



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA



EVELYN MARIA GUILHERME

**Interação dos sistemas histaminérgico e dopaminérgico cerebelar na
modulação de funções motoras e não motoras em camundongos**

São Carlos
2022

EVELYN MARIA GUILHERME

**Interação dos sistemas histaminérgico e dopaminérgico cerebelar na
modulação de funções motoras e não motoras em camundongos**

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos
para obtenção do título de doutora em fisioterapia.

Área de concentração: Processos básicos,
desenvolvimento e recuperação funcional do sistema
nervoso central.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anna Carolyna Lepesteur
Gianlorenço

São Carlos
2022

Nome: GUILHERME, Evelyn Maria

Título: Interação dos sistemas histaminérgico e dopaminérgico cerebelar na modulação de funções motoras e não motoras em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de doutora em fisioterapia.

Aprovado em: 06/05/2022

Banca Examinadora

Profa. Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Julgamento: Aprovada

Prof. Luiz Fernando Takase

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Flávia Roberta Faganello Navega

Instituição: Universidade Estadual de São Paulo - UNESP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Gustavo Christofoleti

Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

Julgamento: Aprovada

Suplentes

Profa. Dra. Kelly Regina Serafim

Instituição: Universidade Central Paulista - UNICEP

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Prof. Dr. Gustavo Provensi

Instituição: Universidade de Florença (Itália) – UNIFI

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço pela orientação durante as atividades desenvolvidas para a elaboração desta tese, e pela confiança constante em meu trabalho.

Aos professores Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi, Dr. Luiz Fernando Takase, Dra. Flávia Roberta Faganello Navega, Dr. Gustavo Christofoleti, Dra. Kelly Regina Serafim, Dra. Anabelle Silva Cornachione e Dr. Gustavo Provensi por aceitarem compor a banca avaliadora desta tese de doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Neurociências que contribuíram para a conclusão desta pesquisa: Bruna, Carlos Eduardo, e José Mário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio institucional, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2017/24879-2) pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro oferecido.

Ao *Government of Canada, Global Affairs Canada (GAC)* e *Canadian Bureau for International Education (CBIE)*, pelo incentivo à internacionalização e concessão de apoio financeiro para realização de estágio em pesquisa no ano de 2018 através do *Emerging Leaders of The Americas Program (ELAP)*.

Aos mentores e colegas da *University of British Columbia* pelo intenso aprendizado proporcionado em um curto período.

Por fim, agradeço e presto minha homenagem à vida dos animais sujeitos desse projeto de pesquisa, e todos os animais em prol do desenvolvimento científico e tecnológico.

RESUMO

GUILHERME, Evelyn Maria. **Interação dos sistemas histaminérgico e dopaminérgico cerebelar na modulação de funções motoras e não motoras em camundongos**. 2022. 97f. Tese (Doutorado em Fisioterapia), Universidade Federal de São Carlos, 2022.

A interação entre neurotransmissores pode gerar diversas possibilidades para integração sináptica. Evidências sugerem que o cerebelo está envolvido no processamento de funções motoras e não motoras. Contudo, a interação entre o sistema histaminérgico e dopaminérgico cerebelar na modulação dessas funções é pouco explorada. Este estudo teve como objetivo investigar o papel do sistema dopaminérgico cerebelar no comportamento motor e aprendizado motor, e na aquisição de memória emocional aversiva em camundongos, assim como investigar a interação dos sistemas histaminérgico e dopaminérgico cerebelar nas mesmas funções. Para isso, os animais receberam a implantação de uma cânula guia no vérmis cerebelar por meio de cirurgia estereotáxica, e após recuperação passaram pelo procedimento de microinjeção de drogas no volume de 0.1µl, a depender do grupo experimental no qual estavam alocados. Para avaliar o desempenho motor e aprendizagem motora dos camundongos, o tempo de permanência no Rota-rod e a latência de travessia na trave de equilíbrio foram mensurados em cinco etapas (habituação, microinjeção, estágio 1, estágio 2, estágio 3). Para avaliação da aquisição de memória emocional, os camundongos passaram por teste de esquila inibitória, e o tempo de travessia do lado claro para o lado escuro foi mensurado em todas as exposições. Após o término dos experimentos, os animais receberam uma dose profunda de anestesia, passaram por perfusão cardíaca com paraformaldeído fixador 4% em tampão fosfato salino (PBS), e seus encéfalos foram armazenados. A análise estatística dos dados comportamentais foi feita por análise de variância de medidas repetidas. O teste post hoc de Tukey foi utilizado em caso de diferenças significativas na análise de variância. A administração intravermis cerebelar isolada de Dopamina e SCH 23390 (antagonista dopaminérgico D1) não apresentaram

efeitos sobre o comportamento motor, aprendizagem motora e memória emocional nesse estudo. A microinjeção de Eticlopride (antagonista dopaminérgico D2) não apresentou efeitos sobre o comportamento motor e aprendizagem motora, porém a dose mais alta provocou melhora na aquisição de memória emocional em tarefa de esQUIVA inibitória ($p=0.01$). A injeção combinada de Histamina e SCH23390 não apresentou efeitos sobre a aquisição de memória emocional na esQUIVA inibitória. No entanto, animais que receberam essa combinação de drogas apresentaram uma piora significativa da performance e aprendizagem motora em rotarod ($p=0.02$), e uma tendência ao aumento no tempo de travessia da trave de equilíbrio ($p=0.07$). A injeção combinada de Histamina e Eticlopride não apresentou efeitos sobre a aprendizagem motora, porém provocou melhora na aquisição de memória emocional no teste de esQUIVA inibitória em camundongos neste estudo ($p=0.07$). Neste estudo, identificamos que a administração de Histamina foi capaz de potencializar a ação de doses sub efetivas dos antagonistas dopaminérgicos D1 e D2 em diferentes modelos experimentais, o que fortalece a hipótese de ação conjunta desses sistemas no processamento de funções motoras e não motoras. Receptores D1 parecem ser predominantemente relacionados à processos de aprendizagem motora, enquanto receptores D2 parecem ser predominantemente relacionados ao processamento de memórias aversivas.

Palavras-chave: cerebelo, neurotransmissores, sistema histaminérgico, sistema dopaminérgico, aprendizagem motora, memória emocional.

ABSTRACT

GUILHERME, Evelyn Maria. **Histaminergic and dopaminergic cerebellar systems interaction on modulation of motor and non-motor functions of mice.** 2022. 97f. Dissertation (PhD in Physical Therapy) – Federal University of Sao Carlos, 2022.

The interaction between neurotransmitters triggers several possibilities for synaptic integration. Evidence suggests that the cerebellum is involved in processing both motor and non-motor functions. However, the interaction between the cerebellar histaminergic and dopaminergic systems in the modulation of these functions is unclear. This study aimed to investigate the role of the cerebellar dopaminergic system in motor behavior and motor learning, and in the acquisition of aversive emotional memory in mice, as well as to investigate the interaction of the cerebellar histaminergic and dopaminergic systems in the same functions. For this, the animals received the implantation of a guide cannula into the cerebellar vermis through stereotaxic surgery. After recovery they underwent the drug microinjection procedure, with an administration of 0.1µl of the drug, depending on the experimental group in which they were allocated. To evaluate the motor performance and motor learning of the mice, the time spent on the Rota-rod and the crossing latency on the balance beam were measured in five steps (habituation, microinjection, stage 1, stage 2, stage 3). To assess the acquisition of emotional memory, the mice underwent the inhibitory avoidance test, and the time to cross from the light side to the dark side was measured at all exposures. After the end of the experiments, the animals received a deep dose of anesthesia, underwent cardiac perfusion with 4% paraformaldehyde fixative in phosphate buffered saline (PBS), and their brains were stored. Statistical analysis of behavioral data was performed by repeated measures analysis of variance. Tukey's post hoc test was used in case of significant differences in the analysis of variance. Intravermis cerebellar administration alone of Dopamine and SCH 23390 (D1 dopamine antagonist) had no effects on motor behavior, motor learning and emotional memory in this study. The microinjection of Eticlopride (D2 dopamine antagonist) had no effect on motor behavior and motor learning, but the

highest dose improved the acquisition of emotional memory in the inhibitory avoidance task ($p=0.01$). The combined injection of Histamine and SCH23390 had no effect on emotional memory acquisition in inhibitory avoidance. However, animals that received this drug combination showed a significant decrease in performance and motor learning in rotarod ($p=0.02$), and a tendency to increase the balance beam crossing time ($p=0.07$). The combined injection of Histamine and Eticlopride had no effect on motor learning, but it improved the emotional memory acquisition in the inhibitory avoidance test in mice in this study ($p=0.07$). In this study, we identified that Histamine administration was able to potentiate the action of sub-effective doses of D1 and D2 dopaminergic antagonists in different experimental models, which strengthens the hypothesis of interaction of these systems in the processing of motor and non-motor functions. D1 receptors seem to be predominantly related to motor learning processes, while D2 receptors seem to be predominantly related to the processing of aversive memories.

Keywords: cerebellum, neurotransmitters, histaminergic system, dopaminergic system, motor learning, emotional memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: representação esquemática do procedimento cirúrgico.

Figura 2: representação esquemática de teste em Rotarod.

Figura 3: fotografia de teste em trave de equilíbrio.

Figura 4: representação esquemática de teste de esquiva inibitória.

Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental para os testes de desempenho motor e aprendizagem motora.

Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para os testes de memória emocional.

Figura 7: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Dopamina em diferentes doses submetidos ao Rotarod, $p = 0.27$.

Figura 8: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Dopamina em diferentes doses submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0.18$.

Figura 9: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e SCH 23390 em diferentes doses submetidos ao Rotarod, $p = 0,72$.

Figura 10: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e SCH 23390 em diferentes doses submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0,12$.

Figura 11: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Eticlopride em diferentes doses submetidos ao Rotarod, $p = 0,69$.

Figura 12: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Eticlopride em diferentes doses submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0.35$.

Figura 13: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Dopamina em diferentes doses submetidos ao teste de esquiva inibitória, $p=0.31$.

Figura 14: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e SCH 23390 em diferentes doses submetidos ao teste de esquiva inibitória, $p = 0.01$. * Diferença significativa comparado ao grupo SCH 1,54 nmol/0,1ul.

Figura 15: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Etilopride em diferentes doses submetidos ao teste de esquiva inibitória, * $p = 0.01$.

Figura 16: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos ao Rotarod, * $p = 0.02$.

Figura 17: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos à trave de equilíbrio, * $p = 0.1$.

Figura 18: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos ao rotarod, * $p = 0.1$.

Figura 19: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0.8$.

Figura 20: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos ao teste de esquiva inibitória.

Figura 21: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos ao teste de esquiva inibitória.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais – efeitos do sistema dopaminérgico sobre o desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional de camundongos.

Tabela 2: Grupos experimentais – experimento 3a

Tabela 3: Grupos experimentais – experimento 3b

Tabela 4: Grupos experimentais – experimento 4a

Tabela 5: Grupos experimentais – experimento 4b

Tabela 6: Média da latência das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos submetidos ao Rotarod e trave de equilíbrio após microinjeção de Dopamina (DA), SCH 23390 (SCH), Eticlopride (ETI) ou salina (SAL).

Tabela 7: Média da latência de cruzamento e erro padrão da média para os grupos submetidos ao teste de aquisição de memória de esquiva inibitória após microinjeção de Dopamina (DA), SCH 23390 (SCH), Eticlopride (ETI) ou salina (SAL).

Tabela 8: Média da latência das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos submetidos ao Rotarod e trave de equilíbrio após protocolo de microinjeção combinada de Histamina e/ou SCH23390; Histamina e/ou Eticlopride.

Tabela 9: Média da latência de cruzamento e erro padrão da média para os grupos submetidos ao teste de aquisição de memória de esquiva inibitória após protocolo de microinjeção combinada de Histamina e/ou SCH23390; Histamina e/ou Eticlopride.

Tabela 10: síntese dos resultados apresentados

LISTA DE ABREVIações

BLA – amídala basolateral

CEUA – comitê de ética em experimentação animal

DOP – cloridrato de Dopamina

ETI – cloridrato de Eticlopride

PFC – córtex pré-frontal

SAL – solução salina 0,9%

SCH – cloridrato de SCH-23390

SN – substância negra

SNC – sistema nervoso central

VTA – área tegmentar ventral

SUMÁRIO

1.	CONTEXTUALIZAÇÃO	17
1.1.	INSERÇÃO NA LINHA DE PESQUISA DA ORIENTADORA E DO PROGRAMA	17
1.2.	PARCERIAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS	17
1.3.	ORIGINALIDADE, CONTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA PESQUISA PARA O AVANÇO CIENTÍFICO E RELEVÂNCIA SOCIAL	17
1.4.	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO	18
1.5.	LINK DO CURRÍCULO LATTES DO ALUNO E SEU ORCID	21
1.6.	DESCRIÇÃO DA TESE PARA O PÚBLICO LEIGO	21
2.	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.	OBJETIVOS	27
3.1.	OBJETIVO GERAL	27
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.	ASPETOS ÉTICOS E LOCAIS DE PESQUISA	28
4.2.	AMOSTRA	28
4.3.	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	28
4.4.	CIRURGIA E MICROINJEÇÃO	29
4.5.	EQUIPAMENTOS	30
4.5.1.	Rota-rod	30
4.5.2.	Trave de equilíbrio	31
4.5.3.	Caixa de Esquiva Inibitória	32
4.6.	TESTES COMPORTAMENTAIS	32
4.6.1.	Desempenho motor e aprendizagem motora	32
4.6.2.	Teste de Esquiva Inibitória	33
4.7.	GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
4.7.1.	Experimentos 1a, 1b e 1c	34
4.7.2.	Experimentos 2a, 2b e 2c	35
4.7.3.	Experimento 3a	36
4.7.4.	Experimento 3b	36

4.7.5. Experimento 4a	37
4.7.6. Experimento 4b	37
4.8. EUTANÁSIA	38
4.9. PERDAS E EXCLUSÕES DE ANIMAIS DO ESTUDO	38
4.10. ANÁLISE DE DADOS	38
4.10.1. Testes comportamentais	38
4.10.2. Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS	39
5.1. EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO CEREBELAR SOBRE O DESEMPENHO MOTOR E APRENDIZAGEM EM CAMUNDONGOS	39
5.1.1. Experimento 1a) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar de Dopamina sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos	39
5.1.2. Experimento 1b) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar do antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH 23390 sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos	41
5.1.3. Experimento 1c) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar do antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos.	43
5.2. EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO CEREBELAR SOBRE A MEMÓRIA EMOCIONAL EM CAMUNDONGOS	45
5.2.1. Experimento 2a) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar de Dopamina sobre a memória emocional de camundongos	45
5.2.2. Experimento 2b) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar do antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH 23390 sobre a memória emocional de camundongos	46
5.2.3. Experimento 2c) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar do antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride sobre a memória emocional de camundongos.....	47
5.2.4. Seleção de doses para os experimentos 3a, 3b, 4a e 4b.....	49
5.3. EFEITOS DA INJEÇÃO COMBINADA DE HISTAMINA E ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SOBRE O DESEMPENHO MOTOR E APRENDIZAGEM MOTORA DE CAMUNDONGOS	49

5.3.1. Experimento 3a: Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar combinada de Histamina e do antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH23390 sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos.	49
5.3.2. Experimento 3b: Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar combinada de Histamina e do antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos.	51
5.4. EFEITOS DA INJEÇÃO COMBINADA DE HISTAMINA E ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SOBRE A MEMÓRIA EMOCIONAL DE CAMUNDONGOS.....	53
5.4.1. Experimento 4a: Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar combinada de Histamina e do antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH23390 sobre a memória emocional de camundongos.	53
5.4.2. Experimento 4b: Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar combinada de Histamina e do antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride sobre a memória emocional de camundongos.	54
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. INSERÇÃO NA LINHA DE PESQUISA DA ORIENTADORA E DO PROGRAMA

Esta tese foi desenvolvida pela aluna Evelyn Maria Guilherme, bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2017/24879-2), sob orientação da Profa. Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço, vinculada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Especificamente, esta pesquisa faz parte da linha de pesquisa implementada no laboratório de Neurociências e Reabilitação Neurológica sobre plasticidade do sistema nervoso central, que envolve a investigação da ação de neurotransmissores em processos de aprendizagem motora e não motora.

1.2. PARCERIAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

O desenvolvimento do projeto contou com a colaboração do Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo, docente efetivo do Departamento de Fisioterapia da UFSCar.

Ainda, durante o período de desenvolvimento do doutorado, a aluna realizou estágio em pesquisa na University of British Columbia, Canadá, sob supervisão do Prof. Jason Snyder, financiado pelo Emerging Leaders of the Americas Program (ELAP).

1.3. ORIGINALIDADE, CONTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA PESQUISA PARA O AVANÇO CIENTÍFICO E RELEVÂNCIA SOCIAL

Poucos grupos de pesquisa se dedicam ao estudo das funções cerebelares atreladas à ação isolada ou combinada de dois importantes sistemas de neurotransmissão, os sistemas histaminérgico e dopaminérgico.

Nosso grupo mostrou em estudos anteriores que o sistema histaminérgico cerebelar está diretamente relacionado ao processamento de funções motoras e não motoras, como locomoção, comportamento exploratório, ansiedade e memória.

