; CC cerebral córtex; Hi Hippocampus; Hy hipotálamo; IC, inferior colliculus; MO, medulla oblongata; OB, olfactory bulb; Pi pituitary; SC, superior colliculus; SP, spinal Cord; St, striatum; Th, thalamus; TM, tuberomammillary nucleus. (Yanai e Tashiro, 2007)

Segundo, Inagaki e colaboradores (1991) a HA é liberada a partir de fibras varicosas que se projetam predominantemente de maneira ipsilateral para todo o sistema nervoso central (SNC), incluindo a maioria dos núcleos subcorticais e córtex cerebral (WADA et al., 1991). Os neurônios histaminérgicos enviam projeções através da via ascendente ventral para o hipotálamo, banda-septo-diagonal e bulbo olfatório, enquanto que a via posterior inerva o tálamo, o hipocampo e a amígdala (BROWN et al., 2001). Já as fibras descendentes projetam-se principalmente para o cérebro e medula (KHOLER et al., 1985).

A HA possui ainda a característica de não atravessar prontamente a barreira hematoencefálica. No cérebro, é formada a partir da L-histidina (LH) que é descarboxilada quase exclusivamente pela ação da enzima L-histidina descarboxilase, a qual pode ser bloqueada pelo inibidor α -fluormetilhistidina (α -FMH) (BROWN et al., 2001).

Nos mamíferos a HA interage com seus receptores específicos H1, H2 e H3, que estão distribuídos irregularmente por todo o cérebro. No entanto, a distribuição desses receptores parece ser espécie-específica (MARTINEZ-MIR et al., 1990). Os receptores histaminérgicos medeiam às ações características da HA em nível celular, sináptico e comportamental (HAAS & PANULA, 2003). Além dos receptores H1, H2 e H3, um quarto receptor (H4) foi identificado, sendo detectado predominantemente na periferia (medula óssea e leucócitos) (NGUYEN et al., 2001).

Os receptores histaminérgicos H1 centrais são os sítios responsáveis pela ação sedativa dos anti-histamínicos, estando presentes em altos níveis nas áreas envolvidas com a vigília (tálamo, córtex, grupos de células colinérgicas, locus coeruleus e núcleo da rafe) (BROWN et al., 2001). No cérebro de ratos adultos esses receptores são encontrados em alta densidade em regiões do sistema límbico, como por exemplo, na amígdala e áreas hipocámpais (BOUTHENET, et al., 1988).

Os receptores H2 apresentam uma ampla expressão no cérebro e medula espinhal, e altas densidades são encontradas particularmente nos gânglios da base e em parte do sistema límbico (hipocampo e amígdala) (BROWN et al., 2001). No entanto baixas densidades do receptor H2 são encontradas em áreas septais e núcleos hipotalâmicos (VIZUET et al., 1997).

Os receptores H3 foram inicialmente localizados em sítios pré-sinápticos do SNH (YANAI & TASHIRO, 2007), podendo ser encontrados predominantemente em regiões do globo pálido, hipocampo e áreas corticais (MARTINEZ-MIR et al., 1990). Esse tipo de receptor foi detectado como um auto-receptor envolvido no controle e liberação da HA através de retroalimentação negativa nas terminações nervosas histaminérgicas, indicando que a HA pode reduzir pré-sinápticamente sua própria liberação a partir das terminações axonais (PASSINI et al., 2000). Sendo assim, a síntese e a liberação da histamina são inibidas através da ativação desse receptor (BROWN et al., 2001).

A ampla distribuição dos receptores histaminérgicos por todo o SNC, principalmente nas áreas envolvidas com a emoção, faz com que esse sistema esteja relacionado com várias funções cognitivas (PASSANI et al., 2000). E, devido à complexidade neuromodulatória entre o SNH e outros sistemas, por exemplo o acetilcolinérgico, envolvidos em processos cognitivos pode-se sugerir a atuação da HA sobre a aprendizagem e a memória (BACCIOTTINI et al., 2000).

1.3 Sistema neural histaminérgico, aprendizagem e memória

O SNH está envolvido com uma ampla variedade de funções cerebrais, por exemplo, controle do ciclo do sono e vigília; funções neuroendócrina, autonômica e vestibular; modulação da atividade locomotora, comportamento alimentar, agressividade; e plasticidade sináptica (para revisão ver HAAS & PANULA, 2003). Existem estudos que sugerem a ação da HA na regulação do estado de alerta (PASSANI et al., 2007), na modulação dos comportamentos defensivos (SANTOS et al., 2001; 2002), na plasticidade e recuperação funcional do cérebro (HUSTON et al., 1997., PIRATELLO & MATTIOLI, 2004), e com o desenvolvimento de algumas doenças como Doença de Alzheimer, Síndrome de Down e Depressão (ISHUNINA et al., 2003).

Existem evidências que indicam que a manipulação do SNH em paradigmas de aprendizagem e memória modifica o comportamento animal, porém os

resultados dessas investigações ainda são contraditórios (BLANDINA et al., 2004). Investigações sobre o SNH e a sua relação com alguns processos cognitivos, sugerem que esse sistema tem ação modulatória na aprendizagem e memória (RUBIO et al., 2001). Entretanto, o atual papel dos agonistas e antagonistas histaminérgicos durante a aquisição, o armazenamento da informação, e a evocação da memória necessitam de maior esclarecimento (DA SILVA et al., 2006). Em peixes, a inibição do sistema histaminérgico pela Clorfeniramina (CPA), um antagonista histaminérgico do receptor H1, administrada intraperitonealmente (i.p.) acelerou o processo de recuperação funcional após lesão vestibular (PIRATELLO & MATTIOLI, 2004) e facilitou a aprendizagem com reforço positivo, melhorando a consolidação da memória de longa duração (SPIELER et al., 1999). A administração de CPA mostrou que esses animais permaneciam mais tempo no ambiente pareado, sugerindo um efeito reforçador positivo dessa droga nas doses utilizadas no experimento (MATTIOLI et al., 1996).

A administração intracerebroventricular (i.c.v.) dos antagonistas dos receptores H1 e H2, cimetidina e pirilamina, respectivamente, facilitou a retenção da memória, em um teste de esQUIVA inibitória em ratos. Em um estudo realizado por Eidi e colaboradores (2003) a administração da HA prejudicou a retenção da memória. Experimentos com lesões eletrolíticas e neuroquímicas no núcleo TM sugerem que a atividade histaminérgica reduzida é favorável sobre o reforço e a aprendizagem (HUSTON et al., 1997). Lesões bilaterais do núcleo TM também proporcionaram a facilitação da aprendizagem (KLAPDOR et al., 1994).

De Almeida e colaboradores (1986) demonstraram o efeito facilitador da HA após injeção i.c.v. em ratos em um teste de esQUIVA ativa. Adicionalmente, os resultados obtidos por Prast e colaboradores (1996) indicaram que a histamina, a LH, precursor da histamina, e a tioperamida (antagonista histaminérgico do receptor H3, que aumenta a quantidade de HA na fenda sináptica) têm um efeito facilitador na aquisição da memória de curta duração em um teste de memória social em ratos. Estes autores sugerem ainda que a inibição da síntese da histamina pela α -fluormetilhistidina tem um efeito negativo no processo de memória.

A tioperamida administrada pré-teste melhorou o desempenho de ratos num paradigma de esQUIVA inibitória (KOMATER et al., 2003) e melhorou também a

aprendizagem em ratos velhos (MEGURO et al., 1995). Entretanto, trabalhos realizados por Rubio e colaboradores (2001) mostraram que o tratamento i.p de (R)-alfa-metilhistamina, agonista do receptor H3, facilitou a aprendizagem no teste de esquiwa e facilitou a evocação da memória espacial em ratos.

Em peixes, a aplicação de α -fluormetilhistidina, substância inibidora específica da enzima histidina descarboxilase, teve um efeito inibitório na consolidação da memória de longa duração (PEITSARO et al., 2003). A LH reverteu o déficit da memória de trabalho induzido pela droga 8-OH-DPAT (agonista do receptor serotoninérgico 5-HT1A) em ratos no labirinto radial (ISAYAMA et al., 2001). Enquanto que a administração da LH no núcleo acumbente exerceu efeito reforçador em ratos (HASENOHRL et al., 2001).

Segundo Passani e colaboradores (2000) a razão para essas discrepâncias no envolvimento do SNH nos processos relacionados com aprendizagem e memória, poderia ser elucidada, através do conhecimento da ação distinta e opostora que os neurônios TM histaminérgicos poderiam exercer. Além da ampla distribuição no cérebro dos mamíferos, o SNH também parece estar relacionado à ativação de diferentes tipos de receptores em diversos sistemas envolvidos nos processos cognitivos (PANULA et al., 1984; 1990).

As pesquisas realizadas usando peixes como sujeito experimental em nosso laboratório (MEDALHA et al., 2003; COFIEL & MATTIOLI, 2006) foram baseadas nas suposições de que os aspectos contraditórios do SNH nas funções cognitivas poderiam ser mais facilmente resolvidos através do uso de uma espécie que tem somente um único sítio de projeção para o telencefalo (EKSTROM et al., 1995). Porém, essa estratégia não foi suficiente para esclarecer o envolvimento da HA na aprendizagem e memória. Diferentes modelos usados em nossos trabalhos (preferência por lugar, aprendizagem apetitiva e compensação vestibular) continuaram a mostrar resultados discrepantes (COELHO et al., 2001; MEDALHA & MATTIOLI, 2007; PIRATELLO & MATTIOLI, 2007).

Além disso, recentes trabalhos (RODRIGUEZ et al., 2002; PORTAVELLA et al., 2005) têm sugerido a existência de diferentes sistemas de aprendizagem em peixes como a aprendizagem emocional. Em concordância com esses estudos,

Faganello & Mattioli (2007) mostraram que a CPA poderia ter um efeito amnésico, ansiolítico e/ou analgésico e que esses efeitos poderiam, também, ocorrer através da modulação de algum componente da aprendizagem emocional.

1.4 Atuação do sistema histaminérgico na modulação da ansiedade e da memória emocional

Alguns estudos têm revelado a participação da histamina neural nos comportamentos relacionados com o medo e a ansiedade (FRISCH et al., 1998). Segundo Yuzurihara e colaboradores (2000) tanto a HA derivada das células neuronais quanto das células não neuronais desempenham um importante papel na indução da ansiedade experimental.

Em peixes, a relação entre o SNH e a ansiedade tem sido sugerida em estudos comportamentais (MATTIOLI et al., 1998; PEITSARO et al., 2003). Em paralelo com esses trabalhos, estudos com roedores também têm mostrado o envolvimento do SNH em estados de ansiedade (ITO et al., 1999; MALMBERG-AIELLO et al., 2002).

