

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia
Laboratório de Neurociências

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO CEREBELAR NA
APRENDIZAGEM MOTORA E MEMÓRIA EMOCIONAL DE
CAMUNDONGOS**

BRUNA SILVA MARQUES

São Carlos - SP

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia
Laboratório de Neurociências

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO CEREBELAR NA
APRENDIZAGEM MOTORA E MEMÓRIA EMOCIONAL DE
CAMUNDONGOS**

BRUNA SILVA MARQUES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Fisioterapia. Área: Neuroplasticidade.

Orientador(a): Rosana Mattioli

Co-orientador(a): Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço.

São Carlos – SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Bruna Silva Marques, realizada em 28/08/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço (UFSCar)

Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo (UFSCar)

Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza (UFMS)

Prof. Dr. Gustavo Christofolletti (UFMS)

Profa. Dra. Flavia Roberta Faganello Navega (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Rosana Mattioli, não apenas pela orientação durante o mestrado e doutorado, mas pela paciência, dedicação e grande amizade;

Aos professores da banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura e avaliação deste trabalho;

Aos professores Patrizio Blandina e Beatrice Passani, por me proporcionarem uma rica experiência em seu laboratório NEUROFARBA da Università degli Studi di Firenze por um ano;

Às amigas formadas durante o estágio em Florença/Itália, Gustavo Provensi, Barbara Rani, Carmen Coal, Adelaide Zaita e Gerardo Scognamiglio;

Aos professores doutores Anna Carolyn L. Gianlorenço, Thiago Luiz Russo, Kelly Regina Serafim e Keico Okino Nonaka que participaram do exame de qualificação, pela leitura crítica e sugestões que muito contribuíram para aprimorar este trabalho;

Em especial à Profa Dra Anna Carolyn L. Gianlorenço, pela co-orientação deste trabalho;

Aos meus pais Irene Silva Marques e José Luiz Marques, pelo apoio incondicional ao meu sonho de seguir carreira acadêmica;

À minha irmã Natália Silva Marques, minha melhor amiga e confidente de todas as alegrias e dificuldades enfrentadas nestes quatro anos;

Ao meu melhor amigo Sanmy Rocha Nóbrega, por estar comigo em todas as fases de minha vida acadêmica, compartilhando as vitórias e percalços da pós graduação;

Aos amigos do laboratório de Neurociências Evelyn Guilherme, Kelly Serafim, Fernanda Daher, Carlos Eduardo Fernandes e Lucas Canto de Souza;

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos;

Aos auxílios fornecidos pela CAPES (processo nº302011/2018-8) e PROEX (processo nº 0487) durante esse período;

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, processos nº 2014/24774-8 e 2016/00557-3, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho, e pela Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior - BEPE (processo nº 2018/08099-0) fornecida no período de 01/09/2018 à 25/08/2019.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Sistema Histaminérgico Neuronal	1
1.2. Sistema Histaminérgico Cerebelar	6
2. Contextualização	10
3. Objetivos	11
3.1. Geral	11
3.2. Específicos	11
4. Materiais e Métodos	12
4.1. Aspectos Éticos e Local da Pesquisa	12
4.2. Amostra	12
4.3. Tratamento Farmacológico	12
4.4. Cirurgia e Microinjeção	13
4.5. Equipamentos e Procedimentos	14
4.5.1. Rota-rod	14
4.5.2. Trave de Equilíbrio	15
4.5.3. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	17
4.6. Grupos Experimentais	18
4.7. Análise Histológica	20
4.8. Análise Estatística	21
5. Resultados	22
5.1. Experimento I	22
5.2. Experimento II	26
5.3. Experimento III	30
5.4. Experimento IV	34
5.5. Correlação entre desempenho motor e sistema emocional	39
5.5.1. Histamina	39
5.5.2. Clorfeniramina	40
5.5.3. Ranitidina	41
5.6. Resumo dos Resultados	42
5.7. Acertos no sítio de injeção da cânula, confirmados pela histologia	43
5.8. Perda Amostral	44
6. Discussão	45

6.1. O sistema histaminérgico neuronal pode mediar o aprendizado e controle motor em camundongos através do vérmis cerebelar	45
6.2. A histamina facilita o desempenho motor de camundongos através de receptores H ₁ e H ₂ no vérmis cerebelar	47
6.3. A manipulação do sistema histaminérgico pode influenciar o sistema dopaminérgico.....	48
6.4. O bloqueio do autoreceptor H ₃ pela tioperamida pode modular processos motores e cognitivos via receptores H ₁ e H ₂ ou via excitação de outros neurotransmissores	49
6.5. Efeito de antagonistas histaminérgicos na ansiedade em camundongos.....	52
7. Conclusão	54
8. Referências Bibliográficas	55
Anexos.....	69
8.1. Anexo I – Certificado de aprovação no CEUA/UFSCar	69
8.2. Anexo II – Dados Complementares (LCE).....	70
8.3. Anexo III – Dados Complementares: correlações entre desempenho motor e ansiedade	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1a – Representação esquemática do sistema histaminérgico no encéfalo humano.....	1
Figura 1b - Representação esquemática das projeções histaminérgicas do cérebro de roedores envolvidas na cognição.....	2
Figura 2 – Representação esquemática da síntese e metabolização da histamina.....	3
Figura 3 – Camundongo posicionado no aparelho estereotáxico para a implantação da cânula.....	14
Figura 4 – Animal sendo testado para controle e aprendizagem motora através do rota-rod.....	15
Figura 5 – Animal sendo testado para coordenação motora e equilíbrio motora através da trave de equilíbrio.....	16
Figura 6 – Representação esquemática do protocolo experimental para os testes de desempenho motor e aprendizagem motora.....	17
Figura 7 – Representação esquemática dos locais das microinjeções dentro do cerebelo dos camundongos de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (2001).....	21
Figura 8a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e histamina no teste de rota-rod.....	23
Figura 8b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e histamina no teste de Rota-rod por estágio.....	23
Figura 9a: Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e histamina no teste de trave de equilíbrio.....	24
Figura 9b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e histamina no teste de trave de equilíbrio por estágio.....	25

Figura 10 –Média de entrada nos braços abertos (EBA), tempo nos braços abertos (TBA), Porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) no LCE para o grupo Histamina.....	25
Figura 11a –Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e CPA no teste de rota-rod.....	27
Figura 11b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e CPA no teste de rota-rod por estágio.....	27
Figura 12a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e CPA no teste de trave de equilíbrio.....	28
Figura 12b –Média e erro padrão da média para os grupos controle e CPA no teste de trave de equilíbrio por estágio.....	29
Figura 13 –Média de entrada nos braços abertos (EBA), tempo nos braços abertos (TBA), Porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) no LCE para o grupo CPA.....	29
Figura 14a –Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e RA no rota-rod.....	31
Figura 14b –Média e erro padrão da média para os grupos controle e RA no teste de rota-rod por estágio.....	31
Figura 15a –Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e RA na trave de equilíbrio.....	32
Figura 15b –Média e erro padrão da média para os grupos controle e RA no teste de trave de equilíbrio por estágio.....	33
Figura 16 –Média de entrada nos braços abertos (EBA), tempo nos braços abertos (TBA), Porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) no LCE para o grupo RA.....	34

Figura 17a –Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e TIO no rota-rod.....	35
Figura 17b –Média e erro padrão da média para os grupos controle e TIO no teste de rota-rod por estágio.....	35
Figura 18a –Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e TIO na trave de equilíbrio.....	36
Figura 18b –Média e erro padrão da média para os grupos controle e TIO no teste da trave de equilíbrio por estágio.....	37
Figura 19 –Média de entrada nos braços abertos (EBA), tempo nos braços abertos (TBA), Porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) no LCE para o grupo TIO.....	38
Figura 20 – Resultados expressos em histograma para a correlação entre o desempenho motor de camundongos, que receberam histamina, submetidos ao rota-rod e os dados comportamentais de %EBA e %TBA do LCE.....	39
Figura 21 – Resultados expressos em histograma para a correlação entre o desempenho motor de camundongos, que receberam CPA, submetidos ao rota-rod e os dados comportamentais de %EBA e %TBA do LCE.....	40
Figura 22 – Resultados expressos em histograma para a correlação entre o desempenho motor de camundongos, que receberam RA, submetidos ao rota-rod e os dados comportamentais de %EBA e %TBA do LCE.....	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais: Experimento I.....	18
Tabela 2 – Grupos experimentais: Experimento II.....	19
Tabela 3 – Grupos experimentais: Experimento III.....	19
Tabela 4 – Grupos experimentais: Experimento IV.....	19
Tabela 5 – Resumo dos Resultados Motores.....	42
Tabela 6 – Resumo dos Resultados Não-Motores.....	42
Tabela 7 – Correlação entre os estágios de treino motor e avaliação de ansiedade pelo coeficiente de Pearson (Grupo Histamina).....	67
Tabela 8 – Correlação entre os estágios de treino motor e avaliação de ansiedade pelo coeficiente de Pearson (Grupo CPA).....	68
Tabela 9 – Correlação entre os estágios de treino motor e avaliação de ansiedade pelo coeficiente de Pearson (Grupo RA).....	69

ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervoso Central
NTM	Núcleos tuberomamilaes
PFC	Córtex pé-frontal
SI	Substantiainnominata
Str	Estriado
Ami	Amígdala
Hip	Hipocampo
ME	Medula espinhal
CER	Cerebelo
HDC	Histidina-descarboxilase
GPCRs	<i>G protein-coupled receptors</i>
IP3	Inositol trifosfato
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína cinase C
NMDA	N-metil D-Aspartato
Ca⁺²	Cálcio
Na⁺	Sódio
K⁺	Potássio
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPC

GABA	Ácido gama-aminobutírico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
LTP	Potenciação de longa duração
LTD	Depressão de longa duração
HA	Histamina
CPA	Clorfeniramina
RA	Ranitidina
TIO	Tioperamida
SAL	Salina
BA	Braço Aberto
BF	Braço Fechado
EBA	Entradas nos braços abertos
%EBA	Porcentagem de tempo nos braços abertos
TBA	Tempo nos braços abertos
%TBA	Porcentagem de tempo nos braços abertos
EBF	Entradas nos braços fechados
TBF	Tempo nos braços fechados
TC	Tempo no Centro
DA	Dopamina
ML-DA	Sistema mesolímbico dopaminérgico

RESUMO

O sistema histaminérgico neural inerva o cerebelo, com alta densidade de fibras no vérmis e flóculo. Evidências experimentais indicam que o cerebelo está envolvido em várias operações motoras e não-motoras, no entanto, o papel do sistema histaminérgico nessas funções ainda não é claro. Neste estudo, investigamos os efeitos das injeções intracerebelares de histamina e injeções de antagonistas dos receptores H₁, H₂ e H₃ (clorfeniramina, ranitidina e tioperamida, respectivamente) no desempenho motor, aprendizado, equilíbrio e ansiedade em camundongos. Para isso, foram utilizados camundongos albinos suíços com peso de 25 a 35g e mantidos em ambiente termorregulado. Uma cânula-guia foi implantada no vérmis cerebelar de camundongos experimentalmente ingênuos. Após três dias de recuperação, os animais receberam microinjeção de salina, histamina, clorfeniramina, ranitidina ou tioperamida em diferentes concentrações. Cinco minutos após a microinjeção, o teste de rota-rod e trave de equilíbrio foi realizado em três etapas. Após avaliação do desempenho motor e do equilíbrio, os animais foram submetidos a labirinto em cruz elevado. A análise estatística incluiu o teste de homogeneidade e a análise de variância multifatorial (ANOVA), seguida pelo teste de Amplitudes Múltiplas de Duncan e pelo teste de Pearson para correlação entre as funções motoras e não motoras. Foi adotado um valor de $p \leq 0,05$ para significância. Os resultados mostraram uma possível facilitação da histamina na dose mais alta na avaliação do aprendizado e desempenho motor no rota-rod. Além disso, os resultados mostraram comprometimento quando testados na dose 0,052 de CPA, nas doses mais baixas de ranitidina e também na dose mais alta de tioperamida. Não encontramos correlação entre habilidades motoras e ansiedade neste estudo. Juntos, os resultados sugerem que as projeções histaminérgicas cerebelares estão envolvidas no aprendizado motor e desempenham um papel modulador no circuito cerebelar, para garantir que os movimentos sejam realizados com eficiência. Além disso, discutimos como a manipulação do sistema histaminérgico pode influenciar outros sistemas.

Palavras-chave: sistema histaminérgico, clorfeniramina, ranitidina, tioperamida, aprendizado, desempenho motor.

ABSTRACT

The neural histaminergic system innervates the cerebellum, with high density of fibers in the vermis and flocculus. Experimental evidence indicates that cerebellum is involved in various non-motor as well as motor operations. However, the role of histaminergic system in these functions is not clear. In this present study, we investigated the effects of intracerebellar histamine injections and H₁, H₂ and H₃ receptor antagonist injections (chlorpheniramine, ranitidine and thioperamide, respectively) on motor performance, motor learning, balance and anxiety in mice. For this, we used Swiss albino mice weighing 25-35g and maintained in a thermoregulated environment. The cerebellar vermis of male mice was implanted with guide cannula. After three days of recovery, the animals received microinjections of saline, histamine, chlorpheniramine, ranitidine or thioperamide in different concentrations. Five minutes postinjection, the rota-rod and balance beam test was performed in three stages. After evaluation of motor performance and balance, animals were submitted to elevated plus maze. Statistical analysis included the homogeneity test and multi-factor analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's Multiple Range test and Pearson test for correlation between motor and non-motor functions. A p value of ≤ 0.05 was required for significance. The results showed a possible facilitation of histamine at the highest dose in the evaluation of learning and motor performance in the rota-rod. In addition, the results showed an impairment when tested at the 0.052 dose of CPA, at the lowest doses of ranitidine and also at highest dose of thioperamide. We do not found any correlation between motor skills and anxiety in this study. Together, the results suggest that cerebellar histaminergic projections are involved in motor learning and make a modulating role in the cerebellar circuit to ensure that movements are performed efficiently. Furthermore, the manipulation of the histaminergic system can influence other systems.

Keywords: histaminergic system, chlorpheniramine, ranitidine, thioperamide, learning, motor performance.

1. Introdução

1.1. Sistema Histaminérgico Neuronal

A histamina é uma amina biogênica e um neuromodulador do Sistema Nervoso Central (SNC), importante na regulação de diversos processos fisiológicos, como o ciclo circadiano e de sono, da temperatura corporal, motivação, memória e cognição (Haas, Sergeeva e Selbach, 2008). Em condições fisiológicas em animais vertebrados, a histamina neuronal é originada primariamente nos núcleos tuberomamilares (NTM) da região posterior do hipotálamo (Panula *et al.*, 1984; Takeda *et al.*, 1984) e suas fibras projetam-se para todo o SNC (Inagaki *et al.*, 1988; Panula *et al.*, 1989) (Fig. 1a). Os mastócitos são outra fonte de histamina no cérebro de algumas espécies. Em aves, mastócitos imaturos se infiltram no SNC e sofrem diferenciação *in situ* dentro da substância branca subcortical (Zhuang *et al.*, 1999) e migrações maciças de mastócitos no cérebro foram associados ao comportamento de cortejo em pombos (Silverman *et al.*, 1994). Outras fontes possíveis de histamina no cérebro pode incluir microglia e células endoteliais microvasculares (Katoh *et al.*, 2001; Yamakami *et al.*, 2000). O sistema neural histaminérgico dos roedores (Fig 1b) é similar ao sistema encontrado no cérebro humano (Panula *et al.*, 1984).

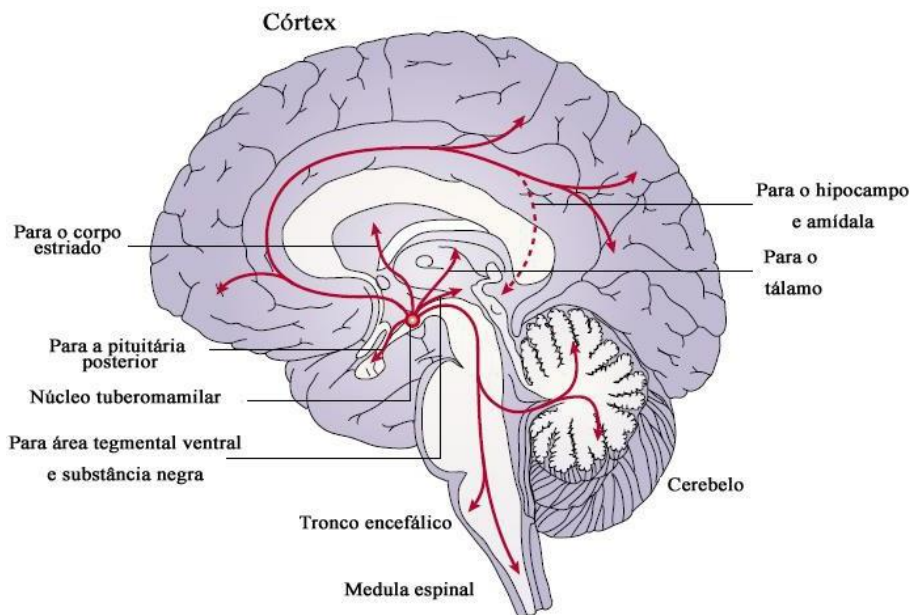


Figura 1a – Representação esquemática do sistema histaminérgico no encéfalo humano. As fibras histaminérgicas originam-se no núcleo tuberomamilar e projetam-se para todo o sistema nervoso central. Modificado de Haas e Panula (2003).

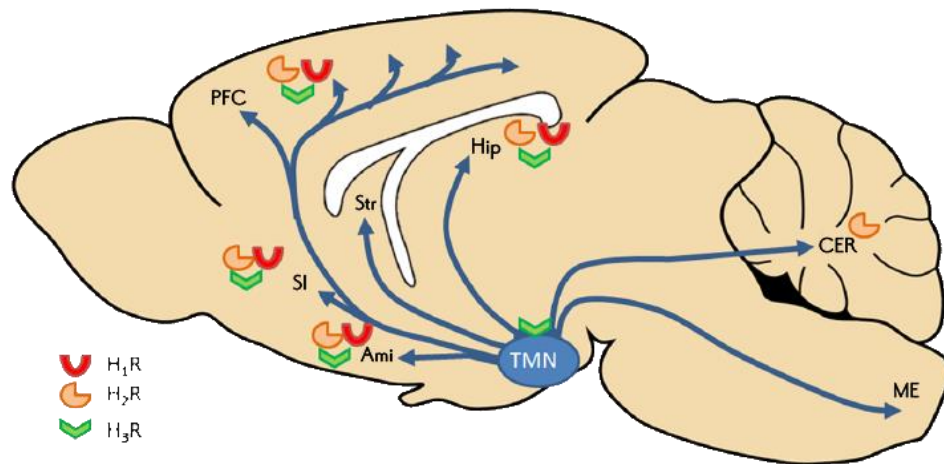


Figura 1b - Representação esquemática das projeções histaminérgicas do cérebro de roedores envolvidas na cognição. Os corpos celulares produtores de histamina originam-se no nucleotúberomamilar (TMN) e as fibras histaminérgicas projetam-se para várias regiões do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal (PFC), a *substantia innominata* (SI), o estriado (Str), a amígdala (Ami), o hipocampo (Hip), a medula espinhal (ME) e o cerebelo (CER). Os efeitos da histamina no cérebro são mediados por quatro receptores (H₁ a H₄) com distribuição diferente no cérebro. Modificado de Passani *et al.* (2020).

Sintetizada a partir da descarboxilação oxidativa do aminoácido histidina, através da enzima histidina-decarboxilase (HDC) (Fig. 2), a molécula de histamina é armazenada em vesículas sinápticas e liberada na fenda sináptica de maneira cálcio-dependente. No meio extracelular, esse neurotransmissor é metabolizado em tele-metilhistamina pela enzima histamina metiltransferase. A tele-metilhistamina é degradada pela ação da monoamina oxidase em ácido t-metil-imidazolacético (Haas e Panula, 2003; Haas, Sergeeva e Selbach, 2008).

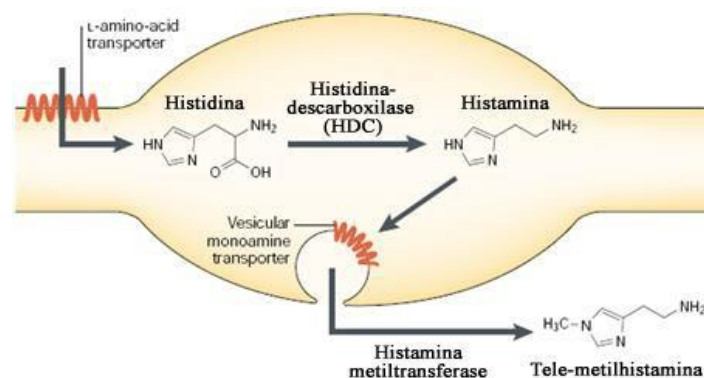


Figura 2—Representação esquemática da síntese e metabolização da histamina. Modificado de Haas e Panula (2003).

A atuação da histamina no SNC se dá pela estimulação de quatro classes de receptores: H_1 , H_2 , H_3 e H_4 , todos designados por receptores acoplados à proteína G (GPCRs, do inglês *G protein-coupled receptors*). Cada receptor é composto por elementos transmembranares que são envolvidos na transferência de sinais extracelulares para o interior da célula. As GPCRs têm uma característica estrutural comum que consiste em sete hélices transmembranares ligadas por três laços extracelulares e três citoplasmáticos (Rai *et al.*, 2009). Os receptores histaminérgicos neuronais diferem farmacologicamente entre si na localização e nas respostas intracelulares mediadas (Jutel, Blaser e Akdis, 2005). Os receptores H_1 e H_2 são pós-sinápticos geralmente excitatórios (Panula *et al.*, 2015), enquanto o subtipo H_3 é um autorreceptor que regula de forma inibitória a síntese e liberação de histamina (Haas, Sergeeva e Selbach, 2008). Os receptores H_4 são expressos primariamente em células envolvidas com o sistema imune e seu papel no SNC ainda é uma questão em debate (Galeotti, Sanna e Ghelardini, 2013). Sanna *et al.* (2017) sugerem que os receptores H_4 modulam várias funções neurofisiológicas, como atividade locomotora, ansiedade, nocicepção e comportamento alimentar.

