

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

“Efeitos da Clorfeniramina na aprendizagem,  
memória e ansiedade de teleósteos submetidos à  
ablação telencefálica”

Flávia Roberta Faganello Navega

SÃO CARLOS  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**“Efeitos da Clorfeniramina na aprendizagem, memória e  
ansiedade de teleósteos submetidos à ablação  
telencefálica”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisioterapia.

**Flávia Roberta Faganello Navega**  
**Orientadora: Rosana Mattioli**

**SÃO CARLOS  
2006**

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

N323ec

Navega, Flávia Roberta Faganello.

Efeitos da clorfeniramina na aprendizagem, memória e ansiedade de teleósteos submetidos à ablação telencefálica.

-- São Carlos : UFSCar, 2006.

94 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Medicina experimental. 2. Teleósteos. 3. Aprendizagem e memória. 4. Ansiedade. 5. Ablação telencefálica I. Título.

CDD: 619 (20<sup>a</sup>)

**FLÁVIA ROBERTA FAGANELLO NAVEGA**

**Estudo I**

Clorfeniramina facilita a esquiva inibitória em teleósteos submetidos à ablação telencefálica

**Estudo II**

Efeito ansiolítico da Clorfeniramina na esquiva inibitória em peixes dourados submetidos à ablação telencefálica

**Estudo III**

Papel da CPA na recuperação funcional de teleósteos submetidos à ablação telencefálica em novo modelo de condicionamento operante para peixes

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rosana Mattioli  
Apoio Financeiro: CAPES

São Carlos-SP  
2006

Ao Marcelo,  
companheiro em todas  
as horas

### **Agradecimento Especial**

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Mattioli, por ter possibilitado mais essa etapa de minha formação profissional e por tudo o que me ensinou durante esses anos.  
Te admiro por ser uma pessoa justa, e por ser uma ótima pesquisadora e orientadora.  
Muito obrigada por tudo.

## Agradecimentos

À Deus por tantas oportunidades.  
À todos os membros da minha banca, que aceitaram o convite para enriquecer esse trabalho.

Aos professores: Azair Liane M.C. Souza, Carla Christina Medalha, e João Eduardo de Araújo por todas as sugestões dadas em minha qualificação.  
Ao meu marido, Marcelo, por todo amor, por toda paciência e por ser tão amigo. Eu amo você.

Aos meus pais que sempre incentivaram meus estudos.  
Às minhas irmãs e ao meu irmão por serem tão amigos e tão importantes em minha vida.

À minha futura afilhada, Maria Eduarda, por já trazer tanta alegria para toda a família.

Às minhas queridas e velhas amigas Ana Cláudia e Cristiane, por tudo.

Aos meus colegas de laboratório, Luciana, Fernanda, Fabiana, Aline e Miagui, por tornarem esses anos tão felizes.  
À Luciana, Fernanda e Fabiana por serem amigas e por me ajudarem tanto na realização deste trabalho. Eu adoro vocês.

Ao Miagui, pela velha amizade, pelo empenho em solucionar problemas e por me ajudar com as ilustrações desse trabalho.

À Karina Gramani, por sua amizade tão especial. Você realmente é uma pessoa incrível.

À Andréa, “minha” aluna, por me agüentar e pela ajuda na realização desse trabalho.

Ao professor Nivaldo Parizotto por me introduzir na vida científica, e por ser uma pessoa maravilhosa.

À professora e amiga Vanessa Monteiro Pedro. Eu realmente te adoro.

À Tereza Fatori pela amizade e por toda ajuda na análise histológica.

À Paulinha por ser uma secretária eficiente e amiga  
À todo o pessoal dos laboratórios do Departamento de Fisioterapia, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

À professora Tânia Salvini por disponibilizar o criostato. E aos seus alunos, Sabrina e Tiago, por toda a ajuda e paciência.

À todos os meus professores do Programa de Pós-graduação, por terem me ensinado tanto.

À CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho não seria possível.



## Resumo

Os peixes teleósteos possuem o telencéfalo bem desenvolvido com áreas homólogas a estruturas límbicas de vertebrados superiores, como o hipocampo e a amígdala. Esses animais apresentam também uma única via do sistema histaminérgico ascendente ao telencéfalo que foi preservada durante a evolução. O sistema histaminérgico está relacionado à aprendizagem e memória, entretanto os resultados desses estudos não são conclusivos. Alguns autores sugerem que o efeito facilitador ou inibidor da histamina está relacionado à estrutura cerebral envolvida e à natureza da tarefa realizada. Desta forma a análise das conseqüências da ablação telencefálica em teleósteos pode contribuir para o entendimento da função da histamina na aprendizagem e memória. Para auxiliar esse entendimento foram realizados três estudos. O primeiro teve como objetivo verificar o papel da CPA (clorfeniramina), antagonista histaminérgico H<sub>1</sub>, na esquia inibitória em teleósteos submetidos à ablação telencefálica. O condicionamento de esquia foi realizado em cinco dias consecutivos (1 dia de adaptação, 3 dias de treino, compostos por 3 tentativas cada, e 1 dia de teste) e teve início 5 dias após a cirurgia de ablação telencefálica. Foram realizados 3 grupos experimentais (Sal, CPA 8 e CPA16). Todos os animais foram submetidos à ablação telencefálica e recebiam o tratamento farmacológico (salina, 8 ou 16 µg/g de CPA) imediatamente após a última tentativa dos três dias de treino. Os resultados mostraram que a CPA apresenta um efeito facilitatório na retenção da tarefa de esquia inibitória em teleósteos submetidos à ablação telencefálica provavelmente devido a um efeito ansiolítico que ocorre via mesencéfalo e/ou diencéfalo. O segundo estudo teve como objetivo verificar se há semelhança entre o efeito da CPA e uma droga benzodiazepínica (diazepam - DZP) no condicionamento de esquia inibitória. A esquia inibitória foi realizada em três dias (1 dia de adaptação e 2 dias de treino, compostos por 3 tentativas cada). Nos dois dias de treino os animais submetidos (A) ou não (S) à ablação telencefálica recebiam tratamento farmacológico (Salina, 16µg/g de CPA, propilenoglicol 40% (PPG) ou 1 µg/g de DZP) 20 antes do início do experimento. Foram realizados 8 grupos experimentais (grupos Sham: S-Sal, S-CPA, S-PPG, S-DZP e grupos ablação: A-Sal, A-CPA, A-PPG e A-DZP). Os resultados mostraram que a CPA causou efeitos similares ao DZP independentemente da ablação telencefálica sugerindo efeito ansiolítico da CPA. Para o terceiro estudo foi desenvolvido um modelo de condicionamento operante para analisar a recuperação funcional após ablação telencefálica em teleósteos e verificar o papel da CPA nessa função. O condicionamento operante foi realizado em 10 dias consecutivos e teve início 5 dias após a cirurgia de ablação. O animal deveria associar a retirada de uma divisória opaca com o fornecimento de alimento. Foram realizados 4 grupos experimentais (Sham, ablação, Ablação-Sal, Ablação-CPA). Os resultados mostraram que o modelo desenvolvido é adequado para o estudo da recuperação funcional e que a CPA, devido a um provável efeito ansiolítico, prejudicou o desempenho do animal. Dessa forma sugerimos que em teleósteos submetidos à ablação telencefálica a CPA parece desempenhar apenas um efeito ansiolítico mediado pelo diencéfalo e/ou telencéfalo e outras possíveis ações da CPA, nos processos de aprendizagem, memória e recuperação funcional parecem ser mediados pelo telencéfalo.

## Abstract

The teleost telencephalon provides a good opportunity for studying the function of the vertebrate limbic system because it is simple and present homologies to the limbic structure of higher vertebrates, with hippocampus and amygdala. These animals shows only one area of projection to the telencephalon (Ekström et al., 1995), which has been well preserved through evolution (Peitsaro et al., 2003).

## SUMÁRIO

<b>CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>2</b>
<hr/>	
<b>ESTUDO I</b>	<b>4</b>
<hr/>	
<b>RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>8</b>
ANIMAIS	8
ABLAÇÃO TELENCEFÁLICA	9
ANÁLISE HISTOLÓGICA	10
DROGAS E TRATAMENTO	11
AQUÁRIO EXPERIMENTAL	11
PROCEDIMENTOS	12
ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
<b>RESULTADOS</b>	<b>13</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>15</b>
<b>DESENVOLVIMENTO A PARTIR DO ESTUDO INICIAL</b>	<b>19</b>
<hr/>	
<b>ESTUDO II</b>	<b>21</b>
<hr/>	
<b>RESUMO</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>22</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
ANIMAIS	25
ABLAÇÃO TELENCEFÁLICA	25
ANÁLISE HISTOLÓGICA	26
DROGAS E TRATAMENTOS	26
AQUÁRIO EXPERIMENTAL	27
PROCEDIMENTOS	27
ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>DESENVOLVIMENTO A PARTIR DOS ESTUDOS ANTERIORES</b>	<b>37</b>
<hr/>	
<b>ESTUDO III</b>	<b>39</b>
<hr/>	
<b>RESUMO</b>	<b>39</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>40</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
ANIMAIS	41
ABLAÇÃO TELENCEFÁLICA E ANÁLISE HISTOLÓGICA	41
DROGAS E TRATAMENTOS	41

	1
AQUÁRIOS EXPERIMENTAIS	42
PROCEDIMENTOS	43
ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	46
<b><u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u></b>	<b>49</b>
<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b>51</b>
<b><u>ANEXOS – ESTUDO I</u></b>	<b>59</b>
<b><u>ANEXOS – ESTUDO II</u></b>	<b>71</b>
<b><u>ANEXOS - ESTUDO III</u></b>	<b>91</b>

## Contextualização

Peixes, répteis, aves e mamíferos fazem parte de uma mesma escala evolutiva e possuem um ancestral comum (NORTHCUTT, 1981; CARROL, 1988; BROGLIO, 2003). Sendo o peixe o mais antigo nesta escala evolutiva, o conhecimento de sua capacidade cognitiva e suas bases neurais pode contribuir para o entendimento da evolução cerebral e comportamental dos vertebrados, incluindo dos mamíferos.

Os teleósteos, classe de peixe com esqueleto ósseo, possuem o telencéfalo bem desenvolvido com áreas homólogas a áreas cerebrais de vertebrados superiores. A área dorso-lateral do telencéfalo é considerada homóloga ao hipocampo dos mamíferos (NIEUWENHUYIS e MEEK, 1990; BRAFORD, 1995; NORTHCUTT, 1995; VARGAS et al., 2000, RODRÍGUEZ et al., 2002) e a área dorso-medial, homóloga a amígdala (VARGAS et al., 2000; PORTAVELLA et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 2002).

Nas últimas décadas estudos farmacológicos têm sido realizados a fim de investigar a função de neurotransmissores sobre os processos de aprendizagem e memória. Dentre eles, agonistas e antagonistas histaminérgicos têm sido alvo de muita atenção, uma vez que o sistema histaminérgico está relacionado a uma série de funções no Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo aprendizagem e memória (HASS e PANULA, 2003)

A atuação da histamina no SNC se dá pela estimulação de receptores pós ( $H_1$  e  $H_2$ ) e pré-sinápticos ( $H_3$ ) (ARRANG et al., 1985). Outro tipo de receptor histaminérgico ( $H_4$ ) foi identificado, porém sua ação, até agora, é considerada restrita ao sistema imunológico (LIM et al., 2005).

Os resultados dos estudos relacionando o sistema histaminérgico aos processos de aprendizagem e memória não são conclusivos. Por exemplo, o bloqueio crônico da enzima sintetizadora da histamina (HA) induziu tanto a facilitação como a inibição da aquisição da esQUIVA ativa em ratos (CACABELOS e ALVAREZ, 1991; KAMEI et al., 1993).

Antagonistas e agonistas inversos do receptor  $H_3$  prejudicaram a aprendizagem de medo condicionado (PASSANI et al., 2001) e melhoraram o desempenho em tarefa de esQUIVA inibitória em ratos adultos (FOX et al., 2002, 2003). Em teleósteos a administração de clorfeniramina (CPA), um antagonista  $H_1$ , induziu a aprendizagem de preferência condicionada por lugar (MATTIOLI et al., 1996), e também facilitou a retenção da memória em um teste de esQUIVA inibitória (MEDALHA et al., 2000).

Segundo Blandina e colaboradores (2004) o efeito facilitador ou inibidor da histamina nos processos de aprendizagem e memória pode estar relacionado, dentre outros fatores, à estrutura cerebral envolvida e a natureza da tarefa realizada. Desta forma a análise das conseqüências da ablação telencefálica em teleósteos pode contribuir para entendimento das funções da histamina na aprendizagem e memória uma vez que, o sistema histaminérgico desses animais apresenta uma única via ascendente ao telencéfalo (EKSTRÖM et al., 1995).

Diante disso, realizamos três estudos. No primeiro, que teve como objetivo verificar o papel da CPA na esQUIVA inibitória em teleósteos submetidos à ablação telencefálica, sugerimos um provável efeito ansiolítico da CPA. No segundo buscamos esclarecer a hipótese levantada analisando a semelhança entre o efeito da CPA e uma droga benzodiazepínica na aprendizagem de esQUIVA inibitória. No terceiro estudo foi desenvolvido um modelo de condicionamento operante a fim de verificar a ação da CPA na recuperação funcional de teleósteos submetidos à ablação telencefálica, e conseqüentemente ajudar no esclarecimento do papel da CPA na aprendizagem e memória.

## Estudo I

### **“Clorfeniramina facilita a esquiva inibitória em teleósteos submetidos à ablação telencefálica”.**

#### **Resumo**

O objetivo desse estudo foi verificar o papel da CPA na esquiva inibitória em teleósteos submetidos à ablação telencefálica. Os peixes sofriam ablação telencefálica cinco dias antes de iniciado os procedimentos experimentais. Os procedimentos de esquiva inibitória foram realizados em um aquário retangular dividido em dois compartimentos (branco e preto) em 5 dias. Um dia para a adaptação (os peixes eram adaptados por 10 minutos), três dias para o treino composto por 3 tentativas cada (primeiro dia T1, T2 e T3; segundo dia 2T1, 2T2 e 2T3 e terceiro dia 3T, 3T2 e 3T3) e um dia para teste. Nos dias de treino, os peixes eram colocados em um compartimento branco e após 20 segundos a porta, que separava os dois compartimentos, era aberta. Quando o peixe passava para o compartimento preto, um peso de 45 gramas era solto. Esse procedimento era repetido por três vezes consecutivas. Imediatamente após a terceira tentativa, em cada dia de treino, o peixe recebia um dos tratamentos farmacológicos (salina, 8 ou 16  $\mu\text{g/g}$  de CPA). No dia do teste, o tempo de passagem para o compartimento preto era registrado. Os resultados sugerem que a CPA, principalmente na dose de 8  $\mu\text{g/g}$ , apresentou um efeito facilitatório na memória da tarefa de esquiva inibitória. Nós sugerimos que o peixe submetido à ablação telencefálica foi capaz de aprender a tarefa de esquiva inibitória devido a circuitos locais presentes no mesencéfalo que atua para a geração e elaboração de reações defensivas, e que a CPA, devido a seu efeito ansiolítico, interfere nesses circuitos mesencefálicos.

**Palavras chave:** Clorfeniramina, esquiva inibitória, ablação telencefálica, teleósteos

“Chlorpheniramine facilitates the inhibitory avoidance in teleosts submitted to telencephalic ablation”

### **Abstract**

The aim of this study was to verify the role of CPA in inhibitory avoidance in teleosts submitted to telencephalic ablation. The fish underwent telencephalic ablation five days prior to the experimental procedure. The inhibitory avoidance procedure was performed in a rectangular aquarium divided into two compartments (black and white), in 5 days. One day for adaptation (fish were adapted for 10 min.), three days for training composed of 3 trials each (first day T1, T2 and T3; second day 2T1, 2T2 and 2T3 and third day 3T1, 3T2 and 3T3), and one day for test. On training days, the fish were placed in a white compartment and after 20 seconds the door, that separated the compartments, was opened. When the fish crossed to a black compartment, a 45-gram weight was dropped. This procedure was performed three times in a row. Immediately after the third trial, on each day of training, the fish received one of the pharmacological treatments (saline, 8 or 16 µg/g of CPA). On test day, the time for crossing to the black compartment was recorded. The results suggest that CPA, mainly at a dosage of 8 µg/g, had a facilitating effect on memory of the inhibitory avoidance task. We suggest that the fish submitted to telencephalic ablation were able to learn the inhibitory avoidance task due to the local circuits of midbrain that act to generate and elaborate defense reactions, and that CPA, probably due to its anxiolytic-like effect, interferes in these midbrain circuits.

**Keywords:** Chlorpheniramine, inhibitory avoidance, telencephalic ablation, teleost



## Introdução

É bem conhecido que o sistema límbico está envolvido no medo-relacionado ao condicionamento clássico em mamíferos (KAPP et al., 1979; DAVIS, 2000; MEDINA et al., 2002). Por outro lado, a ablação do telencéfalo dos teleósteos, que é filogeneticamente relacionada ao sistema límbico de vertebrados superiores, não impediu o condicionamento autônomo clássico em um procedimento aversivo (OVERMIER e CURNOW, 1969; MEDINA et al., 2002), o que sugere que estruturas mesencefálicas podem ser capazes de promover aprendizagem de respostas emocionais condicionadas.

Teleósteos são apropriados para o estudo da histamina como neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) porque o sistema histaminérgico em peixes é mais restrito e possui somente uma área de projeção no telencéfalo (EKSTRÖN et al., 1995) que foi bem preservada durante a evolução (PEITSARO et al., 2003).

Vários estudos sugerem que a HA participa dos processos de aprendizagem e formação da memória (HASS e PANULA, 2003; CHOICH et al., 2004). Entretanto os resultados são frequentemente contraditórios, visto que efeitos facilitatório e inibitório já foram descritos (BLANDINA et al., 1996; PASSANI et al., 2001; CANGIOLI et al., 2002).

Estudos anteriores mostraram que a histamina apresenta um efeito inibitório em diferentes tarefas de esquiva inibitória. Eidi e colaboradores (2003) sugeriram que a administração pós-treino de histamina atenuou a retenção da memória e potencializou o prejuízo na memória induzido pela escopolamina, em ratos. Em um estudo realizado por Rubio e colaboradores (2001) o aumento nos níveis de histamina cerebral em ratos prejudicou a aquisição da resposta de esquiva, ao passo que níveis reduzidos facilitaram essa aquisição. Em teleósteos, a clorfeniramina (CPA), um antagonista histaminérgico H<sub>1</sub>, melhorou a aprendizagem de esquiva inibitória (MEDALHA et al., 2000).

Uma vez que, em alguns estudos, a histamina apresentou um efeito inibitório em tarefas de aprendizagem e a ablação telencefálica em teleósteos não interrompeu o condicionamento autonômico clássico usando um procedimento aversivo, o objetivo desse estudo foi verificar o papel da CPA na esquia inibitória em teleósteos submetidos à ablação telencefálica.

## Materiais e métodos

### Animais

Foram utilizados quarenta e seis peixes dourados (*Carassius auratus*) (figura 1) de sexo indeterminado pesando de 4 a 8g. Os animais eram mantidos em aquários de 30 litros (15 peixes por aquário) com filtro e oxigenação constante, a uma temperatura de 20-22° com ciclo natural de luz.

Os peixes eram alimentados cinco vezes por semana com ração flutuante (Wardly Corporation, New Jersey, U.S.A.). Um intervalo de duas semanas de aclimação foi dado entre a compra do peixe e os procedimentos cirúrgicos. Os animais eram individualmente identificados por suas características físicas, como cor e tipo de cauda.



Fig 1: foto do peixe *Carassius auratus*.

## Ablação Telencefálica

Os peixes foram anestesiados por imersão em uma solução de 0,8 g/l de tricaína metassulfonada (TMS)-(3-aminobenzoic acid ethyl ester methasulfonate, Sigma Chemical Co.) até a atividade motora espontânea e os movimentos branquiais cessarem. Os peixes eram retirados da solução anestésica, envolvidos em gaze úmida e posicionados adequadamente em um aparato (figura 2) para a realização dos procedimentos cirúrgicos. Uma solução anestésica de 0,3 g/l de TMS foi perfundida continuamente pela boca, durante todo o procedimento cirúrgico, por perfusão pela boca.

A parte dorsal do crânio era removida para a exposição dos lobos telencefálicos. Os lobos telencefálicos eram então retirados por aspiração através de uma pipeta conectada a um sistema de vácuo. Após a ablação do telencéfalo o crânio era fechado com acrílico dental de secagem rápida (Dental Vipi Ltda, Pirassununga, São Paulo – Brazil). A solução anestésica era então substituída por água até reiniciarem os movimentos branquiais, e os peixes eram recolocados nos aquários de manutenção por um período de recuperação de 5 dias antes do início dos procedimentos experimentais.



Fig 2: Foto do procedimento cirúrgico.

## Análise Histológica

Após a conclusão dos procedimentos experimentais os animais eram novamente anestesiados, em seguida decapitados, os cérebros foram removidos dos crânios e inspecionados para uma avaliação preliminar da ablação (figura 3). Os cérebros eram então fixados em formalina 10% por pelo menos quatro dias. Depois disso, eram seccionados a uma espessura de 50  $\mu$ m usando um criostato. Por meio da análise histológica verificamos que os cérebros submetidos à ablação exibiram completa remoção do tecido telencefálico ao passo que as áreas pré-ópticas e tratos ópticos não foram lesados (figura 4).

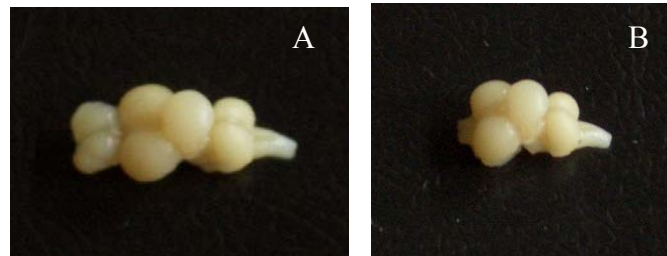


Fig 3: A: foto de um cérebro íntegro de teleosteo. B: foto de um cérebro de teleosteo após ablação telencefálica.

