

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

**DIOGO COSTA GARÇÃO**

**PAPEL DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO NOS  
PROCESSOS DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA EM  
*CARASSIUS AURATUS* APÓS ABLAÇÃO CEREBELAR**

**São Carlos  
2009**

**DIOGO COSTA GARÇÃO**

**PAPEL DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO NOS PROCESSOS  
DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA EM *CARASSIUS*  
*AURATUS* APÓS ABLAÇÃO CEREBELAR**

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

**ORIENTADORA**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ROSANA MATTIOLI**

**São Carlos**  
**2009**

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

G237p

Garção, Diogo Costa.

Papel do sistema histaminérgico nos processos de aprendizagem e memória em *Carassius auratus* após ablação cerebelar / Diogo Costa Garção. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
62 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Cerebelo. 2. Memória. 3. L-Histidina. 4. Pirilamina. 5. Zolantidina. I. Título.

CDD: 615.78 (20ª)

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE Diogo Costa Garção APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 16 DE FEVEREIRO DE 2009.**

**BANCA EXAMINADORA:**



**Rosana Mattioli  
(UFSCar)**



**Keico Okino Nonaka  
(UFSCar)**



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

Aos meus pais, **Joel e Lourdes**, e ao meu irmão, **Danilo**, por toda dedicação, incentivo e apoio, tornando possível a concretização deste sonho.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À **Profª Drª Rosana Mattioli**, pela forma que me acolheu no laboratório, por ter acreditado em mim e por tudo que me ensinou durante esses anos. Admiro-te pela profissional ética, humana e competente. Muito obrigado!

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida e por repor minhas forças a cada amanhecer, obrigado companheiro por sempre iluminar e guiar meus passos.

Aos meus pais, **Joel e Lourdes**, pelo amor, carinho, dedicação e incentivo; o testemunho de vida dos senhores me faz acreditar que sou capaz, capaz de tentar, ousar, de conseguir. Apesar da ausência física diária, vocês estavam presentes constantemente em cada decisão tomada, através das porções de aprendizado humano que cada um ainda hoje continua me passando. Obrigado pelo apoio e por acreditarem no meu sonho, vocês são personagens principais dessa história. AMO VOCÊS!

Ao meu irmão, **Danilo**, que sempre torce por mim e do seu modo me ajudou. Valeu mano!

Aos professores doutores: **Azair Liane M.C. Souza, Carla Christina Medalha e Ricardo Nunes de Souza**, pela leitura atenciosa e valiosas contribuições para a elaboração dos manuscritos e dissertação final.

Aos **professores do PPG-FT** por todo o conhecimento que me proporcionaram em cada disciplina realizada.

Aos colegas de laboratório: **Fernanda Romaguera, Luciana, Marcos (Miagui), Kelly, Nadiesca, Anna Carolina, Lucas, Fernanda Daher e Glessler**, por todos os momentos que passamos juntos. Formamos a família neurociências, pela qual tenho um carinho muito especial! Obrigado pelo ombro amigo que sempre tive quando precisei!

À **Fernanda Romaguera**, por ter me ensinado a trabalhar com peixes e por ter me ajudado na elaboração do projeto de mestrado.

Ao **Glessler**, pela ajuda na realização de alguns experimentos.

Ao **Marcos (Miagui)**, pelas fotografias dos encéfalos que ilustram esse trabalho e revisão da dissertação.

À **Nadiesca**, pela leitura “cricri-metodológica” da dissertação final.

Às minhas colegas/amigas de turma, **Catarina e Carolina**, pela companhia, amizade e conselhos, sei que posso contar com vocês sempre. Obrigado por tudo!

Ao **Paulo, Junior, Guto, Marlon e Ricardo** pela amizade e momentos de diversão.

À **Ana Cláudia, Osmara, Kelly e Cristiane**, secretárias do PPG-FT, pela paciência e atendimento prestado durante esse período.

À **Tereza Fatori** pelo apoio técnico.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro concedido.

A todos que de alguma forma contribuíram para conclusão desse trabalho.

*A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Mattioli. 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 Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2007/06041-0.*

## RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo investigar o efeito farmacológico do precursor da histamina (L-histidina) e dos antagonistas dos receptores H<sub>1</sub> (Pirilamina) e H<sub>2</sub> (Zolantidina) na consolidação da memória de esquiva inibitória em *Carassius auratus* após ablação cerebelar. Para isso, foram realizados três experimentos, sendo empregados os mesmos procedimentos experimentais, no entanto, diferindo nos tratamentos farmacológicos realizados, que foram: I - L-histidina (dose: 100mg/kg) II - Pirilamina (dose: 35 mg/kg) e III - Zolantidina (dose: 20mg/kg), sendo todos acompanhados de dois grupos controle (Sham), um injetado com solução salina e outro da cirurgia (Lesão Fictícia). Um aquário foi dividido em dois compartimentos iguais por uma porta tipo guilhotina, sendo um compartimento branco e o outro preto. No compartimento preto foi associado um sistema de polia, do qual um peso era liberado na sua extremidade quando o animal entrava neste compartimento. Após três dias de recuperação da cirurgia, foi realizado o procedimento comportamental composto por três dias consecutivos, sendo eles: Habituação, Treino – cinco treinos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> e T<sub>5</sub>) e Teste. O tratamento farmacológico era realizado via intraperitoneal após dez minutos do último treino (T<sub>5</sub>) e em seguida os peixes foram recolocados no aquário de origem. O tempo utilizado pelo animal para entrar no compartimento escuro (latência) foi registrado em segundos nos treinos e no teste. Os dados foram analisados pelo teste de homogeneidade (Levene) e quando necessário foram transformados para log<sub>10</sub> (Experimento I). As latências dos treinos e do teste de cada experimento foram submetidas a análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla Student – Newman – Keuls (SNK). Os três experimentos indicaram que a ablação do cerebelo não impede que o animal aprenda o condicionamento de esquiva inibitória, no entanto, vinte quatro horas após o treino, os animais com ablação indicam retenção da tarefa enquanto os animais do grupo Sham não consolidam a mesma. Os resultados do experimento I mostraram que a L-histidina reverteu o efeito da lesão. O experimento II demonstrou que a Pirilamina não influencia na consolidação da memória e os dados do experimento III indicam que a zolantidina facilita a aquisição de esquiva inibitória independente do cerebelo. Estes resultados sugerem que o cerebelo está envolvido na consolidação da memória de esquiva inibitória e/ou interpretação do valor aversivo e que este processo é mediado via receptores H<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** aprendizagem; memória; cerebelo; l-histidina; pirilamina; zolantidina.

## ABSTRACT

This study investigated the effect of post-training treatment with L-histidine, Pyrilamine and Zolantidine on the memory consolidation of inhibitory avoidance in *Carassius auratus* submitted to cerebellar ablation. Cerebellar ablation was performed 3 days before the experiment. The inhibitory avoidance procedure included one habituation day, one training day (5 trials: T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>) and a test day (TE). On the training day, each fish was individually placed in a white compartment separated from a black compartment by a sliding door. After 30s, the door was opened. When the fish crossed into the black compartment, a weight was dropped in front of it (aversive stimulus). An intraperitoneal injection with saline or L-histidine (100 mg/kg), Pyrilamine (35 mg/ml) and Zolantidina (ZO) was administered 10 minutes after the trials. The difference in the time elapsed until the fish entered the black compartment (latency) during training and testing was taken as an indicator of behavioral learning and memory. Data were analyzed by ANOVA and the Student Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ). The three experiments indicated that in T<sub>5</sub>, all groups had similar latencies that were significantly higher than T<sub>1</sub> latencies, indicate that all groups were able to acquire inhibitory avoidance, suggesting that cerebellar ablation does not impair learning. However, twenty four hours after the trainings, the animals with ablation indicating retention of the task while that the animals of the Sham group do not consolidate memory. The results of experiment I showed that the L-histidine reverted the effect of injury. Experiment II demonstrated that the Pyrilamine does not influence in the consolidation of the memory and the data of experiment III indicated that the zolantidina facilitates the acquisition of inhibitory avoidance independent of the cerebellum. These results suggest that the cerebellum is involved in the memory consolidation of inhibitory avoidance and/or interpretation of the aversive value and that this process is mediated by H<sub>2</sub> receptors.

**Key words:** learning, memory, cerebellum, l-histidine, pyrilamine, zolantidina.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da distribuição do sistema histaminérgico no cérebro de teleósteos.	14
<b>Figura 2:</b> Cérebro dos peixes teleósteos. (A) Representação esquemática em vista dorsal; (B) representação esquemática em vista lateral com indicação das principais estruturas macroanatômicas.	16
<b>Figura 3:</b> Peixes da espécie <i>Carassius auratus</i> .	19
<b>Figura 4:</b> Aparato cirúrgico.	20
<b>Figura 5:</b> Encéfalo de <i>Carassius auratus</i> com visualização do cerebelo (A) e após ablação cerebelar (B).	21
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática do aquário experimental de esquiva inibitória.	22
<b>Figura 7:</b> Delineamento experimental de esquiva inibitória – tratamento pós-treino.	21
<b>Figura 8:</b> Microfotografia transversal do cerebelo com lesão fictícia (lado esquerdo) e ablação do corpo cerebelar (lado direito) de <i>Carassius auratus</i> .	25
<b>Figura 9:</b> Médias e erro padrão da média ( $\pm$ EPM) das latências dos grupos no Experimento I.	28
<b>Figura 10:</b> Médias e erro padrão da média ( $\pm$ EPM) das latências dos grupos no Experimento II.	30
<b>Figura 11:</b> Médias e erro padrão da média ( $\pm$ EPM) das latências dos grupos no Experimento III.	32

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Grupos experimentais com tratamento de L-histidina ou solução salina.	27
<b>Tabela 2:</b> Grupos experimentais com tratamento de Pirilamina ou solução salina.	29
<b>Tabela 3:</b> Grupos experimentais com tratamento de Zolantidina e solução salina.	31

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**SNH** – Sistema neural histaminérgico

**HA** – Histamina

**SNC** – Sistema nervoso central

**TM** – Núcleo tuberomamilar

**CPA** – Clorfeniramina

**LH** – L-histidina

**TMS** - Tricaína metassulfonato

**T** – Treino

**TE** - Teste

**PI** – Pirilamina

**ZOLA** – Zolantidina

**SL** – Solução salina

**SNK** - Teste de comparação múltipla Student – Newman – Keuls

**PL** – Porção lateral

**PM** – Porção medial

# SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<i>1.1 - Sistema Neural Histaminérgico e os Processos de Aprendizagem e Memória</i>	13
<i>1.2 – Papel da Histamina no Cerebelo</i>	16
<b>2 – OBJETIVO</b>	<b>18</b>
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<i>3.1 – Amostra</i>	19
<i>3.2 - Aspectos Éticos</i>	19
<i>3.3 - Procedimento Cirúrgico</i>	20
<i>3.4 - Aquário Experimental</i>	21
<i>3.5 – Procedimento Comportamental</i>	22
<i>3.6 - Tratamento Farmacológico e Procedimento de Injeção</i>	24
<i>3.7 – Filmagem</i>	24
<i>3.8 - Análise Histológica</i>	24
<b>4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>26</b>
<b>5 – EXPERIMENTOS</b>	<b>27</b>
<i>5.1 - Experimento I</i>	27
• Grupos Experimentais	27
• Resultados	27
<i>5.2- Experimento II</i>	29
• Grupos Experimentais	29
• Resultados	29
<i>5.3 - Experimento III</i>	31
• Grupos Experimentais	31
• Resultados	31
<b>6 – DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>7 – CONCLUSÕES</b>	<b>39</b>
<b>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>40</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO</b>	<b>61</b>

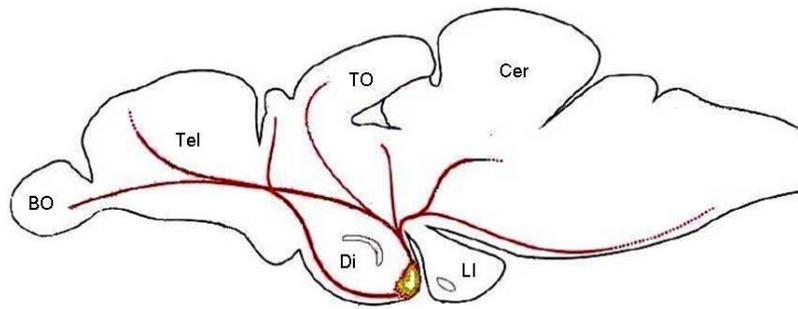
# 1 – INTRODUÇÃO

## ***1.1 - Sistema Neural Histaminérgico e os Processos de Aprendizagem e Memória.***

Há cerca de quatro décadas, iniciaram-se estudos sobre o Sistema Neural Histaminérgico (SNH) devido a seu efeito sedativo (Gabarg *et al.*, 1974), sendo depois descoberto seu papel como um neurotransmissor (Haas *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1991; Onodera *et al.*, 1994). A histamina (HA) é uma monoamina biogênica encontrada nos mastócitos e em neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC), mas que não ultrapassa a barreira hemato-cefálica. Sua síntese ocorre pela degradação da enzima N-metiltransferase, através da descarboxilação do aminoácido L-histidina (Watanabe *et al.*, 1984).