Receptores H_1 são encontrados em densidade particularmente alta no hipotálamo, na área septal, no núcleo medial da amígdala, cerebelo e em áreas hipocámpais (Brown *et al.*, 2001; Haas *et al.*, 2008). A ativação do receptor H_1 estimula a atividade da fosfolipase C, que hidroliza o composto fosfatidil-4,5-bifosfato gerando dois segundos-mensageiros, o inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). A formação do DAG

estimula a atividade da proteína cinase C (PKC) que facilita a ativação dos receptores glutamatérgicos N-metil D-Aspartato (NMDA). O IP₃ age em receptores do retículo endoplasmático, estimulando a liberação de Ca⁺² no citosol. O aumento de Ca⁺² intracelular, aumenta a atividade do trocador de Na⁺/Ca⁺² e também induz a produção de óxido nítrico. Ainda, a proteína G ativada pelo receptor H₁ é capaz de bloquear a abertura dos canais de K⁺ de dois poros, responsáveis pela hiperpolarização, mantendo o neurônio em estado ativado por um período prolongado. O efeito final após a estimulação deste receptor é a intensa despolarização celular, ou seja, a estimulação neuronal (Brown *et al.*, 2001).

Os receptores H₂ são predominantemente expressos nos gânglios da base, amígdala, hipocampo e nas células granulares e de Purkinje do córtex (Brown *et al.*, 2001). Agonistas H₂ potencializam a transmissão sináptica do hipocampo e aumentam o disparo de muitos tipos de neurônios (Selbach *et al.*, 1997). Em seu artigo de revisão, Brown *et al.* (2001) descrevem que a estimulação dos receptores H₂ também leva à excitação neuronal, porém por mecanismos diferentes daqueles gerados pela estimulação dos receptores H₁. O receptor H₂ se acopla à proteína G para estimular a adenilato ciclase e aumentar as concentrações de AMPc intracelular que, por sua vez, ativa a proteína cinase A (PKA). As subunidades da PKA são translocadas para o núcleo, e estimulam a atividade do fator CREB, culminando em transcrição de proteínas. Este fator é importante regulador da neurofisiologia e da plasticidade neuronal. Além disto, as sub-unidades ativas da PKA bloqueiam a condutância dos canais de K⁺ ativados pelo influxo de Ca⁺², que são os responsáveis pela repolarização e pelo prolongamento da hiperpolarização pós-potencial de ação nestes neurônios. O AMPc produzido também é capaz de modificar a sensibilidade da voltagem dos canais ativados por hiperpolarização e dependente de nucleotídeo cíclico permitindo sua ativação em voltagens menos negativas, o que facilita a despolarização neuronal subsequente.

O receptor H₃, por sua vez, é um autoreceptor pré-sináptico acoplado a proteína G inibitória e sua estimulação leva a inibição da formação do AMPc. O antagonista histaminérgico H₃ foi identificado pela primeira vez no cérebro de ratos (Arrang *et al.*, 1983), sua presença no cérebro humano foi confirmada alguns anos depois (Arrang *et al.*, 1988); e foi clonado com sucesso e expresso funcionalmente por Lovenberg *et al.* (1999),

após o qual houve um grande interesse de grupos acadêmicos e empresas farmacêuticas para desenvolver compostos que poderiam modular terapeuticamente as funções desse receptor. Embora não exista um mecanismo fisiopatológico direto que vincule qualquer condição de doença do SNC à histamina, a localização distinta de H₃ no SNC, somado ao fato de modular a liberação de outros neurotransmissores no cérebro por meio da ação de heterorreceptores em neurônios não histaminérgicos, despertou pesquisadores a avaliar suas ligações em várias doenças cerebrais (Nuutinen e Panula, 2010).

Como autoreceptores, a ativação da proteína G inibitória reduz a atividade dos canais de Ca⁺² de alta voltagem, e conseqüentemente, reduz a fusão das membranas vesiculares e plasmática, prejudicando, dessa forma, a neurotransmissão (Brown *et al.*, 2001). Como heteroreceptores, sua ativação é capaz de inibir a liberação de outros neurotransmissores como glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), noradrenalina, dopamina, acetilcolina, serotonina e vários peptídeos, aparentemente pela inibição dos canais de cálcio pré-sinápticos (Köhler *et al.*, 2011).

Receptores H₃ estão sendo extensivamente investigados por seu potencial como agente terapêutico para déficits cognitivos (Sander *et al.*, Tiligada *et al.*, 2009; Brioniet *al.*, 2011; Leurset *al.*, 2011). Em estudos pré-clínicos, os antagonistas H₃ aumentam a atividade dos neurônios histaminérgicos e foi observada uma melhoria simultânea na cognição e no aprendizado (Passani *et al.*, 2004). As promissoras descobertas pré-clínicas deram um forte impulso para inúmeras empresas farmacêuticas apostarem em estudos clínicos com vários antagonistas H₃ para diversas condições neurológicas (Drahl, 2009).

Os receptores H₄ são expressos principalmente em células de origem hematopoiética, como eosinófilos e mastócitos, tendo função associada a processos inflamatórios e alérgicos (Haas *et al.*, 2008). Estes receptores foram identificados no SNC através da detecção do seu RNAm na amígdala, no cerebelo, no corpo caloso, no córtex pré-frontal e tálamo, tanto em humanos, quanto em ratos. Em ambas as espécies, este receptor encontra-se em alta densidade na medula espinhal e nos gânglios da raiz dorsal, sugerindo uma possível função na mediação da nocicepção (Haas *et al.*, 2008). Seu mecanismo de ação também é através da proteína G, porém causando a mobilização do cálcio intracelular como maior via de sinalização (Thurmond, Gelfand e Dunford, 2008).

Evidências demonstram que todos os quatro subtipos de receptores histaminérgicos existem no cerebelo em diferentes espécies (Li *et al.*, 2014).

1.2. Sistema Histaminérgico Cerebelar

Estudos farmacológicos e genéticos em roedores indicam que, além de suas funções periféricas amplamente conhecidas de mediação à resposta inflamatória, a histamina presente no sistema nervoso central pode ser um potencial sinalizador de perigo, promovendo a ansiedade como resposta (Brown, Stevens e Haas, 2001). A ansiedade e o medo são respostas adaptativas geradas em antecipação ou na presença de estímulos que ameaçam perturbar a integração do organismo. Enquanto o medo é geralmente provocado por um determinado contexto distinguível, a ansiedade pode ocorrer na ausência de situação de perigo (Davis, 2000). Variações extremas ou perturbações dos mecanismos neurais de controle do medo e da ansiedade podem desencadear situações de persistência da ansiedade mesmo após a retirada do estímulo aversivo e levar a problemas psicológicos e de comportamento em seres humanos, tais como o transtorno do pânico, as fobias, e os transtornos de estresse pós-traumático (Cuthbert *et al.*, 2003; Victor e Bernstein, 2009; Weisberg, 2009).

Os primeiros estudos sobre o cerebelo sugeriram que essa estrutura poderia servir como o local de alterações plásticas necessárias para uma ampla gama de fenômenos adaptativos e condicionados, classificados como aprendizagem motora, e ilustraram que a ablação de regiões críticas cerebelares resultou em uma incapacidade de adquirir este tipo de comportamento adaptativo (Bloedel *et al.*, 1991). Segundo revisão de Manto e colaboradores (2012), pesquisas sobre as funções do cerebelo ampliaram durante as últimas décadas. Os autores afirmam que o cerebelo contribui para regulação e planejamento do movimento, organização temporal e aquisição sensorial e está envolvido na previsão das consequências sensoriais da ação, o que explica os déficits clínicos apresentado por pacientes com comprometimentos cerebelares, caracterizados por distúrbios na precisão e coordenação (distúrbios dos movimentos oculares, distúrbios da fala, distúrbios de movimentos dos membros, deficiências de postura e marcha).

Song e colaboradores (2006), utilizando cilindro de equilíbrio (*rota-rod*), observaram que histamina injetada no núcleo interposto cerebelar de ratos promoveu melhora do

desempenho motor, nas habilidades de equilíbrio e coordenação, através da ativação de receptores H₂. Os autores sugerem que as projeções histaminérgicas hipotálamo-cerebelares podem desempenhar um papel modulador no circuito cerebelar para assegurar que movimentos são executados com precisão. Além disso, Quin e colaboradores (2011) demonstraram que a histamina excita neurônios do núcleo denteado do cerebelo via receptores H₂, sugerindo o envolvimento de projeções histaminérgicas para início e planejamento dos movimentos.

Além do papel motor amplamente conhecido do cerebelo, evidências sugerem que distúrbios cerebelares podem também culminar em transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão, ansiedade (Baldaçara *et al.*, 2008). Sacchetti e colaboradores relacionam o vérmis cerebelar e a formação de memórias emocionais (Sacchetti *et al.*, 2002; Sacchetti *et al.*, 2007; Sacchetti *et al.*, 2009). Os autores demonstraram que a inativação do vérmis cerebelar após o pareamento de estímulos causou prejuízo na consolidação da memória (Sacchetti *et al.*, 2007). De acordo com os autores, o vérmis participa da memória emocional independente de seu papel em processos motores ou sensoriais, e poderia representar uma interface entre o estímulo sensorial, o estado emocional do sujeito e as respostas motoras.

Em corroboração com os autores, Gianlorenço *et al.* (2015), em seu estudo sobre a consolidação da memória emocional em camundongos, sugerem que as projeções histaminérgicas do vérmis cerebelar, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo e amígdala estão envolvidas na modulação da consolidação da memória aversiva propondo, desta forma, a inclusão do vérmis cerebelar no circuito.

Estas novas descobertas abrem uma gama de possibilidades em âmbito experimental e clínico, desde reconhecer, diagnosticar e tratar condições, antes desconsideradas, que afetam a qualidade de vida de pacientes portadores de ataxia cerebelar, bem como lidar melhor frente às consequências não-motoras das patologias cerebelares (Jeremy e Schmahmann, 2008). Zhu *et al.* (2006) levantam ainda a importância da compreensão dos mecanismos não somáticos cerebelares para a integração somática-visceral que resulte na explicação da patogênese de diversas disfunções que afetam ambos os sistemas.

Evidências experimentais indicaram também papel cerebelar na aprendizagem aversiva. A capacidade de aprender e reter respostas de condicionamento do medo foi investigada em camundongos mutantes, caracterizados por uma deficiência primária nas sinapses feitas pelas fibras paralelas com as células de Purkinje. Nesses animais, a disfunção cerebelar prejudicou a aprendizagem do medo, sugerindo que essas sinapses estão envolvidas na consolidação da memória aversiva (Sacchetti *et al.*, 2004). Zhu *et al.* (2007) demonstraram que a potenciação de longa duração (LTP) é o mecanismo envolvido nas memórias associativas aversivas no cerebelo, enquanto a depressão de longo prazo (LTD) está correlacionada ao aprendizado motor.

Popa e colaboradores (2014) sugerem que a participação do cerebelo em funções motoras e não motoras está relacionada à sua arquitetura uniforme e a um modo comum de processamento das informações. Nesta revisão, os autores correlacionam resultados eletrofisiológicos dos sinais motores no córtex cerebelar com observações em domínios não motores, e sugerem que o córtex cerebelar tem grande capacidade de estabelecer associações entre diferentes sinais sensoriais, motores e não motores. De acordo com os autores, os resultados de estudos sobre como as células de Purkinje codificam os sinais de movimentos indicam que a circuitaria do córtex cerebelar suporta aprendizagem associativa, sequenciamento, memória de trabalho e modelos internos de domínios não motores.

Nosso grupo mostrou que a histamina no cerebelo modula a consolidação da memória emocional (Gianlorenço, Canto-de-Souza e Matioli, 2011). Os resultados apresentaram comprometimento mediado pelos receptores H₁ nas memórias relacionadas à ansiedade (Gianlorenço *et al.*, 2012), e os receptores H₂ mostraram mediar a consolidação da memória das tarefas de prevenção inibitória (Gianlorenço *et al.*, 2015). No entanto, nenhum estudo investigou o papel do sistema neural histaminérgico na aprendizagem motora de camundongos via vérmis cerebelar. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o controle motor e o aprendizado motor de camundongos no rota-rod e trave de equilíbrio após injeções intracerebrales de compostos histaminérgicos e estabelecer uma possível interação entre sistema motor e emocional nas condições apresentadas. Com base em estudos anteriores e na modulação do sistema histaminérgico no cerebelo em processos não motores, sugerimos que o sistema histaminérgico também

pode modular o controle motor de camundongos e apresentar uma interface entre as funções motoras e não-motoras.

2. Contextualização

Em estudos prévios do nosso laboratório encontramos diferentes efeitos da microinjeção de substâncias histaminérgicas no cerebelo em camundongos testados no LCE e no teste de esQUIVA inibitória. Gianlorenço, Canto-de-Souza e Mattioli (2011) investigaram o efeito da microinjeção de histamina no vérmis cerebelar em camundongos através do Labirinto em Cruz-Elevado, e demonstraram que o sistema histaminérgico e o cerebelo estão envolvidos no processo de consolidação da memória emocional, através de inibição dose-dependente da histamina. Recentemente, com o objetivo de investigar o papel dos receptores H₁ e H₂ na consolidação da memória emocional em camundongos, os resultados demonstraram que o antagonista H₁ clorfeniramina (CPA) não afetou o comportamento dos animais nas doses utilizadas, porém foi capaz de reverter o efeito inibitório da histamina na consolidação da memória emocional em situação de ansiedade no LCE (Gianlorenço *et al.*, 2012). Por outro lado, Gianlorenço, Canto-de-Souza e Mattioli (2013) evidenciaram uma facilitação na consolidação da memória emocional no teste de esQUIVA inibitória envolvendo estímulo aversivo na dose 1,36 nmol, e que o pré-tratamento com o antagonista H₂ ranitidina (RA) foi capaz de prevenir este efeito.

Desta forma, acreditamos que estudos acerca do papel do cerebelo e de seus sistemas de neurotransmissão em funções motoras e não motoras poderão auxiliar no melhor entendimento de sua participação na interface motora/emocional, bem como nos comprometimentos apresentados por indivíduos com lesões cerebelares.

As doses utilizadas neste estudo foram previamente testadas em outros trabalhos do laboratório, utilizando o mesmo sítio de microinjeção, portanto nossa escolha de manter as doses que já funcionaram foi pensada no sentido de haver um comparativo entre os estudos com condições experimentais similares.

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar o desempenho motor e o aprendizado motor de camundongos no rota-rod e trave de equilíbrio após injeções intracerebelares de compostos histaminérgicos e estabelecer uma possível interação entre sistema motor e emocional nas condições apresentadas

3.2. Específicos

- Investigar os efeitos dose-dependentes de histamina, microinjetada no vérmis cerebelar, sobre a ansiedade, o desempenho motor e a aprendizagem motora de camundongos;
- Investigar os efeitos da microinjeção de antagonista do receptor H₁ (clorfeniramina) sobre o desempenho motor e a aprendizagem motora de camundongos;
- Investigar os efeitos da microinjeção de antagonista do receptor H₂ (ranitidina) sobre o desempenho motor e a aprendizagem motora de camundongos;
- Investigar os efeitos da microinjeção de antagonista do receptor H₃ (tioperamina) sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos;
- Verificar a correlação entre o treino motor, a ansiedade e a aprendizagem e memória emocional de camundongos.

4. Materiais e Métodos

4.1. Aspectos Éticos e Local da Pesquisa

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar, protocolo nº 4949260515), apresentada no Anexo I. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia, na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

4.2. Amostra

Foram utilizados 169 camundongos albinos suíços machos experimentalmente ingênuos, pesando entre 25-35 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram agrupados em até 5 animais por caixa (31 × 20 × 13 cm) e mantidos sob um ciclo de luz de 12 horas (com as luzes acesas às 7 horas) em um ambiente controlado a uma temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de $50 \pm 5\%$. Antes do início dos experimentos, os animais foram gentilmente manipulados (tocar e segurar o animal com as mãos) 2 minutos por dia durante 5 dias para habituação com o manuseio do experimentador. Alimento e água estiveram disponíveis, exceto durante as sessões do teste. O experimento foi realizado na fase clara, no período entre 8 e 14 horas para minimizar a influência da variação do ritmo circadiano dada por respostas comportamentais.

4.3. Tratamento Farmacológico

Histamina (HA) nas doses de 0,54 nmol, 1,36 nmol, 2,72 nmol e 4,07 nmol (Gianlorenço *et al.*, 2013), Clorfeniramina (CPA) nas doses de 0,016 nmol, 0,052 nmol e 0,16 nmol (Serafim *et al.*, 2012), Ranitidina (RA) nas doses de 0,57 nmol, 2,85 nmol e 5,7 nmol (Gianlorenço *et al.*, 2014) e Tioperamida (TIO) nas doses 0,06 nmol, 0,3 nmol e 1,5 nmol (Costa-Neto, 2013) foram microinjetadas em volume de 0,1 µl por uma bomba de microinfusão. Os animais dos grupos controles receberam solução salina (SAL). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina estéril (0,9%) e as soluções mantidas em tubos codificados por cores, de modo que o experimentador não teve conhecimento do

conteúdo dos mesmos no momento do experimento e durante a análise das imagens gravadas.

4.4. Cirurgia e Microinjeção

Os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal utilizando uma solução de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), além da administração de anestesia local (3% de lidocaína com norepinefrina 1: 50.000), e posicionados no aparelho estereotáxico Stoelting (Fig. 3). Adicionalmente, foi fornecido ao animal, durante o procedimento, uma combinação de analgésico Cetoprofeno 5mg/kg e antibiótico Ceftriaxona 4mg/kg. Uma cânula guia de 7 mm de aço inoxidável (calibre 25) foi implantada no vérmis cerebelar de acordo com as seguintes coordenadas de Paxinos e Franklin (2001): 6,5 mm posterior ao bregma, 0 mm laterais à linha média e 2,0 mm de medida ventral a partir da superfície do crânio. A cânula guia foi fixada ao crânio comacrílico dental e parafusos de joalheiro. Um mandril (fio de aço inoxidável de calibre 33) foi inserido na cânula guia para reduzir a incidência de oclusão e contaminação. A analgesia pós-operatória foi fornecida durante 3 dias, adicionando acetaminofeno (200 mg/ml) em a água potável numa proporção de 0,2 ml de paracetamol para 250 ml de água (a concentração final foi de 0,16 mg/mL).



Figura 3 - Camundongo posicionado no aparelho estereotáxico para a implantação da cânula.

A solução salina e drogas foram infundidas no vérmis cerebelar utilizando uma agulha de micro-injeção (calibre 33), que se estende 2,0 mm além da ponta da cânula guia. A unidade de microinjeção foi ligada a uma micro-seringa Hamilton de 5 μ l através de um tubo de polietileno (PE-10), e a uma bomba de infusão, programada para administrar um volume de 0,1 μ l ao longo de um período de 60 segundos (Gianlorenço, Canto-de-Souza e Mattioli, 2011). O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução (Canto-de-Souza *et al.*, 2002).

4.5. Equipamentos e Procedimentos

4.5.1. Rota-rod

Foi utilizado o Rota-rod (Insight Equipamentos Científicos, Brasil) para avaliação da coordenação motora e equilíbrio (Fig. 4). O aparelho de Rota-rod automatizado consiste basicamente em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro,

instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do piso do equipamento, mantido em rotação através de um motor. A caixa é dividida em quatro baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de quatro animais simultaneamente. Durante o estudo, os animais foram avaliados segundo protocolo descrito na figura 6.

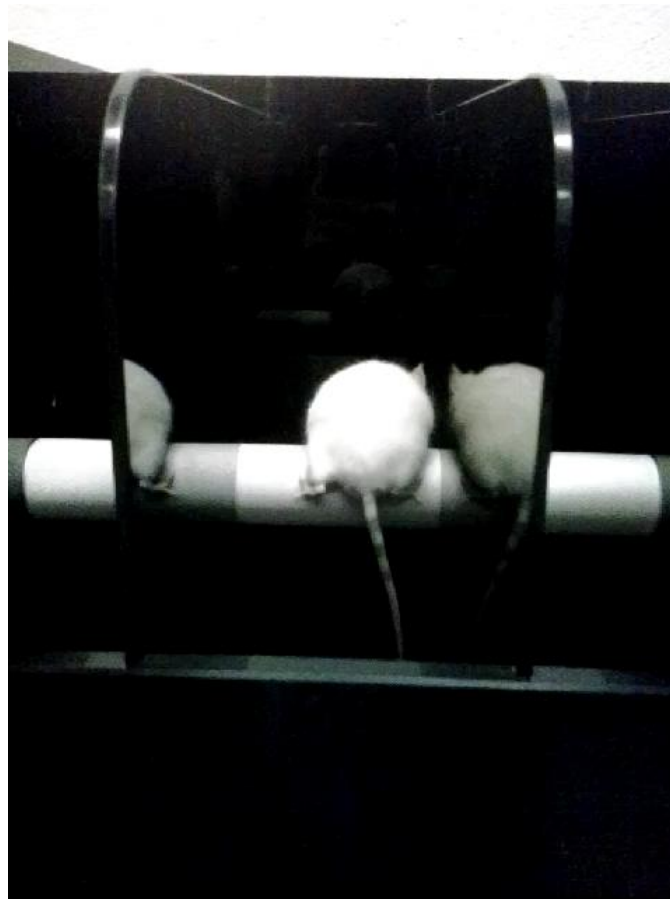


Figura 4 – Animal sendo testado para controle e aprendizagem motora através do rota-rod.

4.5.2. Trave de Equilíbrio

O aparato da trave de equilíbrio consiste em uma placa de madeira (100 cm x 2.8 cm), elevada a 50 cm do chão por suportes também de madeira (Fig. 5). Com o objetivo de amortecer possível queda do animal, uma proteção de tecido foi colocada abaixo do equipamento. Para o teste, o animal foi colocado em uma extremidade da trave de equilíbrio, cronometrando-se o tempo transcorrido até que alcance a outra das extremidades do equipamento, onde há uma caixa preta com maravalha de sua caixa moradia.



Figura 5 – Animal sendo testado para coordenação motora e equilíbrio motora através da trave de equilíbrio.