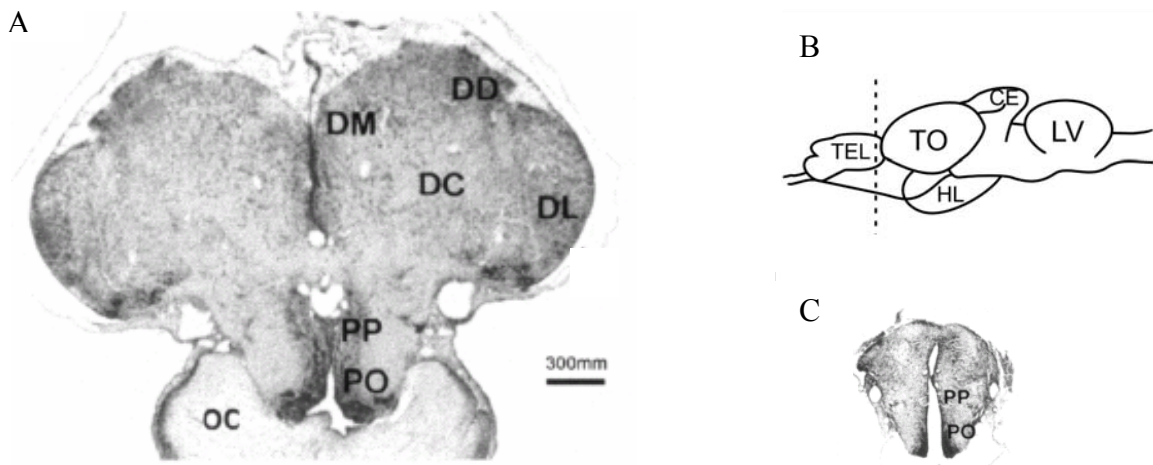


Fig 4: Corte transverso do cérebro de teleosteos. A: cérebro normal. C: cérebro após ablação telencefálica. B: Esquema do cérebro mostrando o local de secção. Abreviaturas: TEL: telencefalo; TO: trato óptico; CE: cerebelo; LV: lobo vagal; HL: hipotálamo lateral, DC: região dorso-central do telencefalo, DD: região dorso-dorsal; DM: região dorso-medial; DL: região dorsolateral; PP: núcleo pré-óptico periventricular; PO: núcleo pré-óptico. Adaptado de Portavela et al.,2003.

## Drogas e tratamento

Clorfeniramina (CPA) sal de maleato (Sigma, MO, USA) foi dissolvida em salina (0.9%) nas concentrações de 8 e 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . CPA 8 e 16  $\mu\text{g}/\text{g}$  ou salina (SAL) foram administrado intraperitonealmente no volume de 1  $\mu\text{l}/\text{g}$ . As substâncias foram codificadas e os códigos não eram conhecidos pelo experimentador.

Os peixes foram divididos em três grupos. Grupo SAL (n=20) composto por animais tratados com salina, grupo CPA8 (n=12) e grupo CPA16 (n=13) compostos, respectivamente, por animais que receberam tratamento de CPA nas doses de 8 e 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## Aquário experimental

Foi utilizado um aquário, de vidro, retangular dividido em dois compartimentos sendo um branco e o outro preto, delimitados por uma porta do tipo guilhotina. Cada compartimento possuía dimensões de 15 centímetros de altura, 10 centímetros de largura e 22,5 centímetros de comprimento (figura 5).

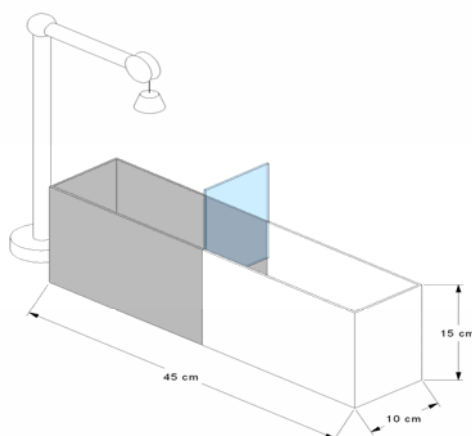


Fig 5: Esquema do aquário experimental

## **Procedimentos**

O experimento foi realizado em 5 dias consecutivos. Um dia de adaptação, três dias de treino (compostos por 3 tentativas cada: primeiro treino T1, T2 e T3, segundo treino 2T1, 2T2 e 2T3 e terceiro treino 3T1, 3T2 e 3T3) e um dia de teste.

No dia de adaptação os animais eram colocados individualmente no aquário por 10 minutos. Nos dias de treino os animais eram colocados individualmente no compartimento branco do aquário e após 20 segundos a porta era retirada. Quando o peixe atravessava a linha divisória entre os compartimentos um peso de 45 gramas era solto a sua frente. O peixe voltava ou era imediatamente recolocado no compartimento inicial, o procedimento era repetido por mais 2 vezes. A passagem para o compartimento preto foi definida como o momento em que a nadadeira dorsal do animal entrava no compartimento preto. Imediatamente após a terceira tentativa, nos três dias de treino os animais recebiam o tratamento farmacológico (SAL, CPA8 ou CPA16). Vinte e quatro horas após, os animais eram testados e o tempo de entrada no compartimento preto era registrado novamente.

A determinação de colocar o animal inicialmente no compartimento branco se deve a sua preferência natural pelo ambiente escuro (SANTANGELO e MATTIOLI, 1999). Todo procedimento experimental foi gravado em vídeo-tape.

## **Análise estatística**

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste Levene para verificar a homogeneidade dos dados. Quando apropriado, os dados foram transformados em  $\log_{10}$  e então analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

O valor de  $p < 0,05$  foi estabelecido como nível de significância.

## Resultados

A figura 6-A mostra as médias e erro padrão das médias (+EPM) das latências dos dias de treino e teste do grupo SAL. A latência foi significativamente maior somente na terceira tentativa do segundo dia de treino (ANOVA: d.f.=9, F=2.19, p=0.0249 e Dunn p<0.05). Sugerindo que os animais tratados com salina foram capazes de aprender a tarefa, mas não conseguiram reter a informação aprendida.

Os animais tratados com CPA8 mostraram um aumento nas latências, tentativa após tentativa, no segundo dia de treino e permaneceu alta nas três tentativas do terceiro dia de treino e no dia do teste (ANOVA: d.f.=9, F=3.15, p= 0.0022 e Dunn p<0.05) (Figura 6-B). O grupo CPA16 apresentou maiores latências no segundo e terceiro dia de treino (ANOVA d.f.=9, F=3.67, p=0.0005 e Dunn p<0.05) (figura 6-C). Esses resultados sugerem que a CPA, principalmente na dose de 8 µg/g, apresentou um efeito facilitador na memória.



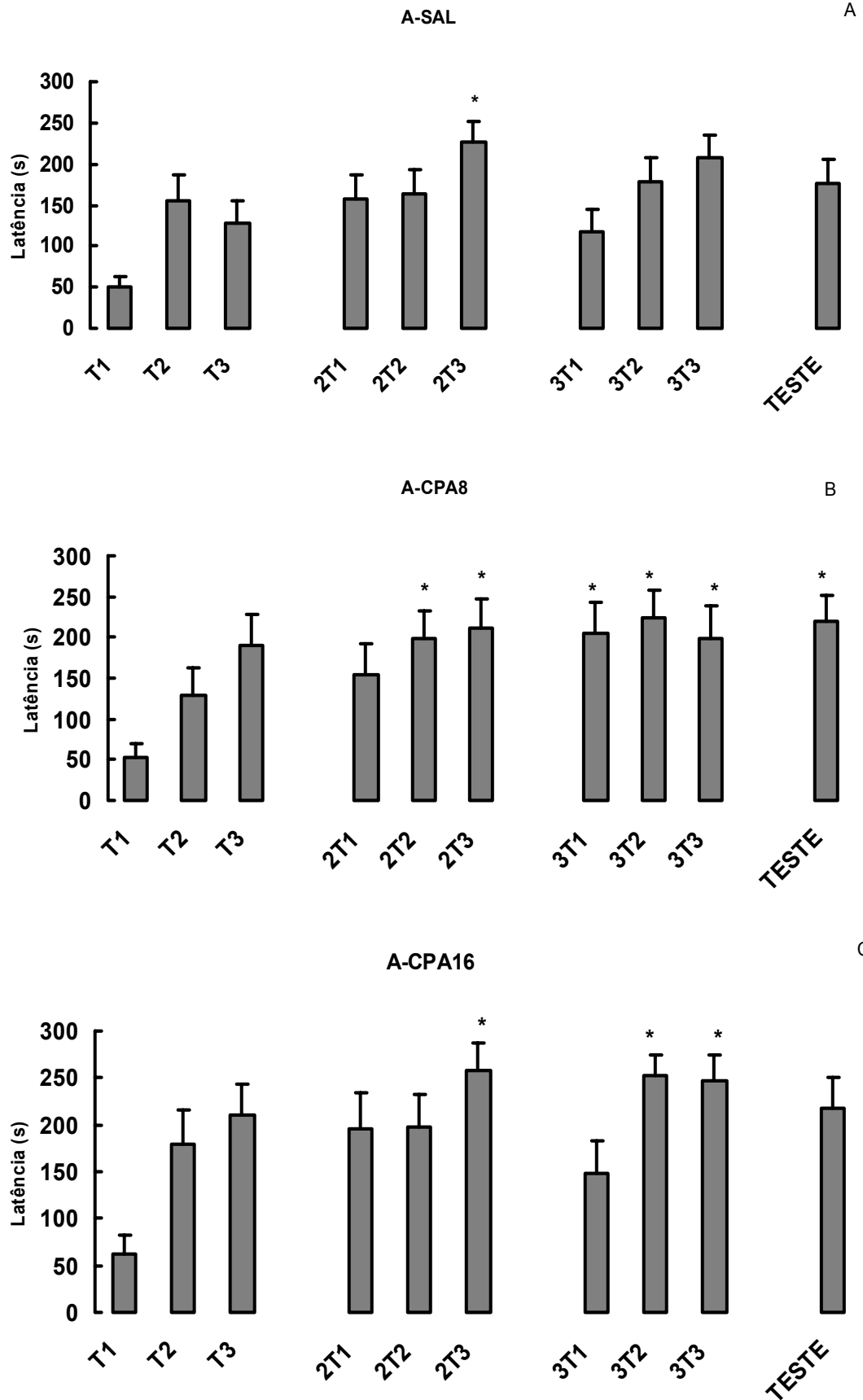


Fig 6: A-médias e erro padrão das médias (+EPM) das latências nos dias de treino e teste do grupo SAL: ANOVA:  $p=0.0249$  e Dunn  $p<0.05$ , \* diferente de T1. B: médias e erro padrão das médias (+EPM) das latências nos dias de treino e teste do grupo CPA8: ANOVA:  $p=0.0022$  e Dunn  $p<0.05$ , \* diferente de T1. C: médias e erro padrão das médias (+EPM) das latências nos dias de treino e teste do grupo CPA16: ANOVA:  $p=0.0005$  e Dunn SNK  $p<0.05$ , \*diferente de T1

## Discussão

Os resultados desse estudo sugerem que a CPA melhora a retenção da tarefa de esquiva inibitória em peixes submetidos à ablação telencefálica. Resultados similares foram encontrados por Medalha e colaboradores (2000) em um estudo realizado em peixes dourado intactos no mesmo modelo experimental. Em seu estudo o grupo tratado com CPA na dose de 8 µg/g apresentou um aumento significativo na latência para deixar o compartimento de saída. Assim, nós sugerimos que a ação da CPA no condicionamento de esquiva inibitória ocorre via estruturas mesencefálicas e/ou diencefálicas.

Fanselow (1981) e Blanchard e colaboradores (1989) propuseram que padrões de comportamento defensivos são organizados em uma série hierárquica de repostas. Alguns estudos sugerem que a estimulação de estruturas do teto do mesencéfalo produz alerta, “freezing” e reações de fuga. Sugerem também que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal e do colículo inferior induz efeito aversivo, reforça a reposta de fuga operante e também permite aprendizagem de repostas emocionais condicionadas (JENCK et al., 1983, 1995; BRANDÃO et al., 1997).

O teto do mesencéfalo apresenta circuitos locais para a geração e elaboração de reações defensivas, entretanto estruturas cerebrais superiores são necessárias para conseguir o controle de comportamentos mais complexos relacionados ao medo. Por exemplo, a conexão do colículo inferior com a amígdala atua como um importante filtro para as informações sensoriais de natureza aversiva (MAISONNETTE et al., 1996). Sabendo-se que a esquiva é um tipo de comportamento defensivo (MISSLIN, 2003), nós podemos sugerir que os peixes submetidos à ablação telencefálica são capazes de aprender a tarefa de esquiva inibitória devido aos circuitos locais do mesencéfalo, e que a CPA facilita a retenção da experiência aversiva, por pelo menos vinte e quatro horas, provavelmente por meio desses circuitos.

Outros estudos sugerem também uma ação do sistema histaminérgico no diencéfalo, principalmente em tarefas que envolvam componentes emocionais como aversão, estresse e medo. Ito e colaboradores (1999) submeteram ratos a uma situação de estresse agudo, em que os animais eram mantidos imóveis em uma gaiola apertada por uma hora. A análise histoquímica mostrou um aumento nos níveis de histamina no diencéfalo.

Ferretti e colaboradores (1998) relataram que o estresse induz a liberação de histamina no hipotálamo. Da mesma forma, no estudo de Tasaka e colaboradores (1985) após a administração de histamina intraventricular, maior radioatividade foi determinada no hipotálamo. Neste estudo a histamina causou uma inibição dose-dependente na resposta de esquiva em ratos, e os autores sugeriram que esse efeito inibitório está preferencialmente ligado ao receptor H1.

Regiões do teto do mesencéfalo contêm substratos para o comportamento defensivo, aversão e medo (BRANDÃO et al., 2003). Existem boas evidências que a aprendizagem de esquiva é baseada na aquisição de um estado “antecipatório” de medo em peixes dourados (OVERMIER e CURNOW, 1969; GALONN, 1972; PORTAVELLA et al., 2003). De acordo com Brandão e colaboradores (2003) os processos preparatórios para a orientação do perigo, medo e esquiva são ligados a ansiedade. Assim, o efeito da CPA na memória encontrado em nosso estudo pode ser também devido a um efeito ansiolítico da CPA mediado pelo diencéfalo e/ou teto do mesencéfalo.

O envolvimento do sistema histaminérgico no estado de ansiedade de animais já foi sugerido por alguns autores. Malberg-Aiello e colaboradores (2002) mostraram que substâncias capazes de aumentar a transmissão histaminérgica reduziram o tempo de permanência no compartimento claro em camundongos, indicando um provável efeito ansiogênico. Em um estudo fisiológico foi relatado que a destruição da sub-região E2 rostroventral do núcleo tuberomamilar em ratos, que é o local de origem do sistema histaminérgico, induziu um efeito ansiolítico em um teste de labirinto elevado e esse efeito

parece estar relacionado à diminuição da atividade histaminérgica causado pela lesão (FRISH et al., 1998). Em um estudo realizado por Medalha et al. (2003) em peixes dourados, o grupo tratado com CPA apresentou valores mais baixos no nível de um metabólito da serotonina (5-HIAA- ácido 5-hidroxihindileacético) no diencéfalo quando comparado ao grupo tratado com salina, sugerindo que a CPA pode apresentar um efeito ansiolítico uma vez que a serotonina está envolvida nos processos de ansiedade (GRAEFF, 2002).

Uma hipótese adicional pode ser a participação do sistema colinérgico. Estudos clínicos (BEATTY e BUTTERS, 1986; EAGGER et al., 1991; JONES et al., 1992) e experimentais (DUNNETT et al., 1985) têm mostrado que o sistema colinérgico desempenha um importante papel na aprendizagem, memória e atenção, e outros estudos sugerem que o sistema histaminérgico influencia a aprendizagem e memória por modulação da liberação da acetilcolina (PASSANI et al., 2000; BACCIOTTINI et al., 2001). Em um trabalho realizado por Eidi et al. (2003) a melhora na memória induzida pela acetilcolina ou nicotina pode ser prejudicada pela histamina. Em uma análise bioquímica, Miyazaki et al. (1995) sugeriram que a histidina (precursora da histamina) diminuiu os níveis de acetilcolina no córtex cerebral, no diencéfalo e mesencéfalo de ratos.

Uma vez que células colinérgicas foram descritas no teto do mesencéfalo de teleósteos (GONZALEZ et al., 2002) e que o sistema histaminérgico tem origem no diencéfalo (EKSTRÖN et al., 1995), e regiões do mesencéfalo apresentam altos níveis de histamina em peixes (e em mamíferos) (ALMEIDA e BEAVEN, 1981), o efeito facilitatório da CPA em nosso estudo também pode ser devido a uma relação entre os sistemas histaminérgico e colinérgico no mesencéfalo e em estruturas diencefálicas. Entretanto estudos adicionais, sobre a relação da histamina/acetilcolina na aprendizagem de esQUIVA inibitória, devem ser realizados.

Em conclusão, podemos concluir que os peixes submetidos à ablação telencefálica são capazes de aprender a tarefa de esQUIVA inibitória provavelmente devido a circuitos locais no

mesencéfalo que atuam para a geração e elaboração de reações defensivas, e que a CPA interfere nesses circuitos, provavelmente por um efeito ansiolítico.

## **Desenvolvimento a partir do estudo inicial**

No primeiro estudo verificamos que os animais com ablação telencefálica foram capazes de aprender o condicionamento de esquiva inibitória, apesar do telencéfalo ser considerado homólogo a estruturas límbicas do cérebro de vertebrados superiores. Esse fato, provavelmente se deu devido à capacidade de estruturas mesencefálicas gerarem reações comportamentais que são primordiais para a sobrevivência da espécie, denominadas reações defensivas.

As reações defensivas ocorrem frente à situações de perigo, e desencadeiam respostas incondicionadas de medo geradas no teto mesencefálico (BRANDÃO et al., 2003). Segundo Misslin (2003) respostas de esquiva fazem parte do repertório de comportamentos defensivos dos animais assim como fuga, luta, imobilidade, agressão e ajustes fisiológicos em geral. Essas reações apresentam íntima relação com a ansiedade e estresse (RAU et al., 2005).

Fortes experiências emocionais podem prejudicar tarefas previamente adquiridas, por isso drogas ansiolíticas, quando administradas após o treino de tarefas com fortes componentes emocionais, podem auxiliar na retenção da tarefa (DIAMOND et al, 2004). O que reforça a hipótese de efeito ansiolítico da CPA levantada em nosso primeiro estudo, uma vez que os animais tratados com essa droga apresentaram melhor desempenho na tarefa proposta.

Entretanto, Izquierdo e colaboradores (1990) sugerem que algumas tarefas precisam de certo grau de estresse e ansiedade para serem aprendidas, como é o caso da esquiva inibitória. Em um estudo realizado por de Souza-Silva e colaboradores (1993) o tratamento prévio com diazepam prejudicou a retenção da tarefa de esquiva inibitória em ratos. Resultados semelhantes foram encontrados por Izquierdo et al. (1990) onde a administração

pré-treino de clonazepam e diazepam, que são drogas ansiolíticas, apresentaram um efeito prejudicial na aquisição do condicionamento de esquiva inibitória em ratos.

Vários estudos já relacionaram o sistema histaminérgico com a ansiedade, e apontam principalmente para uma relação diretamente proporcional, ou seja, que maiores concentrações de histamina seriam responsáveis por maiores índices de ansiedade (OISHI et al., 1992; FRISH et al., 1998; MALBERG-AIELLO et al., 2002; BONGERS et al., 2003).

Com base nas informações apresentadas verificamos que drogas ansiolíticas podem apresentar resultados opostos no condicionamento de esquiva inibitória, dependendo do momento de sua administração. Quando administradas antes do treino apresentam um efeito inibitório, e quando administradas após o treino podem causar um efeito facilitatório. Diante do exposto, decidimos realizar um segundo estudo a fim de verificar se há semelhança entre o efeito do antagonista histaminérgico H1 (CPA) e uma droga benzodiazepínica (Diazepam), sugerindo afeito ansiolítico da CPA.

## Estudo II

### “Efeito ansiolítico da Clorfeniramina na esQUIVA inibitória em peixes dourados submetidos à ablação telencefálica”

#### Resumo

O objetivo desse estudo foi verificar as conseqüências da ablação telencefálica na aprendizagem de esQUIVA inibitória em peixes dourados e verificar se há semelhança entre o efeito do antagonista histaminérgico H1 (CPA) e uma droga benzodiazepínica (Diazepam). Os animais eram submetidos á ablação telencefálica ou a lesão fictícia cinco dias antes dos procedimentos experimentais. O procedimento de esQUIVA inibitória foi realizado em três dias usando um aquário retangular dividido em dois compartimentos (preto e branco) com uma porta central. No primeiro dia os animais eram adaptados por 10 minutos. No segundo e terceiro dias, eles eram injetados com salina (SAL), 16µg/g de Clorfeniramina (CPA), propilenoglicol 40% (PPG) ou µg/g de diazepam (DZP) vinte minutos antes do treino. Então os animais eram colocados no compartimento branco, a porta central era aberta e o tempo para atravessar a linha entre os compartimentos era registrado. Após o peixe passar a linha entre os compartimentos um peso de 45 gramas era solto. Esse procedimento era repetido por três vezes consecutivas. Os grupos submetidos ou não à ablação telencefálica e tratados com salina apresentaram uma diferença entre as sessões de treino; entretanto, os grupos tratados com CPA, PPG ou DZP não apresentaram nenhuma diferença entre eles. Esses resultados sugerem que o tratamento com CPA, PPG ou DZP prejudicou a aquisição do condicionamento de esQUIVA inibitória nos animais independente da ablação telencefálica. Em conclusão, a ablação telencefálica não retira a capacidade do animal aprender a tarefa de esQUIVA inibitória, e baseado no fato de que a CPA mostrou efeitos similares ao DZP, nos animais submetidos ou não à ablação telencefálica, nós sugerimos que a CPA apresenta um efeito ansiolítico, mediado pelo diencéfalo e/ou mesencéfalo em peixes dourados.

**Palavras chave:** ansiedade, clorfeniramina, diazepam, peixes dourados, esQUIVA inibitória, telencéfalo



**“Anxiolytic-like effect of Chlorpheniramine in Inhibitory Avoidance in  
goldfish submitted to Telencephalic Ablation”**

**Abstract**

The aim of the present study was to verify the consequences of telencephalic ablation on the learning of inhibitory avoidance goldfish and verify the similarity between CPA and benzodiazepnic drug (Diazepam). The animals were submitted to telencephalic ablation or sham operations five days prior to the experimental procedure. The inhibitory avoidance procedure was performed in 3 days using a rectangular aquarium divided into two compartments (black and white) with a central door. On the first day, the animals were adapted for 10 min. On the second and third days, they were injected with Saline (SAL), 16µg/g Chlorpheniramine (CPA), 40% Propylene glycol (PPG) or 1µg/g Diazepam (DZP) twenty min. before training. Then the animals were placed in the white compartment, the central door was opened and the time spent for crossing between compartments was recorded. After the fish crossed the line between the compartments a 45-g weight was dropped. This procedure was performed three times in a row. The groups submitted or not to telencephalic ablation and treated with SAL presented a difference between training sessions; however, the groups treated with CPA, PPG or DZP did not show any differences between them. These results suggest that the treatment with CPA, PPG or DZP impaired the acquisition of inhibitory avoidance conditioning in animals regardless of telencephalic ablation. In conclusion, telencephalic ablation does not disrupt the animals' capacity to learn the inhibitory avoidance task, and based on the fact that CPA showed similar effects to those of DZP on the animals submitted or not to telencephalic ablation, we suggest that the CPA presents an anxiolytic-like effect mediated by the diencephalons and/or mesencephalon in goldfish.