O local de síntese deste neurotransmissor em mamíferos é o núcleo tuberomamilar (TM) (Cooper *et al.*, 1996), que está localizado na região posterior do hipotálamo. As fibras eferentes do TM projetam-se em duas direções: as fibras ascendentes que passam pelo feixe prosencefálico medial e pela face ventral do hipotálamo chegando até o bulbo olfatório; e as fibras descendentes que projetam-se para o cerebelo e medula espinhal (Wada *et al.*, 1991). Filogeneticamente, o SNH é antigo e possui distribuição geral similar em todos os vertebrados (Panula *et al.*, 1984). Porém, a quantidade de HA no SNC varia entre as espécies, sendo maior nos mamíferos e menor nas aves e peixes, uma vez que esses últimos apresentam o córtex cerebral e o cerebelo menos desenvolvidos (Reite, 1972; Almeida & Beaven, 1981; Panula *et al.*, 1984; Panula *et al.*, 1990; Meek *et al.*, 1998).

Nos teleósteos (peixes com esqueleto ósseo) os corpos celulares histaminérgicos também são encontrados na parte posterior do hipotálamo, nas proximidades do terceiro ventrículo, em uma região correspondente ao TM dos mamíferos, a qual envia projeções ao telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, teto óptico, cerebelo e medula espinhal (Figura 1) (Inagaki *et al.*, 1990).



**Figura 1:** Representação esquemática da distribuição do sistema histaminérgico no cérebro de teleostes. (Adaptado de Kaslin e Panula, 2001). Abreviações: (BO) bulbo olfatório; (Tel) telencéfalo; (Di) diencéfalo; (TO) teto óptico; (LI) lobo inferior; (Cer) cerebelo.

As ações histaminérgicas são mediadas por quatro classes de receptores ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  e  $H_4$ ), os quais diferem em farmacologia, localização e ações intracelulares em que estão envolvidos (Schwartz *et al.*, 1991; Leurs *et al.*, 1995). No SNC estão presentes os receptores  $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$ , sendo que os receptores  $H_1$  e  $H_2$  são pós-sinápticos e o  $H_3$  é um autorreceptor pré-sináptico que regula a síntese e liberação de HA neural (Schwartz *et al.*, 1986; Arrang *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001). O receptor  $H_4$  foi recentemente identificado e sua função, até o momento, é considerada restrita ao sistema imunológico (Lin *et al.*, 2005).

Várias pesquisas têm sido realizadas no sentido de verificar quais influências o SNH exerceria sobre as funções do SNC. Dentre estas funções estão o controle do ritmo circadiano e do sono (Burns *et al.*, 2003), a ansiedade (Imaizumi & Onodera, 1993; Santos *et al.*, 2003; Faganelo & Mattioli, 2007), a percepção da dor (Mobarakeh *et al.*, 2000), a modulação da atividade psicomotora (Alvarez *et al.*, 1994), a aprendizagem e memória (De Almeida & Izquierdo, 1986; Mattioli *et al.*, 1998; Medalha *et al.*, 2000; Cofiel & Mattioli, 2006) e a plasticidade e recuperação funcional do SNC (Weiler *et al.*, 1992; Piratello & Mattioli, 2004; Piratello & Mattioli, 2007).

Evidências experimentais indicam que o SNH pode ter um importante papel nos processos de aprendizagem e memória. Coelho e colaboradores (2001) verificaram um efeito reforçador da L-histidina em um teste de preferência por lugar em *Carassius auratus*.

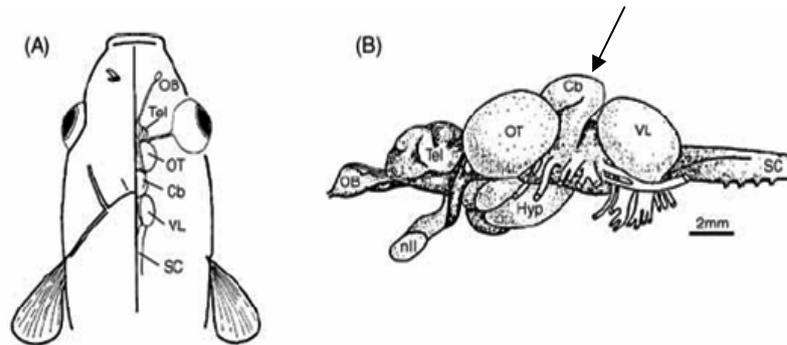
Hasenöhrl e colaboradores (2001) observaram que a HA, quando administrada no núcleo acumbente, causou facilitação da tarefa de esquivar, e produziu preferência por lugar, indicando a ação reforçadora da droga. Um estudo realizado por Faganello e Mattioli (2007) sugeriu que a inibição do sistema histaminérgico pela clorfeniramina (CPA), prejudicou o processo de recuperação funcional em peixes após ablação telencefálica. Prast e colaboradores, (1996) concluíram que a L-Histidina (LH), precursor da HA, tem efeito facilitador na memória de curta duração, em teste de memória social com ratos, e que a  $\alpha$ -fluormetilhistidina, um inibidor da síntese da HA, tem um efeito inibidor no processo de memória espacial em ratos. Esses resultados sugerem que a HA no córtex e hipocampo está intimamente relacionada nestes diversos tipos de modelos experimentais de memória. Da mesma forma, tanto a administração sistêmica como a intracerebroventricular de  $\alpha$ -fluormetilhistidina retardou a aquisição de esquivar ativa em ratos (Kamei *et al.*, 1993).

Por outro lado, segundo Faganello e Mattioli (2003) o papel da HA na aprendizagem e memória tem apresentado resultados contraditórios. Neste contexto, um estudo de Piratello e Mattioli (2004) sugeriu que a CPA, um antagonista histaminérgico do receptor H1, acelerou o processo de recuperação funcional em peixes após lesão vestibular. Outro estudo sugeriu que a administração de CPA apresenta um efeito positivo na aprendizagem e memória em *Carassius auratus* (Spiler *et al.*, 1999). Além disso, no estudo de Medalha e colaboradores (2000), verificou-se uma organização dose-dependente da facilitação desse processo. Há grande interesse na pesquisa sobre as bases neurais da aprendizagem e memória, uma vez que estes processos envolvem mecanismos celulares e moleculares bastante semelhantes aos inerentes à recuperação funcional (Wied, 1997).

Nesses processos, sabe-se da existência de diversas vias neurais envolvendo diferentes neurotransmissores em várias regiões do encéfalo, dentre elas o cerebelo.

## 1.2 - O Papel da Histamina no Cerebelo

O modelo de organização neural da circuitaria básica e das características neurofisiológicas do cerebelo em *Carasius auratus* (Figura 2) é similar a de outros vertebrados estudados (Rodriguez *et al.*, 2005).



**Figura 2:** Cérebro dos peixes teleósteos. (A) Representação esquemática em vista dorsal; (B) representação esquemática em vista lateral com indicação das principais estruturas macroanatômicas. (Adaptado de Broglio *et al.*, 2003). Abreviações: OB, bulbo olfatório; Tel, telencéfalo; nII, nervo óptico; OT, teto óptico; Cb, cerebelo (seta); Hyp, lobo hipotalâmico; SC, medula espinhal; VL, lobo vagal.

Pesquisas revelam que o cerebelo destes peixes está envolvido em processos de aprendizagem e memória (Lalonde *et al.*, 1990; Petrossini *et al.*, 1998; Durán *et al.*, 2001; Sacchetti *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004; Ito, 2005; Sacchetti *et al.*, 2005; Ito, 2006; Shutoh *et al.*, 2006) e funções emocionais (Yoshida *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2006), as quais anteriormente eram consideradas funções restritas do telencéfalo (Portavella *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2006; Ghidoni *et al.*, 2006). Outros trabalhos também demonstram o papel do cerebelo na regulação visceral, particularmente na modulação cardiovascular e respiratória (Li *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2006).

Evidências experimentais demonstram a existência de conexões diretas entre o cerebelo e estruturas telencéfalicas, as quais podem constituir uma via de comunicação envolvida na coordenação de tarefas não-motoras, como a memória de lugar (Vondershen *et*

*al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006). Em outro experimento, com auto-radiografia constatou-se o envolvimento dos receptores H<sub>1</sub> na transmissão de sinais desta mesma via (Takemura *et al.*, 2003). Segundo Choich e colaboradores (2004), os receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> são os que estão presentes em maior quantidade no cerebelo de peixes teleósteos. Um estudo utilizando cerebelo de ratos *in vitro*, demonstrou que a HA promove resposta excitatória nas células de Purkinje através dos receptores H<sub>2</sub>, uma vez que este efeito foi bloqueado pela ranitidina, revelando a importância das fibras histaminérgicas nas atividades funcionais do cerebelo (Tian *et al.*, 2000). Song e colaboradores (2006), utilizando cilindro de equilíbrio (*rota-rod*), observaram que o bloqueio dos receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> do núcleo interposto cerebelar em ratos promoveu um decréscimo no desempenho motor, para habilidades de coordenação e equilíbrio.

Deste modo, vários estudos também têm evidenciado que a histamina participa das alterações neuroplásticas associadas à recuperação funcional, além de funcionar como um substrato neural no controle do reforço e processos de memória e aprendizagem (Cofiel & Mattioli, 2006). Por outro lado, ainda não foram totalmente elucidados os efeitos do SNH sobre a estrutura cerebelar, e de que forma a associação estaria agindo sobre os processos de aprendizagem e memória.

## **2 - OBJETIVO**

Investigar o efeito farmacológico do precursor da histamina (L-histidina) e dos antagonistas dos receptores H<sub>1</sub> (Pirilamina) e H<sub>2</sub> (Zolantidina) na consolidação da memória de esquiva inibitória em *Carassius auratus* após ablação cerebelar.

## 3 – MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 – Amostra

Foram utilizados 177 peixes da espécie *Carasius auratus* (Figura 3), indeterminados quanto ao sexo e pesando entre 8 e 14g, provenientes de um único estabelecimento comercial local. Antes do experimento, os animais permaneceram no laboratório durante duas semanas em tanques de 500 litros, com finalidade de controlar possíveis doenças.



**Figura 3:** Peixes da espécie *Carasius auratus*.

A temperatura da água foi mantida em torno de 22°C, com filtração e oxigenação constante, sob ciclo de luz natural. Os animais eram alimentados com ração em forma de flocos (“Fast Color”, Hai Feng, Formosa), disponibilizada diariamente no período da manhã. A identificação dos animais foi realizada através das características físicas individuais, como cor, tamanho e formato de cauda.