Apesar de ambos os testes (rota-rod e trave de equilíbrio) se mostrarem semelhantes na teoria, a utilização de ambos é feita objetivando a complementação dos dados. O animal tem um forte fator motivacional envolvido no teste da trave de equilíbrio, uma vez que é necessário que se interesse pela maravalha na extremidade oposta da trave para se locomover voluntariamente. Já no rota-rod o camundongo não tem controle sobre o início dos movimentos, o fim ou a velocidade de rotação, além de apresentar um controle motor grosso, em contraste à trave de equilíbrio que tem um controle motor mais fino. Desta forma, os aparatos medem atividades diferentes, mas complementares.

O protocolo comportamental para avaliação da coordenação motora e do equilíbrio, utilizando o rota-rod e a trave de equilíbrio, foi baseado em metodologia de Song *et al.* (2006) e He *et al.* (2014), com algumas modificações. Song *et al.* (2006)

consideram os testes complementares pois permitem avaliar simultaneamente equilíbrio e controle motor fino.

O protocolo foi dividido em cinco etapas, que foram nomeadas Habituação, Microinjeção, Estágio 1, Estágio 2, e Estágio 3. Na habituação os animais foram posicionados no cilindro do Rota-rod na velocidade 0 por 120 segundos ou até caírem, 24 horas antes da microinjeção. Cinco minutos após a microinjeção, os camundongos foram submetidos ao estágio 1; 4 horas após a microinjeção ao estágio 2; e 24 horas após ao estágio 3. Em cada estágio, o animal foi submetido ao rota-rod em uma rampa de subida com velocidade de rotação crescente de 0 a 20 rpm por até 300 segundos ou até o animal cair na plataforma em três exposições diferentes. O animal retorna para a caixa moradia por pelo menos 5 minutos de descanso, e então é submetido à trave de equilíbrio, por um período de até 300 segundos em três exposições diferentes.

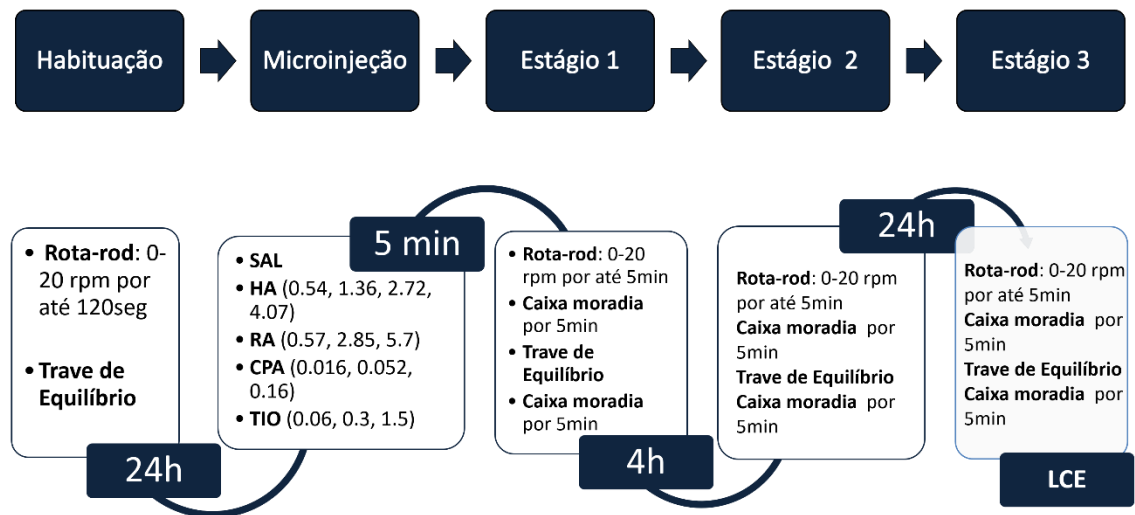


Figura 6 – Representação esquemática do protocolo experimental para os testes de desempenho motor e aprendizagem motora.

4.5.3. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Pelo menos duas horas após o protocolo experimental para testar o equilíbrio e controle motor foi utilizado o LCE para avaliar a ansiedade do animal. O labirinto é

composto de dois braços abertos (BA) (30 x 5 x 0,25 cm) perpendiculares a dois braços fechados (BF) com proteções laterais opacas de acrílico (30 x 5 x 15 cm), unidas por uma região central (5 x 5 cm) e elevado do solo a uma altura de 38,5 cm. Uma câmera posicionada a 90° acima do labirinto e acoplada ao computador permite o registro das imagens. Os animais foram transportados em uma caixa individual de paredes opacas (33 x 15 x 13 cm) até o labirinto e posicionados individualmente na plataforma central com a face voltada para o braço aberto.

Foram usadas como medidas comportamentais: o número de entradas nos braços abertos, o número de entradas nos braços fechados, o tempo do animal nos braços abertos, tempo nos braços fechados e tempo na plataforma central. Roedores são presa na natureza e tem preferência natural a espaços baixos e protegidos, demonstrando aversão a espaços abertos e elevados. Dessa forma, quando o animal passa mais tempo nos braços abertos, interpretamos um efeito ansiolítico da droga administrada. O teste tem duração de 5 minutos e é realizado uma única vez.

Depois da realização de cada teste, o labirinto foi limpo com álcool 5% para evitar a influência de odor do camundongo anterior no comportamento do animal testado subsequentemente.

4.6. Grupos Experimentais

Experimento I: Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou histamina (0.54 nmol; 1.36 nmol; 2.72 nmol ou 4.07 nmol/0,1 µl) 5 minutos antes do primeiro estágio no primeiro dia no rota-rod e na trave de equilíbrio. Logo após, todos os animais foram testados no LCE para verificar se o treino motor influencia na ansiedade e na aprendizagem e memória emocional. A microinjeção foi feita apenas previamente ao estágio 1 do rota-rod e trave de equilíbrio.

Quadro 1 – Experimento I

GRUPOS	TESTE	TRATAMENTO	DOSE	N
SAL	Rota + Trave + LCE	Salina	--	10

HA 0.54	Rota + Trave + LCE	Histamina	0.54 nmol/0.1µ	10
HA 1.36	Rota + Trave + LCE	Histamina	1.36 nmol/0.1µ	10
HA 2.72	Rota + Trave + LCE	Histamina	2.72 nmol/0.1µ	10
HA 4.07	Rota + Trave + LCE	Histamina	4.07 nmol/0.1µ	10

Experimento II: Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou Clorfeniramina (0.016 nmol; 0.052 nmol ou 0.16 nmol/0,1 µl) 5 minutos antes do primeiro estágio no primeiro dia no rota-rod e na trave de equilíbrio.

Quadro 2 – Experimento II

GRUPOS	TESTE	TRATAMENTO	DOSE	N
SAL	Rota + Trave + LCE	Salina	--	10
CPA 0.016	Rota + Trave + LCE	Clorfeniramina	0.016 nmol/0.1µ 10	9
CPA 0.052	Rota + Trave + LCE	Clorfeniramina	0.052 nmol/0.1µ 10	10
CPA 0.16	Rota + Trave + LCE	Clorfeniramina	0.16 nmol/0.1µ	10

Experimento III: Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou Ranitidina (0.57 nmol; 2.85 nmol ou 5.7 nmol/0,1 µl) 5 minutos antes do primeiro estágio no primeiro dia no rota-rod e na trave de equilíbrio.

Quadro 3 – Experimento III

GRUPOS	TESTE	TRATAMENTO	DOSE	N
SAL	Rota + Trave + LCE	Salina	--	10
RA 1.42	Rota + Trave + LCE	Ranitidina	1.42 nmol/0.1µ	10

RA 2.85	Rota + Trave + LCE	Ranitidina	2.85 nmol/0.1 μ	10
RA 5.7	Rota + Trave + LCE	Ranitidina	5.7 nmol/0.1 μ	10

Experimento IV: Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou Tioperamida (0.06 nmol; 0.3 nmol ou 1.5 nmol/0,1 μ l) 5 minutos antes do primeiro estágio no primeiro dia no Rota-rod e na Trave de equilíbrio.

Quadro 4 – Experimento IV

GRUPOS	TESTE	TRATAMENTO	DOSE	N
SAL	Rota + Trave + LCE	Salina	--	10
TIO 0.06	Rota + Trave + LCE	Tioperamida	0.06 nmol/0.1 μ	10
TIO 0.3	Rota + Trave + LCE	Tioperamida	0.3 nmol/0.1 μ	10
TIO 1.5	Rota + Trave + LCE	Tioperamida	1.5 nmol/0.1 μ	10

4.7. Análise Histológica

Após o término do experimento, os animais receberam infusão de 0,1 μ l de uma solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o procedimento descrito para a injeção das drogas (Figura 7). Após receberem uma dose profunda de anestesia com solução de Cloridrato de Cetamina e Xilasina, os animais sofreram deslocamento cervical, decapitação e seus encéfalos serão removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%), por três dias no mínimo. Após esse período, os encéfalos ficaram conservados em solução de sacarose (20%) até 48 horas antes da análise, em solução de sacarose (30%) até 24 horas antes da histologia, e mantidos sob refrigeração.

Posteriormente, os encéfalos foram seccionados coronalmente na espessura de 80 micrômetros (μ m) ao longo do trajeto da cânula, utilizando um micrótomo de lâmina vibratória (Leica VT 1200S). As secções foram inspecionadas através de um microscópio

5. Resultados

5.1. Experimento I

Os resultados mostram o efeito da histamina microinjetada no vérmis cerebelar sobre o desempenho motor e aprendizagem motora em camundongos submetidos aos testes no rota-rod e na trave de equilíbrio, respectivamente.

Rota-rod (Fig. 8a e 8b): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,36$). A ANOVA de duas vias indicou que houve diferença entre as doses de histamina utilizadas entre os estágios do teste ($F_{4,45}=4,98$; $p=0,002$). A análise de *post hoc* mostrou uma diminuição significativa do tempo de latência para os animais que receberam histamina na dose 1.36 nmol no segundo estágio ($p=0,04$) e terceiro estágio ($p=0,02$) em relação aos animais que receberam salina ($p<0,05$), o que sugere um prejuízo na aquisição e consolidação do controle motor nesta dose. A análise mostrou ainda um aumento significativo de latência para os animais que receberam histamina na dose mais alta (4.07 nmol) em relação aos animais que receberam salina no primeiro estágio ($p=0,01$). A mesma dose mostrou tendência ao aumento de latência no segundo estágio em relação ao grupo salina ($p=0,06$) e não mostrou diferença no terceiro estágio em relação ao grupo salina ($p=0,66$). Estes resultados sugerem uma facilitação da aquisição do controle motor nos camundongos que receberam a dose mais alta de histamina, sem mudança significativa na consolidação da memória motora. Juntos, os resultados sugerem um efeito dose-dependente da histamina, com prejuízo no desempenho motor na dose 1.36 nmol seguido de facilitação na dose 4.07 nmol.

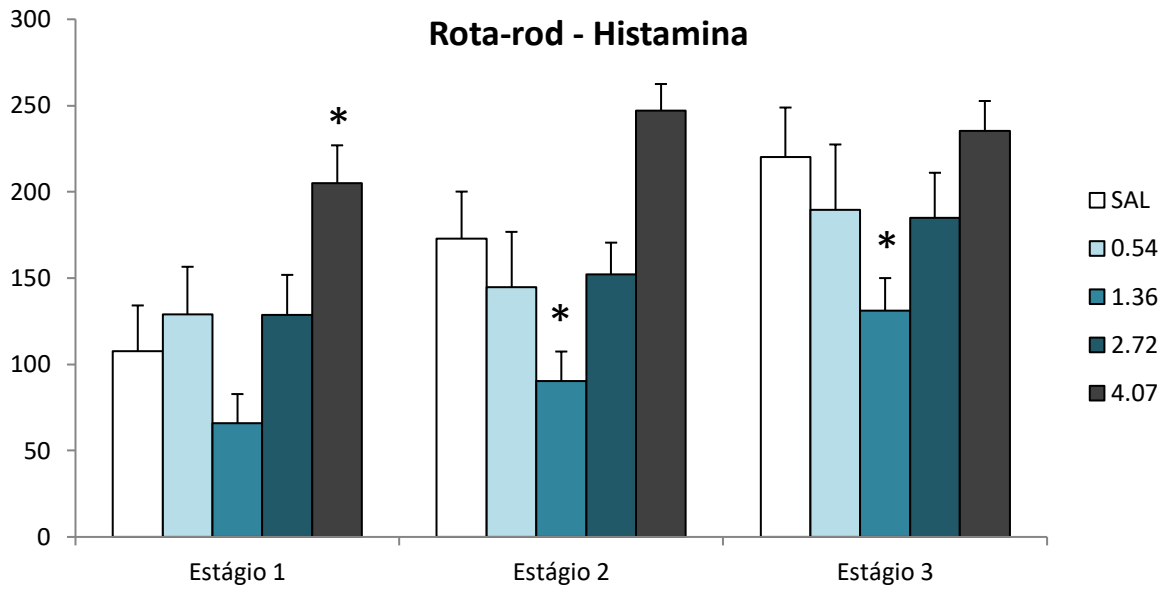


Figura 8a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e histamina no teste de rota-rod (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle do mesmo estágio). N = 10 animais por grupo.

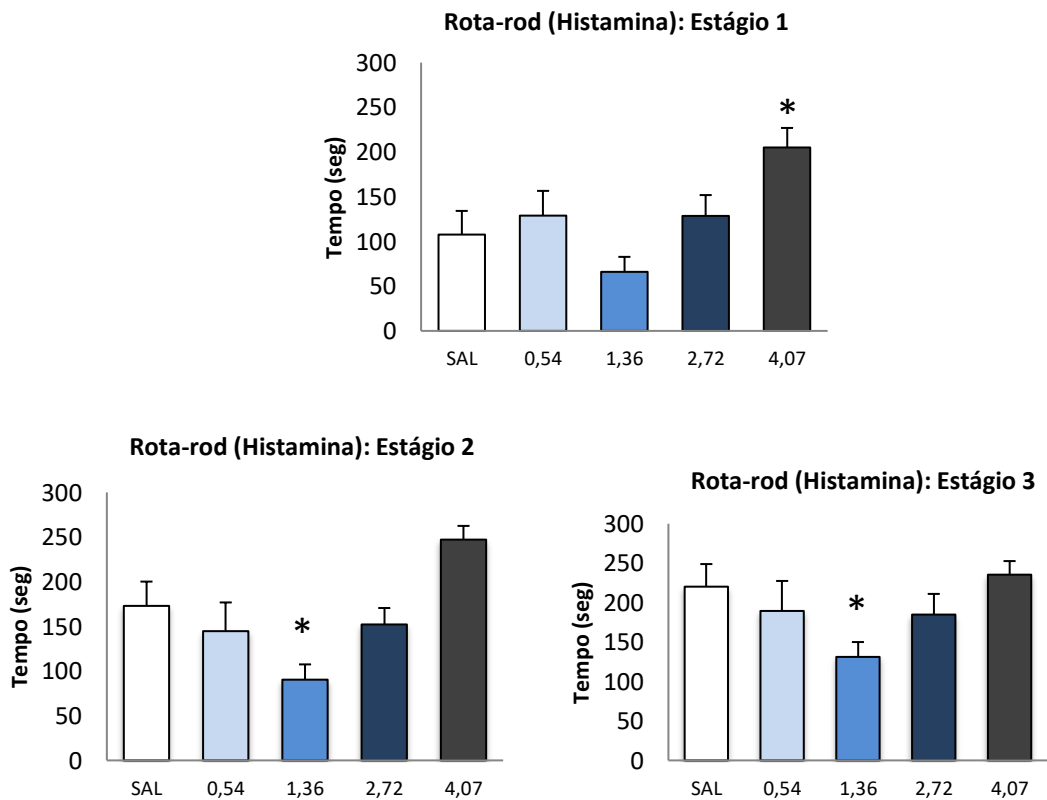


Figura 8b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e histamina no teste de Rota-rod por estágio (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

Trave de Equilíbrio (Fig. 9a e 9b): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,52$). A ANOVA de duas vias indicou que houve uma diminuição significativa do tempo de latência que o animal levou para atravessar a trave ao longo dos estágios, mas não houve diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0,05$) e as doses utilizadas ($F_{4,45}=1,26$; $p=0,29$).

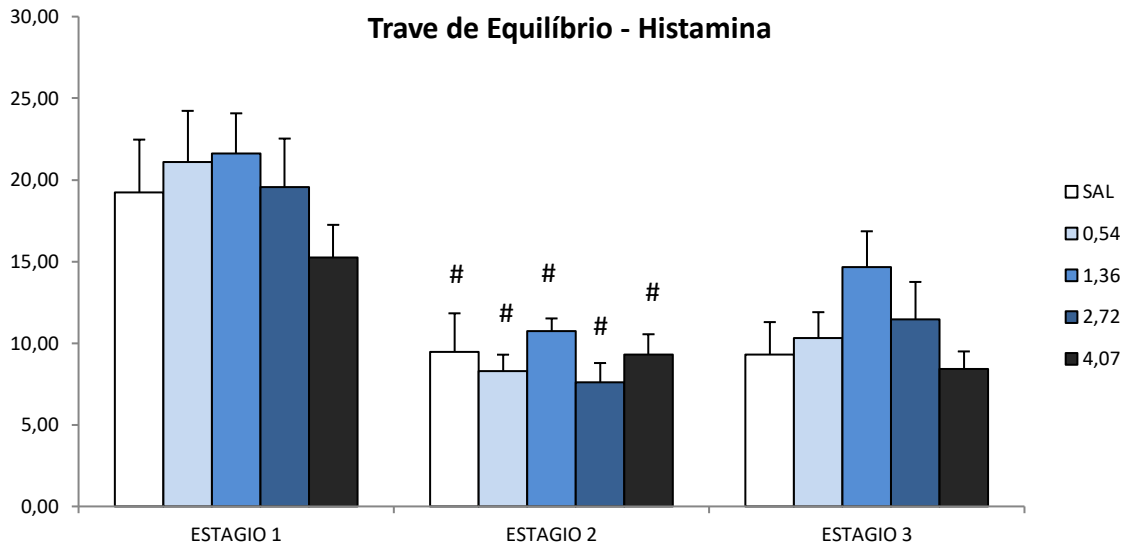


Figura 9a: Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e histamina no teste de trave de equilíbrio (# $p < 0,05$ comparado ao mesmo grupo no estágio 1). N = 10 animais por grupo.

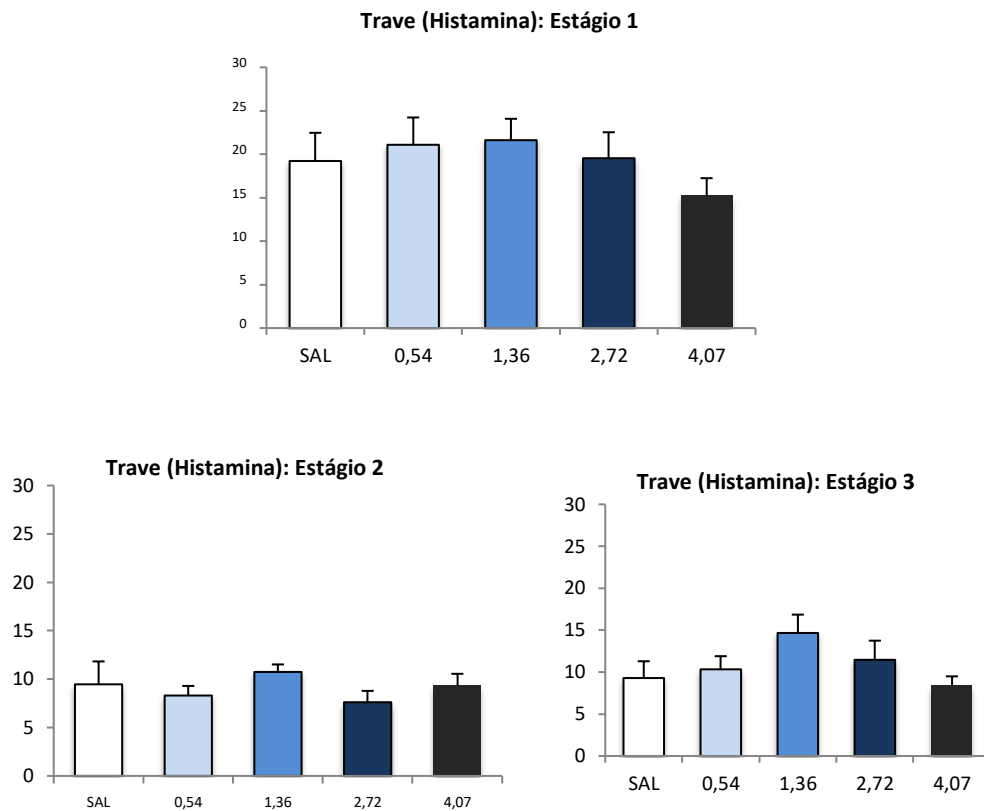


Figura 9b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e histamina no teste de trave de equilíbrio por estágio (não houve diferença entre as doses dentro de cada estágio).

LCE (Fig. 10): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,34$ para %EBA e $p=0,06$ para %TBA). A ANOVA de duas vias não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e as doses utilizadas.

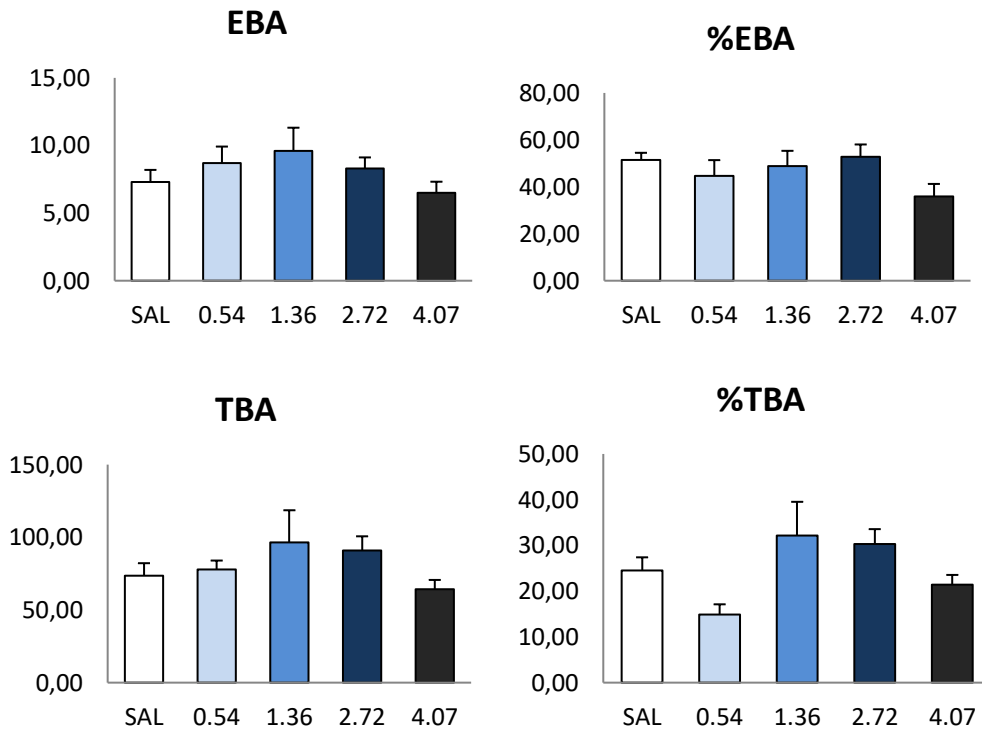


Figura 10 – Média de entrada nos braços abertos (EBA), tempo nos braços abertos (TBA), Porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) no LCE para o grupo Histamina. Não houve diferença entre os grupos. N = 10 animais por grupo. Para os valores de entrada no braço fechado (EBF), tempo nos braços fechados (TBF) e tempo no centro (TC) consultar Anexo II.

