



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)

DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA



ELAYNE BORGES FERNANDES

Efeitos de compostos histaminérgicos no desempenho motor de camundongos submetidos ao modelo animal de neurotoxina 6-OHDA.

São Carlos- SP

2023

ELAYNE BORGES FERNANDES

Efeitos de compostos histaminérgicos no desempenho motor de camundongos submetidos ao modelo animal de neurotoxina 6-OHDA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

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

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

São Carlos

2023

Nome: FERNANDES, Elayne Borges

Título: Efeitos de compostos histaminérgicos no desempenho motor de camundongos submetidos ao modelo animal de neurotoxina 6-OHDA.

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

Aprovado em: 28/02/2023

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço

Instituição: Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Flávia Roberta Faganello Navega

Instituição: Universidade Estadual de São Paulo - UNESP

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Kelly Regina Serafim

Instituição: Universidade Central Paulista – UNICEP

Julgamento: Aprovada

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Marly e José Carlos,
por sempre me incentivar,
apoiar, e acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus pela oportunidade, pelos desafios, pela força para superar todos os obstáculos e por me mostrar o quão forte sou. Agradeço também por ter colocado pessoas maravilhosas em minha jornada, e que sem essa rede de apoio, eu não nada seria.

À minha orientadora, Professora Dra. Anna Carolyn, obrigada pela dedicação imensurável, por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho; por cada ensinamento e conselhos; por me apresentar ao mundo da pesquisa experimental e me guiar passo a passo.

À minha família, ao meu pai José Carlos, que acredita e se orgulha de mim; que com a simplicidade de um trabalhador rural que não teve a oportunidade de terminar o ensino fundamental, garantiu que eu conseguisse concluir minha graduação e ingressasse na pós-graduação. Você é a minha fortaleza e refúgio. À minha mãe Marly, que me incentiva e me conforta, a luz da minha vida, meu abrigo. Obrigada por crer que sou capaz de superar qualquer adversidade, que sempre abraça meus sonhos, e por nunca permitir que eu desistisse. Aos meus irmãos, Carlos, Edilayne e em especial Gislaine, por me ajudar em todas as circunstâncias; por se fazerem presentes mesmo a distância, pelas palavras e incentivo e por acreditarem na minha capacidade.

Ao meu namorado Bruno, pelas horas em ligação para me confortar e dizer que “vai dar tudo certo”, por ser meu primeiro “aluno” mesmo sem entender nada do assunto; por me incentivar a seguir meus sonhos e por cada gesto de carinho e amor durante esses anos em que estamos juntos.

À minha amiga Laura, se tornou minha família, que foi meu ombro amigo e companheira de jornada desde a graduação, e me apoiou em todos os momentos, bons e ruins.

Aos meus amigos, Alessandra, Marcela, Brenda, Ana Paula, Mariana, Giselle, Diego, Daniel, Luís e em especial à Maria e a Laira, meus amigos de longa data, que me estão comigo durante todos esses anos, me ouvindo e aconselhando nos momentos bons e ruins.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurociências, em especial à Mariana, que não mediu esforços para me ajudar, dia após dia, horas a fio no laboratório.

Aos professores, colegas, funcionários e a técnica de laboratório do PPGFT,
por colaborarem com a minha pesquisa e formação.

Ao auxílio financeiro fornecido pela CAPES.

E a todos, que de alguma forma, contribuíram com minha formação.

“Todos esses que aí estão
Atravancando meu caminho,
Eles passarão...
Eu passarinho!”
(Mario Quintana)

Resumo

A modulação do sistema histaminérgico sob o sistema dopaminérgico tem atraído particular atenção, devido a um potencial efeito neuroinflamatório da histamina. Na Doença de Parkinson (DP), cuja causa primária ainda é desconhecida, a neuroinflamação neuronal poderia ser o desencadeador da neurotoxicidade dopaminérgica. Uma hipótese recente está relacionada à ativação da micróglia mediada pelo receptor histaminérgico H4. Entretanto, até então, não existem estudos onde investigam o comportamento motor frente a modulação do sistema histaminérgico sob o sistema dopaminérgico no modelo animal de neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Nosso objetivo foi investigar o efeito dos compostos histaminérgicos sobre o desempenho motor no modelo animal de neurotoxina 6-OHDA. Utilizamos 120 camundongos ingênuos machos (suíço albino), que foram submetidos a lesão neuronal induzida por injeções hemiestriatais de 6-OHDA e, após duas semanas, receberam injeções sistêmicas de L-histidina (Exp. 1), Tioperamida (Exp. 2) e VUF-8430 (Exp. 3) e foram avaliados por meio de testes comportamentais sendo eles, o campo aberto, rotarod e trave de equilíbrio em dois dias consecutivos. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) two way de medidas repetidas, onde avaliamos o desempenho dos animais. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para o Exp.1 a ANOVA two way no campo aberto mostrou diferenças estatísticas em relação aos grupos e dias de teste ($p=0,001750$); na trave de equilíbrio indicou diferenças estatísticas nos dias de teste ($p=0,003838$), e no rotarod apontou diferenças estatísticas os grupos de teste, ($p=0,007008$). Para o Exp. 2 a Anova não apresentou diferença estatisticamente significativa intragrupos no campo aberto ($p=0,242618$) e no rotaroad ($p=0,408666$); entre os grupos no campo aberto ($p=0,432498$) e no rotaroad ($p=0,119649$); e na interação entre dias e grupos no campo aberto ($p=0,214738$), e no rotaroad ($p=0,987078$). Enquanto na trave de equilíbrio apresentou diferença apenas intragrupo ($p=0,004725$), e entre grupos ($p=0,303353$) e na interação entre os dias e grupos ($p=0,064281$), não houve diferença significativa. E para o Exp. 3 a ANOVA no campo aberto indicou que houve diferença entre os dias ($p=0,000131$) e entre os grupos ($p=0,004990$); na trave de equilíbrio não apresentou diferenças significativas intragrupos ($p=0,694178$); entre os grupos ($p=0,083342$) e na interação entre dias e grupos ($p=0,075682$); e no rotarod indicou que houve diferença entre os dias do

grupos ($p=0,013951$). Encontramos que a LH influenciou positivamente no desempenho motor dos camundongos submetidos a lesão hemiestriatal com 6-OHDA, e que o agonista do receptor H4 foi capaz de inibir a atividade locomotora e piorar o equilíbrio dos camundongos com a lesão neurotóxica.

Palavras-chave: Sistema histaminérgico; Sistema dopaminérgico; 6-OHDA; Modelo animal; comportamento motor.

Abstract

The modulation of the histaminergic system under the dopaminergic system has attracted particular attention, due to a potential neuroinflammatory effect of histamine. In Parkinson's Disease (PD), whose primary cause is still unknown, neuronal neuroinflammation may trigger dopaminergic neurotoxicity. A recent hypothesis is related to the activation of microglia mediated by the H4 histaminergic receptor. However, so far, there are no studies investigating the motor behavior against the modulation of the histaminergic system under the dopaminergic system in the animal model of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Our aim was to investigate the effect of histaminergic compounds on motor performance in the animal model of the 6-OHDA neurotoxin. We used 120 naïve male mice (Swiss albino), which were submitted to neuronal damage induced by hemiestriatal injections of 6-OHDA and, after two weeks, received systemic injections of L.-histidine (Exp. 1), Thioperamide (Exp. 2) and VUF-8430 (Exp. 3) and were evaluated through behavioral tests, namely open field, rotarod and balance beam on two consecutive days. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, where we evaluated the performance of the animals. P values < 0.05 were considered statistically significant. For Exp.1, two-way ANOVA in the open field showed statistical differences in relation to groups and test days ($p=0.001750$); on the balance beam it indicated statistical differences on the test days ($p=0.003838$), and on the rotarod it indicated statistical differences between the test groups, ($p=0.007008$). For Exp. 2 ANOVA showed no statistically significant intragroup difference in the open field ($p=0.242618$) and rotaroad ($p=0.408666$); between groups in open field ($p=0.432498$) and rotaroad ($p= 0.119649$); and in the interaction between days and groups in the open field ($p=0.214738$), and in the rotaroad ($p= 0.987078$). While on the balance beam presented difference only within the group ($p=0.004725$), and between groups ($p=0.303353$) and in the interaction between days and groups ($p=0.064281$), there was no significant difference. And for Exp. 3 ANOVA in the open field indicated that there was a difference between days ($p=0.000131$) and between groups ($p=0.004990$); on the balance beam, there were no significant intragroup differences ($p=0.694178$); between groups ($p=0.083342$) and in the interaction between days and groups ($p=0.075682$); and in the rotarod it indicated that there was a difference between the days of the groups ($p=0.013951$). We found that LH had a positive influence on the motor performance of mice subjected to hemiestriatal injury with 6-

OHDA, and that the H4 receptor agonist was able to inhibit locomotor activity and worsen the balance of mice with neurotoxic injury.

Keywords: Histaminergic system; Dopaminergic system; 6-OHDA; Animal model; motor behavior.