### 3.2 – Aspectos Éticos

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pelo comitê de ética e pesquisa em animais da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (ANEXO A) e, concomitantemente, estiveram de acordo com os preceitos da Sociedade

Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC.

### ***3.3 - Procedimento Cirúrgico***

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Contudo, foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo que em um grupo foi realizada ablação cerebelar e, no outro, os cerebelos dos animais foram mantidos intactos.

Os peixes foram anestesiados com de solução de tricaína metassulfonato (TMS) – sal éster etílico do ácido 3-aminobenzóico metassulfonato (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em concentração de 0,8g/L de água. Após cessarem a atividade locomotora e os movimentos branquiais, o peixe era envolvido em gaze úmida e colocado em um fixador com um aparato bucal (Figura 4), que permanecia com perfusão constante de solução TMS, com concentração de 0,3g/L de água durante o procedimento cirúrgico.

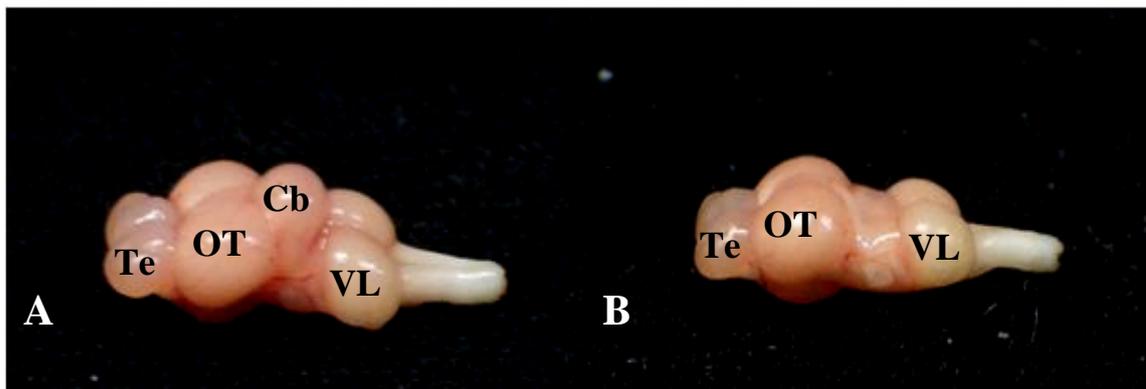


**Figura 4:** Aparato cirúrgico.

Realizou-se uma incisão no crânio e cuidadosamente o cerebelo foi aspirado através de uma pipeta conectada a uma bomba de vácuo (Microbomba Nevoni Standard, NSR Ind., Com. e Repr. Ltda., SP, Brasil). Posteriormente, o crânio era fechado com acrílico dental de secagem rápida (Acrílico Auto-Polimerizante Clássico, JET, SP, Brasil e Líquido Acrílico Auto-Polimerizante, Dental VIPI Ltda, SP, Brasil) e a ferida higienizada com azul de

metileno.

Em seguida, a solução de TMS era substituída por água até que os movimentos branquiais espontâneos retornassem e então os peixes eram recolocados nos aquários de manutenção. Este método cirúrgico foi descrito por Yoshida *et al.* (2004) e se mostrou eficaz em ablação cerebelar e lesão fictícia (Figura 5).



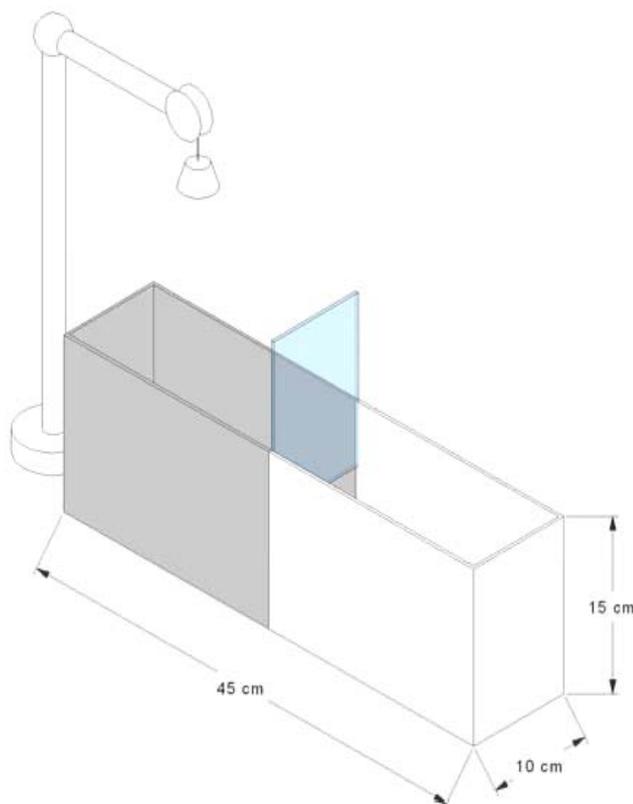
**Figura 5:** Encéfalo de *Carassius auratus* com visualização do cerebelo (A) e após ablação cerebelar (B). Abreviações: Te: telencéfalo; OT: Trato óptico; Cb: cerebelo; VL: lobo vagal.

Nos aquários de manutenção foram utilizadas doses preventivas do fungicida/bactericida e auxiliar no tratamento de parasitoses Labcon Aqualife (Alcon, SC, Brasil). Os peixes permaneceram no aquário de manutenção durante um período de recuperação de três dias antes das sessões experimentais.

### **3.4 - Aquário Experimental**

O aquário utilizado na realização dos experimentos tem 45 centímetros de comprimento, 10 centímetros de largura e 15 centímetros de altura, e é dividido em dois compartimentos iguais por uma porta tipo guilhotina, sendo um compartimento branco e o outro preto (Figura 6).

Ao lado do aquário foi fixado um sistema de polia, do qual um peso de 45 gramas poderia ser liberado a 5 centímetros da extremidade do compartimento preto do aquário, a uma altura de 15 centímetros da superfície da água.



**Figura 6:** Representação esquemática do aquário experimental de esquia inibitória (Cofiel & Mattioli, 2006).

### ***3.5 - Procedimento Comportamental***

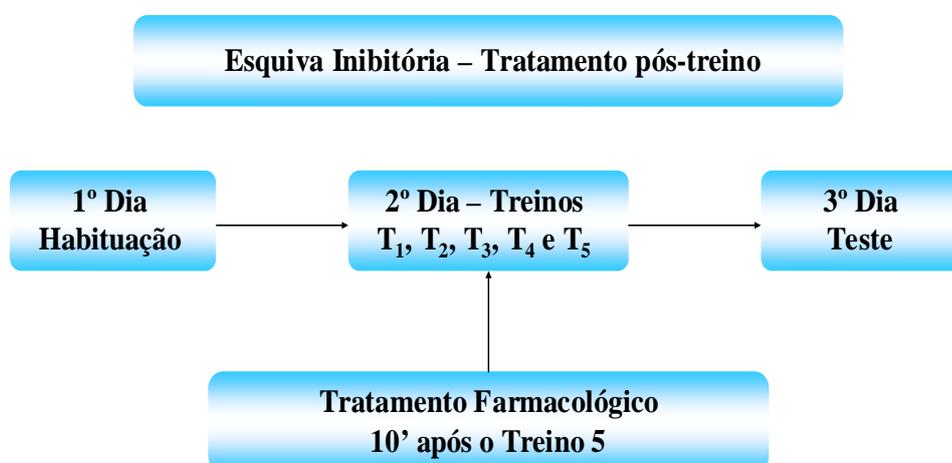
O procedimento comportamental foi composto por três dias consecutivos (Figura 7). No primeiro dia (Sessão de Habituação), os animais foram submetidos à habituação ao aquário experimental, na qual cada peixe era colocado individualmente no compartimento branco por 30 segundos, a porta guilhotina era aberta e o animal tinha 10 minutos para explorar o aquário, com livre acesso aos dois compartimentos.

No segundo dia (Sessão de Treino) eram realizados os treinos. O peixe era colocado no compartimento branco por 30 segundos. Após esse período, a porta guilhotina era aberta e o animal tinha 5 minutos para passar para o compartimento preto, sendo que os animais que não mudaram de compartimento nas duas primeiras tentativas eram excluídos do

experimento. Após a entrada do animal no compartimento preto, o peso era liberado à sua frente (T<sub>1</sub>). Caso o animal não retornasse para o compartimento branco, o peixe era deslocado gentilmente para o mesmo, a porta guilhotina era fechada e o procedimento era imediatamente repetido mais quatro vezes (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> e T<sub>5</sub>).

A partir do momento em que a divisória dos compartimentos era retirada, o tempo utilizado pelo animal para entrar no compartimento escuro (latência) foi registrado em segundos, sendo considerada a entrada no compartimento preto quando o peixe ultrapassava com o final da nadadeira dorsal a linha divisória dos compartimentos. Caso os animais não passassem na primeira tentativa, neste intervalo de tempo, a porta guilhotina era fechada e dava-se início a mais uma tentativa de treino. Imediatamente após o último treino (T<sub>5</sub>), os peixes eram recolocados no aquário de origem e após dez minutos era realizado o tratamento farmacológico.

No terceiro dia, era realizado o teste (TE), no qual o peixe era colocado no compartimento branco por 30 segundos, em seguida, a divisória dos compartimentos era retirada e o tempo utilizado pelo animal para entrar no compartimento escuro (latência do teste) era registrado em segundos.



**Figura 7:** Delineamento experimental de esquiva inibitória – tratamento pós-treino.

As latências dos treinos e do teste foram coletadas e consideradas como indicadores comportamentais de aprendizagem e memória.

### ***3.6 - Tratamento Farmacológico e Procedimento de Injeção***

As drogas utilizadas nos experimentos foram a LH – precursora da histamina, pirilamina sal de maleato (PI) – antagonista dos receptores H<sub>1</sub> e a zolantidina sal de dimaleato (ZOLA) – antagonista dos receptores H<sub>2</sub> - (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). As concentrações das drogas foram de 100 mg/ml para a LH (Medalha & Mattioli, 2007), 35 mg/ml para a PI (Masuoka & Kamei, 2007) e 20 mg/ml para a ZOLA (Cofiel & Mattioli, 2006), sendo injetado um volume de 1 ml/kg de peso do animal. As drogas foram diluídas em solução salina e as doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios que demonstraram influência nos processos de aprendizagem e memória.

Os animais do grupo controle receberam solução salina (SL) em volume equivalente ao da droga. As drogas e a solução salina foram mantidas sob refrigeração até o momento da sua utilização, em tubos codificados, de modo que o pesquisador não tinha conhecimento do conteúdo dos mesmos no momento dos experimentos.

As soluções foram administradas via intraperitoneal (i.p.) através de uma seringa Hamilton (710 N) de 100 µl, com uma cânula de polietileno adaptada a uma agulha dental.

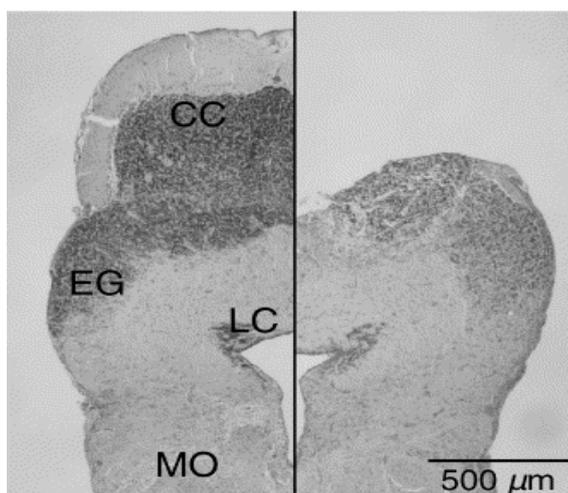
### ***3.7 – Filmagem***

Os experimentos foram gravados através de uma câmera de vídeo (Gradiente GCP 165-CR) e registrados em vídeo tape (Vídeo Cassete Mitsubshi HS X50). Posteriormente, as latências foram quantificadas pelo pesquisador através de um monitor de televisão (Philco Hitachi, 20”).