Experimentos realizados com ratos que foram submetidos a um teste de estresse de contenção de forma aguda (imobilização por 1 hora) e crônica (imobilização por 1 hora durante 21 dias) revelaram um aumento da HA durante o estresse agudo no diencéfalo (principal sítio de concentração de HA), núcleo acumbente e estriado. No estresse crônico houve um aumento da atividade da enzima que metaboliza a HA, a N-metiltransferase (HMT) no núcleo acumbente e estriado (ITO et al., 1999). Yuzurihara e colaboradores (2000) sugeriram que a liberação da HA neuronal e não neuronal leva à indução da ansiedade experimental num teste claro/escuro em ratos. **Em um estudo semelhante, Malmberg-Aiello e colaboradores (2002) mostraram que substâncias capazes de intensificar a transmissão histaminérgica reduzem o tempo gasto no compartimento claro, indicando um provável efeito ansiogênico da HA.**

Além dos modelos acima citados para avaliar a ansiedade induzida

experimentalmente, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um teste clássico usado para a detecção dos efeitos de drogas ansiogênicas e ansiolíticas, já que a sua aplicação é fácil e rápida (CRUZ et al., 1994; ANSELONI & BRANDÃO, 1997). O teste é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos (FERNANDES & FILE, 1996), sendo também de grande validade em testes farmacológicos e de critérios comportamentais (LISTER, 1990; PELLOW et al., 1985). O LCE tem sido utilizado, também, para o entendimento das bases biológicas das emoções relacionadas com a aprendizagem e memória, dor, e com os vários tipos de desordens relacionadas com a ansiedade, como por exemplo, a fobia e o estresse pós-traumático (ADAMEC et al., 1998; LAMPREA et al., 2000; BANNERMAN et al., 2004).

Uma das principais características desse teste é o conflito resultante da tendência natural dos animais de se aproximarem ou evitarem situações perigosas (CRUZ-MORALES et al., 2002). Uma outra característica interessante desse modelo animal está relacionada ao efeito da prévia experiência ao teste. Estudos sugerem que a re-exposição aumenta a esquia dos braços abertos (BA) (FERNANDES & FILE, 1996; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000).

Durante a re-exposição, o aumento da esquia dos BA no LCE pode estar relacionado com a memória emocional dessas áreas do labirinto consideradas potencialmente perigosas (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Segundo Dal-Cól e colaboradores (2003) a memória emocional pode ser avaliada através do paradigma T1/T2, ou seja, 24 horas depois de T1 os animais desenvolvem um aumento da esquia dos BA (ESPEJO, 1997) indicando que uma exposição prévia ao labirinto aumenta significativamente o medo em uma exposição subsequente. Segundo Blanchard e colaboradores (1990) a ameaça imediata causa comportamento de esquia, enquanto que a ameaça em potencial gera um conflito entre aproximação e avaliação de risco. Então, esse conflito gerado no LCE seria responsável por todo o repertório comportamental expressado pelo animal (GRAY & MACNAUGHTON, 2000).

Alguns estudos têm focado a relação entre as drogas histaminérgicas, a ansiedade e a memória no LCE. Resultados obtidos por Frisch e colaboradores (1998) concedem evidências de que lesões do núcleo TM da região E2 podem induzir um efeito ansiolítico em ratos, indicado pelo aumento do tempo gasto nos BA do LCE, e

diminuição do tempo gasto nos braços fechados (BF). Alvarez & Ruarte (2002) mostraram que a HA administrada no hipocampo e amígdala de ratos, prejudicou a aprendizagem e a memória que envolve a ansiedade num modelo para resposta de esquiva ativa. Em outro estudo, a LH reduziu o déficit de aprendizagem induzido pela escopolamina em camundongos expostos ao LCE (MIYASAKI et al., 1995).

A HA administrada na amígdala de ratos submetidos ao LCE parece ter um efeito ansiogênico que pode ser revertido pela ação do antagonista H1, pirilamina, mas não pelo antagonista H2, cimetidina. Esses estudos apontam para a atuação do receptor H1, mas não o H2, na modulação dos comportamentos relacionados com a ansiedade (ZARRINDAST et al., 2006). A HA também apresentou efeito ansiogênico quando administrada no hipocampo de ratos (ROSTAMI et al., 2006). Camundongos que receberam injeções i.p de LH mostraram um aumento do tempo gasto nos BA de maneira dose dependente, sugerindo um efeito ansiogênico dessa droga (KUMAR et., 2007).

Corroborando com os trabalhos acima citados, estudos realizados por Cangioli e colaboradores (2002) mostraram que o SNH tem atuação na consolidação da memória que envolve o medo (memória emocional) em roedores, e que esse mesmo sistema provoca comportamentos que permitem inferir efeito ansiogênico (BONGERS et al., 2003). Sendo assim, esses estudos parecem direcionar para uma atuação do SNH na modulação da ansiedade e dos componentes relacionados com a memória emocional.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi investigar a atuação da L-Histidina sobre a ansiedade e a evocação da memória emocional em camundongos expostos e re-expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Foram usados camundongos da cepa suíço-albino (figura 2), machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com idade entre 12 e 15 semanas na época do teste. Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas (41×34×16 cm, 10 por gaiola) em condições controladas de temperatura ($24\pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55\pm 5\%$), luz (ciclo claro/escuro de 12 horas). Todos os testes foram conduzidos na fase clara do ciclo de luz (entre 9:00 e 15:00 horas). Comida e água estavam disponíveis *ad libitum* exceto no curto período de tempo durante o experimento. Todos os animais eram experimentalmente ingênuos.

Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética na Experimentação Animal da UFSCar. Todos os esforços foram feitos para reduzir o sofrimento dos animais.



Figura 2. camundongos da cepa suíço-albino

3.2 Drogas

A droga usada no presente estudo foi a L-histidina (Research Biochemicals International, USA). A droga foi dissolvida em solução salina estéril (0,9%). A injeção foi administrada via intraperitoneal (i.p.) no volume de 2ml/kg de peso corporal do animal. As doses finais utilizadas foram 200mg/kg e 500mg/kg. Essas doses foram baseadas em estudos prévios realizados em nosso laboratório (MEDALHA et al., 2000; COELHO et al., 2001). A solução salina foi usada como controle e, ambas as doses de droga e a solução salina foram colocadas em tubos eppendorf codificados sob refrigeração. Esta codificação era desconhecida pelo examinador no momento do teste.

3.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O equipamento usado foi o LCE (Figura 3) validado para ratos (PELLOW et al., 1985) e camundongos (LISTER, 1987). O labirinto é feito de madeira e consiste em dois braços abertos (30,0×5,0×0,25 cm) e dois braços fechados com paredes de vidro transparente (30,0×5,0×15,0 cm), unidos a uma plataforma central (5,0cm×5,0cm) e elevado a uma altura de 38,5cm do solo por um suporte de madeira. A exploração dos braços abertos é encorajada pela inclusão de uma fina borda de acrílico (0,25cm) ao redor do seu perímetro. A iluminação utilizada foi de 77 lux no assoalho da plataforma central.

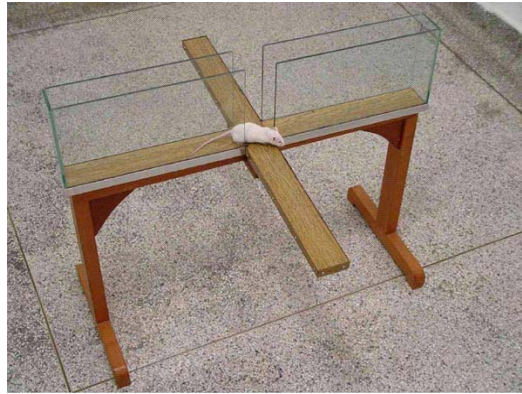


Figura 3. Labirinto em Cruz Elevado - LCE.

3.4 Procedimento

O experimento foi realizado em dois dias consecutivos, sendo que no primeiro dia de teste (T1) foi realizada a exposição do animal ao LCE e no segundo dia (T2) foi feita a re-exposição. Para facilitar a adaptação, em T1, os animais foram transportados para uma sala do laboratório, e foram deixados neste ambiente por pelo menos uma hora antes da realização do mesmo.

Os animais foram agrupados aleatoriamente em 8 grupos experimentais, segundo a tabela abaixo:

Tabela 1 - Grupos de tratamentos submetidos ao LCE - tratamento pré T1 e T2, realizado 40min antes do teste.

Grupos experimentais	N	Tratamento (mg/kg)	
		T1	T2
SAL-SAL	10	Salina	Salina
SAL-LH	10	Salina	LH 200
LH-SAL	10	LH 200	Salina
LH-LH	10	LH 200	LH 200
SAL-SAL	11	Salina	Salina
SAL-LH	10	Salina	LH 500
LH-SAL	15	LH 500	Salina
LH-LH	13	LH 500	LH 500

A exposição começou colocando-se o sujeito na plataforma central do labirinto, com a face voltada para o braço aberto, quando foi permitindo ao animal a livre exploração do ambiente por cinco minutos. Depois de cada teste, o labirinto foi limpo com álcool 20%. Em T2, os animais foram re-expostos ao LCE seguindo-se os mesmos procedimentos acima descritos. Em ambos os dias, os animais receberam o tratamento farmacológico 40 minutos antes de serem testados.

3.5 Análise Comportamental

Os cinco minutos permitidos para os animais explorarem o labirinto foram analisados através das gravações em vídeo, avaliando-se as medidas espaço-temporais convencionais (LISTER, 1987) e os comportamentos etológicos (CRUZ et al., 1994; RODGERS & JOHNSON, 1995). Todos os comportamentos foram gravados por uma câmera posicionada aproximadamente a 50° do labirinto, permitindo assim a discriminação e a documentação dos mesmos. As gravações foram analisadas por um observador treinado usando um programa de análise etológica. Os comportamentos foram analisados utilizando o programa de computador X- PLOT-Rat, 2005 (GARCIA et

al., 2005) desenvolvido no laboratório do Comportamento Exploratório da USP/ Ribeirão Preto (<http://scotty.ffclrp.usp.br>).

As medidas convencionais compreenderam a frequência de entradas nos braços abertos e fechados (EBA e EBF) e o total de entradas (TE). A entrada nos braços foi considerada quando as quatro patas do animal estavam dentro do braço. O tempo gasto nos braços abertos (TBA), fechados (TBF) e na plataforma central (TC), também foram analisados. Esses dados foram usados para calcular a porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas: $[EBA/TE] \times 100$; Tempo $[\text{tempo no compartimento} / 300] \times 100$).

A diminuição da atividade nos braços abertos (entradas e tempo de permanência nos braços abertos) foi definida como índice de aprendizagem e memória. O número de entradas nos braços fechados foi considerado como um índice da atividade locomotora (CRUZ et al., 1994).

A análise do comportamento animal tem sido aperfeiçoada através da visão etológica detalhada necessária para elucidar a complexa estrutura comportamental dos roedores observada no LCE (ESPEJO & MIR, 1993). Assim, a análise etológica é utilizada juntamente com as medidas convencionais para reforçar os resultados obtidos durante a análise clássica.