5.2. Experimento II

Os resultados do experimento II mostram o efeito da microinjeção intravérmis cerebelar do antagonista do receptor H_1 (Clorfeniramina) sobre o desempenho motor e aprendizagem de camundongos submetidos aos testes no rota-rod e na trave de equilíbrio, respectivamente.

Rota-rod (Fig. 11a e 11b): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,69$). A ANOVA de duas vias indicou que houve diferença entre as doses de CPA utilizadas entre os estágios do teste ($F_{3,35}=3,86$; $p=0,017$). A análise de *post hoc* mostrou uma diminuição

significativa no tempo de latência no rota-rod para os animais que receberam as doses 0.016 nmol no segundo estágio ($p=0,01$) e para os animais que receberam a dose de 0.052 nmol no terceiro estágio ($p=0,01$). Estes resultados sugerem um prejuízo na aprendizagem motora 4 horas e 24 horas após a aquisição da habilidade motora nas doses 0.016 nmol e 0.052 nmol respectivamente.

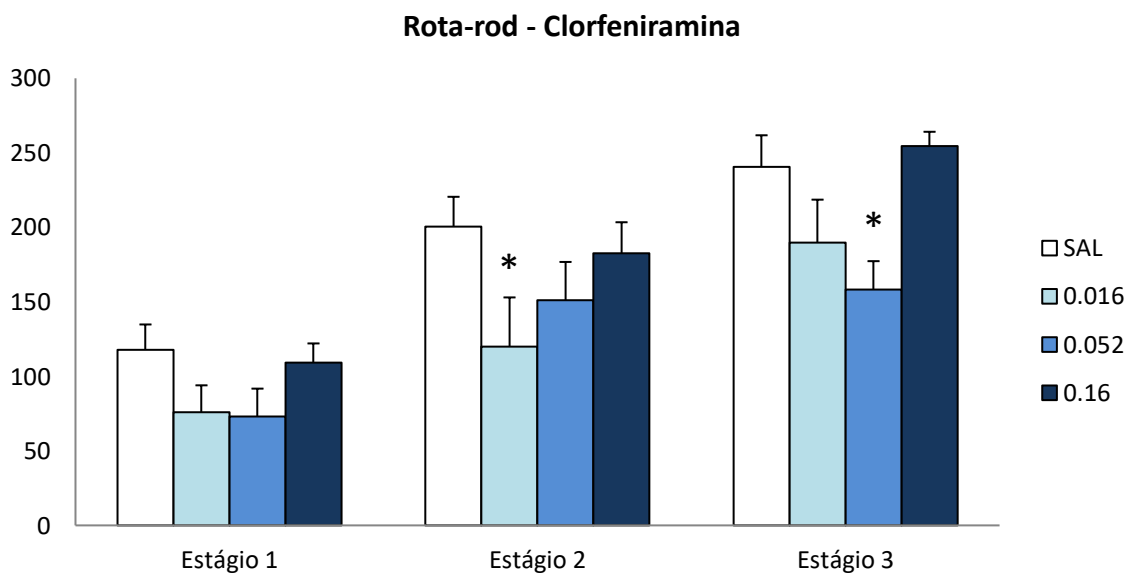
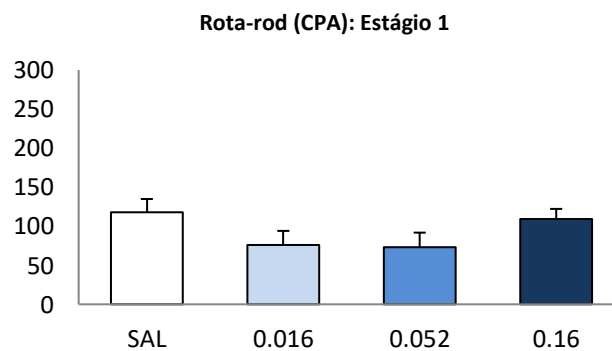


Figura 11a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e CPA no teste de Rota-rod (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle). N = 9-10 animais por grupo.



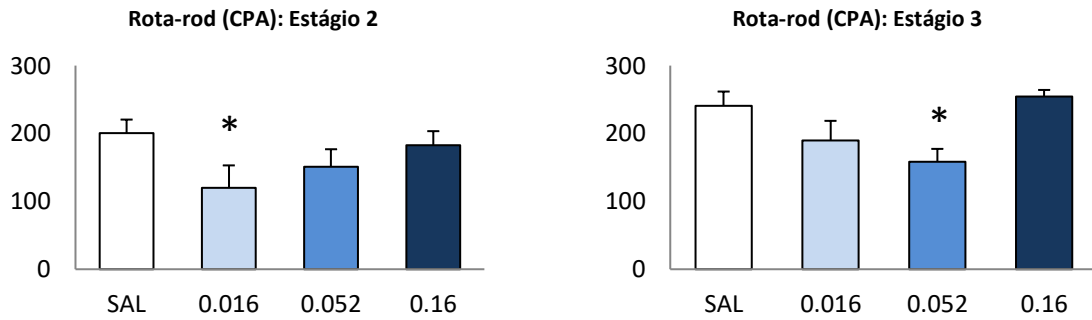


Figura 11b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e CPA no teste de Rota-rod por estágio (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

Trave de Equilíbrio (Fig. 12a e 12b): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,22$). A ANOVA de duas vias indicou que houve diferença significativa entre as doses de CPA utilizadas entre os estágios do teste ($F_{3,35}=4,01$; $p=0,02$). A análise de *post hoc* mostrou um aumento significativo no tempo que o animal levou para atravessar a trave na dose mais alta (0.16 nmol) no segundo estágio ($p=0,02$) em relação ao grupo salina. Estes resultados sugerem um prejuízo no desempenho motor e equilíbrio dos animais testados na trave de equilíbrio que receberam a dose mais alta de CPA.

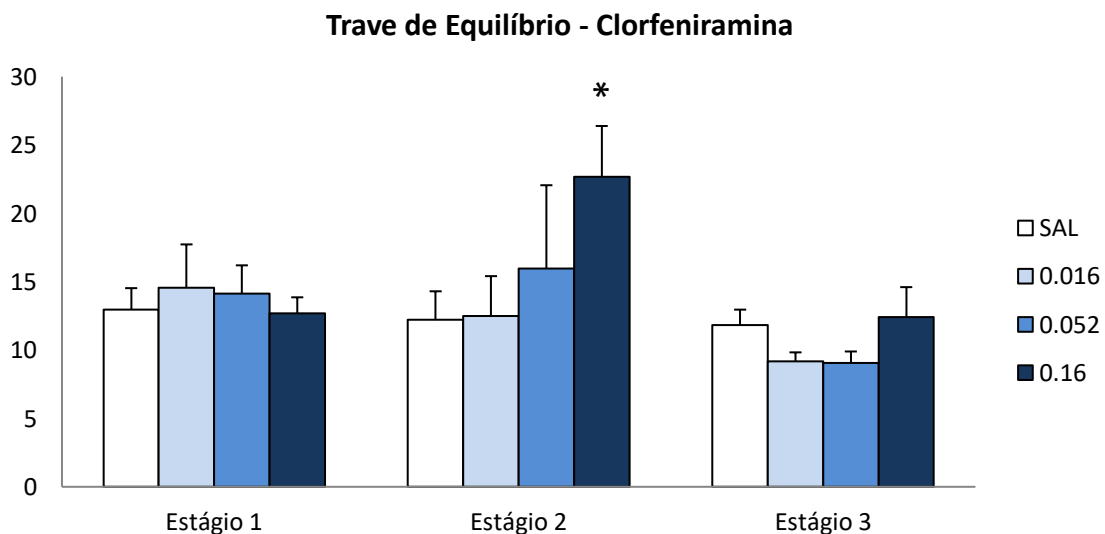


Figura 12a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e CPA no teste de trave de equilíbrio (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle). N = 9-10 animais por grupo.

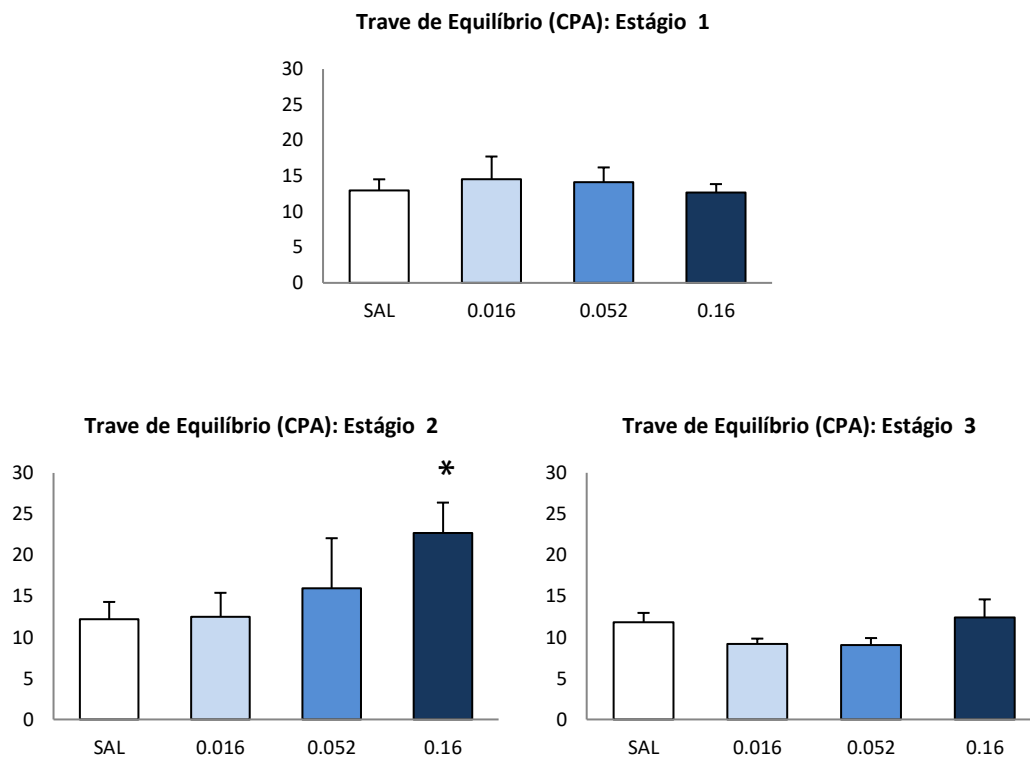


Figura 12b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e CPA no teste de trave de equilíbrio por estágio (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

LCE (Fig. 13): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p = 0,06$ para %EBA e $p = 0,37$ para %TBA). A ANOVA de duas vias não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e as doses utilizadas.

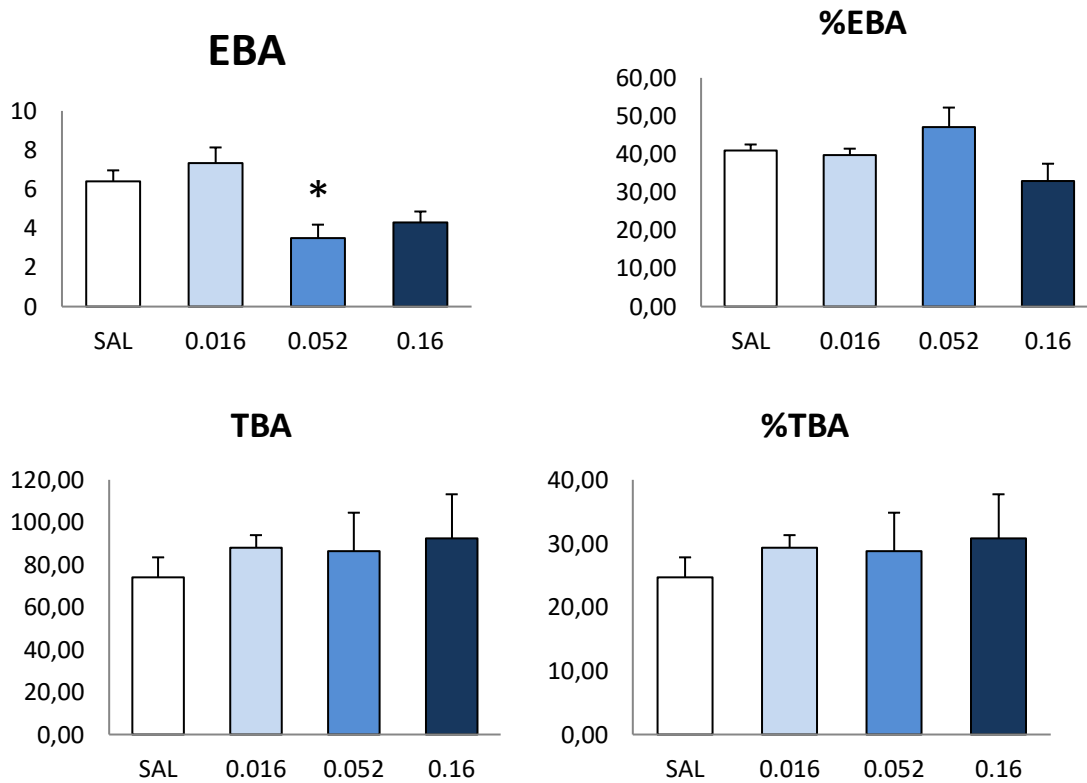


Figura 13 –Média de entrada nos braços abertos (EBA), tempo nos braços abertos (TBA), Porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) no LCE para o grupo CPA. Houve diferença entre a dose 0.052 de EBA e o grupo controle (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle). $N = 9-10$ animais por grupo. Para os valores de entrada no braço fechado (EBF), tempo nos braços fechados (TBF) e tempo no centro (TC) consultar Anexo II.

5.3. Experimento III

Os resultados mostram o efeito do antagonista do receptor H_2 (Ranitidina) microinjetada no vérmis cerebelar sobre o desempenho motor e aprendizagem em camundongos submetidos aos testes no rota-rod e na trave de equilíbrio, respectivamente.

Rota-rod (14a e 14b): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,46$). A ANOVA de duas vias indicou que houve diferença entre as doses de ranitidina utilizadas entre os

estágios do teste ($F_{3,36}=3,48$; $p=0,02$). A análise de *post hoc* mostrou uma diminuição significativa do tempo de latência no rota-rod para os animais que receberam ranitidina na dose 1.42 nmol no segundo estágio ($p=0,01$) e terceiro estágio ($p=0,002$) em relação aos animais que receberam salina. A análise mostrou uma diminuição significativa no tempo de latência também no tempo dos animais que receberam ranitidina na dose 2.85 nmol no segundo estágio ($p=0,02$) e terceiro estágio ($p=0,007$) em relação ao grupo salina. Estes resultados sugerem um prejuízo expressivo no desempenho motor no rota-rod dos animais que receberam ranitidina nas doses 1.42 nmol e 2.85 nmol.

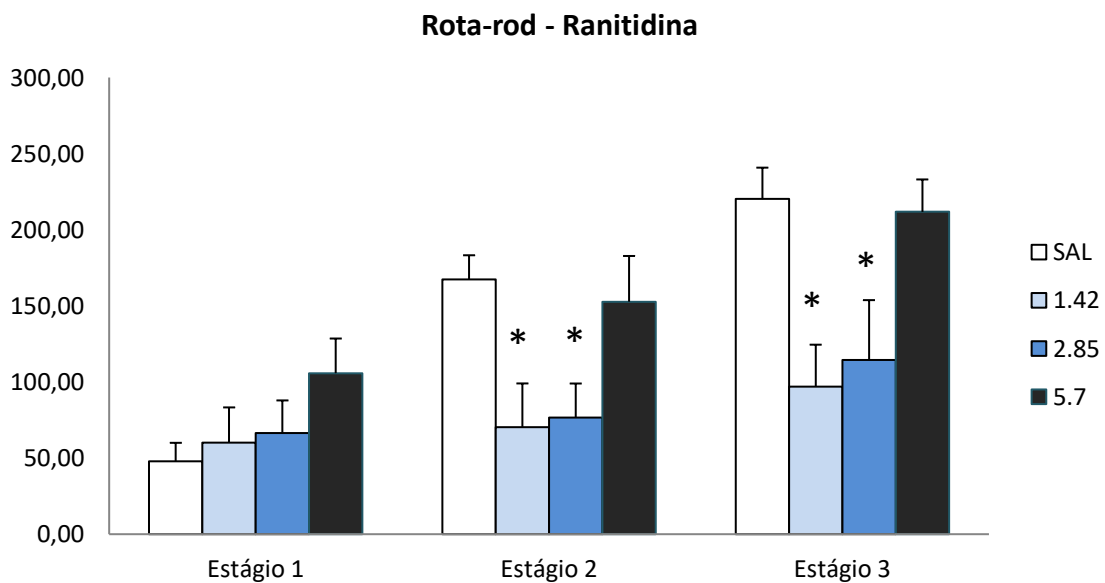
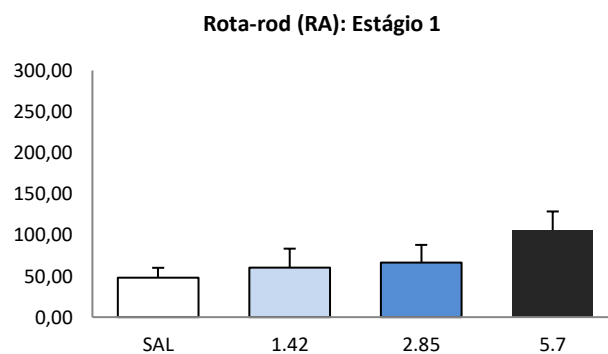


Figura 14a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e RA no rota-rod (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle). N = 10 animais por grupo.



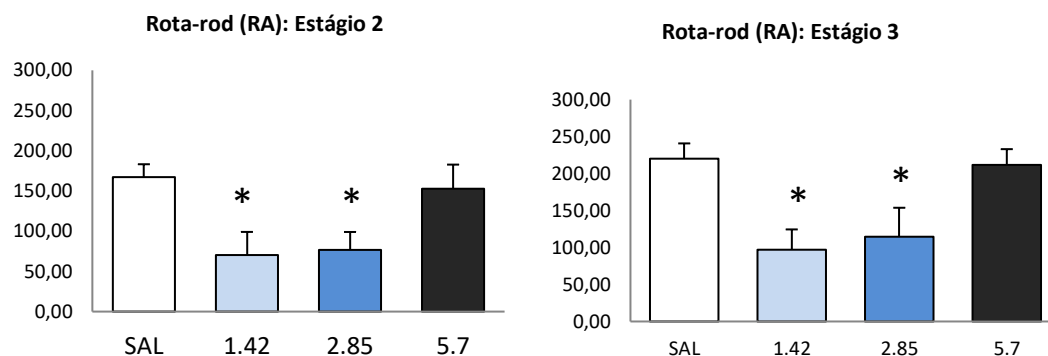


Figura 14b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e RA no teste de rota-rod por estágio (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

Trave de Equilíbrio (Fig. 15a e 15b): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,11$). A ANOVA de duas vias indicou que não houve diferença significativa entre as doses de Ranitidina utilizadas entre os estágios do teste ($F_{3,36}=2,41$; $p=0,08$).

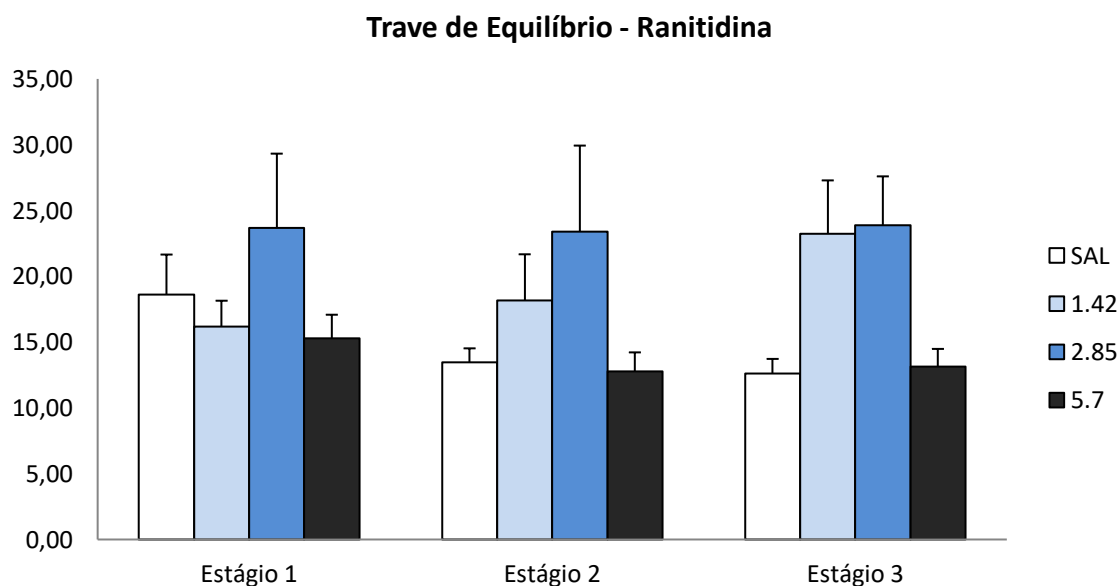


Figura 15a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e RA no teste de trave de equilíbrio (não houve diferença entre os grupos). $N = 10$ animais por grupo.