### ***3.8 – Análise Histológica***

Após a conclusão dos procedimentos experimentais, os animais foram

novamente anestesiados. Em seguida, eram decapitados e os cérebros foram removidos e fixados em formalina à 10% por no mínimo 5 dias. Depois disso, foram seccionados a uma espessura de 50  $\mu\text{m}$ , através de um criostato (Figura 8). Por meio de análise histológica, foi verificado se os cerebelos foram completamente removidos, sem lesionar outras áreas.



**Figura 8:** Microfotografia transversal do cerebelo com lesão fictícia (lado esquerdo) e ablação do corpo cerebelar (lado direito) de *Carassius auratus*. Abreviações: CC, corpo cerebelar; EG, grânulo eminente; LC, lobo caudal; MO, medula oblonga (Yoshida *et al.*, 2004).

## 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As latências dos treinos e do teste de cada experimento foram submetidas ao teste de Homogeneidade (Teste Levene), quando necessário os dados foram transformados para  $\log_{10}$  (Experimento I). Em seguida, nos três experimentos foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA de duas vias) seguido pelo teste de comparação múltipla Student – Newman – Keuls (SNK) ( $p < 0,05$ ).

## 5 - EXPERIMENTOS

Foram realizados três experimentos, sendo empregados os mesmos procedimentos experimentais descritos anteriormente, no entanto, diferindo no tratamento farmacológico.

### 5.1 - Experimento I: L-histidina (Precursor da histamina)

- **Grupos Experimentais**

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos, como mostra a tabela abaixo:

**Tabela 1:** Grupos experimentais com tratamento de L-histidina ou solução salina.

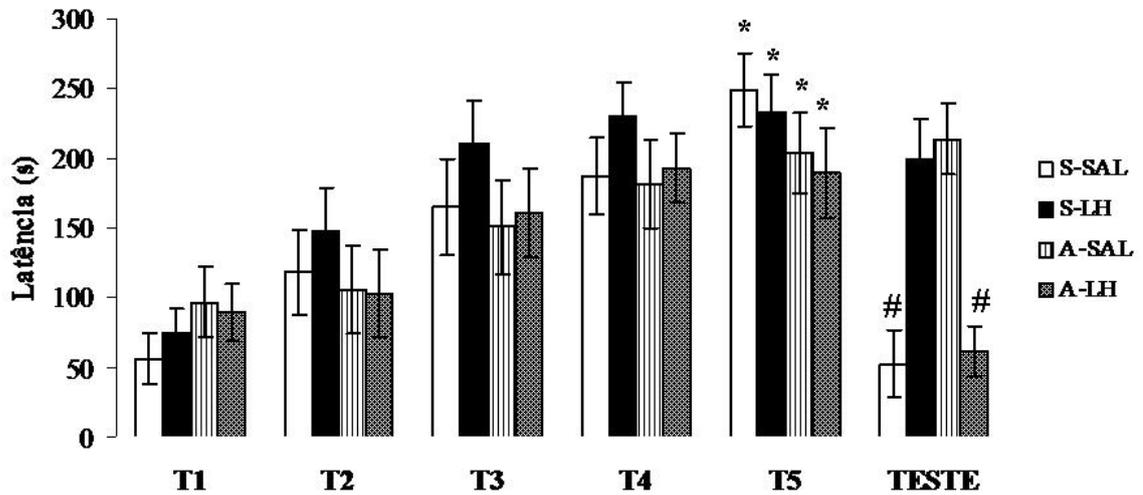
GRUPOS	TRATAMENTO	DOSE	n
Lesão Fictícia (S-SAL)	Solução Salina	-	14
Lesão Fictícia (S-LH)	L-Histidina	100 mg/ml	14
Ablação Cerebelar (A-SAL)	Solução Salina	-	14
Ablação Cerebelar (A-LH)	L-Histidina	100 mg/ml	15

- **Resultados**

A Figura 9 mostra as médias e erro padrão da média ( $\pm$ EPM) das latências dos grupos experimentais durante os treinos e o teste. A ANOVA de duas vias (Fator A: Tratamento e Fator B: Tentativa), revelou diferença estatisticamente significativa nas latências entre as tentativas ( $F_{(5,347)}=13,87$ ,  $p<0,0001$ ) e que houve interação dos fatores ( $F_{(15,347)}=3,60$ ,  $p<0,0001$ ), contudo não apontou diferença significativa entre os tratamentos realizados ( $F_{(15,347)}=1,63$ ,  $p=0,191$ ). O teste SNK, indicou aumento significativo das latências dos grupos em T5 quando comparados com T1, demonstrando que todos os grupos foram capazes de aprender a tarefa ( $p<0,05$ ).

No entanto, em TE, o teste SNK ( $p<0,05$ ) apontou diminuição significativa das latências dos grupos A-LH e S-SL em relação aos grupos A-SL e S-LH, demonstrando

que a ablação do cerebelo facilitou a retenção e a LH reverteu o efeito da lesão cerebelar.



**Figura 9:** Médias e erro padrão da média ( $\pm$ EPM) das latências dos grupos no Experimento I para os cinco treinos e o teste. (ANOVA de duas vias,  $p=0,0001$ , seguido do SNK  $p<0,05$ . (\*) Diferença estatisticamente significativa de T1,  $p<0,05$ . (#) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos em TE.

## 5.2 - Experimento II: Pirilamina (Antagonista dos receptores $H_1$ )

- **Grupos Experimentais**

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos, como mostra a tabela abaixo:

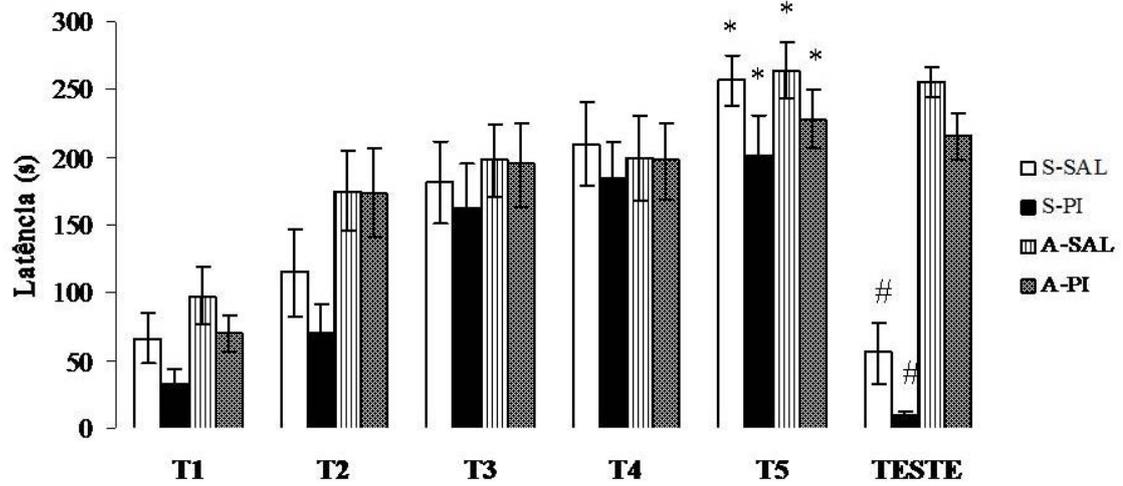
**Tabela 2:** Grupos experimentais com tratamento de Pirilamina ou solução salina.

GRUPOS	DROGAS	DOSE	n
Lesão Fictícia (S-SAL)	Solução Salina	-	15
Lesão Fictícia (S-PI)	Pirilamina	35 mg/ml	14
Ablação Cerebelar (A-SAL)	Solução Salina	-	16
Ablação Cerebelar (A-PI)	Pirilamina	35 mg/ml	15

- **Resultados**

As médias  $\pm$  EPM das latências em segundos dos treinos e teste são demonstradas na Figura 10. A ANOVA duas vias (Fator A: Tratamento e Fator B: Tentativa), demonstrou diferença significativa entre as latências e os tratamentos ( $F_{(3,359)} = 5,64$ ,  $p < 0,001$ ), as tentativas ( $F_{(5,359)} = 30,59$ ,  $p = 0,0019$ ) e interação dos fatores ( $F_{(15,359)} = 4,19$ ,  $p < 0,0001$ ).

O teste SNK indicou um aumento significativo das latências de todos os grupos em T5 quando comparados com T1, demonstrando que todos os grupos foram capazes de aprender a tarefa ( $p < 0,05$ ). Entretanto, no TE, o teste SNK demonstrou redução significativa das latências dos grupos S-SL e S-PI em relação aos grupos A-SL e A-PI, sugerindo que ablação do cerebelo facilitou a retenção de esQUIVA inibitória e que a PI não influencia na consolidação da memória.



**Figura 10:** Médias e erro padrão da média ( $\pm$ EPM) das latências dos grupos no Experimento II para os cinco treinos e o teste. (ANOVA de duas vias,  $p=0,0001$ , seguido do SNK  $p<0,05$ . (\*) Diferença estatisticamente significativa de T1,  $p<0,05$ . (#) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos em TE.

### 5.3 - Experimento III: Zolantidina (Antagonista dos receptores $H_2$ )

- **Grupos Experimentais**

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos, como mostra a tabela abaixo:

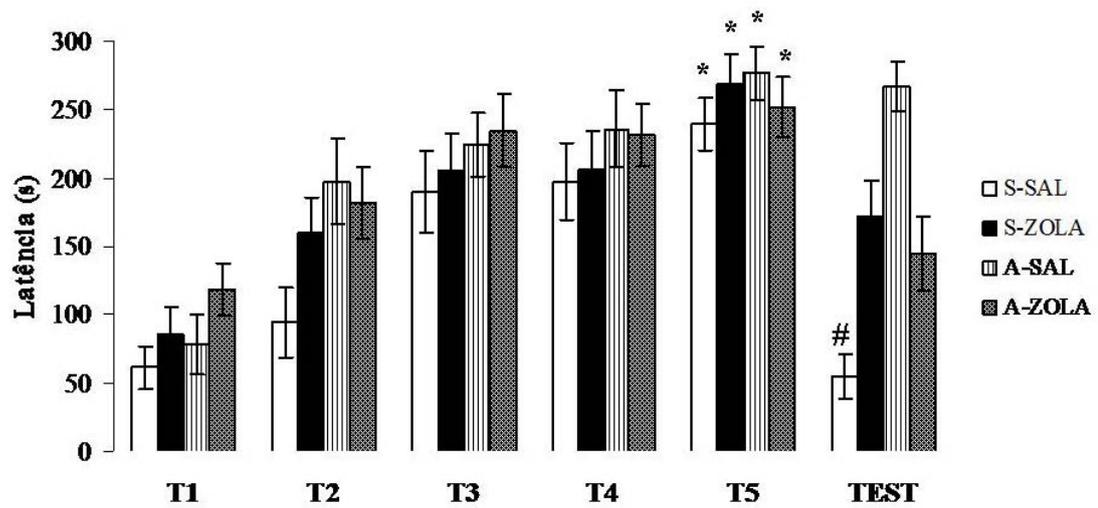
**Tabela 3:** Grupos experimentais com tratamento de Zolantidina e solução salina.