Porém, não havia estudos verificando sua interação com outro importante sistema de neurotransmissão, o sistema dopaminérgico. Os resultados obtidos com os experimentos conduzidos na presente tese de doutorado trazem informações originais e relevantes para a compreensão do processamento de informações nos circuitos cerebelares e nas funções motoras e não motoras as quais se associa.

O estudo de estruturas e funções do sistema nervoso central é a base para a compreensão de aspectos clínicos que por muitas vezes afetam pacientes com diferentes comprometimentos cerebelares.

1.4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

Artigos publicados relacionados à tese

Guilherme EM; Gianlorenço ACL (2021). The effects of intravermis cerebellar microinjections of dopaminergic agents in motor learning and aversive memory acquisition in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, 20. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.628357>.

Artigos submetidos relacionados à tese

Guilherme EM; Prati JM, Gianlorenço ACL. Cerebellar dopamine receptors interact with histamine on the modulation of motor learning and aversive memory in mice. Em processo de submissão.

Outros artigos publicados desenvolvidos no Laboratório de Neurociências

Guilherme EM, Padovez RF, Oliveira A, Ferro AM, Pires di Lorenzo V, Gianlorenço ACL (2021). Respiratory Disorders in Parkinson Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 11(3): 993 - 1010. DOI: 10.3233/JPD-212565.

Prati JM; Guilherme EM; Russo TL; Gianlorenco ACL (2021). Neuronal activation of cerebellum functional circuits in motor and non-motor functions in mice. *Neuroscience Letters*, v. 765, p. 136271, doi: 10.1016/j.neulet.2021.136271.

Fernandes CEM; Guilherme EM; Serafim KR; Gianlorenço ACL; Mattoli R (2021). Intracerebellar Microinjection of an H4 Agonist Impairs Memory Consolidation in Open Field and Rotarod Tasks in Mice. *International Journal of Cognition and Behaviour*, 4:012. doi.org/10.23937/2690-3172/1710012.

Artigos publicados desenvolvidos na University of British Columbia

Zhang, TR, Guilherme E, Kesici A, Ash AM, Vila-Rodriguez F, Snyder JS (2021). Electroconvulsive Shock, but Not Transcranial Magnetic Stimulation, Transiently Elevates Cell Proliferation in the Adult Mouse Hippocampus" *Cells* 10 (8): 2090. <https://doi.org/10.3390/cells10082090>.

Zhang T; Guilherme E; Kesici A; Vila-Rodriguez F; Snyder J (2019). Differential effects of transcranial magnetic stimulation and electroconvulsive stimulation on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Brain Stimulation*, v. 12, p. 540.

Artigos submetidos desenvolvidos em outros laboratórios

Motta HG; Carvalho C; Guilherme EM; de Oliveira MPB; Rossi KNZP. Effects of intra-articular injection of platelet-rich plasma on the inflammatory process and histopathological characteristics of cartilage and synovium in animals with osteoarthritis: a systematic review with meta-analysis". *The Knee*.

Participações em congressos nacionais e internacionais

Como avaliador

- XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar, na condição de avaliador de pôster, 2018.
- XXVI Simpósio de Fisioterapia da UFSCar, na condição de avaliador de trabalhos científicos, 2019.
- XXVI Congresso de Iniciação Científica e XI Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, na condição de avaliador de trabalhos científicos, 2019.

Como apresentador de trabalhos oral ou poster:

- Intracerebellar microinjection of D2 antagonist eticlopride improve aversive memory acquisition in mice. XLIII Reuniao Annual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, 2020, online.
- Comprometimentos respiratórios em pacientes com doença de Parkinson. 11º Congresso Internacional de Fisioterapia – SBF, 2019, Salvador, BA, Brasil.
- Effects of dopaminergic compounds into cerebellar vermis of mice in motor coordination and balance, EBPS Biennial Meeting, 2019, Braga, Portugal.
- Effects of Electroconvulsive Stimulation on Hippocampal Neurogenesis in Mice, Advances in Translational Neuroscience: Focus on Neuropsychiatric Disorders and Neurodegenerative Diseases, 2018, Instituto de Neurociências Comportamental, Ribeirao Preto, SP, Brasil.

Como ouvinte

- Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2020, online.
- 12th Annual Canadian Neuroscience Meeting, 2018, Vancouver, BC, Canada.

Coorientação de alunos de graduação

Hiago de Oliveira. Efeitos da microinjeção intra-vérmis cerebelar de histamina na memória de reconhecimento de objetos em camundongos. Iniciação científica (FAPESP 2019/04793-1).

Participação em bancas de avaliação

Serafim KR; Guilherme EM; Doltrário SMB. Doença de Parkinson e qualidade de vida – estudo de caso. Estudante: Bruna Caroline Martinez. Trabalho de conclusão de curso Fisioterapia, Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, 2018.

Rossi KNZP; Guilherme EM; Wolf DF. Efeitos da infiltração intra-articular de plasma rico em plaquetas no processo inflamatório e nas características

histopatológicas da cartilagem e da sinóvia em animais com osteoartrite: uma revisão sistemática com meta-análise. Trabalho de conclusão de curso Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2021.

Aulas ministradas

“Reabilitação vestibular”, aula ministrada aos alunos do curso de graduação em Fisioterapia, na disciplina Fisioterapia Neurológica. Carga horária 4 horas, 2019.

1.5. LINK DO CURRÍCULO LATTES DO ALUNO E SEU ORCID

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/6269689282970701>

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6486-7912>

1.6. DESCRIÇÃO DA TESE PARA O PÚBLICO LEIGO

Os neurotransmissores são substâncias químicas presentes no sistema nervoso, que atuam como mensageiros entre as células, permitindo o envio de informações e a execução de diversas funções. Nesse estudo, investigamos a ação de dois diferentes neurotransmissores – e sua interação – quando diretamente aplicados no cerebelo, em um estudo do comportamento de aprendizagem de movimento e de memória relacionada a um estímulo negativo. Observamos que a administração isolada de histamina e dopamina não afetou a memória nos animais neste estudo. Ainda, drogas antagonistas atuantes via sistema dopaminérgico podem apresentar efeitos sobre a memória emocional, mas a administração combinada de histamina e antagonistas dopaminérgicos parece intensificar esses efeitos, provocando piora no desempenho e aprendizado motor, e melhora na aquisição de memória emocional negativa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Neurotransmissores

O sistema nervoso central (SNC) apresenta diferentes estruturas em sua divisão anatômica, que se conectam funcionalmente através de vias e projeções neuronais (Xu et al., 2016). As funções fisiológicas do SNC são mediadas por neurotransmissores (Südhof, 2008), moléculas sintetizadas e armazenadas no neurônio pré-sináptico que, quando liberadas, estabelecem uma comunicação química através de uma ligação com receptores de membrana específicos (Lovinger, 2008).

Existem diversos tipos de neurotransmissores, como a acetilcolina, glicina, glutamato, norepinefrina, epinefrina, serotonina, GABA, histamina e dopamina, (Lodish et al., 2000). Cada neurônio geralmente possui um único tipo de neurotransmissor (Lodish et al., 2000), contudo há relatos que um mesmo neurônio pode realizar o armazenamento e liberação de um ou mais neurotransmissores (Sámano et al., 2012), o que torna essa interação ainda mais complexa (Granger et al., 2017).

O sistema dopaminérgico está envolvido em diversas funções, como regulação da pressão arterial, movimentos, comportamentos direcionados a objetivos, cognição, atenção, motivação e aprendizado (Viggiano et al., 2003). A dopamina é derivada da descarboxilação da tirosina (Rodwell, 2003), e a parte mais proeminente de neurônios dopaminérgicos está localizada no mesencéfalo, enviando projeções a diferentes áreas do sistema nervoso central (Chinta et al., 2005).

A dopamina age através de cinco diferentes tipos de receptores: D1, D2, D3, D4 e D5. Apesar disso, os receptores são agrupados em duas subcategorias, sendo que D1 e D5 fazem parte do grupo D1; e D2, D3 e D4 fazem parte do grupo D2 (Jaber et al., 1996), de acordo com suas similaridades estruturais e funcionais (Strange, 1993).

Em revisão de El-Ghundi e colaboradores, evidências sugerem que o sistema dopaminérgico age em conjunto com outros sistemas de neurotransmissão no processo de aprendizagem, ressaltando a importância de entender essa interação (El-Ghundi et al., 2007). Nowak sugeriu que a presença de receptores histaminérgicos em terminais nervosos estriatais dopaminérgicos tem a capacidade

de modular a liberação de dopamina (Nowak, 1985), e outros estudos mostraram que há uma possível interação entre histamina e dopamina na modulação de funções motoras pelo sistema nervoso central (Paul et al., 2000), e em funções básicas como ansiedade (Medalha et al., 2007).

Os neurônios histaminérgicos têm origem no núcleo tuberomamilar hipotalâmico, que envia projeções a diversas estruturas do SNC (Panula et al., 1993). A histamina é uma amina biogênica sintetizada a partir da descarboxilação da histidina (Schneider et al., 2014) que, além de atuar no SNC, tem participação em outros sistemas corporais, como o cardiovascular, gastrointestinal, imunológico e reprodutor (Haas et al., 2008), agindo através de quatro tipos de receptores acoplados à proteína G: H1, H2, H3 e H4 (Haas et al., 2008; Panula et al., 2015).

Os receptores H1 e H2 são excitatórios (Haas et al., 2008), ao passo que o receptor H3 apresenta atividade pré-sináptica inibitória sobre a síntese e liberação de histamina (Leurs et al., 1995; Panula et al., 2015). O receptor H4 é encontrado em maior quantidade em tecidos periféricos (Haas et al., 2008), porém sua participação no SNC foi recentemente relatada (Galleoti et al., 2013) e ainda vem sendo discutida.

2.2. Cerebelo

O cerebelo, importante estrutura do SNC, apresenta diferentes tipos de divisões. A divisão anatômica, na qual é dividido em hemisférios e vérmis; a ontogenética que o divide em lobos anterior, posterior e flóculo-nodular; a filogenética que o divide em arquicerebelo, paleocerebelo e neocerebelo; e a longitudinal, em faixa mediana, intermediária e lateral (Machado, 2005; Engelhardt e Moreira, 2009).

Algumas regiões cerebelares apresentam fortes correlações com funções específicas, tanto motoras quanto não motoras. Estudos mostram que o vérmis cerebelar e áreas adjacentes são predominantemente relacionadas com processamento afetivo e regulação de emoções primárias, o lobo anterior com o controle motor e movimentos automáticos, e o lobo posterior com a cognição e função executiva (Schmahmann et al., 2007; Adamaszek et al., 2016).

O cerebelo interage com mais de vinte tipos de aminas e neuropeptídios (Li et al., 2014), dentre eles a histamina e dopamina. Alguns estudos mostram que os neurônios aferentes histaminérgicos têm papel importante no cerebelo (Li et al., 2014), e que a histamina cerebelar participa da modulação de funções motoras, como equilíbrio e coordenação (Song et al., 2006) e não motoras, como o processo de consolidação da memória emocional (Gianlorenço et al., 2015; Silva-Marques et al., 2016). No que diz respeito ao sistema dopaminérgico, um estudo utilizou de técnicas imuno-histoquímicas e mostrou que o córtex cerebelar de ratos expressa os cinco subtipos de receptores de dopamina até hoje descritos (Barili et al., 2000), e que o cerebelo é capaz de modular a liberação de dopamina em outras estruturas, como o córtex pré-frontal (Mittleman et al., 2008).

Classicamente, o cerebelo é definido como uma estrutura com importante participação em processos motores, como controle postural (Yamaura et al., 2013), equilíbrio (Surgent et al., 2019), coordenação motora (Paulin, 1993) e marcha (Hoogkamer et al., 2017). Contudo, recente revisão sugeriu que o cerebelo está envolvido em funções não motoras (Adamaszek et al., 2017), como cognição (Van Overwalle et al., 2015), processos emocionais (Sachetti et al., 2009), linguagem (Mariën & Beaton, 2014) e memória (Shiroma et al., 2016).

Estudos clínicos foram essenciais para a investigação da função não motora do cerebelo. Em 2007, Schmahmann e Sherman relataram situações clínicas que evidenciavam a relação de lesões cerebelares e sintomas neuropsicológicos, como ansiedade, transtorno do pânico, desinibição e falta de limites, agressividade, comportamento obsessivo repetitivo, perda de memória e incapacidade de explicitar emoções (Schmahmann et al., 2007).

2.3. Sistema histaminérgico e dopaminérgico cerebelar

Nosso grupo tem investigado os efeitos do sistema histaminérgico cerebelar em funções motoras e não motoras. Gianlorenço e colaboradores mostraram que a microinjeção intravérmis cerebelar de histamina prejudicou a consolidação de

memória emocional em camundongos re-expostos ao labirinto em cruz elevado (Gianlorenço et al., 2011), e que esse déficit foi mediado pela ação de receptores histaminérgicos H1 (Gianlorenço et al., 2012). Além disso, a histamina intravermis cerebelar facilitou a retenção da memória no teste de esQUIVA inibitória (Gianlorenço et al., 2013), e a injeção de agonista e antagonista seletivos de receptor H2 mediaram essa função (Gianlorenço et al., 2015). Silva-Marques e colaboradores mostraram que a histamina cerebelar não afetou a consolidação de memória em comportamentos de fuga, contudo apresenta efeito facilitatório sobre a consolidação da memória quando os animais são submetidos à esQUIVA inibitória com reexposição ao labirinto em T elevado (Silva-Marques et al., 2016). Ainda, a histamina cerebelar não provocou efeitos sobre o comportamento em campo aberto, mas a injeção cerebelar de antagonistas de receptores H1 e H4 aumentaram significativamente o comportamento locomotor e exploratório neste aparato (Guilherme et al., 2018), e a injeção de antagonistas de receptores H4 prejudicou a consolidação de memória motora em camundongos (Fernandes et al. 2021). Por fim, foi observado um possível efeito facilitatório da histamina na aprendizagem motora e performance no Rotarod (Silva-Marques et al., submetido).

Estudos mostram que o sistema dopaminérgico tem participação no aprendizado emocional (Kobayashi, 2001), na formação de memória emocional frente a estímulos aversivos na amígdala basolateral (Zheng et al., 2008), além de mediar a plasticidade sináptica no giro denteado, processo importante na formação de memória hipocampal (Hamilton et al., 2010). Além disso, Locke e colaboradores mostraram que a inibição de neurônios positivos para receptores dopaminérgicos D1 localizados no núcleo cerebelar lateral prejudica a memória espacial e de trabalho em camundongos (Locke et al., 2018), contudo não foram encontrados estudos sobre a participação da dopamina intra vérmis cerebelar nessas funções.

Pouco se sabe sobre a interação do sistema histaminérgico e dopaminérgico em processos como aprendizagem e memória. Sabemos que a memória é um processo complexo, e sua formação pode ser diretamente influenciada por diversos fatores, como envelhecimento (Bettio et al., 2017), experiências emocionais (Tyng et al., 2017) ou alterações em sistemas de neurotransmissão, como o histaminérgico

(Passani et al., 2017) e dopaminérgico (Lauzon et al., 2013). Com o objetivo de investigar processos de memória em camundongos knockout de receptores histaminérgicos H1 (H1R-KO), Dere e colaboradores (2008) mostraram que esses animais apresentam um déficit de memória episódica e memória de procedimento de longo prazo, que coincidem com um déficit nos níveis de dopamina cerebelares (Dere et al., 2008), o que indica a influência dos sistemas histaminérgico e dopaminérgico no cerebelo.

Poucos estudos verificaram a interação entre antagonistas dopaminérgicos e histamina. Santangelo e colaboradores (2017) mostraram que a depleção aguda de histamina aumenta a complexidade de padrões exploratórios de camundongos expostos ao campo aberto, que é revertida com a administração intraventricular lateral de baixas doses de sulpiride (Santangelo et al., 2017). Além disso, Bananej e colaboradores (2011) verificaram que microinjeções intra-BLA de SCH 23390 ou sulpiride combinadas com doses elevadas de histamina previnem os efeitos ansiogênicos causados pela histamina no labirinto em cruz elevado (Bananej et al., 2012). Contudo, não existem estudos que verifiquem essa interação em nível cerebelar.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o papel do sistema dopaminérgico cerebelar em funções motoras e não motoras, assim como sua ação moduladora junto ao sistema histaminérgico nos processos de aprendizagem e memória. Essa investigação foi realizada através da administração intravérmis cerebelar isolada ou combinada de histamina e dos antagonistas dopaminérgicos D1 SCH 23390 (Nasehi et al., 2016) e D2 eticlopride (Sutoo, Akiyama, 1999) e avaliação comportamental em modelos de aprendizagem motora e memória emocional.

Dadas evidências que ambos os sistemas histaminérgico e dopaminérgico estão intimamente relacionados às funções cerebelares, e que o cerebelo tem participação no comportamento motor e não motor, acreditamos que ocorra uma interação entre esses dois sistemas de neurotransmissão na modulação de funções como desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional.