**Key words:** anxiety, chlorpheniramine, diazepam, Goldfish, inhibitory avoidance, telencephalon

## Introdução

O telencéfalo dos teleosteos fornece uma boa oportunidade para o estudo da função do sistema límbico dos vertebrados porque ele é simples e homólogo a estruturas límbicas de vertebrados superiores (DROOGLEEVER-FOUTUYN, 1961; NORTH CUTT e BRADFORD, 1980; LOPEZ et al., 2000).

Portavella e colaboradores (2004) estudaram a resposta de esquiva após lesão de áreas telencefálicas e sugeriram a presença de dois diferentes sistemas de memória em peixes dourados. Um sistema de memória emocional relacionado à região medial do telencéfalo, e um sistema de memória espacial e temporal relacionado à região lateral do telencéfalo. Além disso, os efeitos diferenciais causados pelas lesões telencefálicas são similares àqueles produzidos por lesão amígdalar e hipocampal em mamíferos.

Teleosteos são apropriados para o estudo da Histamina como neurotransmissor no Sistema Nervoso Central (SNC), uma vez que o sistema histaminérgico em peixes apresenta somente uma área de projeção para o telencéfalo (EKSTRÖN et al., 1995) que foi bem preservada durante a evolução (PEITSARO et al., 2003).

Desde a descoberta que antihistamínicos clássicos apresentavam uma ação sedativa, tornou-se claro que a histamina desempenha importante ação no SNC (HASS e PANULA, 2003). Vários estudos sugerem que a histamina está envolvida em muitas funções neurológicas, como o controle do despertar, atenção, processos sensoriais e formação da memória (CHOICH et al., 2004).

Os dados disponíveis sobre os efeitos da histamina central no comportamento animal, especialmente na aprendizagem e memória, ainda são contraditórios. Alguns estudos descrevem um efeito inibitório da histamina (BEARDSLEY, 1992; SANNERUD et al., 1995; SUZUKI et al., 1995). Entretanto, outra linha de evidência aponta para um efeito facilitatório

da histamina na aprendizagem e memória (De ALMEIDA e IZQUIERDO, 1986; KAMEI e TASAKA, 1993; MEGURO et al., 1995; MIYAZAQUI et al., 1995; COELHO et al., 2001).

Vários estudos também revelaram um papel da histamina no medo e na ansiedade (OISHI et al., 1986; IMAIZUMI e ONODERA, 1993; FRISCH et al., 1998).

Considerando que o telencéfalo dos teleósteos é homólogo a estruturas límbicas de vertebrados superiores, que o sistema histaminérgico central está envolvido na aprendizagem, memória e ansiedade (De ALMEIDA e IZQUIERDO, 1986, MATTIOLI et al., 1998) e sua maior área de projeção está localizada no telencéfalo, o objetivo deste estudo foi verificar a relação do sistema histaminérgico na aprendizagem de esquiva inibitória em peixes submetidos á ablação telencefálica e investigar se há semelhança entre o efeito do antagonista histaminérgico H1 (CPA) e uma droga benzodiazepínica.

## **Materiais e métodos**

### **Animais**

Cento e cinquenta e seis peixes dourados (*Carassius auratus*) (figura 1) de sexo indeterminado e pesando de 4 a 8 g foram usados. Os animais eram mantidos em um aquário de 30 litros (15 peixes por aquário) com filtro e oxigenação constante a uma temperatura de 20-22° com ciclo natural de luz.

Eles foram alimentados cinco vezes por semana com ração flutuante (Wardly Corporation, New Jersey, U.S.A.). Um intervalo de duas semanas de aclimação foi admitido entre a compra do peixe e os procedimentos cirúrgicos. Os animais eram individualmente identificados por suas características físicas, como cor e tipo de cauda.

### **Ablação Telencefálica**

Os peixes foram anestesiados por imersão em uma solução de 0,8 g/l de tricaína metassulfonada (TMS)-(3-aminobenzoic acid ethyl ester methasulfonate, Sigma Chemical Co.) até a atividade motora espontânea e os movimentos branquiais cessarem. Os peixes eram envolvidos em gaze e colocados em um aparato com suportes laterais que estabilizavam o corpo do animal para a realização dos procedimentos cirúrgicos. Anestesia foi mantida continuamente, durante todo o procedimento cirúrgico, por perfusão de uma solução 0,3 g/l de TMS pela boca (figura 2).

A parte dorsal do crânio era removida para a exposição dos lobos telencefálicos. Os lobos telencefálicos eram então retirados por aspiração através de uma pipeta conectada a um sistema de vácuo. Após a ablação do telencéfalo o crânio foi fechado com acrílico dental de secagem rápida (Dental Vipi Ltda, Pirassununga, São Paulo – Brazil). Os grupos com lesão

fictícia (Sham) eram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos exceto pela aspiração dos lobos telencefálicos. Depois de o crânio ser fechado a solução anestésica era substituída por água até reiniciarem os movimentos branquiais. Os peixes eram então recolocados nos aquários de manutenção para um período de recuperação de cinco dias antes do início dos procedimentos experimentais.

### **Análise Histológica**

Após a conclusão dos experimentos os animais eram decapitados, os cérebros eram removidos e inspecionados para uma avaliação preliminar da ablação (figura 3). Os cérebros eram então fixados em formalina 10% por pelo menos quatro dias. Depois disso, eram seccionados a uma espessura de 50  $\mu\text{m}$  em um criostato. A análise mostrou que os cérebros submetidos à ablação exibiram completa remoção do tecido telencefálico ao passo que as áreas pré-ópticas e tratos ópticos não foram lesados (figura 4).

### **Drogas e tratamentos**

Diazepam (DZP) (Roche S/A, São Paulo, Brasil) foi diluído em propilenoglicol 40% (PPG) na concentração de 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Clorfeniramina (CPA) sal de maleato (Sigma, MO, USA) foi dissolvida em salina (0.9%) até a concentração de 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . DZP, PPG, CPA ou salina (SAL) foram administrados intraperitonealmente no volume de 1  $\mu\text{l}/\text{g}$ . As substâncias foram codificadas e os códigos não eram conhecidos pelo experimentador, que não sabia que substâncias eram injetadas em cada animal.

Os peixes foram divididos em oito grupos levando em consideração o procedimento cirúrgico, submetido à ablação telencefálica (A) ou não (S), e o tratamento farmacológico (tabela 1).

Tabela 1: grupos experimentais

<b>Grupo</b>		<b>N</b>	<b>Tratamento</b>
S-Sal	Sham	26	Salina
S-PPG	Sham	20	Propilenoglicol (40%)
S-DZP	Sham	20	Diazepam 1µg/g
S-CPA16	Sham	13	CPA 16 µg/g
A-Sal	Ablação	20	Salina
A-PPG	Ablação	20	Propilenoglicol (40%)
A-DZP	Ablação	20	Diazepam 1µg/g
A-CPA16	Ablação	17	CPA 16 µg/g

### **Aquário Experimental**

Foi utilizado um aquário de vidro retangular dividido em dois compartimentos sendo um branco e o outro preto, delimitados por uma porta do tipo guilhotina (figura 5). Cada compartimento possuía dimensões de 15 centímetros de altura, 10 centímetros de largura e 22,5 centímetros de comprimento.

### **Procedimentos**

O experimento foi realizado em três dias consecutivos, sendo um dia de adaptação e dois dias de treino. No dia de adaptação os animais eram colocados individualmente no aquário por 10 minutos.

Os dias de treino eram compostos por três tentativas cada sendo primeiro dia de treino: T1, T2 e T3 e segundo dia de treino: 2T1, 2T2 e 2T3. Nos dois dias de treino, vinte minutos antes de iniciado os procedimentos experimentais os animais eram injetados com SAL, CPA, DZP ou PPG. Então, os animais eram colocados individualmente no compartimento branco do aquário e após 20 segundos a porta era retirada. Quando o peixe atravessava a linha divisória entre os compartimentos um peso de 45 gramas era solto a sua frente. O peixe voltava para o compartimento branco ou era imediatamente recolocado e o procedimento era

repetido por mais 2 vezes. A passagem para o compartimento preto foi definida como o momento em que a nadadeira dorsal do animal passava a linha divisória entre os compartimentos. Todo procedimento experimental era gravado em vídeo - tape.

A determinação de colocar o animal inicialmente no compartimento branco se deve a sua preferência natural pelo ambiente escuro (SANTANGELO e MATTIOLI, 1999).

A atividade locomotora do animal na primeira tentativa do primeiro dia de treino (T1) foi registrada para verificar se as drogas interferiam na locomoção dos animais. Para isso, o compartimento branco do aquário foi dividido em três partes iguais, e o número de cruzamentos entre as partes foi contado. O número de cruzamentos dividido pela latência foi calculado para todos os grupos e utilizado como indicador da atividade locomotora.

## **Análise estatística**

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste Levene para verificar a homogeneidade dos dados. Quando apropriado, os dados foram transformados em  $\log_{10}$  e então analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK).

O valor de  $p < 0,05$  foi estabelecido como nível de significância.

## Resultados

A figura 7 mostra as médias e erro-padrão das médias (+SEM) das latências dos dias de treino dos grupos Sham. O grupo S-SAL apresentou um aumento significativo nos valores de latências entre cada tentativa nos dois dias de treino (ANOVA d.f.=5;  $p=0,001$  e SNK  $p<0,05$ ). Os grupos S-CPA, S-PPG e S-DZP não apresentaram diferença significativa nos valores de latência em nenhum dia de treino (ANOVA d.f.=5:  $p=0,23$ ,  $p=0,73$  e  $p=0,12$  respectivamente).

A figura 8 mostra as médias e erro-padrão das médias (+SEM) das latências dos dias de treino dos grupos com ablação telencefálica. O grupo A-SAL apresentou um aumento significativo nos valores de latências entre cada tentativa nos dias de treino (ANOVA d.f.=5;  $p=0,0018$  e SNK  $p<0,05$ ). Os grupos A-CPA, A-PPG e A-DZP não mostraram diferença significativa nos valores de latência em nenhum dia de treino (ANOVA d.f.=5:  $p=0,29$ ,  $p=0,09$  e  $p=0,28$  respectivamente).

Esses resultados sugerem que o tratamento com CPA, PPG ou DZP prejudicou a aquisição do condicionamento de esQUIVA inibitória nos animais submetidos ou não a ablação telencefálica, já que tanto os animais dos grupos Sham como dos grupos submetidos à ablação telencefálica apresentaram prejuízos semelhantes após tratamento com essas drogas.

A figura 9 mostra as médias e erro-padrão das médias (+SEM) da atividade locomotora dos grupos Sham (ANOVA: d.f.=3,  $p=0,29$ ) e a figura 10 mostra as médias e erro-padrão das médias (+SEM) da atividade locomotora dos grupos submetidos à ablação telencefálica (ANOVA: d.f.=3,  $p=0,99$ ). Com base nesses dados sugerimos que os diferentes tratamentos farmacológicos não interferiram na locomoção dos animais. Entretanto, quando realizada uma comparação da atividade locomotora dos animais dos grupos sham e ablação, verificamos que a retirada do telencéfalo causa uma diminuição na locomoção dos animais (two-way ANOVA d.f.=1,  $F=32,34$ ,  $p<0,0001$ ).



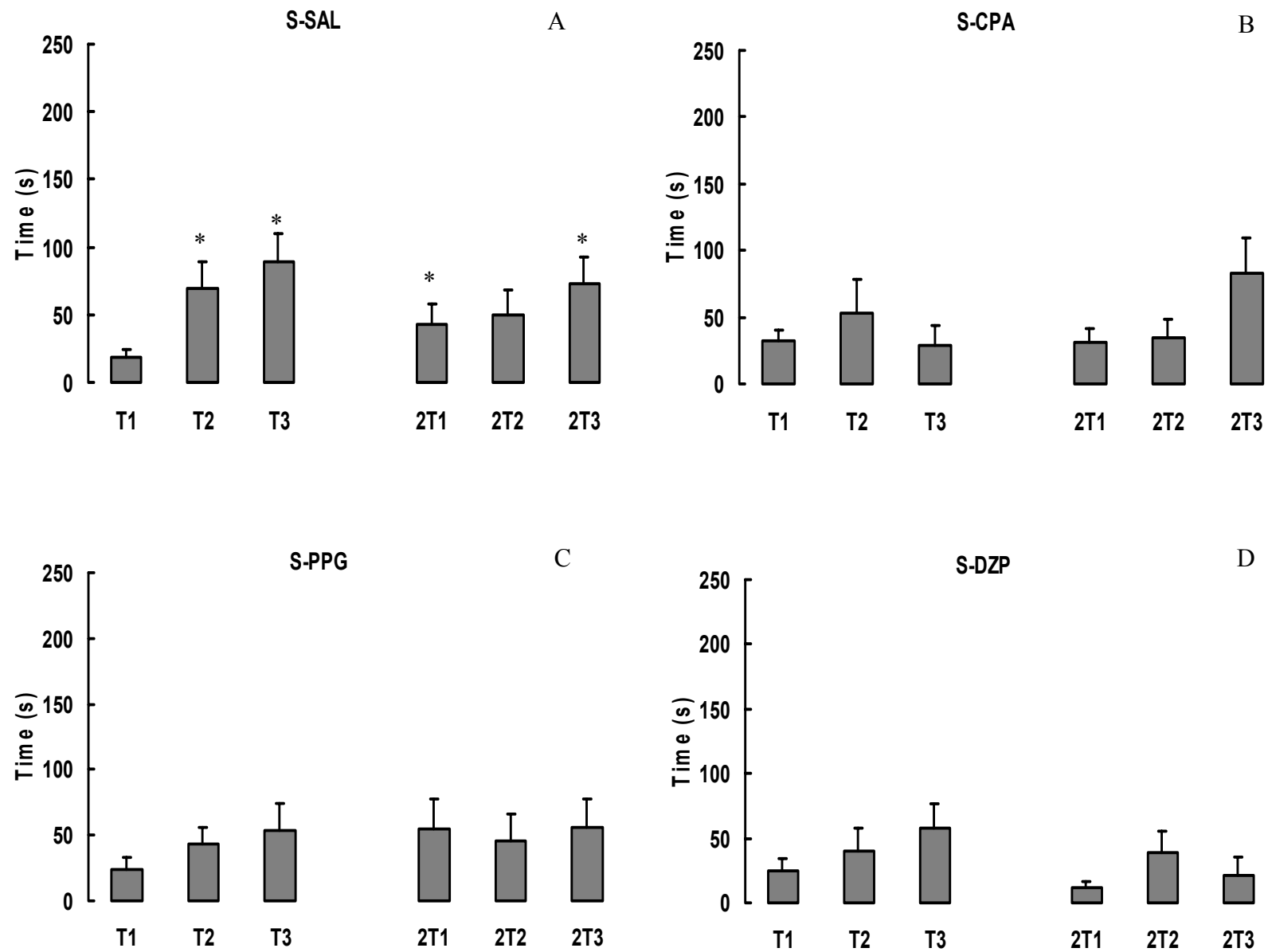


Fig 7: Médias e erro padrão das medias (+EPM) das latências dos treinos dos grupos Sham. (A) grupo S-SAL: ANOVA  $p=0.001$  e SNK  $p<0.05$ , \* diferente de T1. (B) grupo S-CPA: ANOVA  $p=0.23$ . (C) grupo S-PPG: ANOVA  $p=0.73$ . (D) grupo S-DZP: ANOVA  $p=0.12$ .

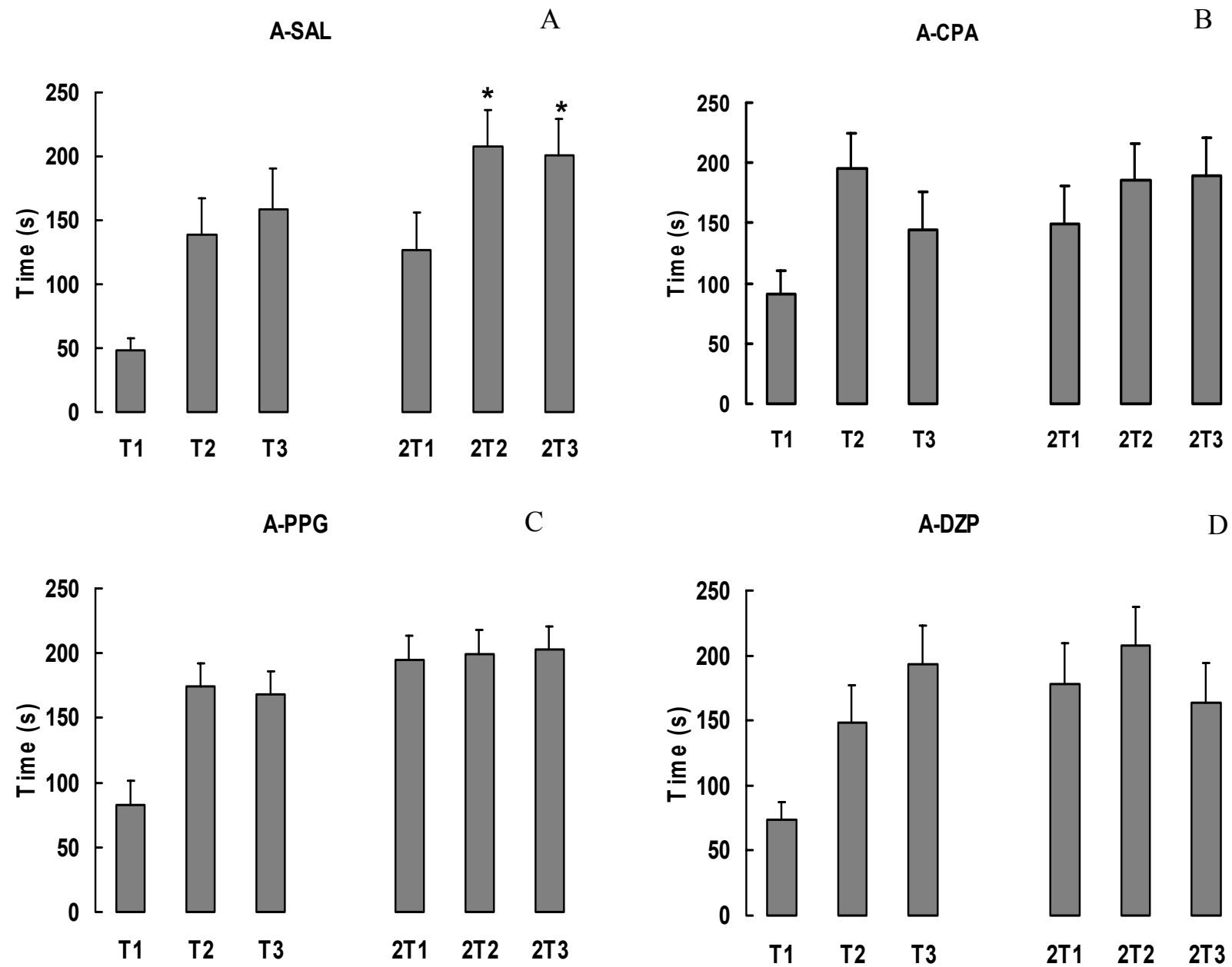


Fig 8: Médias e erro padrão das médias (+EPM) das latências dos treinos dos grupos submetidos à ablação telencefálica. (A) grupo A-SAL: ANOVA  $p=0,0018$  e SNK  $p<0,05$ , \* diferente de T1. (B) grupo A-CPA: ANOVA  $p=0,29$ . (C) grupo A-PPG: ANOVA  $p=0,09$ . (D) grupo A-DZP: ANOVA  $p=0,28$ .

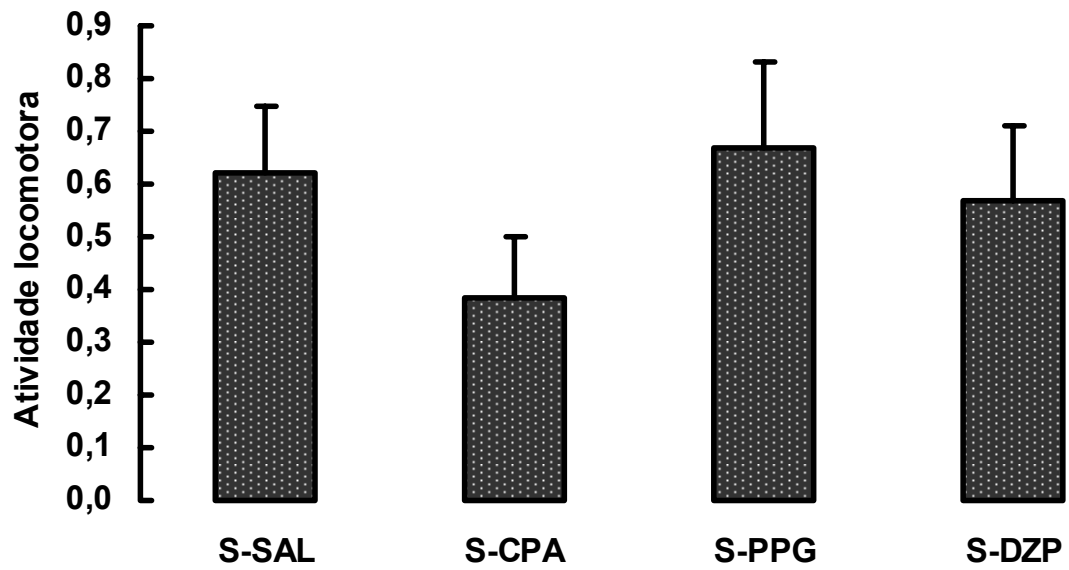


Fig 9: Média e erro padrão da média (+EPM) da atividade locomotora dos animais dos grupos Sham (ANOVA:  $p=0,29$ ).

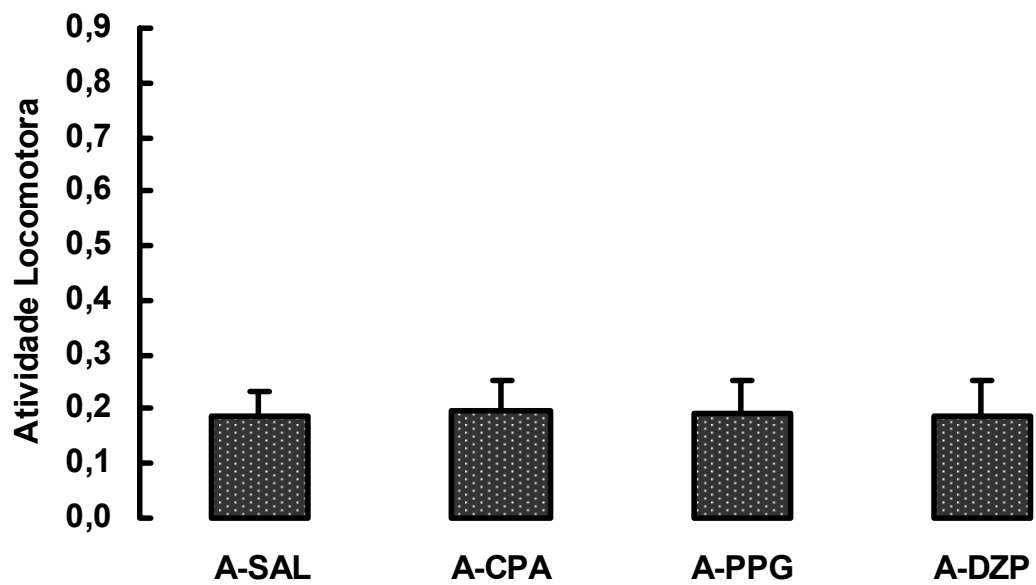


Fig 10: Média e erro padrão da média (+EPM) da atividade locomotora dos animais dos grupos Ablação (ANOVA:  $p=0,99$ ).