Lista de figuras

Figura 1- Protocolo experimental.....	27
Figura 2- Campo aberto	27
Figura 3- Rotarod	28
Figura 4- Trave de equilíbrio	29
Figura 5- Média e erro padrão da média no número de cruzamentos no teste de campo aberto. * $p < 0,05$ em relação ao dia 14 do grupo SHAM, # $p < 0,05$ em relação ao dia 14 de todos os grupos pelo teste de Duncan	31
Figura 6- Média e erro padrão da média do tempo em segundos na trave de equilíbrio. * $p < 0,05$ em relação ao dia 14 do grupo 6-OHDA, # $p < 0,05$ em relação ao dia 14 de todos os grupos pelo teste de Duncan.	32
Figura 7- Média e erro padrão da média do tempo em segundos na trave de equilíbrio. # $p < 0,05$ em relação ao dia 14 de todos os grupos + $p < 0,05$ em relação ao dia 15 do grupo 6-OHDA, pelo teste de Duncan.	33
Figura 8- Média e erro padrão da média do número de cruzamentos total no campo aberto.	34
Figura 9- Média e erro padrão da média do tempo em segundos na trave de equilíbrio.....	34
Figura 10- Média e erro padrão da média do tempo em segundos no rotarod	35
Figura 11- Média e erro padrão da média do número de cruzamentos total no campo aberto. * $p < 0,05$ em relação ao dia 14 dos grupos SHAM e 6-OHDA, # $p < 0,05$ em relação ao dia 14 de todos os grupos, + $p < 0,05$ em relação ao dia 15 do grupo 6-OHDA, pelo teste de Duncan.	36
Figura 12- Média e erro padrão da média do tempo em segundos na trave de equilíbrio... ..	37
Figura 13- Média e erro padrão da média do tempo em segundos no rotarod. * $p < 0,05$ em relação ao dia 14 do grupo 6-OHDA, + $p < 0,05$ em relação ao dia 15 do grupo 6-OHDA, pelo teste de Duncan.....	38

Lista de tabelas

Tabela 1- Representação das concentrações e volumes das drogas	25
Tabela 2- Experimento 1	29
Tabela 3- Experimento 2	29
Tabela 4- Experimento 3	30

Lista de abreviaturas e siglas

SNC: Sistema Nervoso Central
SNP: Sistema Nervoso Periférico
RNA_m: Ácido ribonucleico mensageiro
GABA: ácido gama-aminobutírico
L-dopa: Levodopa
VTA: área tegmental ventral
SNpc: substância negra pars compacta
DP: doença de Parkinson
6-OHDA: 6-hidroxidopamina
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β : interleucina 1 beta
IL-6: interleucina 6
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: micrograma por microlitro
NaCl: cloreto de sódio
mg / mL: miligrama por mililitro
LH: L-histidina
TIO: Tioperamida
VUF: VUF-8430
IP: intraperitonealmente
nl/min: nanolitros por minuto
mm: milímetros
AP: ântero-posterior
ML: medio-lateral
DV: dorso-ventral
h/dia: horas por dia
cm: centímetros
Sham: placebo
SAL: Solução salina, NaCl à 0,9%
D14: Dia 14
D15: Dia 15
NHS: Sistema histaminérgico neural

Sumário

I. Contextualização	16
1.1. Inserção na linha de pesquisa da orientadora e do programa	16
1.2. Parcerias nacionais e internacionais	16
1.3. Originalidade, contribuição dos resultados da pesquisa para o avanço científico e relevância social	16
1.4. Atividades desenvolvidas durante o mestrado	17
1.5. Link do currículo lattes do aluno e seu Orcid	17
1.6. Descrição da dissertação para o público leigo	17
II. Introdução	18
2.1 Sistema Histaminérgico	18
2.2 Sistema Dopaminérgico	19
2.3 Doença de Parkinson	21
2.4 Justificativa	23
III. Objetivo geral	23
3.1 Objetivos específicos	23
IV. Material e métodos	24
4.1 Aspectos Éticos e Local da Pesquisa	24
4.2 Amostra	24
4.3 Drogas	24
4.5 Cuidados Pós-Operatórios	26
4.6 Modelos comportamentais	26
4.7 Grupos experimentais	29
V. Análise estatística	30
VI. Resultados	30
Experimento 1	30
Experimento 2	33
Experimento 3	35

VII- Discussão	38
VIII- Conclusão	41
IX- Referências bibliográficas	41

I. Contextualização

1.1. Inserção na linha de pesquisa da orientadora e do programa

Esta dissertação foi desenvolvida pela aluna Elayne Borges Fernandes, bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, 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 doenças neurodegenerativas e 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.

1.3. Originalidade, contribuição dos resultados da pesquisa para o avanço científico e relevância social

O sistema histaminérgico modula diversas funções fisiológicas e sua interação com outros neurotransmissores é estudada constantemente. Especificamente, entre sistema histaminérgico e dopaminérgico o interesse tem crescido, visto potencial aplicabilidade clínica em condições patológicas. Até onde sabemos, somos o primeiro grupo a estudar o modelo de neurotoxina 6-OHDA com injeções intraperitoneais de l-histidina, tioperamida e VUF-8430. Esse processo como linha de pesquisa (modelos animais em doenças neurodegenerativas) apesar de um pequeno passo, foi um grande avanço visto as adversidades e obstáculos do contexto atual em investimentos de pesquisa. Visamos com isso, dar seguimento a essas investigações, incluindo análises da lesão por meio de outros testes comportamentais, e análises histológicas e moleculares. Nosso objetivo é também complementar com novos estudos e parcerias para entender melhor os efeitos agudos e crônicos sobre o desempenho motor e não motor dos compostos histaminérgicos e dos receptores de histamina neste modelo, além da interação com sistema dopaminérgico

1.4. Atividades desenvolvidas durante o mestrado

Artigos submetidos relacionados à tese

Fernandes EB; Gianlorenço ACL. Efeitos da L-Histidina na recuperação motora, equilíbrio e coordenação em camundongos sob modelo 6OHDA. Em processo de submissão.

Coorientação de alunos de graduação

Isabeli Cristina Pereira Morasco. Efeitos da terapia robótica em membros inferiores na mobilidade de indivíduos pós AVC. Monografia

1.5. Link do currículo lattes do aluno e seu Orcid

<http://lattes.cnpq.br/289885660053828>

<https://orcid.org/0000-0003-4086-0606>

1.6. Descrição da dissertação para o público leigo.

A doença de Parkinson não tem cura, e atualmente é utilizado um medicamento chamado L-DOPA que visa retardar a morte dos neurônios. Entretanto, a longo prazo, esse medicamento começa a trazer uma série de efeitos colaterais, então nossa pesquisa envolvia manipular outras substâncias que o nosso corpo produz na tentativa de diminuir/prevenir a morte desses neurônios, observando o comportamento motor de animais com Parkinson.

II. Introdução

2.1 Sistema Histaminérgico

A histamina, descoberta em 1910 por Henry Hallet e Patrick Playfair Laidlaw, é uma monoamina sintetizada a partir da descarboxilação do aminoácido histidina, e sua degradação se dá através da diamina oxidase e histamina N-metiltransferase (Schneider et al. 2014). A ação histaminérgica é diversa, dependendo da interação ao seu receptor ligante, os quais foram numerados conforme sua descoberta, sendo eles H1, H2, H3 e H4 (Yoshikawa et al. 2019). Esses receptores são proteínas ligadas à membrana, pertencentes à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, que se diferenciam em mecanismo de sinalização celular, localização e nível de atividade construtiva (Bongers et al. 2010).

A ativação da histamina via receptor de histamina H1 promove diversas funções sistêmicas como vasodilatação, broncodilatação e estão relacionados às reações alérgicas. Estes receptores estão localizados no músculo liso, endotélio e Sistema Nervoso Central (SNC), com maior densidade no hipocampo, tálamo, córtex e tronco cerebral, mas também em células não neuronais como nas células gliais, sanguíneas e também nos vasos sanguíneos (Bongers, 2010; Schneider, 2014). A ativação do receptor H1 no SNC está relacionada à cognição, aprendizagem e memória, além de contribuir para compensações funcionais vestibulares em disfunções posturais estáticas e dinâmicas; enquanto sua ativação no Sistema Nervoso Periférico (SNP) modula informações sensoriais e percepção da dor (Tashiro, 2002; Ruitenbeek, 2009; Chen, 2018).

A ativação do receptor H2 tem como principal característica sistêmica promover a secreção do ácido gástrico, e este subtipo de receptor histaminérgico ser encontrado em vários tecidos além das células gástricas, como o tecido cardíaco e cérebro (Bongers et al. 2010). Já no SNC, está predominantemente expresso no córtex, hipocampo, núcleos da base e amígdala. Há áreas em que os receptores H1 e H2 estão situados em um local em comum, incitando uma ação sinérgica entre os dois receptores (Schneider et al. 2014). Apesar de não ter plenos esclarecimentos sobre os efeitos da ativação do receptor H2 no SNC, sabe-se que está relacionado com a nocicepção e respostas cardiovasculares mediante à estresse (Schneider, 2014; Yue, 2014; Almeida, 2015).

O receptor H3 é expresso predominantemente em células neuronais, no SNC apresenta alta densidade em regiões pós-sinápticas do córtex cerebral, hipocampo e núcleo accumbens, porém também pode ser encontrado no SNP (Schwartz, 2011). Estes receptores atuam como auto receptores sinápticos em neurônios histaminérgicos, inibindo a síntese e liberação da histamina, porém também são capazes de modular a liberação de outros neurotransmissores como dopamina, acetilcolina e noradrenalina, atuando como heteroreceptor (Parsons e Ganellin, 2006). Em neurônios gabaérgicos, o receptor H3 forma um heterodímero com os receptores D1 e D2 dopaminérgicos, modulando a sinalização, tendo repercussões significativas na função locomotora (García-Galvez e Arias-Montaño, 2016).

O receptor H4 é expresso em células hematopoiéticas, atuando como mediador de mastócitos, eosinófilos, monócitos, células dendríticas e células T. O RNAm do H4 em seres humanos também é encontrado nas porções mais superiores da medula espinhal, hipocampo, cerebelo e outras regiões encefálicas como córtex, tálamo e amígdala, enquanto no rato se expressa na medula espinhal, córtex, cerebelo, tronco encefálico, amígdala, tálamo e corpo estriado (Strakhova et al., 2009). O H4 modula várias funções neurofisiológicas como atividade locomotora, ansiedade, nocicepção e comportamento alimentar (Sanna et al., 2017)

Dessa forma, os estudos demonstram que o sistema histaminérgico tem importante papel modulador de diversas funções fisiológicas, seja via ativação de seus receptores, como interagindo com outros neurotransmissores como acetilcolina, noradrenalina, GABA e dopamina. Entre essas interações, a modulação do sistema histaminérgico sob o sistema dopaminérgico tem atraído particular atenção, devido a um potencial efeito neuroinflamatório da histamina.

2.2 Sistema Dopaminérgico

A dopamina, descoberta por Carlsson et al. em 1957, é uma catecolamina derivada do aminoácido tirosina que possui seus receptores acoplados à proteína G. A formação da dopamina se dá através da conversão da tirosina em L-dopa (1-3,4-dihidroxifenilalanina), sendo essa reação catalisada pela tirosina hidroxilase, e por meio da ação do L-aminoácido aromático descarboxilase, a L-dopa é convertida em dopamina no SNC (Klein, 2019; Changliang e Pascal, 2019).