Dessa forma, essa investigação pode promover um maior entendimento sobre o processamento de informações nos circuitos cerebelares nas funções de

aprendizagem motora e memória emocional, além de embasar estudos futuros que auxiliem na compreensão de aspectos clínicos que podem estar presentes em pacientes com disfunções cerebelares.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral investigar o papel do sistema dopaminérgico em funções motoras e não motoras em camundongos, assim como a interação dos sistemas histaminérgico e dopaminérgico nas mesmas funções.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos dose dependentes da microinjeção isolada de dopamina no desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional em camundongos (experimentos 1a e 2a).
- Avaliar os efeitos dose dependentes da microinjeção isolada de SCH 23390 (antagonista do receptor dopaminérgico D1) no desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional em camundongos (experimentos 1b e 2b), e selecionar a dose utilizada no protocolo de injeção combinada.
- Avaliar os efeitos dose dependentes da microinjeção isolada de Eticlopride (antagonista do receptor dopaminérgico D2) no desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional em camundongos (experimentos 1c e 2c), e selecionar a dose utilizada no protocolo de injeção combinada.
- Avaliar os efeitos da microinjeção combinada de histamina e SCH 23390 no desempenho motor e aprendizagem motora em camundongos (experimento 3a).
- Avaliar os efeitos da microinjeção combinada de histamina e SCH 23390 na aquisição de memória emocional em camundongos (experimento 3b)
- Avaliar os efeitos da microinjeção combinada de histamina e eticlopride no desempenho motor e aprendizagem motora em camundongos (experimento 4a).
- Avaliar os efeitos da microinjeção combinada de histamina e eticlopride na aquisição de memória emocional em camundongos (experimento 4b).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ASPETOS ÉTICOS E LOCAIS DE PESQUISA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (processos CEUA nº 1625270818 e 4486110220). Os experimentos comportamentais foram realizados no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia, na Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

4.2. AMOSTRA

A amostra foi composta de camundongos ingênuos (Suíço Albino) pesando entre 25 e 35g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos. Os animais permaneceram agrupados em até 5 animais por caixa (31×20×13 cm) em ambiente com ciclo de luz de 12 horas (com as luzes acesas as 06:00h), temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) controlados. Alimento e água permaneceram disponíveis até o início dos testes, que foram realizados na fase clara.

4.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Para todos os experimentos, os fármacos foram dissolvidos em solução salina estéril (0,9%), e as soluções foram mantidas refrigeradas em tubos codificados, até o momento de sua utilização, de modo que o experimentador não tivesse conhecimento do conteúdo no momento do experimento e durante a análise de dados. Todas as drogas foram microinjetadas em volume de 0,1µl.

Experimentos 1a e 2a: os animais receberam microinjeção de solução salina ou Dopamina nas doses 0.29, 0.86 ou 1.5 nmol / 0.1µl.

Experimentos 1b e 2b: os animais receberam microinjeção de solução salina ou antagonista de receptor D1 SCH23390 nas doses 0.31, 0.92 ou 1.54 nmol / 0.1µl.

Experimentos 1c e 2c: os animais receberam microinjeção de solução salina ou antagonista de receptor D2 Eticlopride nas doses 0.26, 1.32 ou 2.65 nmol / 0.1µl.

Experimentos 3a e 4a: em protocolo de injeção combinada, os animais receberam Histamina na dose 6.8 nmol/0.1µl (Gianlorenço et al., 2011), e SCH 23390 na dose 1.54 nmol / 0.1µl (selecionada com base nos resultados dos experimentos 1b e 2b). O grupo controle recebeu solução salina.

Experimento 3b: Em protocolo de injeção combinada, os animais receberam Histamina na dose 6.8 nmol/0.1µl (Gianlorenço et al., 2011), e Eticlopride na dose 2.65 nmol / 0.1µl (Selecionada no experimento 1c). O grupo controle recebeu solução salina.

Experimento 4b: Em protocolo de injeção combinada, os animais receberam Histamina na dose 6.8 nmol/0.1µl (Gianlorenço et al., 2011), e Eticlopride na dose 1.32 nmol / 0.1µl (Selecionada no experimento 2c). O grupo controle recebeu solução salina.

4.4. CIRURGIA E MICROINJEÇÃO

Os animais receberam implantação craniana de cânula-guia (25 gauge) de 7 mm de comprimento no vérmis cerebelar, após anestesia com Cloridrato de Cetamina (100mg/Kg) e Xilazina (10 mg/kg). A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico (JET resina e líquido polimerizante) com base nas seguintes coordenadas estereotáxicas (Insight EFF-333 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) definidas pelo Atlas de Paxinos e Franklin (2001): 6,5 mm posterior ao bregma, 0 mm lateral à linha média e 2 mm ventral à superfície do crânio (Figura 1). O mandril foi inserido no interior da cânula-guia para evitar problemas de obstrução e para reduzir contaminação. Logo após a cirurgia, os animais foram tratados com acetaminofeno (200mg/ml) adicionado a água, com uma razão de 0,2 ml de acetaminofeno para 250 ml de água. (Messier et al, 1999; Nunes-De-Souza et al, 2008).

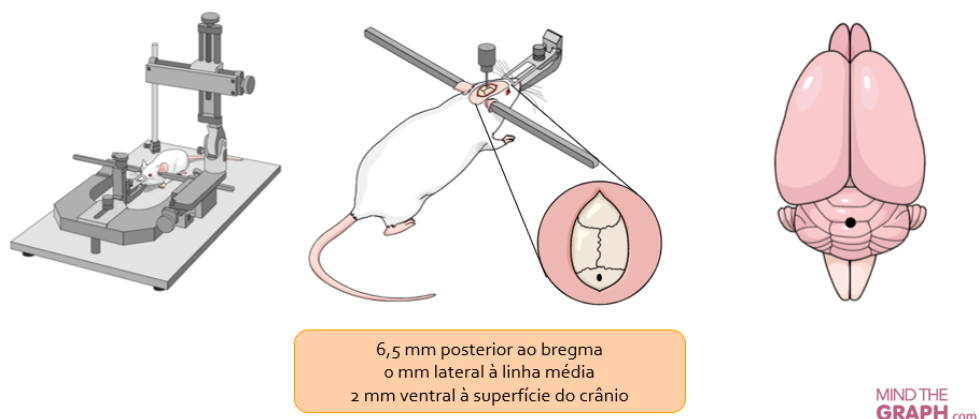


Figura 1: representação esquemática do procedimento cirúrgico.

A agulha de injeção, cujo comprimento ultrapassa 1,0 mm a ponta da cânula-guia, foi inserida dentro da cânula guia para a infusão das soluções no vérmis cerebelar. A agulha de injeção era conectada por meio de tubo de polietileno (PE-10) à microseringa Hamilton de 5 μ l, que por sua vez era acoplada a uma bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos Científicos Ltda, Brasil), programada para injetar 0,1 μ l de solução durante 60 segundos. O procedimento de microinjeção consistiu na remoção dos mandris, inserção da agulha de injeção, injeção da solução por 60 segundos, e permanência da agulha de injeção por 60 segundos após o término das injeções. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmava o fluxo da solução (Canto-De-Souza et al., 2002).

4.5. EQUIPAMENTOS

4.5.1. Rota-rod

O Rota-rod automatizado (Insight Equipamentos Científicos, Brasil) consiste 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. O equipamento é dividido em cinco baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de cinco animais simultaneamente (Figura 2). A latência de queda dos animais é mensurada automaticamente por sensor localizado na base do aparato.

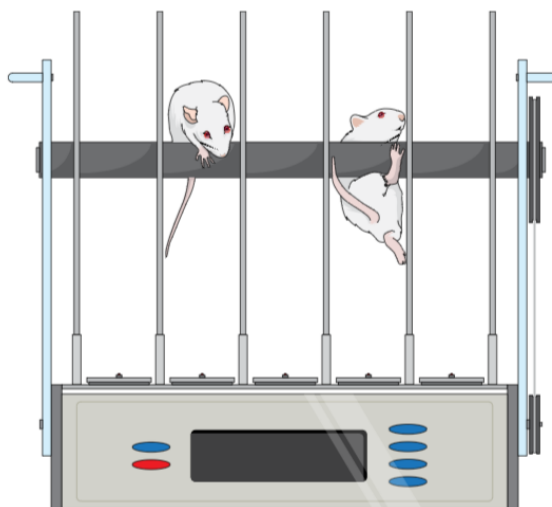


Figura 2: representação esquemática de teste em Rotarod.

4.5.2. Trave de equilíbrio

A trave de equilíbrio consiste em uma placa de madeira (100 cm x 2.8 cm), elevada a 50 cm do chão por suportes de acrílico. Com o objetivo de amortecer possível queda do animal, uma proteção de tecido é colocada abaixo do equipamento. Para o teste, o animal é colocado em uma extremidade da trave elevada até que chegue a outra das extremidades do equipamento, onde se encontra uma caixa preta com maravalha de sua caixa moradia (Figura 3). O tempo transcorrido durante a travessia é mensurado por sensores localizados nas extremidades da trave.



Figura 3: fotografia de teste em trave de equilíbrio.

4.5.3. Caixa de Esquiva Inibitória

A caixa de esquiva inibitória é confeccionada em acrílico (48×24,5×25 cm) e composta por dois compartimentos de mesma dimensão: um claro, sob iluminação de 450 lx, e outro escuro, com acrílico preto dotado de tampa (1 lx). Uma abertura na forma de porta guilhotina de 10×9 cm (base x altura) localiza-se ao nível do piso e no centro da divisão dos dois ambientes; seu acionamento se dá através do programa instalado em computador em resposta aos sensores de infravermelho. O piso é constituído por barras de aço inoxidável (2,5 mm de diâmetro) distanciadas 1 cm entre si, que liberam choques elétricos com a intensidade de 1,5 mA por 5 segundos (Figura 4).

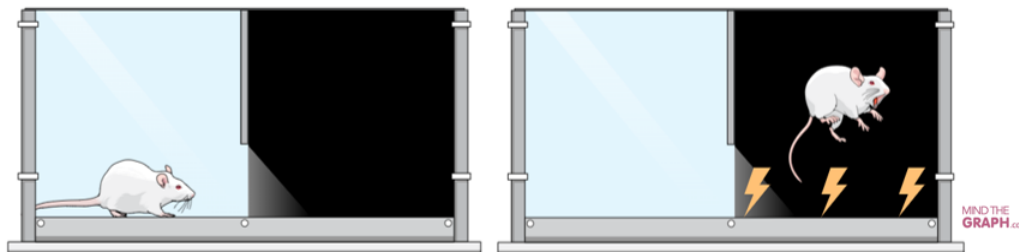


Figura 4: representação esquemática de teste de esquiva inibitória.

4.6. TESTES COMPORTAMENTAIS

4.6.1. Desempenho motor e aprendizagem motora

O uso combinado do Rotarod e trave de equilíbrio permitem a avaliação simultânea de função motora grossa, equilíbrio e coordenação motora (Song et al., 2006; Curzon et al., 2009). O protocolo comportamental foi baseado em metodologia de Song et al. (2006) e He et al. (2014), com adaptações.

O procedimento foi dividido em cinco etapas, nomeadas habituação, microinjeção, estágio 1, estágio 2, e estágio 3. Na habituação os animais foram posicionados no cilindro do Rota-rod na velocidade 8 por 120 s ou até caírem, e na trave de equilíbrio até cruzarem o aparato em direção à caixa moradia, possibilitando o contato inicial dos animais com os aparatos. Vinte e quatro horas após a

habituação, o procedimento de microinjeção foi realizado conforme descrito anteriormente. 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 rotação crescente (8 a 20 rpm) por até 5 minutos, permaneceu na caixa moradia por pelo menos 5 minutos de descanso, e então foi submetido à trave de equilíbrio, por um período de até 5 minutos (Figura 5). No total, foram realizados três estágios no Rotarod e três estágios na trave de equilíbrio, perfazendo nove exposições à cada aparato ao longo de todo o protocolo experimental.

Teste completo:



Cada estágio:



Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental para os testes de desempenho motor e aprendizagem motora.

4.6.2. Teste de Esquiva Inibitória

Cinco minutos após o procedimento de microinjeção, cada animal foi transportado individualmente até a caixa de esquiva e posicionado no centro da parte iluminada por 5 segundos. Então, a porta guilhotina foi aberta e o tempo de latência para o animal atravessar para o compartimento escuro foi medido. Depois que o animal atravessou com as quatro patas para o compartimento escuro, a porta guilhotina foi fechada e o animal retirado do aparato. O treino de habituação foi

repetido 30 minutos depois, e após esse mesmo intervalo foi realizada a sessão de aquisição. Na aquisição, imediatamente após o animal entrar no compartimento escuro a porta guilhotina foi fechada e choques nas patas (50 Hz, 1,5mA por 5s) foram liberados. Após 20 segundos, o animal foi removido do aparato. Dois minutos depois, o animal foi testado seguindo o mesmo procedimento, e o tempo gasto para atravessar para o compartimento escuro indicou se a aquisição da resposta de esquiva foi obtida. Após esses procedimentos, o animal foi retirado do aparato e colocado em sua caixa moradia (Figura 6).

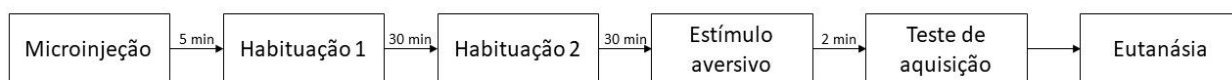


Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para os testes de memória emocional.

4.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Seis experimentos foram realizados para verificar o efeito dose dependente da administração isolada de Dopamina, SCH23390 (antagonista dopaminérgico D1), e Eticlopride (antagonista dopaminérgico D2) sobre o desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional aversiva em camundongos.

Quatro experimentos foram realizados para verificar o efeito da administração combinada de Histamina e SCH23390, e Histamina e Eticlopride, sobre o desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional aversiva em camundongos.

4.7.1. Experimentos 1a, 1b e 1c

Esses experimentos foram realizados a fim de compreender a ação isolada do sistema dopaminérgico cerebelar no desempenho motor e aprendizagem motora de

camundongos, e de definir a dose dos antagonistas D1 e D2 utilizadas nos experimentos 3a e 4a.

Experimento 1a: Os animais receberam injeção intravermis cerebelar de solução salina (0.9%) ou Dopamina (0.29, 0.86 ou 1.5 nmol/0.1µl), cinco minutos antes de serem submetidos ao estágio 1 em Rotarod e trave de equilíbrio (Tabela 1).

Experimento 1b: Os animais receberam injeção intravermis cerebelar de solução salina (0.9%) ou SCH 23390 (0.31, 0.92 ou 1.54 nmol/0.1µl), cinco minutos antes de serem submetidos ao estágio 1 em Rotarod e trave de equilíbrio (Tabela 1).

Experimento 1c: Os animais receberam injeção intravermis cerebelar de solução salina (0.9%) ou Eticlopride (0.26, 1.32 ou 2.65 nmol/0.1µl), cinco minutos antes de serem submetidos ao estágio 1 em Rotarod e trave de equilíbrio (Tabela 1).

4.7.2. Experimentos 2a, 2b e 2c

Esses experimentos foram realizados a fim de compreender a ação isolada do sistema dopaminérgico cerebelar na aquisição de memória emocional de camundongos, e de definir a dose dos antagonistas D1 e D2 utilizadas nos experimentos 3b e 4b.

Experimento 2a: Os animais receberam injeção intravermis cerebelar de solução salina (0.9%) ou Dopamina (0.29, 0.86 ou 1.5 nmol/0.1µl), cinco minutos antes de serem submetidos ao protocolo de esquiva inibitória (Tabela 1).

Experimento 2b: Os animais receberam injeção intravermis cerebelar de solução salina (0.9%) ou SCH 23390 (0.31, 0.92 ou 1.54 nmol/0.1µl), cinco minutos antes de serem submetidos ao protocolo de esquiva inibitória (Tabela 1).

Experimento 2c: Os animais receberam injeção intravermis cerebelar de solução salina (0.9%) ou Eticlopride (0.26, 1.32 ou 2.65 nmol/0.1µl), cinco minutos antes de serem submetidos ao protocolo de esquiva inibitória (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos experimentais – efeitos do sistema dopaminérgico sobre o desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional de camundongos.