## Discussão

Tanto os animais submetidos à ablação telencefálica como os animais submetidos à lesão fictícia (grupos SHAM) foram capazes de aprender a tarefa de esquiva inibitória quando tratados com salina, sugerindo que a ablação telencefálica não impede o animal aprender essa tarefa.

Em um estudo realizado por Werka e Zielinski (1998) ratos submetidos à lesão na amígdala (que corresponde à parte dorso-medial do telencéfalo de teleósteo) foram capazes de aprender a resposta de esquiva, com leve atraso. Da mesma forma, lesão hipocampal (que corresponde à parte dorso-lateral do telencéfalo de teleósteo) em ratos não afetou significativamente a aquisição e retenção da esquiva inibitória (GIONET et al., 1991). Por outro lado, a completa ablação do telencéfalo prejudicou a aprendizagem de esquiva em peixes dourados em outros estudos (OVERMIER e STARKMAN, 1974; FLOOD et al., 1976; FLOOD e OVERMIER, 1981; OVERMIER e HOLLIS, 1990).

Segundo Brandão e colaboradores (2003) estruturas mesencefálicas apresentam circuitos locais que são capazes de gerar comportamentos defensivos, como no caso a resposta de esquiva. Sendo assim, provavelmente, graças à esses circuitos locais no mesencéfalo, os peixes submetidos ablação telencefálica foram capazes de aprender a tarefa proposta em nosso estudo.

Foi verificado, neste estudo, que a ablação telencefálica causou uma diminuição na atividade locomotora dos animais. Resultados semelhantes já foram citados por outros autores, que sugeriram uma diminuição da atividade espontânea após ablação telencefálica em peixes (JANZEN, 1933; HALE, 1956). A aquisição da tarefa, dos grupos sham e ablação, foram analisadas separadamente para evitar uma possível interpretação equivocada dos dados, uma vez que em nosso estudo a aprendizagem é inferida pelo aumento da latência. Entretanto,

como nenhuma diferença na atividade locomotora foi encontrada entre os tratamentos farmacológicos, tantos nos animais submetidos à ablação telencefálica ou à lesão fictícia, a aprendizagem de esquiva inibitória não foi devido a uma mudança na atividade locomotora, mas realmente à aquisição da tarefa.

O comportamento dos animais tratados com PPG e CPA foi similar aos animais tratados com DZP, uma droga ansiolítica clássica, sugerindo um provável efeito ansiolítico do PPG e da CPA. Em nosso estudo, DZP bem como o PPG e a CPA prejudicaram a aquisição da esquiva inibitória nos animais submetidos ou não a ablação telencefálica.

Estudos anteriores sugeriram um efeito-ansiolítico do PPG. Em 1998, Lin e colaboradores reportaram que o PPG reduziu a ansiedade em um teste de labirinto elevado em ratos. Lourenço da Silva e Elisabetsky (2001) também demonstraram uma interferência ansiolítica do PPG, na concentração de 30%, em um teste “hole board” em ratos. Sendo assim, uma vez que os animais tratados com PPG apresentaram comportamento semelhante aos animais que receberam DZP, e que outros autores já verificaram efeitos ansiolíticos do PPG, principalmente quando administrado em altas concentrações, como em nosso estudo, podemos sugerir que o prejuízo na aquisição do condicionamento de esquiva inibitória foi causado pela redução da ansiedade nos animais também pela administração prévia do PPG.

O envolvimento do sistema histaminérgico no estado de ansiedade do animal não está ainda bem esclarecido. Oishi e colaboradores (1986) reportaram que o DZP diminui a taxa de renovação da histamina em ratos, sugerindo uma participação do sistema histaminérgico cerebral na ansiedade. Malberg-Aiello e colaboradores (2002) mostraram que substâncias capazes de aumentar a transmissão da histamina reduzem o tempo de permanência no compartimento claro, indicando um provável efeito ansiogênico.

Resultados de um estudo fisiológico mostraram que a destruição da subregião E-2 na parte ventral do núcleo tuberomamilar, que é considerado o local de origem dos neurônios

histaminérgicos, causou efeito ansiolítico em um teste de labirinto elevado, esse efeito foi provavelmente devido à redução da atividade histaminérgica induzida pela lesão (FRISH et al., 1998). Em uma situação de estresse agudo, foi verificado um aumento no nível de histamina no hipotálamo (MAZURKIEWICZ-KWILECK e TAU, 1978) bem como no diencéfalo, núcleo acumbente e estriado de rato (ITO et al., 1999, 2000). Ito e colaboradores (1999) sugeriram que o aumento no nível de histamina no diencéfalo após estresse agudo pode representar um aumento na síntese de histamina, uma vez que o diencéfalo é o principal local de síntese desse neurotransmissor. Depois de sintetizada a histamina é transportada por axônios até o núcleo acumbente e estriado onde é metabolizada.

Em peixes, a relação entre o sistema histaminérgico e a ansiedade já foi sugerida em estudos comportamentais (MATTIOLI et al., 1998; MEDALHA et al., 2000, COELHO et al., 2001, PEITSARO et al., 2003). Recentemente, Medalha e colaboradores (2003), em um estudo realizado em peixes dourados usando o método de cromatografia líquida (HPLC), sugeriram um efeito ansiolítico da CPA. Nesse estudo a CPA não alterou os níveis de monoaminas e seus metabólicos no telencéfalo, mas os resultados referentes ao diencéfalo indicaram que o grupo tratado com CPA apresentou baixos níveis de 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindoleacético) comparados ao grupo tratado com salina, sugerindo que a CPA pode ter um efeito ansiolítico uma vez que a serotonina está envolvida nos processo de ansiedade (GRAEFF, 2002). É importante salientar que esses dados neuroquímicos foram encontrados nas áreas diencefálicas, que de acordo com Ekström et al. (1995), é a origem do sistema histaminérgico em peixes.

Em conclusão, a ablação telencefálica não interrompeu a capacidade do animal em aprender a tarefa de esquiiva inibitória, e, baseado no fato da CPA ter mostrado efeitos similares dos animais tratados com DZP, submetidos ou não a ablação telencefálica, nós

sugerimos que a CPA apresenta um efeito ansiolítico mediado pelo diencéfalo e/ou mesencéfalo em peixes dourados.

## **Desenvolvimento a partir dos estudos anteriores**

Nos dois estudos anteriores foi verificado que os animais submetidos à ablação telencefálica são capazes de aprender o condicionamento de esquiva inibitória proposto devido ao fato de estruturas cerebrais primitivas serem capazes de gerar reações defensivas. E a CPA parece atuar através dessas estruturas causando um efeito ansiolítico. Entretanto, estruturas cerebrais superiores são necessárias para o controle de comportamentos mais complexos, como por exemplo para o controle de diferentes formas de aprendizagem e memória.

Dessa maneira é de grande importância a realização de estudos que verifiquem as funções do telencéfalo de teleósteos, uma vez que essa estrutura contém processos anatômicos que são considerados precursores do sistema límbico de vertebrados superiores (Droogleever Fortuyn, 1961).

O telencéfalo dos teleósteos desempenha um importante papel em diferentes tipos de aprendizagem. López e colaboradores (2000) relacionaram o telencéfalo com a capacidade de memória espacial em teleósteos. Ohnishi (1989) sugeriu que o telencéfalo é fundamental na integração de eventos neurais que ocorrem em estruturas extratelencefálicas para a aprendizagem instrumental e Portavella e colaboradores (2002) mostraram a relação do telencéfalo à aprendizagem emocional e temporal.

Sabendo-se que os processos neurais que ocorrem durante a aprendizagem e formação da memória, denominados de plasticidade neural, são semelhantes em aspectos neuroquímicos e morfológicos aos que ocorrem durante a recuperação funcional após lesão do SNC (COTMAN et al., 1981; COTMAN e LYNCH, 1989), o terceiro estudo teve como objetivo, primeiramente, desenvolver um modelo experimental de condicionamento operante



a fim de observar a aprendizagem após ablação telencefálica em *Carassius auratus* e, posteriormente, analisar o papel da CPA na aprendizagem e memória.

## Estudo III

### “Papel da CPA na aprendizagem de teleósteos submetidos à ablação telencefálica em novo modelo de condicionamento operante para peixes”

#### Resumo

O objetivo desse estudo foi desenvolver um modelo de condicionamento operante para estudar a aprendizagem após ablação telencefálica em peixes dourados e verificar o papel da CPA nessa função. Os animais eram submetidos à ablação telencefálica ou a lesão fictícia cinco dias antes do início dos procedimentos experimentais. Seis aquários retangulares, com uma barreira opaca delimitando a área de alimentação, foram usados. O condicionamento operante foi realizado em dez dias consecutivos. A barreira opaca era retirada e, após 30 segundos, o alimento era oferecido por um tubo de acrílico colocado dentro da área de alimentação. O tempo que o animal levava para entrar na área de alimentação era registrado. Foram realizados quatro grupos experimentais sendo, grupo Ablação (n=14): animais submetidos à ablação telencefálica, grupo Sham (n=10): animais submetidos à lesão fictícia, grupos Abl-Sal (n=12): animais submetidos à ablação telencefálica e tratados com salina e grupo Abl-CPA (n=11): animais submetidos à ablação telencefálica e tratados com 16 µg/g de CPA. O tratamento farmacológico era administrado em dias alternados, dez minutos após o término dos procedimentos experimentais. Foi observada uma diminuição nos valores de latência no grupo Sham a partir do segundo dia até o final do experimento (ANOVA  $p < 0,001$ , Student Newman Keuls  $P < 0,01$ ). O grupo ablação apresentou uma leve diminuição nas latências, mas nenhuma diferença significativa foi observada (ANOVA  $p = 0,237$ ), indicando um prejuízo após ablação telencefálica. O grupo Abl-sal mostrou diminuição nas latências a partir do sexto dia até o final (ANOVA  $p < 0,001$ , Student Newman Keuls  $P < 0,01$ ). O grupo A-CPA não apresentou diminuição nos valores de latência (ANOVA  $p = 0,607$ ). Os resultados sugerem que esse modelo é adequado para a aprendizagem após ablação telencefálica em teleósteos, e a CPA apresenta um provável efeito ansiolítico que prejudicou o desempenho do animal.

**Palavras-Chaves:** condicionamento operante, ablação telencefálica, aprendizagem, clorfeniramina, peixes

## **“The Role of CPA in the learning of teleosts submitted to telencephalic ablation in a new model of fish operant conditioning”**

### **Abstract**

The aim of the present study was to develop an instrumental conditioning model to study the learning after telencephalic ablation in goldfish, and also verify the role of CPA in this function. The animals were submitted to telencephalic ablation or sham surgery five days prior to the beginning of the experimental procedure. Six rectangular aquariums with an opaque barrier delimitating the feeding area, were employed. The operant conditioning was realized during 10 consecutive days. The conditioning was consisted of the retreating of the opaque barrier followed by the food offering (30 seconds after) through an acrylic tube inserted at the feeding area. The time spent by the animal to enter at the feeding area was recorded. Four experimental groups were carried out. Ablation group (n=14): the animals were submitted to the telencephalic ablation; Sham group (n=10): the animals were submitted to the sham operation. Abl-Sal (n=12): animals submitted to the telencephalic ablation and treated whit saline and Abl-CPA (n=11) group: animals submitted to the telencephalic ablation and received 16 µg/g of CPA. The treatment was administered in alternate days, ten minutes after the end of the experimental procedure. A decrease in latencies for the sham animals was observed from the second day until the end of experiment (ANOVA  $p < 0,001$ , Student Newman Keuls  $P < 0,01$ ). The ablation group presented a slight decrease in latencies, but not statistically significant differences were observed (ANOVA  $p = 0,237$ ), indicating an impairment after telencephalic ablation. The Abl-Sal group showed a statistically significant decrease in latencies from sixth day until the end (ANOVA  $p < 0,001$ , Student Newman Keuls  $P < 0,01$ ). The Abl-CPA group did not present any decrease in latency values (ANOVA  $p = 0,607$ ). Results suggest that this model is suitable for the study of learning recovery after telencephalic ablation in teleost and that CPA presents an anxiolytic-like effect that impaired animal performance.

**Key words:** operant conditioning, telencephalic ablation, learning, chlorpheniramine, fish.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Foram utilizados 47 peixes da espécie *Carassius auratus* de sexo indeterminado e peso entre 4 e 10 gramas, provenientes do comércio local. Foram mantidos em aquários de 30 litros (15 peixes por aquário) com filtro e oxigenação constante até o dia da cirurgia de ablação telencefálica. Nesses aquários eram alimentados cinco vezes por semana com ração flutuante (Wardly Corporation, New Jersey, U.S.A.) entre 8 e 9 horas da manhã.

Após a ablação telencefálica os peixes eram colocados individualmente nos aquários experimentais, onde eram alimentados, com clara de ovo cozida, até um dia antes do início do experimento.

### **Ablação Telencefálica e Análise histológica**

Todos os procedimentos cirúrgicos, bem como a análise histológica, foram semelhantes aos realizados nos estudos anteriores.

### **Drogas e tratamentos**

Clorfeniramina (CPA) sal de maleato (Sigma, MO, USA) foi dissolvida em salina (0.9%) até a concentração de 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . CPA ou salina (SAL) foram administrado intraperitonealmente no volume de 1  $\mu\text{l}/\text{g}$ . As substâncias foram codificadas e os códigos não eram conhecidos pelo experimentador.

Os peixes foram divididos em 4 grupos: considerando o procedimento cirúrgico, Sham ou ablação e o tratamento farmacológico (Tabela 2).

Tabela 2: grupos experimentais

<b>Grupo</b>	<b>Cirurgia</b>	<b>N</b>	<b>Tratamento</b>
Sham	Sham	10	-
Ablação	Ablação	14	-
Abla-Sal	Ablação	12	Salina
Abla-CPA	Ablação	11	CPA 16 $\mu\text{g/g}$

### Aquários Experimentais

Foram utilizados 6 aquários de vidro transparente de formato retangular, (16cm de largura, 35cm de comprimento e 20cm de altura) que possuíam em uma das arestas um tubo de acrílico transparente de 16 cm de comprimento que direcionava a queda do alimento (clara de ovo) até o fundo do aquário. A 8 cm da parede lateral, que continha o tubo de fornecimento de alimento, foi colocada uma divisória de plástico rígido e opaco com 24 cm de altura, e 15 cm de comprimento para delimitar a área de alimentação (Figura 11).



Fig 11: Aquário Experimental

## **Procedimentos**

O condicionamento operante foi realizado em 10 dias consecutivos e teve início 5 dias após a cirurgia de ablação telencefálica.

A divisória, que delimita a área de alimentação, era retirada e após 30 segundos o alimento era oferecido pelo tubo. A partir do momento da retirada da divisória o tempo de entrada na área de alimentação era cronometrado. Ao entrar na área de alimentação o animal podia se alimentar por 2 minutos, ao final desse período a divisória era recolocada e o excedente de alimento retirado. Caso o animal não entrasse na área de alimentação em 10 minutos a divisória era recolocada e o alimento retirado. Para os animais dos grupos tratados, 10 minutos após a colocação da divisória os animais recebiam SAL ou CPA no primeiro, terceiro, quinto, sétimo e nono dias de experimento.

Uma câmera de vídeo (JVC VHS Super Digital Signal Processing) era colocada em um tripé a uma distância de 83 cm da parede frontal dos aquários que foram mantidos na mesma posição durante todos os dias do experimento.

## **Análise estatística**

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste Levene para verificar a homogeneidade dos dados. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK).

O valor de  $p < 0,05$  foi estabelecido como nível de significância.

## Resultados

A figura 12 apresenta as médias (+ EPM) das latências de entrada na área de alimentação dos animais dos grupos Ablação e Sham

No grupo Sham foi verificada uma diminuição da latência dia a dia de treino, sendo significativa a partir do segundo dia (ANOVA  $p < 0,001$ , Student Newman Keuls  $p < 0,01$ ). Já os animais do grupo Ablação não apresentaram queda nos valores de latência nos dias de treino (ANOVA  $p = 0,237$ ).

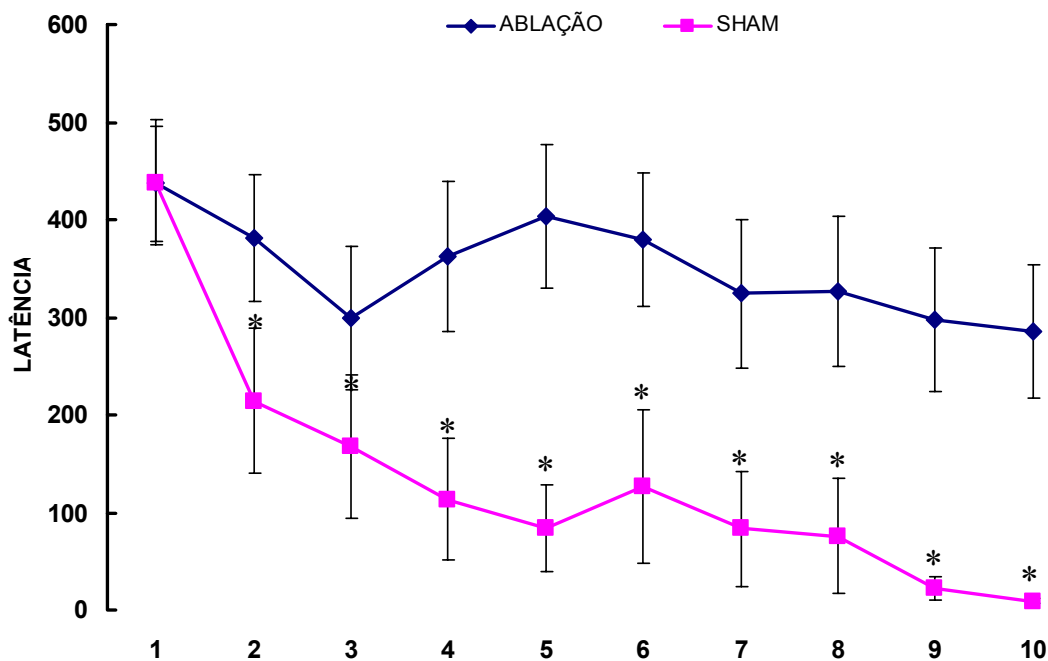


Fig 12: Média (+ EPM) do tempo (s) de entrada na área de alimentação dos animais dos grupos Sham (n=10) ANOVA  $p < 0,001$  e Student Newman Keuls  $p < 0,05$  e ABLA (n=14) ANOVA  $p = 0,237$ . \* diferente do dia 1.

A figura 13 apresenta as médias (+ EPM) das latências de entrada na área de alimentação dos animais dos grupos Abl-Sal e Abl-CPA.

Os animais do grupo Abl-Sal apresentaram uma diminuição na latência significativa (ANOVA  $p < 0,001$ , Student Newman Keuls  $P < 0,01$ ) a partir do sexto dia de treino. No do grupo Abl-CPA não houve diminuição nos valores de latência (ANOVA  $p = 0,607$ ).

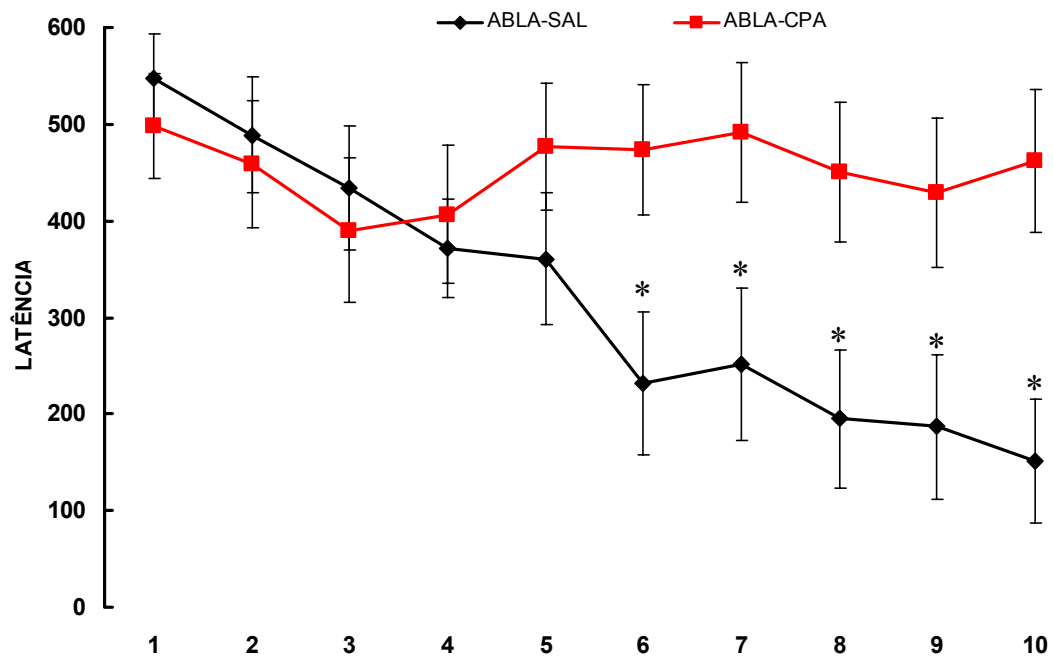


Fig 13: Média (+EPM) do tempo de entrada na área de alimentação dos animais dos grupos Abla-SAL (n=12) (ANOVA  $p < 0,001$  e Student Newman Keuls  $P < 0,01$ ) e Abla-CPA (n=11) (ANOVA  $p = 0,607$ ). \* diferente do dia 1



## Discussão

Os animais do grupo Sham apresentaram uma diminuição nos valores de latência significativa a partir do segundo dia de treino, mostrando que foram capazes de associar a retirada da divisória com o fornecimento do alimento. Já os animais do grupo Ablação mostraram uma leve queda nos valores de latência durante os dias de treino, porém esta queda não foi significativa, sugerindo que a ablação telencefálica acarretou prejuízo na aprendizagem do condicionamento operante proposto.