Os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo localizam-se em três núcleos distintos: a área tegmental ventral (VTA), o campo retrorubral e a substância negra pars compacta (SNpc). Na SNpc, esses neurônios projetam-se no estriado dorsal, conhecido como via nigroestriatal, e desempenha funções como o aprendizado e controle motor voluntário (Luo e Huang, 2016).

Os receptores dopaminérgicos são divididos em dois grandes grupos: os receptores D1 (que incluem os receptores D1 e D5) que são encontrados predominantemente no núcleo caudado e putâmen (estriado), núcleo accumbens, substância negra pars reticulada, bulbo olfatório, amígdala e córtex frontal; e os receptores D2 (D2, D3 e D4) e são expressos principalmente em estriado, a parte lateral do Globo Pálido, núcleo do núcleo accumbens, área tegmental ventral, hipotálamo, amígdala, áreas corticais, hipocampo e hipófise (Beaulieu, 2015).

O sistema dopaminérgico exerce vários papéis como neuromodulador, dentre eles o controle e aprendizado motor, memória espacial, motivação, recompensa, excitação, reforço, regulação do sono, atenção, afeto, função cognitiva, alimentação, olfato, regulação hormonal e influencia o sistema imunológico (Klein, 2019). A disfunção desta monoamina implica em variadas condições patológicas, como a depressão (Felger, 2017), a esquizofrenia (McCutcheon, 2019) e a Doença de Parkinson (Simon, 2019).

Estudos relatam a interação entre sistemas dopaminérgico e histaminérgico, por exemplo, a coativação pós-sináptica dos receptores H1 e H2 no núcleo tuberomamilar hipotalâmico, foi capaz de promover a modulação da excitabilidade e da capacidade de resposta da dopamina pelo receptor D1 e os neurônios espinhosos do meio gabaérgico que expressam o receptor D2 (Zhuang, 2018).

Além disso, foi demonstrado que o antagonista do receptor H3 pode estimular o aumento da liberação de dopamina no córtex pré-frontal, enquanto no estriado, o receptor H3 interagiria com os receptores D1 e D2. Essa interação potencializa a dopamina, resultando em inibição da excitação da via direta pelo receptor D1, e inibição a via indireta através do receptor D2 (Ellenbroek, 2013). Erich H. Schneider (2019), em seu estudo com animais, observou que os danos causados por rotenona sobre os neurônios dopaminérgicos foram consideravelmente inibidos pela administração intra-cérebro-ventricular do antagonista do receptor H4 JNJ7777120.

Considerando o potencial farmacológico dessa interação em doenças causadas por alterações nos níveis de dopamina, estudos mostraram que a regulação

histaminérgica por meio da inativação do receptor H3 na substância negra, causa regulação pré e pós-sináptica na neurotransmissão dopaminérgica estriatal, desencadeando redução dos efeitos da neuroinflamação no corpo estriado (Koski, 2020). Nesse contexto, os receptores H4 e H3 podem ser potenciais alvos para o estudo dos processos fisiopatológicos na doença de Parkinson.

2.3 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma afecção crônica, neurodegenerativa progressiva, lenta e irreversível do sistema nervoso central que provoca distúrbios do movimento, caracterizada principalmente pela morte progressiva de neurônios dopaminérgicos nigrais dos núcleos da base e pela presença de inclusões de alfa-sinucleína denominadas corpúsculos ou neuritos de Lewy nos neurônios sobreviventes (Raza et al. 2019).

Os sintomas motores de DP são frequentemente associados a fisiopatologia do estriado dorsal, pois acredita-se que este desempenha um papel na seleção e fragmentação dos componentes motores baseado nas informações prévias, sensoriais e motivacionais, sendo a principal entrada dos núcleos da base (Zhai et al. 2019). Os sinais cardinais são rigidez, bradicinesia, tremor de repouso e alterações posturais e o surgimento destas indicam que já ocorreu perda de pelo menos 60% dos neurônios. Inicialmente apresenta discretas aparições como alteração da escrita, perda de agilidade, dores articulares, fraqueza em membros inferiores, lentidão ao caminhar, ou ainda queixas confusas como fadiga, apatia, depressão e indisposição para o trabalho (Sveinbjornsdottir, 2016).

A causa primária da DP segue desconhecida, entretanto estudos recentes sugerem que a neuroinflamação pode ser um fator importante no início da patogênese, sendo que a micróglia, mediada pelo receptor H4, são ativadas e influenciam na neurotoxicidade dopaminérgica (Zhou et al.2019).

A DP é incapacitante nas fases finais da patologia, curar a doença ou pelo menos interromper sua progressão, no entanto, é uma meta ainda não alcançada e, por isso, estudos são necessários para compreender melhor a fisiopatologia. Vários modelos animais foram desenvolvidos para estudar vários aspectos da doença para entender a patogênese e o desenvolvimento terapêutico. Um modelo de doença pode ser estabelecido usando neurotoxina ou abordagens genéticas em uma ampla

variedade de animais, como primatas não humanos, peixes e roedores (Chia et al. 2020).

O modelo de neurotoxina com de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi primeiro modelo animal de DP gerado, e tem sido amplamente utilizado por causa de seu fenótipo comportamental consistente na degeneração em neurônios dopaminérgicos. A injeção intracerebral de 6-OHDA é necessária porque não penetra na barreira hematoencefálica. Uma vez dentro da célula, a 6-OHDA oxida rapidamente e produz espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e radicais hidroxila que levam à disfunção mitocondrial, e lesão dos neurônios dopaminérgicos. A administração de 6-OHDA em diferentes regiões do cérebro leva a um padrão distinto de degeneração de neurônios. Por exemplo, a injeção de 6-OHDA direcionada ao corpo estriado danificará os terminais do axônio primeiro no corpo estriado, seguido pela degeneração do neurônio dopaminérgico na substância negra. Em contraste, a injeção de 6-OHDA em SN leva à destruição maciça do neurônio dopaminérgico. Portanto, a última abordagem mostra sintomas relativamente graves (Chia et al., 2020).

Considerando a interação entre histamina e dopamina, estudar uma possível modulação histaminérgica em condições fisiopatológicas em neurônios dopaminérgicos foi objeto de estudo de alguns trabalhos. Como Nowak e colegas (2007) que avaliaram efeito dos respectivos agonista e antagonista/agonista inverso do receptor H3, imetit e tioperamida no modelo animal de 6-OHDA.

Fang e colaboradores (2021) demonstraram em seu estudo, que o encéfalo pós-morte de indivíduos com DP apresentava aumento da espessura das fibras histaminérgicas na substância negra e aumento do nível de histamina nos núcleos da base. Nesta pesquisa, utilizaram ratos Sprague-Dawley perfundido intracerebroventricular com rotenona, e descobriu-se que a inativação do receptor H4, com seu antagonista JNJ7777120, levou a normalização do número de fibras dopaminérgicas nigroestriatais e os níveis de dopamina estriatais, prevenindo a degeneração das fibras dopaminérgicas e reduzindo as inclusões de α -sinucleína no corpo estriado. Ademais, Shan e colaboradores (2012) observaram em seu estudo pós-morte de pacientes com doença de Parkinson, um aumento da expressão de RNAm de H4 no núcleo putâmen e caudado.

O antagonista de H4 JNJ, demonstrou papel importante na redução das células microgлияis positivas para Iba-1 e diminuição de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 no cérebro do rato (Zhang et al. 2020), o que corrobora com Zhou *et al* (2019) que cita que o tratamento com JNJ, diminuiu os níveis de RNAm e TNF- α e IL-1 β , tendo conseqüente redução de células microgлияis. Esses fatores incitam que o processo pró-inflamatório por meio da micrógлия, acelera a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNpc em modelos animais.

Esses estudos, embora com modelos animais distintos, nos levam a investigar a interação histamina-dopamina nesse contexto.

2.4 Justificativa

Atualmente não há cura para a DP, mas o tratamento medicamentoso com L-dopa visa melhorar os sintomas e retardar a progressão da patologia, sendo de início precoce e contínuo. Entretanto, a administração de L-dopa traz prejuízos funcionais ao indivíduo com o uso prolongado e diminuição da sua eficácia, além de inúmeros efeitos colaterais. A modulação neuroinflamatória mediada pelo sistema histaminérgico vem sendo alvo de pesquisas, e compreender essa interação entre os sistemas histaminérgicos e dopaminérgicos poderão ser a chave para estratégias futuras de intervenção.

Esse estudo auxiliará no entendimento do efeito agudo da histamina após 40 minutos de aplicação sistêmica no processo neuroinflamatório visando o entendimento da sintomatologia, como também pela inibição do receptor H3 com seu antagonista tioperamida e a ativação de H4, com seu agonista VUF-8430, receptores histaminérgicos possivelmente envolvidos.

III. Objetivo geral

Investigar o efeito dos compostos histaminérgicos sobre o desempenho motor no modelo animal de neurotoxina 6-OHDA.

3.1 Objetivos específicos

- Analisar o comportamento motor do animal, pós lesão neurotóxica dos neurônios dopaminérgicos (6 - OHDA).

- Investigar os efeitos da injeção intraperitoneal da L-histidina sobre o desempenho motor e a atividade exploratória de camundongos no modelo de lesão neurotóxica 6OHDA;
- Investigar os efeitos da injeção intraperitoneal do antagonista do receptor H3 (tioperamida) sobre o desempenho motor e atividade exploratória de camundongos no modelo de lesão neurotóxica 6OHDA;
- Investigar os efeitos da injeção intraperitoneal do agonista do receptor H4 (VUF-8430) sobre o desempenho motor e atividade exploratória de camundongos no modelo de lesão neurotóxica 6OHDA;

IV. Material e métodos

4.1 Aspectos Éticos e Local da Pesquisa

Todos os procedimentos experimentais desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (**CEUA Nº 4679100322**). A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia, na Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

4.2 Amostra

Foram utilizados 120 camundongos ingênuos machos (Suíço Albino) para a pesquisa, e 20 camundongos para treinamento, pesando entre 30-40 g com idade de ± 21 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram alojados em caixas, com o ambiente controlado com ciclos de luz de 12 horas, temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de $50\pm 5\%$, com água e alimentação ad libitum.