Tratamento	Dose	N (aprendizagem)	N (esquiva)
------------	------	------------------	-------------

			motora)	inibitória)
Experimento 2a	Salina	-----	7	8
	Dopamina	0.29 nmol / 0.1 µl	8	14
	Dopamina	0.86 nmol / 0.1 µl	8	9
	Dopamina	1.5 nmol / 0.1 µl	8	11
Experimento 2b	Salina	-----	6	7
	SCH 23390	0.31 nmol / 0.1 µl	7	9
	SCH 23390	0.92 nmol / 0.1 µl	7	10
	SCH 23390	1.54 nmol / 0.1 µl	7	9
Experimento 2c	Salina	-----	8	9
	Eticlopride	0.26 nmol / 0.1 µl	8	9
	Eticlopride	1.32 nmol / 0.1 µl	8	8
	Eticlopride	2.65 nmol / 0.1 µl	9	7

4.7.3. Experimento 3a

A dose mais alta e subefetiva do antagonista dopaminérgico D1 SCH23390 no experimento 1b foi selecionada para os experimentos combinados com histamina. Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar combinada de Salina ou SCH 23390 (1.54 nmol/0.1µl) + Salina ou Histamina (6.8 nmol/0.1µl) (Gianlorenço et al., 2012), cinco minutos antes de serem submetidos ao estágio 1 em Rotarod e trave de equilíbrio (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos experimentais – experimento 3a

GRUPOS	DROGA 1	DOSE 1	DROGA 2	DOSE 2	N
Controle	Salina	-	Salina	-	8
1	Salina	-	Histamina	6.9 nmol /0.1µl	9
2	SCH 23390	1.54 nmol / 0.1 µl	Salina	-	9
3	SCH 23390	1.54 nmol / 0.1 µl	Histamina	6.8 nmol/0.1µl	10

4.7.4. Experimento 3b

A dose mais alta e subefetiva do antagonista dopaminérgico D2 Eticlopride no experimento 2b foi selecionada para os experimentos combinados com histamina. Os animais receberão injeção intravérmis cerebelar combinada de Salina ou

Eticlopride + Salina ou Histamina (6.8 nmol/0.1µl) (Gianlorenço et al., 2012), cinco minutos antes de serem submetidos ao estágio 1 em Rotarod e trave de equilíbrio (Tabela 3).

Tabela 3: Grupos experimentais – experimento 3b

GRUPOS	DROGA 1	DOSE 1	DROGA 2	DOSE 2	N
Controle	Salina	-	Salina	-	8
1	Salina	-	Histamina	6.8 nmol/0.1µl	10
2	Eticlopride	2.65 nmol / 0.1 µl	Salina	-	9
3	Eticlopride	2.65 nmol / 0.1 µl	Histamina	6.8 nmol/0.1µl	11

4.7.5. Experimento 4a

A dose mais alta e subefetiva do antagonista dopaminérgico D1 SCH23390 no experimento 1c foi selecionada para os experimentos combinados com histamina. Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar combinada de Salina ou SCH 23390 (1.54 nmol/0.1µl) + Salina ou Histamina (6.8 nmol/0.1µl) (Gianlorenço et al., 2012), cinco minutos antes de serem submetidos ao protocolo de esQUIVA inibitória (Tabela 4).

Tabela 4: Grupos experimentais – experimento 4a

GRUPOS	DROGA 1	DOSE 1	DROGA 2	DOSE 2	N
Controle	Salina	-	Salina	-	6
1	Salina	-	Histamina	6.8 nmol/0.1µl	9
2	SCH 23390	1.54 nmol/0.1µl	Salina	-	9
3	SCH 23390	1.54 nmol/0.1µl	Histamina	6.8 nmol/0.1µl	9

4.7.6. Experimento 4b

A dose mais alta e subefetiva do antagonista dopaminérgico D2 Eticlopride no experimento 2c foi selecionada para os experimentos combinados com histamina. Os animais receberão injeção intravérmis cerebelar combinada de Salina ou Eticlopride + Salina ou Histamina (6.8 nmol/0.1µl) (Gianlorenço et al., 2012), cinco minutos antes de serem submetidos ao protocolo de esQUIVA inibitória (Tabela 5).

Tabela 5: Grupos experimentais – experimento 4b

GRUPOS	DROGA 1	DOSE 1	DROGA 2	DOSE 2	N
Controle	Salina	-	Salina	-	9
1	Salina	-	Histamina	6.8 nmol/0.1µl	8
2	Eticlopride	1.32 nmol/0.1µl	Salina	-	9
3	Eticlopride	1.32 nmol/0.1µl	Histamina	6.8 nmol/0.1µl	9

4.8. EUTANÁSIA

Após o final dos experimentos, todos os animais receberam uma profunda dose de anestesia com Cloridrato de Cetamina (300mg/Kg) e Xilazina (30mg/kg). Os encéfalos foram removidos e armazenados refrigerados imersos em solução fosfato salina por pelo menos 24 horas.

Os encéfalos foram seccionados coronalmente na espessura de 40 micrômetros (µm) utilizando um micrótomo de lâmina vibratória (Leica VT 1200S), e o local de cirurgia foi verificado. O índice de acerto da cirurgia foi de 80%. Animais com posicionamento incorreto da cânula foram excluídos deste estudo.

4.9. PERDAS E EXCLUSÕES DE ANIMAIS DO ESTUDO

Durante os experimentos, perdas e exclusões de animais se deram pelos seguintes motivos: 1) morte durante ou pós cirurgia; 2) oclusão da cânula; 3) soltura da cânula; 4) falha técnica em equipamento de esQUIVA inibitória; e 4) posicionamento inadequado da cânula.

4.10. ANÁLISE DE DADOS

4.10.1. Testes comportamentais

Para os experimentos de desempenho motor e aprendizagem motora, foram quantificadas as latências de queda (Rota-rod) e de cruzamento (trave de equilíbrio) durante os estágios 1, 2 e 3.

Nos experimentos de memória emocional feitos com o teste de esQUIVA inibitória, foram quantificadas as latências de cruzamento do compartimento claro para o compartimento escuro em todas as exposições.

4.10.2. **Análise estatística**

A análise estatística dos dados comportamentais foi feita por meio do software GraphPad Prism 9.0. Os dados foram analisados pelo método ROUT (Q=1%) para a identificação de possíveis outliers (Zeng et al., 2019). A análise de variância de medidas repetidas foi utilizada para comparação entre grupos de latência de cruzamento da trave de equilíbrio, latência de queda do rotarod, e latência de cruzamento para o compartimento escuro do teste de esquiva inibitória. O teste post hoc de Tukey foi utilizado em caso de diferenças significativas na análise de variância. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO CEREBELAR SOBRE O DESEMPENHO MOTOR E APRENDIZAGEM EM CAMUNDONGOS

5.1.1. **Experimento 1a) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar de Dopamina sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos**

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos de queda do rotarod e de travessia da trave de equilíbrio foram apresentados na tabela 6. Nenhum outlier foi identificado na análise comportamental em Rotarod, e 9 outliers foram identificados e removidos na análise comportamental na trave de equilíbrio. A análise estatística indicou diferença significativa em todos os grupos entre os estágios, o que infere um aumento na latência de queda do Rotarod ($F_{1,842,49,74} = 1,39$; $p < 0,0001$) e uma diminuição no tempo de cruzamento da trave de equilíbrio ($F_{1,928,43,37} = 4,18$; $p = 0,02$) ao longo dos três estágios. Contudo, não houve diferenças significativas entre os grupos que receberam Dopamina em diferentes doses e o grupo controle, tanto para as exposições ao rotarod ($F_{3,27} = 1,74$; $p = 0,27$)

(Figura 7), quanto à trave de equilíbrio ($F_{3,27} = 1,74$; $p = 0.18$) (Figura 8) , indicando que a microinjeção no vérmis cerebelar de Dopamina nas doses 0.29, 0.86 e 1.5 nmol/0.1ul não apresentou efeitos comportamentais no desempenho motor, equilíbrio e aprendizagem motora em camundongos neste estudo (Tabela 6).

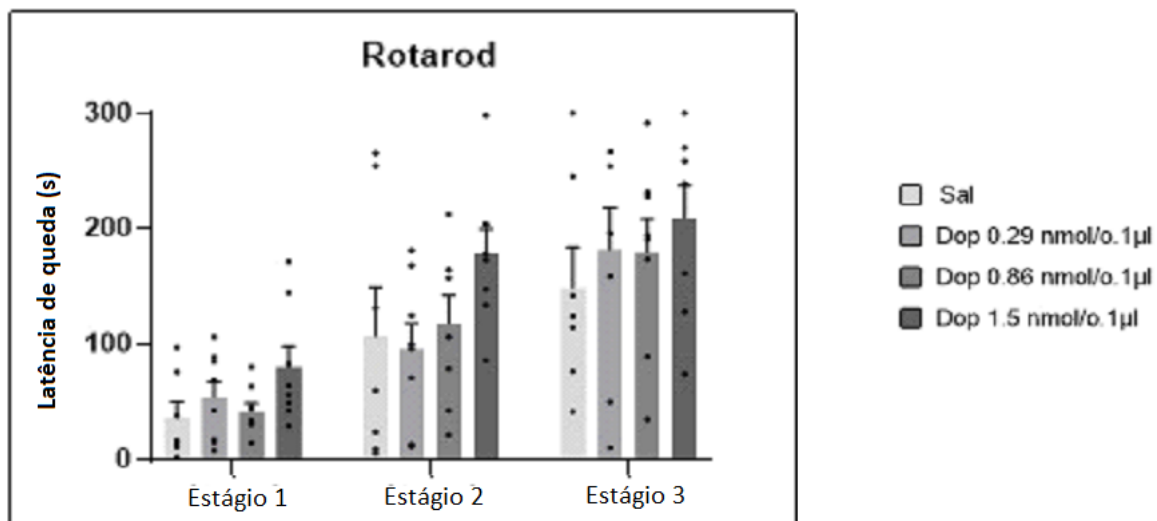


Figura 7: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Dopamina em diferentes doses submetidos ao Rotarod, $p = 0.27$.

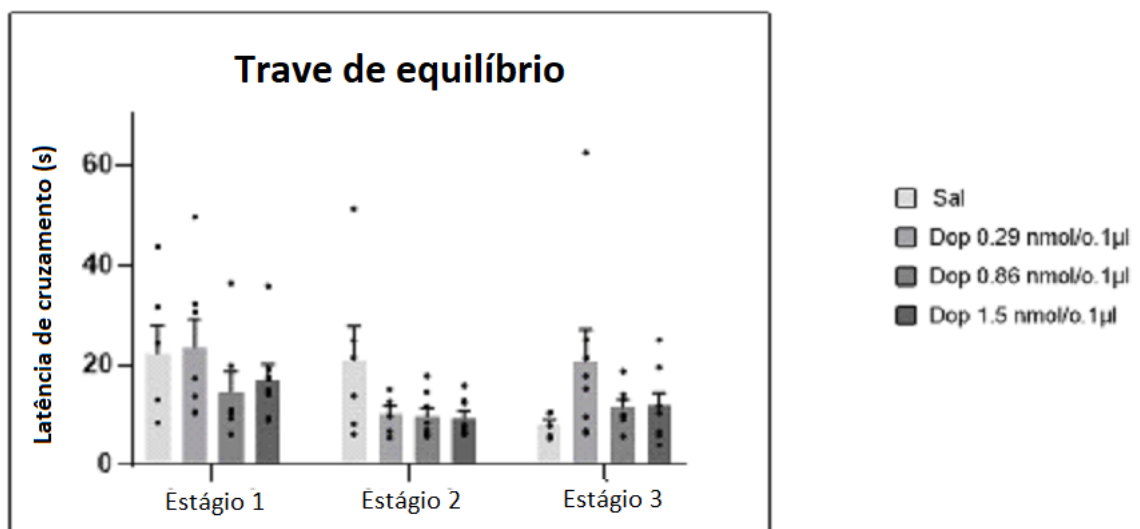


Figura 8: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Dopamina em diferentes doses submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0.18$.

5.1.2. Experimento 1b) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar do antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH 23390 sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos de queda do rotarod e de travessia da trave de equilíbrio foram apresentados na tabela 6. Nenhum outlier foi identificado nesse grupo experimental. A análise de variância indicou diferença significativa ao longo dos três estágios, sugerindo que todos os

grupos apresentaram um aumento na latência de queda do Rotarod ($F_{1,900,45.77} = 20,39$, $p < 0,0001$) e diminuição do tempo de travessia da trave de equilíbrio ($F_{1,494,45.77} = 4,12$; $p = 0,03$). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos que receberam o antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH 23390 em diferentes doses e o grupo controle expostos ao rotarod ($F_{3,23} = 0,44$; $p = 0,72$) (Figura 9) e à trave de equilíbrio ($F_{3,23} = 2,16$; $p = 0,12$) (Figura 10). Esses resultados demonstram que a microinjeção intravermis cerebelar de SCH 23390 não promoveu alterações no desempenho motor, equilíbrio e aprendizagem motora de camundongos nas doses utilizadas (Tabela 6).

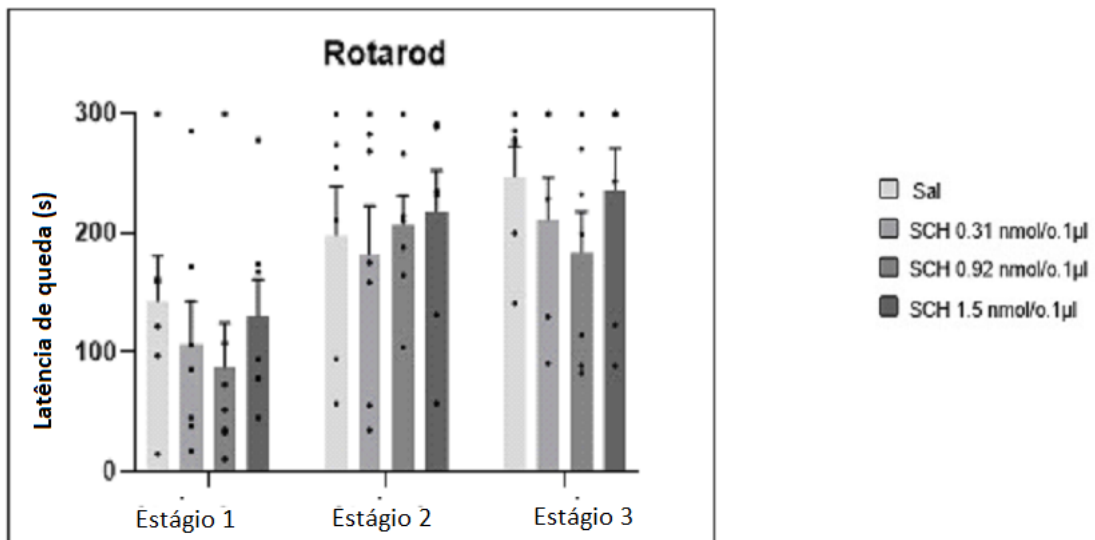


Figura 9: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e SCH 23390 em diferentes doses submetidos ao Rotarod, $p = 0,72$.

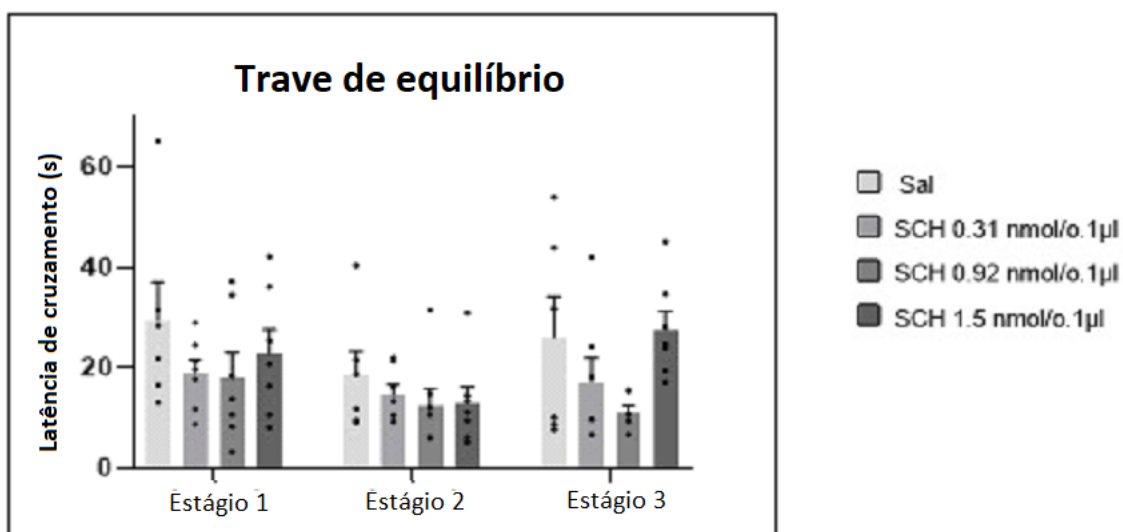


Figura 10: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e SCH 23390 em diferentes doses submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0,12$.

5.1.3. Experimento 1c) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar do antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos.

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos de queda do rotarod e de travessia da trave de equilíbrio foram apresentados na tabela 6. Cinco medidas outliers foram identificadas e removidas no grupo rotarod, e quatro no grupo trave de equilíbrio. Todos os grupos apresentaram um aumento na latência de queda do Rotarod ($F_{1,993,52.83} = 53,54$; $p < 0.0001$) e queda no tempo de cruzamento da trave de equilíbrio ($F_{1,847,49,86} = 7,53$; $p = 0.001$) ao longo dos três estágios. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos que receberam o antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride em diferentes doses e o grupo controle, para os testes comportamentais em Rotarod ($F_{3,29} = 0,49$; $p = 0,69$) (Figura 11) e trave de equilíbrio ($F_{3,29} = 1,15$; $p = 0.35$) (Figura 12). Esses dados sugerem que a microinjeção no vérmis cerebelar de Eticlopride nas doses 0.26, 1.32 e 2.65 nmol/0.1ul não interferiu no desempenho motor, equilíbrio e aprendizagem motora de camundongos, nas doses citadas (Tabela 6).