Vários estudos demonstraram prejuízos causados pela ablação telencefálica em teleósteos em diferentes tipos de aprendizagem. No estudo realizado por López e colaboradores (2000) animais submetidos à ablação telencefálica tiveram sucesso em tarefas espaciais constantes, mas severas restrições nas tarefas que envolviam reversões espaciais. No estudo de Peeke e Gordon (1981) teleósteos submetidos à ablação telencefálica, apresentaram um grande atraso na aquisição e não foram capazes de reter a tarefa de comportamento exploratório proposto.

Considerando que os animais submetidos à ablação telencefálica apresentaram grande prejuízo na tarefa proposta, a utilização desse modelo experimental se torna viável para o estudo de drogas que possam atuar nos processos de aprendizagem e memória bem como nos processos de recuperação funcional de teleósteos submetidos à ablação telencefálica.

Nos animais do grupo Abl-Sal foi observada uma diminuição nos valores de latência dia após dia de treino, sendo essa diminuição estatisticamente significativa a partir do sexto dia do experimento. Indicando que quando injetados com salina, mesmo animais submetidos à ablação telencefálica, conseguiram desempenhar a tarefa.

Kaneto (1997) sugere que os processos envolvidos na formação da memória, como a aquisição, consolidação, retenção e recuperação, podem ser facilitados pela exposição a

determinados tipos de estresse. Da mesma forma, em um estudo realizado por Gouirand e Matuszewich (2005) ratos submetidos a estresse moderado apresentaram melhor desempenho na tarefa (labirinto aquático de Morris) do que os animais que não foram submetidos ao estresse. Os autores sugeriram que os animais submetidos ao estresse desenvolveram mais estratégias para realizar a tarefa, mostrando um melhor desempenho.

Com base nesses fatos podemos sugerir que nos animais do grupo Abl-Sal o estresse causado pelo procedimento de injeção facilitou os processos de aquisição e retenção da tarefa.

Já os animais do grupo Abl-CPA não apresentaram diminuição nos valores de latência, o que nos leva a pensar em duas hipóteses: a) ausência de efeito da CPA, uma vez que o comportamento do grupo Abl-CPA foi semelhante ao do grupo Ablção; b) efeito prejudicial da CPA, uma vez que o desempenho do grupo Abl-CPA foi inferior ao do grupo Abl-Sal.

Levando em consideração a hipótese de ausência de efeito da CPA podemos sugerir que essa droga atua nos processos de aprendizagem e memória via Telencéfalo, uma vez que vários estudos já apontaram um efeito facilitador da CPA em diferentes tipos de tarefas. Spieler e colaboradores (1999) em um estudo realizado em *Carassius auratus* sugeriram que a CPA desempenha um papel facilitador na aprendizagem e na memória. Outro experimento também realizado com *Carassius auratus* utilizando CPA mostrou um maior tempo de permanência dos animais no ambiente pareado, sugerindo um efeito reforçador positivo dessa droga (MATTIOLI et al., 1996).

Em relação à hipótese de efeito prejudicial da CPA devemos levar em consideração nossos dois estudos anteriores, onde a CPA apresentou um efeito ansiolítico. Assim, podemos sugerir que o pior desempenho do Grupo Abl-CPA, quando comparado ao grupo Abl-Sal, pode ter sido causado por esse efeito ansiolítico já que à exposição a estresse moderado, em nosso caso o procedimento de injeção, pode contribuir para um bom desempenho (KANETO,

1997; GOUIRAND e MATUSZEWICH, 2005) e drogas ansiolíticas podem ser prejudiciais para a aquisição de diferentes tipos de tarefas.

Outros estudos já apontaram o efeito prejudicial de ansiolíticos para os processos de aprendizagem. Nakamura-Palacios e Roelke (1997) sugeriram que a administração aguda de diazepam prejudicou a memória de trabalho. Kant e colaboradores (1995) também demonstraram prejuízo no desempenho de ratos, em labirinto aquático, após tratamento com o diazepam.

Como já foi citado em nossos dois estudos anteriores, as estruturas primitivas do cérebro são capazes de gerar reações defensivas e, essas reações apresentam íntima relação com a ansiedade e estresse. Assim podemos sugerir que em teleósteos submetidos à ablação telencefálica a CPA apresenta um efeito ansiolítico via estruturas mesencefálicas e/ou diencefálicas. E outras ações da CPA, em diferentes tipos de aprendizagem e memória, ocorrem via telencéfalo.

## Considerações finais

Os resultados dos nossos três estudos apontam para um efeito ansiolítico da CPA em teleósteos submetidos à ablação telencefálica.

Nos dois primeiros estudos foi proposta uma tarefa de esquiva inibitória, que segundo Rau (2005) está relacionada à ansiedade e ao estresse. Nesses dois estudos à ablação telencefálica não impediu o animal de aprender a tarefa, provavelmente devido à capacidade de estruturas primitivas do cérebro serem capazes de gerar reações que são necessárias para a sobrevivência das espécies, conhecidas como reações defensivas. Após a análise dos dados verificamos que a CPA atuou da mesma forma que drogas ansiolíticas convencionais atuam em tarefas de esquiva, causando resultados opostos dependendo do momento de sua administração.

No primeiro estudo, quando administrada após o treino, a CPA facilitou a aquisição e retenção da tarefa, o que nos fez pensar em um efeito ansiolítico, uma vez que, drogas ansiolíticas administradas após o treino, de tarefas com fortes componentes emocionais, podem auxiliar na retenção da tarefa (DIAMOND et al, 2004).

No segundo estudo a CPA administrada antes do treino causou prejuízo na aquisição e retenção da tarefa, tanto nos animais submetidos à ablação telencefálica ou à lesão fictícia. Efeito similar foi encontrado após a administração de Diazepam. Esse resultado fortalece a idéia de propriedades ansiolíticas da CPA, uma vez que Izquierdo e colaboradores (1990) sugerem que algumas tarefas precisam de certo grau de estresse e ansiedade para serem aprendidas, como é o caso da esquiva inibitória. Dessa forma drogas ansiolíticas administradas antes do treino de esquiva inibitória podem prejudicar o desempenho do animal, como foi encontrado em nosso estudo.

No terceiro estudo foi proposta uma tarefa de condicionamento operante e a administração da CPA foi realizada após o treino. Nesse estudo, mesmo sendo minimizado o componente emocional da tarefa, quando comparado ao condicionamento de esquiva inibitória, verificamos as propriedades ansiolítica da CPA que prejudicou o desempenho do animal. Essa conclusão foi baseada no fato de que à exposição a estresse moderado pode contribuir para um bom desempenho em diferentes tipos de tarefa (KANETO, 1997; GOUIRAND e MATUSZEWICH, 2005).

Dessa forma sugerimos que em teleósteos submetidos à ablação telencefálica a CPA parece desempenhar apenas um efeito ansiolítico mediado pelo diencéfalo e/ou mesencéfalo, e outras possíveis ações da CPA, nos processos de aprendizagem e memória, parecem ocorrer via telencéfalo.

## Referencias Bibliográficas

- ALMEIDA A.P., BEAVEN M.A. Phylogeny of histamine in vertebrate brain. **Brain Research**, 208(1) 244-50, 1981.
- ARRANG, J. M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J. C. Autoregulation of histamine release in brain by presynaptic H<sub>3</sub>-receptors. **Neuroscience**, v. 15, p. 553-562, 1985.
- BACCIOTTINI L., PASSANI M.B., MANNAIONI P.F., BLANDINA P. Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, 124: 183-194, 2001 .
- BEARDSLEY, P.M.; BALSTER, R.L. The intravenous self-administration of antihistamines by rhesus monkeys. **Drug and Alcohol Dependence**, 30, 117-26, 1992.
- BEATTY W.W., BUTTERS N., JANAWSKY D. Memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypothesis of dementia. **Behavioral and Neural Biology**, 45:196-211, 1986.
- BLANCHARD R.J., BLANCHARD D.C., HORI K. An ethoexperimental approach to the study of defense (1989) In: M.L.Brandão, A.C. Troncoso, M.A.S. Silva, J.P. Huston. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, 463: 225-233, 2003.
- BLANDINA P., GIORGETTI M., BATTOLINI L., CECCHI M., TIMMERMAN H., LEURS R., PEPEU G., GIVANINI M.G. Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H<sub>3</sub> receptor activation in rats. **British Journal of Pharmacology**, 119: 1656-1664, 1996.
- BLANDINA, P.; EFOUDEBE, M.; CENNI, G.; MANNAIONI,P.; PASSANI, M.B. Acetylcholine, histamine, and cognition: Two side of the same coin. **Learning & Memory**, 11:1-8, 2004.
- BONGERS, G.; LEURS, R.; ROBERTSON, J.; RABER, J. Role of H<sub>3</sub>- Receptor-Mediated Signaling in Anxiety and Cognition in Wild-Type and Apoe Mice. **Neuropsychopharmacology**. 1-9, 2003.
- BRAFORD, M.R. Comparative aspects of forebrain organization in Ray-finned fishes: Touchstones or not? **Brain Behavior and Evolution**, 46: 259-279, 1995.
- BRANDÃO M.L., TRONCOSO A.C., MELO L.L., SANDNER G. Active avoidance learning using brain stimulation applied to the inferior colliculus as negative reinforcement in rats: evidence for latent inhibition. **Neuropsychobiology**, 35: 30-35, 1997.
- BRANDÃO M.L., TRONCOSO A.C., SILVA M.A.S., HUSTON J.P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, 463: 225-233, 2003.

BROGLIO, C.; RODRÍGUEZ, F.; SALAS, C. Spatial cognition and its neural basis in teleost fishes. **Fish and Fisheries**, 4: 247-255, 2003.

CACABELOS, R.; ALVAREZ, X. A., Histidine decarboxylase inhibition induced by alpha-fluoromethylhistidine provokes learning-related hypokinetic activity. **Agents Actions**, 33(1-2):131-4, 1991.

CANGIOLI L., BALDI E., MANNAIONI P.F., BUCHERELLI C., BLANDINA P., PASSANI M.B. Activation of histaminergic H3 receptor in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. **European Journal of Neuroscience**, 16 521-528, 2002.

CARROL, R.L. Vertebrate Paleontology and evolution. New York: W.H. Freeman, 1988.

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. **Environmental Research**, 94: 86-93, 2004.

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

COTMAN, C.V.; NIETO-SANPEDRO, M. HARRIS, E. W. Synapse replacement in the central nervous system of adult vertebrates. **Physiological Reviews** , 61: 687-784, 1981.

COTMAN, C.V.; LYNCH, G.S. The neurobiology of learning and memory. **Cognition**. 33: 201-241, 1989.

DAVIS M. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. (2000). In: M.Yoshida, I. Okamura, K. Uematsu. Involvement of cerebellum in classical fear conditioning in goldfish. **Behavioural Brain Research**, 153: 143-148, 2004.

DE ALMEIDA, M.A.M.R; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, 283:193-198, 1986.

DIAMOND, D. M.; PARK, C. R.; WOODSON, J. C. Stress generates emotional memories and retrograde amnesia by inducing an endogenous form of hippocampal LTP. **Hippocampus**. 14(3):281-91, 2004.

DROOGLEEVER FORTUYN, J. Topographical relations in the telencephalon of the sunfish, *Europomotis gibbosus*. **Journal of Comparative Neurology**, 116: 249-264, 1961.

DUNNETT S.B., TONIOLO G., FINE A., RYAN C.N., BJÖRKLUND A., INVERSEN S.D. Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the nucleus basalis magnocellularis: II. Sensorimotor and learning impairment. **Neuroscience**, 16; 787-797, 1985.

EAGGER S.A., LEVY R., SAHAKIAN B.J. Tacrini in Alzheimer's disease. **Lancet**, 337 989-992, 1991.

EIDI M., ZARRINDAST M.-R., EIDI A., ORYAN S., PARIVAR K. Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. **European Journal of Pharmacology**, 465: 91-96, 2003.

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

FANSELOW M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety (1981) In: BRANDÃO M.L., TRONCOSO A.C., SILVA M.A.S, HUSTON J.P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, 463: 225-233, 2003.

FERRETTI C., BENGLIO M., GHI P., ADAGE T., RICCI P., GAMALERO S. Hypothalamic histamine release in normal and stressed rats is affected by sex and aging. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 59: 225-60, 1998.

FLOOD, N.B.; OVERMIER, J.B.,. Learning in teleost fish: role of the telencephalon (1981). In ROONEY, D.J., LAMING, P.R Effects of Telencephalic ablation on Habituation of arousal responses, within and between daily training sessions in goldfish. **Behavioral and Neural Biology**, 49: 83-96, 1988.

FLOOD, N.B., OVERMIER, J.B., SAVAGE, G.E. The teleost telencephalon and learning: An interpretative review of data and hypotheses. **Physiology and Behavior**, 16: 783-789, 1976.

FOX, G. B.; PAN, J. B.; ESBENSHADE, T. A.; BENNANI, Y. L.; BLACK, L. A.; FAGHIH, R.; HANCOCK, A. A.; DECKER, M. W., Effects of histamine H(3) receptor ligands GT-2331 and ciproxifan in a repeated acquisition avoidance response in the spontaneously hypertensive rat pup. **Behavioural Brain Research** 1(1-2):151-61, 2002.

FOX, G. B.; PAN, J. B.; RADEK, R. J.; LEWIS, A. M.; BITNER, R. S.; ESBENSHADE, T. A.; FAGHIH, R.; BENNANI, Y. L.; WILLIAMS, M.; YAO, B. B.; DECKER, M. W.; HANCOCK, A. A. Two novel and selective nonimidazole H3 receptor antagonists A-304121 and A-317920: II. In vivo behavioral and neurophysiological characterization. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 305(3):897-908, 2003.

FRISCH C., HASENOHRL R. U., KRAUTH J., HUSTON J.P. Anxiolytic-like behavior after lesion of tuberomammillary nucleus E2-region. **Experimental Brain Research**. 119: 260-264, 1998.

GALONN R.L. Effects of pre-training with fear and escape conditioning on shuttle-box avoidance acquisition by goldfish. **Psychological Reports**, 31: 319-924, 1972.

GIONET, T.X. THOMAS, J.D.; WARNER, D.S.; GOODLETT, C.R.; WASSERMAN, E.A.; WEST, J.R. Forebrain ischemis induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats. **Stroke**. 22(8): 1040-7, 1991.



- GONZALEZ A., LOPEZ J.M., SANCHEZ-CAMACHO A., MARIN O. Localization of choline-acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of a caecilian amphibian, *Dermophis mexicanus* (Amphibia: Gymnophiona). **Journal of Comparative Neurology**. 48 (3): 249-67, 2002.
- GOUIRAND, A.M., MATUSZEWICH, L. The effects of chronic unpredictable stress on male rats in the water maze. **Physiology and Behavior**. 86(1-2): 21-31, 2005.
- GRAEFF F. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology** (Berl) 163, 467-476, 2002.
- HAAS, H; PANULA, P. The Role of Histamine and the Tuberomamillary Nucleus in the Nervous System. **Nature Reviews Neuroscience**, 4: 121-130, 2003.
- HALE, E. B. Social facilitation and forebrain function in maze performance of green sunfish, *Lepomis cyanellus*. **Physiological Zoology**, 29, 93-107, 1956.
- IMAIZUME, M.; ONODERA, K. The behavioral and biochemical effects of thioperamide, a histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist, in a light/dark test measuring anxiety in mice. **Life Sciences**, 53 (22):1675-83, 1993.
- 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. **Neuroscience Letters**, 262: 143-145, 1999.
- ITO, C. The role of brain histamine in acute and chronic stresses. **Biomed Pharmacother**, 54: 263-267, 2000.
- IZQUIERDO, I.; PEREIRA, M. E.; MEDINA, J. H. Benzoazepine receptor ligand influences on acquisition: suggestion of an endogenous modulatory mechanism mediated by benzodiazepine receptors. **Behavioral and Neural Biology**. 54(1):27-41, 1990.
- JANZEM, W. Untersuchungen über Grosshirn-funktion des goldfishes (*Carassius auratus*) 1933. In: SAVAGE, G.E. Telencephalic lesions and avoidance behaviour in the goldfish (*Carassius auratus*). **Animal Behaviour**, 17(2): 362-73, 1969.
- JENCK F., SCHIMITT P., KARLIET P. Morphine applied to the mesencephalic central gray suppresses brain stimulation escape. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 19: 189-195, 1983.
- JENCK, F., MOREAU J.L., MARTÍN J.R. Dorsal periaqueductal gray induced aversión as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. **Psychiatry Research**. 57: 181-191, 1995.
- JONES G.M.M., SAHAKIAN B.J., LEVY R., WARBURTON D.M., GRAY J.A. Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. **Psychopharmacology**, 108: 485-494, 1992.

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

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

KANETO, H. Learning/memory processes under stress conditions. **Behavioural Brain Research**. 83 (1-2): 71-74, 1997.

KANT, G. H.; WYLIE, R. M.; VASILAKIS, A. A.; GHOSH, S. Effects of triazolam and diazepam on learning and memory as assessed using a water maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 53 (2), p. 317-322, 1996.

KAPP B.S., FRYSSINGER R.C., GALLAGHER M., HASELTON J. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. **Physiology and Behavior**, 23: 1109-17, 1979.

LIN, H.Q.; BURDEN, P. M.; JOHNSTON, G.A. Propylene Glycol elicits anxiolytic-like responses to the elevated plus-maze in male mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 50: 1127-1131, 1998.

LIM, H. D.; RIJN, R. M. V.; LING, P.; BAKKER, R. A.; THURMOND, R. L.; LURS, R. Evaluation of Histamine H<sub>1</sub>-, H<sub>2</sub>-, and H<sub>3</sub>-Receptor Ligands at the Human Histamine H<sub>4</sub> Receptor: Identification of 4-Methylhistamine as the First Potent and Selective H<sub>4</sub> Receptor Agonist. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 314:1310–1321, 2005.

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

LOURENÇO DA SILVA, A.; ELISABETSKY, E. Interference of propylene glycol with the hole-board test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 545-547, 2001.

MAISONNETTE SS., KAWASAKI M.C., COINBRA N.C., BRANDÃO M.L. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research Bulletin**., 40: 93-98, 1996.

MALMBERG-AIELLO P., IPPONI A., BARTOLINI A., SCHUNACK W. Mouse light/dark box test reveals anxiogenic-like effects by activation of histamine H<sub>1</sub> receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**., 71: 321-326, 2002.

MATTIOLI, R.; COELHO J.; MARTINS A. Reinforcing properties of the substance P C-fragment analog DiMe-C7 in *Carassius auratus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 29:495-9, 1996.

MATTIOLI, R.; NELSON, C.A.; HUSTON, J.P. SPIELER, R.E. Conditioned place-preference analysis in the goldfish with the H<sub>1</sub> histamine antagonist Chlorpheniramine. **Brain Research Bulletin**, 45: 41-44, 1998.

MAZURKIEWICZ-KWILECK, I.M.; TAU, H. Effects of stress on brain histamine. (1978). In: MALMBERG-AIELLO, P.; IPPONI, A.; BARTOLINI, A.; SCHUNACK, W. Mouse light/dark box test reveals anxiogenic-like effects by activation of histamine H1 receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 71: 321-326, 2002.

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**, 24: 295-305, 2000.

MEDALHA C.C., SANTANGELO E.M., MATTIOLI R. Neurochemical analysis of brain monoamines after L-histidine and chlorfeniramine administration in goldfish. **Neuroscience Letters**, 349: 179-182, 2003.

MEDINA J.F., REPA J.C., MAUK M.D., LEDOUX J.E. Parallels between cerebellum-and amygdala-dependent conditioning. **Nature Reviews Neuroscience**, 3:122-31, 2002.

MEGURO, K-I, YANAI, K.; SAKAI, N.; SAKURAI, E.; MAEYAMA, K.; SASAKI, H.; WATANABE, T. Effects of thioperamide, a histamine H3 antagonist, on the step-trough passive avoidance response and histidine decarboxylase activity in senescence-accelerated mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 50: 321-32, 1995

MISSLIN R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiologie Clinique**. 33(2): 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**. 56: 1563-70, 1995.

NAKAMURA-PALACIOS, E.M., ROELKE, C. E. Effects of acute daily administration of diazepam on spatial learning and working memory. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 46 (3), p. 181-190, 1997.

NIEUWENHUYS, R., MEEK, J. (1990). The telencephalon of sarcopteriginan fishes. In: LÓPEZ, J. C., BINGMAN, V.P., RODRÍGUEZ, F., GÓMEZ, Y., SALAS, C. Dissociation of place and cue learning by Telencephalic ablation in goldfish. **Behavioral Neuroscience**, 114: 687-699, 2000.

NORTHCUTT, R.G. Evolution of the telencephalon in nonmammals. **Annual Review of Neuroscience**. 4: 301-50; 1981.

NORTHCUTT, R.G., (1995). The forebrain of gnathostomes. In: LÓPEZ, J. C., BINGMAN, V.P., RODRÍGUEZ, F., GÓMEZ, Y., SALAS, C. Dissociation of place and cue learning by Telencephalic ablation in goldfish. **Behavioral Neuroscience**, 114: 687-699, 2000.

NORTHCUTT, R.G.; BRADFORD, M.R. New observations on the organization and evolution of the telencephalon of actinopterygian fishes (1980). In: PORTAVELLA, M.; TORRES, B.; SALAS, C.; PAPINI, M.R. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). **Neuroscience Letters**, 362: 75-78, 2004.

OISHI, R.; NISHIBORI, M., ITOH, Y., SAKI, K. Diazepam-induced decrease in histamine turnover in mouse brain. **European Journal of Pharmacology**, 124: 337-342, 1986.

OISHI, R.; ITOH, Y.; SAEKI, K. Inhibition of histamine turnover by 8-OH-DPAT, buspirone and 5-hydroxytryptophan in the mouse and rat brain. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 345(5):495-9, 1992.

OHNISHI, K. Telencephalic function implicated in food-reinforced color discrimination learning in goldfish. **Physiology & Behavior**, 46 (4):707-712, 1989.

OVERMIER J.B., CURNOW P.F. Classical conditioning, pseudoconditioning, and sensitization in "normal" and forebrainless goldfish. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. 68: 193-198, 1969.

OVERMIER, J.B.; SARKMAN, N. Transfer of control avoidance behavior in normal and telencephalon ablated goldfish (*Carassius auratus*). **Physiology and Behavior**, 12: 605-608, 1974.

OVERMIER, J.B.; HOLLIS, K. L. Fish in the think tank: learning, memory and integrated behavior (1990). In: PORTAVELLA, M.; TORRES, B.; SALAS, C.; PAPINI, M.R. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). **Neuroscience Letters**, 362: 75-78, 2004.

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

PASSANI M.B., CANGLIOLI I., BALDI E., BUCHERELLI C., MANNAIONI P.F., BLANDINA P. Histaminergic H3 receptor-mediated impairment of contextual fear conditioning and in-vivo inhibition of cholinergic transmission in the rat basolateral amygdala. **European Journal of Neuroscience**, 14: 1522-1532, 2001.