4.3 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- 1) 6 hidroxidopamina $6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (6-OHDA) (Sigma) foi dissolvida em uma solução de NaCl a 0,9% em ácido ascórbico $0,2 \text{ mg} / \text{mL}$ e aplicada no estriado dorsal hemilateral;

- 2) L-histidina (LH) 200 mg/kg (SERAFIM et al, 2010) precursor de histamina (RBI, USA) que foi dissolvida em salina (0,9%);
- 3) Tioperamida (TIO) 10 mg/kg (CLAPHAM e KIOPATRICK, 1994), antagonista do receptor H3, que foi dissolvida em salina (0,9%);
- 4) VUF-8430 0,5 mg/kg (FERNANDES et al., 2021), agonista do receptor H4, que foi dissolvida em salina (0,9%).

Os compostos histaminérgicos foram administrados intraperitonealmente, com a solução salina utilizada como controle. A tabela 1 descreve a concentração e volume utilizado de cada droga.

Tabela 1- Representação das concentrações e volumes das drogas

<i>Droga</i>	<i>Concentração</i>	<i>Diluição</i>	<i>Volume</i>
<i>6 hidroxidopamina</i>	6 µg/µL	NaCl a 0,9% em ácido ascórbico 0,2 mg / ml	2 × 1,5 ml
<i>L-histidina</i>	200 mg/kg	NaCl a 0,9%	2ml/kg
<i>Tioperamida</i>	10mg/kg	NaCl a 0,9%	2ml/Kg
<i>VUF-8430</i>	0,5 mg/kg	NaCl a 0,9%	2ml/kg

4.4 Modelo animal induzido por Neurotoxina

Nesse estudo optamos por injeções hemi-estriatais de 6-OHDA, que foram realizadas após anestesia intraperitonealmente (i.p.) com Cloridrato de Cetamina (100mg/Kg) e Xilazina (10 mg/kg). Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em um quadro estereotáxico (Stoelting, Kiel, WI, EUA) e lesões unilaterais foram obtidas por injeção de cloridrato de 6-OHDA no hemisfério direito usando uma seringa Hamilton de 10 µL (DDBioLaB, Barcelona, Espanha). A neurotoxina foi usada à uma concentração de 6 µg / µL (calculado a partir do peso de base livre) dissolvido em uma solução de NaCl a 0,9% (salina) em ácido ascórbico 0,2 mg / mL. 6-OHDA foi administrado no estriado dorsolateral (2 × 1,5 µL) a uma taxa de 300 nl / min, nas seguintes coordenadas estereotáxicas (em relação ao bregma, em mm): (i) AP = +1,0, ML = -2,1, DV = -2,9; (ii) AP = +0,3, ML = -2,3, DV = -2,9. Depois de cada injeção, a agulha foi deixada no local por 5 min para difusão e para

evitar refluxo. O grupo controle foi injetado com solução salina a 0,9% nas mesmas condições da neurotoxina.

4.5 Cuidados Pós-Operatórios

Smith e Andreas (2011) apontam que a mortalidade pós-operatória é geralmente alta em modelos de camundongos 6-OHDA, e os animais podem sofrer de uma variedade de complicações. A fim de diminuir os riscos, os animais foram alojados em sala aquecida durante a recuperação imediata e os cuidados pós-operatórios consistiram em receber 5 gotas paracetamol diluído em 200ml água potável 24h/dia por 5 dias para analgesia, e injeção via subcutânea de antiinflamatório (eloxicam 5 mg / kg) a cada 24 h por 3 dias.

4.6 Modelos comportamentais

Dias de intervenção:

Dia 1: Os animais foram submetidos à lesão neuronal induzida por injeções hemiestriatais de 6-OHDA ou solução de NaCl à 0,9% (SAL) para o grupo controle;

Dia 2: Os animais receberam injeções sistêmicas de LH, TIO, VUF ou SAL, com o intuito de verificar o possível papel neuroprotetor das respectivas drogas após 24h do procedimento que induz lesão.

Dia 13: Os animais passaram pela habituação em todos os aparatos de teste por no máximo 5 minutos.

Dia 14: Os animais passaram por todos os testes comportamentais, com intervalo de descanso de, no mínimo, 5 minutos por aparelho.

Dia 15: Os animais receberam injeções sistêmicas de LH, TIO, VUF ou SAL a fim de verificar se as drogas injetadas sistemicamente influenciam no comportamento motor dos animais; e após 40 minutos foram reexpostos nos testes e em seguida eutanasiados.

Após o uso de cada aparato, o mesmo era devidamente higienizado com álcool 92%, a fim de eliminar quaisquer odores do animal anterior. O experimento foi conduzido na ordem delineada na figura 1, e os testes comportamentais estão descritos abaixo.

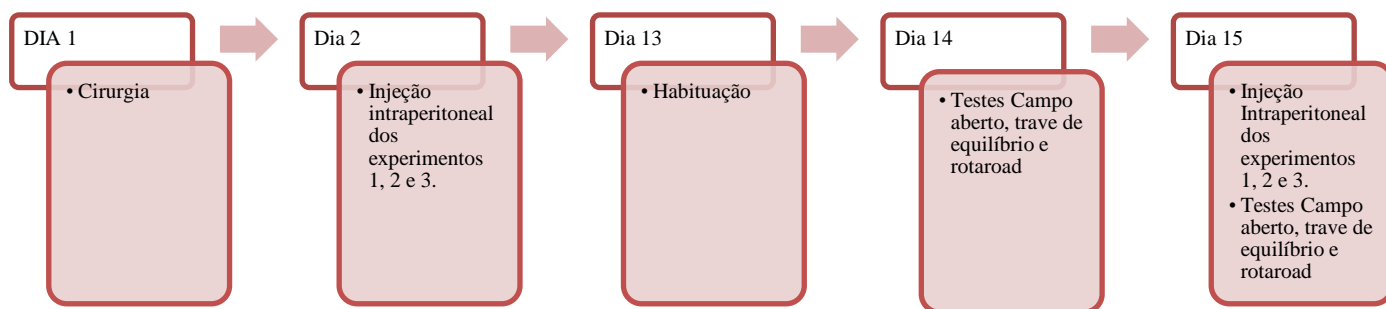


Figura 1- Protocolo experimental

Open Field

Esse teste visa avaliar a atividade exploratória e locomotora em uma caixa quadrada de madeira (52,5 x 52,5 cm) com paredes laterais de 27,5 cm, tendo o solo dividido em 25 quadrantes (10x10 cm), sem barreira física entre eles (figura 2). O animal foi posicionado no centro do campo e avaliado conforme sua atividade locomotora por meio do número de cruzamento de quadrantes durante 5 minutos.



Figura 2- Campo aberto

Rota rod

Neste aparelho foi avaliado a coordenação motora e equilíbrio se manter sobre uma superfície cilíndrica em movimento. Consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro, posicionado transversalmente a aproximadamente 20 cm do piso do equipamento, mantido em rotação por meio de um motor. A caixa é

dividida em quatro abas de aproximadamente 10 cm de largura, o que proporciona a observação simultânea de até quatro animais (figura 3). O animal foi posicionado em uma rampa de subida com velocidade de rotação crescente de 0 a 20 rpm por até 300 segundos ou até a latência da queda.



Figura 3- Rotarod

Trave de equilíbrio

A trave de equilíbrio examina a capacidade do animal em permanecer ereto e andar de uma extremidade a outra do equipamento, sem cair ou escorregar, cronometrando o tempo transcorrido, sendo por no máximo 5 minutos. É formado por uma placa de madeira relativamente estreita (100 cm x 2,8 cm), que é suspenso do chão com suportes de madeira de 50 cm, e com superfície acolchoada abaixo do equipamento, para amortecer possíveis quedas (figura 4).



Figura 4- Trave de equilíbrio

4.7 Grupos experimentais

O estudo foi composto por três experimentos, e estão representados nas tabelas abaixo.

Tabela 2- Experimento 1

Grupos	Droga 1	Droga 2	N
1	Sham	Salina	9
2	Sham	L-histidina	7
3	6-OHDA	Salina	10
4	6- OHDA	L-histidina	8

Tabela 3- Experimento 2

Grupos	Droga 1	Droga 2	N
1	Sham	Salina	7
2	Sham	Tioperamida	6
3	6-OHDA	Salina	6

4	6- OHDA	Tioperamida	6
---	---------	-------------	---

Tabela 4- Experimento 3

Grupos	Droga 1	Droga 2	N
1	Sham	Salina	9
2	Sham	VUF-8430	8
3	6-OHDA	Salina	7
4	6- OHDA	VUF-8430	6

V. Análise estatística

O desempenho do motor foi expresso com tempo (em segundos) na barra ou trave (trave de equilíbrio, rotarod) e número de cruzamentos (open field). Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas de duas vias, sendo os fatores Grupos e Dias de teste. Para valores significativos, foi efetuado o teste post-hoc Duncan para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi o de $p < 0,05$. As análises foram realizadas através do software Statistica 8.0 (Stat Soft. Inc).

VI. Resultados

Foram utilizados 120 camundongos e no total uma perda amostral de 25,8%. As causas de perda foram decorrentes de complicações durante procedimento anestésico (32,2%), complicações durante o procedimento cirúrgico (32,2%), complicações agudas pós cirúrgicos (32,2%) e complicações na primeira semana pós cirurgia (3,2%).

Experimento 1

No teste de campo aberto (figura 5), a ANOVA two way mostrou diferenças estatísticas em relação aos grupos e dias de teste ($f=6,4027$; $p=0,001750$). O teste

de Duncan indicou diferença em dias no grupo controle (Sham/SAL) ($p= 0,028558$) e no grupo Sham/LH ($p= 0,002637$). Além disso, D14 de Sham/LH foi diferente de todos os outros dias de teste. Esses resultados sugerem que a LH pode impactar durante o período pós cirúrgico, mas também na pré-exposição ao campo aberto na locomoção geral.