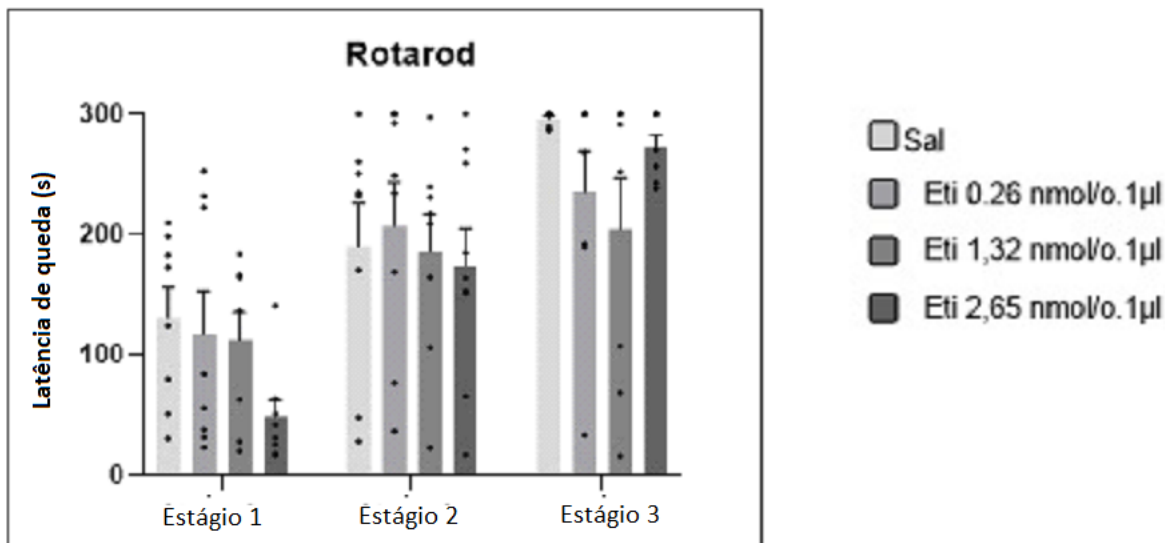


Figura 11: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Eticlopride em diferentes doses submetidos ao Rotarod, $p = 0,69$.

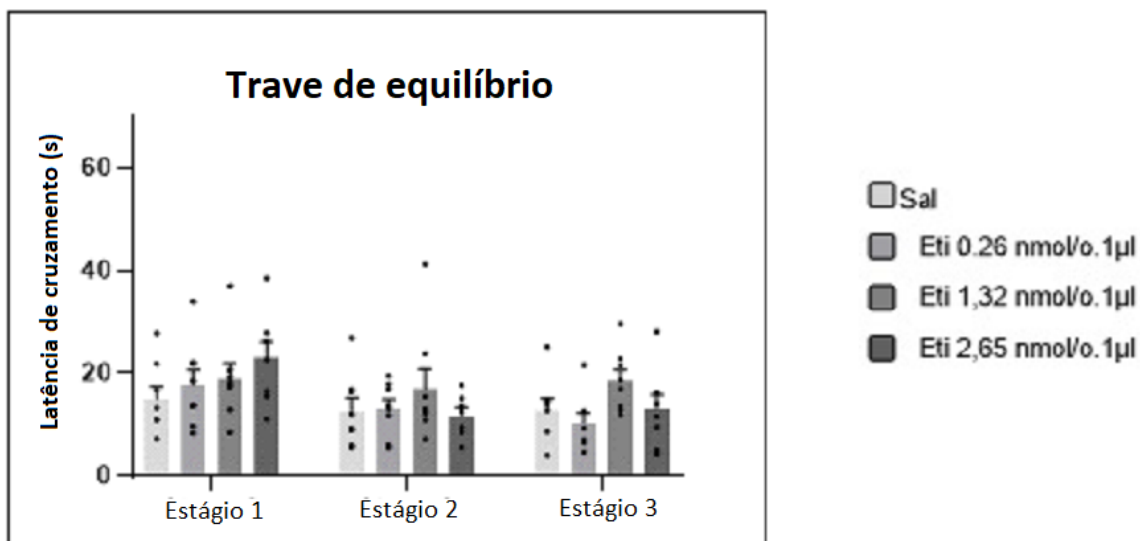


Figura 12: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Eticlopride em diferentes doses submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0,35$.

Tabela 6: Média da latência das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos submetidos ao Rotarod e trave de equilíbrio após microinjeção de Dopamina (DA), SCH 23390 (SCH), Eticlopride (ETI) ou salina (SAL).

	Estágio 1		Estágio 2			Estágio 3		
	Rotarod	Trave de Equilíbrio	de Rotarod	Trave de Equilíbrio	de Rotarod	Trave de Equilíbrio	de	
SAL	36.77 ± 13.73	41.38 ± 19.62	107.36 ± 42.60	36.14 ± 16.21	149.35 ± 34.73	26.51 ± 12.02	±	
DA 0.29	54.22 ± 38.26	35.35 ± 12.78	95.92 ± 22.34	20.87 ± 7.41	182.17 ± 35.91	20.60 ± 6.45		
DA 0.86	41.77 ± 7.42	22.1 ± 8.15	118.62 ± 23.69	9.73 ± 1.58	179.46 ± 28.97	15.91 ± 4.65		
DA 1.5	84.05 ± 17.50	17.11 ± 2.96	178.21 ± 21.95	9.43 ± 1.3	209,0 ± 27.78	11.85 ± 2.52		
SAL	142.58 ± 38.39	29.47 ± 7.68	198.59 ± 40.82	18.54 ± 4.83	246.9 ± 25.57	26.06 ± 8.22		
SCH 0.31	103.28 ± 32.38	18.91 ± 2.65	182.32 ± 40.75	14.6 ± 2.06	211.30 ± 35.08	17.22 ± 4.74		
SCH 0.92	96.41 ± 39.74	20.95 ± 4.56	223.99 ± 10.01	12.08 ± 3.73	195.61 ± 34.68	10.54 ± 1.12		
SCH 1.54	130.7 ± 30.47	22.83 ± 4,81	218.15 ± 34.29	13.0 ± 3.27	236.39 ± 34.81	27.59 ± 3.64		
SAL	130.98 ± 24.81	14.91 ± 2.41	190.37 ± 35.70	12.92 ± 2.70	241.85 ± 35.64	12.83 ± 2.20		
ETI 0.26	117.28 ± 35.4	17.68 ± 2.94	208.29 ± 36.65	12.99 ± 1.83	235.33 ± 33.46	10.22 ± 1.93		
ETI 1.32	108.59 ± 24.71	18.90 ± 2.93	182.54 ± 32.89	16.95 ± 3.86	197.57 ± 45.24	18.46 ± 2.14		
ETI 2.65	66.73 ± 22.39	29.91 ± 7.4	173.85 ± 31.21	24.31 ± 8.43	227.18 ± 31.16	21.31 ± 8.59		

5.2. EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO CEREBELAR SOBRE A MEMÓRIA EMOCIONAL EM CAMUNDONGOS

5.2.1. Experimento 2a) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar de Dopamina sobre a memória emocional de camundongos

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos do cruzamento para o lado escuro do teste de esquiiva inibitória foram apresentados na tabela 7. Um outlier foi identificado e removido do grupo experimental. A análise estatística identificou que todos os grupos apresentaram um aumento da latência de cruzamento para o lado escuro da caixa após a administração do choque nas patas ($F_{1,37} = 54,12$; $p < 0.0001$), sinalizando o sucesso na aquisição da memória emocional aversiva. Contudo, não houve diferenças entre os grupos que receberam Dopamina em diferentes doses e o grupo controle para a latência de cruzamento ($F_{3,38} = 2,35$; $p = 0.09$) (Figura 13), indicando que a microinjeção no vérmis cerebelar de Dopamina nas doses 0.29, 0.86 e 1.5 nmol/0.1ul não apresentou efeitos comportamentais na aquisição de memória emocional em camundongos neste estudo (Tabela 7).

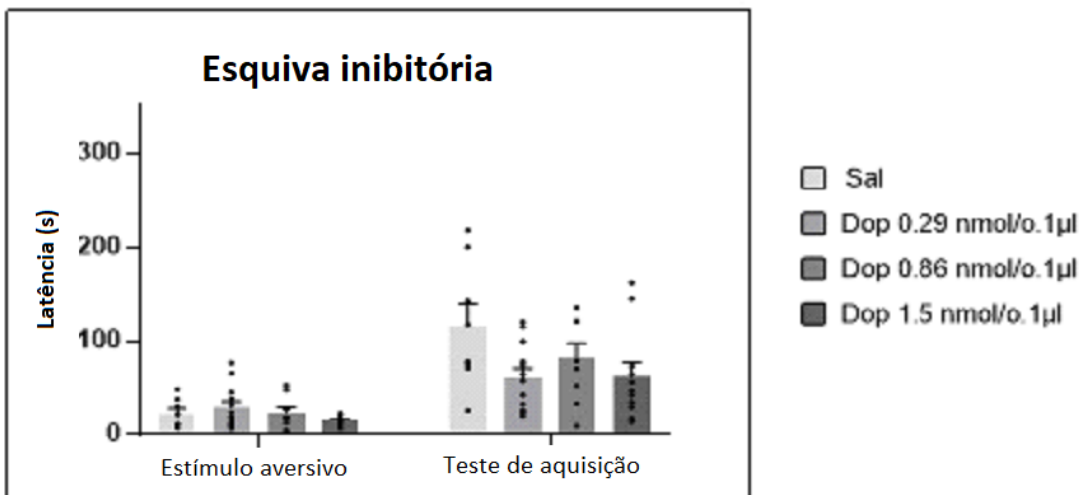


Figura 13: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Dopamina em diferentes doses submetidos ao teste de esquiva inibitória, $p=0.31$.

5.2.2. Experimento 2b) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar do antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH 23390 sobre a memória emocional de camundongos

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos do cruzamento para o lado escuro do teste de esquiva inibitória foram apresentados na tabela 7. Dois outliers foram identificados e removidos deste grupo experimental. A comparação intragrupo mostrou um aumento da latência de cruzamento para o lado escuro da caixa após a administração do choque nas patas em todos os grupos ($F_{1,29} = 21,68$; $p < 0.0001$), sinalizando o sucesso na aquisição da memória emocional aversiva. Além disso, análise de comparações múltiplas revelou uma diferença na latência de cruzamento ao longo dos três estágios entre os grupos ($F_{3,31} = 4,07$; $p = 0,01$). Contudo, não houve diferença entre os grupos tratados com SCH 23390 e o grupo controle para a latência de cruzamento. Os grupos que receberam SCH 23390 nas doses mais baixas (0,31 e 0,92 nmol/0,1ul) apresentaram uma latência de cruzamento menor quando comparados ao grupo que recebeu a dose mais alta de 1,54 nmol/0,1ul ($F_{3,32}=1.37$; $p=0.27$) (Figura 14), (Tabela 7).

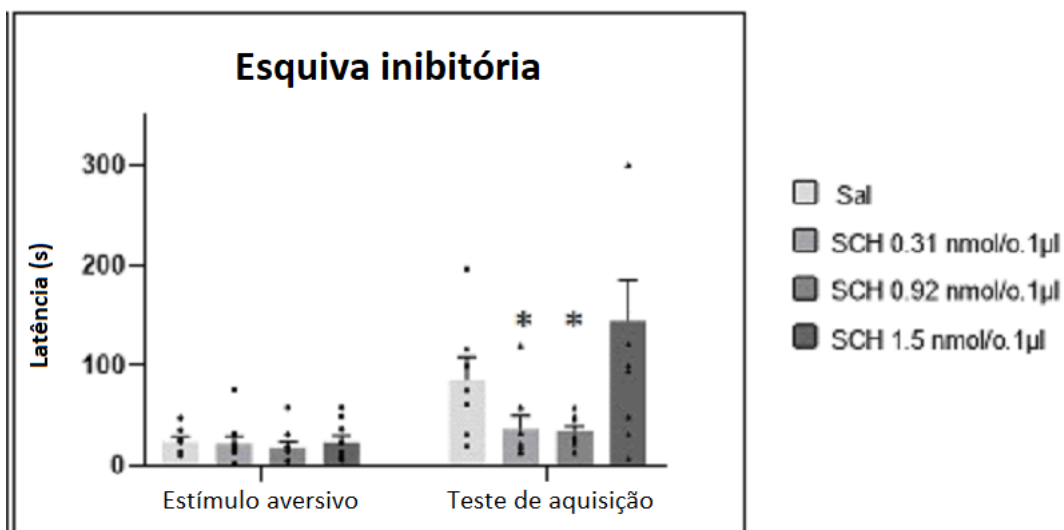


Figura 14: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e SCH 23390 em diferentes doses submetidos ao teste de esquiva inibitória, $p = 0.01$. * Diferença significativa comparado ao grupo SCH 1,54 nmol/0,1ul.

5.2.3. Experimento 2c) Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar do antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride sobre a memória emocional de camundongos.

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos do cruzamento para o lado escuro do teste de esquiva inibitória foram apresentados na tabela 7. Nenhum outlier foi identificado nesse grupo experimental. A análise estatística identificou que todos os grupos apresentaram um aumento da latência de cruzamento para o lado escuro da caixa após a administração do choque nas patas ($F_{1,29} = 64,23$; $p < 0.0001$), sinalizando o sucesso na aquisição da memória emocional aversiva. Além disso, a ANOVA de medidas repetidas apontou diferenças para a latência de cruzamento entre os grupos ($F_{3,29} = 4,15$; $p = 0.01$). O post hoc de Tukey identificou que o grupo que recebeu a dose mais alta de Eticlopride de 2.65 nmol/0.1µl apresentou um significativo aumento na latência de cruzamento quando comparado ao grupo controle ($p = 0.002$) e ao grupo que recebeu a menor dose de Eticlopride 0.26 nmol/0.1µl ($p = 0.002$) (Figura 15), indicando que a microinjeção no vérmis cerebelar de Eticlopride na dose 2.65 nmol/0.1ul provocou melhora na

aquisição de memória emocional no teste de esQUIVA inibitória em camundongos neste estudo (Tabela 7).

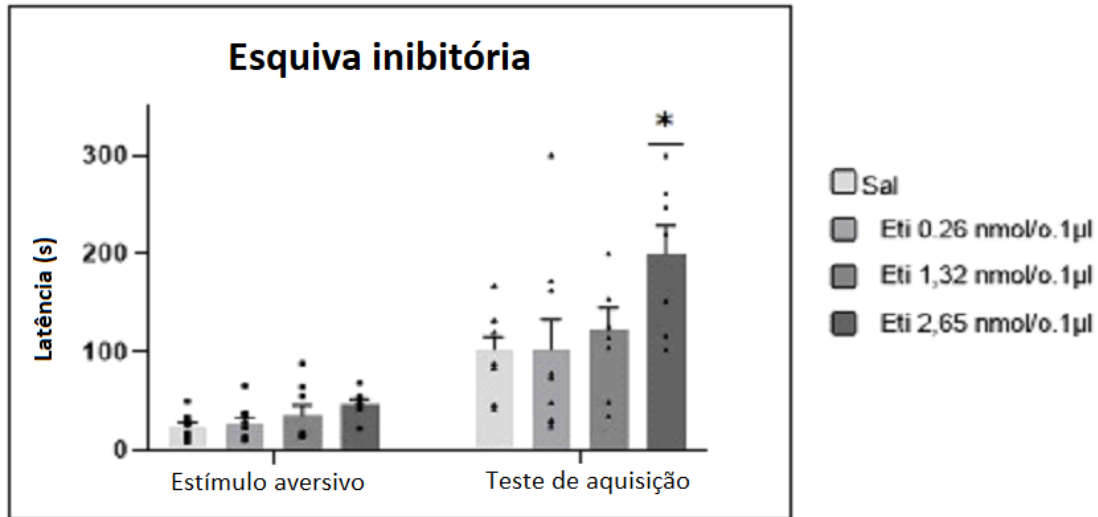


Figura 15: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos controle e Etilopride em diferentes doses submetidos ao teste de esQUIVA inibitória, * p = 0.01.

Tabela 7: Média da latência de cruzamento e erro padrão da média para os grupos submetidos ao teste de aquisição de memória de esQUIVA inibitória após microinjeção de Dopamina (DA), SCH 23390 (SCH), Etilopride (ETI) ou salina (SAL).