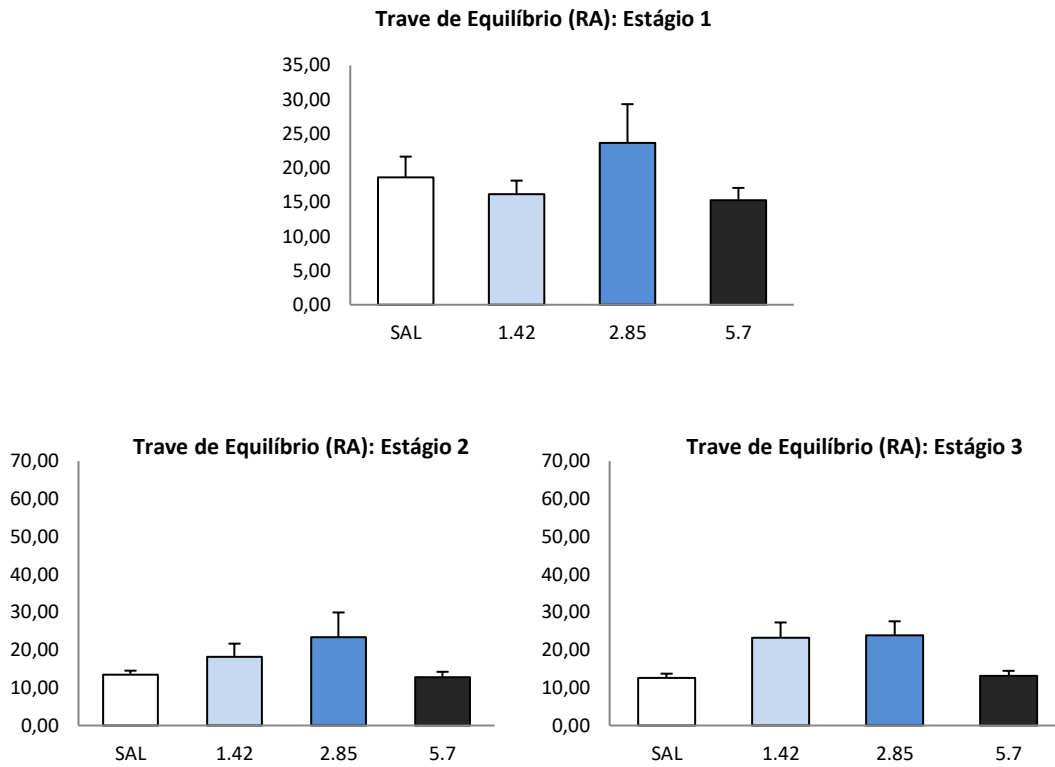
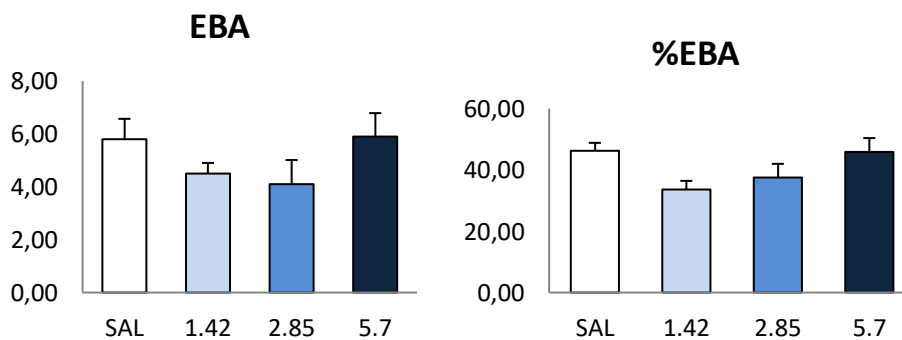


Figura 15b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e RA no teste de trave de equilíbrio por estágio.

LCE (Fig. 16): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p= 0,35$ para %EBA e $p=0,08$ para %TBA). A ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa entre o grupo controle, TBA e %TBA na dose mais alta ($F_{3,44} P=0,004$).



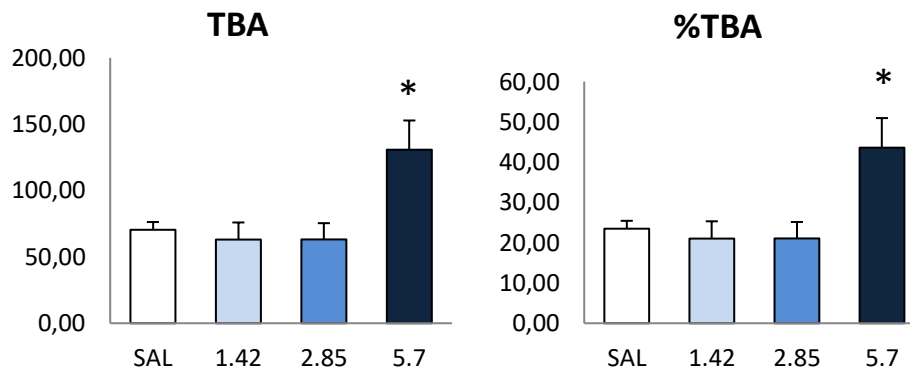


Figura 16 –Média de entrada nos braços abertos (EBA), tempo nos braços abertos (TBA), Porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) no LCE para o grupo RA (* $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle). N = 10 animais por grupo. Para os valores de entrada no braço fechado (EBF), tempo nos braços fechados (TBF) e tempo no centro (TC) consultar Anexo II.

5.4. Experimento IV

Os resultados mostram o efeito do antagonista do receptor H_3 (Tioperamida) microinjetada no vérmis cerebelar sobre o desempenho motor e aprendizagem em camundongos submetidos aos testes no rota-rod e na trave de equilíbrio, respectivamente.

Rota-rod (17a e 17b): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,21$). A ANOVA de duas vias indicou que houve diferença entre as doses de tioperamida utilizadas entre os estágios do teste ($F_{3,47}=3,51$; $p=0,02$). A análise de *post hoc* mostrou uma diminuição significativa do tempo de latência no rota-rod para os animais que receberam tioperamida na dose mais alta (1,5 nmol) no terceiro estágio ($p=0,003$) em relação aos animais que receberam salina. Este resultados sugerem um prejuízo no desempenho motor no rota-rod dos animais que receberam tioperamida na dose mais alta.

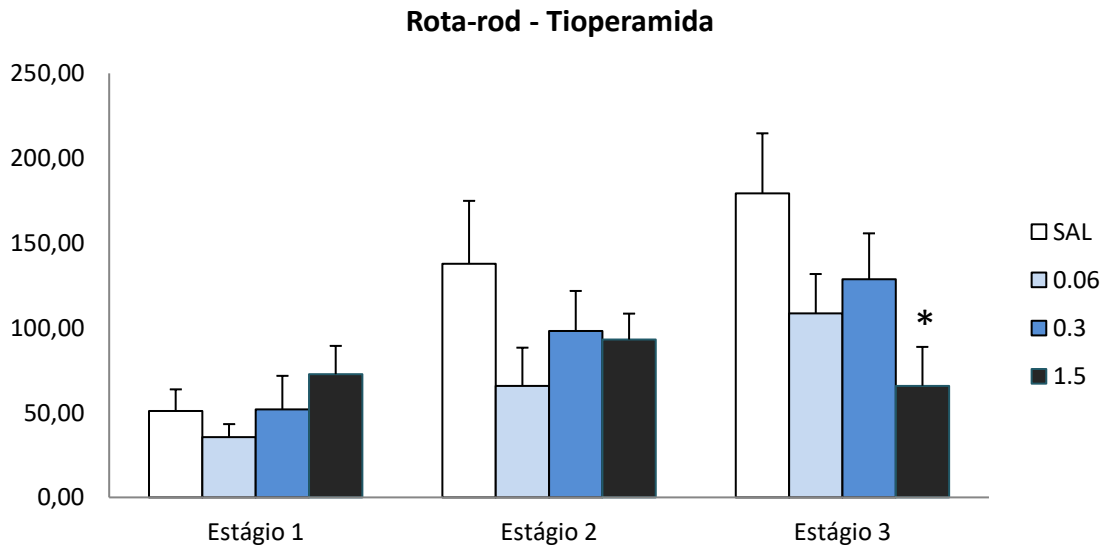


Figura 17a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e TIO no Rota-rod (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle). $N = 10$ animais por grupo.

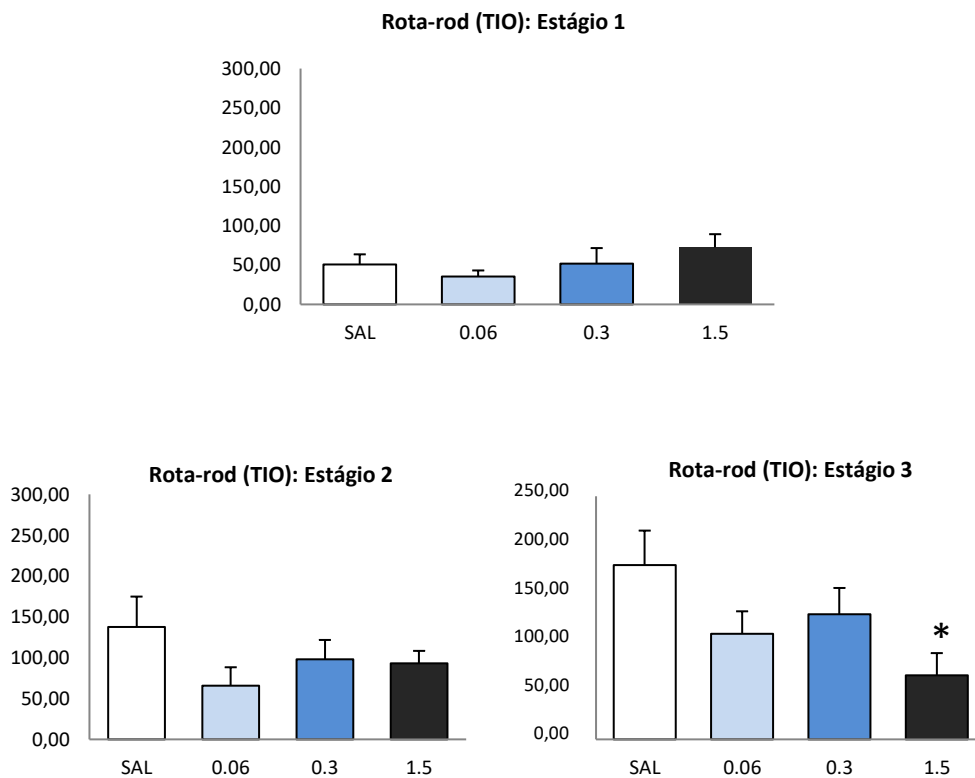


Figura 17b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e TIO no teste de rota-rod por estágio.

Trave de Equilíbrio (Fig. 18a e 18b): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p=0,26$). A ANOVA de duas vias indicou que houve diferença entre as doses de tioperamida utilizadas entre os estágios do teste ($F_{3,31}=3,62$; $p=0,03$). A análise de *post hoc* mostrou um aumento significativa do tempo para atravessar a trave de equilíbrio no segundo estágio para os animais que receberam tioperamida na dose mais alta (1,5 nmol) no ($p=0,001$) em relação aos animais que receberam salina. Este resultados sugerem um prejuízo no desempenho de coordenação motora e equilíbrio dos animais que receberam tioperamida na dose mais alta.

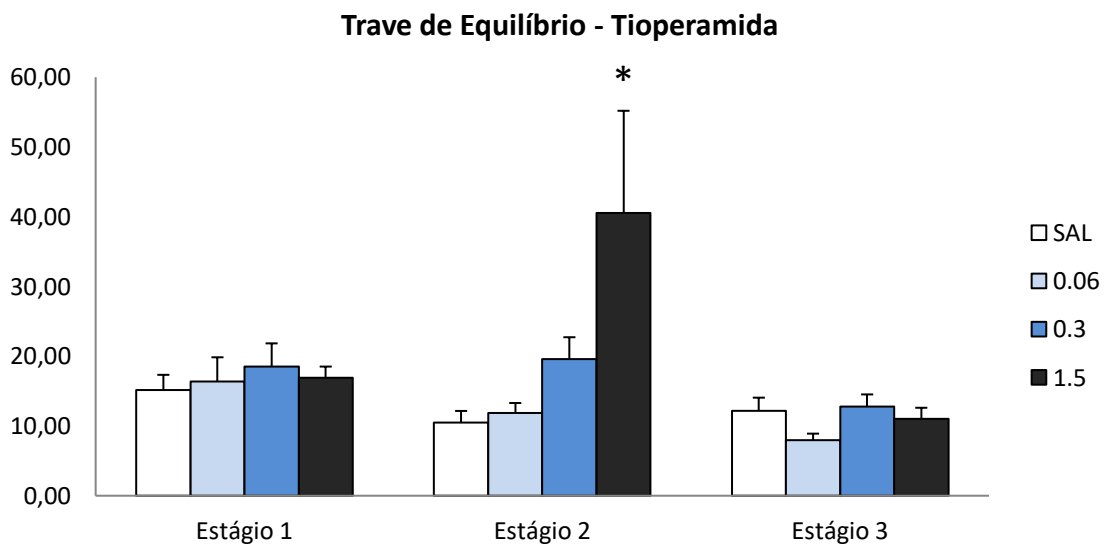
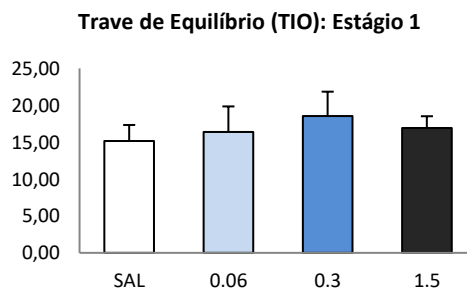


Figura 18a – Média das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos controle e TIO na trave de equilíbrio (* $p < 0,01$ em relação ao grupo controle). N = 10 animais por grupo.



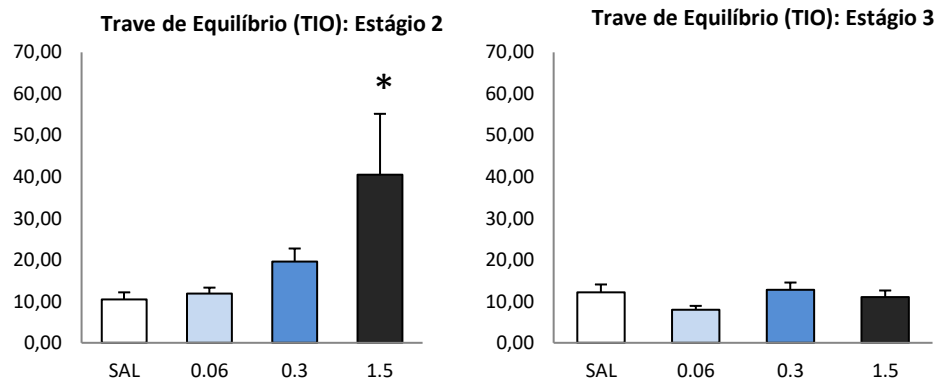


Figura 18b – Média e erro padrão da média para os grupos controle e TIO no teste de trave de equilíbrio por estágio.

LCE (Fig. 19): O teste de Levene para Homogeneidade de Variância assegurou a homogeneidade entre os animais dentro do grupo ($p= 0,14$ para %EBA e $p=0,23$ para %TBA). A ANOVA de duas vias não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e as doses utilizadas

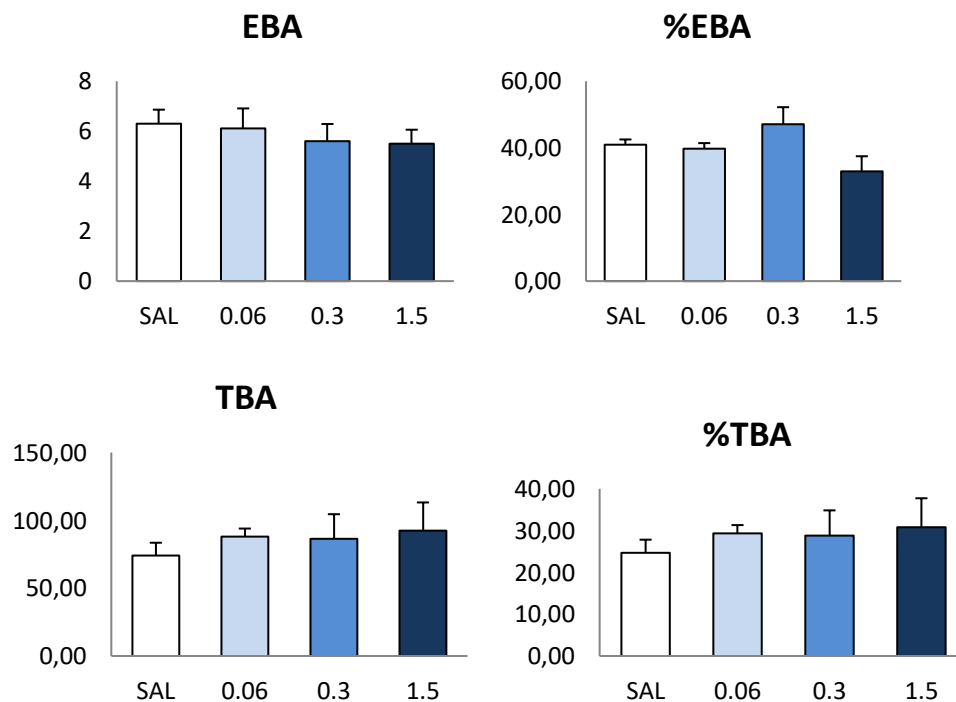


Figura 19 – Média de entrada nos braços abertos (EBA), tempo nos braços abertos (TBA), Porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) no LCE para o grupo TIO. Não houve diferença entre os grupos. N = 10 animais por grupo. Para os valores de entrada no braço fechado (EBF), tempo nos braços fechados (TBF) e tempo no centro (TC) consultar Anexo II.

5.5. Correlação entre desempenho motor e sistema emocional

5.5.1. Histamina

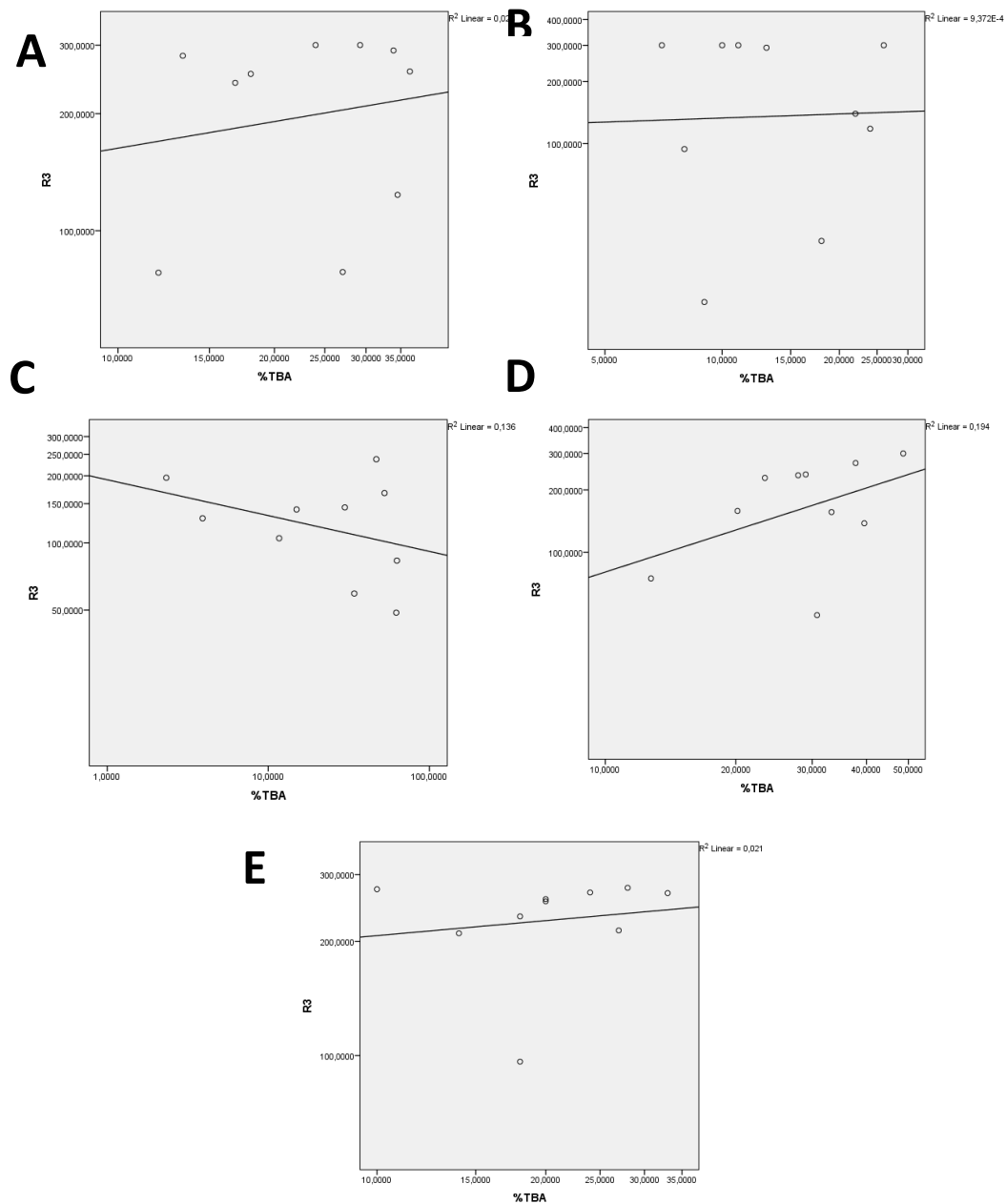


Figura 20 – Resultados expressos em histograma para a correlação entre o desempenho motor de camundongos, que receberam histamina, submetidos ao rota-rod, e os dados comportamentais de %EBA e %TBA do LCE (coeficiente de *Pearson*). **A**=SAL; **B**=0.54 nmol; **C**=1.36 nmol; **D**=2.72 nmol; **E**=4.07 nmol. Não houve correlação entre os grupos. N = 10 animais por grupo. Para os valores descritos, consultar a tabela 7 do anexo III.