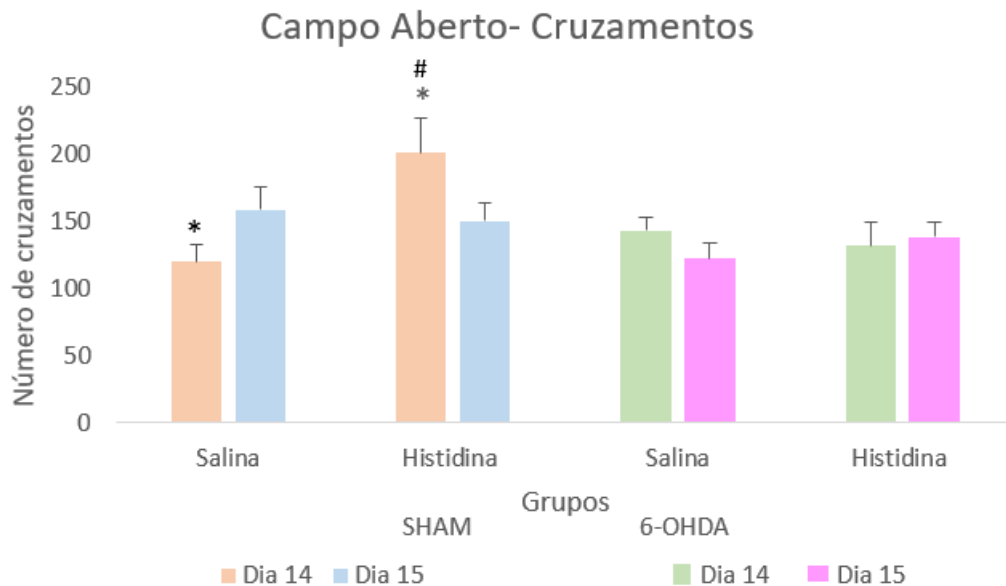


Figura 5- Média e erro padrão da média no número de cruzamentos no teste de campo aberto. * $p<0,05$ em relação ao dia 14 dos grupos SHAM/Salina e SHAM/L-histidina, # $p<0,05$ em relação ao dia 14 do SHAM/L-histidina e todos os grupos pelo teste de Duncan

No teste de trave de equilíbrio (figura 6), ANOVA two way mostrou diferenças estatísticas nos dias de teste ($f= 9,82131$; $p=0,003838$), e de acordo com a análise post hoc, o grupo 6OHDA/SAL foi diferente de todos os outros dias de teste, incluindo 6OHDA/LH ($p= 0,000121$). Os animais submetidos ao modelo 6OHDA apresentaram déficit de equilíbrio de coordenação e que a LH aplicada na recuperação foi capaz de reverter esse prejuízo.

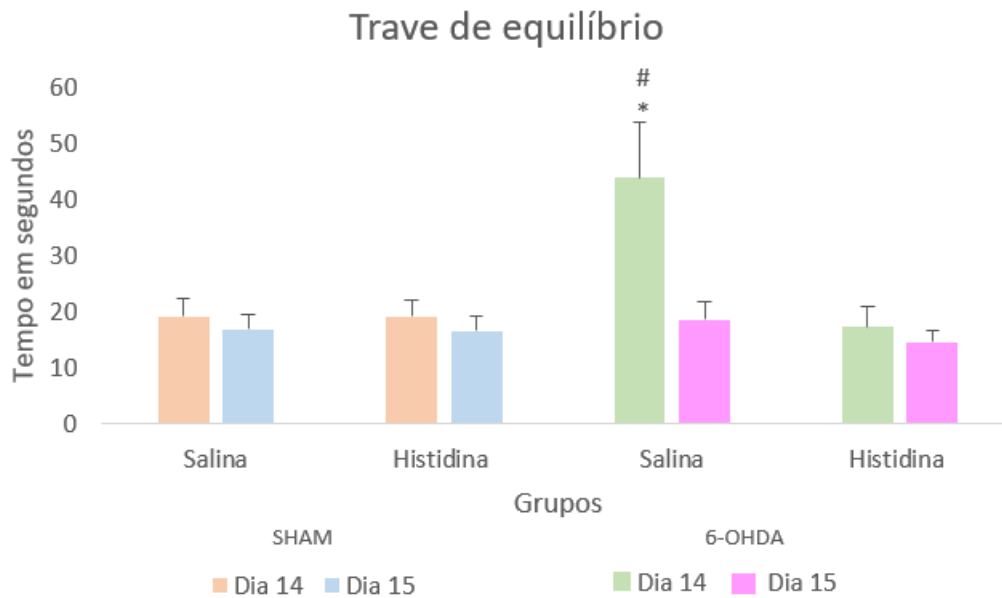


Figura 6-Média e erro padrão da média do tempo em segundos na trave de equilíbrio. * $p < 0,05$ em relação ao dia 14 do grupo 6-OHDA/Salina e 6-OHDA/L-histidina, # $p < 0,05$ em relação ao dia 14 do grupo 6-OHDA/Salina quando comparado à todos os grupos pelo teste de Duncan.

No rotarod (figura 7), a ANOVA de duas vias mostrou diferenças estatísticas entre os grupos, ($f=4,87990$; $p=0,007008$) e a análise post hoc indicou que D14 do grupo 6OHDA/LH era diferente de D14 do grupo controle (Sham/SAL) ($p=0,010383$) e de 6OHDA/Sal ($p=0,002990$). O padrão semelhante ocorreu sugerindo um efeito protetor da LH.

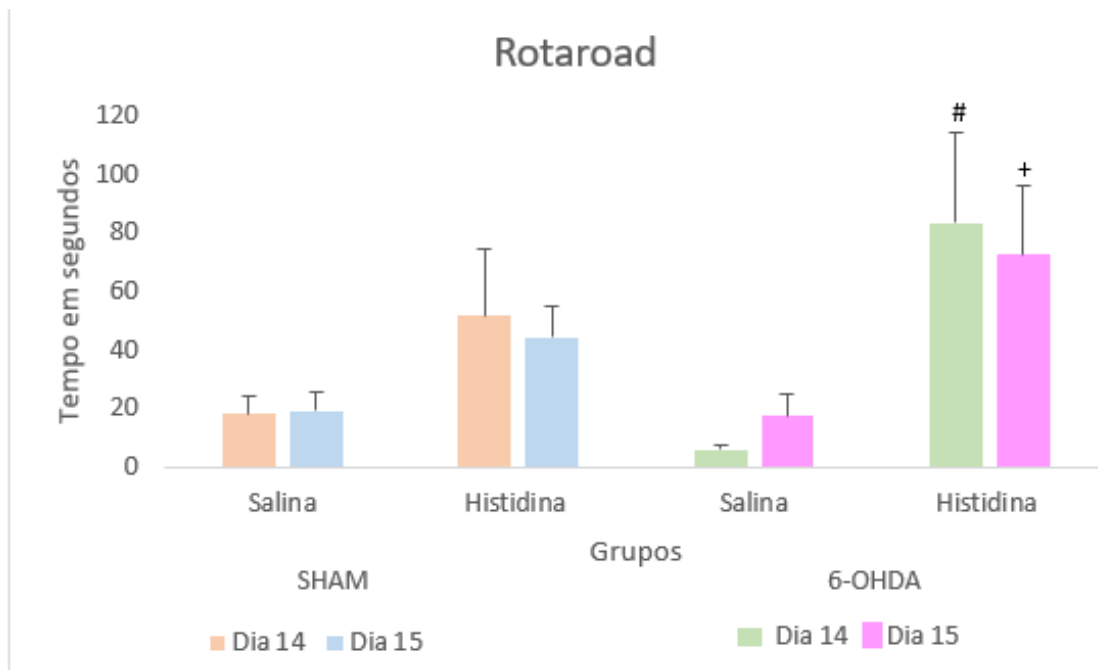


Figura 7-Média e erro padrão da média do tempo em segundos na trave de equilíbrio. # $p < 0,05$ em relação ao dia 14 do grupo 6-OHDA/L-histidina quando comparados a de todos os grupos + $p < 0,05$ em relação ao dia 15 do grupo 6-OHDA/L-histidina e 6-OHDA/Salina, pelo teste de Duncan.

Experimento 2

No experimento 2 (figuras 8 e 10), a Anova não apresentou diferença estatisticamente significativa intragrupos no campo aberto ($f=1,4456$; $p=0,242618$) e no rotaroad ($f=0,71084$ $p=0,408666$); entre os grupos no campo aberto ($f=0,9543$; $p=0,432498$) e no rotaroad ($f=2,18721$; $p=0,119649$); e na interação entre dias e grupos no campo aberto ($f=1,6203$; $p=0,214738$), e no rotaroad ($f=0,04471$; $p=0,987078$). Enquanto na trave de equilíbrio (figura 9) apresentou diferença apenas intragrupo ($f=9,98369$; $p=0,004725$), e análise pós hoc indica diferença entre os dias 14 e 15 do grupo SHAM Salina ($p=0,002167$); e entre grupos ($f=1,29150$; $p=0,303353$) e na interação entre os dias e grupos ($f=2,81186$; $p=0,064281$), não houve diferença significativa.

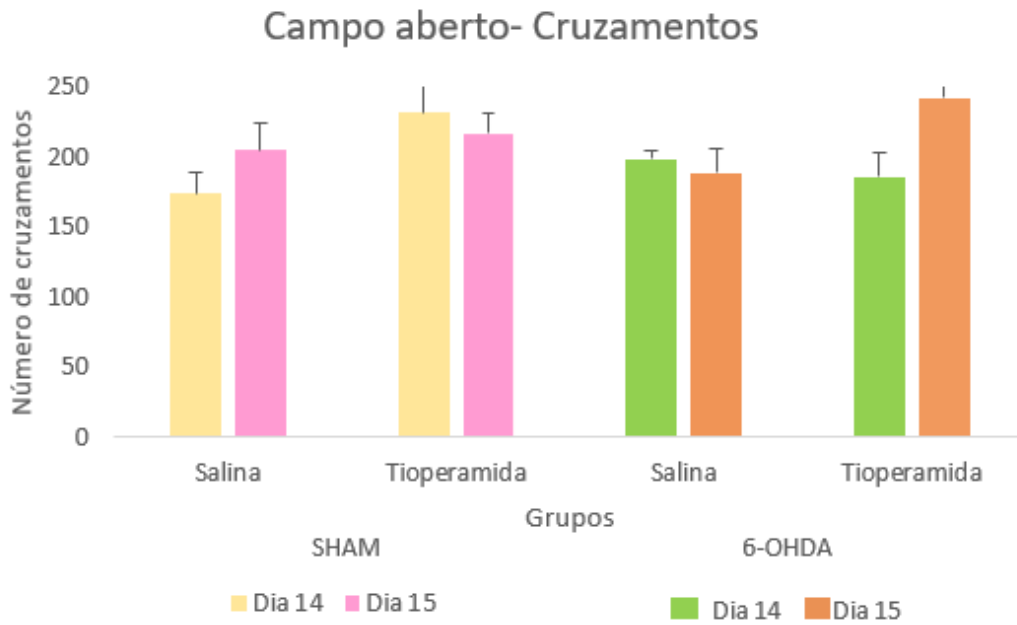


Figura 8- Média e erro padrão da média do número de cruzamentos total no campo aberto.