	Habituação 1	Habituação 2	Aquisição	Teste de aquisição
SAL	20.44 ± 3.91	27.41 ± 4.14	21.81 ± 5.01	115.54 ± 22.40
DA 0.29	46.56 ± 12.80	23.01 ± 4.92	29.02 ± 5.87	77.54 ± 19.29
DA 0.86	51.54 ± 15.01	26.45 ± 5.14	23.18 ± 4.73	81.93 ± 12.45
DA 1.5	33.51 ± 9.53	20.62 ± 4.28	14.73 ± 1.58	61.73 ± 14.69
SAL	29.05 ± 6.91	27.62 ± 6.83	24.13 ± 5.26	86.16 ± 22.59
SCH 0.31	34.84 ± 7.56	18.09 ± 6.45	22.23 ± 7.38	65.77 ± 31.47*
SCH 0.92	47.29 ± 17.35	20.26 ± 4.92	18.43 ± 5.23	61.15 ± 26.94*
SCH 1.54	39.95 ± 11.54	14.19 ± 3.63	23.59 ± 6.64	144.96 ± 40.51
SAL	53.66 ± 10.39	29.50 ± 3.79	24.04 ± 4.38	102.17 ± 13.61
ETI 0.26	54.17 ± 15.71	25.10 ± 3.95	16.90 ± 5.90	102.27 ± 30.85
ETI 1.32	25.64 ± 5.12	28.00 ± 4.88	35.61 ± 10.41	122.96 ± 21.79
ETI 2.65	36.11 ± 5.61	39.22 ± 7.35	46.76 ± 5.20	199.91 ± 28.96 *

5.2.4. Seleção de doses para os experimentos 3a, 3b, 4a e 4b

Os experimentos 1a, 1b, 1c, 2a, 2b e 2c forneceram informações sobre a ação isolada da microinjeção intravermis cerebelar de Dopamina e de antagonistas dopaminérgicos D1 e D2 em diferentes doses sobre o desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional de camundongos, descritas nos itens 5.1. e 5.2. deste estudo.

Assim, para a avaliação dos efeitos da injeção combinada de Histamina e SCH 23390 (antagonista dopaminérgico D1) sobre o desempenho motor, aprendizagem motora e memória emocional de camundongos, selecionamos a dose mais alta e sub-efetiva observada nos experimentos 1b e 2b, de 1.54 nmol/0.1µl.

A avaliação dos efeitos da injeção combinada de Histamina e Eticlopride (antagonista dopaminérgico D2) sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos foi feita com a administração da dose mais alta e sub-efetiva do experimento 1c, de 2.65nmol/0.1µl. Para avaliação dos efeitos combinados de Histamina e Eticlopride sobre a memória emocional, utilizamos a dose mais alta e sub-efetiva do experimento 2c, de 1.32 nmol/0.1ul.

5.3. EFEITOS DA INJEÇÃO COMBINADA DE HISTAMINA E ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SOBRE O DESEMPENHO MOTOR E APRENDIZAGEM MOTORA DE CAMUNDONGOS

5.3.1. Experimento 3a: Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar combinada de Histamina e do antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH23390 sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos.

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos de queda do rotarod e de travessia da trave de equilíbrio foram apresentados na tabela 8. Nenhum outlier foi identificado no grupo Rotarod e trave de equilíbrio. A análise intragrupo indicou que todos os grupos apresentaram um aumento na latência de queda do Rotarod ($F_{2,96} = 22,76$, $p < 0,0001$) e de travessia da trave de equilíbrio

($F_{2,96} = 13,26$; $p < 0,0001$) ao longo dos três estágios, indicando aprendizagem motora dentro do protocolo experimental aplicado.

A análise de variância indicou que houve diferença para a latência de queda do rotarod entre os grupos ($F_{3,96} = 3,17$; $p = 0,027$), e o teste de comparações múltiplas identificou que os grupo que receberam apenas Histamina (6,8nmol/0,1ul) ou apenas SCH23390 (1,54nmol/0,1ul) não apresentaram diferenças do grupo controle, porém o grupo que recebeu a injeção combinada de Histamina e SCH23390 apresentou piora no desempenho e aprendizado motor no rotarod, representado pelo menor tempo de permanência no aparato ($p = 0,024$) (Figura 16). Não houve diferença entre os grupos na avaliação de desempenho na trave de equilíbrio ($F_{3,96} = 2,350$; $p = 0,07$) (Figura 17), porém os valores obtidos na análise estatística indicam uma tendência ao aumento do tempo de travessia da trave de equilíbrio para o grupo que recebeu a injeção combinada de Histamina e SCH23390, indicando uma possível piora na coordenação motora e equilíbrio nesse aparato (Tabela 8).

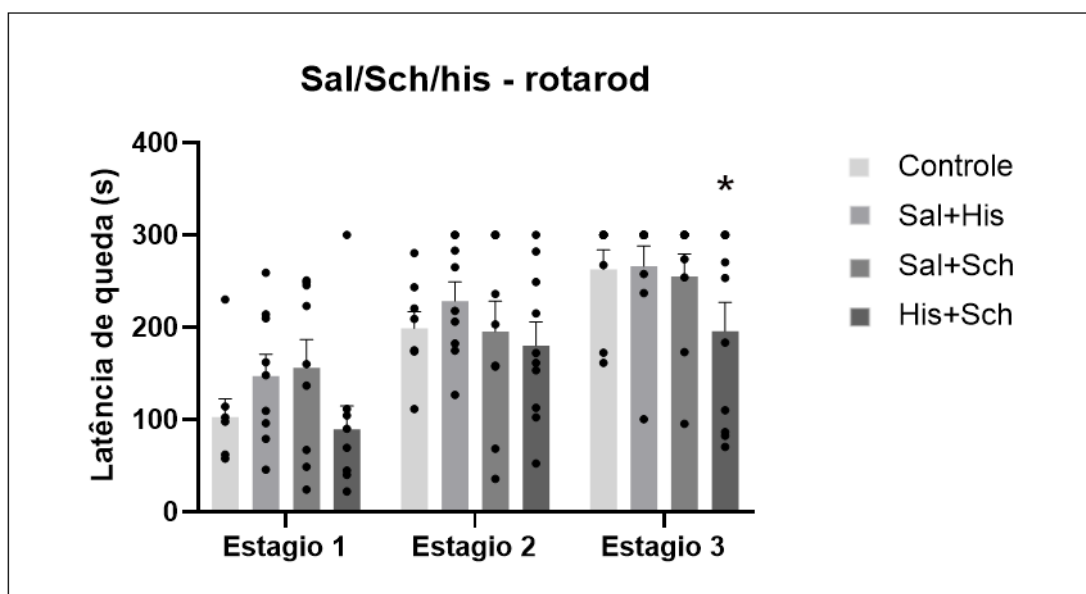


Figura 16: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos ao Rotarod, $p = 0,024$.

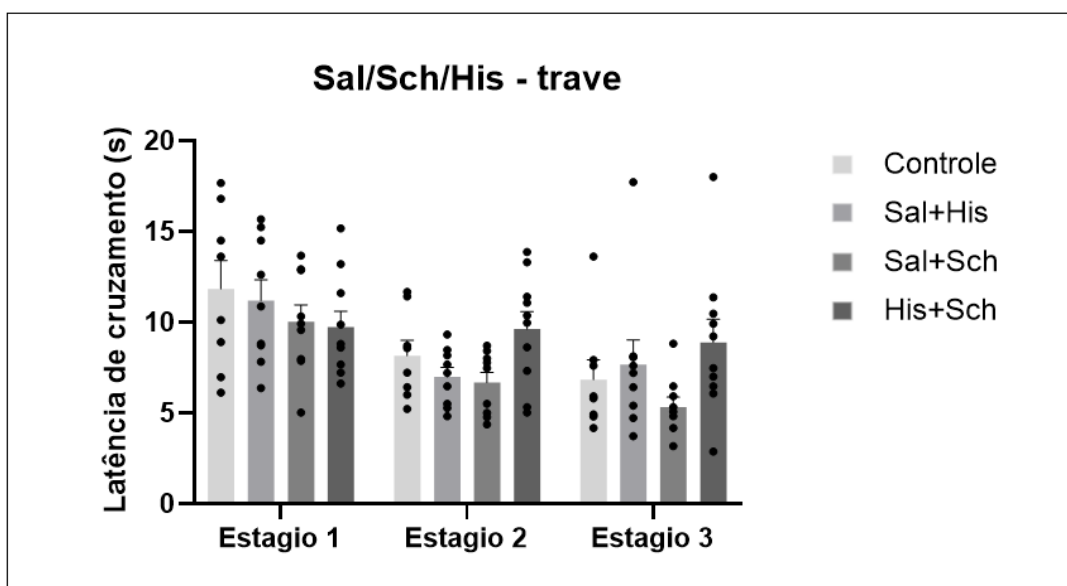


Figura 17: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0.07$.

5.3.2. Experimento 3b: Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar combinada de Histamina e do antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride sobre o desempenho motor e aprendizagem motora de camundongos.

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos de queda do rotarod e de travessia da trave de equilíbrio foram apresentados na tabela 8. Nenhum outlier foi identificado nos grupos submetidos ao Rotarod e trave de equilíbrio. A análise estatística não identificou diferença entre os grupos para a latência de queda do rotarod nos três estágios ($p=0.8$), assim como não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para o tempo de travessia na trave de equilíbrio ($p=0.8$), indicando que as microinjeções intravermis cerebelar de histamina e Eticlopride não provocaram efeitos na aprendizagem motora neste estudo (Figuras 18 e 19) (Tabela 8).

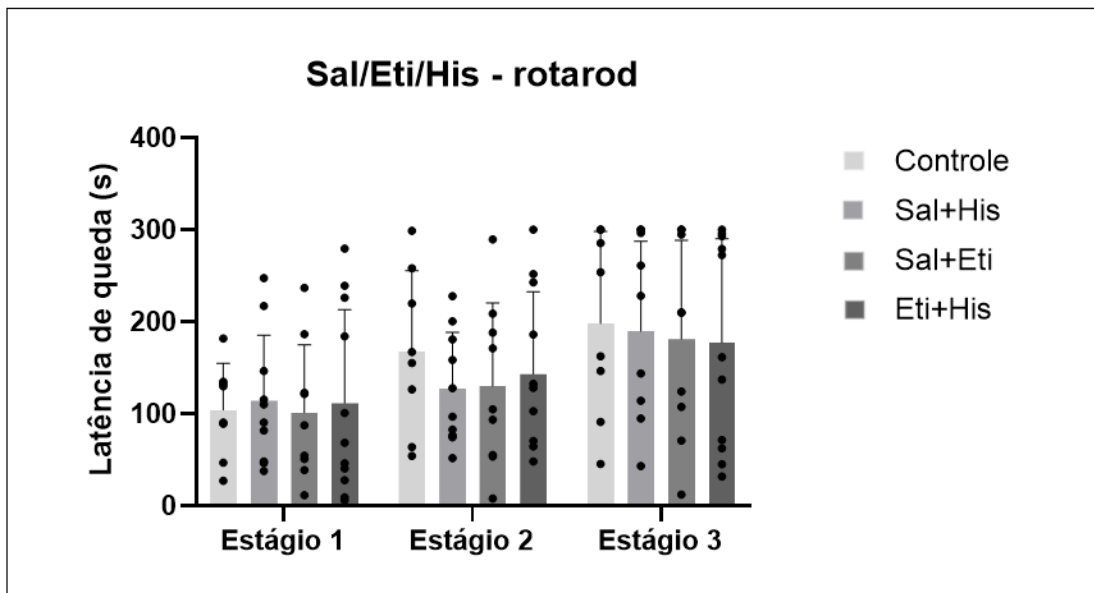


Figura 18: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos ao rotarod, $p = 0.08$.

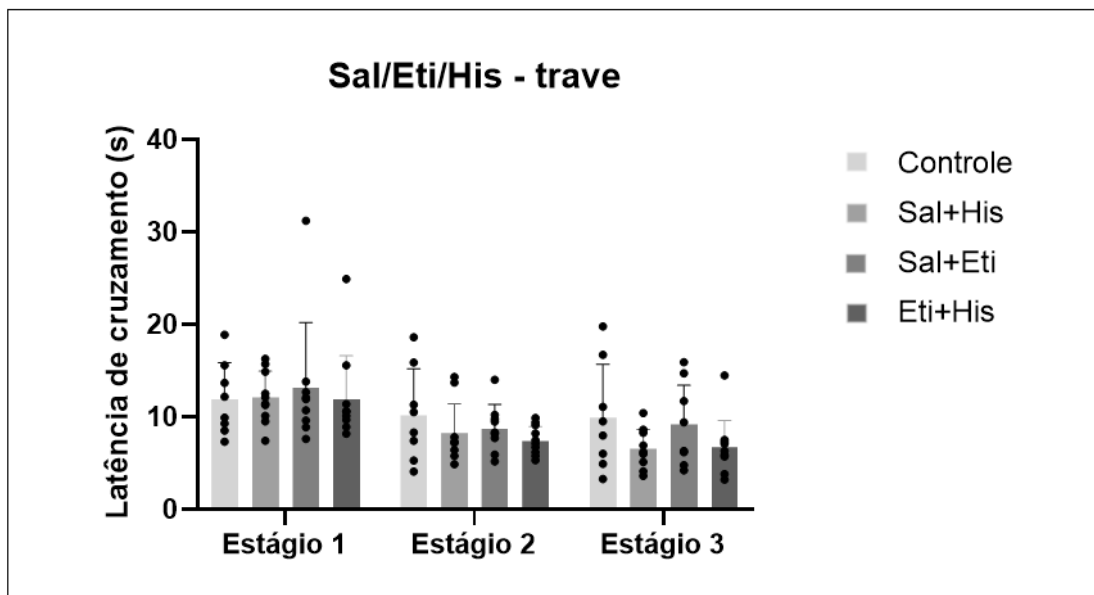


Figura 19: Média das três tentativas para cada estágio (pool) com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos à trave de equilíbrio, $p = 0.8$.

Tabela 8: Média da latência das três tentativas para cada estágio (pool) e erro padrão da média para os grupos submetidos ao Rotarod e trave de equilíbrio após protocolo de microinjeção combinada de Histamina e/ou SCH23390; Histamina e/ou Eticlopride.

	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3	
	Rotarod	Trave de Equilíbrio	Rotarod	Trave de Equilíbrio	Rotarod	Trave de Equilíbrio
SAL + SAL	102,9 ± 19,7	11,8 ± 1,6	198,7 ± 18,2	8,2 ± 0,8	262,7 ± 21,3	6,8 ± 1,1
SAL + HIS	147,1 ± 22,4	11,2 ± 1,2	228,5 ± 19,5	7,0 ± 0,5	266,2 ± 21,0	7,7 ± 1,4
SAL + SCH	156,2 ± 30,6	10,0 ± 0,9	195,5 ± 33,1	6,6 ± 0,6	255,2 ± 24,3	4,9 ± 0,3
HIS + SCH	89,6 ± 24,0	9,4 ± 0,9	180,1 ± 24,4	9,9 ± 1,0	195,7 ± 30,1*	8,8 ± 1,4
SAL + SAL	104,1 ± 18,0	11,9 ± 1,4	168,0 ± 30,9	10,2 ± 1,8	198,1 ± 35,4	9,9 ± 2,0
SAL + HIS	114,2 ± 22,6	12,4 ± 1,0	127,8 ± 19,2	8,4 ± 1,2	189,7 ± 30,9	6,3 ± 0,7
SAL + ETI	101,2 ± 24,6	13,2 ± 2,3	130,3 ± 30,0	9,2 ± 0,8	181,0 ± 35,8	9,5 ± 1,5
HIS + ETI	111,6 ± 30,6	10,6 ± 0,7	143,3 ± 26,9	7,1 ± 0,5	117,3 ± 34,0	7,1 ± 1,0

5.4. EFEITOS DA INJEÇÃO COMBINADA DE HISTAMINA E ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SOBRE A MEMÓRIA EMOCIONAL DE CAMUNDONGOS

5.4.1. Experimento 4a: Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar combinada de Histamina e do antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH23390 sobre a memória emocional de camundongos.

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos do cruzamento para o lado escuro do teste de esquiva inibitória foram apresentados na tabela 9. Nenhum outlier foi identificado nesse grupo experimental. A comparação intragrupo mostrou um aumento da latência de cruzamento para o lado escuro da caixa após a administração do choque nas patas em todos os grupos ($F_{1,58} = 75,92$; $p < 0.0001$), sinalizando o sucesso na aquisição da memória emocional aversiva. A análise de comparações identificou que não houve diferença na latência de cruzamento ao longo dos três estágios entre os grupos ($F_{3,58} = 0,12$; $p = 0,94$). (Figura 20), indicando que a microinjeção no vérmis cerebelar de histamina e de SCH23390 não provocou efeitos na aquisição de memória emocional neste estudo.

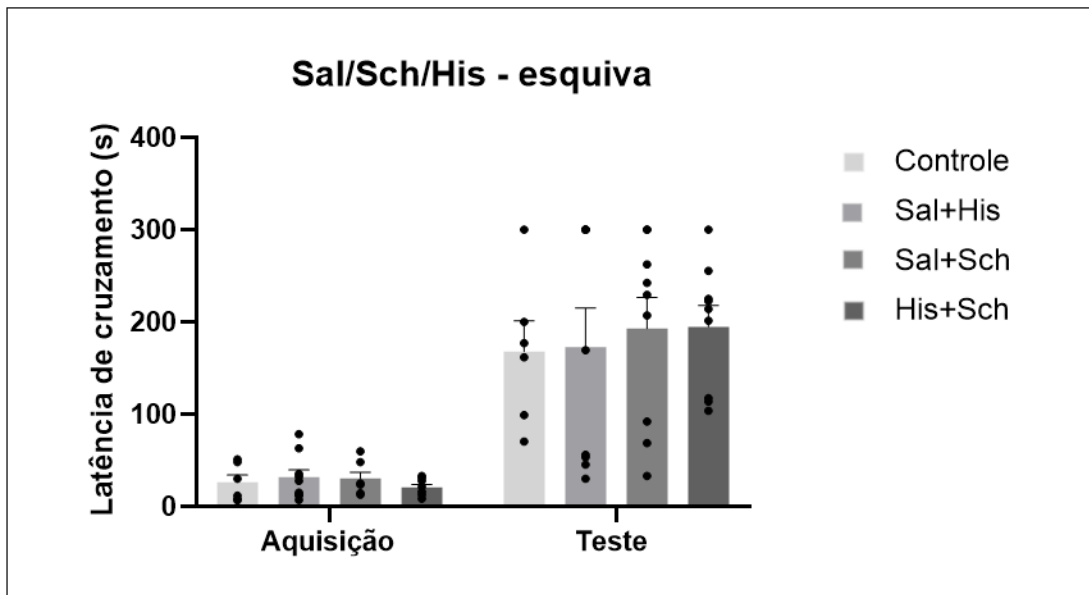


Figura 20: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos ao teste de esquiva inibitória.