5.5.2. Clorfeniramina

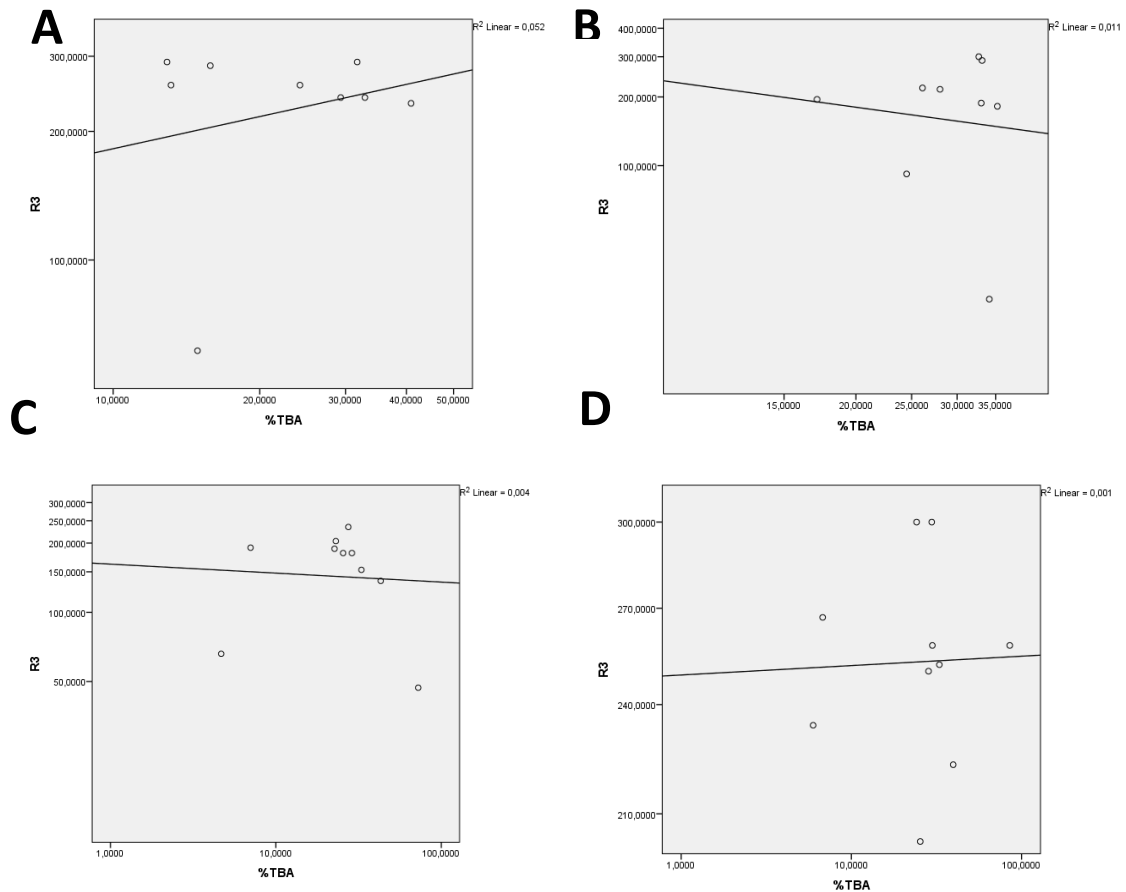


Figura 21 – Resultados expressos em histograma para a correlação entre o desempenho motor de camundongos, que receberam CPA, submetidos ao rota-rod, e os dados comportamentais de %EBA e %TBA do LCE (coeficiente de *Pearson*). **A**=SAL; **B**=0.016nmol; **C**=0.052nmol; **D**=0.16nmol. Não houve correlação entre os grupos. N = 9-10 animais por grupo. Para os valores descritos, consultar a tabela 8 do anexo III.

5.5.3. Ranitidina

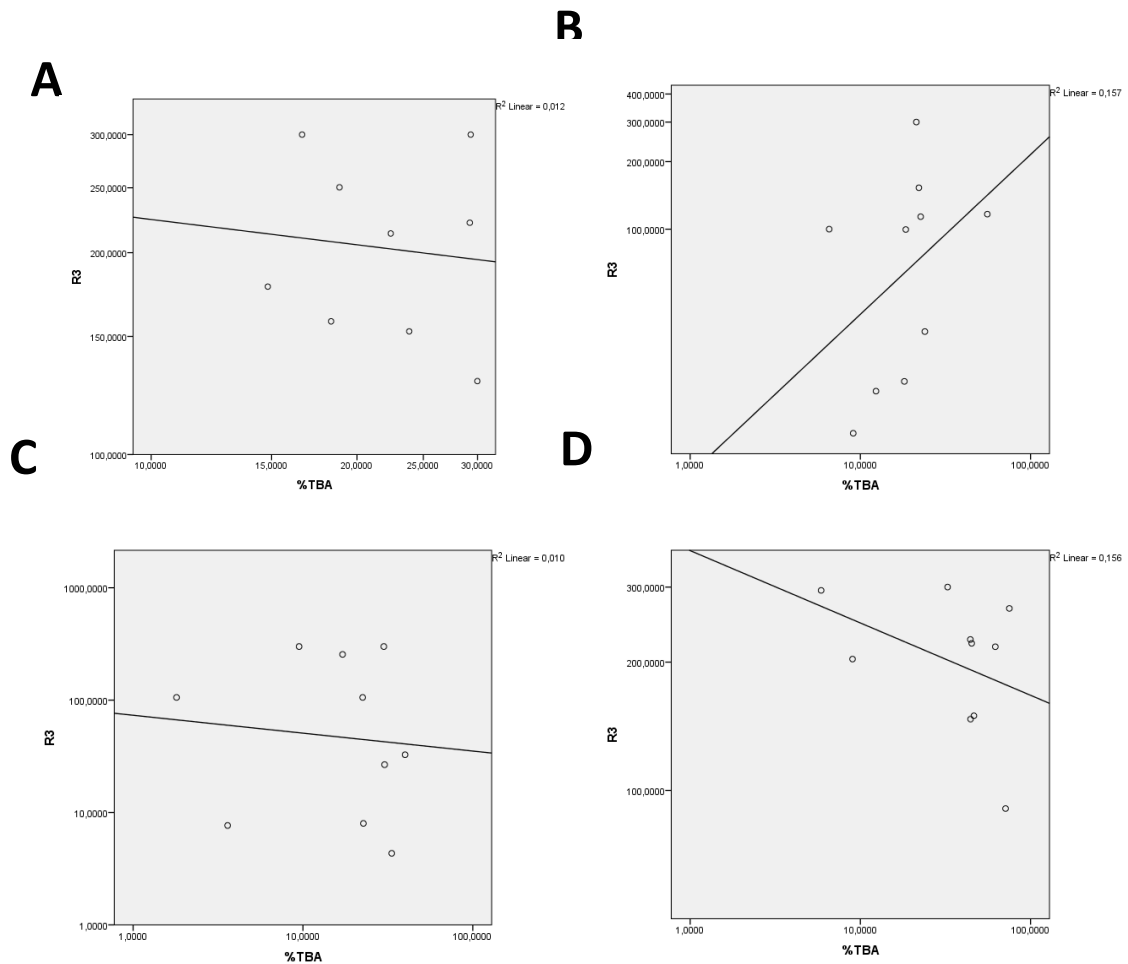


Figura 22 – Resultados expressos em histograma para a correlação entre o desempenho motor de camundongos, que receberam RA, submetidos ao rota-rod, e os dados comportamentais de EBA e TBA do LCE (coeficiente de *Pearson*). **A**=SAL; **B**=1.42 nmol; **C**=2.85 nmol; **D**=5.7 nmol. Não houve correlação entre os grupos. N = 9-10 animais por grupo. Para os valores descritos, consultar a tabela 9 do anexo III.

5.6. Resumo dos Resultados

Tabela 5 – Resumo dos Resultados Motores

ESTÁGIO	HA	CPA	RA	TIO
R1	↑ (4.07)	∅	∅	∅
R2	↓ (1.36)	↓ (0.016)	↓(1.42) ↓ (2.85)	∅
R3	↓ (1.36)	↓ (0.052)	↓(1.42) ↓ (2.85)	↓(1.5)
T1	∅	∅	∅	∅
T2	∅	↑ (0.16)	∅	↑ (1.5)
T3	∅	∅	∅	∅

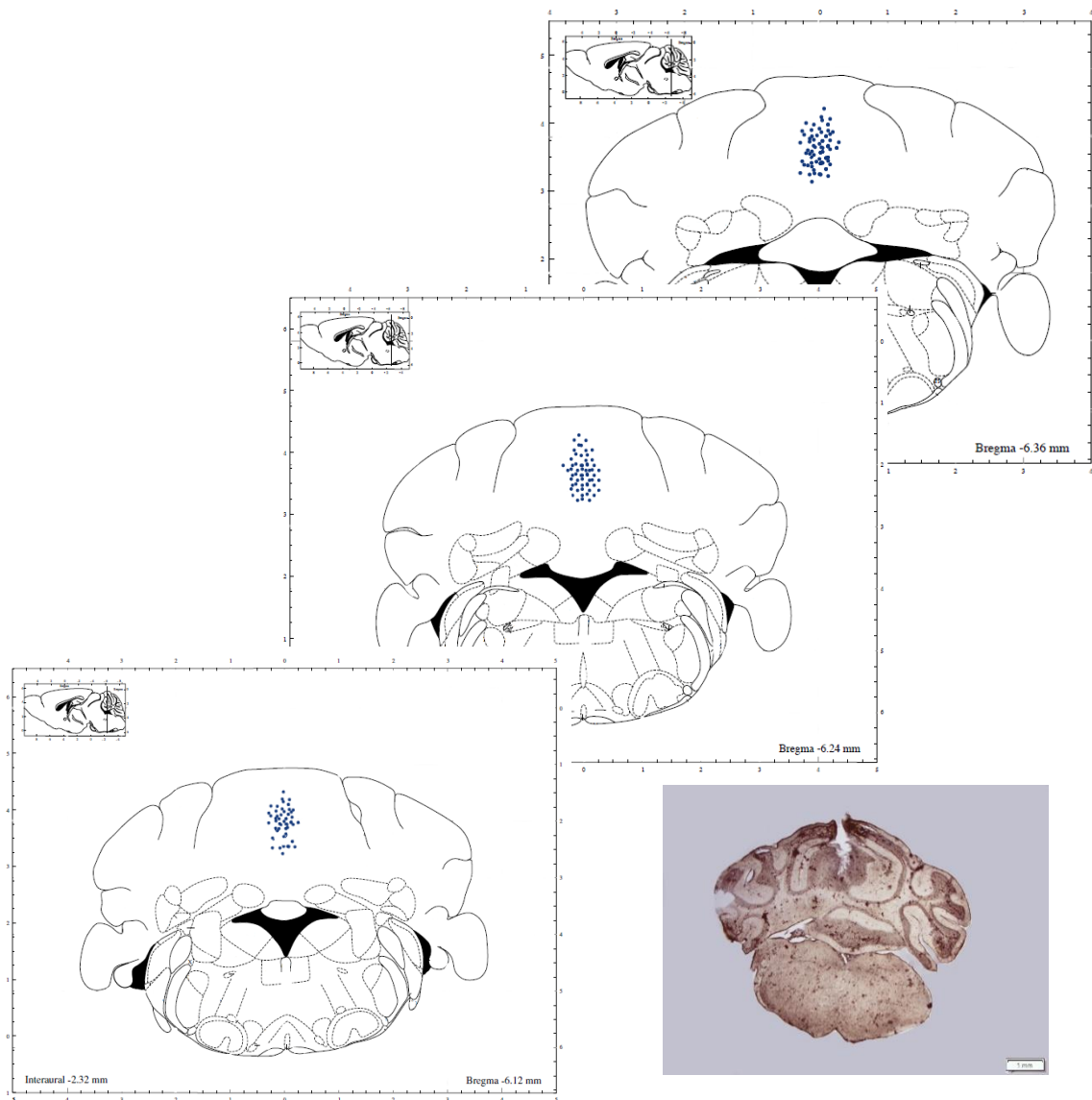
Legenda: R1, R2 e R3 são os resultados (pool) dos três estágios do rota-rod; T1, T2 e T3 são os resultados (pool) dos três estágios da trave de equilíbrio; ↑: Facilitação; ↓: Prejuízo; ∅: sem alteração.

Tabela 6 – Resumo dos Resultados Não-Motores

ESTÁGIO	HA	CPA	RA	TIO
EBA	∅	↓ (0.052)	∅	∅
%EBA	∅	∅	∅	∅
TBA	∅	∅	↑ (5.7)	∅
%TBA	∅	∅	↑ (5.7)	∅

Legenda: ↑: ansiolítico; ↓: ansiogênico; ∅: sem alteração.

5.7. Acertos no sítio de injeção da cânula, confirmados pela histologia



5.8. Perda Amostral

Não houve perda amostral em relação ao sítio de implantação da cânula, uma vez que o vérmis cerebelar é uma estrutura relativamente grande e de fácil localização. Dos animais utilizados neste estudo, somente um não sobreviveu à anestesia, em um período de temperaturas muito baixas. Não houve perdas adicionais por obstrução de cânula ou falta de habilidade do experimentador, uma vez que este procedimento é feito no laboratório com bastante frequência.

O período compreendido entre os testes no projeto piloto (para testar os aparatos comportamentais e o protocolo) no entanto, mostrou perda de aproximadamente 15% da amostra. No protocolo original, o teste do Labirinto em cruz Elevado era realizado em dois momentos: uma vez após as exposições ao protocolo motor e uma segunda exposição 24 horas depois, para medir a memória. No entanto, ao somar o período entre o dia da cirurgia, os cinco dias de repouso, o longo protocolo de três estágios e outro dia para retestar o LCE resultou na perda do capacete de acrílico de parte dos animais, expondo a amostra a sofrimento desnecessário. Portanto, optamos pelo bom senso e saúde dos camundongos, diminuindo o tempo de testes e manipulação.

6. Discussão

6.1. O sistema histaminérgico neuronal pode mediar o aprendizado e controle motor em camundongos através do vérmis cerebelar

Embora haja um consenso que o sistema histaminérgico neuronal participa de múltiplas funções cerebrais superiores, como regulação do sono, vigília, ritmos circadianos e alimentares, imunidade, aprendizado e memória (Haas *et al.*, 2008; Chazot, 2013; Kim *et al.*, 2015; Eban-Rothchild *et al.*, 2017), o papel da histamina no controle motor tem recebido crescente atenção somente nos últimos anos (Anichtchik *et al.*, 2000; Lian *et al.*, 2015). No presente estudo, verificou-se que as microinjeção intra-cerebelar de histamina causou um efeito dose-dependente na aprendizagem motora através do aumento da latência no teste rota-rod (Fig. 8a e 8b).

As fibras aferentes histaminérgicas cerebelares se originam do núcleo tuberomamilar no hipotálamo e se projetam para todo o cérebro, incluindo o córtex cerebelar e núcleos cerebelares. Estas fibras modulam paralelamente as células de Purkinje, as células granulares e os núcleos neuronais por meio dos receptores H₁ e/ou H₂ e influenciam sequencialmente as eferências do cerebelo (Li *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2000). Com base nessas propriedades estruturais, as fibras histaminérgicas aferentes no córtex cerebelar são consideradas como fibras de múltiplas camadas. De acordo com Li *et al.* (2014) a maioria das terminações das fibras histaminérgicas não produz especializações sinápticas típicas, e sim formam varicosidades. O padrão de contato varicoso em vez de sináptico, juntamente com a inervação dispersiva de aferentes histaminérgicos hipotalâmicos no córtex e núcleos cerebelares, indicam um papel extensivamente modulador da histamina no circuito cerebelar (Li *et al.*, 2014).

Ademais, Bostan *et al.* (2010) mostraram que o núcleo subtalâmico dos gânglios da base tem uma projeção di-sináptica substancial no córtex cerebelar. Essa via fornece um meio para os sinais normais e anormais dos gânglios da base influenciarem a função cerebelar em ambas as direções. O mesmo grupo mostrou anteriormente que o núcleo denteado do cerebelo tem uma projeção di-sináptica para o estriado, em um estágio de entrada de processamento dos gânglios da base (Hoshi *et al.*, 2005). Juntos, esses resultados fornecem o substrato anatômico para uma comunicação bidirecional

substancial entre os gânglios da base e o cerebelo. Assim, as duas estruturas subcorticais podem estar ligadas entre si para formar uma rede funcional integrada.

Esses achados indicam que as entradas aferentes histaminérgicas dos núcleos cerebelares podem estar envolvidas na função cerebelar do controle motor. Para testar esta hipótese, neste estudo, agentes histaminérgicos foram microinjetados no vermis cerebelar de camundongos machos adultos experimentalmente ingênuos, e foram observados seus efeitos no aprendizado motor e na coordenação dos animais que foram submetidos ao rota-rod e na trave de equilíbrio.

Neste trabalho, a microinjeção intravérmis cerebelar de histamina provocou uma diminuição notável no tempo em que os animais permaneceram no rota-rod na dose 1,36 nmol no segundo e terceiro estágio, seguido de um aumento significativo no tempo de latência na dose 4,07 nmol no primeiro estágio, configurando um efeito histaminérgico dose-dependente em nossas condições experimentais. Estes resultados mostram um prejuízo na consolidação da aprendizagem motora na dose 1,36 nmol e facilitação na aquisição da habilidade motora na dose mais alta. Estes efeitos não parecem estar associados diretamente à função de equilíbrio, uma vez que os animais de todos os grupos diminuíram acentuadamente o tempo de duração através dos estágios para atravessar a trave de equilíbrio até a caixa de descanso, sem diferença significativa entre os grupos.

Curiosamente, percebemos também o prejuízo no desempenho motor, no segundo e no terceiro estágio, em animais que receberam microinjeções dos antagonistas histaminérgicos de receptores H_1 (CPA) e de H_2 (RA). Isso pode ser explicado por um possível aumento compensatório da liberação de histamina endógena, uma vez que a microinjeção foi administrada somente 5 minutos antes do primeiro estágio do teste. A interação pode, então, ter atuado na janela de consolidação motora, dificultando a manutenção da habilidade, e assim prejudicando o desempenho motor no segundo e terceiro estágio.

6.2. A histamina facilita o desempenho motor de camundongos através de receptores H₁ e H₂ no vérmis cerebelar

A administração do antagonista seletivo do receptor histaminérgico H₁ clorfeniramina diminuiu o tempo de permanência dos animais no rod-rod nas doses 0,016 nmol e 0,052 nmol, significando um prejuízo no desempenho motor nas condições experimentais neste estudo. O antagonista seletivo do receptor histaminérgico H₂ ranitidina também mostrou uma diminuição do tempo de permanência dos animais no rota-rod nas doses 1,42 nmol e 2,85 nmol.

Esses resultados corroboram com diferentes modelos de memória e aprendizagem utilizados anteriormente em nosso laboratório, apontando um papel regulador do sistema histaminérgico cerebelar através da ativação dos receptores de histamina no vérmis cerebelar. O primeiro trabalho do nosso grupo com o sistema histaminérgico cerebelar em peixes (Garção *et al.*, 2009) mostrou que os animais que apresentaram ablação cerebelar apresentaram maior latência no teste de esQUIVA inibitória, quando comparados ao grupo controle. Além disso, o grupo com ablação cerebelar tratada com CPA manteve o prejuízo quando comparado a outros grupos, mesmo após 8 sessões de treinamento da atividade. A hipótese sugerida na época era de que o sistema histaminérgico age modulando os comportamentos de exploração versus proteção.

Nosso grupo mostrou também que animais tratados com histamina teve prejuízo na consolidação da memória emocional, enquanto o tratamento com CPA não alterou os parâmetros comportamentais mas foi capaz de reverter o efeito de prejuízo da histamina (Gianlorenço *et al.*, 2012). A inativação dos receptores H₁ (promovidos pela CPA) e dos receptores H₄ (promovidos pelo VUF-8430), no estudo de Guilherme *et al.* (2018) evidenciou uma facilitação nos comportamentos locomotores e exploratórios em camundongos avaliados no campo aberto (Guilherme *et al.*, 2018), sem diferença significativa nos grupos HA, RA e TIO. Juntos, estes resultados apontam para um componente modulador histaminérgico na atividade locomotora e memória emocional em diferentes aparatos, porém mais estudos de comparação entre os modelos de aprendizagem e memória precisam ser realizados para uma avaliação mais precisa.

6.3. A manipulação do sistema histaminérgico pode influenciar o sistema dopaminérgico

Com os progressos da neurociência, tendências motivacionais básicas opostas, como aproximação e evitação ou comportamento de exploração versus proteção, têm sido relacionadas à interação de múltiplos circuitos neurais localizados em extensas áreas cerebrais, desde o tronco cerebral inferior ao córtex cerebral anterior (Panksepp, 2011). Uma estrutura complexa chamada Sistema de Procura (do inglês *Seeking System*) poderia explicar a necessidade de um sistema de controle e feedback de comportamentos motivados pelo forrageamento (busca e exploração de recursos), necessidade e desejo, essenciais para a sobrevivência.

Nos mamíferos, a disposição da procura é promovida pela transmissão da dopamina (DA) dentro das áreas neurais subcorticais associativas intermediárias que conectam o processamento sensorial e motor. A maioria dessas áreas faz parte do “lobo olfativo-límbico”, onde o valor afetivo dos estímulos externos é traduzido em padrões comportamentais intencionais (Mogenson *et al.*, 1980). Alcaro e Panksepp (2011) mostram que o sistema mesolímbico dopaminérgico (ML-DA) de mamíferos conecta os núcleos mesencefálicos e prosencefálicos envolvidos na expressão básica do desejo ancestral de procura com áreas do córtex cerebral anterior, mais evoluídas, em termo de desenvolvimento, nas quais unidades geradas internamente são elaboradas de acordo com a percepção, informação cognitiva e visceral. A demonstração de uma via que liga o estágio de saída do processamento cerebelar ao estágio de entrada do processamento dos gânglios da base foi demonstrada por Hoshi *et al.* (2005). Isso levanta a possibilidade de que cerebelo pode ajustar adaptativamente a atividade dos gânglios da base com base em algum modelo interno de correções de erros, de maneira semelhante aos mecanismos cerebelares, para ajustar o movimento voluntário.