GRUPOS	DROGAS	DOSE	n
Lesão Fictícia (S-SAL)	Solução Salina	-	15
Lesão Fictícia (S-ZOLA)	Zolantidina	20 mg/ml	15
Ablação Cerebelar (A-SAL)	Solução Salina	-	15
Ablação Cerebelar (A-ZOLA)	Zolantidina	20 mg/ml	15

- **Resultados**

A ANOVA de duas vias (Fator A: Tratamento e Fator B: Tentativa), demonstrou diferença significativa na latência entre os tratamentos ( $F_{(5,323)}=28,31$ ,  $p<0,0001$ ), as tentativas ( $F_{(3,323)}=6,29$ ,  $p<0,001$ ) e interação dos fatores ( $F_{(15,323)} = 2,38$ ,  $p = 0,0031$ ).

O teste SNK indicou um aumento significativo das latências de todos os grupos em T5 quando comparados com T1, demonstrando que todos os grupos foram capazes de aprender a tarefa ( $p < 0,05$ ) (Figura 11). Todavia, no TE, o teste SNK demonstrou redução significativa das latências do grupo S-SL em relação aos grupos S-ZOLA, A-SL e A-ZOLA, sugerindo que ablação do cerebelo facilitou a retenção de esQUIVA inibitória e que a HA media este processo via receptores  $H_2$ .



**Figura 11:** Médias e erro padrão da média ( $\pm$ EPM) das latências dos grupos no Experimento III para os cinco treinos e o teste. (ANOVA de duas vias,  $p=0,0001$ , seguido do SNK  $p<0,05$ . (\*) Diferença estatisticamente significativa de T1,  $p<0,05$ . (#) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos em TE.

## 6 – DISCUSSÃO

O modelo experimental de condicionamento de esquiva inibitória para peixes da espécie *Carassius auratus* é um teste através do qual se infere aprendizagem e memória. Neste modelo, os peixes são treinados em um aquário de dois compartimentos, sendo um claro e outro escuro, associando-se ao compartimento escuro um estímulo aversivo (queda de peso). Devido à preferência natural dos peixes desta espécie por ambientes escuros (Santangelo & Mattioli, 1999), com a associação do estímulo aversivo ao compartimento escuro, os animais passam a evitar a entrada neste compartimento, permitindo a inferência de aprendizagem e memória de esquiva.

Diversos estudos utilizaram este modelo com o objetivo de investigar o efeito de diferentes drogas nos processos de aprendizagem, memória e recuperação funcional de peixes dourados (Medalha *et al.*, 2000; Faganello *et al.*, 2003; Cofiel & Mattioli, 2006; Faganello & Mattioli, 2008; Garção *et al.*, *in press*; Garção & Mattioli, 2009).

Os resultados dos três experimentos indicaram que todos os grupos foram capazes de aprender a tarefa de esquiva inibitória, sugerindo que a ablação cerebelar não impede a aprendizagem. Um estudo prévio demonstrou que peixes dourados submetidos à ablação cerebelar foram capazes de adquirir resposta de condicionamento bradicárdico - Condicionamento Emocional (Salas *et al.*, 2006). Por outro lado, outros estudos mostraram que a remoção completa do cerebelo prejudicou a aprendizagem de condicionamento clássico em *Carassius auratus* (Álvarez *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2003). Sendo o condicionamento de esquiva inibitória um teste de comportamento defensivo (Misslin, 2003), acreditamos que a presença de circuitos inibidores da atividade do mesencéfalo, diencéfalo e telencéfalo podem esclarecer o motivo pelo qual os peixes submetidos à ablação cerebelar foram capazes de aprender a tarefa.

Brandão *et al.* (2003) propõem que o teto do mesencéfalo possui circuitos locais capazes de gerar comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao medo, como no caso de esquiva inibitória. Contudo, outras estruturas encefálicas superiores também são necessárias para a regulação de comportamentos complexos relacionados ao medo. Por exemplo, as conexões entre o colículo inferior e a amígdala funcionam como um importante filtro de informações sensoriais de natureza aversiva (Maisonnette *et al.*, 1996). Adicionalmente, diversos estudos demonstraram a existência de conexões anatômicas entre o cerebelo e áreas límbicas, incluindo o núcleo accumbens, hipocampo, locus ceruleus, área tegmental ventral, área periaquedutal e amígdala (Sacchetti *et al.*, 2005). Sacchetti *et al.* (2007) propõe que a amígdala e o cerebelo são interconectados funcionalmente e que essas conexões são ativadas durante os processos de aprendizagem e memória aversiva.

Lesões na amígdala causaram drástica redução dos comportamentos de medo e agressividade, enquanto estimulação elétrica nessa estrutura induziu respostas de medo em animais e estado de medo em animais e humanos (Sacchetti *et al.*, 2005). Além disso, um estudo que realizou estimulação elétrica no vérmis cerebelar, tanto de ratos quanto de gatos após neurocirurgia, demonstrou que o cerebelo modula atividades comportamentais na amígdala (Heath *et al.*, 1978). Outro estudo em ratos submetidos à cerebelectomia usando o modelo experimental de esquiva inibitória indicou que essa estrutura está envolvida no processo de consolidação da memória emocional, mas que não é o local de armazenamento da memória (Dahhaoui *et al.*, 1990; Guillaumin *et al.*, 1991).

Nos três experimentos realizados, os animais com ablação cerebelar foram capazes de reter a informação vinte quatro horas após o treino, enquanto os animais do grupo lesão fictícia não consolidaram a memória. Deste modo, pode-se sugerir que os animais submetidos à ablação cerebelar foram capazes de reter a tarefa, uma vez que a ausência do cerebelo liberaria a ação da amígdala, prolongando o efeito do medo frente ao estímulo.

Diversos estudos revelaram que a HA afeta a plasticidade neural, sendo associada com a recuperação funcional (Piratello & Mattioli, 2007; Garção *et al.*, *in press*). Além disso, evidências experimentais sugerem a participação da HA como substrato neural para os processos de aprendizagem e memória emocional (Faganello & Mattioli; 2008). Adicionalmente, tanto a administração sistêmica quanto intracerebroventricular do inibidor da histamina ( $\alpha$ -fluormetilhistidina) retardou a aquisição de esQUIVA ativa em ratos (Kamei *et al.*, 1993). De forma similar, a histamina facilitou a retenção da memória de esQUIVA e causou preferência de lugar, indicando a ação reforçadora da droga (Hansenohrl *et al.*, 2001).

Ferretti e colaboradores (1998) demonstraram que a indução de estresse em ratos aumenta o nível de histamina no hipotálamo. Em outro estudo, administração intraventricular de histamina causou um aumento do radioisótopo  $^3\text{H}$ -HI (marcador da histamina) no hipotálamo e promoveu uma inibição dose-dependente no condicionamento de esQUIVA de ratos (Tasaka *et al.*; 1985). Em modelo de estresse por confinamento, com restrição de espaço durante duas horas, também foi observado aumento significativo do nível de histamina no diencéfalo de ratos (Ito *et al.*, 1999).

Apesar da dificuldade de comparação entre o SNC de peixes e mamíferos em virtude do processo de inversão do telencéfalo, estudos anatômicos e funcionais mostraram a existência de similaridade entre algumas estruturas do encéfalo de mamíferos com os três maiores grupos de células telencefálicas dos teleósteos (núcleo telencefálico dorsal, ventral e lateral) (Butter, 2000). A porção lateral (PL) está associada com a memória espacial e temporal, indicando homologia com o hipocampo de mamíferos; enquanto que a porção medial (PM) está relacionada à memória emocional sugerindo uma possível homologia com a amígdala de mamíferos. Além disso, estudos recentes demonstraram a existência de conexões entre o cerebelo e a PM em *Carassius auratus* e outros peixes teleósteos (Northcutt, 2006; Yang, 2004).

Vários estudos relataram o envolvimento da HA na regulação dos processos de aprendizagem e memória, e também em processos relacionados à recuperação funcional após lesão do SNC (Piratello & Mattioli, 2007; Garção *et al.*, *in press*). Em um estudo que realizou lesão do núcleo tuberomamilar em ratos ocorreram prejuízos na aprendizagem de esquiva inibitória, os quais foram revertidos pelo tratamento com LH, um precursor da histamina (Chen & Shen; 2002). Alvarez & Ruarte (2004) demonstraram que a administração local de HA no núcleo basolateral da amígdala de ratos reduziu a latência em modelo de esquiva inibitória, indicando que a HA afeta a memória.

Resultados similares foram encontrados no Experimento I do presente estudo, em que o grupo A-LH não consolidou a memória da tarefa de esquiva, 24 horas após o treino, enquanto a LH promoveu efeito oposto no grupo lesão fictícia. Esses dados podem ser explicados pelo efeito da LH na PM após a conexão entre o cerebelo e a PM ser destruída, prevenindo a consolidação da memória da esquiva inibitória. Estes resultados suportam evidências que a LH exerce efeito na consolidação da memória de esquiva inibitória em estruturas límbicas. Entretanto, futuros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Diversos estudos evidenciaram que a consolidação da memória de esquiva inibitória é afetada por administração de uma série de substâncias, tais como os antagonistas dos receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>. Entretanto, os resultados são contraditórios (Faganello *et al.*, 2003, Cofiel & Mattioli, 2006).

Segundo Medalha *et al.* (2000), a CPA facilitou a aquisição da tarefa de esquiva inibitória em peixes. Outro estudo que administrou CPA em peixes dourados apresentou um efeito facilitatório na aprendizagem e memória de tarefa espacial em *Carassius auratus* (Spieler *et al.*, 1999). No entanto, o bloqueio dos receptores H<sub>1</sub> em ratos impediu a consolidação da memória espacial no modelo de labirinto de oito braços (Xu *et al.*, 2005).

Os resultados do Experimento II demonstraram que a PI na dose utilizada não influencia na consolidação da memória de esQUIVA inibitória em animais submetidos à ablação cerebelar, tendo em vista que, independentemente do tratamento farmacológico os peixes apresentaram latências semelhantes, 24 horas após o treino. Nossos resultados estão de acordo com os achados da literatura, que indicam que o cerebelo é um dos locais com maior densidade dos receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> (Choich, 2005). Entretanto, os animais tratados com PI apresentaram médias significativamente menores em relação aos animais tratados com salina. O modelo experimental de esQUIVA inibitória para peixes é mais sensível para drogas facilitadoras de memória, uma vez que o grupo S-SAL não consolidou a tarefa 24 horas após o treino. Sugerimos que sejam realizados outros trabalhos a fim de esclarecer a diferença entre os grupos S-SL e S-PI, utilizando outros modelos experimentais de memória emocional.

No Experimento III, como apenas os animais do grupo S-SAL não foram capazes de reter a memória da tarefa, inferimos que tanto a ablação cerebelar quanto a administração de ZOLA resultou em facilitação da consolidação da memória de esQUIVA inibitória. Estes resultados concordam com outros trabalhos que apontam o envolvimento dos receptores H<sub>2</sub> na consolidação da memória.

Onodera *et al.* (1998) demonstraram que um agonista dos receptores H<sub>2</sub> (4-methylhistamine) provocou um efeito inibitório na retenção de esQUIVA passiva. Em outro estudo, a administração intracerebroventricular do antagonista dos receptores H<sub>2</sub>, Cimetidina, facilitou a consolidação da memória de tarefa de esQUIVA inibitória, enquanto que, a administração de HA atenuou a retenção da memória em ratos (Eidi *et al.*, 2003). Por outro lado, Flood *et al.* (1998) observaram um efeito facilitatório do agonista dos receptores H<sub>2</sub>, Dimaprit, na retenção da memória em modelo experimental com labirinto em T; ao contrário, a Cimetidina apresentou um efeito inibitório. Além disso, o bloqueio dos receptores H<sub>2</sub> por

meio da ZOLA prejudicou a aprendizagem e a memória de esQUIVA inibitória em *Carrasius auratus* (Cofiel & Mattioli, 2006).