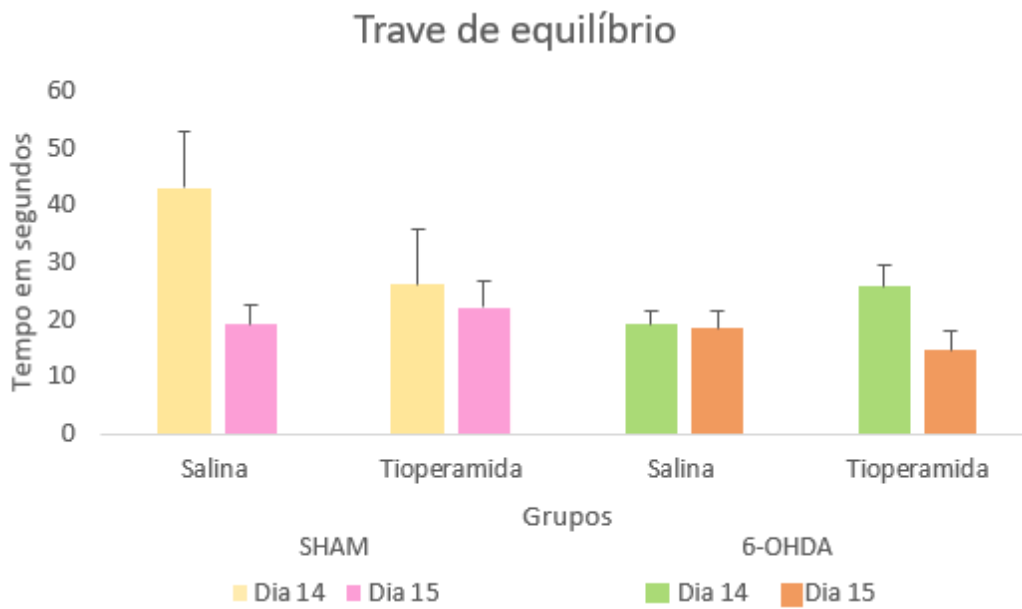


Figura 9- Média e erro padrão da média do tempo em segundos na trave de equilíbrio

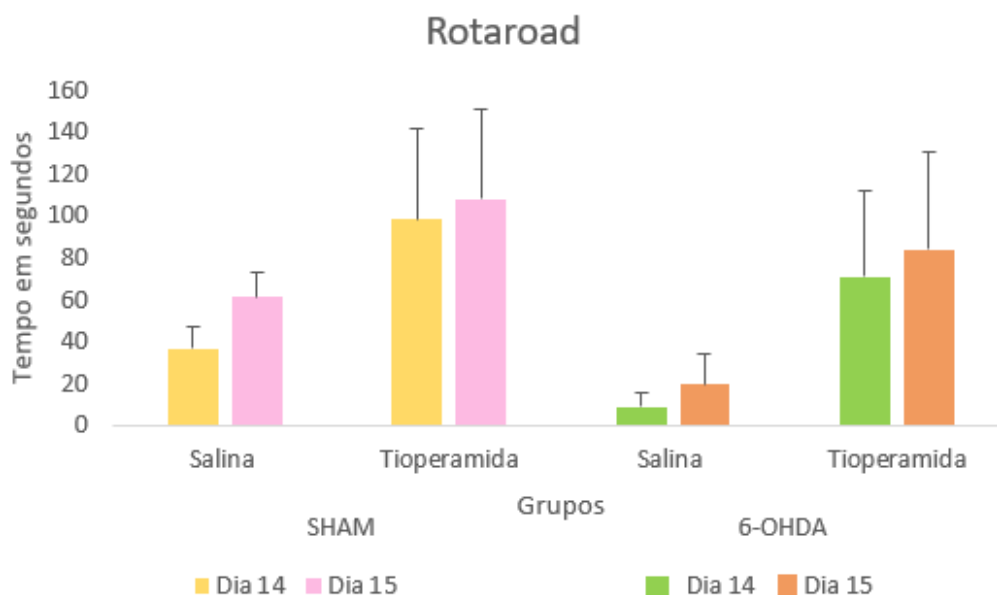


Figura 10-Média e erro padrão da média do tempo em segundos no rotarod

Experimento 3

No teste de campo aberto do experimento 3 (figura 11), a análise de variância indicou que houve diferença entre os dias ($f= 20,377$; $p=0,000131$) e entre os grupos ($f=5,464$; $p=0,004990$), onde o pós hoc destacou que o grupo SHAM VUF apresentou diferenças entre os dias ($p=0,024473$), e o dia 14 se diferenciou estatisticamente dos grupos SHAM Salina e SHAM VUF ($p=0,034681$). Também apresentou diferenças entre os dias, o grupo 6-OHDA Salina ($p=0,020103$), tendo o dia 15 se diferenciando entre os grupos 6-OHDA Salina e 6-OHDA VUF ($p=0,020014$). Concluindo então que o VUF pode ter efeito inibitório para a atividade locomotora do grupo SHAM.

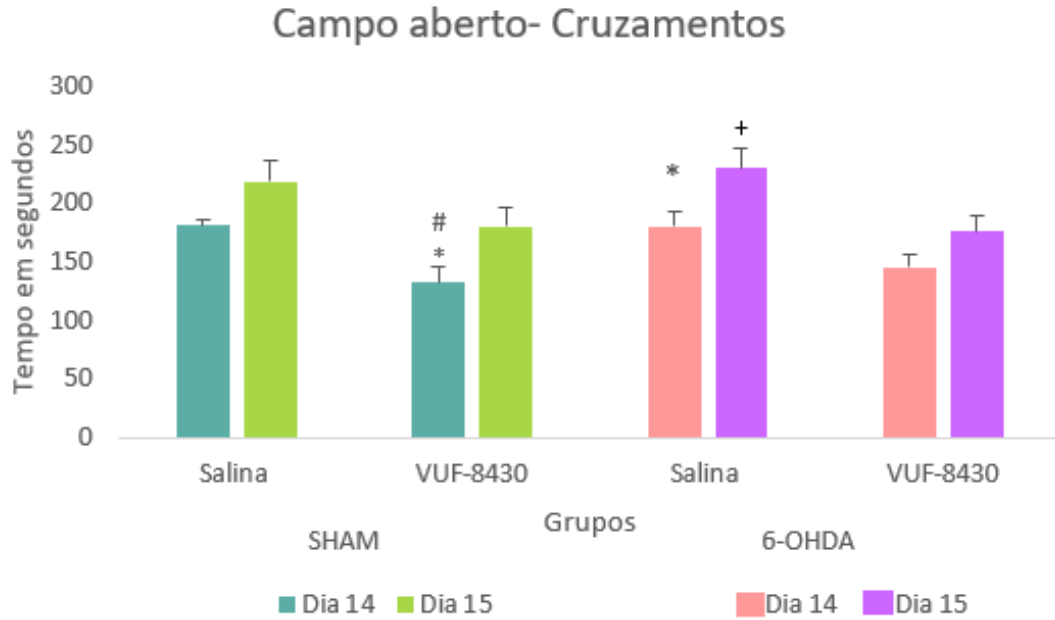


Figura 11-Média e erro padrão da média do número de cruzamentos total no campo aberto. * $p < 0,05$ em relação ao dia 14 entre os grupos SHAM/Salina e SHAM/VUF; 6-OHDA/Salina e 6-OHDA/VUF. # $p < 0,05$ em relação ao dia 14 do grupo SHAM/VUF quando comparado à todos os grupos. + $p < 0,05$ em relação ao dia 15 do grupo 6-OHDA/ Salina e 6-OHDA/VUF, pelo teste de Duncan.

Para a trave de equilíbrio (figura 12), a análise estatística não apresentou diferenças significantes intragrupos ($f=0,1582$; $p=0,694178$); entre os grupos ($f=2,4918$; $p=0,083342$) e na interação entre dias e grupos($f=2,5849$; $p=0,075682$).

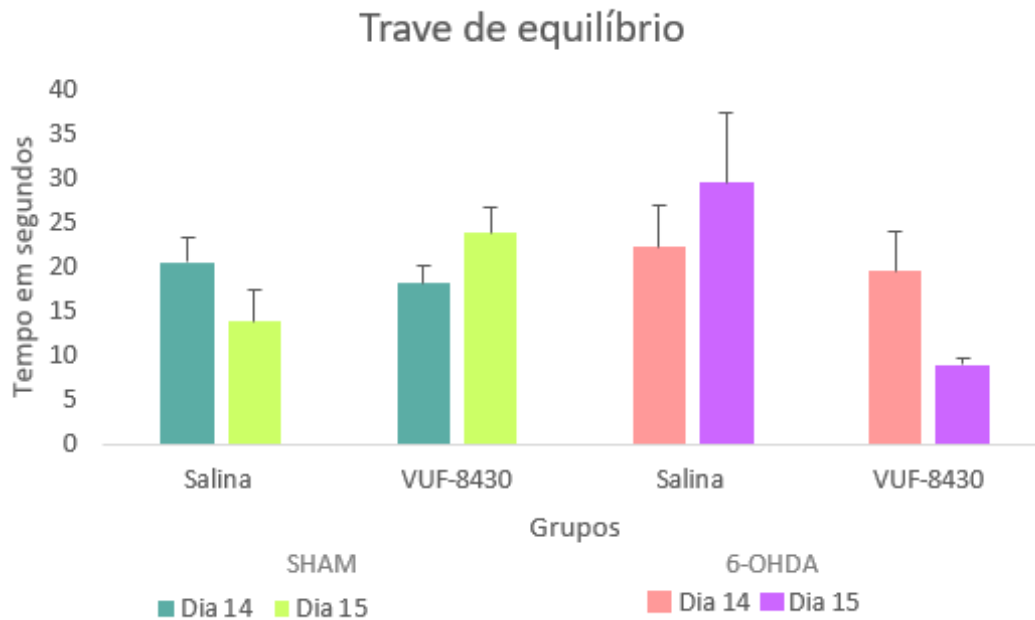


Figura 12- Média e erro padrão da média do tempo em segundos na trave de equilíbrio.