PEEKE, H.V.S.; GORDON, D.G. Deficits in foraging behavior after Telencephalon ablation in the goldfish (*Carassius auratus*). **Experimental Neurobiology**. 72: 204-210, 1981.

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

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

PORTAVELLA M., SALAS C., VARGAS J.P., PAPINI M.R. Involvement of the telencephalon in spaced-trial avoidance learning in the goldfish (*Carassius auratus*) **Physiology and Behavior** 80: 49-56, 2003.

PORTAVELLA, M.; TORRES, B.; SALAS, C.; PAPINI, M.R. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). **Neuroscience Letters**, 362: 75-78, 2004.

RAU, V.; DECOLA, J.P.; FANSELOW, M.S. Stress-induced enhancement of fear: Na animal model of posttraumatic stress disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 29: 1207-1223, 2005.

RODRIGUEZ, F.; LÓPEZ, J.C.; VARGAS, J.P.; BROGLIO, C.; GÓMEZ, Y., SALAS, C. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: Insights from reptiles and teleost fish. **Brain Research Bulletin**, 57: 499-503, 2002

RUBIO S., BEGEGA A., SANTÍN L.F., MIRANDA R., ARIAS J.L. Effects of histamine precursor and (R)- $\alpha$ -methylhistamine on the avoidance response in rats. **Behavioural Brain Research**, 124: 177-181, 2001.

SANNERUD, C.A.; KAMINSKY, B.J.; GRIFFITHS, R. Maintenance of H1 antagonists self-injection in baboons. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, 3: 26-32, 1995.

SANTANGELO E.M; MATTIOLI R. Preferência natural por ambientes escuros em *Carassius auratus*:In: XIV Reunião anual da Federação de sociedade de Biologia experimental, Caxambu M.G.. Anais Caxambu, MG. p 346, 1999.

SOUZA-SILVA, M.; GUIMARÃES, F.S.; GRAEFF, F.G.; TOMAZ, C. Absence of amnestic effect of na 5-HT<sub>3</sub> antagonist (BRL46470A) injected into basolateral amygdale, as opposed to diazepam. **Behavioural Brain Research**, 59 (1-2): 141-145, 1993.

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

SUZUKI, T.; TAKAMOI, K.; MISAWA, M.; ONODERA, K. Effects of the histaminergic system on the morphine-induced conditioned place preference in mice. **Brain Research**, 675: 195-202, 1995.

TASAKA K., KAMEI C., AKAHORI H., KITAZUME K. The effects of histamine and some related compounds on conditioned avoidance once response in rats. **Life Sciences**. 37: 2005-14, 1985.

VARGAS, J. P.; RODRÍGUEZ, F. LÓPEZ, J. C.; ARIAS, J. L.; SALAS, C. Spatial learning-induced increase in the argyrophilic nucleolar organizer region of dorsolateral telencephalic neurons in goldfish. **Brain Research**. 865: 77-84, 2000.

WERKA, T.; ZIELINSK, K. CS modality transfer of two-way avoidance in rats with central and basolateral amygdala lesions. **Behavioural Brain Research**, 93(1-2): 11-24, 1998.

## **ANEXOS – Estudo I**

Carta de submissão, do artigo “Chlorpheniramine facilitates the inhibitory avoidance in teleosts submitted to telencephalic ablation”, enviada para a revista Neuroscience Letters.

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Departamento de Fisioterapia - Laboratório de Neurociências  
Via Washington Luís, km 235 - Caixa Postal 676  
CEP: 13565-905 - São Carlos - SP - Brasil  
Fone: (016) 3351-8628 FAX: (016) 3351-2081



São Carlos, 12.09.05  
**S. G. Waxman**  
Editor-in-Chief

NEUROSCIENCE LETTERS

**Dear Dr. Waxman**

**Please consider for publication in Neuroscience Letters an original manuscript by  
F. R. Faganello and R. Mattioli entitled “Chlorpheniramine facilitates the inhibitory  
avoidance in teleosts submitted to telencephalic ablation”**

Cordially yours,

Rosana Mattioli, Ph.D.  
Lab. Neurociências. DEFISIO, UFSCar

Versão do artigo enviada para a revista Neuroscience Letters

**“Chlorpheniramine facilitates the inhibitory avoidance in teleosts  
submitted to telencephalic ablation”**

Faganello, Flávia Roberta, Mattioli, Rosana  
Laboratory of Neuroscience, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos,  
SP - Brazil.

Number of pages: 15

Number of figures: 1

Corresponding autor: Mattioli, Rosana  
Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Fisioterapia  
Address: Via Washington Luis Km 235  
São Carlos, SP - Brazil  
CEP – 13565-905  
Phone number: +55 (16) 33518628  
Fax number: +55 (16) 33612081  
e-mail address: [mattioli@power.ufscar.br](mailto:mattioli@power.ufscar.br)

*Acknowledgements*

This work was supported by grants from CAPES. We thank Ms Tereza Fatori for technical assistance.

## **Introduction**

It is well known that the limbic system is critically involved in fear-related classical conditioning in mammals [10,30,25]. However, ablation of the teleost telencephalon, which is phylogenetically related to the limbic system in land vertebrates, does not disrupt classical autonomic conditioning when using an aversive procedure similar to that used in mammals [30,33], indicating that mesencephalic structures are able to support the learning of conditioned emotional responses.

Teleosts are suitable for studying neurotransmitter histamine (HA) in the central nervous system (CNS) because the histaminergic system in fish has only one area of projection to the telencephalon [14], which has been well preserved through evolution [37].

Several reports suggest that HA has been implicated in learning and memory [9]. However, the results are often contradictory, as both facilitatory and inhibitory effects have been described [5,36,8].

Previous studies showed that histamine plays inhibitory effects in different tasks of inhibitory avoidance. Eidi et al. [13] suggested that post training administration of histamine attenuated memory retention and potentiated the inhibitory effect on memory induced by scopolamine in rats. In a study performed by Rubio and colleagues [39] the increase in cerebral histamine levels impaired the acquisition of avoidance response, whereas reduced levels facilitated this acquisition. In teleosts, Chlorpheniramine, a H1 histaminergic antagonist, improved the learning of inhibitory avoidance [28].

As the cited studies found that histamine has presented an inhibitory effect on learning tasks and ablation of the teleost telencephalon did not disrupt classical autonomic conditioning using an aversive procedure [30,33], the aim of this study is to verify the role of CPA in inhibitory avoidance in teleosts submitted to telencephalon ablation.



## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Forty-six goldfish (*Carassius auratus*) of undetermined sex and weighing 4-10g were used. The fish were maintained at 20-25°C in a continuously filtered and aerated aquarium of 30L (15 fish per aquarium) under a natural light cycle.

They were fed five times a week with flake food (Wardly Corporation, New Jersey, U.S.A.). A 2-week acclimation interval was allowed between the purchase of the fish and the surgical procedure. The fish were individually identified by their unique physical characteristics, such as color and tail type.

### 2.2. Surgery

The fish were anaesthetized by immersion in a solution of 0.8 g/l of tricaine methanesulfonate (TMS)-(3-aminobenzoic acid ethyl ester methasulfonate, Sigma Chemical Co.) until spontaneous motor activity and gill movement ceased. The fish were then wrapped in wet gauze and placed on a stand that stabilized the body through laterally adjustable holders. Anesthesia was maintained by perfusing the animals through the mouth continuously with an aerated solution of 0.3 g/l TMS.

The dorsal part of the skull was removed to expose the telencephalic lobes. The telencephalic lobes were then ablated by aspiration through a glass pipette connected to a vacuum pump. Following telencephalic ablation, the skull was closed with dental acrylic (Dental Vipi Ltda, Pirassununga, São Paulo – Brazil). After the skull was closed, the anesthetic solution was replaced by fresh water until the gills began to move. The fish were then placed in the maintenance aquarium for 5 days of recovery prior to the experimental procedure.

### 2.3 Histology

At the conclusion of experimental procedures, the fish were decapitated and the brains were removed from the skull and inspected for preliminary assessment of ablation. The brains were then fixed in 10% formalin for four days. Thereafter, they were sectioned at 50 µm using a freezing microtome. The analysis showed that the telencephalon-ablated brains exhibited complete telencephalic tissue removal wherein the preoptic areas and

optic tracts were not injured. The analysis showed that the telencephalon-ablated brains exhibited complete telencephalic tissue removal and the preoptic areas and optic tracts had not been injured.

### *2.3. Drugs and Treatment*

Chlorpheniramine (CPA) maleate salt (Sigma, MO, USA) was dissolved in (0.9%) saline at a concentration of 8 and 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . CPA 8 and 16  $\mu\text{g}/\text{g}$  or 0.9% saline control (SAL) were administered intraperitoneally at a volume of 1  $\mu\text{l}/\text{g}$ . The substances were coded and the experimenter was not given access to the codes. Therefore, the experimenter knew the code but not which substance was injected into each fish.

The fish were divided into three groups: SAL group (n=20) composed by fish treated with saline, CPA8 group (n=12) composed of fish that received treatment with 8  $\mu\text{g}/\text{g}$  of CPA and CPA16 group (n=14) composed of fish treated with 16  $\mu\text{g}/\text{g}$  of CPA.

### *2.4. Test Procedures*

A rectangular aquarium divided into two compartments was used. Each compartment was 15 cm high, 15 cm wide and 25 cm long. One compartment was black and the other white and a central sliding door was used to separate them.

The experiment was performed on five consecutive days. One day for habituation, three days for training (composed by three trials each: first training T1, T2 and T3; second training 2T1, 2T2 and 2T3 and third training 3T1, 3T2 and 3T3) and one day for test.

On habituation day each fish was placed in the aquarium by itself for 10 minutes. On training days, the fish were placed individually in the white compartment and after 20 seconds the door was opened. When the fish crossed to the black compartment, a 45-gram weight was dropped in front of it. Thereafter, the fish crossed back or was immediately returned to the start compartment and the procedure was repeated two more times. Crossing was defined as the moment when the dorsal fin entered the black compartment. Immediately after the third trial on each of the three days of training, the fish in the treated groups received the pharmacological treatment (SAL, CPA8 or CPA16).

Twenty-four hours later the fish were tested and the time lapse to enter the black compartment was registered again.

The white compartment was chosen as the starting compartment because a previous experiment indicated that goldfish present a natural preference for dark environments [40]. All experiments were videotaped.

### 2.5. Statistical Analysis

All results were initially submitted to Levene's test for homogeneity of variance. When appropriate, the data were converted to  $\log_{10}$  and variance analysis (ANOVA) was performed, followed by Dunn's multiple comparisons test.

The value of  $p < 0.05$  was established as the significance level.

## 3. Results

Figure 1-A shows the means and standard error of the means (+SEM) of latencies for training and test days for the saline treated group. The latency was significantly higher only on the 3<sup>rd</sup> trial of the second training day (ANOVA: d.f.=9,  $F=2.19$ ,  $p=0.0249$  and Dunn  $p < 0.05$ ). These results suggest the fish were able to learn the task but did not retain the learned information.

The fish treated with CPA8 showed increased latencies on trial after trial on the 2<sup>nd</sup> training day and latencies remained high for the three trials on 3<sup>rd</sup> training day and test (ANOVA: d.f.=9,  $F=3.15$ ,  $p=0.0022$  and Dunn  $p < 0.05$ ) (Figure 1-B). The CPA16 group shows higher latencies on the second and third day of training (ANOVA d.f.=9,  $F=3.67$ ,  $p=0.0005$  and Dunn  $p < 0.05$ ) (figure 1-C). These results suggest that CPA, mainly at a dosage of  $8\mu\text{g/g}$ , had a facilitating effect on memory.

## 4. Discussion

The results of the present study suggest that CPA improves the memory of the inhibitory avoidance task in telencephalic-ablated fish. Medalha et al. [28] found similar results in a study performed on intact goldfish with the same experimental model where the group treated with CPA at a dosage of  $8\text{ mg/kg}$  presented a significant increase in latency to leave the start compartment. The present study confirms and extends the action of CPA on conditioning of inhibitory avoidance in suggesting that these effects occur via mesencephalic structures.

Blanchard et al. [4] and Fanselow [15] proposed that defensive behavior patterns are organized in a hierarchical series of responses. Some studies suggest that stimulation of the

midbrain tectum structures produces alertness, followed by freezing and escape reactions. Furthermore, electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus has consistently been shown to induce aversive effects, because it elicits defensive behaviors. Moreover, it sustains learned operant escape responses and also supports the learning of conditioned emotional responses [6,22,23].

Although the midbrain tectum seems to have local circuits for the generation and elaboration of defense reactions, higher brain structures are necessarily enlisted in the control of more complex fear-related behaviors. For example, the connections of the inferior colliculus to the amygdala act as an important filter for sensorial information of an aversive nature [26]. Based on these data we suggest that the fish submitted to the telencephalic ablation were able to learn the inhibitory avoidance task due to the local circuits of midbrain, and that CPA facilitated retention of an aversive experience, as a type of defensive behavior [31], for at least twenty-four hours.

Other studies also suggest the histaminergic system acts on the diencephalons, mainly in tasks that involve emotional components such as aversion, stress and fear. Ito et al.[21] submitted mice to a situation of acute stress, in which the animals remained immobile in a tight cage for one hour. The analysis of cerebral histamine showed an increased HA level in the diencephalon. Ferretti et al. [16] reported stress-induced histamine release from the hypothalamus. Tasaka and colleagues [42] reported that Histamine caused a dose-dependent inhibition of the avoidance response in rats, and that this inhibitory effect is preferentially linked to the H1-receptor. In this study, after intraventricular application of HA, the highest level of radioactivity was found in the hypothalamus. Santos et al. [41] suggested that H2 receptors may be involved in the control of escape behavior following activation of neural substrates of fear in the midbrain tectum.

The midbrain tectal sites are often considered to contain substrates of defensive behavior, aversion and fear [7]. There is good evidence that avoidance learning is based on the acquisition of a mediational state of fear in goldfish [18, 34, 38]. In agreement with Brandão et al.[7] the preparatory process of danger-orientation, fear and avoidance seems to be linked to anxiety. Thus, the facilitatory effect of CPA on memory found in our study can also be due to an anxiolytic-like effect of CPA mediated by the diencephalon and/or the midbrain tectum.

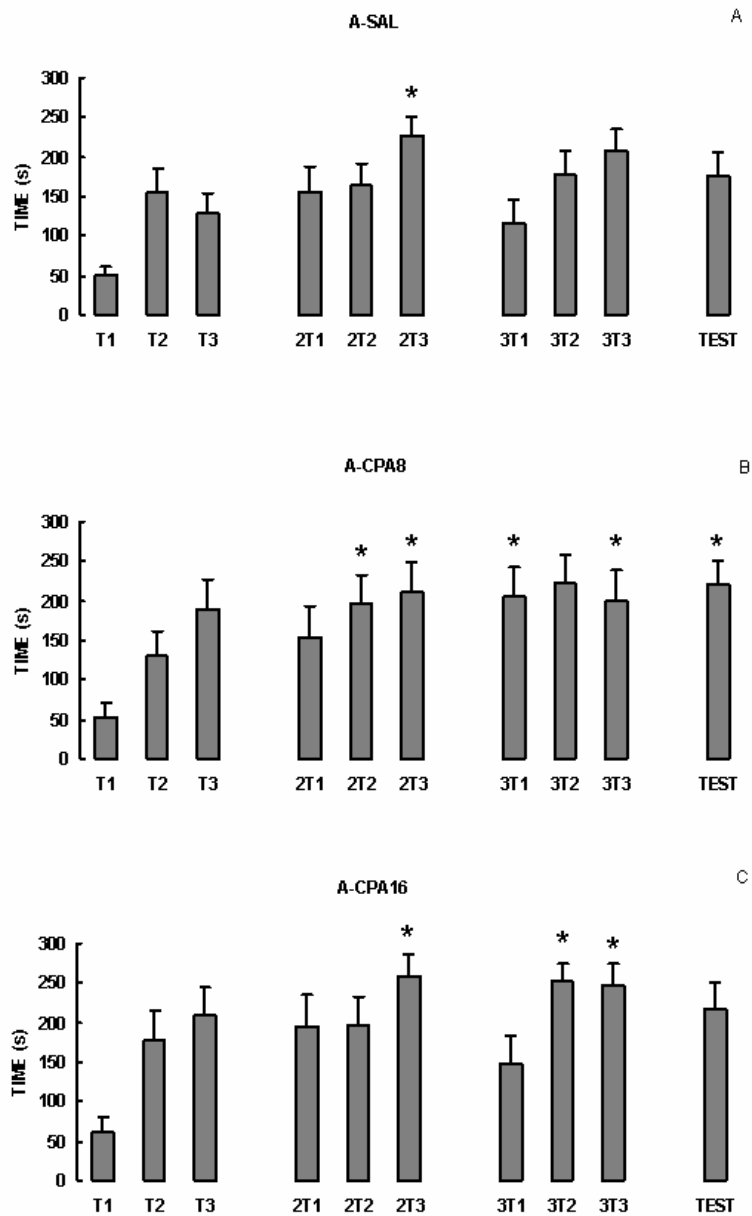
Some authors have already suggested the involvement of the histaminergic system in the anxiety states of animals. Malberg-Aiello et al. [27] showed that substances able to enhance histaminergic transmission reduced the time spent in the lighted compartment,

indicating a probable anxiogenic-like effect. A physiological study reported that destruction of the rat tuberomammillary rostroventral E-2 subregion, from which the histaminergic neuron fibers rise, can induce anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze test, as these effects are linked to a lesion-induced reduction in histaminergic activity [17]. In a study realized by Medalha et al. [29], the CPA-treated group had lower 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) levels in the diencephalon than the saline groups, suggesting that CPA may have an anxiolytic-like effect since serotonin is involved in anxiety process [20].

An additional hypothesis is participation by the cholinergic system. Clinical [3,12, 24] and experimental [11] studies have shown that the cholinergic system plays an important role in learning, memory and attention. Many studies indicate that the histaminergic system influences learning and memory by modulating the release of acetylcholine [35, 2].

In a study realized by Eidi et al. [13] the memory improvement induced by acetylcholine or nicotine can be impaired by histamine. Miyazaki et al. [32] suggested that histidine significantly decreased acetylcholine levels in the cerebral cortex and diencephalons of mice, and midbrain levels as well. Considering that cholinergic cells have been described in the midbrain tectum of teleosts [19], that the histaminergic system arises in the diencephalons [14], and midbrain regions show the highest histamine levels in fish (as in mammals) [1], the facilitatory effect of the CPA in our study may also be due to the relationship of the histaminergic system with the cholinergic system in midbrain and diencephalic structures. However, further research needs to be carried out on the histamine/acetylcholine relation on inhibitory avoidance learning.

In conclusion, we suggest that the fish submitted to telencephalic ablation were able to learn the inhibitory avoidance task due to the local circuits of midbrain that act to generate and elaborate defense reactions, and that CPA, probably due to its anxiolytic-like effect, interferes in these midbrain circuits.



### Figure Legend

Figure1:A- Means and standard error of the means (+SEM) of latencies for training and test days in the A-SAL group: ANOVA:  $p=0.0249$  and Dunn  $p<0.05$ , \* different of T1. B: Means and standard error of the means (+SEM) of latencies for training and test days in the A-CPA8 group: ANOVA:  $p=0.0022$  and Dunn  $p<0.05$ , \* different of T1. C: Means and standard error of the means (+SEM) of latencies for training and test days in the A-CPA16 group: ANOVA:  $p=0.0005$  and SNK  $p<0.05$ , \*different of T1.

Tabela 1: Valores de latências (segundos) dos animais submetidos á ablação telencefálica e tratados com salina imediatamente após a última tentativa de cada dia de treino (grupo Sal).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>	<b>3T1</b>	<b>3T2</b>	<b>3T3</b>	<b>TESTE</b>
<b>1</b>	29	300	83	41	49	111	9	300	300	8
<b>2</b>	76	27	31	250	55	300	300	31	300	300
<b>3</b>	58	300	300	300	300	300	300	300	300	300
<b>4</b>	7	95	300	300	300	300	300	300	300	118
<b>5</b>	54	300	239	300	300	300	17	300	300	210
<b>6</b>	86	300	33	20	100	4	6	47	87	22
<b>7</b>	22	52	183	73	233	267	77	96	52	93
<b>8</b>	41	168	26	23	300	300	78	300	300	300
<b>9</b>	38	2	10	3	12	6	1	10	16	2
<b>10</b>	213	12	124	7	11	300	15	8	6	20
<b>11</b>	12	5	91	69	300	258	300	300	199	300
<b>12</b>	107	300	300	300	147	300	13	300	300	300
<b>13</b>	118	300	28	300	300	53	300	300	300	300
<b>14</b>	82	16	87	300	5	300	4	5	300	300
<b>15</b>	4	300	300	239	300	80	32	231	300	300
<b>16</b>	24	10	83	294	208	300	134	72	177	7
<b>17</b>	6	300	37	1	34	142	300	23	1	300
<b>18</b>	6	5	1	2	300	300	130	23	1	300
<b>19</b>	2	300	300	4	1	300	3	300	300	1
<b>20</b>	23	10	3	300	7	300	19	300	300	31
<b>MÉDIA</b>	<b>50,40</b>	<b>155,10</b>	<b>127,95</b>	<b>156,30</b>	<b>163,10</b>	<b>226,05</b>	<b>116,90</b>	<b>177,30</b>	<b>206,95</b>	<b>175,60</b>
<b>EPM</b>	<b>11,69</b>	<b>31,21</b>	<b>26,32</b>	<b>30,79</b>	<b>29,20</b>	<b>25,01</b>	<b>28,83</b>	<b>30,06</b>	<b>28,33</b>	<b>30,43</b>

Tabela 2: valores de latências (segundos) dos animais submetidos á ablação telencefálica e tratados com 8 µg/g de clorfeniramina (CPA) imediatamente após a última tentativa de cada dia de treino (grupo CPA8).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>	<b>3T1</b>	<b>3T2</b>	<b>3T3</b>	<b>TESTE</b>
<b>1</b>	199	4	263	300	300	300	300	300	300	139
<b>2</b>	40	32	57	13	62	119	121	135	208	76
<b>3</b>	63	206	73	300	300	300	300	300	25	300
<b>4</b>	6	126	300	154	300	300	300	300	300	300
<b>5</b>	123	300	300	108	300	300	300	300	300	300
<b>6</b>	37	94	300	300	197	300	300	300	300	300
<b>7</b>	8	300	300	300	22	300	300	300	300	300
<b>8</b>	2	263	72	29	205	53	13	125	25	164
<b>9</b>	47	115	300	32	77	255	300	300	300	300
<b>10</b>	92	97	300	300	300	300	207	300	28	300
<b>11</b>	16	4	5	9	300	2	18	4	9	161
<b>12</b>	4	11	8	1	10	12	4	18	300	1
<b>MÉDIA</b>	<b>53,08</b>	<b>129,33</b>	<b>189,83</b>	<b>153,83</b>	<b>197,75</b>	<b>211,75</b>	<b>205,25</b>	<b>223,50</b>	<b>199,58</b>	<b>220,08</b>
<b>EPM</b>	<b>17,17</b>	<b>32,50</b>	<b>38,00</b>	<b>39,27</b>	<b>35,02</b>	<b>36,32</b>	<b>37,18</b>	<b>34,24</b>	<b>38,67</b>	<b>30,98</b>



Tabela 3: Valores de latências (segundos) dos animais submetidos á ablação telencefálica e tratados com 16 µg/g de clorfeniramina (CPA) imediatamente após a última tentativa de cada dia de treino (grupo CPA16).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>	<b>3T1</b>	<b>3T2</b>	<b>3T3</b>	<b>TESTE</b>
<b>1</b>	136	300	300	297	300	300	177	300	300	26
<b>2</b>	174	300	300	300	300	300	300	300	300	242
<b>3</b>	21	10	120	5	56	300	121	300	300	300
<b>4</b>	226	300	300	300	300	300	17	300	300	176
<b>5</b>	5	300	27	300	300	300	5	300	300	300
<b>6</b>	44	68	57	300	300	300	195	100	300	279
<b>7</b>	12	9	5	2	110	4	10	300	300	3
<b>8</b>	118	238	300	300	300	300	300	300	300	300
<b>9</b>	1	300	300	300	300	300	300	300	300	300
<b>10</b>	8	19	300	9	7	300	17	131	300	300
<b>11</b>	3	21	300	13	3	9	12	125	300	300
<b>12</b>	14	32	25	12	22	300	10	186	31	4
<b>13</b>	34	300	300	300	176	300	300	300	87	223
<b>MÉDIA</b>	<b>66,769</b>	<b>169</b>	<b>202,62</b>	<b>187,538</b>	<b>190,31</b>	<b>254,8</b>	<b>135,69</b>	<b>249,38</b>	<b>242,85</b>	<b>211,77</b>
<b>EPM</b>	<b>20,431</b>	<b>38,5625</b>	<b>36,281</b>	<b>40,9356</b>	<b>36,333</b>	<b>30,57</b>	<b>36,302</b>	<b>22,486</b>	<b>30,317</b>	<b>33,475</b>

## ANEXOS – Estudo II

E-mail recebido em 05/04/2006 da revista “Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry” apontando a aprovação do “Anxiolytic-like effect of chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation”

<b>Para:</b>	"Flávia" <frfaganello@yahoo.com.br>
<b>De:</b>	"Monique Baron" <monique.baron@crchul.ulaval.ca>
<b>Assunto:</b>	MS 0509496
<b>Data:</b>	Wed, 5 Apr 2006 14:06:30 -0400

Title: Anxiolytic-like effect of chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation

Authors: Faganello, F.R. and Mattioli, R.