A análise dos comportamentos etológicos foi realizada através do registro de algumas atitudes e posturas dos animais no labirinto, como o levantar, o mergulho e o esticar. Estas categorias foram definidas por estudos realizados em ratos (CRUZ et al., 1994; ANSELONI & BRANDÃO, 1997) e em camundongos (RODGER & JOHNSON, 1995). O levantar é definido operacionalmente como o levantamento parcial ou total dos membros anteriores. O mergulho é verificado pelo movimento exploratório da cabeça e ombros para fora dos limites do labirinto, e para baixo em direção ao chão. A postura de esticar o corpo (stretched attend postures - SAP) é observada quando o animal estica todo o seu comprimento e retorna a posição anterior sem qualquer movimento para frente das suas patas posteriores.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade da variância. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, tendo como fatores independentes o tratamento farmacológico e o dia de teste. As diferenças entre os grupos obtidas pelos valores de P significativos foram identificadas pelo teste Fisher's LSD (Protected t-Tests).

Os dados que não apresentaram homogeneidade foram submetidos ao teste de variância de Kruskal-Wallis para analisar as diferenças entre os grupos e o teste de Wilcoxon para analisar as diferenças entre os dias de teste T1 e T2.

Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

As figuras 4 e 5 mostram o efeito da injeção sistêmica de LH (200mg/kg) sobre os comportamentos de camundongos expostos e re-expostos ao LCE.

Em T1 o teste de Kruskal-Wallis não apontou diferenças significativas entre os grupos nas EBA (Kruskal-Wallis, $p=0,1537$) e no TBA (Kruskal-Wallis, $p=0,824$). Na re-exposição o teste de Wilcoxon mostrou uma diminuição nas EBA para os grupos SAL-SAL (Wilcoxon, $p=0,017823$), SAL-LH (Wilcoxon, $p=,00021$) e LH-SAL (Wilcoxon $p= 0,007$), enquanto que o grupo LH-LH não apresentou alterações nas EBA ($p>0,05$). Foi observada uma diminuição no TBA somente para os grupos SAL-SAL (Wilcoxon, $p=0,0166$) e SAL-LH (Wilcoxon, $p=0,0284$). Nos grupos LH-LH e LH-SAL não houve diferenças significativas ($p>0.05$).

Em T1, os resultados da ANOVA de duas vias não apontaram efeitos significativos do tratamento farmacológico na dose de 500mg/kg nas EBA ($F_{3, 48}= 1.39$; $p>0,05$) e TBA ($F_{3,48}=1,37$; $p>0,05$) entre os grupos. O teste Fisher's LSD mostrou que em T2 houve uma redução da atividade nos BA para os grupos SAL-SAL, SAL-LH e LH-SAL representada pelas medidas: EBA ($F_{(1,48)}=13,01$; $p<0,05$) e TBA ($F_{1, 48}=43,56$; $p<0.05$) (figuras 6 e 7). Por outro lado, não foram observadas mudanças significativas nas EBA e TBA para os animais tratados com LH entre T1 e T2 ($p>0,05$).

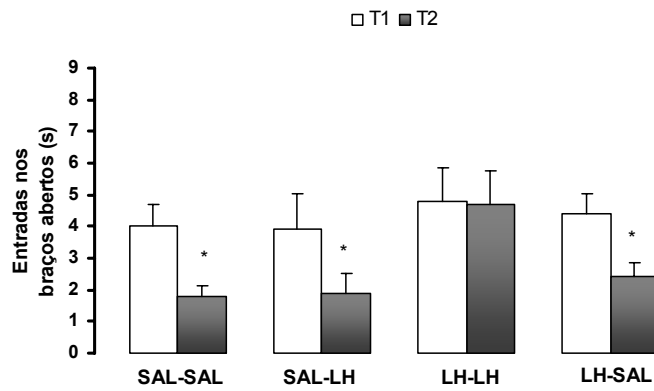


Figura 4. Efeito da LH (200mg/kg) ou SAL injetadas i.p pré T1 e pré T2 em camundongos expostos e reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão das médias (M+ EPM) das entradas nos braços abertos do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL.
* comparado T1 (Wilcoxon, $p < 0,05$).

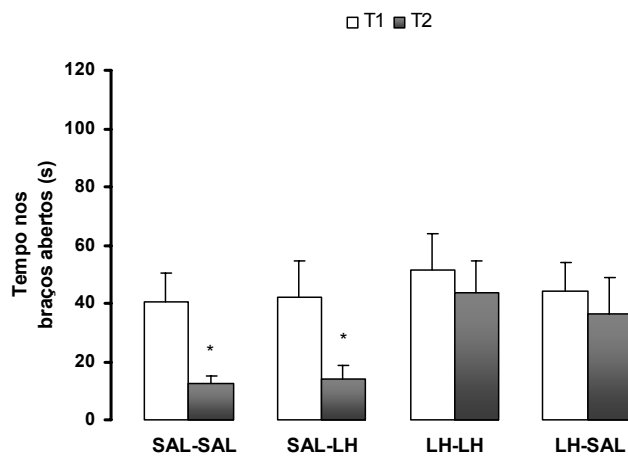


Figura 5. Efeito da LH (200mg/kg) ou SAL injetadas i.p pré T1 e pré T2 em camundongos expostos e reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão das médias (M+ EPM) do tempo gasto nos braços abertos do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL.
* comparado a T1 (Wilcoxon, $p < 0,05$).

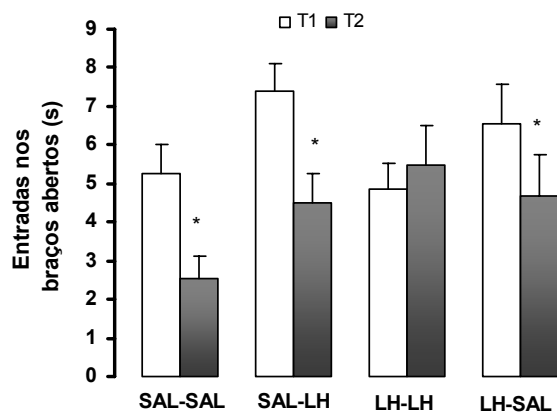


Figura 6. Efeito da LH (500mg/kg) ou SAL injetadas i.p pré T1 e pré T2, em camundongos expostos e reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão das médias (M+ EPM) das entradas nos braços abertos do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1(ANOVA seguida do teste Fisher's LSD).

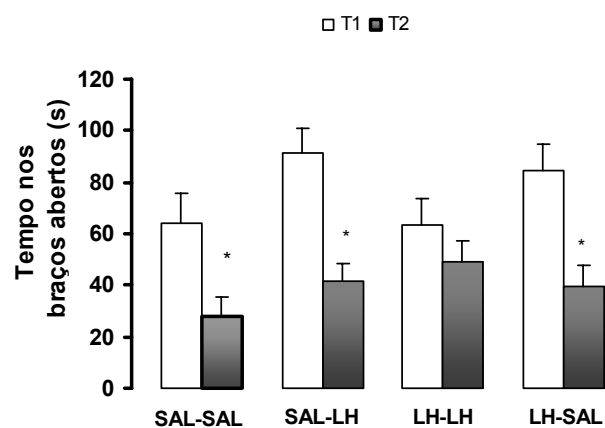


Figura 7. Efeito da LH (500mg/kg) ou SAL injetadas i.p pré T1 e pré T2, em camundongos expostos e reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão das médias (M+ EPM) do tempo gasto nos braços abertos do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1(ANOVA seguida do teste Fisher's LSD).

A tabela 1 mostra que não houve diferenças significativas do tratamento farmacológico na dose de 200mg/kg, nas %EBA (Kruskal-Wallis; $p=0,1232$) e nas %TBA (Kruskal-Wallis; $p=0,0824$), entre os grupos experimentais no primeiro dia de teste. Adicionalmente, o teste de Wilcoxon revelou uma diminuição nas %EBA somente para o grupo SAL-SAL (Wilcoxon $p=0,0125$) e uma diminuição nas %TBA para os grupos SAL-SAL (Wilcoxon $p=0,0166$) e SAL-LH (Wilcoxon $p=0,0284$).

A ANOVA de duas vias revelou que na dose de 500mg/kg de LH não houve mudanças significativas nas %EBA e %TBA [$F(3,48)=0,68$ e $0,26$, respectivamente $p>0,05$] entre os grupos em T1. Entretanto ocorreu uma redução entre T1 e T2 nas %EBA [$F(1,48)=8,83$, $p<0,05$] e nas %TBA [$F(1,48)=43,57$, $p<0,05$] para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; e SAL-SAL; SAL-LH; LH-SAL, respectivamente (tabela 2). Para o grupo LH-LH não houve diminuição significativa dessas medidas ($p>0,05$). O mais importante é notar que todos esses efeitos acima citados foram observados na ausência de alterações na atividade locomotora representada pelas EBF ($p>0,05$) em ambos os tratamentos realizados (ver Tabelas 1 e 2).

O tratamento farmacológico mostrou um efeito significativo da LH (200mg/kg) sobre o tempo de permanência nos braços fechados. O teste Kruskal-Wallis revelou uma diferença significativa no TBF (Kruskal-Wallis; $p=0,007$) em T2 entre os grupos SAL-SAL, SAL-LH e LH-SAL. O teste post-hoc mostrou um aumento do TBF dos grupos SAL-SAL e SAL-LH em relação ao grupo LH-SAL. O teste de Wilcoxon mostrou um efeito significativo da reexposição no TBF, com um aumento dessa medida para os grupos SAL-SAL (Wilcoxon; $p=0,0166$), SAL-LH (Wilcoxon; $p=0,0166$), LH-SAL (Wilcoxon; $p=0,0284$) e LH-LH (Wilcoxon; $p=0,0367$). A ANOVA de duas vias revelou que na dose de 500mg/kg houve um aumento do TBF [$F(1,48)=41,17$, $p<0,05$] para os grupos SAL-SAL, SAL-LH e LH-SAL em T2 em relação a T1 (ver figuras 8 e 9).

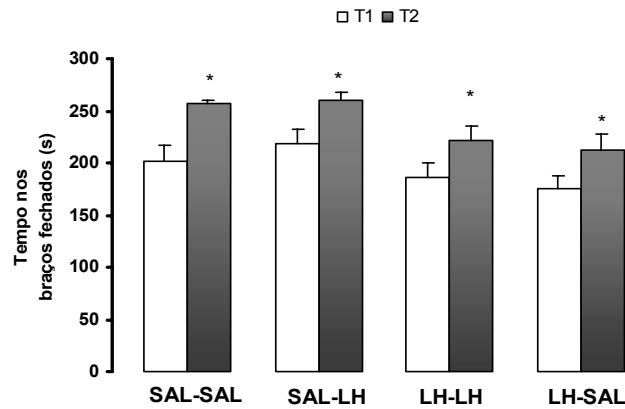


Figura 8. Efeito da LH 200mg/kg ou SAL injetadas i.p pré T1 e pré T2, em camundongos expostos e reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão das médias (M+ EPM) do tempo gasto nos braços fechados do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1 (Wilcoxon).