Os resultados do presente estudo demonstraram envolvimento dos receptores histaminérgicos H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> na consolidação da memória e/ou interpretação do valor aversivo de esQUIVA inibitória em *Carassius auratus* após ablação cerebelar. Assim, esses dados reforçam as evidências que a HA exerce influencia inibitória no processo de consolidação da memória através dos receptores H<sub>1</sub> e efeito excitatório através dos receptores H<sub>2</sub>.

Alguns estudos demonstraram que ocorre o aumento dos níveis de metabólitos histaminérgicos com a idade e existem indícios de que um aumento da atividade histaminérgica esteja associado a distúrbios de funções mnemônicas que acompanham processos neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer (Prell *et al.*, 1988; Álvarez *et al.*, 1996). Deste modo, o estudo do SNH pode ser de grande importância, uma vez que existem evidências para possíveis papéis terapêuticos de anti-histaminérgicos nas doenças neurodegenerativas.

## 7 – CONCLUSÕES

- A ablação cerebelar não influencia a aprendizagem, mas facilita a consolidação de memória de esquiva inibitória, indicando que o cerebelo está envolvido em processos emocionais em *Carassius auratus*.
- A Histamina participa como substrato neural na consolidação da memória de esquiva inibitória em *Carassius auratus* e a L-histidina reverte o efeito da lesão.
- A Pirilamina não influencia na consolidação da memória de esquiva inibitória em teleósteos submetidos à ablação cerebelar.
- A Zolantidina facilita a consolidação da memória independente do cerebelo.
- Novos estudos devem ser realizados afim de se observar o envolvimento da histamina e conseqüentemente dos receptores histaminérgicos na conexão entre o cerebelo e a amídala.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Phylogeny of histamine in vertebrate brain. **Brain Research**, 2008: 244-250, 1981.

ALVAREZ, X. A.; FRANCO, A.; FERNANDEZ-NOVOA, L.; CACABELOS, R. Blood levels of histamine, IL-1 beta and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. **Mol Chem Neuropathol**, 29: 237-252, 1996.

ÁLVAREZ E; GÓMEZ A; RODRÍGUEZ F; GONZÁLEZ JA; GONZÁLEZ-PARDO H; ARIAS JL. Effects of classical conditioning on cytochrome oxidase activity in the cerebellum of goldfish. **International Behavioral Neuroscience Meeting**, 11: 49, 2002.

ÁLVAREZ E; GÓMEZ A; DURÁN E; OCAÑA FM; JIMÉNEZ-MOYA F; BROGLIO C. Brain substrates of “eyeblink” classical conditioning in goldfish. **Acta Neurobiol Exp**, 63: 62, 2003.

ALVAREZ EO; RUARTE MB. Glutamic acid and histamine-sensitive neurons in the ventral hippocampus and the basolateral amygdala of rat: functional interaction on memory and learning processes. **Behav Brain Res**, 152: 209-219, 2004.

ARONSON LR; HERBERMAN R. Persistence of a conditioned response in the cichlid fish, *Tilapia macrocephala*, after forebrain and cerebellar ablations. **Anat Rec**, 138: 332, 1960.

ARRANG, J.M.; GARBARO, M, SCHWARTZ, J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. In: BACCIOTTINI, L.; PASSANI, M.B.; MANNAIONI, P.F.; BLANDINA, P. Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. **Behav Brain Res**, 124: 183194, 2001.

BERNTSON GG; TORELLI MW. The paleocerebellum and the integration of behavioral function. **Physiol. Psychol**, 10:2-12, 1982.

BLANDINA P; EFOUDEBE M; CENNI G; MANNAIONI P; PASSANI MB. Acetylcholine, histamine and cognition: Two sides of the same coin. **Learn Mem**, 11:1-8, 2004.

BRANDÃO ML; TRONCOSO AC; MELO LL; SANDER, G. The relevance of neural substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **Eur J Pharmacol**, 463: 225-233, 2003.

BROWN, R.E.; STEVENS, D.R.; HASS, H.L. The physiology of brain histamine. **Prog Neurobiology**, 65: 637-72, 2001.

BURNS, T.A.; HUSTON J.P.; SPIELER, R.E. Circadian variation of brain histamine in goldfish. **Brain Res Bull**, 59: 299-301, 2003.

CHEN Z, SHEN YJ. Effects of brain histamine on memory deficit induced by nucleus basalis-lesion in rats. **Acta Pharmacol Sin.** 23:66-70, 2002.

CHOICH, J.A.; EL-NABAWI, A.; SILBERGELD, E.K. Evidence of histamine receptors in fish brain using an in vivo [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose autoradiographic method and an in vitro receptor-binding autoradiographic method. **Environ Res**, v. 94, p. 86-93, 2004.

COELHO, J.L.; MEDALHA, C.C. MATTIOLI, R. Analysis of effects of CPA and L-histidine on goldfish tested on a conditioned place preference model. **Behav Brain Res**, 124: 161-165, 2001.

COFIEL LP, MATTIOLI R. Involvement of histamine receptors in the acquisition of inhibitory avoidance in *Carassius auratus*. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 30: 1246-1250, 2006.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. Serotonin (5-hydroxytryptamine) and histamine. In: **The biochemical basis of neuropharmacology**, 7th. ed. New York: Oxford University Press, p. 352-409.1996.

DAHHAOUI M, CASTON J, AUVRAY N, REBER A. Role of the cerebellum in an avoidance conditioning task in the rat. **Physiol Behav**, 47:1175-80, 1990.

DE ALMEIDA, M.A.M.R.; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. **Archives Internationales de Pharmacodynamie**, 283: 193-8,1986.

DEMSKI, L.S.; BEAVER, J.A. Brain and cognitive function en teleosts fishes. In: ROTH, G.; WULLIMAN, M.F. (Ed.). **Brain Evolution and Cognition**. New York: Wiley,. p. 297-332, 2001.

DIETRICH E.; HAINES, D.E.; ROSTE, G.K.; ROSTE, L.S. Hypothalamocerebellar and cerebellohypothalamic projections – Circuits for regulating nonsomatic cerebellar activity? **Histol Histopathol**, 9: 603-614, 1994.

DURÁN, E.; ÁLVAREZ, E.; GÓMEZ, A.; MANUCCIA, R.; RODRIGUEZ, F.; SALAS, C. Cerebellar lesions impair spatial learning in goldfish. 3rd **European Conference on Comparative Neurobiology**, 63, 2001.

DURÁN, E.; GÓMEZ, A.; OCAÑA, F. M.; ÁLVAREZ, E.; BROGLIO, C.; JIMÉNEZ-MOYA, F.; RODRIGUÉZ, F.; SALAS, C. Cerebellum and spatial learning in teleost fish, **FENS Forum Abstracts**, 2: 112-15, 2004.

EIDI M, ZARRINDAST MR, EIDI A, ORYAN S, PARIVAR K.Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. **Eur J Pharmacol**. 2003 Mar 28;465(1-2):91-6.

EKSTROM P; HOLMQVIST BI; PANULA P. Histamine-immunoreactive neurons in the

brain of the teleost *Gasterosteus acuteatus*: Correlations with hypothalamic tyrosine hydroxylase and serotonin-immunoreactive neurons. **J Chem Neuroanat** 8:74-85, 1995.

FAGANELLO, F.R.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLI, R. Haloperidol and chlorpheniramine interaction in inhibitory avoidance in goldfish. **Behav Brain Res**, 147: 83-88, 2003.

FAGANELLO, F. R.; MATTIOLI, R. Anxiolytic-like effect of chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 30: 269-74, 2007.

FAGANELLO FR; MATTIOLI R. Chlorpheniramine facilitates inhibitory avoidance in teleosts submitted to telencephalic ablation. **Braz J Med Biol Res** 41: 398-402, 2008.

FERRETTI C, BLENGIO M, GHI P, ADAGE T, PORTALEONE P, RICCI GS. Hypothalamic histamine release in normal and stressed rats is affected by sex and aging. **Pharmacol Biochem Behav** 59: 255-60, 1998.

FLOOD, J.F.; UEZO K., MORLEY, J.E. Effect of histamine H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub> receptor modulation in the septum on post-training memory processing. **Psychopharmacol**, 140: 279-284, 1998.

GABARG, M.; BARBIN, G.; SHWARTZ, J.C. Histaminergic pathway in rat brain evidenced by lesions of the medial forebrain bundle. **Science**, 186: 833-835, 1974.

GARÇÃO, D. C.; MATTIOLI, R. L-histidine impairs the inhibitory avoidance in *Carassius auratus* submitted to cerebellar ablation. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p. 135-140, 2009.

GARÇÃO, D.C.; CANTO-DE-SOUZA, L.; ROMANGUERA, F.; MATTIOLI, R. Chlorpheniramine impairs functional recovery in *Carassius auratus* after telencephalic ablation. **Braz J Med Biol Res**, (*in press*).

GHIDONI, R.; BOCCARDI, M.; BENUSSI, L.; TESTA, C.; VILLA, A.; PIEVANI, M.; GIGOLA, L.; SABATTOLI, F.; BARBIERO, L.; FRISONI, G. B.; BINETTI, G. Effects of estrogens on cognition and brain morphology: involvement of the cerebellum. **Maturitas**, 54, 222-228, 2006.

GÓMEZ, Y.; VARGAS, J. P.; PORTAVELLA, M.; LÓPEZ, J. C. Spatial learning and goldfish telencephalon NMDA receptors. **Neurobiol Learn Mem**, 85: 252-262, 2006.

GUILLAUMIN S, DAHHAOUI M, CASTON J. Cerebellum and memory: an experimental study in the rat using a passive avoidance conditioning test. **Physiol Behav** 49:507-11, 1991.

HAAS, H. L.; REINER, P. B.; GREENE, R. W. Histaminergic and histaminoceptive neurons: electrophysiological studies in vertebrates. In: Wanatabe, T.; Wada, H. (Eds.), **Histaminergic Neurons; Morphology and Function**. CRC Press, Boca Raton, pp. 195-208, 1991.

HASENÖHRL, R.U.; KUHLEN, A.; FRISCH, C.h.; GALOSI, R.; BRANDÃO, M.L.;

HUSTON, J.P. Comparison of intra-accumbens injection of histamine with histamine H1-receptor antagonist chlorpheniramine in effects on reinforcement and memory parameters. **Behav Brain Res**, 124: 203-211, 2001.

HEATH RG, DEMPESY CW, FONTANA CJ, A. Cerebellar stimulation: effects on septal region, hippocampus, and amygdala of cats and rats. **Biol Psychiatry** 13: 501-29, 1978.

IMAIZUMI, M; ONODERA, K. The behavioral and biochemical effects of thioperamide, a histamine H3-receptor antagonist, in a light/dark test measuring anxiety in mice. **Life Sci**, 53: 1675-1683, 1993.

INAGAKI, N., TODA, K.; TANIUCHI, I.; PANULA, P.; YAMATODANI, A.; TOYAMA, M.; WATANABE, T.; WADA, H. An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rat. **Exp Brain Res**, 80: 374-380, 1990.

ITO C; SHEN H; TOYOTA H; KUBOTA Y; SAKURAI E; WATANABE T. Effects of the acute and chronic restraint stresses on the central histaminergic neuron system of Fischer rat. **Neurosci Lett**, 262: 143-5, 1999.

ITO, M. Bases and implications of learning in the cerebellum-Adaptive control and internal model mechanism. **Prog Brain Res**, 148: 95-109, 2005.

ITO, M. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. **Prog Neurobiol**, 78: 272-303, 2006.

KAMEI, C.; OKUMURA, Y.; TASAKA, K. Influence of the histamine depletion on learning and memory recollection in rats. **Psychopharmacology**, 111: 376-382, 1993.

KAPLAN H; ARONSON LR. Function of forebrain and cerebellum in learning in the teleost *Tilapia heudelotii macrocephala*. **Bull Am Mus Nat Hist** 142: 141-208, 1969.

LALONDE, R.; BOTEZ, M. I. The cerebellum and learning processes in animals. **Brain Res**, 15: 325-332, 1990.