Dear Dr Faganello,

We are pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication in Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry.

Please note also that the reference format for Progress in NP & BP has changed in 2006. The format is included in the bottom of this email. We would greatly appreciate if you changed the reference format of your paper accordingly (see the instructions at the end of this email).

Many thanks for submitting your fine paper to Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry. We look forward to receiving additional papers from you in the future.

With kind regards,

Monique Baron

Editorial Office

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Centre de Recherche du CHUL (CHUQ)

Neurosciences

2705 boul. Laurier

Québec (QC), Canada, G1V 4G2

phone 1 418 656 4141 ext 48531

fax 1 418 654 2753

Versão do artigo enviado para a revista “Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry”

**ANXIOLYTIC-LIKE EFFECT OF CHLORPHENIRAMINE IN  
INHIBITORY AVOIDANCE IN GOLDFISH SUBMITTED TO  
TELENCEPHALIC ABLATION”**

Faganello, Flávia Roberta <sup>a</sup>, Mattioli, Rosana <sup>b,\*</sup>

Laboratory of Neuroscience, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos,  
SP - Brazil.

<sup>a</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Fisioterapia  
Address: Via Washington Luis Km 235  
São Carlos, SP - Brazil  
CEP – 13565-905  
Phone number: +55 (16) 33518628  
Fax number: +55 (16) 33612081  
e-mail address: [frfaganello@yahoo.com.br](mailto:frfaganello@yahoo.com.br)

<sup>b</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Fisioterapia  
Address: Via Washington Luis Km 235  
São Carlos, SP - Brazil  
CEP – 13565-905  
Phone number: +55 (16) 33518628  
Fax number: +55 (16) 33612081  
e-mail address: [mattioli@power.ufscar.br](mailto:mattioli@power.ufscar.br)

## Abstract

The aim of the present study was to verify the consequences of telencephalic ablation on the learning of inhibitory avoidance and anxiety in goldfish. The animals were submitted to telencephalic ablation or sham operations five days prior to the experimental procedure. The inhibitory avoidance procedure was performed in 3 days using a rectangular aquarium divided into two compartments (black and white) with a central door. On the first day, the animals were habituated for 10 min. On the second and third days, they were injected with Saline (SAL), 16mg/kg Chlorpheniramine (CPA), 40% Propylene glycol (PPG) or 1mg/kg Diazepam (DZP) twenty min. before training. Then the animals were placed in the white compartment, the central door was opened and the time spent for crossing between compartments was recorded. After the fish crossed the line between the compartments a 45-g weight was dropped. This procedure was performed three times in a row. The groups submitted or not to telencephalic ablation and treated with SAL presented a difference between training sessions; however, the groups treated with CPA, PPG or DZP did not show any differences between them. These results suggest that the treatment with CPA, PPG or DZP impaired the acquisition of inhibitory avoidance conditioning in animals regardless of telencephalic ablation. In conclusion, telencephalic ablation does not disrupt the animals' capacity to learn the inhibitory avoidance task, and based on the fact that CPA showed similar effects to those of DZP on the animals submitted or not to telencephalic ablation, we suggest that the CPA presents an anxiolytic-like effect mediated by the diencephalon in goldfish.

**Key words:** anxiety, chlorpheniramine, diazepam, Goldfish, inhibitory avoidance, telencephalon

**Abbreviations:** CPA – chlorpheniramine; DZP – Diazepam; HA – histamine; PPG - Propylene glycol; SAL – saline

## 1. Introduction

The teleost telencephalon provides a good opportunity for studying the function of the vertebrate limbic system because it is simple and present homologies to the limbic structure of higher vertebrates. Functional analyses showed homologies between the telencephalic dorsomedial and the dorsolateral area of the telencephalon of teleost and the pallial amygdala and the hippocampus of land vertebrates (Droogleever-Foutuyn, 1961; Northcutt and Bradford, 1980; Lopez et al., 2000; Portavella et al., 2002).

Portavella et al. (2004) studied avoidance response after lesions of telencephalic areas and suggested the presence of two different memory systems in goldfish: the medial telencephalic pallium (MP), involved in an emotional memory system, and the lateral telencephalic pallium (LP), involved in a spatial, relational, or temporal memory system. Moreover, these differential effects were similar to those produced by amygdalar and hippocampal lesions in mammals.

Teleosts are suitable for studying neurotransmitter HA in the central nervous system (CNS) because the histaminergic system in fish has only one area of projection to the telencephalon (Ekström et al., 1995), which has been well preserved through evolution (Peitsaro et al., 2003).

Since the discovery that classical antihistamines have a sedative action, it has become clear that histamine performs important actions in the CNS (Haas and Panula, 2003). Several reports suggest that HA has been implicated in many neurological functions, such as arousal control, attention, sensory processing, cognition and memory formation (Choich et al., 2004).

The available data regarding the effects of central HA on animal behavior, especially on learning and memory, is still contradictory. Some studies describe an inhibitory effect of HA (Beardsley, 1992; Sannerud et al., 1995 and Suzuki et al., 1995). Another line of evidence points to a facilitatory role of HA in learning and memory (Coelho et al., 2001; De Almeida and Izquierdo, 1986; Kamei and Tasaka, 1993; Miyazaki et al., 1995; Meguro et al., 1995).

Several studies have revealed a role of neural HA in fear and anxiety (Frisch et al., 1998; Oishi et al., 1986; Imaizumi and Onodera, 1993).

Considering that the teleost telencephalon is regarded as homologous to the limbic structures of higher vertebrates, that the central histamine system seems to be involved in learning, memory and anxiety (De Almeida and Izquierdo, 1986; Mattioli et al., 1998) and its major projection area is located in the telencephalon, the aims of the present study were to

verify the consequences of telencephalic ablation on inhibitory avoidance learning and on anxiety.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

One hundred and fifty-six naïve goldfish (*Carassius auratus*) of undetermined sex and weighing 2.5-7.0g were used. The animals were maintained at 20-22°C in a continuously filtered and aerated aquarium of 30L (15 fish per aquarium) under natural light cycle.

They were fed five times a week with flake food (Wardly Corporation, New Jersey, U.S.A.). A 2-week acclimation interval was allowed between the purchase of the fish and the surgery procedure. The animals were individually identified by their unique physical characteristics, such as color and tail type.

### 2.2. Surgery

The fish selected for the forebrain ablation groups and the sham-operated groups were anaesthetized by immersion in a solution of 0.8 g/l of tricaine methanesulfonate (TMS)-(3-aminobenzoic acid ethyl ester methasulfonate, Sigma Chemical Co.) until spontaneous motor activity and gill movements ceased. The fish were then wrapped in wet gauze and placed on a stand that stabilized the body through laterally adjustable holders. Anesthesia was maintained by perfusing the animals through the mouth continuously with an aerated solution of 0.3 g/l TMS.

The dorsal part of the skull was removed for exposition of the telencephalic lobes. The telencephalic lobes were then ablated by aspiration with a glasspipete connected to a vacuum pump. Following telencephalic ablation the skull was closed with dental acrylic (Dental Vipi Ltda, Pirassununga, São Paulo – Brazil). Sham operations were performed in the same way except for the aspirations of the telencephalic lobes. After the skull was closed the anesthetic solution was replaced by fresh water until the gills began to move. The fish were then placed in the maintenance aquarium for 5 days in order to recover prior to the experimental procedure.

### 2.3 Histology

At the conclusion of experimental procedures the animals were decapitated, the brains were removed from the skull and inspected for preliminary assessment of ablation. The brains were then fixed in 10% formalin for four days. Thereafter, they were sectioned at 50  $\mu\text{m}$  using a freezing microtome. The analysis showed that the telencephalon-ablated brains exhibited complete telencephalic tissue removal whereas the preoptic areas and optic tracts were not injured.

### 2.3. Drugs and treatment

Diazepam (DZP) (Roche S/A, São Paulo, Brazil) was diluted in 40% propylene glycol (PPG) at a concentration of 1.0 mg/ml. Chlorpheniramine (CPA) maleate salt (Sigma, MO, USA) was dissolved in (0.9%) saline at a concentration of 16 mg/ml. DZP 1.0 mg/Kg, vehicle (PPG), CPA 16 mg/kg or 0.9% saline control (SAL) were administered intraperitoneally at a volume of 1ml/Kg. The substances were coded and the coding was not known by the experimenter, who was, therefore, unaware of which substance was being injected into each animal.

The fish were divided into eight groups considering the surgery procedure, submitted the telencephalic ablation (Ablation) or not (Sham), and SAL, CPA, DZP or PPG pharmacological treatment. The groups were: Sham-SAL (n=26), Sham-CPA (n=13), Sham-PPG (n=20), Sham-DZP (n=20), Ablation-SAL (n=20), Ablation-CPA (n=17), Ablation-PPG (n=20) and Ablation-DZP (n=20).

### 2.4. Test procedures

A rectangular aquarium divided into two compartments was used. Each compartment was 15 cm high, 15 cm wide and 25 cm long. One compartment was black and the other white, separated by a central sliding door.

The experiment was performed in 3 consecutive days. On the first day, the animals were placed in the aquarium for 10 min. for habituation. On the second and third days (training days), the fish were injected with SAL, CPA, DZP or PPG 20 minutes before training. The animals were placed individually in the white compartment and after 20 seconds the door was opened. When the fish crossed to the black compartment a 45-gram weight was dropped in front of them ( $T_1$ ). Thereafter, the animals crossed back or were immediately placed in the start compartment again and the procedure was repeated two more times ( $T_2$  and

T<sub>3</sub>). A crossing was defined as the moment when the dorsal fin entered the black compartment. The animal that did not cross to the black compartment in five minutes in the first trial, of the first training day, was excluded of experiment. All experiments were videotaped.

The white compartment was chosen as the starting one because a previous experiment indicated that goldfish present a natural preference for dark environments (Santangelo and Mattioli, 1999).

The animals' locomotor activity in the first trial on the first training day was recorded in order to verify if any of the drugs induced activity change. For this purpose, the white compartment was divided in three equal parts, and the number of crossings between them was counted. The number of crossings divided by the time spent in the white compartment during first trial, on the first training day, was calculated for all groups and considered for locomotor activity evaluation.

### 2.5. Statistical Analysis

The latency data were transformed into  $\log_{10}$  for homogenization. Thereafter, one-way ANOVA was performed separately for each group followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparisons test. Two way ANOVA was performed to analyse locomotor activity.

The value of  $\alpha < 0.05$  was established as the significance level.

## 3. Results

Figure 1 shows the means and standard error of the means (+SEM) of latencies for training in the Sham groups. The Saline group presented a difference between the training sessions (ANOVA  $F = 4.37$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p = 0.001$  and SNK  $p < 0.05$ ). The groups treated with CPA, PPG or DZP did not show any differences between the training sessions (ANOVA:  $F = 1.40$   $d.f. = 5$ ,  $p = 0.23$ ;  $F = 0.55$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p = 0.73$  and,  $F = 1.75$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p = 0.12$  respectively).

Figure 2 shows the means and standard error of the means (+SEM) of latencies for training in the Ablation groups. The saline-treated group showed a difference between the training sessions (ANOVA  $F = 4.17$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p = 0.0018$  and SNK  $p < 0.05$ ). The groups treated with CPA, PPG or DZP did not show any differences between the training phases (ANOVA:  $F = 1.24$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p = 0.29$ ;  $F = 1.94$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p = 0.09$  and  $F = 1.25$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p = 0.28$  respectively).



These results suggest that the treatment with CPA, PPG or DZP impaired the acquisition of inhibitory avoidance conditioning in the animals regardless of telencephalic ablation.

The analysis of the locomotor activity showed that the different pharmacological treatments did not interfere in locomotion. However, ablation did (two-way ANOVA:  $F=32.34$ ,  $d.f.=1$ ,  $p<0.0001$ ). Figure 3 shows the means and standard error of the means (+SEM) of locomotor activity in the sham groups (ANOVA:  $F=1.2$ ,  $d.f.=3$ ,  $p=0.29$ ). Figure 4 shows the means and standard error of the means (+SEM) of locomotor activity in the ablation groups (ANOVA:  $F=0.006$ ,  $d.f.=3$ ,  $p=0.99$ ).

#### 4. Discussion

Both the ablated animals and the sham-lesioned ones were able to learn the inhibitory avoidance task when given saline, suggesting that telencephalon ablation does not disrupt the animal's capacity to learn such task. Albeit activity drops after telencephalic ablation.

Huston et al. (1986) reported that rats devoid of telencephalon were capable to learn the inhibitory avoidance of up-hill response task. On the other hand, the complete ablation of the telencephalon impaired avoidance learning in goldfish in other studies (Flood et al., 1976; Flood and Overmier, 1981; Overmier and Hollis, 1990; Overmier and Starkman, 1974).

Telencephalic ablation caused a decrease in spontaneous activity in previous studies (Hale 1956; Janzen, 1933) as well as in ours. In our study, the animals submitted to the telencephalic ablation presented a decreased locomotor activity, that lead to higher latencies values. Therefore, task acquisition in the sham and ablation groups were analyzed separately.

In our study, learning is inferred through an increase in latencies; therefore, less active fish could bias the result. Since no difference in locomotor activity was found between the drug treatments, learning of the inhibitory avoidance task was not due to a change in locomotor activity.

The behavior of the animals treated with PPG and CPA showed similar effects to that in the groups treated with DZP, a classic anxiolytic drug, suggesting a probable anxiolytic-like effect of these drugs. In our study, DZP as well as PPG and CPA impaired the acquisition of inhibitory avoidance in animals submitted or not to telencephalic ablation.

Previous studies suggested an anxiolytic-like effect of PPG. In 1998, Lin et al. reported anxiolytic-like effects of PPG in elevated plus-maze in rats. Lourenço da Silva and

Elisabetsky (2001) demonstrated the interference of PPG in the hole-board test with a 30% concentration of PPG in rats.

Involvement of the histaminergic system in the animals' anxiety-like state has not yet been clarified. Oishi et al. (1986) reported that DZP decreased the turnover rate of central HA neurons system in mice, indicating the contribution of the brain HA neuron system to anxiety. Malberg-Aiello et al. (2002) showed that substances able to enhance histaminergic transmission reduced the time spent in the lighted compartment, indicating a probable anxiogenic-like effect.

A physiological study reported that a destruction of the rat tuberomammillary rostroventral E-2 subregion, from which the histaminergic neuron fibers rise, can induce anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze test, these effects being linked to a lesion-induced reduction in histaminergic activity (Frish et al., 1998). In an acute stress situation, an increased histamine level in the rat hypothalamus was reported (Mazurkiewicz-Kwileck and Tau, 1978) and likewise in the diencephalon, nucleus accumbens and striatum (Ito et al., 1999, Ito, 2000).

Ito et al. (1999) suggested that the increased HA level in the diencephalon after acute stress may represent increased HA synthesis. Since the diencephalon is the main HA synthesizing site in the brain, it may be carried through axons to the nucleus accumbens and striatum, and is metabolized mainly at these sites after acute restraining stress.

In fish, the relation between the histaminergic system and anxiety already has been suggested in previous behavioral studies (Coelho et al., 2001; Mattioli et al., 1998; Medalha et al., 2000, Peitsaro et al., 2003). Recently, Medalha et al. (2003), in a study performed with goldfish using the high performance liquid chromatography (HPLC) method, suggested an anxiolytic-like effect for CPA. In this study CPA had no effect on monoamines or on metabolite levels in the telencephalon, but results for the diencephalon indicated that the CPA-treated group had lower 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) levels than the saline groups, suggesting that CPA may have an anxiolytic-like effect since serotonin is involved in anxiety processes (Graeff, 2002). It is noteworthy that these neurochemical results were found in the diencephalic area, which, according to Ekström et al. (1995), is the origin of the histaminergic system in fish.

## **5. Conclusion**

Telencephalic ablation does not disrupt animal's capacity to learn the inhibitory avoidance task, and, based on fact that CPA showed similar effects to those of DZP in the animals submitted or not to telencephalic ablation, we suggest that CPA presents an anxiolytic-like effect mediated by the diencephalon in goldfish.

#### *Acknowledgements*

This work was supported by grants from CAPES. We thank Prof. Dr. Fabio Gonçalves Pinto for supplying diazepam and Ms Tereza Fatori for technical assistance.

Tabela 1: Valores de latências (segundos) dos animais submetidos á lesão fictícia (sham) e tratados com salina 20 minutos antes da primeira tentativa nos dois dias de treino (grupo S-Salina).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>
<b>1</b>	20	1	2	1	4	2
<b>2</b>	3	9	14	1	3	10
<b>3</b>	12	48	2	1	1	12
<b>4</b>	47	2	169	2	7	11
<b>5</b>	15	1	2	9	9	12
<b>6</b>	2	3	18	49	2	111
<b>7</b>	10	11	39	174	61	32
<b>8</b>	1	103	201	41	8	102
<b>9</b>	1	9	5	8	9	22
<b>10</b>	23	300	165	77	261	300
<b>11</b>	20	4	77	26	73	81
<b>12</b>	9	151	252	18	32	229
<b>13</b>	2	1	3	7	4	4
<b>14</b>	50	69	60	4	7	8
<b>15</b>	1	3	1	142	4	76
<b>16</b>	1	2	8	8	6	6
<b>17</b>	10	9	111	1	6	1
<b>18</b>	14	7	9	5	5	6
<b>19</b>	59	5	300	148	300	300
<b>20</b>	2	183	1	8	1	3
<b>21</b>	7	139	48	18	54	49
<b>22</b>	140	141	144	300	284	300
<b>23</b>	6	276	300	61	145	200
<b>24</b>	4	14	74	2	5	12
<b>25</b>	10	14	8	9	6	3
<b>26</b>	3	300	300	8	1	1
<b>MÉDIA</b>	<b>18,15</b>	<b>69,42</b>	<b>88,96</b>	<b>43,38</b>	<b>49,92</b>	<b>72,81</b>
<b>EPM</b>	<b>5,77</b>	<b>19,41</b>	<b>20,63</b>	<b>14,09</b>	<b>17,91</b>	<b>20,17</b>

Tabela 2: valores de latências (segundos) dos animais submetidos á lesão fictícia (sham) e tratados com propilenoglicol 40% (PPG) 20 minutos antes da primeira tentativa nos dois dias de treino (grupo S-PPG).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>
<b>1</b>	4	67	8	8	19	1
<b>2</b>	6	123	10	9	3	18
<b>3</b>	10	56	39	4	5	27
<b>4</b>	41	12	230	22	300	5
<b>5</b>	13	80	20	300	300	300
<b>6</b>	3	6	3	6	12	17
<b>7</b>	7	3	4	2	3	2
<b>8</b>	24	57	27	86	4	91
<b>9</b>	2	23	148	1	7	2
<b>10</b>	22	138	194	44	2	1
<b>11</b>	1	4	300	2	69	228
<b>12</b>	2	1	1	2	1	2
<b>13</b>	15	64	7	2	2	5
<b>14</b>	86	197	10	300	4	1
<b>15</b>	10	3	7	4	2	23
<b>16</b>	15	19	14	12	10	2
<b>17</b>	17	5	2	30	135	113
<b>18</b>	1	2	9	1	7	2
<b>19</b>	9	11	8	6	1	38
<b>20</b>	183	2	36	255	28	250
<b>MÉDIA</b>	<b>23,55</b>	<b>43,65</b>	<b>53,85</b>	<b>54,80</b>	<b>45,70</b>	<b>56,40</b>
<b>EPM</b>	<b>9,44</b>	<b>12,30</b>	<b>19,81</b>	<b>22,72</b>	<b>20,70</b>	<b>20,86</b>