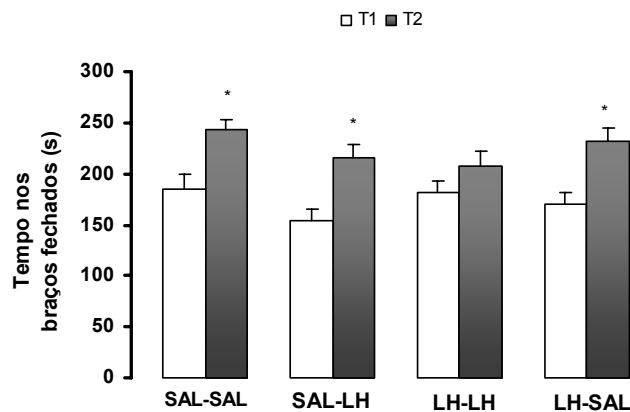


Figura 9. Efeito da LH 500mg/kg ou SAL injetadas i.p pré T1 e pré T2, em camundongos expostos e reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão das médias (M+ EPM) do tempo gasto nos braços fechados do LCE para os grupos SAL-SAL; SAL-LH; LH-LH e LH-SAL. * $p < 0,05$ comparado a T1 (ANOVA seguida do teste teste do teste Fisher's LSD).

A dose de 500mg/kg de LH não alterou o TC entre os grupos em T1 ($F_{3,48}=1,03$; $p>0,05$), e essa medida não sofreu alterações significativas durante a reexposição ($F_{1,48}=8,77$; $p>0,05$). Entretanto, a menor dose estudada alterou significativamente o TC em T1 (Kruskall-Wallis; $p=0,0001$). O teste post-hoc mostrou um aumento do TC do grupo LH-SAL em relação grupo SAL-SAL e SAL-LH. Durante a re-exposição somente grupo LH-LH diminuiu o TC (Kruskall-Wallis; $p=0,0218$).

A tabela 1 mostra o efeito da LH na dose de 200mg/kg sobre os comportamentos etológicos de camundongos re-expostos ao LCE. O teste de Wilcoxon revelou que houve uma diminuição na frequência de mergulho para os grupos SAL-SAL (Wilcoxon, $p=0,0093$), SAL-LH (Wilcoxon, $p=0,0077$), (Wilcoxon, $p=0,0382$), LH-SAL (Wilcoxon, $p=0,016$) e LH-LH . O teste de Kruskal-Wallis revelou que houve uma diferença significativa no comportamento de esticar (Kruskall-Wallis, $p=0,0237$) entre os grupos durante a exposição ao LCE. O teste post-hoc revelou que os grupos LH-LH e LH-SAL apresentaram uma frequência maior de esticar em relação ao grupo SAL-LH ($p>0,05$). A exposição prévia ao labirinto não alterou o comportamento de esticar em T2 ($p>0,05$). Para o comportamento de levantar não foram observadas alterações significativas entre T1 e T2 ($p>0,05$)

A Tabela 2 mostra o efeito da LH na dose de 500mg/kg sobre os comportamentos etológicos de camundongos expostos e re-expostos ao LCE. ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos nos comportamentos de esticar ($F_{3,48}=2,55$; $p>0,05$), mergulho ($F_{3,48}=1,42$; $p>0,05$) e levantar ($F_{3,48}=2,71$; $p>0,05$) entre os grupos experimentais na exposição. Entretanto, a ANOVA mostrou que a exposição prévia ao LCE provocou mudanças na frequência dos comportamentos de esticar e mergulho em T2. O teste Fisher's LSD revelou uma diminuição do comportamento de esticar para os grupos SAL-SAL e SAL-LH ($F_{1,48}=20,57$; $p<0,05$), mas não houve alterações desse comportamento para os grupos LH-LH e LH-SAL (tabela. 2). Para o comportamento de mergulhar houve uma diminuição significativa para todos os grupos estudados ($F_{1,48}=41,93$; $p<0,05$). Já para a frequência de levantar não houve alterações significativas ($F_{1,48}= 33,34$; $p>0,05$).

Tabela 1: Efeito da LH (200mg/kg) ou salina administrada i.p pré-T1 e pré-T2 sobre os comportamentos de camundongos submetidos ao LCE.

[u1] Comentário:

comportamentos	SAL-SAL (n=10)		SAL-LH (n=10)		LH-LH (n=10)		LH-SAL (n=10)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
TE	13.0 ± 1.3	12.0 ± 0.7	12.9 ± 1.3	10.1 ± 1.1	14 ± 1.6	14.7 ± 1.3	14.2 ± 0.8	11.2 ± 1.2
EBF	9.0 ± 0.8	10.2 ± 0.5	9.0 ± 0.5	8.2 ± 0.8	9.2 ± 1.0	10.0 ± 0.8	9.8 ± 0.8	8.8 ± 1.1
%EBA	29.7 ± 2.6	14.0 ± 2.3*	26.6 ± 5.6	16.2 ± 5.1	30.9 ± 5.8	28.7 ± 6.5	32.7 ± 4.3	22.3 ± 4.0
%TBA	13.5 ± 3.2	4.2 ± 0.8*	13.9 ± 4.2	4.7 ± 1.4*	17.1 ± 4.0	14.6 ± 3.5	14.6 ± 3.4	12.1 ± 4.1
TC	57.3 ± 11.3	31.1 ± 2.4	40.2 ± 5.9	25.9 ± 5.4	62.6 ± 8.7	34.1 ± 5.4*	81.4 ± 7.8	50.8 ± 12.0
Esticar	17.0 ± 1.2	14.0 ± 1.2	13.1 ± 1.8	12.0 ± 1.1	18.0 ± 2.2	15.5 ± 1.9	21.1 ± 2.3	20.0 ± 3.1
Mergulho	4.0 ± 0.5	2.0 ± 0.2*	4.4 ± 0.5	2.0 ± 0.4*	4.5 ± 0.7	1.7 ± 0.7*	5.8 ± 1.1	2.6 ± 0.4*
Levantar	6.6 ± 1.1	6.6 ± 0.8	8.9 ± 1.8	7.4 ± 1.6	5.3 ± 1.2	4.9 ± 1.2	4.2 ± 0.6	4.4 ± 1.2

*, P <0,05 comparado a T1

TE, total de entradas

EBF, entradas nos braços fechados

%EBA, porcentagem de entradas nos braços abertos

%TBA, porcentagem de tempo nos braços abertos

TC, tempo no centro

Tabela 2: Efeito da LH (500mg/kg) ou salina administrada i.p. pré-T1 e pré-T2 sobre os comportamentos de camundongos submetidos ao LCE.

comportamentos	SAL-SAL (n=11)		SAL-LH (n=10)		LH-LH (n=15)		LH-SAL (n=13)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
TE	12.7 ± 1.0	9.9 ± 1.0	16.5 ± 0.9	13.4 ± 1.5	14.6 ± 1.2	15.7 ± 1.5	15.2 ± 1.7	14.4 ± 2.0
EBF	7.4 ± 0.5	7.3 ± 0.7	9.1 ± 0.6	8.9 ± 0.9	9.8 ± 0.8	10.2 ± 0.9	8.6 ± 0.8	9.7 ± 1.3
% EBA	40.1 ± 3.6	25.5 ± 6.0*	44.6 ± 4.1	32.3 ± 3.6*	31.8 ± 3.0	33.5 ± 4.9	39.1 ± 3.8	31.8 ± 4.3
% TBA	21.3 ± 3.7	9.2 ± 2.4*	30.4 ± 3.2	13.9 ± 2.1*	21.1 ± 3.4	16.3 ± 2.8	28.1 ± 3.3	13.2 ± 2.5*
TC	50.4 ± 6.2	29.1 ± 4.5	54.6 ± 5.1	42.2 ± 8.0	54.8 ± 10.0	43.4 ± 8.5	45.4 ± 6.0	28.9 ± 7.3
Esticar	18.6 ± 1.5	11.4 ± 1.1*	14.4 ± 1.0	10.0 ± 0.9*	17.0 ± 2.4	13.7 ± 1.2	19.9 ± 1.7	17.5 ± 2.9
Mergulho	4.6 ± 0.4	1.7 ± 0.7*	6.4 ± 1.1	1.9 ± 0.9*	6.8 ± 0.9	3.2 ± 0.7*	8.5 ± 2.0	3.0 ± 0.8*
Levantar	10.7 ± 2.0	10.9 ± 1.5	12.8 ± 2.3	11.7 ± 1.9	6.53 ± 1.6	7.8 ± 1.6	5.7 ± 1.1	10.0 ± 1.4

*, p<0,05 comparado a T1

TE, Total de Entradas

EBF, Entradas nos braços fechados

%EBA, porcentagem de entradas nos braços abertos

%TBA, porcentagem de Tempo nos braços abertos

TC, Tempo no Centro

6 DISCUSSÃO

A histamina não atravessa prontamente a barreira hematoencefálica, porém os níveis desse neurotransmissor podem ser aumentados pela administração periférica do seu precursor. Estudos prévios têm sugerido o uso da L-histidina como uma maneira para se estudar o SHN (PRELL et al., 1996). Portanto, os efeitos observados no presente estudo podem ser atribuídos a HA formada centralmente a partir da administração da L-histidina.

No presente estudo, a L-histidina não apresentou um efeito ansiolítico nos tratamentos realizados, uma vez que não houve diferença significativa da atividade nos braços abertos (EBA e TBA) entre os grupos SAL-SAL e LH-LH em T1. Adicionalmente, na dose de 500mg/kg nenhuma diferença ocorreu durante a primeira exposição entre os grupos experimentais nas atividades nos BA, BF ou TC.

De acordo com Carobrez e Bertoglio (2005) o LCE elicia um estado de medo espontâneo dado que durante a sessão de teste, com livre exploração do labirinto, há uma clara preferência para permanecer nos BF em relação aos BA. Estudos indicam que drogas que aumentam a atividade nos braços abertos são compostos ansiolíticos enquanto aquelas que diminuem essa atividade apresentam característica ansiogênica (BRANDÃO et al., 1994; FILE et al., 1998; MENARD & TREIT., 1999; MENDES-GOMES & NUNES-DE-SOUZA, 2005).

Uma característica interessante observada no LCE é o fato de que uma simples experiência prévia ao labirinto, sem o uso de drogas, reduz significativamente as entradas e o tempo gasto nos BA de camundongos e ratos (GRIEBEL et al., 1993; FERNANDES & FILE, 1996). E, o aumento da esquia dos BA em uma segunda exposição é observada em vários estudos (DE SOUZA et al., 1998; CANTO-DE-SOUZA et al., 2002), mostrando que a re-exposição está associada com mudanças comportamentais indicativas de uma aprendizagem aversiva (FILE et al., 1990).

Os nossos resultados concordam com as evidências de que a exposição prévia ao labirinto modifica o desempenho do animal em T2, uma vez que se verificou uma marcante diminuição nas EBA e TBA para os grupos SAL-SAL, SAL-LH e LH-SAL na dose de 500mg/kg, enquanto que na menor dose houve uma diminuição das EBA

para os mesmos grupos experimentais, e uma diminuição do TBA somente para os grupos SAL-SAL e SAL-LH.

Depois da exploração inicial ao labirinto cada animal adquire, consolida e evoca algum tipo de memória relacionada com as áreas potencialmente aversivas do labirinto (BA) (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Considerando que na dose de 500mg/kg de LH, o grupo LH-SAL reduziu as EBA e o TBA durante a re-exposição, supõe-se que a aquisição e o armazenamento da memória não são afetados pela LH. Além disso, pode-se sugerir que a aprendizagem ocorreu na primeira exposição para esse grupo, e que a memória foi evocada em T2. O aumento da esquia dos BA desenvolvido por ratos (ROSA et al., 2000) e camundongos (HOLMES & RODGERS, 1998) tem sido atribuído à capacidade dessa área do labirinto de eliciar medo. O comportamento de esquia representa uma resposta motivada pela aversão dos animais ao BA, e a presença de mudanças no comportamento exploratório dependentes da experiência denota que a aprendizagem motivada pelo medo está ocorrendo durante a primeira exploração ao labirinto (DAL-COL et al., 2003).