5.4.2. Experimento 4b: Efeitos da microinjeção intravermis cerebelar combinada de Histamina e do antagonista de receptor dopaminérgico D2 Eticlopride sobre a memória emocional de camundongos.

Os dados de média e desvio padrão de latência em segundos do cruzamento para o lado escuro do teste de esquiva inibitória foram apresentados na tabela 9. Nenhum outlier foi identificado nesse grupo experimental. A comparação intragrupo mostrou um aumento da latência de cruzamento para o lado escuro da caixa após a administração do choque nas patas em todos os grupos ($p < 0.0001$), sinalizando o sucesso na aquisição da memória emocional aversiva. Além disso, a ANOVA de medidas repetidas apontou diferenças para a latência de cruzamento entre os grupos ($F_{3,31} = 2,55$; $p = 0.007$). O post hoc identificou que o grupo que recebeu a microinjeção combinada de Eticlopride e Histamina apresentou um significativo aumento na latência de cruzamento na fase de teste pós aquisição de memória emocional quando comparado aos grupos que receberam solução salina ($p = 0.02$), somente Eticlopride ($p = 0,004$) e somente histamina ($p = 0,005$) (Figura 21), indicando que a microinjeção combinada de Eticlopride e Histamina no vérmis

cerebelar provocou melhora na aquisição de memória emocional no teste de esQUIVA inibitória em camundongos neste estudo.

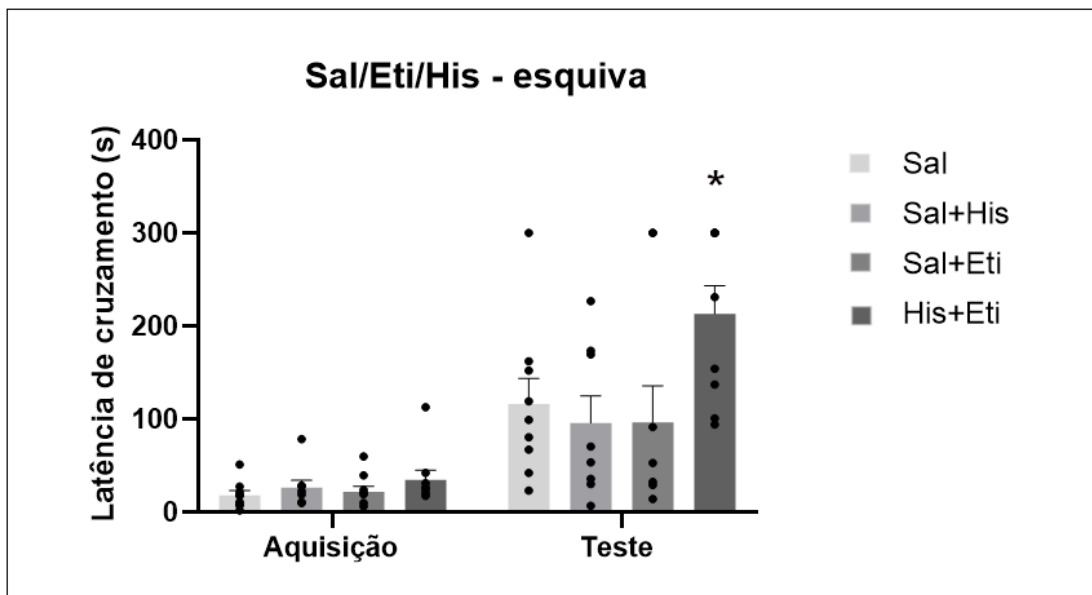


Figura 21: Média da latência de cruzamento com dispersão e erro padrão da média para os grupos submetidos ao teste de esQUIVA inibitória.

Tabela 9: Média da latência de cruzamento e erro padrão da média para os grupos submetidos ao teste de aquisição de memória de esQUIVA inibitória após protocolos de microinjeção combinada de Histamina e/ou SCH23390; Histamina e/ou Eticlopride.

	Habituação 1	Habituação 2	Aquisição	Teste de aquisição
SAL + SAL	25,33 ± 5,99	33,72 ± 10,53	26,05 ± 7,60	168,05 ± 30,63
SAL + HIS	28,70 ± 5,79	29,02 ± 9,33	31,70 ± 8,18	172,75 ± 42,35
SAL + SCH	34,24 ± 4,39	29,92 ± 9,06	30,42 ± 6,25	192,86 ± 32,18
HIS + SCH	40,63 ± 12,29	37,77 ± 6,10	20,88 ± 3,11	194,90 ± 22,88
SAL + SAL	34,78 ± 11,42	23,59 ± 9,46	18,29 ± 5,55	116,12 ± 31,44
SAL + HIS	22,05 ± 3,61	19,58 ± 1,97	26,10 ± 7,50	95,86 ± 27,29
SAL + ETI	38,73 ± 8,26	27,28 ± 9,48	21,78 ± 5,60	96,55 ± 37,20
HIS + ETI	36,33 ± 10,40	24,09 ± 5,37	34,93 ± 10,08	213,07 ± 30,39 *

Tabela 10: síntese dos resultados apresentados

Experimento	Fármacos	Aprendizagem motora	Memória aversiva
-------------	----------	---------------------	------------------

1A e 2 ^a	DOP (0.29, 0.86 ou 1.5)	Dopamina não apresentou efeitos nas doses utilizadas	Dopamina não apresentou efeitos nas doses utilizadas
1B e 2B	SCH (0.31, 0.92 ou 1.54)	SCH23390 não apresentou efeitos nas doses utilizadas	SCH23390 não apresentou efeitos nas doses utilizadas
1C e 2C	ETI (0.26, 1.32 ou 2.65)	Eticlopride não apresentou efeitos nas doses utilizadas	Dose mais alta de Eticlopride provocou melhora da aquisição de memória aversiva.
3A e 4 ^a	HIS (6.8) SCH (1.54)	Histamina e SCH23390 não apresentaram efeitos nas doses utilizadas. HIS + SCH provocou piora no desempenho e aprendizado motor.	Histamina e SCH23390 isoladas ou combinadas não apresentaram efeitos nas doses utilizadas.
3B e 4B	HIS (6.8) ETI (2.65, 1.32)	Histamina e Eticlopride isoladas ou combinadas não apresentaram efeitos nas doses utilizadas.	Histamina e Eticlopride não apresentaram efeitos nas doses utilizadas. HIS + ETI provocou melhora na aquisição de memória aversiva.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, buscamos compreender os efeitos da ação isolada de componentes do sistema dopaminérgico cerebelar em diferentes doses sobre a aprendizagem motora e memória emocional de camundongos, assim como investigar o efeito da interação das mesmas drogas em doses sub-efetivas com a administração combinada de histamina intracerebelar. Observamos que a administração intravermis cerebelar isolada de Dopamina e SCH 23390 não apresentou efeitos sobre o comportamento motor, aprendizagem motora e memória emocional nesse estudo. A microinjeção de Eticlopride não apresentou efeitos sobre o comportamento motor e aprendizagem motora, porém a dose mais alta provocou melhora na aquisição de memória emocional em tarefa de esquiva inibitória ($p=0.01$). A injeção combinada de Histamina e SCH23390 não apresentou efeitos sobre a aquisição de memória emocional na esquiva inibitória. No entanto, animais que receberam essa combinação de drogas apresentaram uma piora no desempenho e aprendizagem motora. A injeção combinada de Histamina e

Eticlopride não apresentou efeitos sobre a aprendizagem motora, porém provocou melhora na aquisição de memória emocional aversiva.

No que se refere ao papel dos agentes dopaminérgicos no aprendizado motor, nós observamos que a microinjeção isolada de diferentes doses de Dopamina, antagonista dopaminérgico D1 SCH23390, e antagonista dopaminérgico D2 Eticlopride, não provocou mudanças significantes no desempenho motor em camundongos submetidos aos testes comportamentais Rotarod e trave de equilíbrio ao longo dos três estágios do protocolo de aprendizagem motora realizado no presente estudo.

A investigação dos efeitos da injeção combinada de Histamina e/ou SCH23390, no entanto, mostrou que o grupo que recebeu a injeção combinada de Histamina e SCH23390 apresentou piora no desempenho e aprendizado motor, representado pelo menor tempo de permanência no Rotarod, e tendência do aumento do tempo de travessia na trave de equilíbrio. A injeção combinada de Histamina e/ou Eticlopride não apresentou efeitos neste modelo experimental.

Alguns estudos têm investigado o papel do sistema dopaminérgico na função motora. Por exemplo, a administração i.p. de antagonistas de receptor D1 foi relacionada a déficits de coordenação motora (Avila-Luna et al., 2016), e a ausência de receptores D2 leva a severos comprometimentos na coordenação motora, locomoção e aprendizado motor (Bello et al., 2017; Lim et al., 2019). Além disso, a administração de antagonistas de D1 e D2 no córtex motor prejudica a aquisição de habilidades motoras e plasticidade sináptica (Molina-Luna et al., 2009; Rioult-Pedotti et al., 2015).

Sabe-se que a administração intracerebelar de antagonistas D2 apresenta um efeito imediato de diminuição do movimento espontâneo (Boulay et al., 2000; Waclaw; Maj, 2001; Barik; Beaurepaire, 2005; Kolasiewicz; Ossowska, 2008; Shimizu et al., 2014), mas nenhum estudo foi encontrado a respeito da influência desses agentes dopaminérgicos intracerebelares no aprendizado motor.

A relação entre os sistemas histaminérgico e dopaminérgico vem sendo cada vez mais investigada. Em uma revisão de literatura, Brabrant e colaboradores mostraram que a histamina pode inibir ou estimular o sistema dopaminérgico

mesencefálico por meio de mecanismos distintos. Em contrapartida, a ativação de receptores D2 parece ser capaz de modular a liberação de histamina no hipotálamo relacionada a comportamentos de recompensa (Brabant et al., 2010).

Em estudos com animais geneticamente modificados para a falta de histamina, evidenciou-se que a deficiência de histamina foi capaz de gerar modulações pré e pós-sinápticas no sistema dopaminérgico estriatal, além de mudanças no comportamento motor e exploratório, evidenciando a interação histamina-dopamina na via nigroestriatal (Abdurakhmanova et al., 2019; Koski et al., 2020). De forma semelhante, a falta de receptores histaminérgicos H3 é um importante regulador sensório-motor, capaz de modificar a sinalização dopaminérgica estriatal (Ferrada et al., 2008; Vanhanen et al., 2016).

No que se refere à investigação da aquisição de memória aversiva, nós observamos que camundongos que receberam uma injeção intravermis cerebelar isolada do antagonista de receptor D2 Eticlopride na dose de 2.65 nmol/0,1µl apresentaram uma melhora na aquisição de memória emocional, demonstrada pela supressão de sua preferência inata pelo compartimento escuro do equipamento de esquiva inibitória após a administração de choque nas patas na fase de aquisição. Contudo, as doses mais baixas de Eticlopride, e a microinjeção de Dopamina e SCH23390 não apresentaram efeitos no mesmo teste comportamental, amplamente utilizado para avaliação de memória emocional em roedores (Gold, 1986; Izquierdo, Medina, 1997; Arawaka, 2019).

Ainda, observamos que a microinjeção combinada de dose subefetiva de Eticlopride e Histamina no vérmis cerebelar provocou melhora na aquisição de memória emocional no teste de esquiva inibitória quando comparados aos grupos que receberam apenas Histamina, apenas Eticlopride, ou apenas solução salina. A combinação de Histamina e/ou SCH23390 não provocou efeitos neste modelo comportamental.

Teorias recentes sugerem que, assim como o aprendizado motor que ocorre por meio da integração de diferentes estruturas do sistema nervoso central, como cerebelo, córtex pré-frontal e núcleos da base, o controle psicológico envolvendo comportamentos de medo e ansiedade é sinérgico e integrado, no qual diferentes

estímulos aversivos podem estimular diferentes níveis hierárquicos do sistema defensivo (McNaughton; Coor, 2004).

Estudos prévios demonstraram que o sistema de neurotransmissão dopaminérgico tem um papel importante em processos de aprendizagem e memória (Saito et al., 2020; Steinberg et al., 2020). Em uma revisão de literatura, Likkтик e Johansen (2019) apontaram que neurônios dopaminérgicos têm origem em regiões mesencefálicas, como a área tegmental ventral (VTA) e a substância negra (SN), e se projetam para amígdala central e lateral, modulando o aprendizado aversivo, por meio de respostas a situações inesperadas e pistas que os predizem. De forma similar, VTA envia projeções dopaminérgicas para o córtex cerebelar (Ikai et al., 1994) e recebe projeções provenientes de células de Purkinje (Snider et al., 1976) e dos núcleos cerebelares (Watabe-Uchita et al., 2012; Carta et al., 2019), o que pode representar um importante circuito pelo qual o cerebelo modula informações de outras estruturas relacionadas ao sistema límbico (Ikai et al., 1996). Além disso, o cerebelo parece ser capaz de exercer controle inibitório (Gil-Miravet et al., 2019) e modular níveis de dopamina no córtex pré-frontal (PFC) (Rogers et al., 2011), uma estrutura importante para o processamento de memórias aversivas (Canto-de-Souza et al., 2016). Por sua vez, o córtex pré-frontal tem influência sobre as projeções dopaminérgicas provenientes da VTA que inervam amígdala e hipocampo (Izquierdo et al., 2016). Dessa forma, acreditamos que o circuito cerebelo-VTA-PFC possa ser um elemento chave na modulação de memórias aversivas.

Sabe-se que um estímulo aversivo é capaz de aumentar a ativação de vérmis cerebelar (Ernst et al., 2019), mas a forma como o sistema dopaminérgico cerebelar age no processamento de memória aversiva é desconhecida. Um recente estudo fez um mapeamento da tirosina hidroxilase – um precursor de dopamina – em diferentes regiões do cerebelo, incluindo o vérmis cerebelar. Os autores mostraram que a sinalização catecolinérgica, dentro de um subconjunto de células de Purkinje, pode modular o condicionamento aversivo sem afetar a função motora grossa no teste em Rotarod (Locke et al., 2020). Baseado nesses achados e nos resultados do presente estudo, acreditamos que o receptor dopaminérgico D2 possam exercer um papel na modulação cerebelar de memória emocional.

Mesmo que a microinjeção intravermis cerebelar de Dopamina e do antagonista dopaminérgico D1 SCH23390 não tenham provocado mudanças comportamentais significativas no protocolo de avaliação de memória aversiva por meio da esQUIVA inibitória no presente estudo, seus efeitos não podem ser negligenciados. A dose mais alta de Dopamina levou a uma diminuição de aproximadamente 46% na média de latência de cruzamento para o compartimento escuro quando comparado ao grupo controle, enquanto a dose mais alta de SCH23390 causou um aumento de cerca de 40% na mesma variável em comparação ao grupo controle. Dessa forma, interpretamos que os dados obtidos neste estudo não podem excluir completamente a possibilidade de participação dos receptores dopaminérgicos D1 na aquisição de memória aversiva.

De acordo com Fujita e colaboradores (2020), o vérmis cerebelar possui diversos módulos ao longo dos diferentes lóbulos, que podem se conectar com diferentes núcleos e de diferentes formas no tronco encefálico, facilitando uma variedade de funções. Acreditamos que o cerebelo é uma estrutura chave na modulação do comportamento adaptativo. Nossa hipótese é que o cerebelo – por meio de suas conexões com outras estruturas do SNC, e se valendo de suas projeções dopaminérgicas e histaminérgicas – pode atuar produzindo ajustes comportamentais de forma semelhante ao mecanismo utilizado para o ajuste de movimentos.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo identificamos que a administração de dopamina nas doses 0.29, 0.86 e 1.5 nmol / 0.1µl, antagonista de receptor dopaminérgico D1 SCH233390 nas doses 0.31, 0.92 e 1.54 nmol / 0.1µl, antagonista de receptor D2 Eticlopride nas doses 0.26, e 1.32 nmol / 0.1µl doses não provocaram efeito comportamental nos modelos experimentais utilizados.

Ainda, identificamos que a administração de combinada de Histamina na dose na dose 6.8nmol/0.1µl foi capaz de potencializar a ação de doses sub efetivas dos antagonistas dopaminérgicos D1 e D2 em diferentes modelos experimentais, o que

fortalece a hipótese de ação conjunta desses sistemas no processamento de funções motoras e não motoras. Receptores D1 parecem ser predominantemente relacionados à processos de aprendizagem motora, enquanto receptores D2 parecem ser predominantemente relacionados ao processamento de memórias aversivas. Contudo, o circuito cerebelar envolvido no processamento de tais funções precisa ser melhor investigado.