Enquanto no teste Rotarod (figura 13) a análise de variância de duas vias indicou que houve diferença entre os dias do grupos ($f=6,99025$; $p=0,013951$) sendo 6-OHDA Salina ($p=0,048113$), e entre os grupos SHAM Salina e 6-OHDA VUF no dia 15($p=0,048800$). O que indica que no modelo de neurotoxina, a VUF piorou o equilíbrio.

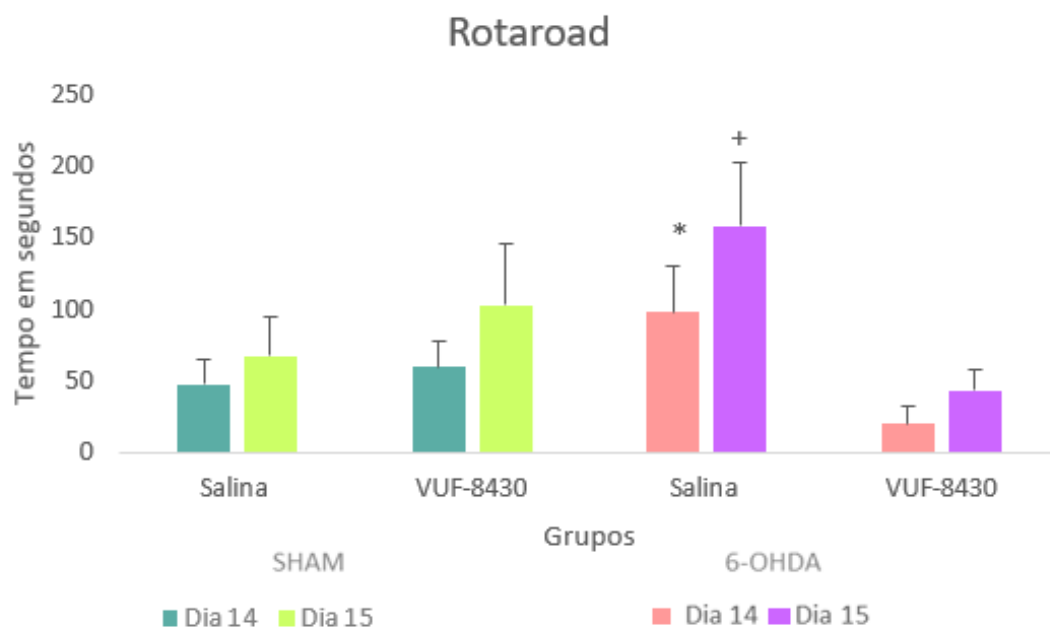


Figura 13-Média e erro padrão da média do tempo em segundos no rotarod. * $p < 0,05$ em relação ao dia 14 entre os grupos 6-OHDA/Salina e 6-OHDA/VUF, + $p < 0,05$ em relação ao dia 15 entre os grupos 6-OHDA/Salina e 6-OHDA/VUF, pelo teste de Duncan.

VII- Discussão

Os principais achados experimentais do presente estudo são que a l-histidina parece promover um efeito agudo sobre a neuroproteção no modelo 6OHDA em camundongos. Nossos resultados indicaram que camundongos submetidos à injeção de LH tiveram um melhor desempenho motor no teste de trave de equilíbrio e Rotarod. Encontramos também que, o agonista do receptor H4 VUF-8430 na recuperação, foi capaz de inibir a atividade locomotora no grupo SHAM durante o teste do campo aberto e piorou o equilíbrio no Rotarod.

A síntese neuronal de histamina é realizada pela histidina descarboxilase, que converte l-histidina em histamina por meio de descarboxilação oxidativa (Dere et al., 2010). O controle do estado de vigília, comportamento motivado, distúrbios comportamentais, ansiedade (Faganello e Mattioli, 2007, Privou et al., 1998, Imaizumi & Onodera, 1993), aprendizagem e memória, bem como alterações neuroplásticas ligadas à recuperação funcional do cérebro danos foram todos ligados ao sistema histaminérgico neural (NHS) (Medalha et al., 2000, Mattioli et al., 1998, De Almeida & Izquierdo, 1986). Além disso, estudos clínicos mostram o envolvimento do sistema histaminérgico do cérebro em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Dere et al 2010).

Foi proposto que a histamina e seus receptores têm um papel modulador na formação da atividade estriatal, e há evidências que indicam uma conexão entre o sistema histaminérgico e distúrbios neuropsiquiátricos. A histamina regula a liberação de dopamina no estriado ventral e dorsal, modula a transmissão sináptica e afeta a plasticidade neuronal. Essas descobertas evidenciam uma interação entre os neurotransmissores (Abdurakhmanova et al., 2019; Koski et al.2020).

Na primeira exposição ao campo aberto, a L-histidina atuou na recuperação pós-procedimento e facilitou a locomoção neste teste, o que corrobora estudo de Sakai e colaboradores (1992) que afirma que a quantidade de histamina no cérebro é proporcional à sua atividade locomotora. Embora Yoshikawa et al.(2014) usaram dietas ricas e pobres em L-histidina, não encontraram diferenças intragrupo no comportamento motor.

No estudo de Liu et al. (2008), os animais foram lesionados com 6-OHDA e depois administrados com apomorfina que induziu o comportamento rotacional. Quando administrado l-histidina, esse comportamento foi acentuado, e quando administrado α -fluorometil-histidina, um inibidor irreversível da histidina descarboxilase, o comportamento de rotação foi reduzido. Este estudo contradiz nossos achados, onde observamos na trave de equilíbrio que o modelo neurotoxina/salina apresentou pior equilíbrio e coordenação enquanto o grupo neurotoxina/l-histidina melhorou seu desempenho.

Em nosso modelo, a dose utilizada do antagonista de H3, tioperamida não promoveu alterações no comportamento locomotor dos animais. Até onde sabemos, não há estudos com lesão por 6-OHDA no camundongo que utilizamos, suíço albino.

Costa (2013) utilizou o camundongo suíço albino e estudou a influência da microinjeção de tioperamida em três concentrações distintas (0,06, 0,3 e 1,5 nmol/0,1 μ l) no vermis cerebelar e concluiu que a droga não interferiu na atividade locomotora em nenhuma das doses utilizadas, o que corrobora com os nosso experimento, embora aplicado em locais distintos, utilizando o mesmo animal.

Nowak e colegas (2008) avaliaram efeito do imetit (agonista de H3) e o tioperamida, além de avaliar os efeitos destes receptores sobre a L-dopa em ratos Wistar recém nascidos lesionados com 6-OHDA. Eles concluíram que a modulação do receptor H3 influencia diretamente no tratamento com l-dopa no modelo de 6-OHDA, onde a estimulação do receptor de H3 pode aumentar a discinesia motora e reduzir a eficácia do tratamento de l-dopa; e a tioperamida foi eficaz para melhorar a

coordenação no teste de rotarod. Em outro estudo com o mesmo modelo animal, Nowak et.al (2009) relatam em seu estudo que a tioperamida foi o único antagonista dos receptores histaminérgicos capaz de prevenir a estereotipia advinda da apomorfina.

Outro estudo avaliou a administração crônica de imepip, agonista do receptor H3, combinado com o L-dopa e encontraram que ocorreu a diminuição significativa dos movimentos anormais involuntários em ratos lesionados com 6-OHDA (Avila-Luna 2019). Entretanto nosso estudo avaliou ip. e a tioperamida de modo isolado.

A ativação microglial induzida por histamina é mediada pelo receptor de H4, desencadeando um efeito pró-inflamatório (Barata-Antunes et al.2016; Fang et al. 2021), que foi evidenciado em nosso estudo, onde os animais pioraram sua recuperação pós procedimento após a primeira dose de VUF quando comparado ao grupo que recebeu salina.

Sanna e colaboradores descobriram que através do receptor H4, há a modulação da locomoção, nocicepção, ansiedade e comportamento alimentar. Em seu estudo com camundongos deficientes deste receptor, encontraram um aumento significativo da atividade exploratória e deambulação no campo aberto, o que corrobora com nosso estudo onde o VUF-8430, agonista do receptor H4, induziu uma inibição para atividade locomotora tanto nos animais que sofreram lesão estriatal quanto os animais controle no teste do campo aberto.

O sistema histaminérgico modula diversas funções fisiológicas e sua interação com outros neurotransmissores é estudada constantemente. Especificamente, entre sistema histaminérgico e dopaminérgico o interesse tem crescido, visto potencial aplicabilidade clínica em condições patológicas. Até onde sabemos, somos o primeiro grupo a estudar o modelo de neurotoxina 6-OHDA com injeções intraperitoneais de l-histidina, tioperamida e VUF-8430. Esse processo como linha de pesquisa (modelos animais em doenças neurodegenerativas) apesar de um pequeno passo, foi um grande avanço visto as adversidades e obstáculos do contexto atual em investimentos de pesquisa. Visamos com isso, dar seguimento a essas investigações, incluindo análises da lesão por meio de outros testes comportamentais, e análises histológicas e moleculares. Nosso objetivo é também complementar com novos estudos e parcerias para entender melhor os efeitos agudos e crônicos sobre o desempenho motor e não motor dos compostos histaminérgicos e dos receptores de histamina neste modelo, além da interação com sistema dopaminérgico.

VIII- Conclusão

Em nosso estudo, encontramos que a LH influenciou facilitou o desempenho motor dos camundongos submetidos a lesão hemiestriatal com 6-OHDA, e que o agonista do receptor H4 foi capaz de inibir a atividade locomotora e piorar o equilíbrio dos camundongos com a lesão neurotóxica.

IX- Referências bibliográficas

ABDURAKHMANOVA S, SEMENOVA S, PIEPPONEN TP, PANULA P. Abnormal behavior, striatal dopamine turnover and opioid peptide gene expression in histamine-deficient mice. **Genes Brain Behav**, v.18, n.8, 2019. Disponível em <https://doi.org/10.1111/gbb.12595>.