Neste estudo, para ambas as doses os resultados apresentados não indicam alterações no parâmetro relacionado com a atividade locomotora, que é representando pelas EBF (CRUZ et al., 1994). Segundo Rosa e colaboradores (2000) esse parâmetro é importante para determinar se o efeito da droga estudada está sendo mascarado pelas alterações induzidas por ela na atividade motora dos animais.

O LCE é um teste que permite avaliar o processo de aprendizagem e memória com um forte componente emocional (medo), visto que o comportamento expressado durante o teste é resultante de um conflito entre a motivação para explorar o labirinto e a tendência natural em evitar os braços abertos motivados pelo medo. Considerando-se que os animais do grupo LH-SAL aprenderam, poderíamos supor que os animais do grupo LH-LH também fossem capazes de evocar a memória adquirida em T1 durante a re-exposição. Esta suposição baseia-se no fato de que as memórias formadas durante as experiências emocionais são lembradas mais facilmente.

A memória emocional permite que o animal evite que uma situação que lhe pareceu aversiva num dado momento (p. ex., exploração dos BA) possa ser repetida numa experiência futura (CURRAN & MINTZER, 2006). Portanto, nossos

resultados sugerem que a LH parece provocar um déficit na evocação da memória estado-dependente, já que os camundongos do grupo LH-SAL foram capazes de se lembrar de uma experiência prévia ao labirinto depois de 24 horas, enquanto os animais do grupo LH-LH não o fizeram.

Segundo Rodgers e colaboradores (1997), devido à importância das pistas tigmotáticas, os comportamentos etológicos são divididos em protegidos ou desprotegidos, dependendo da área do labirinto em que eles acontecem, ou seja, as áreas protegidas seriam os BF e o centro, e as áreas desprotegidas seriam os BA. A frequência dos comportamentos protegidos está relacionada com o índice de ansiedade (ESPEJO et al., 1997). Porém, como em nosso estudo as doses estudadas não apresentaram efeito ansiolítico, foram consideradas as frequências totais dos comportamentos etológicos. A função biológica das medidas etológicas é informar as estratégias comportamentais utilizadas frente a situações de perigo potencial (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005), que no presente estudo estão representadas pelos BA.

Em ambos os tratamentos utilizados, houve uma diminuição do comportamento de mergulho para todos os grupos experimentais durante a re-exposição, indicando que este comportamento não foi afetado pelo tratamento. Já para o comportamento de levantar, que está relacionado com a atividade locomotora vertical, não houve alteração em T2, confirmando que não houve alteração na locomoção total.

O esticar pode ser definido como um comportamento de avaliação de risco, promovendo informação, confirmação e identificando o perigo (ESPEJO, 1997). Na dose de 200mg/kg os animais do grupo LH-LH e LH-SAL não diminuíram o comportamento de esticar em T2. Na dose de 500mg/kg, o grupo LH-LH não reduziu o TBA, as EBA, e a frequência de esticar durante a re-exposição, confirmando novamente nossa hipótese de que a L-histidina prejudica a evocação da memória de uma maneira estado-dependente no LCE.

A memória pode ser estado-dependente, ou seja, uma resposta que tenha sido observada em um dado estado pode ser evocada apenas quando o organismo está numa situação semelhante. Em outras palavras, a evocação da informação aprendida requer que o animal esteja num estado similar àquele no qual a memória

para essa informação foi adquirida (COLPAERT et al., 2001). Este fenômeno tem sido demonstrado depois da administração de várias drogas psicoativas como a morfina e a HA (PATTI et al., 2006; ZARRINDAST et al., 2006). Zarrindast e colaboradores (2006) demonstraram que a HA induz a aprendizagem estado-dependente e que o SNH pode ter interação com sistemas opióides agindo na memória. Neste estudo, quando administrada i.c.v. pré-treino em um teste de esQUIVA passiva a HA comprometeu a evocação da memória, porém essa mesma droga causou facilitação na evocação da memória quando administrada tanto pré-treino quanto pré-teste (histamina-histamina).

Investigações realizadas por Kamei & Tasaka (1993) mostraram que a administração i.c.v. pré-teste de HA causou diminuição da latência resposta da em um teste de esQUIVA ativa em ratos velhos. No mesmo estudo, A LH administrada i.p. nas doses de 200mg/kg e 500mg/kg também provocaram uma diminuição da resposta da latência, facilitando, assim, os processos de memória. Estudos realizados por De Almeida & Izquierdo (1986) demonstraram que a administração i.c.v. de HA na dose de 1 ou 10ng imediatamente pós-teste de esQUIVA facilitou a retenção do comportamento de esQUIVA mensurada 24 horas depois, em ratos. Nossos resultados estão relacionados com a evocação da memória estado-dependente, diferindo, assim, dos trabalhos realizados pelos autores supracitados. Os primeiros autores fizeram a administração da droga durante a fase da consolidação da memória (pós-teste) e Kamei & Tasaka (1993) não trataram os animais antes do treino, não avaliando, portanto, o estado de dependência da resposta.

Em nosso estudo, os camundongos que receberam LH pré-T1 e pré-T2, não reduziram as entradas e o tempo gasto nos braços abertos durante o segundo dia de teste. A partir desse dado, podemos inferir que houve comprometimento na habilidade de evocar a memória durante a re-exposição quando os animais estavam sob o efeito da HA. Essa falha na evocação da memória 24 horas depois de T1, parece ter produzido uma amnésia retrógrada estado-dependente semelhante àquela observada na fase inicial na doença de Alzheimer (MCDONALD'S & OVERMIER, 1998).

Outros trabalhos têm demonstrado, também, o estado de amnésia retrógrada experimentalmente induzida em diferentes modelos e animais: ratos (KIM &

FANSELLLOW, 1992), camundongos (CHO et al., 1993) e macacos (ZOLA-MORGA & SQUIRE, 1990). Desta forma, têm surgido modelos animais bem desenvolvidos (PAGE et al., 1991) para avaliar comprometimento da memória a partir de testes que manipulam o atraso entre a informação adquirida durante a aprendizagem e a capacidade do sujeito experimental em lembrar-se dessa informação posteriormente (MCDONALDS & OVERMIER, 1997).

O LCE, principalmente no segundo dia de teste, demonstrou ser válido como um possível instrumento para avaliar comprometimento da memória. Além disso, os nossos resultados corroboram com outros estudos (YANAI & TASHIRO, 2007; ISHUNINA, et al., 2003) que indicam uma provável relação entre o SNH e a doença de Alzheimer. O presente estudo, também, pode ter uma implicação na avaliação do uso crônico de anti-histamínicos utilizados em larga escala na sociedade atual. Assim, nossos resultados são um primeiro passo para o estabelecimento de um modelo animal com validação para déficit de evocação de memória estado dependente.

7 CONCLUSÃO

A LH não apresenta efeito sobre a ansiedade e provoca um déficit na evocação da memória estado dependente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R. et al. Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.23, p.301-318,1998.

ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Phylogeny of histamine in vertebrate brain. **brain research**, v. 208, p.244-250, 1981.

ALVAREZ, E.O.; RUARTE, M.B. Histaminergic neurons of the ventral hippocampus and the baso-lateral amygdala of the rat: functional interaction on memory and learning mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 128, p. 81-90, 2002.

ANSELONI, V.Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioural Pharmacology**, v.8, p. 533-540, 1997.

BACCIOTTINI, L. et al. Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v.124, p.183-194, 2001 .

BANERMAN, D.M et al. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neuroscience Biobehavioural Review**, v.28, p.273-283, 2004.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; RODGERS, R.J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Aggressive Behavior**, v.16, p. 165-176, 1990.

BLANDINA, P. et al. Acetylcholine, histamine, and cognition: Two side of the same coin. **Learning & Memory**, v.11, p.1-8, 2004.

BERTOGLIO, L.J; CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.108, p. 197-203, 2000.

BONGERS, G. et al. Role of H3- Receptor-Mediated Signaling in Anxiety and Cognition in Wild-Type and ApoE Mice. **Neuropsychopharmacology**, p.1-9, 2002.

BOUTHENET, M.L. et al. A detailed mapping of histamine H1 receptors in guinea-pig central nervous system established by autoradiography with (¹²⁵I) iodobolpyramine. **Neuroscience**, v. 26, p. 553-600, 1988.

BRANDÃO M.L. et al. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Review**, v. 18, p. 339-346, 1994.

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

CANGIOLI, L. et al. Activation of histaminergic H3 receptor in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 521-528, 2002.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; RODGERS, R.J. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience, **Brain Research**, v. 928, p. 50-59, 2002.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on, **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.

CHO, Y.H.; BERACOCCHIA, D.; JAFFORD, R. Extended temporal gradient for the retrograde and anterograde amnesia produced by ibotenate entorhinal cortex lesions in mice. **Journal of Neuroscience**, v.13, p. 1759-1766, 1993.

COELHO, J.L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLI, R. Analysis of the effects of CPA and L-histidine on goldfish test on conditioned place preference model, **Behavioural Brain Research**, v. 124, p. 61-165, 2001.

COFIEL, L.P.C, MATTIOLI R. Involvement of histamine receptors in the acquisition of inhibitory avoidance in *Carassius auratus*. **Progress in Neuro-Psychopharmacol & Biological Psychiatry**, v. 30, n. 7 1246-1250, 2006.

COLPAERT, F.C.; KOEK, W.; BRUINS SLOT, L.A. Evidence that mnesic states govern

normal and disordered memory. **Behavioural Pharmacology** 12: 575-589, 2001.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, p.171-176, 1994.

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

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

Da Silva, W.C. et al. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology Learn and Memory**, v. 86, p.100-106, 2006.

DAL-CÓL, M.L.C. et al. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacology Biochemistry and Behavioural**, v. 74, p. 395-400, 2003.

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

DE-SOUZA, M.M.; SCHENBERG, L.C.; CAROBREZ, A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. **Behavioural Brain Research**, v. 90, p. 157-165, 1998.

EIDI, M. et al. Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats, **European Journal of Pharmacology**, v. 465, p. 91-96, 2003.

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

ESPEJO, E.F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 86, p. 105-112, 1997.

ESPEJO, E. F.; Mir, D. Structure of the rat's behaviour in the hot plate teste. **Behavioural Brain research**, v.2, p.171-176,1993.

FAGANELLO, F.R.; MATTIOLI, R. Anxiolytic-like effect of Chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation, **Progress in Neuro-Psychofarmacol & Biological Psychiatry**. v. 31, p. 269-274, 2007.

FERNANDES, C.; FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavioral**, v. 54, p. 31-40, 1996.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus on the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**, v. 19, p. 397-405, 1998.