Zhuang *et al.* (2018) mostraram, usando técnicas de rastreamento anterógrado, imunocoloração, *patch clamp* qPCR de célula única, uma projeção histaminérgica direta do núcleo tuberomamilar hipotalâmico ao estriado em ratos. Os autores demonstraram ainda que a histamina exerce um forte efeito excitatório pós-sináptico nos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂, expressos pelos neurônios GABAérgicos de projeções espinhosas médias (MSNs).

Os receptores histaminérgicos H₁ e H₂ estão co-localizados nos MSNs que expressam os receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ e co-mediam a excitação induzida pela histamina nos dois tipos de neurônios (Surmeier *et al.*, 2007), sugerindo que as entradas aferentes histaminérgicas no estriado pode modular os MSNs que expressam os receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ pela ativação dos receptores pós-sinápticos histaminérgicos H₁ e H₂ e, portanto, serve como um modulador extrastriatal, importante para influenciar as vias diretas e indiretas e regular ativamente as funções dos gânglios da base (Zhuang *et al.*, 2018).

Além disso, Abdurakhmanova *et al.* (2019) caracterizaram o comportamento exploratório e a neurotransmissão estriatal em camundongos sem a enzima produtora de histamina, a histidina descarboxilase (Hdc). Os camundongos mutantes mostraram um padrão comportamental distinto durante a exploração de um novo ambiente, especificamente, maior frequência na auto-limpeza próximo às paredes, saltos e agitação anormal da cabeça e corpo. Esse fenótipo comportamental foi associado à diminuição dos níveis de dopamina e serotonina no estriado e ao aumento do nível de metabólito dopaminérgico DOPAC.

Neste estudo, demonstramos que a histamina facilita o aprendizado e a coordenação motora de camundongos por meio da ativação dos receptores H₁ e H₂ da histamina no vérmis cerebelar e não se pode descartar que outros neurotransmissores participem desse processo, como dopamina e serotonina.

6.4. O bloqueio do autoreceptor H₃ pela tioperamida pode modular processos motores e cognitivos via receptores H₁ e H₂ ou via excitação de outros neurotransmissores

Neste estudo, a administração do antagonista seletivo do autoreceptor e heteroreceptor H₃, tioperamida, mostrou uma diminuição substancial do tempo de permanência dos camundongos testados no rota-rod na dose mais alta no último estágio do teste (Fig.17a e 17b).

O antagonista H₃ é um receptor acoplado à proteína G, e capaz de sinalizar sozinho, isto é, sem ativação por um agonista, e, portanto, exibe atividade constitutiva. A ativação do receptor H₃ inibe a síntese de histamina através das vias da adenilato ciclase/proteína quinase A e da proteína quinase tipo II (CaMKII) dependente de cálcio/calmodulina. Além disso, ele pode ativar a liberação mediada pela fosfolipase A2 (PLA2) da atividade do ácido araquidônico (AA) e da fosfoinositol-3-quinase, resultando na ativação do eixo Akt / glicogênio sintase quinase (GSK) -3β (Leurs *et al.*, 2005). Desta forma, esperava-se que um composto que bloqueia os canais de inibição de histamina, apresentasse um resultado de facilitação na liberação histaminérgica, e, conseqüentemente, mostrasse uma melhora do desempenho motor dos camundongos testados no rota-rod, como mostrado nos resultados do grupo histamina (Fig. 8a e 8b)

Uma explicação para este resultado está na própria conformação do receptor H₃. A heterogeneidade do receptor H₃ foi revelada em um estudo de microdiálise, onde a administração local de antagonista do receptor H₃ no TMN causou a liberação variável de histamina em diferentes áreas do cérebro: enquanto a concentração aumentou na TMN, no núcleo basal da magnocelular (NBM) e no córtex pré-frontal (PFC), permaneceu inalterada no estriado e núcleo accumbens (NAc) (Giannoni *et al.*, 2010). Houve, então, regulação diferencial na liberação de neurotransmissores de uma maneira específica de acordo com a região no cérebro, e o efeito do bloqueio do receptor H₃ no vérmis cerebelar ainda foi pouco discutido na literatura.

Além de atuar como um autoreceptor pré-sináptico para modular negativamente a síntese e liberação de histamina, o receptor H₃ também pode exercer o papel de um heterorreceptor pré-sináptico para inibir a liberação de vários outros neurotransmissores (Leurs *et al.*, 2000), como noradrenalina, acetilcolina, glutamato e GABA. A expressão e distribuição dos receptores H₃ no cerebelo foram observadas em roedores, porcos e seres humanos, em distribuições diferentes. Em ratos, usando um riboprobe marcado com ³³P para hibridização *in situ*, uma forte expressão de mRNA do receptor H₃, foi encontrada na maioria das células de Purkinje, bem como nos núcleos cerebelares, incluindo os núcleos fastigiais cerebelares (FN) e núcleos cerebelares profundos (IN) (Pillot *et al.*, 2002). Mas havia uma ligação detectável escassa ou muito baixa dos receptores H₃ nas

células de Purkinje, indicada por R-[3H] α -metil-histamina ou [125I]iodoproxifano para autoradiografia (Pillot *et al.*, 2002;), sugerindo que os receptores H₃ são expressos em projeções eferentes, em vez dasomata ou nos dendritos das células de Purkinje em ratos.

Paralelamente, uma alta expressão de mRNA do receptores foram observados em porquinhos da índia (Tardivel-Lacombe *et al.*, 2000), enquanto a análise imunohistoquímica usando anticorpos anti-H₃ melhorados por afinidade (349-358) demonstrou que baixos níveis de receptores H₃ foram detectados na camada granular do cerebelo de camundongo (Chazot *et al.*, 2001), o que pode ter contribuído para os resultados encontrados no modelo animal testado neste trabalho.

O bloqueio do autoreceptor H₃ pela tioperamida evoca o aumento da liberação de histamina neuronal, e esta liberação pode modular processos motores e cognitivos via receptores H₁ e H₂ ou via interneurônios colinérgicos e GABAérgicos diretamente através da excitação dos neurônios neocorticais piramidais ou indiretamente via excitação de neurônios colinérgicos ou dopaminérgicos ascendentes (Bacciottini *et al.*, 2001; Haas e Panula, 2003; Haas *et al.*, 2008).

Como discutido na sessão anterior, a histamina pode modular indiretamente a liberação e regulação de dopamina em neurônios espinhosos médios. Varaschin *et al.* (2018) mostraram que a ativação dos receptores de histamina H₃ pela α -metil-histamina reduziu o excesso de dopamina evocada eletricamente no estriado ventral de camundongos. Além disso, α -metil-histamina não alterou a meia-vida da dopamina excedente ou a taxa de pulso emparelhado. Isso indica que a liberação reduzida de dopamina não aconteceu devido a uma inibição heterossináptica direta dos terminais dopaminérgicos dos axônios, mas sim pela inibição do disparo de interneurônios colinérgicos estriados, levando à facilitação nicotínica reduzida da liberação de dopamina. Há também um grande corpo de evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* em camundongos Hdc e Hrh3 KO que mostram que a liberação de histamina regula a atividade estriatal (Ferrada *et al.*, 2008; Kononoff *et al.*, 2016; Rapanelli, 2017).

Os resultados da trave de equilíbrio para o grupo TIO sugerem um prejuízo no desempenho de coordenação motora e equilíbrio dos animais que receberam tioperamida

na dose mais alta. O estudo de Saara *et al.* (2011) corrobora com estes dados. Os autores examinaram o papel de dois diferentes receptores H₃ (ciproxifan e JNJ-10181457) nos efeitos do etanol em um teste de Preferência por Local Condicionado (CPP), estimulação da atividade locomotora e avaliação motora através do rota-rod e trave de equilíbrio em camundongos DBA/2J. Os resultados encontrados apontaram para um aumento dos efeitos prejudiciais do etanol na trave de equilíbrio, provocando um efeito de inibição de recompensa pela substância.

6.5. Efeito de antagonistas histaminérgicos na ansiedade em camundongos

Não houve correlação entre os dados motores e não-motores em nenhum grupo nas condições experimentais realizadas neste trabalho, porém os grupos CPA (Experimento II) e RA (Experimento III) mostraram diferença significativa, em relação ao grupo controle, em número absoluto de EBA e %TBA, respectivamente.

O teste de Labirinto em Cruz Elevado é amplamente usado para medir o comportamento semelhante à ansiedade, em roedores. Pode ser usado para obter informações sobre condições como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) e outras condições marcadas pelo comportamento ansioso. Também pode ser usado como um componente na triagem de novos compostos de propriedades ansiolíticas (Kraeuter, Guest e Sarnyai, 2018). Este modelo é baseado nas tendências naturais dos roedores em evitar locais abertos e/ou elevados, contrabalanceados com a curiosidade inata de explorar áreas que são novas para eles. Em teoria, um camundongo menos ansioso visitará os braços abertos e mais expostos do labirinto com mais frequência, enquanto um animal ansioso tenderá a passar mais tempo nos braços fechados (File, 1987).

O grupo que recebeu o antagonista de H₁ CPA mostrou uma diminuição de entradas no EBA na dose 0,052 nmol em relação ao grupo controle no teste de LCE, porém a mesma dose também mostrou o efeito de diminuição de entradas no EBF. Este resultado não é capaz de sugerir um efeito ansiogênico, uma vez que não houve evitação dos braços abertos e sim uma diminuição de exploração, confirmada pelos valores de %EBA que não mostraram diferença significativa entre os grupos.

O grupo que recebeu o antagonista do receptor H₂ RA mostrou um aumento tanto em número absoluto do TBA quanto em %TBA em relação ao grupo controle no teste de LCE, o que sugere um efeito ansiolítico nesta dose, uma vez que o animal esteve mais tempo nos braços abertos ao invés de evitá-lo. Este resultado corrobora com outro estudo em nosso laboratório, em um aparato diverso. Usando o Labirinto em T-Elevado (LTE), Silva-Marques *et al.* (2016) notaram um aumento da esquia inibitória de animais que receberam agonista histaminérgico na dose mais alta.

7. Conclusão

Em conclusão, os resultados mostraram uma facilitação da histamina na dose mais alta na avaliação do aprendizado e desempenho motor no rota-rod. Além disso, os resultados mostraram um comprometimento quando testados na dose de 0,052 nmol de CPA nas doses mais baixas de ranitidina e mais alta de tioperamida. Isso sugere que as projeções histaminérgicas cerebelares estão envolvidas no aprendizado motor e desempenham um papel regulador no circuito cerebelar para garantir que os movimentos sejam realizados com eficiência.

Diante desses dados e estudos, hipotetizamos que as projeções histaminérgicas hipotalamocerebelares, associadas a outros neurorreceptores como a dopamina, podem reduzir comportamentos anormais e melhorar a coordenação e o aprendizado motor, desempenhando um papel facilitador no circuito cerebelar para garantir que os movimentos sejam executados com precisão. Sugerimos, portanto, mais estudos que possam apresentar uma interligação entre o sistema histaminérgico e dopaminérgico na relação entre os comprometimentos motores e emocionais.

8. Referências Bibliográficas

1. Abdurakhmanova, S; Semenova, S; Piepponen, TP and Panula, P. Abnormal behavior, striatal dopamine turnover and opioid peptide gene expression in histamine-deficient mice. *Genes Brain Behav.* 18(8):e12595. (2019) DOI: 10.1111/gbb.12595.
2. Alcaro, A and Panksepp, J. The SEEKING mind: Primal neuro-affective substrates for appetitive incentive states and their pathological dynamics in addictions and depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (2011) DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.03.002.
3. Anichtchik OV, Rinne JO, Kalimo H, Panula P. An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 163(1):20–30 (2000). DOI: 10.1006/exnr.2000.7362.
4. Arrang JM, Garbarg M e Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*, v. 302, p. 832-837, (1983) DOI: 10.1038/302832a0.
5. Arrang J - M, Devaux B, Chodkiewicz J - P e Schwartz J - C., H3 - Receptors Control Histamine Release in Human. *Brain. Journal of Neurochemistry*, 51: 105-108. (1988) DOI:10.1111/j.1471-4159.1988.tb04841.x.
6. Bacciottini L, Passani MB, Mannaioni PF e Blandina P. Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 124, 183–194 (2001) DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00230-3.

7. Baldaçara L, Borgio JGF, Lacerda ALT, Jackowski AP. Cerebellum and psychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 30, n. 3, p. 281-289 (2008) DOI: 10.1590/S1516-44462008000300016.
8. Bloedel JR, Bracha V, Kelly TM, Wu JZ. Substrates for motor learning: Does the cerebellum do it all? *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 627, p. 305-318 (1991) DOI: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb25934.x.
9. Bostan AC, Dum RP E Strick PL. The basal ganglia communicate with the cerebellum. *PNAS* May 4, 107 (18) 8452-8456 (2010) DOI: 10.1073/pnas.1000496107.
10. Brown RE, Stevens D, Haas H. The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology*, v. 63, p. 637-72 (2001) DOI: 10.1016/S0301-0082(00)00039-3.
11. Brioni JD, Esbenshade TA, Garrison TR, Bitner SR e Cowart MD. Discovery of histamine H3 antagonists for the treatment of cognitive disorders and Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 38–46 (2011) DOI: 10.1124/jpet.110.166876.
12. Canto-de-Souza A, Nunes-de-Souza RL, Rodgers RJ. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Research*, v. 928, p. 50-59 (2002) DOI: 10.1016/s0006-8993(01)03354-6.
13. Chazot PL, Hann V, Wilson C, Lees G, Thompson CL: Immunological identification of the mammalian H3 histamine receptor in the mouse brain. *Neuroreport* 12: 259–262. (2001) DOI: 10.1097/00001756-200102120-00016

14. Chazot PL. Histamine pharmacology: four years on. *Br J Pharmacol* 170(1):1–3 (2013). DOI: 10.1111/bph.12319
15. Costa-Neto J. Efeitos da microinjeção intravérmis cerebelar de tioperamida na consolidação da memória emocional de camundongos, 55 F. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (2013).
16. Drahl C. Curtain rises on potential drugs. ACS meeting news: medicinal chemists disclose candidates for treating neurological, metabolic, and other disorders. *Chem. Eng. News* 87, 31–33 (2009) DOI: 10.1021/cen-v087n017.p031.
17. Eban-Rothschild A, Giardino WJ, de Lecea L. To sleep or not to sleep: neuronal and ecological insights. *Curr Opin Neurobiol* 44:132–138 (2017). DOI: 10.1016/j.conb.2017.04.010.
18. Ferrada C, Ferré S, Casadó V, Cortés A, Justinova Z, Barnes C, Canela EI, Goldberg SR, Leurs R, Lluís C, Franco R. Interactions between histamine H3 and dopamine D2 receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology*, Volume 55, Issue 2, Pages 190-197 (2008) DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.008.
19. File SE. The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. *Neuropharmacology* 26(7B):877–886 (1987) DOI: 10.1016/0028-3908(87)90065-7
20. Galeotti N, Sanna MD, Ghelardini C. Pleiotropic effect of histamine H4 receptor modulation in the central nervous system. *Neuropharmacology*, v.71, p. 141–147 (2013) DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.026

21. Garção DC, Canto-de-Souza L, Romanguera F, Mattioli R. Chlorpheniramine impairs functional recovery in *Carassius auratus* after telencephalic ablation, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 375 – 379 (2009) DOI: 10.1590/S0100-879X2009000400010.
22. Giacobini E e Becker RE. One hundred years after the discovery of Alzheimer's disease. A turning point for therapy? *J. Alzheimers Dis.* 12, 37–52. (2007) DOI: 10.3233/jad-2007-12105.
23. Gianlorenço ACL, Canto-de-Souza A e Mattioli R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. *Brain Res Bull*, v. 86, p. 134-138 (2011) DOI: 10.1016/j.brainresbull.2011.05.014.
24. Gianlorenço, ACL, Serafim, KR, Canto-de-Souza, A and Mattioli, R. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H1 but not H2 receptors, *Brain Res. Bull.* 89, 197–202 (2012) DOI: 10.1016/j.brainresbull.2012.09.003.
25. Gianlorenço, ACL; Canto-de-Souza, A and Mattioli, R. Intra-cerebellar microinjection of histamine enhances memory consolidation of inhibitory avoidance learning in mice via H2 receptors, *Neurosci. Lett*, v. 557, p. 159–164 (2013) DOI: 10.1016/j.neulet.2013.10.017.
26. Gianlorenço ACL, Serafim KR, Canto-de-Souza A, Mattioli R. Effects of histamine H1 and H2 receptor antagonists microinjected into the cerebellar vermis on emotional memory consolidation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.47(2), p.135-143 (2014) DOI: 10.1590/1414-431X20133429.

27. Gianlorenço ACL, Riboldi AM, Silva-Marques B e Mattioli R. Cerebellar vermis H2 receptors mediate fear memory consolidation in mice, *Neurosci. Lett.* 57–61 (2015) DOI: 10.1016/j.neulet.2014.12.017.
28. Guilherme, EM; Silva-Marques, B; Fernandes, CEM; Russo, TL; Mattioli, R and Gianlorenço, ACL. Intracerebellar microinjection of histaminergic compounds on locomotor and exploratory behaviors in mice. *Neuroscience Letters*, Volume 687, Pages 10-15 (2018) DOI: 10.1016/j.neulet.2018.09.022.v.
29. Haas HL, Panula P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n. 2, p. 121-30 ISSN 1471- 003X (2003) DOI: 10.1038/nrn1034.
30. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev*, v. 88, n. 3, p. 1183-241, ISSN 0031-9333 (2008) DOI: 10.1152/physrev.00043.2007.
31. He X, Ishizeki M, Mita N, Wada S, Araki Y, Ogura H, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Mikoshiba K, Inoue T, Oshima T. Cdk5/p35 is required for motor coordination and cerebellar plasticity. *Journal of Neurochemistry*, v. 131, p. 53-64 (2014) DOI: 10.1111/jnc.12756.
32. Hoshi E, Tremblay L, Féger J, Carras PL e Strick PL. The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat Neurosci* 8:1491–1493 (2005) DOI: 10.1038/nn1544.
33. Inagaki N, Yamatodani A, Shinoda K, PanulaP,Watanabe T, Shiotani Y et al. Histaminergic nerve fibers in the median eminence and hypophysis of rats demonstrated

immunocytochemically with antibodies against histidine decarboxylase and histamine.

Brain Res 439: 402–405. (1988) DOI: 10.1016/0006-8993(88)91503-x.

34. Jeremy D, Schmahmann MD. The Cerebellum in behavioral Neurology and Neuropsychiatry. Spring-The Official Publication of the National Ataxia Foundation, v. 36, nº 1 (2008) DOI: 10.1080/14734220701490995.

35. Jutel, M; Blaser, K and Akdis, CA. Histamine in Allergic Inflammation and Immune Modulation Int Arch Allergy Immunol 137:82–92 (2005) DOI: 10.1159/000085108.

36. Katoh Y, Niimi M, Yamamoto Y, Kawamura T, Morimoto-Ishizuka T, Sawada M et al. Histamine production by cultured microglial cells of the mouse. Neurosci Lett 305: 181–184. (2001) DOI: 10.1016/s0304-3940(01)01835-3.

37. Kim YS, Kim YB, Kim WB, Yoon BE, Shen FY, Lee SW, Soong TW, Han HC. Histamine resets the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus through the H1R-CaV 1.3-RyR pathway in the mouse. Eur J Neurosci 42(7):2467–2477 (2015). DOI: 10.1111/ejn.13030.

38. Köhler CA et al. Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. Neural Plasticity, v. 2011, p. 1-16 (2011) DOI: 10.1155/2011/328602.

39. Kononoff JV, Nuutinen S, Tuominen M e Panula P. Histamine H3 Receptor Regulates Sensorimotor Gating and Dopaminergic Signaling in the Striatum. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 357 (2) 264-272 (2016) DOI: 10.1124/jpet.115.230771.

40. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. Neuropsychiatric sequelae of early nutritional modifications: a Beginner's guide to behavioral analysis. *Methods Mol Biol* 1735:403–420 (2018) DOI: 10.1007/978-1-4939-7614-0_28.
41. Leurs R, Hoffmann M, Wieland K, Timmerman H: H3 receptor gene is cloned at last. *Trends Pharmacol Sci* , 21: 11–12. (2000) DOI: 10.1016/S0165-6147(99)01411-X
42. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H e de Esch IJ. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 107–122. (2005) DOI: 10.1038/nrd1631.
43. Leurs R, Vischer HF, Wijtman M e de Esch IJ. En route to new blockbuster anti-histamines: surveying the offspring of the expanding histamine receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 250–257 (2011) DOI: 10.1016/j.tips.2011.02.004.
44. Lian J, De Santis M, He M, Deng C Risperidone-induced weight gain and reduced locomotor activity in juvenile female rats: the role of histaminergic and NPY pathways (2015). *Pharmacol Res* 95-96: 20–26. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.03.004.
45. Li B, Zhu J e Wang J. Histaminergic afferent system in the cerebellum: structure and function. *cerebellum ataxias* 1, 5 (2014) DOI: 10.1186/2053-8871-1-5.
46. Li WC, Tang XH, Li HZ, Wang JJ: Histamine excites rat cerebellar granule cells in vitro through H-1 and H-2 receptors. *J Physiology Paris* 93:239–244 (1999) DOI: 10.1016/S0928-4257(99)80157-0.

47. Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol. Pharmacol.* 55, 1101–1107 (1999).
48. Lovenberg TW e Carruthers NI. The first potent and selective non- imidazole human histamine H4 receptor antagonists. *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 3957-3960, 2003.
49. Li B, Zhu J-N, Wang J-J. Histaminergic afferent system in the cerebellum: structure and function. *Cerebellum Ataxias* 1:5 (2014) DOI:10.1186/2053-8871-1-5.
50. Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-García JM, da Guarda SN, Gerwig M, Habas C, Hagura N, Ivry RB, Mariën P, Molinari M, Naito E, Nowak DA, Oulad Ben Taib N, Pelisson D, Tesche CD, Tilikete C, Timmann D. Consensus Paper: Roles of the cerebellum in motor control – the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum*, v.11, p. 457-487 (2012) DOI: 10.1007/s12311-011-0331-9.
51. Mogenson GJ, Jones DL e Yim CY. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol.* 14(2-3):69-97(1980) DOI: 10.1016/0301-0082(80)90018-0.
52. Nuutinen S, Vanhanen J, Pigni MC, Panula P. Effects of histamine H3 receptor ligands on the rewarding, stimulant and motor-impairing effects of ethanol in DBA/2J mice, *Neuropharmacology*, Volume 60, Issues 7–8, Pages 1193-1199, (2011) DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.10.027.
53. Nuutinen S, Karlstedt K, Aitta-Aho T, Korpi ER e Panula P. Histamine and H3 receptor-dependent mechanisms regulate ethanol stimulation and conditioned place

preference in mice. *Psychopharmacology* 208, 75–86 (2010) DOI: 10.1007/s00213-009-1710-5.