AVILA-LUNA, A., RÍOS, C., GÁLVEZ-ROSAS, A. et al. Chronic administration of the histamine H3 receptor agonist immapip decreases L-Dopa-induced dyskinesias in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Psychopharmacology** v.236, p.1937–1948 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-019-5182-y>

BARATA-ANTUNES S.; et al. Dual role of histamine on microglia-induced neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v.1863 n. 3, p.764-769, 2017. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.016>

BEAULIEU, Jean M.; ESPINOZA, Stefano; GAINETDINOV, Raul R. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. **British journal of pharmacology** v. 172, n.1, p. 1-23, 2015. Disponível em: <https://doi:10.1111/bph.12906>

BONGERS, Gerold, ESCH, Iwan de, LEURS, Rob. Molecular Pharmacology of the Four Histamine Receptors. **Histamine in Inflammation. Advances in Experimental Medicine and Biology**, Springer, Boston, MA, v. 709 p. 11-19, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8056-4_2

CHANGLIANG, Liu; PASCAL, Kaeser S. Mechanisms and regulation of dopamine release. **Current opinion in neurobiology** v. 57, n.1, p. 46-53, 2019. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.conb.2019.01.001>

CHEN Zhang-Peng; et al. Histamine H1 Receptor Contributes to Vestibular Compensation. **Journal of Neuroscience**, v.39, n.3, p.420-433, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1350-18.2018>.

CHIA, Shyh J.; TAN, Eng-King; CHAO, Yin-Xia. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. **International journal of molecular sciences**, v.21, n.7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21072464>

CLAPHAM, Jane; KILPATRICK, Gavin J. Thioperamide, the selective histamine H3 receptor antagonist, attenuates stimulant-induced locomotor activity in the mouse. **European journal of pharmacology**, v.259, n.2, p.107-114, 1994.. Disponível em : [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90498-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90498-7).

ELLENBROEK, BA. Histamine H3 receptors, the complex interaction with dopamine and its implications for addiction. **British Journal Pharmacology**, v.170, n.1, p.46-57, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.12221>

FANG, Qiuyuan; et al. Histamine-4 receptor antagonist ameliorates Parkinson-like pathology in the striatum. **Brain, behavior, and immunity**, v. 92, p. 127-138, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.036>.

FELGER, Jennifer. The Role of Dopamine in Inflammation-Associated Depression: Mechanisms and Therapeutic Implications. **Current topics in behavioral neurosciences**, v.31, p.199-219, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/7854_2016_13.

FERNANDES, C.; SERAFIM, K. R.; GIANLORENÇO, A.; MATTIOLI, R. Systemic injection of an H4 receptor agonist induces a decrease in CREB and pCREB levels in the cerebellar vermis and prefrontal cortex in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.52, n.5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20198334>.

GARCÍA-GÁLVEZ, Ana M.; ARIAS-MONTAÑO, José A. Isoforms of the human histamine H3 receptor: Generation, expression in the central nervous system and functional implications. **Gaceta Médica de México**, v.152, n.1, p. 94-102, 2016. Spanish. PMID: 26927649

GUILHERME, Evelyn M. Influência do sistema histaminérgico cerebelar no comportamento locomotor e ansiedade de camundongos. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p.21, 2018.

KLEIN, Marianne O. et al. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 39, n.1, p. 31-59, 2019: 31-59. Disponível em: <https://doi:10.1007/s10571-018-0632-3>.

KOSKI, Sini K.; 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**, v. 729, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134932>.

LIU, Chun-Qing; et al. Apomorphine-induced turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rats is increased by histidine and decreased by histidine decarboxylase, histamine H1 and H2 receptor antagonists, and an H3 receptor agonist. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.90, p. 325-330, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.03.010>

LUO Sarah X.; HUANG Eric J. Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly. • **The American journal of pathology**, v. 186, n.3, p. 478-488, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.023>.

MARQUES, Bruna S. Influência do Sistema Histaminérgico Cerebelar na Aprendizagem Motora e Memória Emocional de Camundongos. Tese (Doutorado em Fisioterapia). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 15-16, 2020.

MASINI, Débora; et al. A Guide to the Generation of a 6-Hydroxydopamine Mouse Model of Parkinson's disease for the Study of Non-Motor Symptoms. **Biomedicines**, v.9, n.598, p 1-19, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060598>

MCCUTCHEON, Robert A.; ABI-DARGHAM, Anissa; HOWES, Oliver D. Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. **Trends in neurosciences**, v.42, n.3, p.205-220, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.12.004>.

NOWAK, P., NORAS, Ł., JOCHEM, J. et al. Histaminergic Activity in a Rodent Model of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research** v.15 p.246–251, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9025-1>

NOWAK, P., BORTEL, A., DABROWSKA, J. et al. Histamine H3 receptor ligands modulate L-dopa-evoked behavioral responses and L-dopa-derived extracellular dopamine in dopamine-denervated rat striatum. **Neurotox Res** v.13, p.231–240, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03033506>

PARSONS, Mike E.; GANELLIN, Robin C. Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n.1, p. 127-135, 2006 Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706440>.

PINHEIRO, Bárbara M.; et al. Unilateral Intrastratial 6-Hydroxydopamine Lesion in Mice: A Closer Look into Non-Motor Phenotype and Glial Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms222111530>.

RAZA, Chand; ANJUM, Rabia; SHAKEEL, Noor U.A. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. **Life sciences**, v.226, p.77-90, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>.

ROCHA, S.M.; SARAIVA, T.; CRISTÓVÃO, A.C; et al. Histamine induces microglia activation and dopaminergic neuronal toxicity via H1 receptor activation. **Journal**

Neuroinflammation v.13, n.137, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0600-0>

RUITENBEEK P. V.; et al. Histamine H1receptor blockade predominantlyimpairs sensory processes in human sensorimotor performance. **British Journal of Pharmacology**, v.157, n.1, p. 76?85, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00103.x>.

SAKAI, Naruhiko; et al. Effects of (S) - α -fluoromethylhistidine and metoprine on locomotor activity and brain histamine content in mice, **Life Sciences**, v. 51, p. 397-405,1992 Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90406-F](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90406-F).

SANNA Maria D.;et al. Behavioural phenotype of histamine H4 receptor knockout mice: Focus on central neuronal functions. **Neuropharmacology**, v.114, p.48-57, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.023>.

SCHALLERT, Timothy; et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v.39, n.5, p.777-787, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00005-8](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00005-8).

SCHNEIDER, Erich H. Microglial histamine H4R in the pathophysiology of Parkinson's disease-a new actor on the stage?. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v.392, p.641-645, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01635-0>.

SCHNEIDER, Erich H.; NEUMANN, Detlef; SEIFERT, Roland. Modulation of behavior by the histaminergic system: Lessons from H1R-and H2R-deficient mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 42, p. 252-266, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.009>.

SCHNEIDER, Erich H.; NEUMANN, Detlef; SEIFERT, Roland. Modulation of behavior by the histaminergic system: Lessons from HDC- H3R- and H4R-

deficient **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.47, p 101-121, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.07.020>.

SCHWARTZ JC. The histamine H3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. **Br J Pharmacol**, v.63 n.4 p. 713-21, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01286.x>.

SERAFIM, K. R.; KISHI, M.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n.1, p. 100-106, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009007500025>.

SHAN, Ling; et al. Alterations in the histaminergic system in the substantia nigra and striatum of Parkinson's patients: a postmortem study. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n.7, p. 1488.e1-1488.e13, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.016>.

SIMON, David K.; TANNER, Caroline M.; BRUNDIN, Patrik. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in geriatric medicine**, v.36, n.1, p.1-12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>.

SMITH, Gaynor; HEUER, Andreas. 6-OHDA toxin model in mouse. **Neuromethods**, v.61 p. 281-29, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-298-4_14

STRAKHOVA, Marina; et al. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. **Brain research**, v. 1250, p.41-48, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.018>.

Sveinbjornsdottir, Sigurlaug. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 139 n.1, p.318–324, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.13691>

TASHIRO, Manabu; et al. Roles of histamine in regulation of arousal and cognition: functional neuroimaging of histamine H1 receptors in human brain. **Life Sciences**, v.72, p. 409-414, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02276-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02276-2).

TILLERSON, Jennifer L.; et al. Forced Limb-Use Effects on the Behavioral and Neurochemical Effects of 6-Hydroxydopamine. **Journal of Neuroscience** v.21, n.12, p. 4427-4435, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04427.2001>

VIZUETE, M L; et al. Histamine Infusion Induces a Selective Dopaminergic Neuronal Death Along with an Inflammatory Reaction in Rat Substantia Nigra. **Journal of Neurochemistry**, v.75, n.2, p. 540-552, 2000. Disponível em : <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750540.xC>

YOSHIKAWA, Takeo; et al. Insufficient Intake of L-Histidine Reduces Brain Histamine and Causes Anxiety-Like Behaviors in Male Mice. **Journal of Nutrition**, v.144, p.1637–1641, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/jn.114.196105>

YOSHIKAWA, Takeo; NAKAMURA, Tadaho; YANAI, Kazuhiko. Histamine N-Methyltransferase in the Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.737, p. 01-14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20030737>.

YUE, Jia-Xing; et al. Histamine Up Regulates Nav1.8 Expression in Primary Afferent Neurons Via H2 Receptors: Involvement in Neuropathic Pain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v.20 n.10, p. 883-892, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cns.12305>.

ZHAI, Shenyu; et al. Dopaminergic modulation of striatal function and Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v.126, n.4, p. 411-422, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-019-01997-y>.

ZHANG, Wei et al. Histamine induces microglia activation and the release of proinflammatory mediators in rat brain via H1R or H4R. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 280-291, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09887-6>.

ZHOU, Pei; et al. Histamine-4 receptor antagonist JNJ7777120 inhibits pro-inflammatory microglia and prevents the progression of Parkinson-like pathology and behaviour in a rat model. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.76, p. 61-73, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.006>.

Zhuang, Qian-Xing; et al. Histamine Excites Striatal Dopamine D1 and D2 Receptor-Expressing Neurons via Postsynaptic H1 and H2 Receptors. **Molecular neurobiology**, v. 55, n.10, p.8059-8070, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0976-1>.