Tabela 3: valores de latências (segundos) dos animais submetidos á lesão fictícia (sham) e tratados com 1 µg/g de diazepam (DZP) 20 minutos antes da primeira tentativa nos dois dias de treino (grupo S-DZP).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>
<b>1</b>	19	7	8	6	18	7
<b>2</b>	56	1	2	1	8	1
<b>3</b>	3	15	2	12	10	3
<b>4</b>	8	9	22	6	29	6
<b>5</b>	3	4	2	23	103	1
<b>6</b>	14	7	12	7	7	10
<b>7</b>	204	106	34	9	10	5
<b>8</b>	10	5	4	9	5	8
<b>9</b>	44	1	125	10	1	1
<b>10</b>	8	1	300	4	8	7
<b>11</b>	13	6	145	1	2	9
<b>12</b>	1	11	21	5	5	5
<b>13</b>	51	64	52	40	180	5
<b>14</b>	3	23	12	3	5	6
<b>15</b>	3	6	5	14	4	7
<b>16</b>	1	1	4	5	7	11
<b>17</b>	29	300	168	3	46	7
<b>18</b>	2	222	222	73	300	300
<b>19</b>	14	7	12	7	17	12
<b>20</b>	6	3	4	6	4	7
<b>MÉDIA</b>	<b>24,60</b>	<b>39,95</b>	<b>57,80</b>	<b>12,20</b>	<b>38,45</b>	<b>20,90</b>
<b>EPM</b>	<b>10,16</b>	<b>18,06</b>	<b>19,38</b>	<b>3,76</b>	<b>16,82</b>	<b>14,71</b>

Tabela 4: valores de latências (segundos) dos animais submetidos á lesão fictícia (sham) e tratados com 16 µg/g de clorfeniramina (CPA) 20 minutos antes da primeira tentativa nos dois dias de treino (grupo S- CPA).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>
<b>1</b>	8	2	7	99	4	129
<b>2</b>	35	87	1	3	34	47
<b>3</b>	9	4	3	10	43	3
<b>4</b>	4	6	18	74	10	2
<b>5</b>	100	180	201	89	122	178
<b>6</b>	43	300	80	1	52	300
<b>7</b>	1	76	13	1	15	210
<b>8</b>	35	4	2	7	3	8
<b>9</b>	36	6	1	35	7	19
<b>10</b>	1	1	3	1	2	7
<b>11</b>	79	1	3	41	7	70
<b>12</b>	58	10	37	42	148	100
<b>13</b>	4	5	1	1	3	1
<b>MÉDIA</b>	<b>31,77</b>	<b>52,46</b>	<b>28,46</b>	<b>31,08</b>	<b>34,62</b>	<b>82,62</b>
<b>EPM</b>	<b>8,86</b>	<b>25,34</b>	<b>15,65</b>	<b>9,96</b>	<b>13,25</b>	<b>26,71</b>

Tabela 5: Valores de latências (segundos) dos animais submetidos á ablação telencefálica e tratados com salina 20 minutos antes da primeira tentativa nos dois dias de treino (grupo A-Sal).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>
<b>1</b>	7	6	11	4	9	5
<b>2</b>	52	300	300	300	300	300
<b>3</b>	42	6	6	6	300	3
<b>4</b>	8	300	8	153	300	300
<b>5</b>	7	64	71	13	288	300
<b>6</b>	79	300	300	300	300	300
<b>7</b>	45	157	300	300	300	300
<b>8</b>	6	235	300	300	300	300
<b>9</b>	7	7	5	22	13	13
<b>10</b>	10	263	235	158	300	300
<b>11</b>	83	245	300	300	300	300
<b>12</b>	29	39	130	10	53	131
<b>13</b>	9	7	5	3	5	153
<b>14</b>	80	300	1	63	239	140
<b>15</b>	66	161	300	5	53	300
<b>16</b>	157	300	300	300	300	300
<b>17</b>	13	6	5	7	7	30
<b>18</b>	101	7	300	67	300	241
<b>19</b>	71	22	300	212	300	300
<b>20</b>	100	46	4	7	193	4
<b>MÉDIA</b>	<b>48,60</b>	<b>138,55</b>	<b>159,05</b>	<b>126,50</b>	<b>208,00</b>	<b>201,00</b>
<b>EPM</b>	<b>9,52</b>	<b>28,54</b>	<b>31,69</b>	<b>29,14</b>	<b>28,47</b>	<b>28,16</b>



Tabela 6: Valores de latências (segundos) dos animais submetidos á ablação telencefálica e tratados com propilenoglicol 40% (PPG) 20 minutos antes da primeira tentativa nos dois dias de treino (grupo A-PPG).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>
<b>1</b>	115	109	156	291	300	300
<b>2</b>	150	166	300	248	300	130
<b>3</b>	47	300	47	300	300	300
<b>4</b>	52	254	79	82	271	6
<b>5</b>	26	6	300	300	300	300
<b>6</b>	86	235	300	300	212	300
<b>7</b>	236	300	300	129	10	300
<b>8</b>	55	141	13	300	89	74
<b>9</b>	8	1	52	300	300	300
<b>10</b>	10	47	33	43	8	39
<b>11</b>	149	300	300	98	300	300
<b>12</b>	25	18	20	20	300	13
<b>13</b>	221	300	7	300	300	300
<b>14</b>	171	300	113	188	300	300
<b>15</b>	124	100	300	300	300	300
<b>16</b>	19	255	300	300	78	173
<b>17</b>	125	9	67	7	48	10
<b>18</b>	30	38	68	95	214	300
<b>19</b>	3	300	300	3	11	6
<b>20</b>	4	300	300	300	42	300
<b>MÉDIA</b>	<b>82,80</b>	<b>173,95</b>	<b>167,75</b>	<b>195,20</b>	<b>199,15</b>	<b>202,55</b>
<b>EPM</b>	<b>16,52</b>	<b>27,29</b>	<b>28,39</b>	<b>26,84</b>	<b>27,59</b>	<b>28,73</b>

Tabela : Valores de latências (segundos) dos animais submetidos á ablação telencefálica e tratados com 1 µg/g de diazepam (DZP) 20 minutos antes da primeira tentativa nos dois dias de treino (grupo A-DZP).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>
<b>1</b>	25	300	300	300	300	300
<b>2</b>	45	300	300	15	300	300
<b>3</b>	55	49	105	30	300	300
<b>4</b>	114	300	300	300	300	300
<b>5</b>	108	237	300	300	300	300
<b>6</b>	15	7	8	300	84	256
<b>7</b>	161	300	300	300	300	38
<b>8</b>	14	49	300	300	300	300
<b>9</b>	41	142	263	300	300	300
<b>10</b>	107	300	256	300	300	300
<b>11</b>	31	300	300	146	300	8
<b>12</b>	58	92	9	10	15	22
<b>13</b>	122	12	300	17	111	5
<b>14</b>	131	2	8	10	13	94
<b>15</b>	164	107	17	12	300	59
<b>16</b>	4	4	44	300	300	300
<b>17</b>	98	157	155	4	6	71
<b>18</b>	169	1	300	300	21	5
<b>19</b>	5	300	300	300	300	4
<b>20</b>	14	16	8	9	6	8
<b>MÉDIA</b>	<b>74,05</b>	<b>148,75</b>	<b>193,65</b>	<b>177,65</b>	<b>207,80</b>	<b>163,50</b>
<b>EPM</b>	<b>12,75</b>	<b>28,73</b>	<b>29,12</b>	<b>31,71</b>	<b>29,32</b>	<b>30,80</b>

Tabela 8: Valores de latências (segundos) dos animais submetidos á ablação telencefálica e tratados com 16 µg/g de clorfeniramina (CPA) 20 minutos antes da primeira tentativa nos dois dias de treino (grupo A-CPA).

<b>Animais</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>2T1</b>	<b>2T2</b>	<b>2T3</b>
<b>1</b>	73	98	87	15	26	49
<b>2</b>	10	6	17	37	235	116
<b>3</b>	58	300	300	300	300	300
<b>4</b>	195	279	120	48	300	300
<b>5</b>	237	94	300	99	37	300
<b>6</b>	12	300	300	300	300	300
<b>7</b>	155	300	300	166	300	300
<b>8</b>	11	300	161	300	259	6
<b>9</b>	182	272	12	1	15	5
<b>10</b>	12	1	15	300	271	300
<b>11</b>	66	154	300	267	300	300
<b>12</b>	133	300	3	13	300	4
<b>13</b>	197	300	211	300	19	300
<b>14</b>	5	180	5	191	300	300
<b>15</b>	22	31	18	8	44	212
<b>16</b>	9	110	4	3	8	9
<b>17</b>	164	300	300	196	135	115
<b>MÉDIA</b>	<b>90,65</b>	<b>195,59</b>	<b>144,29</b>	<b>149,65</b>	<b>185,24</b>	<b>189,18</b>
<b>EPM</b>	<b>20,04</b>	<b>28,38</b>	<b>32,06</b>	<b>30,74</b>	<b>31,23</b>	<b>31,84</b>

Tabela 9: número de cruzamentos da primeira tentativa do primeiro dia de treino dos grupos S-SAL, S-CPA, S-PPG e S-DZP.

<b>Animais</b>	<b>S-SAL</b>	<b>S-CPA</b>	<b>S-PPG</b>	<b>S-DZP</b>
<b>1</b>	3	3	3	6
<b>2</b>	3	5	3	5
<b>3</b>	3	3	4	1
<b>4</b>	13	1	3	5
<b>5</b>	5	2	5	1
<b>6</b>	3	5	3	5
<b>7</b>	4	1	3	19
<b>8</b>	1	3	11	3
<b>9</b>	3	9	1	4
<b>10</b>	7	1	5	4
<b>11</b>	7	7	3	5
<b>12</b>	3	5	3	3
<b>13</b>	3	5	7	16
<b>14</b>	1		5	2
<b>15</b>	1		5	2
<b>16</b>	1		7	1
<b>17</b>	1		5	5
<b>18</b>	9		2	2
<b>19</b>	3		3	7
<b>20</b>	1		3	4
<b>21</b>	2			
<b>22</b>	5			
<b>23</b>	1			
<b>24</b>	5			
<b>25</b>	3			
<b>26</b>	1			
<b>MÉDIA</b>	<b>3,54</b>	<b>3,85</b>	<b>4,20</b>	<b>5,00</b>
<b>EPM</b>	<b>0,56</b>	<b>0,68</b>	<b>0,50</b>	<b>1,04</b>

Tabela 10: valores de latência (segundos) da primeira tentativa do primeiro dia de treino dos grupos S-SAL, S-CPA, S-PPG e S-DZP.

<b>Animais</b>	<b>S-SAL</b>	<b>S-CPA</b>	<b>S-PPG</b>	<b>S-DZP</b>
<b>1</b>	20	8	4	19
<b>2</b>	3	35	6	56
<b>3</b>	12	9	10	3
<b>4</b>	47	4	41	8
<b>5</b>	15	100	13	3
<b>6</b>	2	43	3	14
<b>7</b>	10	1	7	204
<b>8</b>	1	35	24	10
<b>9</b>	1	36	2	44
<b>10</b>	23	1	22	8
<b>11</b>	20	79	1	13
<b>12</b>	9	58	2	1
<b>13</b>	2	4	15	51
<b>14</b>	50		86	3
<b>15</b>	1		10	3
<b>16</b>	1		15	1
<b>17</b>	10		17	29
<b>18</b>	14		1	2
<b>19</b>	59		9	14
<b>20</b>	2		183	6
<b>21</b>	7			
<b>22</b>	140			
<b>23</b>	6			
<b>24</b>	4			
<b>25</b>	10			
<b>26</b>	3			
<b>MÉDIA</b>	<b>18,15</b>	<b>31,77</b>	<b>23,55</b>	<b>24,60</b>
<b>EPM</b>	<b>3,44</b>	<b>8,86</b>	<b>9,44</b>	<b>10,16</b>

Tabela 11: Atividade locomotora (n° de cruz da 1ª tentativa do 1º dia de treino/latência da 1ª tentativa do 1º dia de treino) dos grupos S-SAL, S-CPA, S-PPG e S-DZP.

<b>Animais</b>	<b>S-SAL</b>	<b>S-CPA</b>	<b>S-PPG</b>	<b>S-DZP</b>
<b>1</b>	0,15	0,38	0,75	0,32
<b>2</b>	1,00	0,14	0,50	0,09
<b>3</b>	0,25	0,33	0,40	0,33
<b>4</b>	0,28	0,25	0,07	0,63
<b>5</b>	0,33	0,02	0,38	0,33
<b>6</b>	1,50	0,12	1,00	0,36
<b>7</b>	0,40	1,00	0,43	0,09
<b>8</b>	1,00	0,09	0,46	0,30
<b>9</b>	3,00	0,25	0,50	0,09
<b>10</b>	0,30	1,00	0,23	0,50
<b>11</b>	0,35	0,09	3,00	0,38
<b>12</b>	0,33	0,09	1,50	3,00
<b>13</b>	1,50	1,25	0,47	0,31
<b>14</b>	0,02		0,06	0,67
<b>15</b>	1,00		0,50	0,67
<b>16</b>	1,00		0,47	1,00
<b>17</b>	0,10		0,29	0,17
<b>18</b>	0,64		2,00	1,00
<b>19</b>	0,05		0,33	0,50
<b>20</b>	0,50		0,02	0,67
<b>21</b>	0,29			
<b>22</b>	0,04			
<b>23</b>	0,17			
<b>24</b>	1,25			
<b>25</b>	0,30			
<b>26</b>	0,33			
<b>MÉDIA</b>	<b>0,62</b>	<b>0,38</b>	<b>0,67</b>	<b>0,57</b>
<b>EPM</b>	<b>0,14</b>	<b>0,12</b>	<b>0,16</b>	<b>0,14</b>

Tabela 12: número de cruzamentos da primeira tentativa do primeiro dia de treino dos grupos A-SAL, A-CPA, A-PPG e A-DZP.

<b>Animais</b>	<b>A-SAL</b>	<b>A-CPA</b>	<b>A-PPG</b>	<b>A-DZP</b>
<b>1</b>	0	1	7	1
<b>2</b>	2	4	8	9
<b>3</b>	2	4	3	8
<b>4</b>	2	4	7	1
<b>5</b>	3	30	9	5
<b>6</b>	5	5	5	4
<b>7</b>	1	4	10	3
<b>8</b>	1	2	5	1
<b>9</b>	5	8	3	8
<b>10</b>	5	5	3	3
<b>11</b>	10	3	4	5
<b>12</b>	5	5	4	9
<b>13</b>	4	14	19	7
<b>14</b>	8	4	25	4
<b>15</b>	8	2	3	14
<b>16</b>	9	5	2	5
<b>17</b>	4	7	7	5
<b>18</b>	8		5	3
<b>19</b>	7		1	3
<b>20</b>	3		5	5
<b>MÉDIA</b>	<b>4,60</b>	<b>6,29</b>	<b>6,75</b>	<b>5,15</b>
<b>EPM</b>	<b>0,65</b>	<b>1,64</b>	<b>1,30</b>	<b>0,73</b>

Tabela 13: valores de latência (segundos) da primeira tentativa do primeiro dia de treino dos grupos A-SAL, A-CPA, A-PPG e A-DZP.

<b>Animais</b>	<b>A-SAL</b>	<b>A-CPA</b>	<b>A-PPG</b>	<b>A-DZP</b>
<b>1</b>	7	73	115	25
<b>2</b>	52	10	150	45
<b>3</b>	42	58	47	55
<b>4</b>	8	195	52	114
<b>5</b>	7	237	26	108
<b>6</b>	79	12	86	15
<b>7</b>	45	155	236	161
<b>8</b>	6	11	55	14
<b>9</b>	7	182	8	41
<b>10</b>	10	12	10	107
<b>11</b>	83	66	149	31
<b>12</b>	29	133	25	58
<b>13</b>	9	197	221	122
<b>14</b>	80	5	171	131
<b>15</b>	66	22	124	164
<b>16</b>	157	9	19	4
<b>17</b>	13	164	125	98
<b>18</b>	101		30	169
<b>19</b>	71		3	5
<b>20</b>	100		4	14
<b>MÉDIA</b>	<b>48,60</b>	<b>90,65</b>	<b>82,80</b>	<b>74,05</b>
<b>EPM</b>	<b>9,52</b>	<b>20,04</b>	<b>16,52</b>	<b>12,75</b>

Tabela 14: Atividade locomotora (n° de cruz da 1ª tentativa do 1º dia de treino/latência da 1ª tentativa do 1º dia de treino) dos grupos A-SAL, A-CPA, A-PPG e A-DZP.

<b>Animais</b>	<b>A-SAL</b>	<b>A-CPA</b>	<b>A-PPG</b>	<b>A-DZP</b>
<b>1</b>	0,00	0,01	0,06	0,04
<b>2</b>	0,04	0,40	0,05	0,20
<b>3</b>	0,05	0,07	0,06	0,15
<b>4</b>	0,25	0,02	0,13	0,01
<b>5</b>	0,43	0,13	0,35	0,05
<b>6</b>	0,06	0,42	0,06	0,27
<b>7</b>	0,02	0,03	0,04	0,02
<b>8</b>	0,17	0,18	0,09	0,07
<b>9</b>	0,71	0,04	0,38	0,20
<b>10</b>	0,50	0,42	0,30	0,03
<b>11</b>	0,12	0,05	0,03	0,16
<b>12</b>	0,17	0,04	0,16	0,16
<b>13</b>	0,44	0,07	0,09	0,06
<b>14</b>	0,10	0,80	0,15	0,03
<b>15</b>	0,12	0,09	0,02	0,09
<b>16</b>	0,06	0,56	0,11	1,25
<b>17</b>	0,31	0,04	0,06	0,05
<b>18</b>	0,08		0,17	0,02
<b>19</b>	0,10		0,33	0,60
<b>20</b>	0,03		1,25	0,36
<b>MÉDIA</b>	<b>0,19</b>	<b>0,20</b>	<b>0,19</b>	<b>0,19</b>
<b>EPM</b>	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>

## ANEXOS - Estudo III

Tabela 1: valores de latência para entrada na área de alimentação (segundos) dos animais submetidos à lesão fictícia (grupo Sham).

<b>Dias</b> <b>peixe</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	600	151	135	17	27	12	6	10	11	6
<b>2</b>	600	151	57	10	11	10	9	9	10	14
<b>3</b>	600	600	151	159	75	14	8	20	12	9
<b>4</b>	289	16	17	6	6	8	2	4	3	8
<b>5</b>	385	434	78	16	9	12	20	10	10	8
<b>6</b>	600	87	600	299	262	600	164	86	122	27
<b>7</b>	600	600	600	600	419	600	600	600	43	8
<b>8</b>	374	47	2	1	1	1	2	4	4	3
<b>9</b>	136	35	20	11	17	5	7	8	4	3
<b>10</b>	184	23	14	17	10	8	13	6	7	3
<b>Média</b>	<b>436,80</b>	<b>214,40</b>	<b>167,40</b>	<b>113,60</b>	<b>83,70</b>	<b>127,00</b>	<b>83,10</b>	<b>75,70</b>	<b>22,60</b>	<b>8,90</b>
<b>EPM</b>	<b>59,26</b>	<b>74,99</b>	<b>73,86</b>	<b>62,07</b>	<b>44,86</b>	<b>78,84</b>	<b>59,50</b>	<b>58,77</b>	<b>11,63</b>	<b>2,28</b>

Tabela 2: valores de latência para entrada na área de alimentação (segundos) dos animais submetidos à ablação telencefálica (grupo Ablação)

<b>Dias</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>peixe</b>										
<b>1</b>	600	600	13	600	600	600	600	600	4	167
<b>2</b>	103	200	70	3	28	9	5	2	5	6
<b>3</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
<b>4</b>	159	101	159	66	156	180	34	39	285	258
<b>5</b>	600	600	600	600	13	600	600	600	600	600
<b>6</b>	600	48	25	600	600	506	45	100	92	279
<b>7</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	593	358
<b>8</b>	41	289	213	100	600	168	37	36	535	9
<b>9</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
<b>10</b>	600	8	80	56	600	600	242	600	191	552
<b>11</b>	393	364	2	25	35	9	10	39	2	4
<b>12</b>	33	130	33	22	15	48	13	7	21	6
<b>13</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	557
<b>14</b>	600	600	600	600	600	198	551	143	37	9
<b>Média</b>	<b>437,79</b>	<b>381,43</b>	<b>299,64</b>	<b>362,29</b>	<b>403,36</b>	<b>379,86</b>	<b>324,07</b>	<b>326,14</b>	<b>297,50</b>	<b>286,07</b>
<b>EPM</b>	<b>64,19</b>	<b>64,99</b>	<b>73,64</b>	<b>76,36</b>	<b>73,72</b>	<b>68,67</b>	<b>76,20</b>	<b>76,52</b>	<b>72,88</b>	<b>68,34</b>

Tabela 3: valores de latência para entrada na área de alimentação (segundos) dos animais submetidos à ablação telencefálica e tratados com salina, 10 minutos após a recolocação da divisória que delimitava a área de alimentação (grupo Ablação- SAL).

<b>Dias peixe</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	600	600	343	229	70	9	5	7	5	8
<b>2</b>	43	564	600	249	600	5	338	137	12	49
<b>3</b>	600	600	600	600	39	600	600	53	255	272
<b>4</b>	600	600	582	337	36	35	35	65	20	77
<b>5</b>	600	600	600	600	600	186	600	600	600	600
<b>6</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
<b>7</b>	600	350	390	330	330	470	20	70	20	40
<b>8</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	105
<b>9</b>	600	600	600	315	560	40	12	20	19	6
<b>10</b>	600	600	120	226	460	34	10	12	6	3
<b>11</b>	527	112	126	247	245	132	132	27	19	40
<b>12</b>	600	40	43	128	188	63	68	154	83	10
<b>Média</b>	<b>547,50</b>	<b>488,83</b>	<b>433,67</b>	<b>371,75</b>	<b>360,67</b>	<b>231,17</b>	<b>251,67</b>	<b>195,42</b>	<b>186,58</b>	<b>150,83</b>
<b>EPM</b>	<b>46,26</b>	<b>59,50</b>	<b>64,18</b>	<b>51,21</b>	<b>68,33</b>	<b>73,84</b>	<b>78,73</b>	<b>71,64</b>	<b>74,66</b>	<b>64,18</b>



Tabela 4: valores de latência para entrada na área de alimentação (segundos) dos animais submetidos à ablação telencefálica e tratados com 16 µg/g de clorfeniramina (CPA), 10 minutos após a recolocação da divisória que delimitava a área de alimentação (grupo Abla-CPA).

Dias peixe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>1</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	380	600
<b>2</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
<b>3</b>	600	49	600	545	600	600	600	507	111	252
<b>4</b>	600	600	220	240	600	600	600	600	600	600
<b>5</b>	292	220	207	153	240	136	4	179	6	11
<b>6</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
<b>7</b>	600	600	100	50	600	600	600	600	600	600
<b>8</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
<b>9</b>	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
<b>10</b>	117	138	130	40	16	24	9	26	21	18
<b>11</b>	266	437	37	440	185	249	600	45	600	600
<b>MÉDIA</b>	<b>497,73</b>	<b>458,55</b>	<b>390,36</b>	<b>406,18</b>	<b>476,45</b>	<b>473,55</b>	<b>492,09</b>	<b>450,64</b>	<b>428,91</b>	<b>461,91</b>
<b>EPM</b>	<b>54,33</b>	<b>65,22</b>	<b>74,06</b>	<b>71,41</b>	<b>65,71</b>	<b>67,04</b>	<b>72,39</b>	<b>72,49</b>	<b>77,08</b>	<b>73,67</b>

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)