FILE S.E.; MABBUTT, P.S.; HITCHCOTT, P.K. Characterization of phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 102, p. 98-101, 1990.

FRISCH, C.; HASENÖHRL, R.U.; HUSTON, J.P. The histamine H1 antagonist chlorpheniramine facilitates learning in aged rats. **Neurosciences Letters**, v. 229, p. 89-92, 1998.

GARCIA, A.M.B; CARDENAS, F.P; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 85, p.265-270, 2005.

GRAY, J.A.; McNAUGAHTON, N. (2000). The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. In: CRUZ-MORALES, S.E.; SANTOS, N.R.; BRANDÃO, M.L. One trial Tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze rest in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 72, p. 973-978, 2002.

GRAEFF, F.G. Ansiolíticos. In: **Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação**. EPU, São Paulo. p-61-83, 1989.

GRIEBEL, G.; MOREAU, J.L.; JENCK, F.; MARTIN, J.R.; MISLIN, R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. **Behavioral Process**, v. 29, p. 37-48, 1993.

HAAS, H.L.; PANULA, P. The role of Histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. **Neuroscience**, v. 4, p. 121-130, 2003.

HASENOHRL, R.U. et al. Comparison of intra-accubens injection of histamine with histamine H1-receptor antagonist chlorpheniramine in effects on reinforcement and memory parameters, **Behavioural Brain Research**, v.124, p. 203-2111,2001.

HAUG, M.; WHALEN, ROCI, R.E (1999). Animal models oh human emotion and cogtion. IN: PAUL, E.S.; HARDING, E. J.; MENDEL, M. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach, **Neuroscience and Biobehavior Reviews** v. 29, p. 269-491, 2005.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 60, p. 473-488, 1998.

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

ITO, C. et al. Effects of the acute and chronic restraint stresses on the central histaminergic neuron system. **Neuroscience Letters**, v. 262, p. 143-145, 1999.

INAGAKI, N.; PANULA,P.; YAMATODANI, A.; WADA,H. Organization of the histaminergic system in the brain of teleost *Trachurus trachurus*. **Journal Comparative Neurology**, v. 310, p.310-394, 1991.

ISAYAMA, S. et al. Effects of Histidine on working memory deficits induced by the 5-HT_{1A}-receptor agonist 8-OH-DPAT. **Journal of Pharmacology**, v. 86, 451-453, 2001.

ISHUNINA, T.A. et al. Estrogen receptors and metabolic activity in human tuberomammillary nucleus: changes in relation to sex, aging and Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 988, p.84-96, 2003.

KAMEI, C.; TASAKA, K. Effect of histamine on memory retrieval in old rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 16, p.128-132, 1993.

KLAPDOR, K.; HASENÖHRL, R.U ;HUSTON, J.P. Facilitation of learning in adult and aged rats following bilateral lesions of the tuberomammillary nucleus region. **Behavioural Brain Research**, v. 61,p. 113-116, 1994.

KIM, J.J.; FANSELLLOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, p. 675-677, 1992.

KOHLER, C. et al. The cytoarchitecture of the tuberomammillary nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 16, p. 85-110, 1985.

KOMATER, V.A. et al. H3 receptor blockade by thioperamine enhances in rats without inducing locomotor sensitization, **Psychopharmacology**, v. 167, p. 363-372, 2003.

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

LAMPREA, M.R et al. Dissociation of memory and anxiety in a repeated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. **Behavioural Brain research**, v.117, p.97-105, 2000.

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

LISTER, G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p.180-185, 1987.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1990.

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

MALMBERG-AIELLO P. et al. Mouse light/dark box reveals anxiogenic-like effects by activation of histamine H1 receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavioural*, v. 71, p. 321-326, 2002.

MARTINEZ-MIR, M.I. et al. Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and non human primates. *Brain Research*, v. 526, p. 322- 327, 1990.

MATTIOLI, R.; COELHO, J.E.; MARTIN, S.A. Reinforcing properties of substance P C-fragment analog DiMe C-7 in *Carassius auratus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 29, p. 495-499, 1996.

MATTIOLI R. et al. Conditioned place preference analysis in the goldfish with the H1 histamine antagonist chlorpheniramine. *Brain Research Bulletin*, v. 45, p. 41-44, 1998.

MCDONALDS, M.P.; OVERMIER, J.B. Present Imperfect: A critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v. 22, p. 99-120, 1998.

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

MEDALHA, C.; SANTANGELO, E.M.; MATTIOLI, R. Neurochemical analysis of brain monoamines after L-histidine and chlorpheniramine administration in goldfish. *Neuroscience Letters*, v, 349, n. (3), p.179-182, 2003.

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

MEGURO, K. et al. Effects of thioperamide, a histamine H3 antagonist, on the step-through passive avoidance response and histidine decarboxylase activity in senescence-accelerated mice. ***Pharmacology Biochemistry and Behavioral***, v. 50, p. 321-325, 1995.

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

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE- SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Research**, v. 1047, p. 97-104, 2005.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiologie Clinique**, v. 33, p. 55-66, 2003.

MIYAZAKI, S.; IMAIZUMI, M.; ONODERA, K. Ameliorating effects of histidine on scopolamine-induced learning deficits using an elevated plus-maze test in mice. **Life Sciences**, v. 56, p. 1563-1570, 1995.

NGUYEN, T. et al. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 427-433, 2001.

PAGE, K.J. et al. Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA-and ibotenic acid- induce excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: Differential dependence on cholinergic neuronal loss. **Neuroscience**, v. 43, p. 457- 472, 1991.

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

PANULA, P. et al. A histamine-containing neuronal system in human brain. **Neuroscience**, v. 34, p. 127-132, 1990.

PASSINI, M.B. et al. Central histaminergic system and cognition. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v. 24, p. 107-113, 2000.

PASSANI et al. Histamine in the brain: Beyond sleep and memory, **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 113-1122, 2007.

PATTI, C.L. et al. Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. **Psychopharmacology**, v. 184, p. 1-12, 2006.

PAUL, E.S.; HARDING, E. J.; MENDEL, M. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach, **Neuroscience and Biobehavior Reviews** v. 29, p. 269-491, 2005.

PEITSARO, N. et al. Modulation of histaminergic system and behaviour by alpha-fluoromethylhistidine in zebrafish. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, p. 432-441, 2003.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PRELL, G.D. et al. Lack of precursor-product relationship between histamine and its metabolites in brain after histidine loading. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, p. 1938-1944, 1996.

PIRATELLO, A.C.; MATTIOLI, R. Effects of Chlorpheniramine and L-histidine on vestibular compensation in goldfish, *Carassius auratus*. **Neuroscience Letters**, v. 367, p. 160-163, 2004.

PIRATELLO, A.C.; MATTIOLLI, R. Thioperamide delays vestibular compensation in goldfish. **Neuroscience Letters**, v. 415, p. 146-148, 2007.

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

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

RODGERS, R.J.; JOHNSON, J.T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Marine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52 p. 297-303, 1995.

RODGERS, R.J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

RODRÍGUEZ, R. et al. Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. **Journal of neuroscience**, v. 22, p. 2894-2903, 2002.

ROSA, V.P. et al. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 177-182, 2000.

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

RUBIO, S. et al. Effects of histamine precursor and (R)- α -methylhistamine on the avoidance response in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 124, p. 177-181, 2001.

SANTOS, N.R.; HUSTON, J.P.; BRANDÃO, M;L. Escape behavior under tonic inhibitory control of histamine h2-receptor mediated mechanisms in the midbrain tectum. **Behavioural Brain Research**, v. 124, p. 167-175, 2001.

SANTOS, N.R.; HUSTON, J.P.; BRANDÃO, M. L. Further evidence for the involvement of histamine H2-receptor in the control of defensive behavior generated in the midbrain tectum. **Behavioural Pharmacology**, v. 13, p. 73-81, 2002.

SPIELER, R. et al. Post-trial administration of H1 histamine receptor blocker improves appetitive reversal learning and memory in goldfish. *Carassius auratus* **Neuroscience Letters**, v. 277, p. 5-8, 1999.

VIZUETE, M.L. et al. In: PASSINI, M.B.; BACCIOTTINI, L.; MANNAIONI, P.F.; BLANDINA, P. Central histaminergic system and cognition. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v. 24, p. 107-113, 2000.

WADA, H. T. et al. Is the histaminergic neurons system a regulatory centre for whole-brain activity? **Trends Neuroscience**, p. 14, v. 415-418, 1991.

WATANABE, T. et al. Distribution of the the histaminergic neuron system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine descarboxylase as a marker. **Brain Research**, v. 295, p. 13-25, 1984.

ZARRINDAST, M-R. et al. Influence of Morphine-or apomorphine- induced sensitization

on histamine state-dependent learning in the step-down passive avoidance test. **Behavioural Brain Research**, v. 171, p. 50-55, 2006.

ZHU, S-W. et al. Influence of differential housing on emotional behavior and neurotrophin levels in mice. **Behavioural, Brain Research**, v. 169, p. 10-20, 2006.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. **Science**, v. 250, p. 288-290, 1990.

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

YUZURIHARA, M. et al. Effects of drugs action as histamine releasers or histamine receptor blockers on an experimental anxiety model in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 145-150, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Registro das medidas convencionais durante a exposição e reexposição de camundongos submetidos ao LCE

Tabela 1A – 1H - Medidas convencionais (em segundos) obtidas dos animais tratados com LH (200mg/kg) ou salina, pré T1 e T2, submetidos ao LCE.

Tabela 1 A

Grupo SAL-SAL		Exposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	12	2	10	24	235	41	17	83	8	78	14
2	8	3	5	38	136	126	38	63	13	45	42
3	8	2	6	12	264	24	25	75	4	88	8
4	11	2	9	10	268	22	18	82	3	89	7
5	21	9	12	74	164	61	43	57	25	55	21
6	12	5	7	111	150	39	42	58	37	50	13
7	13	3	10	19	193	89	23	77	6	64	30
8	18	5	13	28	244	28	28	72	9	81	9
9	16	6	10	47	211	41	38	63	16	70	14
10	11	3	8	42	156	102	27	73	14	52	34
Média	13,00	4,00	9,00	40,55	202,10	57,35	29,75	70,25	13,52	67,37	19,12
DP	4,19	2,26	2,54	31,30	49,25	36,25	9,52	9,52	10,43	16,42	12,05
EPM	1,32	0,68	0,80	9,73	15,57	11,32	2,64	2,64	3,24	5,05	3,76

Tabela 1 B

Grupo SAL-SAL		Reexposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	13	2	11	6	254	36	15	85	2	85	13
2	12	1	11	7	260	34	8	92	2	87	11
3	9	1	8	7	266	27	11	89	2	89	9
4	12	3	9	23	243	34	25	75	8	81	11
5	7	0	7	0	272	23	0	100	0	91	9
6	12	1	11	9	259	32	8	92	3	86	11
7	13	2	11	14	260	26	15	85	5	87	9
8	14	3	11	22	261	17	21	79	7	87	6
9	16	3	13	23	242	42	19	81	8	81	12
10	12	2	10	16	247	40	17	83	5	82	12
Média	12,00	1,80	10,20	12,62	256,28	31,10	14,04	85,96	4,21	85,43	10,37
DPM	2,49	1,03	1,75	8,19	9,73	7,81	7,29	7,29	2,73	3,24	2,19
EPM	0,79	0,33	0,55	2,59	3,08	2,47	2,31	2,31	0,86	1,03	0,69

Tabela 1C

Grupo SAL- LH		Exposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	10	3	7	29	185	86	30	70	10	62	29
2	12	1	11	6	268	26	8	92	2	89	9
3	16	6	10	92	161	48	38	63	31	54	16
4	11	1	10	12	259	28	9	91	4	86	10
5	11	1	10	4	264	32	9	91	1	88	11
6	6	1	5	7	253	40	17	83	2	84	13
7	11	1	10	9	258	32	9	91	3	86	11
8	15	7	8	91	191	18	47	53	30	64	6
9	16	7	9	78	177	45	44	56	26	59	15
10	21	11	10	91	163	46	52	48	30	54	15
Média	12,90	3,90	9,00	41,87	217,91	40,22	26,26	73,74	13,96	72,64	13,41
DP	4,18	3,60	1,83	40,37	45,85	18,76	17,77	17,77	13,46	15,28	6,25
EPM	1,32	1,14	0,58	12,76	14,50	5,93	5,62	5,62	4,25	4,83	1,98

Tabela 1D

Grupo SAL- LH		Reexposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	9	0	9	0	293	7	0	100	0	98	2
2	12	2	10	14	246	40	17	83	5	82	13
3	10	2	8	19	222	59	20	80	6	74	20
4	10	2	8	19	271	11	20	80	6	90	4
5	3	0	3	0	297	3	0	100	0	99	1
6	7	0	7	0	264	36	0	100	0	88	12
7	11	0	11	0	271	29	0	100	0	90	10
8	11	4	7	33	230	36	36	64	11	77	12
9	11	5	6	32	251	17	45	55	11	84	6
10	17	4	13	25	253	21	24	76	8	84	7
Média	10,10	1,90	8,20	14,23	259,83	25,94	16,20	83,80	4,74	86,61	8,65
DPM	3,57	1,91	2,78	13,58	24,26	17,32	16,31	16,31	4,53	8,09	5,77
EPM	1,13	0,60	0,88	4,29	7,67	5,48	5,16	5,16	1,43	2,56	1,83

Tabela 1 E

Grupo LH - LH		Exposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	19	9	10	106	115	79	47	53	35	38	26
2	20	7	13	32	226	41	35	65	11	75	14
3	4	2	2	29	152	118	50	50	10	51	39
4	13	7	6	95	161	44	54	46	32	54	15
5	20	9	11	75	158	67	45	55	25	53	22
6	15	3	12	23	187	90	20	80	8	62	30
7	17	7	10	91	146	64	41	59	30	49	21
8	13	1	12	8	233	59	8	92	3	78	20
9	11	3	8	56	219	25	27	73	19	73	8
10	8	0	8	0	260	40	0	100	0	87	13
Média	14,00	4,80	9,20	51,55	185,81	62,64	32,74	67,26	17,18	61,94	20,88
DPM	5,31	3,36	3,33	38,25	46,74	27,74	18,49	18,49	12,75	15,58	9,25
EPM	1,68	1,06	1,05	12,10	14,78	8,77	5,85	5,85	4,03	4,93	2,92

Tabela 1 F

Grupo LH - LH		Reexposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	15	6	9	43	224	34	40	60	14	75	11
2	13	6	7	37	236	27	46	54	12	79	9
3	11	0	11	0	268	32	0	100	0	89	11
4	14	7	7	59	205	36	50	50	20	68	12
5	19	8	11	73	149	78	42	58	24	50	26
6	17	7	10	61	204	35	41	59	20	68	12
7	17	7	10	81	192	26	41	59	27	64	9
8	11	0	11	0	289	11	0	100	0	96	4
9	22	6	16	84	188	28	27	73	28	63	9
10	8	0	8	0	267	34	0	100	0	89	11
Média	14,70	4,70	10,00	43,83	222,07	34,11	28,79	71,21	14,61	74,02	11,37
DPM	4,19	3,30	2,62	33,65	43,33	17,18	20,68	20,68	11,22	14,44	5,73
EPM	1,33	1,04	0,83	10,64	13,70	5,43	6,54	6,54	3,55	4,57	1,81

Tabela 1 G

GRUPO LH-SAL			Exposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC	
1	13	8	5	103	77	121	62	38	34	26	40	
2	13	2	11	10	245	45	15	85	3	82	15	
3	14	3	11	20	201	79	21	79	7	67	26	
4	21	7	14	67	163	70	33	67	22	54	23	
5	12	5	7	62	167	70	42	58	21	56	23	
6	14	3	11	7	172	122	21	79	2	57	41	
7	15	5	10	23	200	77	33	67	8	67	26	
8	16	5	11	52	158	90	31	69	17	53	30	
9	12	2	10	19	193	86	17	83	6	64	29	
10	12	4	8	77	171	54	33	67	26	57	18	
Média	14,20	4,40	9,80	43,91	174,69	81,40	30,94	69,06	14,64	58,23	27,13	
DPM	2,74	2,01	2,53	32,70	43,06	24,94	13,72	13,72	10,90	14,35	8,31	
EPM	0,87	0,64	0,80	10,34	13,62	7,89	4,34	4,34	3,45	4,54	2,63	

Tabela 1 H

Grupo LH - SAL			Reexposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC	
1	11	3	8	91	191	18	27	73	30	64	6	
2	4	1	3	11	281	8	25	75	4	94	3	
3	13	2	11	32	222	46	15	85	11	74	15	
4	17	5	12	79	187	35	29	71	26	62	12	
5	14	4	10	35	145	119	29	71	12	48	40	
6	16	1	15	0	261	39	6	94	0	87	13	
7	7	1	6	5	244	51	14	86	2	81	17	
8	11	2	9	11	171	118	18	82	4	57	39	
9	11	1	10	0	272	28	9	91	0	91	9	
10	8	4	4	101	153	45	50	50	34	51	15	
Média	11,20	2,40	8,80	36,53	212,61	50,87	22,34	77,66	12,18	70,87	16,96	
DPM	4,05	1,51	3,68	39,39	50,03	38,22	12,69	12,69	13,13	16,68	12,74	
EPM	1,28	0,48	1,16	12,46	15,82	12,09	4,01	4,01	4,15	5,27	4,03	

APÊNDICE B – Registro das medidas etológicas durante a exposição e reexposição de camundongos submetidos ao LCE.

Tabela 1A - 1C- Frequência totais das medidas etológicas dos animais pré-tratados (T1 e T2) com LH (200mg/kg) ou salina submetidos ao LCE.

Tabela 1A

Sujeito	Esticar							
	Grupos Experimentais							
	SAL-SAL		SAL-LH		LH-LH		LH-SAL	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	21	12	20	13	19	12	12	17
2	13	15	9	20	22	16	18	20
3	23	10	12	14	3	7	29	26
4	21	13	8	8	12	13	29	26
5	19	7	19	12	22	18	24	38
6	12	21	23	13	20	25	27	26
7	16	17	15	12	21	23	25	8
8	19	13	8	7	24	20	13	14
9	12	18	11	11	12	6	25	21
10	15	12	6	12	27	15	9	4
MÉDIA	17,10	13,80	13,10	12,20	18,20	15,50	21,10	20,00
DPM	4,04	4,08	5,86	3,52	7,15	6,28	7,48	9,88
EPM	1,28	1,29	1,85	1,11	2,26	1,98	2,36	3,12

Abreviações utilizadas: T1 Exposição T2 Reexposição

Tabela 1 B

Sujeito	Mergulho							
	Grupos Experimentais							
	SAL-SAL		SAL-LH		LH-LH		LH-SAL	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	5	3	4	0	6	1	10	5
2	4	1	7	2	5	1	1	2
3	5	3	4	3	0	0	8	5
4	2	1	5	3	6	2	4	2
5	5	2	4	1	3	7	1	2
6	3	1	6	4	6	2	5	3
7	7	3	5	2	8	4	10	2
8	1	2	1	1	3	0	7	3
9	4	2	6	4	3	0	10	1
10	2	1	2	0	5	0	2	1
MÉDIA	3,80	1,90	4,40	2,00	4,50	1,70	5,80	2,60
DPM	3,68	0,88	1,84	1,49	2,27	2,26	3,71	1,43
EPM	0,57	0,28	0,58	0,47	0,72	0,72	1,17	0,45

Abreviações utilizadas: T1 Exposição T2 Reexposição

Tabela 1 C

Sujeito	Levantar							
	Grupos Experimentais							
	SAL-SAL		SAL-LH		LH-LH		LH-SAL	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	10	10	4	9	6	11	5	3
2	0	10	15	16	6	10	4	4
3	9	7	12	7	1	1	3	11
4	11	6	14	7	9	1	6	4
5	6	1	1	0	12	3	8	6
6	3	5	1	1	9	2	1	1
7	8	9	7	5	2	2	5	2
8	8	7	16	13	0	4	5	11
9	9	6	6	4	4	9	3	1
10	2	5	13	12	4	6	2	1
Média	6,6	6,6	8,9	7,4	5,3	4,9	4,2	4,4
DPM	3,72	2,72	5,78	5,19	3,86	3,84	2,04	3,84
EPM	1,18	0,86	1,83	1,64	1,22	1,22	0,65	1,21

Abreviações utilizadas: T1 Exposição T2 Reexposição

APÊNDICE C- Registro das medidas convencionais durante a exposição e reexposição em camundongos submetidos ao LCE

Tabela 1A – 1H - Medidas convencionais (em segundos) obtidas dos animais pré-tratados (T1 e T2) com LH(500mg/kg) ou salina, submetidos ao LCE.