54. Panksepp, J. The basic emotional circuits of mammalian brains: do animals have affective lives? *Neurosci Biobehav Res.* Oct;35(9):1791-804 (2011) DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.08.003.

55. Panula P, Yang HY, Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Nat Acad Sci* 81: 2572–2576 (1984) DOI: 10.1073/pnas.81.8.2572.

56. Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS. Histamine immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28: 585–610 (1989) DOI: 10.1016/0306-4522(89)90007-9.

57. Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WLS et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacol Rev* 67: 601–655 (2015) DOI: 10.1124/pr.114.010249.

58. Passani MB, Lin JS, Hancock A, Crochet S e Blandina P. The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorder. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 618–625 (2004) DOI: 10.1016/j.tips.2004.10.003.

59. Paxinos G e Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Elsevier Science, California (2001).

60. Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM: A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*, 114: 173–193. (2002) DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00135-5.
61. Popa LS, Hewitt AL e Ebner TJ. The cerebellum for jocks and nerds alike. *Frontiers in systems neuroscience*, 8, 113 (2014) DOI: 10.3389/fnsys.2014.00113.
62. Zhuang Q-X, Xu H-T, Lu X-J; Li B, Yung W-H, Wang J-J e Jing-Ning Zhu. Histamine Excites Striatal Dopamine D1 and D2 Receptor-Expressing Neurons via Postsynaptic H1 and H2 Receptors. *Molecular Neurobiology*. 55, pages8059–8070 (2018) DOI: 10.1007/s12035-018-0976-1.
63. Quin YT, Ma SH, Zhuang QX, Qiu YH, Li B, Peng YP, Wang JJ. Histamine evokes excitatory response of neurons in the cerebellar dentate nucleus via H2 receptors. *Neuroscience Letters*, v. 502, n. 3, p. 133-137 (2011) DOI: 10.1016/j.neulet.2011.05.241.
64. Rai B, Tawa GJ, Katz AH, Humblet C. Modeling G protein-coupled receptors for structure-based drug discovery using low-frequency normal modes for refinement of homology models: Application to H3 antagonists. *Proteins*, Vol. 78, pp. 457 – 473 (2009) DOI: 10.1002/prot.22571.
65. Rapanelli M. The magnificent two: histamine and the H3 receptor as key modulators of striatal circuitry. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Volume 73, Pages 36-40, (2017) DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.10.002.

66. Sacchetti B, Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C. Cerebellar role in fear-conditioning consolidation. *Proceeding of National Academy of Science of the United States of America*, v. 99, p. 8406-11 (2002) DOI: 10.1073/pnas.112660399
67. Sacchetti B, Scelfo B, Tempia F e Strata P. Long-term synaptic changes induced in the cerebellar cortex by fear conditioning. *Neuron*, v.42, p. 973-982 (2004). DOI: 10.1016/j.neuron.2004.05.012.
68. Sacchetti B, Sacco T, Strata P. Reversible inactivation of amygdala and cerebellum but not perirhinal cortex impairs reactivated fear memories. *European Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 2875-2884 (2007) DOI: 10.1111/j.1460-9568.2007.05508.x
69. Sacchetti B, Scelfo B, Strata P. Cerebellum and emotional behavior. *Neuroscience*, v.162, p. 756-762 (2009) DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.064.
70. Sanna MD, Ghelardini C, Thurmond R, Masini E, Galeotti N. Behavioural phenotype of histamine H4 receptor knockout mice: Focus on central neuronal functions. *Neuropharmacology*, Vol 114, Pages 48-57 (2017) DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.11.02.
71. Sander K, Kottke T e Stark H. Histamine H3 receptor antagonists go to clinics. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 2163–2281 (2008) DOI: 10.1248/bpb.31.2163.

72. Selbach O, Brown RE, Haas HL. Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP. *Neuropharmacology* 36, 1539–1548 (1997) DOI: 10.1016/S0028-3908(97)00144-5.
73. Serafim KR, Gianlorenço ACL, Daher FP, Mattioli R. H1-histamine receptors in the amygdala are involved in emotional memory but not mediate anxiety-related behaviors in mice submitted to EPM testing. *Brain Research Bulletin*, v. 89, p. 1-7 (2012) DOI: 10.1016/j.brainresbull.2012.06.009.
74. Silva-Marques B, Gianlorenço ACL, Mattioli R. Intracerebellar vermis histamine facilitates memory consolidation in the elevated T maze model, *Neuroscience Letters*, Volume 620, Pages 33-37, ISSN 0304-3940 (2016) DOI: 10.1016/j.neulet.2016.03.010.
75. Silverman AJ, Millar RP, King JA, Zhuang X, Silver R. Mast cells with gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactivity in the brain of doves. *Proc Nat Acad Sci* 91: 3695–3699 (1994) DOI: 10.1073/pnas.91.9.3695.
76. Song Y-N, Li H-Z, Zhu J-N, Guo C-L e Wang J-J. Histamine improves rat rotarod and balance beam performances through H2 receptors in the cerebellar interpositus nucleus. *Neuroscience* Vol 140, Issue 1, Pages 33-43 (2006) DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.045.
77. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30(5):228–235 (2007) DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.008.

78. Takeda N, Inagaki S, Taguchi Y, Tohyama M, Watanabe T, Wada H. Origins of histamine-containing fibers in the cerebral cortex of rats studied by immunohistochemistry with histidine decarboxylase as a marker and transection. *Brain Res* 323: 55–63 (1984) DOI: 10.1016/0006-8993(84)90264-6.
79. Tardivel-Lacombe J, Rouleau A, Heron A, Morisset S, Pillot C, Cochois V, Schwartz JC, Arrang JM: Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H3 receptor: evidence for two isoforms. *Neuroreport* , 11: 755–759. (2000) DOI: 10.1097/00001756-200003200-00020.
80. Tian L, Wen YQ, Li HZ, Zuo CC, Wang JJ: Histamine excites rat cerebellar Purkinje cells via H2 receptors in vitro. *Neurosci Res*, 36:61–66 (2000) DOI: 10.1016/s0168-0102(99)00109-1.
81. Tiligada E, Zampeli E, Sander K e Stark H. Histamine H3 and H4 receptors as novel drug targets. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1519–1531 (2009) DOI: 10.1517/14728220903188438.
82. Varaschin RK, Allen NA, Rosenberg MJ, Valenzuela CF e Savage DD, Prenatal Alcohol Exposure Increases Histamine H3 Receptor - Mediated Inhibition of Glutamatergic Neurotransmission in Rat Dentate Gyrus. *Alcohol Clin Exp Res*, 42: 295-305. (2018) DOI: 10.1111/acer.13574.
83. Yamakami J, Sakurai E, Kuramasu A, Yanai K, Watanabe T, Tanaka Y. L-Histidine decarboxylase protein and activity in rat brain microvascular endothelial cells. *Inflamm Res* 49: 231–235 (2000) DOI: 10.1007/s000110050584.

84. Zhu L, Scelfo B, Hartell NA, Strata P e Sacchetti B. The effects of fear conditioning on cerebellar LTP and LTD. *European Journal of Neuroscience*, v. 26, p. 219-227 (2007) DOI: 10.1111/j.1460-9568.2007.05632.x.

85. Zhuang X, Silverman AJ, Silver R. Distribution and local differentiation of mast cells in the parenchyma of the forebrain. *J Comp Neurol* 408: 477–488 (1999) DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990614)408:4<477::AID-CNE3>3.0.CO;2-O.

Anexos

8.1. Anexo I – Certificado de aprovação no CEUA/UFSCar

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "INFLUÊNCIA DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO CEREBELAR NO DESEMPENHO MOTOR DE CAMUNDONGOS", protocolado sob o CEUA nº 4949260515, sob a responsabilidade de **AnnaCarolyna Lepesteur Gianlorenço** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) em reunião de 18/06/2015.

We certify that the proposal "INFLUENCE OF CEREBELLAR HISTAMINERGIC SYSTEM ON MOTOR PERFORMANCE OF MICE", utilizing 200 Heterogenics mice (200 males), protocol number CEUA 4949260515, under the responsibility of **AnnaCarolyna Lepesteur Gianlorenço** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 06/18/2015.

Vigência da Proposta: de 05/2015 a 12/2017

Laboratório: Fisioterapia

Procedência: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 21 a 35 dias N: 200

Linhagem: SUÍCO ALBINO

Peso: 25 a 40 g

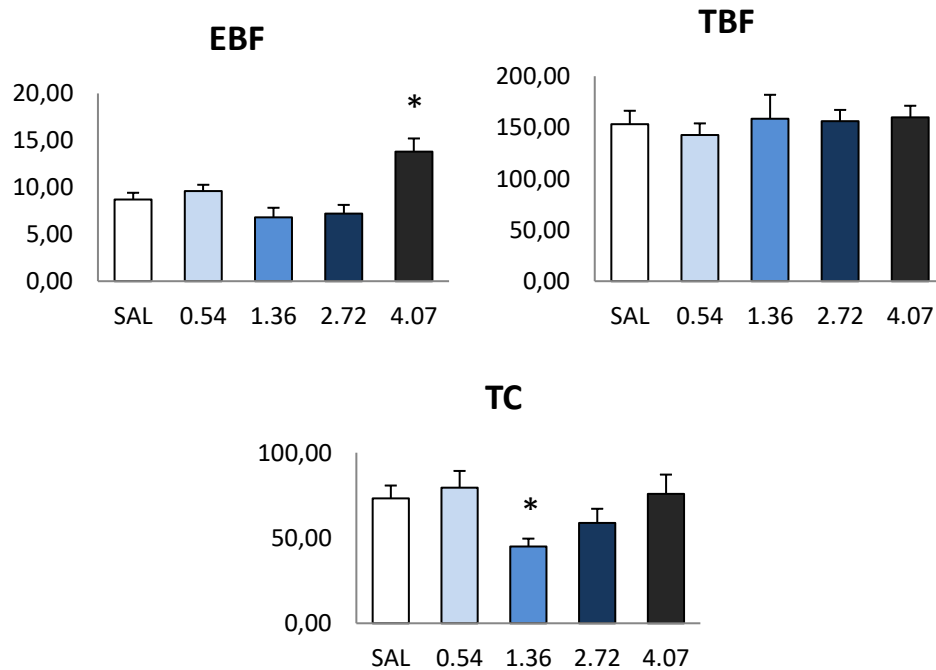
Nota: RESUMO Evidências experimentais indicam que o cerebelo está envolvido em funções motoras e não motoras. Visto que nossos recentes resultados demonstraram a participação do sistema cerebelar histaminérgico na consolidação da memória emocional, este estudo tem como principal objetivo investigar a atuação do sistema neural histaminérgico no desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos via vérmis cerebelar e estabelecer uma possível interação desse sistema no processamento de funções motoras e não motoras. Serão realizados experimentos que investigarão os efeitos dose-dependentes de histamina, microinjetada no vérmis cerebelar; os efeitos da microinjeção de antagonista do receptor H1 (Clorfeniramina); e os efeitos da microinjeção de antagonista do receptor H2 (Ranitidina) sobre a ansiedade, o desempenho motor e a aprendizagem motora de camundongos. Para isso serão utilizados os modelos de campo aberto, labirinto em cruz elevado, Rota-rod e trave de equilíbrio. A análise estatística incluirá o teste de homogeneidade e análise de variância (ANOVA), seguido por teste post-hoc adequados ao desenho experimental.

São Carlos, 18 de junho de 2015

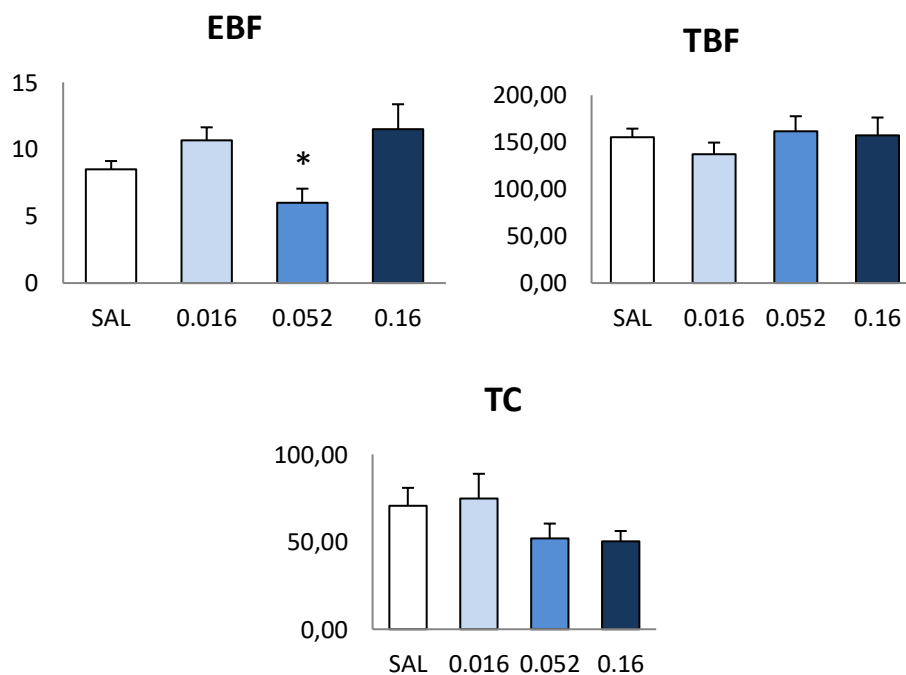
Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

8.2. Anexo II – Dados Complementares (LCE)

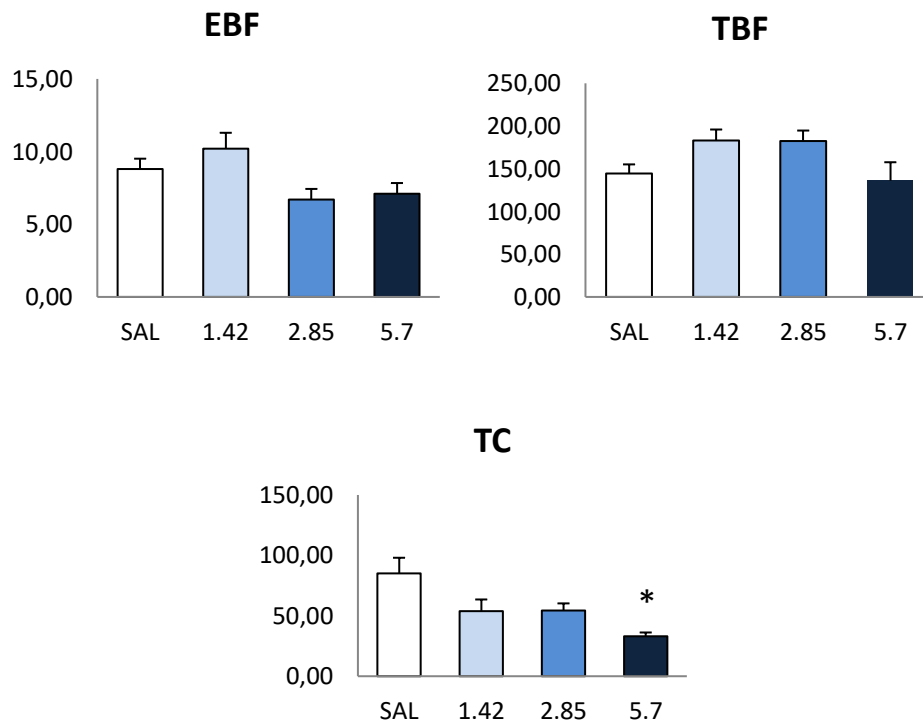
Experimento I – Grupo Histamina. Resultados do LCE: Entrada nos braços fechados (EBF), Tempo nos braços fechados (TBF) e Tempo no Centro (TC)



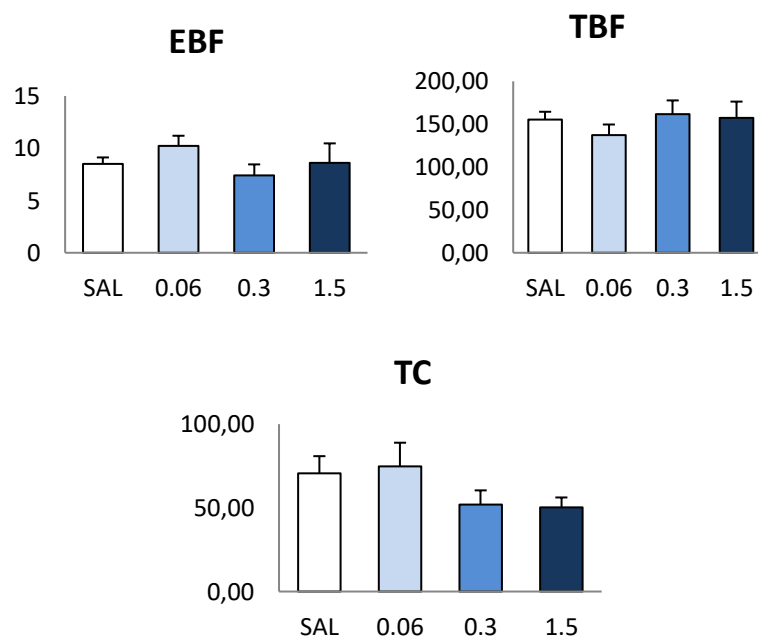
Experimento II – Grupo CPA. Resultados do LCE: Entrada nos braços fechados (EBF), Tempo nos braços fechados (TBF) e Tempo no Centro (TC)



Experimento III – Grupo RA. Resultados do LCE: Entrada nos braços fechados (EBF), Tempo nos braços fechados (TBF) e Tempo no Centro (TC)



Experimento IV – Grupo TIO. Resultados do LCE: Entrada nos braços fechados (EBF), Tempo nos braços fechados (TBF) e Tempo no Centro (TC)



8.3. Anexo III – Dados Complementares: correlações entre desempenho motor e ansiedade

Histamina

Tabela 7 – Correlação entre os estágios de treino motor (R1, R2 e R3) e avaliação de ansiedade (EBA e TBA) pelo coeficiente de Pearson (Grupo Histamina)				
DOSES	FRACA	MODERADA	FORTE	MUITO FORTE
SALINA	R1xR3 (,092) R1xEBA (-,454) R1xTBA (,084) R2xEBA(,296) R2xTBA (,245) R3xTBA (,201)	R1xR2 (0,635) R3xEBA (0,584)	R2XR3 (0,728)	
0.54	R1xR3 (,456) R1xEBA (-,132) R1xTBA (-,124) R2xEBA(-,393) R2xTBA (-,397) R3xEBA (-,063) R3xTBA (-,081)		R1xR2 (,738) R2xR3 (,824)	
1.36	R1xTBA (-,461) R3xEBA (-,458) R3xTBA (-,267)	R1xR3 (,655) R2xTBA (-,581)	R1xR2 (,823) R1xEBA (-,744) R2xR3 (,700) R2xEBA (-,719)	
2.72	R1xEBA (,190) R1xTBA (,470) R2xR3 (,415) R2xEBA (,323) R3xEBA (,071)	R1xR3 (,618) R3xTBA (,504)	R1xR2 (,798) R2xTBA (,783)	

4.07	R1xEBA (,277)	R1xR2 (,609)	R2xR3 (,829)	
	R1xTBA (,325)	R1xR3 (,695)		
	R2xEBA (,200)			
	R2xTBA (,207)			
	R3xEBA (,295)			
	R3xTBA (,231)			

Clorfeniramina

Tabela 8 – Correlação entre os estágios de treino motor (R1, R2 e R3) e avaliação de ansiedade (EBA e TBA) pelo coeficiente de Pearson (Grupo CPA)				
DOSES	FRACA	MODERADA	FORTE	MUITO FORTE
SALINA	R1xR2 (-,034) R1xR3 (,442) R1xEBA (-,244) R1xTBA (-,455) R2xEBA (,021) R2xTBA (,268) R3xEBA (-,091) R3xTBA (,136)		R2xR3 (,777)	
0.016	R1xR3 (,473) R1xEBA (,198) R1xTBA (,024) R2xTBA (-,348) R3xEBA (-,074) R2xTBA (,047)	R1xR2 (,648) R2xR3 (,601) R2xEBA (,639)		
0.052	R1xR3 (,200) R1xEBA (,050) R1xTBA (-,061) R2xR3 (,388)		R1xR2 (,725)	

	R2xEBA (,292) R2xTBA (-,288) R3xEBA (,440) R3xTBA (-,419)			
0.16	R1xR2 (,234) R1xR3 (-,231) R1xEBA (-,264) R1xTBA (-,221) R2xEBA (,177) R2xTBA (,016) R3xEBA (,353) R3xTBA (, 008)	R2xR3 (,699)		

Ranitidina

Tabela 9 – Correlação entre os estágios de treino motor (R1, R2 e R3) e avaliação de ansiedade (EBA e TBA) pelo coeficiente de Pearson (Grupo RA)				
DOSES	FRACA	MODERADA	FORTE	MUITO FORTE
SALINA	R1xEBA (,016) R1xTBA (,248) R2xEBA (,325) R2xTBA (-,353) R3xEBA (,353) R3xTBA (-,071)		R1xR2 (,788) R1xR3 (,840) R2xR3 (,793)	
1.42	R1xEBA (-,019) R1xTBA (-,030) R2xEBA (-,109) R2xTBA (-,066) R3xEBA (,003) R3xTBA (,236)		R1xR2 (,829) R1xR3 (,830) R2xR3 (,774)	

2.85	R1xEBA (,136) R1xTBA (,014) R2xEBA (,413) R2xTBA (-,016) R3xEBA (,228) R3xTBA (-,202)	R1xR3 (,670)	R1xR2 (,766) R2xR3 (,757)	
5.7	R1xEBA (-,035) R1xTBA (,003) R2xTBA (-,479) R3xTBA (-,392)	R1xR3 (,564) R2xEBA (,568) R3xEBA (-,636)	R1xR2 (,705) R2xR3 (,776)	