8. REFERÊNCIAS

- ABDURAKHMANOVA S et al. Abnormal behavior, striatal dopamine turnover and opioid peptide gene expression in histamine-deficient mice. *Genes, Brain and Behavior*, e125995, 2019.
- ADAMASZEK M et al. Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. *Cerebellum*, 552-576, 2017.
- ARAKAWA H. Sensorimotor developmental factors influencing the performance of laboratory rodents on learning and memory. *Behav. Brain Res.*, 375, 112140, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112140>.
- AVILA-LUNA A et al. Dopamine D1 receptor activation maintains motor coordination and balance in rats. *Metab. Brain Dis.*, 33(1), 99 – 105, 2016. doi: 10.1007/s11011-017-0126-x.
- BANANEJ M et al. D1 and D2 dopaminergic systems in the rat basolateral amygdala are involved in anxiogenic-like effects induced by histamine. *Journal of Psychopharmacology*, 26, 564-74, 2012.
- BARIK S; BEAUREPAIRE R. Dopamine D3 modulation of locomotor activity and sleep in the nucleus accumbens and in the lobules 9 and 10 of the cerebellum in the rat. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 29(5), 718 – 726, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.04.020>.
- BARILI P et al. Microanatomical localization of dopamine receptor protein immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Brain Research*, 854, 130-138, 2000.

BELLO EP et al. Inducible ablation of dopamine d2 receptors in adult mice impairs locomotion, motor skill learning and leads to severe parkinsonism. *Mol. Psychiatry*, 22, 595 – 604, 2017. DOI: 10.1038/mp.2016.105.

BETTIO LEB; RAJENDRAN L; GIL-MOHAPEL J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2017, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.neubiorev.2017.04.030>.

BOULAY D et al. Decreased locomotor activity after microinjection of dopamine D2/D3 receptor agonists and antagonists into lobule 9/10 of the cerebellum: a D3 receptor mediated effect? *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*. 24, 39–49, 2000. doi: 10.1016/ s0278-5846(99)00079-2.

BRABRANT C et al. Involvement of the brain histaminergic system in addiction and addiction-related behaviors: A comprehensive review with emphasis on the potential therapeutic use of histaminergic compounds in drug dependence. *Progress in Neurobiology*, 92, 421-441, 2010.

CALIGIORE D et al. The super learning hypothesis: Integrating learning processes across cortex, cerebellum and basal ganglia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 100, 19 – 34, 2019.

CANTO-DE-SOUZA L; MATTIOLI R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem.*, 130, 44 – 51, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.012>.

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*, 928, 50-59, 2002.

CARTA I et al. Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science* 363:eaav0581, 2019. doi: 10.1126/science.aav0581

CHINTA SJ, ANDERSEN JK. Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37, 942-946, 2005.

CURZON P et al. The behavioral assessment of sensorimotor processes in the mouse: acoustic startle, sensory gating, locomotor activity, rotarod, and beam

walking,” in *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. ed. J. J. Buccafusco, 2009. (Boca Raton, FL: CRC Press).

DERE E et al. Episodic-like and procedural memory impairments in histamine H1 Receptor knockout mice coincide with changes in acetylcholine esterase activity in the hippocampus and dopamine turnover in the cerebellum. *Neuroscience*, 157(3), 532-41, 2008.

EL-GHUNDI M; O'DOWD BF; GEORGE SR. Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Reviews in the Neurosciences*, 18, 37-66, 2007.

ERNST TM et al. The cerebellum is involved in processing of predictions and prediction errors in a fear conditioning paradigm. *eLife*, 8: e46831, 2019. doi: 10.7554/eLife.46831.

FERNANDES CEM et al. Intracerebellar microinjection of an H₃ agonist impairs memory consolidation in open field and rotarod tasks in mice. *International Journal of Cognition and Behaviour*, 2021, DOI: 10.23937/2690-3172/1710012.

FERRADA C et al. Interactions between histamine H₃ and Dopamine D₂ receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology*, 55(2), 190-7, 2008.

FUIJTA H; KODAMA T; DU LAC S. Modular outputs circuits of the fastigial nucleus for diverse motor and nonmotor functions of the cerebellar vermis. *eLife*, 9, e58613, 2020. doi: 10.7554/eLife.58613.

GALLEOTI N; SANNA MD; GHELARDINI C. Pleiotropic effect of histamine H₄ receptor modulation in the central nervous system. *Neuropharmacology*, 71, 141 – 147, 2013.

GIANLORENÇO ACL; CANTO-DE-SOUZA A; MATTIOLI R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. *Brain Research Bulletin*, 86, 134-138, 2011.

GIANLORENÇO ACL et al. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H₁ but not H₂ receptors. *Brain Research Bulletin*, 89, 197-202, 2012.

GIANLORENÇO ACL; CANTO-DE-SOUZA A; MATTIOLI R. Intracerebellar microinjections of histamine enhance memory consolidation of inhibitory avoidance learning in mice via H2 receptors. *Neuroscience Letters*, 557, 159-164, 2013.

GIANLORENÇO ACL et al. Cerebellar vermis H2 receptors mediate fear memory consolidation in mice. *Neuroscience Letters*, 57-61, 2015.

GIL-MIRAVET I et al. From back to front: A functional model for the cerebellar modulation in the establishment of conditioned preferences for cocaine-related cues. *Addict Biol.* 26:e12834, 2019. doi: 10.1111/adb.12834

GOLD PE. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology*, 46(1), 87 – 98, 1986.
[https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(86\)90927-1](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(86)90927-1).

GRANGER AJ; WALLACE ML; SABATINI BL. Multi-transmitter neurons in the mammalian central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 85-91, 2017.

GUILHERME EM et al. Intracerebellar microinjection of histaminergic compounds on locomotor and exploratory behaviors in mice. *Neuroscience Letters*, 687, 10-15, 2018.

GUILHERME EM; GIANLORENÇO ACL. The effects of intravermis cerebellar microinjections of dopaminergic agents in motor learning and aversive memory acquisition in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2021, doi: 10.3389/fnbeh.2021.628357.

HAAS HL; SERGEEVA OA; SELBACH O. Histamine in the Nervous System. *Physiological Reviews*, 88, 1183-1241, 2008.

HAMILTON TJ et al. Dopamine modulates synaptic plasticity in dendrites of rat and human dentate granule cells. *PNAS*, 107, 18185 – 18190, 2010.

HE X et al. Cdk5/p35 is required for motor coordination and cerebellar plasticity. *Journal of Neurochemistry*, 131(1), 53-64, 2014.

HOOBKAMER W et al. Quick foot placement adjustments during gait are less accurate in individuals with focal cerebellar lesions. *Gait & Posture*, 58, 390-393, 2017.

IKAI Y et al. Dopaminergic and non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat project, respectively, to the cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei. *Neuroscience*, 51(3), 719 – 728, 1996. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90310-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90310-X).

IKAI Y; TAKADA M; MIZUNO N. Single neuron in the ventral tegmental area that project to both the cerebral and cerebellar cortical areas by way of axon collaterals. *Neuroscience*, 61(4), 925 – 934, 1994. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90413-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90413-8)

IZQUIERDO I; FURINI CRG; MYSKIW JC. Fear memory. *Physiol Rev.* 96, 695–750, 2016. doi: 10.1152/physrev.00018.2015.

IZQUIERDO I; MEDINA JH. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 86, 285 – 316, 1997.
DOI: 10.1006/nlme.1997.3799

JABER M et al. Dopamine Receptors and Brain Function – Review. *Neuropharmacology*, 35(11), 1503-1519, 1996.

KOBAYASHI K. Role of Catecholamine Signaling in Brain and Nervous System Functions: New Insights from Mouse Molecular Genetic Study *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(1), 115-121, 2001.

KOLASIEWICZ W; OSSOWSKA JM. The involvement of cerebellar dopamine D3 receptors in locomotor activity of rats. *J. Neural Transm.*, 115(5), 667 – 681, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0009-0>.

KOSKI SK et al. Genetic lack of histamine upregulates dopamine neurotransmission and alters rotational behavior but not levodopa-induced dyskinesia in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 729, 134932, 2020.

LAUZON NM et al. Supra-normal stimulation of dopamine D1 receptors in the prelimbic cortex blocks behavioral expression of both aversive and rewarding associative memories through a cyclic-AMP-dependent signaling pathway. *Neuropharmacology*, 67, 104-114, 2013.

LEURS R; SMIT MJ; TIMMERMAN H. Molecular Pharmacological Aspects of Histamine Receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 413-463, 1995.

LI B; ZHU J; WANG J. Histaminergic afferent system in the cerebellum: structure and function. *Cerebellum & Ataxias*, 1-9, 2014.

LIKHTIK E; JOHANSEN JP. Neuromodulation in circuits of aversive emotional learning. *Nat. Neurosci.*, 22, 1586 – 1597, 2019. DOI <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0503-3>.

LIM HR et al. DRG2 deficient mice exhibit impaired motor behaviors with reduced striatal dopamine release. *Int J Mol Sci*, 21(1), 60, 2019. doi: 10.3390/ijms21010060.

LOCKE TM et al. Purkinje cell-specific knockout of tyrosine hydroxylase impairs cognitive behaviors. *Front Cell Neurosci.*, 14: 228, 2020. doi: 10.3389/fncel.2020.00228.

LOCKE TM et al. Dopamine D1 Receptor-Positive Neurons in the Lateral Nucleus of the Cerebellum Contribute to Cognitive Behavior. *Biological Psychiatry*, 84, 401 – 412, 2018.

LODISH H et al. Neurotransmitters, Synapses and Impulse Transmission. Section 21.4, *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York: W.H. Freeman, 2000.

LOVINGER DM. Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Research & Health.*, 31(3), 196-214, 2008.

MARIËN P; BEATON A. The enigmatic linguistic cerebellum: clinical relevance and unanswered questions on nonmotor speech and language deficits in cerebellar disorders. *Cerebellum & Ataxias*, 1-12, 2014.

MCNAUGHTON N; CORR PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(3), 285 – 305, 2004.

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

MESSIER C; ÉMOND S; ETHIER K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 63(2), 313-318, 1999.

MITTLEMAN G et al. Cerebellar Modulation of Frontal Cortex Dopamine Efflux in Mice: Relevance to Autism and Schizophrenia. *Synapse*, 62(7), 2008. doi:10.1002/syn.20525.

MOLINA-LUNA, K et al. Dopamine in motor cortex is necessary for skill learning and synaptic plasticity. PLoS One, 4(9), e7082, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0007082.

NASEHI M et al. Harmaline induced amnesia: possible role of amygdala dopaminergic system. Neuroscience, 312, 1-9, 2016.

NOWAK JZ. Depolarisation-evoked release of dopamine and histamine from brain tissue and studies on presynaptic dopamine-histamine interaction. Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy, 37(3), 359-81, 1985.

NUNES-DE-SOUZA V et al. 5-HT₂ receptor activation in the med brain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behavior in mice. Behavior Brain Research, 187, 72-79, 2008.

PANULA P et al. Histamine containing nerve fibers innervate human cerebellum. Neuroscience Letters, 160, 53-56, 1993.

PANULA P et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. Pharmacological Reviews, 67, 601-655, 2015.

PASSANI MB et al. Histamine regulates memory consolidation. Neurobiology of Learning and Memory, 2017, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2017.08.007>.

PAUL VN; CHOPRA K; KULKARNI SK. Modulation of motor functions involving central dopaminergic system by L-histidine. Indian Journal of Experimental Biology, 38(10), 988-93, 2000.

PAULIN MG. The role of the cerebellum in motor control and perception. Brain Behav Evol, 41(1):39-50, 1993. doi: 10.1159/000113822.

PAXINOS G; FRANKLIN KBJ. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. Elsevier Science, California, 2001.

RODWELL VW. Conversion of Amino Acids to Specialized Products. In: Murray, R. K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., et al. Harper's Illustrated Biochemistry, 26th ed. McGraw-Hill, London, 264-269, 2003.

RIOULT-PEDOTTI MS et al. Dopamine promotes motor cortex plasticity and motor skill learning via plc activation. PLoS One, 10(5), e0124986, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0124986

ROGERS TD et al. Connecting the dots of cerebro-cerebellar role in cognitive function: neuronal pathways for cerebellar modulation of dopamine release in the prefrontal cortex. *Synapse*, 65(11), 2011, doi: 10.1002/syn.20960.

SACHETTI B; SCELFO B; STRATA P. Cerebellum and Emotional Behavior – Review. *Neuroscience*, 162, 756-762, 2009.

SAITO N et al. Neurotransmission through dopamine D1 receptors is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex. *Neurosci. Res.*, 156, 58 – 65, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.04.006>.

SÁMANO C; CIFUENTES F; MORALES MA. Neurotransmitter segregation: Functional and plastic implications. *Progress in Neurobiology*, 97, 277-287, 2012.

SANTANGELO A et al. Brain histamine depletion enhances the behavioral sequences complexity of mice tested in the open field: Partial reversal effect of the dopamine D2/D3 antagonist sulpiride. *Neuropharmacology*, 2017, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.11.007.

SCHMAHMANN JD; WEILBURG JB; SHERMAN JC. The neuropsychiatry of the cerebellum: insights from the clinic. *The Cerebellum*, 6, 254-267, 2007.

SCHNEIDER EH; NEUMANN D; SEIFERT R. Modulation of behavior by the histaminergic system: Lessons from H1R- and H2R- deficient mice – Review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 42, 252-266, 2014.

SCHNEIDER EH; NEUMANN D; SEIFERT R. Modulation of behavior by the histaminergic system: Lessons from HDC-, H3R- and H4R- deficient mice – Review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 47, 101-121, 2014.

SHIMIZU S et al. Role of cerebellar dopamine D3 receptors in modulating exploratory locomotion and cataleptogenicity in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol Psychiatry*, 50, 157 – 162, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.12.013>.

SHIROMA A et al. Cerebellar Contribution to Patter Separation of Human Hippocampal Memory Circuits. *Cerebellum*, 645-662, 2016.

SILVA-MARQUES B; GIANLORENÇO ACL; MATTIOLI R. Intracerebellar vermis histamine facilitates memory consolidation in the elevated T maze model. *Neuroscience Letters*, 620, 33-37, 2016.

SNIDER RS; MAITI A; SNIDER SR. Cerebellar pathways to ventral midbrain and nigra. *Exp. Neurol.*, 53, 714 – 728, 1976. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90150-3).

SONG YN et al. Histamine improves rat rota-rod and balance beam performances through H2 receptors in the cerebellar interpositus nucleus. *Neuroscience*, 140, 33-43, 2006.

STEINBERG EE et al. Amygdala-Midbrain connections modulate appetitive and aversive learning. *Neuron*, 106(6), P1026-1043E9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.016>

STRANGE PG. New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochemistry*, 22(3), 223-236, 1993.

SURGENT OJ. Balance and the brain: a review of structural brain correlates of postural balance and balance training in humans. *Gait Posture*, 71:245-252, 2019. doi: 10.1016/j.gaitpost.2019.05.011.

SUTOO D; AKIYAMA K. Effect of dopamine receptor antagonists on the calcium-dependent central function that reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience Letters*, 269, 133-136, 1999.

SÜUDHOF TC. Neurotransmitter release. *In*: SÜUDHOF TC; STARKE K. *Pharmacology of Neurotransmitter Release. Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer, 2008. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74805-2_1.

TYNG CM et al. The influences of emotion on learning and memory. *Frontiers in Psychology*, 8, 1454, 2017.

VAN OVERWALLE F; D'AES T; MARIËN P. Social Cognition and the Cerebellum: A Meta-Analytic Connectivity Analysis. *Human Brain Mapping*, 5137-5154, 2015.

VANHANEN JK et al. Histamine H3 receptors regulates sensorimotor gating and dopaminergic signaling in the striatum. *J pharmacol Exp Ther*, 357(2), 264-72, 2016.

VIGGIANO D; RUOCCO LA; SADILE AG. Dopamine phenotype and behaviour in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 623–637, 2003.

WACLAW K; MAJ J. Locomotor hypoactivity and motor disturbances - behavioral effects induced by intracerebellar microinjections of dopaminergic DA-D2/D3 receptor agonists. *Pol. J. Pharmacol.*, 53, 509 – 515, 2001. PMID: 11990070.

WATABE-UCHIDA M et al. Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* 74, 858–873, 2012. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.017

XU C et al. Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval. *Cell*, 167(4), 961-972, 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.051.

YAMAURA H; HIRAI H; YANAGIHARA D. Postural dysfunction in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Neuroscience*, 243, 126-135, 2013.

ZENG L; BINBING YU; YANG H; NOVICK S (2019). Comparison of outlier tests for potency bioassays. *Pharmaceutical Statistics*, 19, 230 – 242.

ZHENG X et al. Infusion of methylphenidate into the basolateral nucleus of amygdala or anterior cingulate cortex enhances fear memory consolidation in rats. *Science in China Series C: Life Sciences*, 51, 808-813, 2008.