LEURS, R.; SMIT, M.J.; TIMMERMAN, H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. **Pharmacol. Ther**, 66: 413-463, 1995.

LI, W.; TANG, X.; LI, H.; WANG, J. Histamine excites rat cerebellar granule cells in vitro through H1 and H2 receptors. **J Physiol Paris**, 1999.

LIM, H. D.; RIJN, R. M. V.; LING, P.; BAKKER, R. A.; THURMOND, R. L.; LURS, R. Evaluation of Histamine H1-, H2-, and H3-Receptor Ligands at the Human Histamine H4 Receptor: Identification of 4-Methylhistamine as the First Potent and Selective H4 Receptor Agonist. **J Pharmacol Exp Ther**, 314:1310–1321, 2005.

LIU, Y.; BRAUD, W.G. Modification of learning and memory in goldfish through the use of stimulant and depressant drugs. **Psychopharmacologia**, 35: 99-112, 1974.

LÓPEZ, J. C.; BINGMAN, V. P.; RODRÍGUEZ, F.; GÓMEZ, Y.; SALAS, C. Dissociation of place and cue learning by telencephalic ablation in goldfish. **Behav Neuro**, 114: 687-699, 2000.

MAISONNETTE SS; KAWASAKI MC; COIMBRA NC; BRANDÃO ML. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Res Bull**, 40: 93-98, 1996.

MASUOKA T, KAMEI C. Role of hippocampal H1 receptors in radial maze performance and hippocampal theta activity in rats. **Brain Res Bull**, 12: 231-7, 2007.

MATTIOLI, R.; NELSON, C. A.; HUSTON, J. P.; SPIELER, R.E. Conditioned place preference analysis in the goldfish with the H1 histamine antagonist chlorpheniramine. **Brain Res Bull**, 45: 41-44, 1998.

MAMMOTO TADANORI; YAMAMOTO Y.; KAGAWA K.; HAYASHI Y.; MASHIMO T.; YOSHIYA I.; YAMATODANI A.. Interactions between neuronal histamine and halothane anesthesia in rats. **J Neurochem**. 69: 406-411, 1997.

MEDALHA, C. C.; COELHO, J. L.; MATTIOLI, R. Analysis of the role of histamine in inhibitory avoidance in goldfish. **Prog NeuroPsychopharmacolo Biol Psychiatry**. 24: 295-305, 2000.

MEDALHA CC; MATTIOLI R. Involvement of the histaminergic system on appetitive learning and its interaction with haloperidol in goldfish. **Neurosci Lett** 418: 195-200, 2007.

MEEK, J.; NIEUWENHUYS, R. Holosteans and teleosts. In: NIEUWENHUYS, R.; TEN DONKELAAR, H. J.; NICHOLSON, C. **The central nervous system of vertebrates**. Springer-Verlag, Berlin, 759-937, 1998.

MISSLIN R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiol Clin** 33: 55-66, 2003.

MOBARAKEH, J. I.; NALWALK, J. W.; WATANABE, T.; SAKURADA, S.; HOFFMAN, M.; LEURS, R.; TIMMERMAN, H.; SILOS-SANTIAGO, I.; YANAI, K.; HOUGH, L. B. Imiprogran antinociception does not require neuronal histamine or histamine receptors. **Brain Res**, 974: 146-152, 2000.

NORTHCUTT RG. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. **J Comp Neurol**, 494: 903-43. 2006.

ONODERA, K., YAMATODANI, A.; WATANABE, T.; WADA, H. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. **Prog. Neurobiol**, 42: 685-702, 1994.

ONODERA K, MIYAZAKI S, IMAIZUMI M. Cognitive involvement by negative modulation of histamine H<sub>2</sub> receptors in passive avoidance task in mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**. 20: 307-10, 1998.

PANULA, P.; YANG, H-YT; COSTA, E. Histamine-containing neurons in rat hypothalamus. **Proc Natl Acad USA**, 81: 2572-6, 1984.

PANULA, P.; AIRAKSINEN, M. S.; PIRVOLA, V.; KOTILAINEN, E. A histamine-containing neural system in human brain. **Neurosci**, 34: 127-31, 1990.

PEITSARO N; KASLIN J; ANICHTCHIK OV; PANULA P. Modulation of the histaminergic system and behaviour by  $\alpha$ -fluoromethylhistidine in zebrafish. **J Neurochem** 86: 432-441, 2003.

PETROSINI, L.; LEGGIO, M. G.; MOLINARE, M. The cerebellum in spatial problem solving: a co-start or a guest start? **Prog Neurobiol.**, 56, 191-210, 1998.

PIRATELLO, A.C.; MATTIOLI, R. Effects of Chlorpheniramine and L-histidine on vestibular compensation in goldfish, *Carassius auratus*. **Neurosci Lett**, v.367: p 160163, 2004.

PIRATELLO, A. C.; MATTIOLI, R. Thioperamide delays vestibular compensation in goldfish. **Neurosci Lett**, 415: 146-148, 2007.

PORTAVELLA, M.; VARGAS, J. P.; TORRES, B.; SALAS, C. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. **Brain Res**, 57: 397-399, 2002.

PRAST, H.; ARGYRIOU, A.; PHILIPPU, A. Histaminergic neurons facilitate social memory in rats. **Brain Res**, 102: 937-944, 1996.

PRELL GD, KHANDELWAL JK, BURNS RS, LEWITT PA, GREEN JP. Elevated levels of histamine metabolites in cerebrospinal fluid of aging, healthy humans. **Compr Gerontol [A]**, 2:114-9, 1988.

REITE, O.B. Comparative physiology of histamine. **Physiological Reviews**, v.52, p. 778-819, 1972.

RODRÍGUEZ F, DURÁN E, GÓMEZ A, OCAÑA FM, ALVAREZ E, JIMÉNEZ-MOYA F, BROGLIO C, SALAS C.. Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. **Brain Res Bull**, 66: 365-70, 2005.

SACCHETTI, B.; BALDI, E.; LORENZINI, C. A.; BUCHERELLI, C. Cerebellar role in fear-conditioning consolidation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 99: 8406-11, 2002.

SACCHETTI, B.; SCELFO, B.; STRATA, P. The cerebellum: synaptic changes and fear

conditioning. **Neuroscientist**. 11: 217-227, 2005.

SACCHETTI B; SACCO T; STRATA P. Reversible inactivation of amygdala and cerebellum but not perirhinal cortex impairs reactivated fear memories. **Eur J Neurosci**, 25: 2875-84, 2007.

SALAS C; BROGLIO C; DURÁN E; GÓMEZ A; OCAÑA FM; JIMÉNEZ-MOYA F. Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. **Zebrafish**, 3: 157-71, 2006.

SANTANGELO, EM; MATTIOLI, R. Preferência natural por ambientes escuros em *Carassius auratus*. **Anais da XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 1999.

SANTOS, N. R.; HUSTON, J. P.; BRANDÃO, M. L. Blockade of histamine H2 receptors of the periaqueductal gray and inferior colliculus induces fear-like behaviours. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, 75, 25-33, 2003.

SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M.; GARBARG, M. Three classes of histamine receptor in brain. **Trends Pharmacol. Sci**. 7: 24-28, 1986.

SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M.; GARBARG, M.; POLLARD, H.; RUAT, M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. **Physiol. Rev**, 1: 1-51, 1991.

SHUTOH, F.; OHKI, M.; KITAZAWA, H.; ITOHARA, S.; NAGAO, S. Memory trace of motor learning shifts transsynaptically from cerebellar cortex to nuclei for consolidation. **Neuroscience**. 139: 767-777, 2006.

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

SONG, Y.N.; LI, H.Z.; ZHU, J.N.; GUO, C.C.; WANG, J.J. Histamine improves rat rota-rod and balance beam performances through H(2) receptors in the cerebellar interpositus nucleus. **Neuroscience**, 19: 33-43, 2006.

TAKEMURA, M.; KITANAKA, N.; KITANAKA, J.; Signal transduction by histamine in the cerebellum and its modulation by N-methyltransferase. **Cerebellum**, 2: 39-43. 2003.

TASAKA K; KAMEI C; AKAHORI H; KITAZUMI K. The effects of histamine and some related compounds on conditioned avoidance response in rats. **Life Sci**, 21: 2005-14, 1985.

TIAN, L.; WEN, Y.; LI, H.; ZUO, C.; WANG, J.J. Histamine excites rat cerebellar purkinje cells via H2 receptors in vitro. **Neuroscience**, 61-66. 2000.

VONDERSCHEN, K.; BLECKMANN, H.; HOFMANN, M.H. A direct projection from the cerebellum to the telencephalon in the goldfish, *Carassius auratus*. **Neurosci Lett**, 320: 37-

40, 2002.

WADA, H.; INAGAKI, N.; YAMATODANI, A.; WATANABE, T. Is the histaminergic neurons system a regulatory centre for whole-brain activity?. **Trends Neuroscience**, 14: 415-418; 1991.

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

WEILER, H.T.; WAGNER, U.; HUSTON, J.P. Unilateral lesion in the tuberomammillary nucleus region: behavioral asymmetries and effects of histamine precursor. **Behav Brain Res**, 49: 167-73, 1992.

WHITE, J.M.; RUMBOLD, G.R. Behavioural effects of histamine and its antagonists: a review. **Psychopharmacology**, 95: 1-14; 1988.

WIED, D.de. Neuropeptides in learning and memory processes. **Behav Brain Res**, 83: 83-90, 1997.

XU LS, YANG LX, HU WW, YU X, MA L, LIU LY, WEI EQ, CHEN Z. Histamine ameliorates spatial memory deficits induced by MK-801 infusion into ventral hippocampus as evaluated by radial maze task in rats. **Acta Pharmacol Sin**, 26:1448-53, 2005.

YANG CY, YOSHIMOTO M, XUE HG, YAMAMOTO N, IMURA K, SAWAI N, ISHIKAWA Y, ITO H. Fiber connections of the lateral valvular nucleus in a percomorph teleost, tilapia (*Oreochromis niloticus*). **J Comp Neurol** 474(2):209-26, 2004.

YOSHIDA, M.; OKAMURA, I.; UEMATU, K. Involved the cerebellum in classical fear conditioning in goldfish. **Behav Brain Res**, 153: 143-148, 2004.