Tabela 1A

Grupo SAL-SAL	Exposição											
	Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	12	6	6	134	143	24	50	50	45	48	8	
2	12	6	6	65	144	91	50	50	22	48	30	
3	12	6	6	87	156	58	50	50	29	52	19	
4	10	5	5	79	172	49	50	50	26	57	16	
5	20	10	10	99	148	52	50	50	33	49	17	
6	17	7	10	83	138	79	41	59	28	46	26	
7	11	3	8	18	230	52	27	73	6	77	17	
8	15	7	8	72	193	35	47	53	24	64	12	
9	8	2	6	10	266	24	25	75	3	89	8	
10	11	2	9	21	249	30	18	82	7	83	10	
11	12	4	8	34	204	62	33	67	11	68	21	
Média	12,73	5,27	7,45	63,93	185,63	50,44	40,15	59,85	21,31	61,88	16,81	
DPM	3,38	2,41	1,75	38,87	46,14	21,74	12,06	12,06	12,96	15,38	7,25	
EPM	1,02	0,73	0,53	11,72	13,91	6,56	3,63	3,63	3,91	4,64	2,19	

Tabela 1 B

Grupo SAL-SAL	Reexposição											
	Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	10	3	7	32	236	32	30	70	11	79	11	
2	11	3	8	42	224	34	27	73	14	75	11	
3	14	6	8	87	173	41	43	57	29	58	14	
4	15	4	11	24	225	51	27	73	8	75	17	
5	11	3	8	19	269	12	27	73	6	90	4	
6	13	4	9	49	223	28	31	69	16	74	9	
7	10	3	7	25	218	57	30	70	8	73	19	
8	6	0	6	0	271	29	0	100	0	90	10	
9	3	2	1	26	267	7	67	33	9	89	2	
10	9	0	9	0	282	18	0	100	0	94	6	
11	7	0	7	0	285	15	0	100	0	95	5	
Média	9,91	2,55	7,36	27,65	243,16	29,19	25,59	74,41	9,22	81,05	9,73	
DPM	3,56	1,92	2,50	25,60	34,74	15,91	20,06	20,06	8,53	11,58	5,30	
EPM	1,07	0,58	0,75	7,72	10,48	4,80	6,05	6,05	2,57	3,49	1,60	

Tabela 1C

Grupo SAL- LH		Exposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	11	6	5	120	131	50	55	45	40	44	17
2	16	6	10	47	217	36	38	63	16	72	12
3	15	6	9	72	162	66	40	60	24	54	22
4	13	5	8	51	189	60	38	62	17	63	20
5	17	6	11	91	137	73	35	65	30	46	24
6	16	6	10	73	189	38	38	63	24	63	13
7	19	8	11	111	118	72	42	58	37	39	24
8	18	9	9	97	126	77	50	50	32	42	26
9	18	11	7	143	127	30	61	39	48	42	10
10	22	11	11	109	146	45	50	50	36	49	15
Média	16,50	7,40	9,10	91,23	154,11	54,66	44,65	55,33	30,41	51,37	18,22
DPM	3,10	2,22	1,97	30,79	33,72	16,95	8,71	8,73	10,27	11,24	5,65
EPM	0,98	0,70	0,62	9,74	10,66	5,36	2,75	2,76	3,25	3,56	1,79

Tabela 1D

Grupo SAL- LH		Reexposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	11	2	9	21	237	42	18	82	7	79	14
2	7	1	6	9	275	16	14	86	3	92	5
3	16	6	10	62	171	67	38	63	21	57	22
4	11	3	8	36	208	56	27	73	12	69	19
5	19	9	10	78	151	72	47	53	26	50	24
6	5	2	3	30	256	13	40	60	10	86	4
7	20	5	15	43	243	15	25	75	14	81	5
8	14	6	8	48	237	15	43	57	16	79	5
9	16	6	10	39	218	43	38	63	13	73	14
10	15	5	10	53	164	83	33	67	18	55	28
Média	13,40	4,50	8,90	41,87	215,91	42,22	32,33	67,67	13,96	72,00	14,07
DPM	4,88	2,46	3,11	19,88	41,61	26,65	10,83	10,83	6,63	14,00	8,88
EPM	1,54	0,78	0,98	6,29	13,16	8,43	3,42	3,42	2,10	4,43	2,81

Tabela 1E

Grupo LH- LH		Exposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	18	6	12	53	212	34	33	67	18	71	11
2	19	6	13	57	191	52	32	68	19	64	17
3	14	5	9	70	180	51	36	64	23	60	17
4	13	2	11	27	249	24	15	85	9	83	8
5	19	6	13	71	158	71	32	68	24	53	24
6	14	4	10	54	203	43	29	71	18	68	14
7	4	1	3	20	100	179	25	75	7	33	60
8	13	5	8	107	130	62	38	62	36	43	21
9	10	1	9	13	219	68	10	90	4	73	23
10	24	7	17	40	228	33	29	71	13	76	11
11	11	2	9	13	221	66	18	82	4	74	22
12	18	10	8	156	112	32	56	44	52	37	11
13	18	7	11	97	168	36	39	61	32	56	12
14	15	7	8	87	153	60	47	53	29	51	20
15	10	4	6	89	200	11	40	60	30	67	4
Média	14,67	4,87	9,80	63,58	181,53	54,89	31,87	68,13	21,19	60,51	18,30
DPM	4,89	2,56	3,30	39,59	43,82	38,78	11,83	11,83	13,20	14,61	12,93
EPM	1,26	0,66	0,85	10,22	11,31	10,01	3,05	3,05	3,41	3,77	3,34

Tabela 1F

Grupo LH - LH		Reexposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TB	%TC
1	14	3	11	42	242	16	21	79	14	81	5
2	16	6	10	46	147	107	38	63	15	49	36
3	14	2	12	17	272	11	14	86	6	91	4
4	15	1	14	4	266	30	7	93	1	89	10
5	27	13	14	73	163	63	48	52	24	54	21
6	16	2	14	22	259	19	13	88	7	86	6
7	12	3	9	38	234	28	25	75	13	78	9
8	26	12	14	105	147	48	46	54	35	49	16
9	10	6	4	81	100	119	60	40	27	33	40
10	21	10	11	69	163	69	48	52	23	54	23
11	10	0	10	0	266	34	0	100	0	89	11
12	14	6	8	64	191	46	43	57	21	64	15
13	21	10	11	100	172	28	48	52	33	57	9
14	15	5	10	51	228	21	33	67	17	76	7
15	5	3	2	24	264	12	60	40	8	88	4
Média	15,73	5,47	10,27	49,01	207,58	43,41	33,54	66,46	16,34	69,19	14,47
DPM	5,93	4,09	3,53	32,64	55,73	33,18	19,18	19,18	10,88	18,58	11,06
EPM	1,53	1,05	0,91	8,43	14,39	8,57	4,95	4,95	2,81	4,80	2,86

Tabela 1 G

Grupo LH - SAL		Exposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	17	7	10	88	175	38	41	59	29	58	13
2	13	5	8	98	145	57	38	62	33	48	19
3	14	7	7	85	139	76	50	50	28	46	25
4	23	8	15	80	204	16	35	65	27	68	5
5	15	5	10	71	177	52	33	67	24	59	17
6	8	3	5	158	133	9	38	63	53	44	3
7	17	7	10	78	158	65	41	59	26	53	22
8	21	12	9	127	133	40	57	43	42	44	13
9	26	13	13	98	136	66	50	50	33	45	22
10	21	11	10	88	156	57	52	48	29	52	19
11	9	3	6	64	169	67	33	67	21	56	22
12	4	0	4	0	280	20	0	100	0	93	7
13	10	4	6	66	207	28	40	60	22	69	9
Média	15,23	6,54	8,69	84,51	170,07	45,42	39,18	60,82	28,17	56,69	15,14
DPM	6,46	3,80	3,15	36,24	41,31	21,83	14,04	14,04	12,08	13,77	7,28
EPM	1,79	1,05	0,87	10,05	11,46	6,05	3,89	3,89	3,35	3,82	2,02

Tabela 1H

Grupo LH - SAL		Reexposição									
Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	2	1	1	4	293	2	50	50	2	98	1
2	5	2	3	22	276	2	40	60	7	92	1
3	15	2	13	10	269	21	13	87	3	90	7
4	29	13	16	73	187	39	45	55	24	62	13
5	17	5	12	33	241	26	29	71	11	80	9
6	14	4	10	41	251	8	29	71	14	84	3
7	10	0	10	0	288	12	0	100	0	96	4
8	16	7	9	88	177	35	44	56	29	59	12
9	22	7	15	52	160	89	32	68	17	53	30
10	17	10	7	79	146	75	59	41	26	49	25
11	21	5	16	48	225	27	24	76	16	75	9
12	9	2	7	30	238	32	22	78	10	79	11
13	11	3	8	35	257	8	27	73	12	86	3
Média	14,46	4,69	9,77	39,71	231,30	28,99	31,83	68,17	13,24	77,10	9,66
DPM	7,26	3,75	4,68	27,88	49,11	26,64	15,77	15,77	9,29	16,37	8,88
EPM	2,01	1,04	1,30	7,73	13,62	7,39	4,37	4,37	2,58	4,54	2,46

APÊNDICE D – Registro das medidas etológicas durante a exposição e reexposição de camundongos submetidos ao LCE.

Tabela 1A - 1C- Frequência totais das medidas etológicas dos animais pré-tratados (T1 e T2) com LH (500mg/kg) ou salina submetidos ao LCE.

Tabela 1A

Sujeito	Esticar							
	Grupos Experimentais							
	SAL-SAL		SAL-LH		LH-LH		LH-SAL	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	17	9	9	7	15	19	21	2
2	15	10	14	7	15	17	9	3
3	15	10	16	9	12	12	15	12
4	17	20	16	10	43	17	33	40
5	16	13	15	8	20	20	24	16
6	18	12	21	7	31	23	16	16
7	19	7	11	12	17	15	29	29
8	13	11	16	10	11	10	15	11
9	24	6	14	16	19	10	19	14
10	31	15	12	14	22	15	16	15
11	20	13			15	11	19	25
12					7	6	20	26
13					7	8	23	19
14					9	10		
15					12	13		
Média	18,6	11,5	14,4	10,0	17,0	13,7	19,9	17,5
DPM	5,05	3,88	3,31	3,13	9,53	4,80	6,33	10,47
EPM	1,52	1,17	0,96	0,99	2,46	1,24	1,76	2,90

Abreviações utilizadas: T1 Exposição T2 Reexposição

Tabela 1 B

Sujeito	Mergulho							
	Grupos Experimentais							
	SAL-SAL		SAL-LH		LH-LH		LH-SAL	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	6	4	7	0	3	6	7	0
2	8	1	6	0	9	7	4	1
3	5	8	5	0	1	0	5	0
4	3	4	7	3	7	2	4	4
5	5	1	8	10	12	2	5	3
6	4	0	6	0	7	2	2	3
7	3	1	9	3	12	2	21	3
8	6	0	3	0	9	3	19	9
9	4	0	13	2	6	1	6	1
10	3	0	0	1	6	2	26	10
11	4	0			5	3	3	3
12					2	7	4	2
13					11	9	5	1
14					7	3		
15					6	0		
Média	4,6	1,7	6,4	1,9	6,9	3,3	8,5	3,1
DPM	1,57	2,57	3,47	3,11	3,36	2,71	7,91	3,12
EPM	0,47	0,78	1,24	0,98	0,87	0,70	2,19	0,87

Abreviações utilizadas: T1 Exposição T2 Reexposição

Tabela 1C

Sujeito	Levantar							
	Grupos Experimentais							
	SAL-SAL		SAL-LH		LH-LH		LH-SAL	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	13	9	3	5	2	10	2	0
2	10	13	14	11	1	5	1	15
3	16	15	15	14	0	3	3	16
4	14	12	24	13	3	2	2	14
5	7	16	24	23	5	6	2	8
6	13	18	11	0	1	14	2	8
7	2	13	8	11	0	0	6	9
8	16	12	16	13	8	10	7	13
9	0	1	6	15	6	1	11	5
10	4	6	7	12	20	22	12	13
11	23	5			2	0	5	17
12					16	12	11	4
13					12	12	11	9
14					15	13		
15					7	8		
Média	10,73	10,91	12,80	11,70	6,53	7,87	5,77	10,08
DPM	6,92	5,15	7,22	6,06	6,42	6,25	4,19	5,12
EPM	2,08	1,55	2,28	1,92	1,66	1,62	1,16	1,42

Abreviações utilizadas: T1 Exposição T2 Reexposição