ZHU, J.; YUNG, W.; CHOW, B. K.; CHAN, Y.; WANG, J. The cerebellar-hypothalamic circuits: potential pathways underlying cerebellar involvement in somatic-visceral integration. **Brain Res** 52: 93-106, 2006.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Tabela 1: Valores das latências (s) dos animais submetidos à lesão fictícia e tratamento pós-treino com salina (Grupo S-SL) no Experimento I.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	88	26	300	80	300	100
2	2	10	11	8	300	10
3	6	60	20	300	69	10
4	110	153	300	180	300	3
5	255	300	300	300	284	300
6	88	300	240	300	300	232
7	50	197	300	219	300	15
8	22	167	300	109	300	8
9	10	15	300	129	300	5
10	69	10	28	300	300	1
11	11	14	68	245	18	4
12	8	100	19	177	300	4
13	71	300	12	274	300	46
14	4	5	113	3	116	1
<b>MÉDIA</b>	<b>56,71</b>	<b>118,36</b>	<b>165,07</b>	<b>187,43</b>	<b>249,07</b>	<b>52,79</b>
<b>EPM</b>	<b>17,60</b>	<b>30,21</b>	<b>34,65</b>	<b>27,66</b>	<b>25,82</b>	<b>24,48</b>

## APÊNDICE B

Tabela 2: Valores das latências (s) dos animais submetidos à lesão fictícia e tratamento farmacológico pós-treino com L-Histidina (Grupo S-LH) no Experimento I.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T3</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	8	9	6	300	116	120
2	4	5	103	3	126	150
3	19	300	227	300	300	300
4	170	138	300	300	300	300
5	53	3	240	300	300	30
6	152	300	78	300	300	300
7	132	276	300	300	266	300
8	6	153	300	158	300	300
9	192	121	196	205	300	300
10	34	6	7	190	14	17
11	170	300	300	300	300	216
12	20	100	300	177	31	100
13	28	44	300	300	300	300
14	46	300	300	85	300	59
<b>MÉDIA</b>	<b>73,86</b>	<b>146,79</b>	<b>211,21</b>	<b>229,86</b>	<b>232,36</b>	<b>199,43</b>
<b>EPM</b>	<b>18,43</b>	<b>32,24</b>	<b>29,43</b>	<b>24,95</b>	<b>28,16</b>	<b>29,57</b>

## APÊNDICE C

Tabela 3: Valores das latências (s) dos animais submetidos à ablação cerebelar e tratamento pós-treino com salina (Grupo A-SL) no Experimento I.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	4	76	7	160	300	59
2	56	228	174	300	173	14
3	300	5	300	300	300	300
4	25	148	300	19	6	121
5	3	3	3	4	136	300
6	56	10	300	10	82	300
7	154	287	300	192	180	239
8	75	107	12	241	7	300
9	250	300	300	300	300	300
10	125	300	218	158	300	123
11	219	5	7	253	300	193
12	35	6	14	3	300	253
13	47	4	136	300	300	288
14	9	8	40	300	176	201
<b>MÉDIA</b>	<b>97,00</b>	<b>106,21</b>	<b>150,79</b>	<b>181,43</b>	<b>204,29</b>	<b>213,64</b>
<b>EPM</b>	<b>25,17</b>	<b>31,61</b>	<b>34,26</b>	<b>31,88</b>	<b>28,96</b>	<b>25,37</b>

## APÊNDICE D

Tabela 4: Valores das latências (s) dos animais submetidos à ablação cerebelar e tratamento farmacológico pós-treino com L-Histidina (Grupo A-LH) no Experimento I.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	22	35	25	33	15	2
2	48	7	140	116	47	3
3	4	9	11	183	148	68
4	245	300	300	300	300	38
5	3	5	4	224	4	8
6	150	25	145	70	300	211
7	142	127	300	300	300	11
8	215	296	277	219	300	6
9	126	300	292	247	300	41
10	161	52	180	171	300	69
11	6	12	147	300	300	179
12	112	300	280	300	176	40
13	83	9	300	300	300	184
14	21	15	8	84	12	14
15	2	62	6	46	42	49
<b>MÉDIA</b>	<b>89,33</b>	<b>103,60</b>	<b>161,00</b>	<b>192,87</b>	<b>189,60</b>	<b>61,53</b>
<b>EPM</b>	<b>20,41</b>	<b>31,39</b>	<b>31,06</b>	<b>25,17</b>	<b>32,52</b>	<b>17,71</b>

## APÊNDICE E

Tabela 5: Valores das latências (s) dos animais submetidos à lesão fictícia e tratamento pós-treino com salina (Grupo S-SL) no Experimento II.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	88	26	80	300	300	300
2	2	10	8	11	300	15
3	6	60	300	20	69	11
4	110	153	180	300	300	3
5	255	300	300	300	284	2
6	88	300	300	240	300	232
7	50	197	219	300	300	15
8	199	300	300	300	300	10
9	63	31	187	300	300	73
10	21	300	300	300	300	1
11	2	2	20	2	180	21
12	95	14	277	300	300	94
13	6	6	22	261	258	5
14	4	5	3	113	116	1
15	10	20	222	100	250	55
<b>MÉDIA</b>	<b>66,60</b>	<b>114,93</b>	<b>181,20</b>	<b>209,80</b>	<b>257,13</b>	<b>55,87</b>
<b>EPM</b>	<b>19,07</b>	<b>31,98</b>	<b>30,27</b>	<b>30,46</b>	<b>18,69</b>	<b>22,64</b>

## APÊNDICE F

Tabela 6: Valores das latências (s) dos animais submetidos à lesão fictícia e tratamento farmacológico pós-treino com Pirilamina (Grupo S-PI) no Experimento II.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	43	300	300	160	300	11
2	30	100	20	300	287	1
3	56	18	192	300	106	4
4	110	12	300	300	300	10
5	136	69	300	300	300	10
6	30	80	271	231	300	3
7	20	153	300	108	300	4
8	6	2	17	177	9	8
9	5	5	23	67	212	3
10	6	12	6	2	6	8
11	15	12	164	300	300	48
12	4	66	59	40	278	6
13	2	155	30	194	39	7
14	6	3	300	108	72	10
<b>Média</b>	<b>33,50</b>	<b>70,50</b>	<b>163,00</b>	<b>184,79</b>	<b>200,64</b>	<b>9,50</b>
<b>EPM</b>	<b>10,34</b>	<b>21,18</b>	<b>32,43</b>	<b>26,66</b>	<b>30,79</b>	<b>2,87</b>

## APÊNDICE G

Tabela 7: Valores das latências (s) dos animais submetidos à ablação cerebelar e tratamento pós-treino com salina (Grupo A-SL) no Experimento II.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	147	257	87	300	300	260
2	77	84	205	17	104	300
3	2	2	300	300	300	280
4	137	300	300	5	300	300
5	89	120	30	50	300	220
6	253	300	300	300	300	300
7	13	108	59	300	22	246
8	1	300	300	300	300	300
9	193	18	180	300	300	300
10	24	171	156	91	300	218
11	22	177	133	300	300	220
12	70	300	202	55	300	250
13	251	300	300	300	300	270
14	123	12	21	65	205	213
15	143	300	288	300	300	279
16	29	54	300	209	300	147
<b>MÉDIA</b>	<b>98,38</b>	<b>175,19</b>	<b>197,56</b>	<b>199,50</b>	<b>264,44</b>	<b>256,44</b>
<b>EPM</b>	<b>21,04</b>	<b>29,73</b>	<b>26,46</b>	<b>31,31</b>	<b>20,87</b>	<b>10,97</b>

## APÊNDICE H

Tabela 8: Valores das latências (s) dos animais submetidos à ablação cerebelar e tratamento farmacológico pós-treino com Pirilamina (Grupo A-PI) no Experimento II.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	24	300	300	300	300	102
2	16	38	148	45	125	300
3	153	57	154	233	300	214
4	148	188	300	300	300	300
5	35	12	12	151	250	168
6	65	300	300	253	300	255
7	6	28	17	19	111	158
8	108	21	138	300	150	110
9	21	300	300	253	300	300
10	94	19	23	300	65	157
11	135	300	30	74	111	300
12	55	300	300	300	270	220
13	148	300	300	50	300	192
14	10	300	300	300	300	200
15	28	147	300	90	239	257
<b>MÉDIA</b>	<b>69,73</b>	<b>174,00</b>	<b>194,80</b>	<b>197,87</b>	<b>228,07</b>	<b>215,53</b>
<b>EPM</b>	<b>13,93</b>	<b>32,61</b>	<b>31,08</b>	<b>27,99</b>	<b>22,04</b>	<b>17,08</b>

## APÊNDICE I

Tabela 9: Valores das latências (s) dos animais submetidos à lesão fictícia e tratamento pós-treino com salina (Grupo S-SL) no Experimento III.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	60	136	300	245	155	133
2	35	104	179	300	136	21
3	226	172	300	300	300	4
4	90	217	5	20	220	158
5	36	88	300	300	300	10
6	50	7	11	300	300	9
7	20	8	10	62	130	7
8	199	300	300	300	300	229
9	63	31	300	187	300	73
10	21	300	300	300	300	1
11	2	2	2	20	180	21
12	95	14	300	277	300	94
13	6	6	261	22	258	5
14	10	10	178	105	165	6
15	10	20	100	222	250	55
<b>MÉDIA</b>	<b>61,53</b>	<b>94,33</b>	<b>189,73</b>	<b>197,33</b>	<b>239,60</b>	<b>55,07</b>
<b>EPM</b>	<b>15,93</b>	<b>25,22</b>	<b>30,43</b>	<b>27,98</b>	<b>19,17</b>	<b>16,35</b>

## APÊNDICE J

Tabela 10: Valores das latências (s) dos animais submetidos à lesão fictícia e tratamento farmacológico pós-treino com Zolantidina (Grupo S-ZO) no Experimento III.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	45	243	160	300	263	300
2	31	130	61	167	190	96
3	281	221	278	300	300	300
4	217	181	242	149	246	150
5	16	76	67	300	300	240
6	26	36	265	300	300	118
7	95	64	15	80	300	211
8	30	21	17	101	300	6
9	70	300	300	300	300	6
10	34	9	300	16	300	229
11	71	300	300	300	300	78
12	119	117	243	300	22	42
13	49	300	300	10	300	199
14	189	300	226	300	300	300
15	15	90	294	166	300	300
<b>MÉDIA</b>	<b>85,87</b>	<b>159,20</b>	<b>204,53</b>	<b>205,93</b>	<b>268,07</b>	<b>171,67</b>
<b>EPM</b>	<b>19,76</b>	<b>27,00</b>	<b>27,39</b>	<b>28,05</b>	<b>21,93</b>	<b>26,71</b>

## APÊNDICE K

Tabela 11: Valores das latências (s) dos animais submetidos à ablação cerebelar e tratamento pós-treino com salina (Grupo A-SL) no Experimento III.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	262	21	255	300	190	300
2	254	210	300	300	300	300
3	101	300	156	70	300	300
4	4	300	230	300	300	300
5	97	230	248	300	300	300
6	3	300	300	300	300	300
7	108	300	170	300	300	300
8	52	300	300	300	300	300
9	4	300	300	300	300	300
10	9	3	300	187	300	300
11	14	6	54	300	300	300
12	8	24	222	300	276	300
13	210	300	290	1	300	259
14	3	300	244	275	300	300
15	52	59	2	4	91	300
<b>MÉDIA</b>	<b>78,73</b>	<b>196,87</b>	<b>224,73</b>	<b>235,80</b>	<b>277,13</b>	<b>297,27</b>
<b>EPM</b>	<b>21,83</b>	<b>30,99</b>	<b>23,27</b>	<b>27,75</b>	<b>19,22</b>	<b>17,61</b>

## APÊNDICE L

Tabela 12: Valores das latências (s) dos animais submetidos à ablação cerebelar e tratamento farmacológico pós-treino com Zolantidina (Grupo A-ZO) no Experimento III.

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>TESTE</b>
1	272	158	42	181	241	108
2	21	300	300	270	300	300
3	135	106	300	300	300	300
4	17	300	112	219	68	300
5	99	237	300	300	290	229
6	60	196	300	217	163	60
7	131	94	300	300	300	210
8	74	300	300	102	300	300
9	85	124	54	142	300	128
10	21	300	36	300	300	119
11	18	300	300	300	300	27
12	54	33	300	230	300	3
13	32	30	300	300	300	50
14	5	12	273	10	71	4
15	204	229	300	300	236	37
<b>MÉDIA</b>	<b>81,87</b>	<b>181,27</b>	<b>234,47</b>	<b>231,40</b>	<b>251,27</b>	<b>145,00</b>
<b>EPM</b>	<b>17,94</b>	<b>25,94</b>	<b>26,80</b>	<b>22,59</b>	<b>22,02</b>	<b>27,46</b>

**ANEXO**

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propq@power.ufscar.br](mailto:propq@power.ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

---

**Parecer 057/2007**

Protocolo nº. 053/2007

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar, durante sua 16ª. Reunião, realizada no dia 18/12/2007, concluiu a apreciação ética do projeto de pesquisa “Papel do sistema histaminérgico nos processos de aprendizagem e memória em "Carassius auratus" após ablação cerebelar”, elaborado por Rosana Mattioli.

Conclusão: Projeto Aprovado

São Carlos, 19 de dezembro de 2007.

  
Prof.ª. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal