



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

**Influência do sistema histaminérgico cerebelar no comportamento locomotor e
ansiedade de camundongos**

São Carlos

2018

EVELYN MARIA GUILHERME

**Influência do sistema histaminérgico cerebelar no comportamento locomotor e
ansiedade de camundongos**

Versão Corrigida

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

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Evelyn Maria Guilherme, realizada em 16/01/2018:

Anna Carolina Lepesteur Gianlorenço

Profa. Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço
UFSCar

Thiago Luiz de Russo

Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
UFSCar

Flavia R Faganello Navega

Profa. Dra. Flavia Roberta Faganello Navega
UNESP

AGRADECIMENTOS

É indiscutível que a presente dissertação de mestrado é fruto de muito trabalho e dedicação ao longo de dois anos. Contudo, sua conclusão só foi possível devido ao suporte social, educacional e financeiro recebido. Expresso com essas breves palavras a minha gratidão e reconhecimento a todos que de alguma forma agregaram na construção deste trabalho.

Início meus agradecimentos à minha família, que incentivou e deu o apoio necessário para que eu pudesse concluir o mestrado. E agradeço por ter a confiança de que esse apoio permanecerá durante meus próximos passos, independente de onde eles me levem. Ao meu pai, Valdecir, que foi exemplo de que determinação e dedicação são imprescindíveis para alcançar qualquer objetivo. À minha mãe, Luzia, que ensinou a importância do cuidado, paciência e resiliência como base para uma boa convivência em qualquer situação. Aos meus irmãos Evandro e Letícia, sempre presentes durante meu trajeto.

Ao meu namorado Felipe, agradeço por estar presente todos os dias, durante as conquistas e principalmente durante as dificuldades. Seu amor e companheirismo possibilitaram o meu crescimento como profissional e principalmente como pessoa.

Agradeço aos amigos que em algum momento participaram e contribuíram em minha trajetória no mestrado.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Anna Carolyn Lepeteur Gianlorenço. Orgulho-me por ter tido a chance de ser a formada por essa excelente pesquisadora, professora e pessoa. Sua atenção aos detalhes e incentivo frente a novos desafios foram essenciais para todas as minhas conquistas nesse período.

Agradeço aos demais professores da Universidade Federal de São Carlos, especialmente à Profa. Dra. Rosana Mattioli e ao Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo, que além de atuar em importantes áreas para minha formação, deram especiais contribuições para o desenvolvimento da presente dissertação de mestrado.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurociências, Bruna e Carlos Eduardo, obrigado por ensinar o verdadeiro significado de trabalho em equipe. A amizade e espírito colaborativo com certeza contribuíram para o desenvolvimento dessa dissertação de uma forma mais leve e tranquila.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, por estar sempre em busca da excelência e prezar pela boa formação de seus alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio institucional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos nº2016/26071 e 2014/24774-8, agradeço pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro oferecido.

Ao *Government of Canada, Global Affairs Canada (GAC)* e *Canadian Bureau for International Education (CBIE)*, agradeço pelo incentivo à internacionalização e concessão de apoio financeiro para realização de estágio em pesquisa através do *Emerging Leaders of The Americas Program (ELAP)*.

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

A todos o meu muito obrigado!

RESUMO

GUILHERME, Evelyn Maria. **Influência do sistema histaminérgico cerebelar no comportamento locomotor e ansiedade de camundongos**. 2018. 47f. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia), Universidade Federal de São Carlos, 2018.

O cerebelo é uma importante estrutura do sistema nervoso central com participação em processos motores e não motores. O sistema histaminérgico tem participação no circuito neuronal cerebelar, porém sua atuação não é completamente conhecida. A histamina pode atuar por meio de quatro tipos de receptores: H1, H2, H3 e H4. Contudo, há poucos estudos sobre a atuação do sistema histaminérgico cerebelar sobre o desempenho motor e não motor. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da microinjeção de componentes histaminérgicos no vérmis cerebelar, propondo uma possível interação desse sistema junto ao cerebelo na modulação de funções motoras e não motoras. O estudo foi composto de cinco experimentos, avaliando o efeito da Histamina (experimento 1), antagonista de receptor H1 Clorfeniramina (experimento 2), antagonista de receptor H2 Ranitidina (experimento 3), antagonista de receptor H3 Tioperamida (experimento 4), e agonista de receptor H4 VUF-8430 (experimento 5) sobre o comportamento locomotor e ansiedade de camundongos expostos ao teste de campo aberto. Para isso, foi realizada uma cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula-guia de no vérmis cerebelar de camundongos com peso entre 25 e 35 g. Três dias após a cirurgia, foi realizado o procedimento de microinjeção e teste comportamental de campo aberto, e foram quantificados o número de cruzamentos, número de levantamentos do animal sobre as patas traseiras e tempo na área central da arena. A histologia confirmou que a injeção realmente ocorreu no vérmis cerebelar. A análise estatística incluiu análise de variância (ANOVA), seguido por teste *post-hoc* de Duncan. Os principais resultados indicaram que as doses mais altas de clorfeniramina e VUF levaram a um efeito ansiolítico associado ao aumento do comportamento locomotor e exploratório dos animais, indicando uma possível modulação do sistema histaminérgico cerebelar nessas funções, via ação dos receptores H1 e H4.

Palavras-chave: sistema histaminérgico; comportamento locomotor; ansiedade; cerebelo.

ABSTRACT

GUILHERME, Evelyn Maria. **Influence of the cerebellar histaminergic system on locomotor and anxiety-like behaviors in mice.** 2018. 48f. Dissertation (Master's degree in Physical Therapy) – Federal University of Sao Carlos, 2018.

The cerebellum is an important structure of the central nervous system with participation in motor and non-motor functions. The histaminergic system has a major role on the cerebellar neuronal circuit, but its function is not fully understood. The histamine can act through four types of receptors: H1, H2, H3 and H4. There are few studies about the role of the cerebellar histaminergic system on motor and non-motor functions. Thus, the main objective of this study is to investigate the effects of the intravermis cerebellar microinjections of histaminergic compounds, proposing a possible interaction of this system and the cerebellum on the modulation of motor and non-motor functions. The study was composed by five experiments, to evaluate the effects of Histamine (experiment 1), H1 receptor antagonist Chlorpheniramine (experiment 2), H2 receptor antagonist Ranitidine (experiment 3), H3 receptor antagonist Thioperamide (experiment 4) and H4 receptor agonist VUF-8430 (experiment 5) on the locomotor and anxiety-like behaviors in mice exposed to the open field test. A stereotaxic surgery was performed, and a guide cannula was implanted into the cerebellar vermis of mice weighing between 25 – 35g. Three days after surgery, the animals received the microinjection and were exposed to the open field behavioral test. The number of crossed quadrants, number of rearings and time in the central area was measured. The histological analysis confirmed the place of the microinjection. The statistical analysis was composed by one way ANOVA, follow by Duncan's post hoc when appropriate. The results indicate that the higher doses of chlorpheniramine and VUF has an anxiogenic effect associated to increase of the locomotor and exploratory behaviors of mice, indicating a possible modulation of the cerebellar histaminergic system in these functions, through H1 and H4 receptors.

Keywords: histaminergic system, locomotor behavior, anxiety-like behavior, cerebellum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Camundongos machos da linhagem suíço albino.	17
Figura 2: Figura adaptadas do atlas de Paxinos e Franklin (2001) mostrando a localização do vérmis cerebelar, e fotografia da implantação de cânula guia em procedimento cirúrgico.....	18
Figura 6: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de histamina em diferentes doses.	26
Figura 7: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de histamina em diferentes doses.	26
Figura 8: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de histamina em diferentes doses.	26
Figura 9: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de clorfeniramina em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CPA 0,052 nmol, teste de Duncan.	27
Figura 10: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de clorfeniramina em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e grupo 0,052, teste de Duncan.	28
Figura 11: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de clorfeniramina em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação aos outros grupos, teste de Duncan.	28
Figura 12: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de ranitidina em diferentes doses.	29
Figura 13: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de ranitidina em diferentes doses.	29
Figura 14: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de ranitidina em diferentes doses.	29
Figura 15: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de tioperamida em diferentes doses.....	30
Figura 16: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de tioperamida em diferentes doses.	30
Figura 17: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de tioperamida em diferentes doses.....	31
Figura 18: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de VUF em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação aos grupos salina, 0,15 nmol e 0,49 nmol, teste de Duncan.	32

Figura 19: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de VUF em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação aos grupos salina e 0,15 nmol, teste de Duncan. 32

Figura 20: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de VUF em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação aos grupos salina e 0,15 nmol, teste de Duncan. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Experimento 1.	21
Tabela 2: Experimento 2.	22
Tabela 3: Experimento 3.	22
Tabela 4: Experimento 4.	23
Tabela 5: Experimento 5.	23
Tabela 6: Resultados dos experimentos.	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos gerais.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Aspectos éticos e locais de pesquisa	17
3.2. Amostra	17
3.3. Cirurgia e microinjeção	18
3.4. Tratamento farmacológico	19
3.5. Equipamentos e procedimentos.....	19
3.5.1. Campo aberto	19
3.6. Grupos experimentais.....	21
4. ANÁLISE DE DADOS.....	24
4.3. Análise histológica	24
4.4. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.3. Experimento 1 – Efeitos da Histamina microinjetada no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto.....	25
5.4. Experimento 2 – Efeitos da Clorfeniramina microinjetada no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto	27
5.5. Experimento 3 – Efeitos da Ranitidina microinjetada no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto.....	28
5.6. Experimento 4 – Efeitos da Tioperamida microinjetada no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto.....	30
5.7. Experimento 5 – Efeitos do VUF microinjetado no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto	31
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

O cerebelo é uma importante estrutura do sistema nervoso central (SNC), e apresenta conexões com diversas outras estruturas, como o córtex cerebral (MANZONI, 2007; CHAN et al., 2017), hipotálamo (ZHU et al., 2006), e medula espinhal (MANZONI, 2007), o que o relaciona a diversas funções. Para que a função cerebelar seja adequada, são necessárias conexões neuronais bem organizadas e integração adequada entre os circuitos aferentes e eferentes (REEBER et al., 2013).

Tradicionalmente, estudos demonstram a participação do cerebelo em processos motores, como controle postural (YAMAURA et al., 2013) e marcha (HOOGKAMER et al., 2017). Segundo revisão de Manto e colaboradores (2012), o cerebelo contribui para o planejamento e regulação do movimento, o que explica os déficits clínicos apresentados por pacientes com comprometimentos cerebelares, caracterizados por distúrbios na precisão e coordenação, como em distúrbios dos movimentos oculares, distúrbios da fala, distúrbios de movimentos dos membros, deficiências de postura e marcha (MANTO et al., 2012).

Contudo, de acordo com recente revisão de Adamazek e colaboradores (2017), o cerebelo também está envolvido em funções não motoras, como cognição (VAN OVERWALLE et al., 2015), processos emocionais (SACHETTI et al., 2009), memória (SHIROMA et al., 2016) e linguagem (MARIËN & BEATON, 2014), além de ter participação em funções viscerais como ajustes cardiovasculares, através de sua conexão direta com o hipotálamo (ZHU et al., 2006).

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, defensividade tátil, desinibição e falta de limites, agressividade, comportamento obsessivo repetitivo, perda de memória e incapacidade de explicitar emoções. Essa relação tem se tornado cada vez mais evidente nos estudos de imagem funcionais e estruturais (PHILLIPS et al., 2015).

Popa e colaboradores (2014) sugeriram que a participação do cerebelo em funções motoras e não motoras estaria relacionada à sua arquitetura uniforme e a um modo comum de processamento das informações, na qual o córtex cerebelar tem grande capacidade de estabelecer associações entre diferentes sinais sensoriais. De acordo com os autores, a

circuitaria do córtex cerebelar suporta aprendizagem associativa, seqüenciamento, memória de trabalho e modelos internos de domínios não motores (POPA et al., 2014).

Anatomicamente, o cerebelo consiste em dois hemisférios laterais e o vérmis, situado em sua face superior (MACHADO, 2005). Sua principal característica morfológica é o aspecto folheado, com subdivisões em lóbulos separados por uma série de fissuras (LETO et al., 2016). Alguns estudos sugerem uma divisão baseada na ontogênese do cerebelo em lobo flóculo nodular e corpo do cerebelo, que por sua vez se subdivide em lobo anterior e posterior (MACHADO, 2005). Esse modelo não se alinha com os lóbulos cerebelares, mas corresponde a um padrão de terminações aferentes, sendo assim uma forma mais funcional de divisão do cerebelo (RAHIMI-BALAEI et al., 2015).

O córtex cerebelar se subdivide em camada molecular, camada média ou de células de Purkinje e camada granular (MACHADO, 2005; RAHIMI-BALAEI et al., 2015). As células de Purkinje são neurônios inibitórios que projetam axônios para o núcleo do cerebelo e, as células granulosas, por sua vez, são neurônios excitatórios que podem estender axônios para a camada molecular, onde ocorrem as sinapses com os dendritos de Purkinje. Em uma camada mais interna encontra-se o núcleo cerebelar, composto de substância branca e neurônios glutaminérgicos e gabaérgicos. (BUTTS et al., 2014).

Li e colaboradores sugerem que os neurônios cerebelares interagem com mais de vinte diferentes tipos de aminas e neuropeptídios presentes no cerebelo, entre essas aminas, a histamina (LI et al., 2014). No SNC, os neurônios histaminérgicos estão localizados no núcleo tuberomamilar hipotalâmico, com projeções de axônios para regiões do cérebro e cerebelo (PANULA et al., 1993; HAAS et al., 2008). As fibras histaminérgicas cerebelares estão distribuídas nas três camadas corticais de cerebelos de ratos (INAGAKI et al., 1988) e em quantidade expressiva na camada molecular, penetrando perpendicularmente na camada de Purkinje no córtex cerebelar humano (PANULA et al., 1993).

Os níveis de histamina se relacionam a várias funções, como o ritmo circadiano (MONTI, 1993), consolidação da memória emocional (GIANLORENÇO et al., 2012; SERAFIM et al. 2012; SILVA-MARQUES et al., 2016), ansiedade (PIRI et al., 2013), regulação de comportamentos apetitivos (RIVEROS et al., 2015; CONTRERAS et al., 2016) e comportamento motor (LI et al., 2017).

A histamina, sintetizada a partir da descarboxilação da histidina (SCHNEIDER et al., 2014) atua em diversos sistemas corporais, como o SNC, cardiovascular, gastrointestinal,

imunológico e reprodutor (HAAS et al., 2008), através de quatro diferentes receptores acoplados à proteína G: H1, H2, H3 e H4 (HAAS et al., 2008; PANULLA et al., 2015).

O receptor H1 é expresso em córtex, hipotálamo, cerebelo, tálamo e tronco encefálico (HAAS et al., 2008) e participa, de acordo com a revisão de Schneider e colaboradores (2014), da modulação de diversos comportamentos, como a locomoção, estados emocionais, ritmo circadiano, cognição, sono, dor, homeostase energética, respiração e susceptibilidade à convulsões. Já o receptor H2 é encontrado em grande quantidade nos gânglios da base, amígdala, hipocampo e córtex cerebral (HAAS et al., 2008), e tem sido relacionado principalmente a nocicepção (YUE et al., 2014) e respostas cardiovasculares ao estresse (ALMEIDA et al., 2015), porém seus efeitos ainda não são completamente esclarecidos na literatura (SCHNEIDER et al., 2014).

O receptor H3 é expresso em estruturas do sistema nervoso central e periférico em múltiplas isoformas (PANULLA et al., 2015; NIETO-ALAMILLA et al., 2016; GARCÍA-GÁLVEZ & ARIAS-MONTAÑO, 2016), o que lhe confere um elevado grau de heterogeneidade (HAAS et al., 2008). Apresenta atividade pré-sináptica inibitória sobre a síntese e liberação de histamina (LEURS et al., 1995; PANULLA et al., 2015) e participa da modulação de outros neurotransmissores importantes (HAAS et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2014). Alterações na função dos receptores H3 em camundongos estão relacionadas a mudanças comportamentais, metabólicas (HAAS et al., 2008) e na locomoção (TOYOTA et al., 2002).

O receptor H4 é encontrado em maior quantidade em tecidos periféricos (HAAS et al., 2008), com forte participação em processos inflamatórios, alergias e doenças autoimunes (SADEK & STARK, 2016). Contudo, também foi relatada sua participação funcional no SNC, relacionando os receptores H4 com modulação de processos de nocicepção, ansiedade e memória (GALLEOTI et al., 2013), assim como da atividade locomotora, ansiedade e controle do apetite (SANNA et al., 2017).

Algumas drogas podem ser utilizadas para verificar a influência dos receptores histaminérgicos sobre o comportamento animal, como a Clorfeniramina (SERAFIM et al., 2012), Ranitidina (GIANLORENÇO et al., 2015), Tioperamida (ORSETTI et al., 2001), que atuam como antagonistas dos receptores histaminérgicos H1, H2 e H3, respectivamente, e VUF (GALLEOTI et al., 2013), que atua como agonista do receptor histaminérgico H4.

Há poucos estudos avaliando a participação do sistema histaminérgico nas funções do cerebelo. Segundo Li e colaboradores, os neurônios aferentes histaminérgicos têm papel

importante no circuito neuronal cerebelar (LI et al., 2014). Estudos já identificaram que as fibras histaminérgicas cerebelares modulam funções motoras, como equilíbrio e coordenação (SONG et al., 2006) e não motoras, como consolidação de memória emocional (GIANLORENÇO et al., 2013). Contudo, o mecanismo exato da ação da histamina no cerebelo ainda não é totalmente conhecido, e até o momento não foram realizados estudos que avaliem a influência do sistema histaminérgico cerebelar no desempenho locomotor e ansiedade em camundongos, assim como a participação dos receptores H1, H2, H3 e H4 nesses processos.

Em vista disso, o presente estudo teve como objetivo ampliar a o entendimento sobre a atuação do sistema histaminérgico no cerebelo, podendo correlacionar resultados sobre a ansiedade e atividade locomotora e promover elementos para compreender o processamento de informações dos circuitos cerebelares nas funções motoras e não motoras as quais se associa. Dessa forma, esse conhecimento pode auxiliar na compreensão de aspectos clínicos que por muitas vezes afetam diretamente pacientes com algum tipo de comprometimento cerebelar.

Como hipótese fundamental desse estudo, acreditamos que a mudança nos níveis histaminérgicos provocada pela microinjeção de histamina ou de componentes que atuem sobre seus receptores pode gerar alterações comportamentais relacionadas à função cerebelar, tais como o comportamento locomotor e exploratório e a ansiedade de camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo principal investigar os efeitos do sistema histaminérgico via vérmis cerebelar na atividade locomotora e ansiedade de camundongos, e estabelecer uma possível caracterização desse sistema no processamento de funções motoras e não motoras.

2.2. Objetivos específicos

- a. Avaliar os efeitos dose dependente da microinjeção no vérmis cerebelar de Histamina sobre atividade locomotora e ansiedade de camundongos;
- b. Avaliar o efeito dose dependente da microinjeção no vérmis cerebelar do antagonista de receptores H1, Clorfeniramina, sobre atividade locomotora e ansiedade de camundongos;
- c. Avaliar o efeito dose dependente da microinjeção no vérmis cerebelar do antagonista de receptores H2, Ranitidina, sobre atividade locomotora e ansiedade de camundongos;
- d. Avaliar o efeito dose dependente da microinjeção no vérmis cerebelar do antagonista de receptores H3, Tioperamida, sobre atividade locomotora e ansiedade de camundongos.
- e. Avaliar o efeito dose dependente da microinjeção no vérmis cerebelar do agonista de receptores H4, VUF-8430, sobre a atividade locomotora e ansiedade de camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e locais de pesquisa

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocolo n.4949260515). A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia, na Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

3.2. Amostra

Foram utilizados camundongos machos, Suíço Albino, experimentalmente ingênuos, com aproximadamente 21 dias no início dos experimentos e pesando entre 25 e 35g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (Figura 1). Os animais foram agrupados em 5 animais por caixa (31 × 20 × 13 cm) e ficaram em ambiente com ciclo de luz de 12 horas (com as luzes acesas às 07:00h), temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) controlados. Alimento e água ficaram disponíveis, até o início dos testes, os quais foram realizados na fase clara, no período entre 8 e 12 horas, a fim de reduzir a influência do ritmo circadiano nas respostas encontradas.



Figura 1: Camundongos machos da linhagem suíço albino.

3.3. Cirurgia e microinjeção

Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram pesados, anestesiados com injeção subcutânea de Cloridrato de Cetamina (100mg/Kg) e Xilazina (10 mg/kg), e alocados em seu grupo experimental de forma randomizada.

A cirurgia consistiu na implantação craniana de cânula-guia (25 gauge) de 7 mm de comprimento no vérmis cerebelar. 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 2). O mandril foi inserido no interior da cânula-guia para evitar problemas de obstrução ou contaminação por agentes externos. Logo após a cirurgia, os animais foram tratados com paracetamol infantil, adicionado à água por um período de três dias (MESSIER et al, 1999; NUNES-DE-SOUZA et al, 2008).

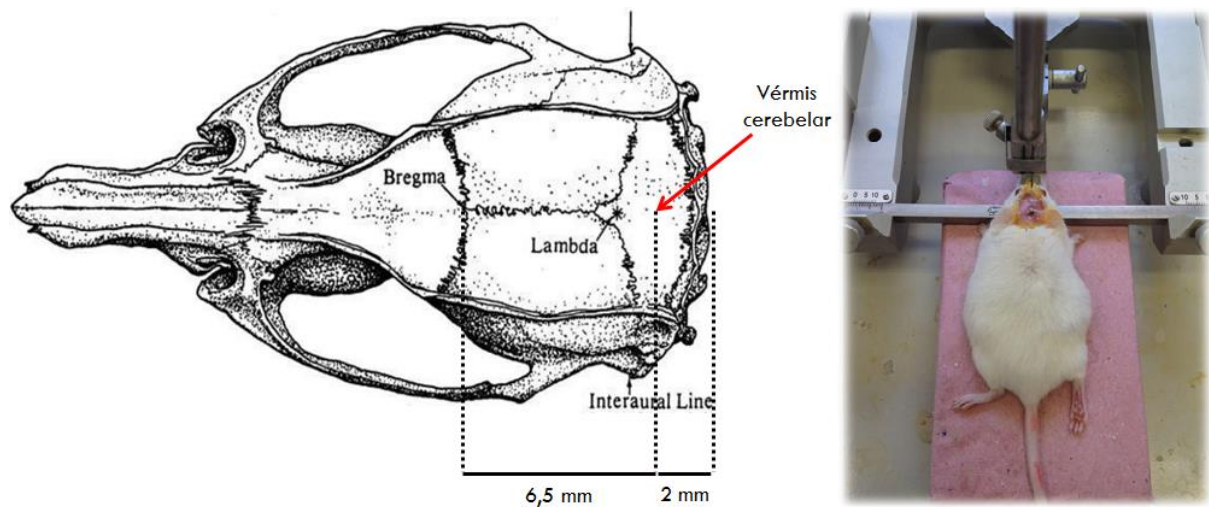


Figura 2: Figura adaptadas do atlas de Paxinos e Franklin (2001) mostrando a localização do vérmis cerebelar, e fotografia da implantação de cânula guia em procedimento cirúrgico.

O procedimento de microinjeção ocorreu após um período de três dias de recuperação dos animais. Inicialmente o animal era restrito manualmente pelo experimentador. Após a remoção dos mandris, 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 µl, que por sua vez era acoplada a uma

bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos Científicos Ltda, Brasil), programada para injetar 0,1 de solução durante 60 segundos. Após o término das injeções, a agulha permanecia por mais 60 segundos, e o movimento de uma bolha de ar no tubo de polietileno confirmava o fluxo da solução (CANTO-DE-SOUZA et al., 2002).

3.4. Tratamento farmacológico

Histamina (HA) nas doses de 0,54 nmol, 1,36 nmol, 2,72 nmol, 4,07 nmol e 6,8 nmol (GIANLORENÇO et al., 2011; GIANLORENÇO et al., 2013); Clorfeniramina (CPA) nas doses de 0,016 nmol, 0,052 nmol, 0,16 nmol (SERAFIM et al., 2012); Ranitidina (RA) nas doses de 0,57 nmol, 2,85 nmol e 5,7 nmol (GIANLORENÇO et al., 2014), Tioperamida (TIO) nas doses de 0,06 nmol, 0,3 nmol e 1,5 nmol (ORSETTI et al, 2001) e VUF-8430 (Amino ethyl carbammidothioic acid ester) nas doses de 0,15 nmol, 0,49 nmol e 1,48 nmol (GALLEOTI et al, 2013) foram microinjetadas em volume de 0,1 µl. Os animais dos grupos controles receberam solução salina. Todas as drogas foram dissolvidas 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 foi cegado para o conteúdo dos mesmos (droga ou solução salina) no momento do experimento e durante a análise das imagens gravadas.

3.5. Equipamentos e procedimentos

3.5.1. Campo aberto

Para avaliar o efeito das microinjeções sobre a atividade locomotora geral e exploratória do animal e sobre a ansiedade, foi utilizado o campo aberto. O campo aberto consiste de uma caixa quadrada de madeira (52,5 x 52,5 cm) com paredes laterais de 27,5 cm e o solo dividido em 25 quadrantes (10 x 10 cm), sem barreira física entre eles. Este teste permite analisar em um mesmo modelo os comportamentos de ansiedade e desempenho locomotor de camundongos (WILSON et al., 1976; PRUT & BELZUNG, 2003). Entre as possíveis variáveis estudadas encontram-se a distância percorrida e o número de cruzamentos, utilizadas para avaliação da atividade geral e locomoção (MEER & RABER, 2005; MILLER

et al., 2010), e o tempo de exploração em áreas centrais ou periféricas do campo aberto, utilizada para inferir ansiedade (MILLER et al., 2010) (Figura 3). De acordo com Lee e colaboradores (1986), inicialmente, os animais tendem a permanecer mais tempo em áreas periféricas, com aumento gradual da locomoção central após a familiarização com o meio.

Cinco minutos após o procedimento de microinjeção, cada animal foi colocado cuidadosamente no centro do campo aberto e o teste teve a duração de 5 minutos (Figura 4). Sua atividade locomotora e exploratória foi verificada através do registro do número de cruzamentos e número de levantamentos do animal sobre as patas traseiras, respectivamente. A medida do comportamento de ansiedade foi feita através do tempo de permanência na área central da arena. Além disso, alterações comportamentais como imobilidade durante o teste foram registradas. Após cada sessão, o chão e as paredes do aparelho foram limpos (etanol 5%) e secos.

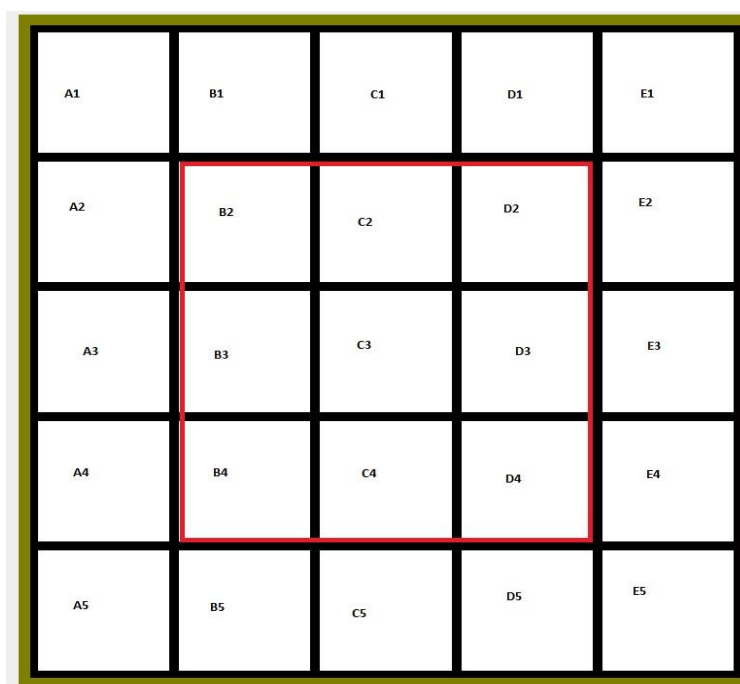


Figura 3: Representação da análise e do campo aberto (área central demarcada em vermelho).

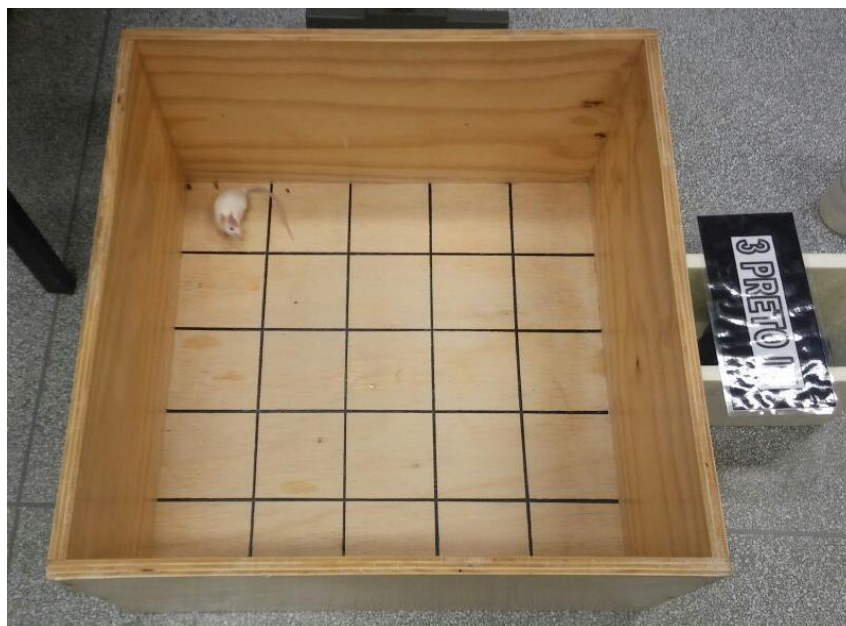


Figura 4: Experimento em campo aberto

3.6. Grupos experimentais

O estudo foi composto de cinco experimentos. Os cinco experimentos foram realizados em diferentes momentos, porém durante a realização de um mesmo experimento, cada sessão de teste contemplou animais representantes de todos os grupos experimentais.

Experimento 1

Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou histamina (0,54; 1,36; 2,72; 4,07 e 6,8 nmol / 0,1 µl) cinco minutos antes de serem submetidos ao campo aberto (Tabela 1).

Tabela 1: Experimento 1.

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	Campo Aberto	Salina	-----	10
HA	Campo Aberto	Histamina	0,54 nmol / 0,1 µl	10
HA	Campo Aberto	Histamina	1,36 nmol / 0,1 µl	9
HA	Campo Aberto	Histamina	2,72 nmol / 0,1 µl	10
HA	Campo Aberto	Histamina	4,07 nmol / 0,1 µl	8
HA	Campo Aberto	Histamina	6,8 nmol / 0,1 µl	10

Experimento 2

Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou Clorfeniramina (0,016; 0,052 e 0,16 nmol / 0,1 µl) cinco minutos antes de serem submetidos ao campo aberto (Tabela 2).

Tabela 2: Experimento 2.

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	Campo Aberto	Salina	-----	12
CPA	Campo Aberto	Clorfeniramina	0,016 nmol / 0,1 µl	9
CPA	Campo Aberto	Clorfeniramina	0,052 nmol / 0,1 µl	12
CPA	Campo Aberto	Clorfeniramina	0,16 nmol / 0,1 µl	11

Experimento 3

Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou Ranitidina (1,42; 2,85 e 5,7 nmol / 0,1 µl) cinco minutos antes de serem submetidos ao campo aberto (Tabela 3).

Tabela 3: Experimento 3.

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	Campo Aberto	Salina	-----	13
RA	Campo Aberto	Ranitidina	1,42 nmol / 0,1 µl	7
RA	Campo Aberto	Ranitidina	2,85 nmol / 0,1 µl	12
RA	Campo Aberto	Ranitidina	5,7 nmol / 0,1 µl	6

Experimento 4

Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou Tioperamida (0,06; 0,3 e 1,5 nmol / 0,1 µl) cinco minutos antes de serem submetidos ao campo aberto (Tabela 4).

Tabela 4: Experimento 4.

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	Campo Aberto	Salina	-----	7
TIO	Campo Aberto	Tioperamida	0,06 nmol / 0,1 µl	10
TIO	Campo Aberto	Tioperamida	0,3 nmol / 0,1 µl	9
TIO	Campo Aberto	Tioperamida	1,5 nmol / 0,1 µl	9

Experimento 5

Os animais receberam injeção intravérmis cerebelar de salina (0,9%) ou VUF (0,15; 0,49 e 1,48 nmol / 0,1 µl) cinco minutos antes de serem submetidos ao campo aberto (Tabela 5).

Tabela 5: Experimento 5.

Grupos	Teste	Tratamento	Dose	N
SAL	Campo Aberto	Salina	-----	7
VUF	Campo Aberto	VUF	0,15 nmol / 0,1 µl	10
VUF	Campo Aberto	VUF	0,49 nmol / 0,1 µl	9
VUF	Campo Aberto	VUF	1,48 nmol / 0,1 µl	8

4. ANÁLISE DE DADOS

4.3. Análise histológica

Após o término do experimento, os animais receberam microinjeção de 0,1 µl de uma solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o procedimento descrito para a injeção das drogas. Após receberem uma dose profunda de anestesia com solução de Cloridrato de Cetamina e Xilasina, os animais sofreram deslocamento cervical, decapitação e seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de 10% de formalina.

Posteriormente, os encéfalos foram seccionados coronalmente na espessura de 50 micrômetros (µm) ao longo do trajeto da cânula, utilizando um micrótomo de lâmina vibratória (Leica VT 1200S). As secções foram inspecionadas através de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção. Quando a injeção não atingiu o vérmis cerebelar, o animal foi excluído do estudo.

4.4. Análise estatística

A homogeneidade dos dados foi verificada através do teste de Levene. Os dados comportamentais foram analisados através de análise de variância de uma via (ANOVA) (BAILEY & CRAWLEY, 2009) e o *post hoc* de Duncan foi aplicado.

A análise foi realizada utilizando o *software* Statistica 10, Copyright© StatSoft. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Foram utilizados no total 208 camundongos nos experimentos com o modelo de Campo aberto, e o índice de acerto de acordo com a análise histológica foi de cerca de 90 % (Figura 4).

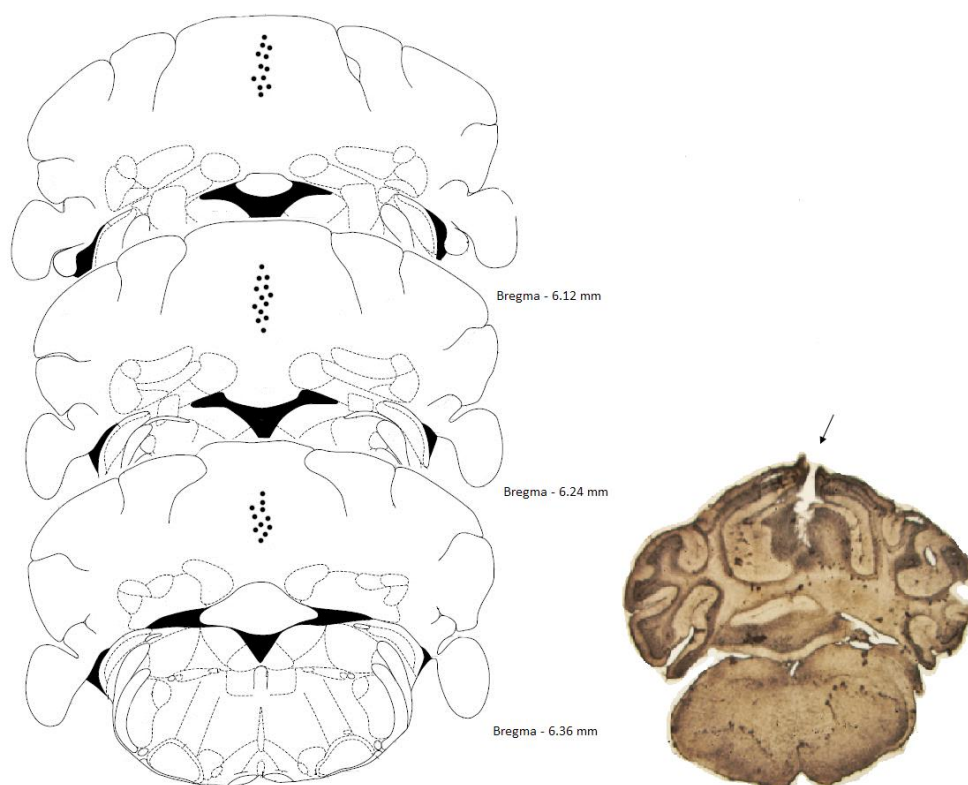


Figura 5: Figuras adaptadas do atlas de Paxinos e Franklin (2001), implantação da cânula guia e fotomicrografia do cerebelo de camundongo mostrando trajeto da cânula no vérmis cerebelar.

5.3. Experimento 1 – Efeitos da Histamina microinjetada no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto

A ANOVA de uma via não indicou diferença significativa no número total de cruzamentos entre os grupos ($F_{5, 52} = 1,19, p = 0,33$) (Figura 6). Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos microinjetados com histamina e salina para tempo gasto na área central ($F_{5, 52} = 1,75, p = 0,19$) (Figura 7) e número de levantamentos ($F_{5, 52} = 1,57, p = 0,19$) (Figura 8). Nenhum animal apresentou comportamento marcante de imobilidade.

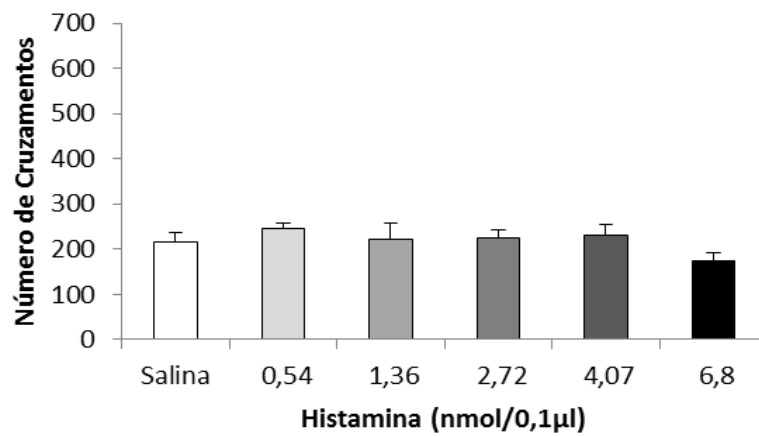


Figura 3: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de histamina em diferentes doses.

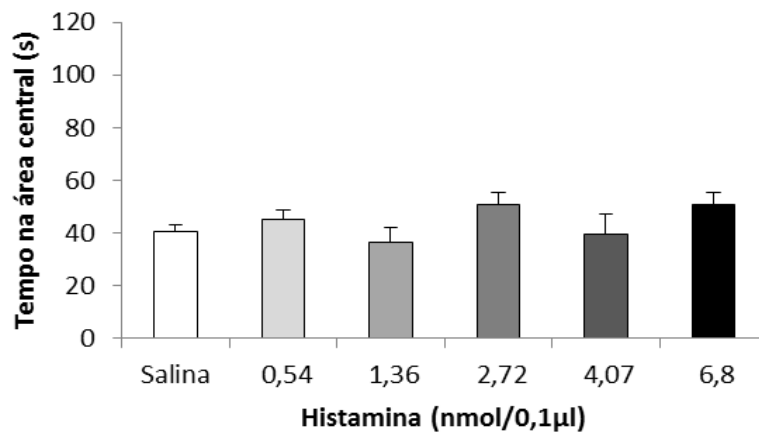


Figura 4: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de histamina em diferentes doses.

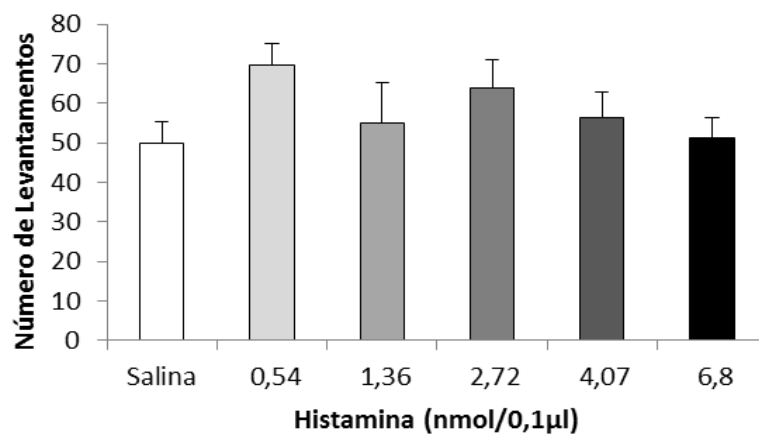


Figura 5: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de histamina em diferentes doses.

5.4. Experimento 2 – Efeitos da Clorfeniramina microinjetada no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto

A análise estatística (ANOVA uma via) indicou diferença significativa nas variáveis número total de cruzamentos ($F_{3, 41} = 2,90$, $p < 0,05$) (Figura 9), tempo gasto na área central ($F_{3, 41} = 9,34$, $p < 0,0001$) (Figura 10), e número de levantamentos ($F_{3, 41} = 5,83$, $p = 0,003$) (Figura 11). O teste *post hoc* de Duncan revelou que no número total de cruzamentos, houve diferença entre os grupos salina e clorfeniramina 0,16 nmol, e entre os grupos clorfeniramina 0,16 nmol e 0,052 nmol ($p < 0,05$). Para o tempo gasto na área central, o teste de comparações múltiplas indicou que os grupos clorfeniramina 0,016 e 0,16 nmol foram estatisticamente diferentes do grupo salina ($p < 0,01$). Em relação ao número de levantamentos, houve diferença entre os animais salina e os que receberam clorfeniramina na dose de 0,16 nmol ($p < 0,001$). Nenhum animal apresentou comportamento marcante de imobilidade. Esses dados demonstram que os animais que foram microinjetados com clorfeniramina na dose de 0,16 nmol obtiveram um maior número de cruzamentos, maior tempo no centro e maior número de comportamentos de levantar, o que indica que esses animais apresentaram-se mais ativos em todo o aparato, podendo inferir maior atividade locomotora e exploratória geral quando comparados ao grupo controle.

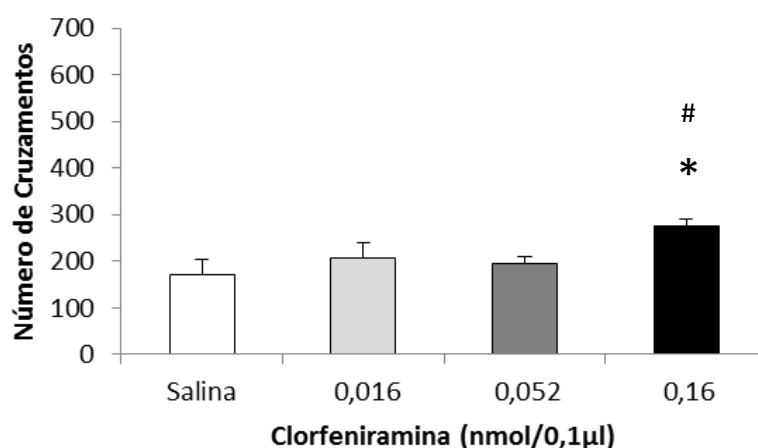


Figura 6: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de clorfeniramina em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CPA 0,052 nmol, teste de Duncan.

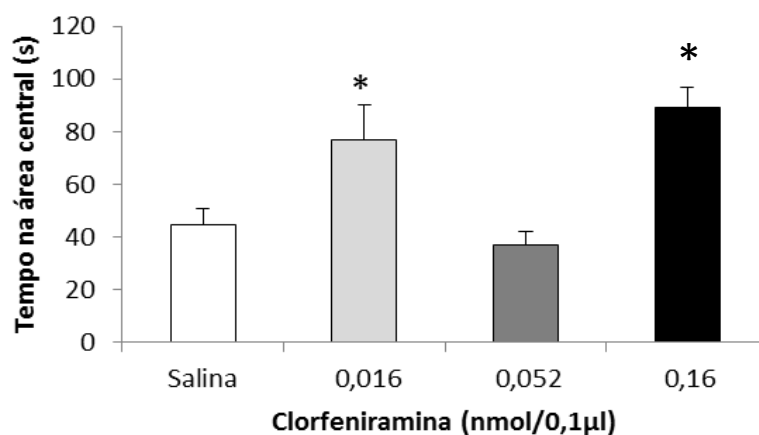


Figura 7: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de clorfeniramina em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e grupo 0,052, teste de Duncan.

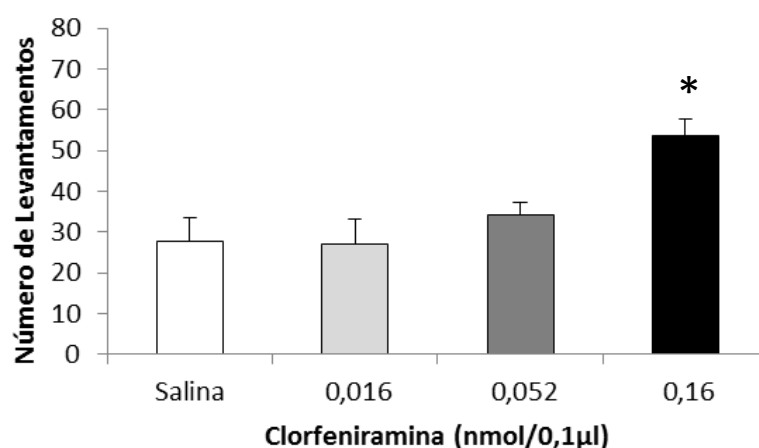


Figura 8: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de clorfeniramina em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação aos outros grupos, teste de Duncan.

5.5. Experimento 3 – Efeitos da Ranitidina microinjetada no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto

Não houve diferença significativa no número total de cruzamentos entre os grupos salina e Ranitidina nas diferentes doses ($F_{3, 32} = 2,02$, $p = 0,13$) (Figura 12). Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos para tempo gasto na área central ($F_{3, 32} = 0,12$, $p = 0,95$) (Figura 13), número de levantamentos ($F_{3, 32} = 0,72$, $p = 0,55$) (Figura 14). Nenhum animal apresentou comportamento marcante de imobilidade.

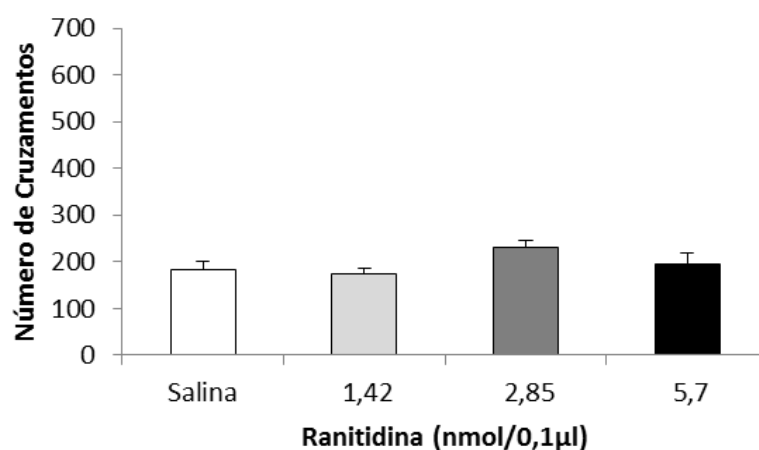


Figura 9: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de ranitidina em diferentes doses.

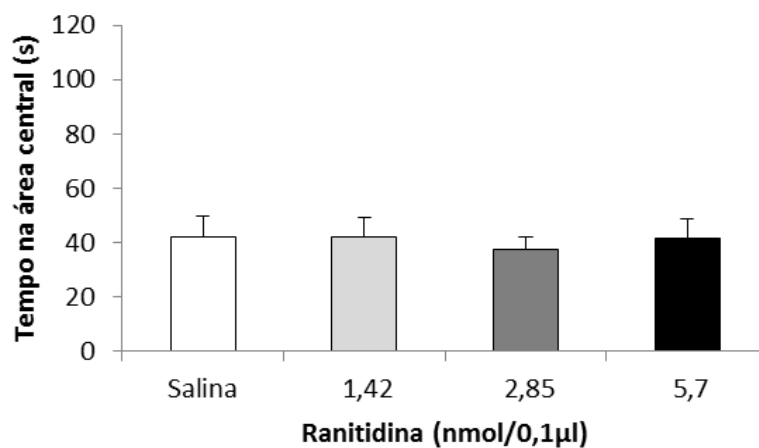


Figura 10: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de ranitidina em diferentes doses.

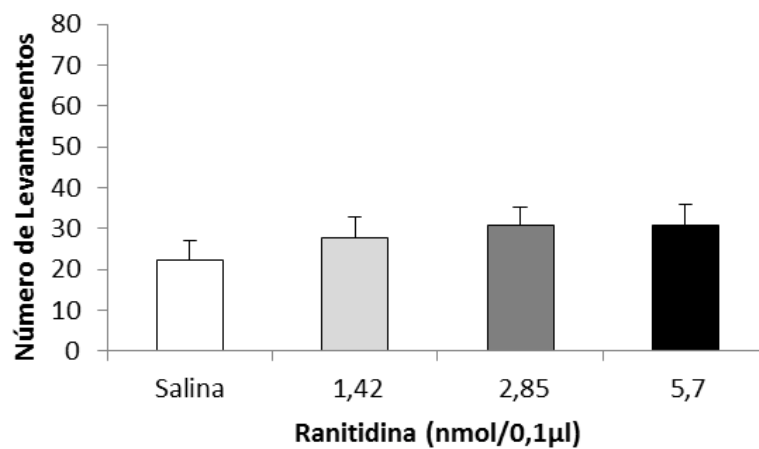


Figura 11: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de ranitidina em diferentes doses.

5.6. Experimento 4 – Efeitos da Tioperamida microinjetada no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto

A análise estatística (ANOVA uma via) não mostrou diferença significativa para as variáveis número total de cruzamentos ($F_{3, 31} = 0,37, p = 0,78$) (Figura 15), tempo gasto na área central ($F_{3, 31} = 1,91, p = 0,15$) (Figura 16) e número de levantamentos ($F_{3, 31} = 0,29, p = 0,83$) (Figura 17). Nenhum animal apresentou comportamento marcante de imobilidade. Esses dados demonstram que os animais que a microinjeção com tioperamida nas doses de 0,06nmol, 0,3nmol e 1,5nmol não provocou nenhum efeito sobre o comportamento locomotor, exploratório e ansiedade dos animais, quando comparado ao grupo controle.

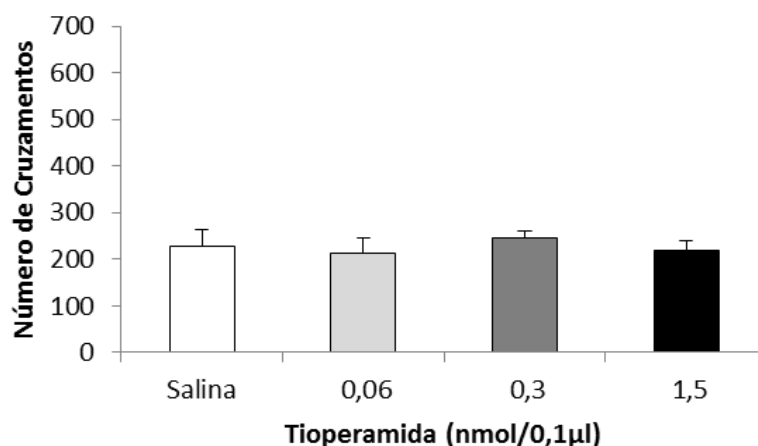


Figura 12: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de tioperamida em diferentes doses.

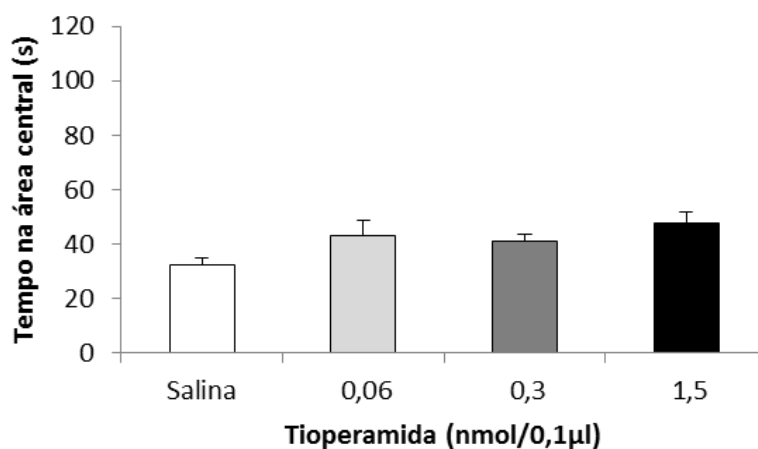


Figura 13: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de tioperamida em diferentes doses.

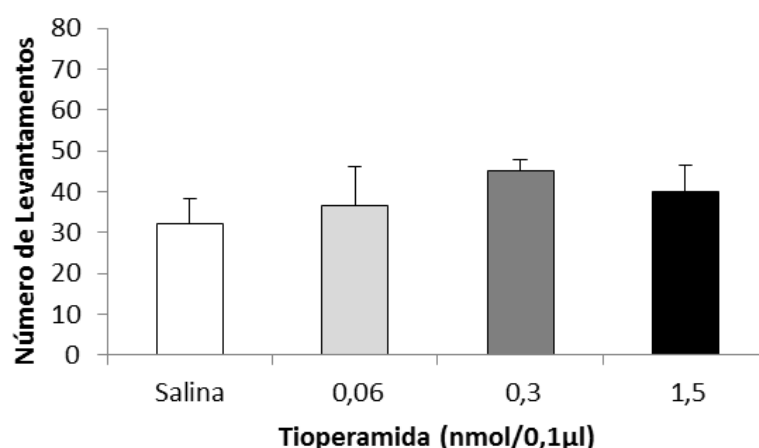


Figura 14: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de tioperamida em diferentes doses.

5.7. Experimento 5 – Efeitos do VUF microinjetado no vérmis cerebelar de camundongos expostos ao Campo aberto

A análise estatística (ANOVA uma via) indicou diferença significativa nas variáveis número total de cruzamentos ($F_{3, 30} = 13,82, p < 0,0001$) (Figura 18), tempo gasto na área central ($F_{3, 30} = 5,16, p < 0,006$) (Figura 19), e número de levantamentos ($F_{3, 30} = 5,33, p < 0,005$) (Figura 20). O teste *post hoc* de Duncan revelou que no número de cruzamentos total, houve diferença entre o grupo VUF 1,48 nmol e os grupos salina, VUF 0,15 nmol e VUF 0,49 nmol ($p < 0,0001$). Para o tempo gasto na área central, o teste de comparações múltiplas indicou que os grupos VUF 1,48 nmol foi estatisticamente diferentes dos grupos salina ($p < 0,003$), VUF 0,15 nmol ($p < 0,004$) e VUF 0,49 nmol ($p < 0,02$). Em relação ao número de levantamentos, o grupo que recebeu VUF na dose de 0,49 nmol foi estatisticamente diferente do grupo salina ($p < 0,02$) e VUF 0,15 nmol ($p < 0,003$). Nenhum animal apresentou comportamento marcante de imobilidade.

Esses dados demonstram que os animais que foram microinjetados com as doses mais altas de VUF obtiveram um maior número de cruzamentos, maior tempo no centro e maior número de comportamentos de levantar, o que indica que esses animais apresentaram-se mais ativos em todo o aparato, podendo inferir maior atividade locomotora e exploratória geral quando comparados ao grupo controle.

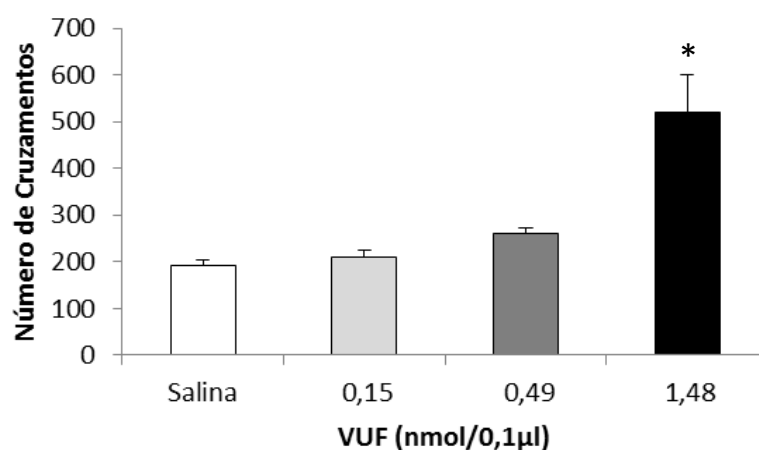


Figura 15: Médias e erro padrão da média para número total de cruzamentos no campo aberto após microinjeção de VUF em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação aos grupos salina, 0,15 nmol e 0,49 nmol, teste de Duncan.

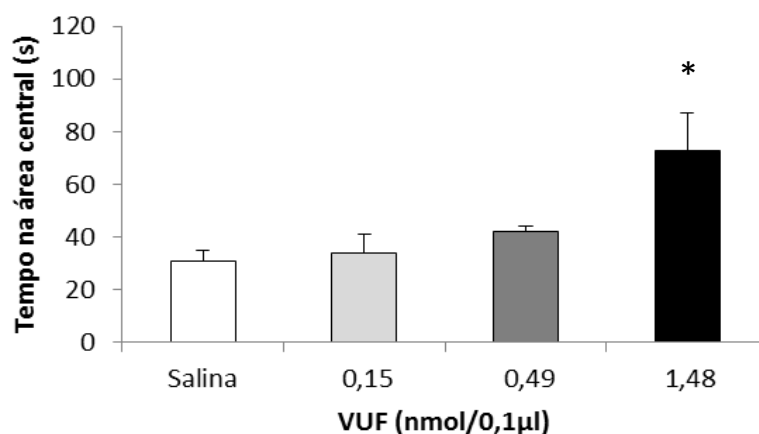


Figura 16: Médias e erro padrão da média para tempo em segundos na área central do campo aberto após microinjeção de VUF em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação aos grupos salina e 0,15 nmol, teste de Duncan.

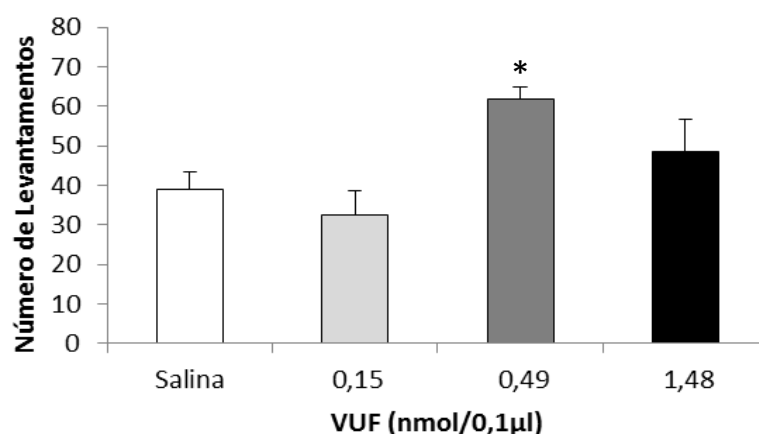


Figura 17: Médias e erro padrão da média para número de levantamentos no campo aberto após microinjeção de VUF em diferentes doses, * $p < 0,05$ em relação aos grupos salina e 0,15 nmol, teste de Duncan.

Tabela 6: Resultados dos experimentos. Os dados estão apresentados em média \pm SEM. Os animais receberam microinjeção das seguintes drogas: Histamina (salina, 0.54, 1.36, 2.72, 4.07 e 6.8 nmol/0,1 μ l); Clorfeniramina (salina, 0.016, 0.052, 0.16 nmol/0,1 μ l); Ranitidina (salina, 0.57, 2.85, 5.7 nmol/0,1 μ l); Tioperamida (salina, 0.06, 0.3, 1.5 nmol/0,1 μ l) e VUF (salina, 0.15, 0.49, 1.48 nmol/0,1 μ l) e cinco minutos depois, foram expostos ao teste em campo aberto. As variáveis mensuradas foram número de cruzamentos, número de levantamentos e tempo de permanência na área central.

	Dose (nmol/0,1 μ l)	Número de Cruzamentos	Número de Levantamentos	Tempo na área central
Histamina	Salina	216,30 \pm 19,36	49,8 \pm 5,63	40,57 \pm 2,69
	0,54	246,6 \pm 10,17	69,7 \pm 5,27	45,40 \pm 3,32
	1,36	220,44 \pm 35,56	55 \pm 9,64	36,3 \pm 5,54
	2,72	225,4 \pm 17,75	63,7 \pm 7,10	50,83 \pm 4,43
	4,07	230,38 \pm 21,84	56,5 \pm 6,01	36,97 \pm 7,29
	6,8	175,4 \pm 16,72	51,3 \pm 4,98	50,99 \pm 4,24
Clorfeniramina	Salina	171,67 \pm 30,82	27,87 \pm 5,64	41,5 \pm 6,43
	0,016	206,1 \pm 33,87	27 \pm 6,13	77,1 \pm 12,95
	0,052	195,09 \pm 16,11	34,08 \pm 3,17	37,24 \pm 5,09
	0,16	275 \pm 14,29	53,8 \pm 3,76	89,20 \pm 7,39
Ranitidina	Salina	184 \pm 15,49	22,38 \pm 7,1	41,92 \pm 8,02
	0,57	139,11 \pm 25,18	21,89 \pm 6,77	66,2 \pm 30,06
	2,85	214,15 \pm 22,32	29,08 \pm 6,74	46,91 \pm 4,5
	5,7	194,67 \pm 22,59	41,53 \pm 6,52	39,14 \pm 6,41
Tioperamida	Salina	206,56 \pm 30,10	32,67 \pm 4,74	27,78 \pm 3,62
	0,06	214,10 \pm 29,84	36,7 \pm 8,85	43,28 \pm 5,28
	0,3	244,57 \pm 16,13	45,14 \pm 2,50	40,89 \pm 2,43
	1,5	220,11 \pm 18,26	39,89 \pm 6,66	47,72 \pm 4,15
VUF	Salina	207,38 \pm 18,55	37,50 \pm 3,96	27,51 \pm 4,88
	0,15	209,5 \pm 16,06	32,40 \pm 6,12	33,98 \pm 7,14
	0,49	259,22 \pm 14,58	61,78 \pm 3,23	42,34 \pm 1,98
	1,48	520,75 \pm 80,71	48,63 \pm 7,93	72,63 \pm 14,3

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi o primeiro estudo a associar o sistema histaminérgico, através da histamina e todos os seus receptores, com a modulação do comportamento locomotor e ansiedade através do teste de campo aberto. Esse estudo segue a linha de nosso grupo de pesquisa, que dá especial atenção ao aspecto não motor do cerebelo.

Os resultados obtidos nos experimentos demonstraram, em síntese, que as microinjeções intravérmis de histamina (experimento 1), ranitidina (experimento 3) e tioperamida (experimento 4) não apresentaram efeitos comportamentais no teste de campo aberto nas doses utilizadas. Entretanto, as microinjeções de clorfeniramina (experimento 2) e VUF (experimento 4) mostraram modular o comportamento locomotor e ansiedade de camundongos no campo aberto.

Os resultados do experimento 1 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e as doses de histamina administradas no comportamento locomotor e ansiedade de camundongos, uma vez que os grupos apresentaram comportamentos semelhantes em relação ao número de cruzamentos e número de levantamentos sobre as patas traseiras, sugerindo que não houve efeito da histamina sobre o comportamento locomotor e exploratório geral dos camundongos, assim como não foram registradas diferenças no tempo de permanência na área central do aparato, tornando possível inferir que a histamina intravérmis cerebelar nas doses utilizadas não influenciou o estado de ansiedade dos animais.

Esse resultado corrobora estudos prévios que não encontraram diferenças no comportamento locomotor e exploratório no campo aberto, após microinjeção de histamina no núcleo interpósito cerebelar de ratos (SONG et al., 2006), e 24 horas após microinjeção de histamina intravérmis cerebelar em camundongos (SILVA-MARQUES et al., 2016).

Em relação aos efeitos da histamina sobre funções não motoras, estudos com animais expostos ao labirinto em cruz elevado relataram um efeito ansiolítico da histamina no hipocampo ventral (YEUNG et al., 2016) e amígdala (DAHER et al., 2015). Além disso, Silva-Marques e colaboradores mostraram um efeito facilitatório da histamina cerebelar sobre a memória emocional de camundongos expostos ao teste de esquiva inibitória no labirinto em T elevado (SILVA-MARQUES et al., 2016). Contudo, não foram encontrados outros estudos que avaliassem os efeitos da histamina cerebelar sobre o estado de ansiedade.

Acreditamos que a falta de efeitos comportamentais em animais que receberam microinjeções de histamina no vérmis cerebelar não exclui a hipótese inicial, de que as funções cerebelares podem ser moduladas pelo sistema histaminérgico. Portanto, os seguintes experimentos podem oferecer informação mais detalhada sobre as vias histaminérgicas utilizadas nessas funções.

No experimento 2, feito com Clorfeniramina, um antagonista do receptor H1 histaminérgico em diferentes doses, foram encontradas diferenças significativas para as variáveis número total de cruzamentos, número de levantamentos sobre as patas traseiras e tempo gasto na área central do campo aberto, tornando possível inferir que a clorfeniramina intravérmis cerebelar aumentou significativamente a atividade locomotora e exploratória dos animais quando comparados ao grupo controle.

De acordo com diversos estudos, a CPA, geralmente usada no tratamento de processos alérgicos (SIMONS & SIMONS, 1994), tem efeitos adversos no sistema nervoso central, como sonolência, diminuição do estado de alerta e tempo de reação (VAN RUITENBEEK et al., 2009; TOKUNAGA et al., 2009). Tashiro e colaboradores (2008) mostraram que a clorfeniramina leva a uma supressão da cognição visuo-espacial e coordenação visual-motora durante atividade de condução de um carro em homens jovens, entre 20 e 25 anos de idade. No mesmo estudo, a análise do fluxo sanguíneo mostrou que houve uma diminuição do fluxo sanguíneo nos hemisférios cerebelares, e um aumento do fluxo no vérmis cerebelar, quando se comparava sujeitos que receberam a clorfeniramina com o grupo controle (TASHIRO et al., 2008), o que pode sugerir uma ação específica da clorfeniramina sobre o vérmis cerebelar.

Em contraponto, em estudo da ação de microinjeção intracerebroventricular crônica de clorfeniramina em ratos idosos, evidenciou-se que essa droga provocou efeito ansiolítico nos testes de campo aberto, sem alteração dos níveis de atividade locomotora (HASENÖHRL et al., 1999).

Dentro de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da clorfeniramina intravérmis cerebelar em comportamentos locomotores e de ansiedade em camundongos. Acreditamos que a inativação dos receptores H1 promovida pela CPA influencia na modulação do sistema histaminérgico. Uma potencial explicação para esse resultado é que a modulação afeta o comportamento da exploração versus proteção, aumentando o componente exploratório ou reduzindo a interpretação do estímulo aversivo representado pelo ambiente do campo aberto.

Como mecanismo alternativo, salientamos que a CPA, além de atuar como antagonista do receptor histaminérgico H1, apresenta também afinidade com outros sistemas de neurotransmissão, como o sistema colinérgico (KUBO et al., 1987; YASUDA et al., 1999), serotoninérgico (KARAMANAKOS et al., 2004) e dopaminérgico (ESCOBEDO-AVILA et al., 2014). No que diz respeito à interação da clorfeniramina e o sistema dopaminérgico, estudos mostraram que a injeção intracerebroventricular de clorfeniramina inibe os efeitos de catalepsia provocados pelo haloperidol, um antipsicótico bloqueador do receptor dopaminérgico D2 (JAIN et al, 2015), que a clorfeniramina exerce um efeito antidepressivo no teste de suspensão pela cauda pela ativação de receptores dopaminérgicos D1 e adrenérgicos (HIRANO et al, 2007) e que administração sistêmica de clorfeniramina produziu aumento dose dependente dos níveis de dopamina no núcleo accumbens e neocórtex em ratos, sugerindo um papel modulatório do sistema histaminérgico sobre a atividade dopaminérgica (DRINGENBERG et al., 1998). Sabendo da interação de característica excitatória da clorfeniramina sobre o sistema dopaminérgico, sugerimos que os mecanismos desencadeadores dos resultados observados podem estar relacionados a esse sistema de neurotransmissão. Contudo, são necessários mais estudos para esclarecimento do papel da clorfeniramina nessas funções.

O experimento 3, feito com o antagonista do receptor histaminérgico H2, ranitidina, não mostrou diferenças significativas no seu comportamento locomotor e ansiedade para as variáveis observadas entre os grupos que receberam diferentes doses da droga e o grupo controle.

Não existem estudos anteriores que verifiquem a ação dos receptores histaminérgicos H2 intravérmis cerebelar no comportamento locomotor e ansiedade de camundongos. Com o objetivo de verificar a participação desses receptores através da ranitidina intravérmis cerebelar na consolidação da memória e esquila inibitória de camundongos também não houve efeitos significativos quando comparados ao grupo controle (GIANLORENÇO et al., 2013).

Outros estudos verificaram que a microinjeção de ranitidina nos núcleos cerebelares interpósito (SONG et al., 2006) e fastigial (HE et al., 2012) levou à alterações no controle motor e equilíbrio de animais, sugerindo que os receptores H2 dessas estruturas modulam o controle motor cerebelar.

Em relação a seu efeito não motor, Zarrindast e colaboradores verificaram os efeitos da ranitidina microinjetada no núcleo accumbens, e mostraram que essa droga apresenta

efeitos ansiolíticos em teste de labirinto em cruz elevado, assim como acontece após a microinjeção de histamina nessa estrutura (ZARRINDAST et al., 2010).

O resultado desse estudo, associado a resultados de estudos prévios, enfatizam a importância dos receptores H2 na modulação de funções no sistema nervoso central, porém podem ser indicativo que esses receptores não têm participação especificamente em funções motoras e não motoras relacionadas ao vérmis cerebelar.

No que diz respeito ao experimento 4, feito com Tioperamida, um antagonista dos receptores histaminérgicos H3, não foram encontradas diferenças significativas para todas as variáveis analisadas.

Estudos prévios mostram que os receptores histaminérgicos H3 atuam no aumento de liberação de histamina no sistema nervoso central (IMAZUMI & ONODERA, 1993; MOHSEN et al., 2014), e que o bloqueio desses receptores através da tioperamida leva a um aumento da atividade locomotora (SAKAI et al., 1991). Visto que a histamina intravérmis cerebelar (experimento 1) não mostrou ter efeitos sobre o comportamento locomotor e exploratório de camundongos, era esperado que os efeitos excitatórios da tioperamida sobre a liberação de histamina não provocasse alterações no teste em campo aberto, como observado no presente estudo.

Sobre os efeitos da tioperamida em funções não motoras, um estudo usando o labirinto em cruz elevado e o teste de nado forçado, mostrou uma possível atividade antidepressiva e nenhuma influência sobre a atividade locomotora e ansiedade dos animais (PÉREZ-GARCÍA et al., 1999). Em contraponto, outro estudo mensurou os efeitos da tioperamida injetada no ventrículo lateral através do teste em caixa clara e escura, e mostrou aumento no nível de ansiedade dos animais em comparação ao grupo controle (MALMBERG-AIELLO et al., 2002). Os resultados desses estudos prévios divergem do encontrado no presente estudo, que mostrou que não há qualquer efeito da tioperamida sobre comportamentos de ansiedade no teste de campo aberto.

Por fim, o experimento 5, feito com VUF, um agonista dos receptores histaminérgicos H4, mostrou que os animais microinjetados com as doses mais altas de VUF apresentaram um aumento na atividade locomotora e exploratória, visto que houve de significativo aumento no número de quadrantes percorridos no campo aberto e do número de levantamentos do animal sobre as patas traseiras. O tempo de permanência do animal na área central da arena também aumentou substancialmente, indicando influência no componente de ansiedade sobre a atividade locomotora geral do animal no aparato.

Estudos mais antigos descreviam os receptores histaminérgicos H4 como exclusivamente periféricos (HAAS et al., 2008), e atualmente existem poucos estudos que relatam a presença desses receptores no sistema nervoso central (FERNANDES et al., 2017; SANNA et al., 2017; GALLEOTTI et al., 2013). Entretanto, uma recente revisão de literatura aponta que a expressão neuronal de receptores H4 ainda é duvidosa e necessita de melhor investigação (SCHNEIDER & SEIFERT, 2016).

Poucos estudos investigaram a participação dos receptores H4 no sistema nervoso central utilizando o VUF. Galleotti e colaboradores (2013) demonstraram, entre outros efeitos, a ação ansiolítica do VUF no teste em caixa clara e escura, sem alterar a atividade locomotora e exploratória a partir de dados do *hole board test* (GALLEOTTI et al., 2013) e, um recente estudo feito em nosso laboratório mostrou que a dose mais alta de VUF de 1,48 nmol microinjetada no vérmis cerebelar prejudicou a aprendizagem e memória no labirinto em cruz elevado e esquiva inibitória (FERNANDES et al., 2017).

Diferente dos receptores H1, H2 e H3, os estudos a respeito dos receptores H4 são escassos, e sua ação não é inteiramente compreendida. Apesar de existirem relatos de afinidade do VUF também com os receptores H3 (LIM et al., 2009), o experimento 4 feito com antagonista do receptor H3 tioperamida não provocou efeitos sobre a função motora e não motora dos camundongos em campo aberto. Acreditamos que a modulação provocada pelo VUF evidencia a participação dos receptores H4 no sistema nervoso central, seguindo o mesmo princípio de ação sobre o comportamento de exploração versus proteção dos animais.

Neste estudo, verificamos a possível modulação do sistema histaminérgico no comportamento locomotor e ansiedade no teste de campo aberto, através da administração da histamina e dos antagonistas dos receptores desse sistema. Além disso, todas as respostas observadas foram medidas comparando os efeitos dose-dependentes dessas substâncias. Estudos de diferentes modelos encontraram diferenças entre os grupos utilizando doses similares de histamina (GIANLORENÇO et al., 2013; SILVA-MARQUES et al., 2016), clorfeniramina (SERAFIM et al., 2012), ranitidina (GIANLORENÇO et al., 2015), tioperamida (ORSETTI et al., 2001) e VUF (FERNANDES et al., 2017). Esses fatores demonstram uma metodologia robusta e a falta de diferenças significativas nos experimentos 1, 3 e 4 pode indicar que a combinação específica da administração intravérmis cerebelar e o modelo de campo aberto não provocaram nenhum efeito nos comportamentos de camundongos nas doses utilizadas.

Com base nos resultados deste estudo e de estudos anteriores, acreditamos que o cerebelo modula os sistemas que interpretam a intensidade do componente aversivo, em vias de permitir ou reduzir o comportamento exploratório. O primeiro trabalho do nosso grupo com o sistema histaminérgico cerebelar em peixes (GARÇÃO et al., 2011) onde verificou-se que os animais que tiveram ablação cerebelar apresentavam uma maior latência no teste de esQUIVA inibitória em peixes, quando comparados ao grupo controle. E que o grupo com ablação cerebelar tratado com CPA manteve a alta latência quando comparados aos demais grupos após 8 sessões de treinamento da atividade. A hipótese que foi sugerida nesse momento era que o sistema histaminérgico atuava na modulação dos comportamentos de exploração versus proteção.

Acreditamos que o aumento da locomoção dos animais que receberam o antagonista de histamina H1 clorfeniramina e o agonista do receptor H4 VUF observado no presente estudo pode ser interpretado como uma diminuição do estímulo aversivo proporcionado pelo campo aberto, provocando efeito ansiolítico sobre os animais e permitindo o aumento do comportamento locomotor e exploratório, o que acreditamos ser um efeito modulador nessa condição.

7. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados deste estudo sugerem que a clorfeniramina e VUF modulam a ansiedade e os comportamentos locomotores e exploratórios de camundongos submetidos ao teste de campo aberto. Além disso, a histamina, a ranitidina e a tioperamida, nas doses utilizadas, não apresentaram efeitos comportamentais neste teste.

8. REFERÊNCIAS

ADAMAZEK, M; D'AGATA, FD; FERRUCCI, F, et al. Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. **Cerebellum**, 2017, 16, 552:576.

ALMEIDA, D.O., FERREIRA, H.S., PEREIRA, L.B., FREGONEZE, J.B. Hypertensive responses to stress: The role of histaminergic H1 and H2 receptors in the medial amygdala. **Physiology & Behavior**, 2015, 144, 95:102.

BAILEY, K.R., CRAWLEY, J.N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: BUCCAFUSCO, J.J. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd Edition. Medical College of Georgia, Augusta: **Frontiers in Neuroscience**, 2009.

BUTTS, T., GREEN, M.J., WINGATE, R.J.T. Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'. **Development**, 2014, 141, 4031:4041.

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**, 2002, 928, 50:59.

CHAN, H.H., COOPERRIDER, J.L., PARK, H., WATHEN, C.A., GALE, J.T., BAKER, K.B., MACHADO, A.G. Crossed Cerebellar Atrophy of the Lateral Cerebellar Nucleus in na Endothelin-1-Induced, Rodent Model of Ischemic Stroke. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2017, doi: 10.3389/fnagi.2017.00010.

CONTRERAS, M., RIVEROS, M.E., QUISPE, M., SÁNCHEZ, C., PERDOMO, G., TORREALBA, F., VALDÉS, J.L. The Histaminergic Tuberomamillary Nucleus Is Involved In Appetite For Sex, Water And Amphetamine. **PLOS One**, 2016, 11(2): e0148484. doi:10.1371/journal.pone.0148484.

DAHER, F.P., MATTIOLI, R. Impairment in the aversive memory of mice in the inhibitory avoidance task but not in the elevated plus maze through intra-amygdala injections of histamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2015, 135, 237:245.

DRINGENBERG, H.C, DE SOUZA-SILVA M.A., SCHWARTING, R.K., HUSTON, J.P. Increased levels of extracellular dopamine in neostriatum and nucleus accumbens after histamine H1 receptor blockade. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 1998, 358(4), 423:429.

ESCOBEDO-AVILA, I., VARGAS-ROMERO, F., MOLINA-HERNÁNDEZ, F., LÓPEZ-GONZALÉZ, R., CORTÉS, D., DE CARLOS, J.A., VELASCO, I. Histamine impairs midbrain dopaminergic development in vivo by activating histamine type 1 receptors. **Molecular Brain**, 2014, 7:58.

FERNANDES, C.E.M, SERAFIM, K.R., GIANLORENÇO, A.C.L., MATTIOLI, R. Intra-venous H4 receptor agonist impairs performance in anxiety- and fear- mediated models. **Brain Research Bulletin**, 2017, 135, 179:184.

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

GARÇÃO, D.C., CANTO-DE-SOUZA, L., ROMAGUERA, F., MATTIOLI, R. Chlorpheniramine impairs functional recovery in *Carassius auratus* after telencephalic ablation. **Brazilian Journal of Medical and biological Research**, 2009, 42, 375:379.

GARCÍA-GÁLVEZ, A.M., ARIAS-MONTAÑO, J.A. Isoformas del receptor a histamina H3 humano: generación, expresión en el sistema nervioso central (SNC) e implicaciones funcionales. **Gaceta Médica de México**, 2016, 152, 94:102.

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

GIANLORENÇO, A.C.L., SERAFIM, K.R., CANTO-DE-SOUZA, A., MATTIOLI, R. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H1 but not H2 receptors. **Brain Research Bulletin**, 2012, 89, 197:202.

GIANLORENÇO, A.C.L., CANTO-DE-SOUZA, A., MATTIOLI, R. Intra-cerebellar microinjection of histamine enhances memory consolidation of inhibitory avoidance learning in mice via H2 receptors. **Neuroscience Letters**, 2013, 557, 159:164.

GIANLORENÇO, A.C.L., SERAFIM, K.R., CANTO-DE-SOUZA, A., MATTIOLI, R. Effect of histamine H1 and H2 receptor antagonists, microinjected into cerebellar vermis, on emotional memory consolidation in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2014, 47(2), 135:143.

GIANLORENÇO, A.C.L., RIBOLDI, A.M., SILVA-MARQUES, B., MATTIOLI, R. Cerebellar vermis H2 receptors mediate fear memory consolidation in mice. **Neuroscience Letters**, 2015, 587, 57:61.

HAAS, H.L., SERGEEVA, O.A., SELBACH, O. Histamine in the Nervous System. **Physiological Reviews**, 2008, 88, 1183–1241.

HASENÖHRL, R.U., WETH, K., HUSTON, J.P. Intraventricular infusion of the histamine H1 receptor antagonist chlorpheniramine improves maze performance and has anxiolytic-like effects in aged hybrid Fischer 344/Brown Norway rats. **Experimental Brain Research**, 1999, 128, 435:440.

HE, Y., WU, G., LI, D., TANG, B., LI, B., DING, Y., ZHU, J., WANG, J. Histamine promotes rat motor performances by activation of H2 receptors in the cerebellar fastigial nucleus. **Behavioural Brain Research**, 2012, 228, 44:52.

HIRANO, S., MIYATA, S., ONODERA, K., KAMEI, J. Involvement of dopamine D1 receptors and $\alpha 1$ -adrenoceptors in the antidepressant-like effect of chlorpheniramine in the mouse tail suspension test. **European Journal of Pharmacology**, 2007, 562, 72:76.

HOOBKAMER, W., POTOANAC, Z., VAN CALENBERGH, F., DUYSSENS, J. Quick foot placement adjustments during gait are less accurate in individuals with focal cerebellar lesions. **Gait & Posture**, 2017, 58, 390-393.

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

INAGAKI, N., YAMATODANI, A., ANDO-YAMAMOTO, M., TOHYAMA, M., WATANABE, T., WADA, H. Organization of the histaminergic fibers in the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, 1988, 273(3), 283:300.

JAIN, N.S., TANDI, N., VERMA, L. Contribution of the central histaminergic transmission in the cataleptic and neuroleptic effects of haloperidol. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2015, 139, 59-66.

KARAMANACOS, P.N., PAPPAS, P., MARSELOS, M. Involvement of the brain serotonergic system in the locomotor stimulant effects of chlorpheniramine in Wistar rats: implication of postsynaptic 5-HT1A receptors. **Behavioural Brain Research** 2004, 148, 199:208.

KUBO, N., SHIRAKAWA, O., KUNO, T., TANAKA, C. Antimuscarinic effects of antihistamines: quantitative evaluation by receptor-binding assay. **Japanese Journal of Pharmacology**, 1987, 43(3), 277:282.

LEE, E.H.Y., TSAI, M.J., CHAI, C.Y. Stress Selectively Influences Center Region Activity of Mice in a Open Field. **Physiology & Behavior**, 1986, 37, 659:662.

LETO, K., ARANCILLO, M., BECKER, E.B.E., BUFFO, A., CHIANG, C., DING, B., DOBYNS, H.B., DUSART, I., HALDIPUR, P., HATTEN, M.E., HOSHINO, M., JOYNER, A.L., KANO, M., KILPATRICK, D.L., KOIBUCHI, N., MARINO, S., MARTINEZ, S., MILLEN, K.J., MILLNER, T.O., MIYATA, T., PARMIGIANI, E., SCHILLING, K., SEKERKOVÁ, G., SILLITOE, R.V., SOTELO, C., UESAKA, N., WEFERS, A., WINGATE, R.J.T. HAWKES, R.. Consensus Paper: Cerebellar Development. **Cerebellum** DOI 10.1007/s12311-015-0724-2.

LEURS, R., SMIT, M., TIMMERMAN, H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, 1995, 66, 413:463.

LI, B., ZHU, J.N., WANG, J.J. Histaminergic afferent system in the cerebellum: structure and function. **Cerebellum & Ataxias**, 2014, 1:5.

LI, B., ZHANG, X.Y., YANG, A.H., PENG, X.C., CHEN, Z.P., ZHOU, J.Y., CHAN, Y.S., WANG, J.J., ZHU, J.N. Histamine Increases Neuronal Excitability and Sensitivity of the Lateral Vestibular Nucleus and Promotes Motor Behaviors via HCN Channel Coupled to H2 Receptor. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2017, 10:300. doi: 10.3389/fncel.2016.00300.

LIM, H.D., ADAMI, M., GUAITA, E., WERFEL, T., SMITS, R.A., ESCH, I.J.P., BAKKER, R.A., GUTZMER, R., CORUZZI, G., LEURS, R. Pharmacological characterization of the

new histamine H4 receptor agonist VUF 8430. **British Journal of Pharmacology**, 2009, 157, 34:43.

MACHADO, ABM. Neuroanatomia Funcional Cerebelo: Anatomia Macroscópica e Divisões Cap. 6. 2 edição: São Paulo, **Editora Atheneu**, 2005.

MALMBERG-AIELLO, P., IPPONI, A., BARTOLINI, A., SCHUNACK, W. Mouse light/dark box test reveals anxiogenic-like effects by activation of histamine H1 receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2002, 71, 313:318.

MANTO, M. et al. Consensus Paper: Roles of the cerebellum in motor control – the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. **Cerebellum**, 2012, 11, 457- 487.

MANZONI, D. The cerebellum and sensorimotor coupling: Looking at the problem from the perspective of vestibular reflexes. **The Cerebellum**, 2007, 6, 24:37.

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

MEER, P.V., RABER, J. Mouse behavioral analysis in systems biology: review article. **Biochemistry Journal**, 2005, 389, 593:610.

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

MILLER, B.H., SCHULTZ, L.E., GULATI, A., SU, A.I., PLETCHER, M.T. Phenotypic Characterization of a Genetically Diverse Panel of Mice for Behavior Despair and Anxiety. **PLoS ONE**, 2010, 5(12), e14458.

MOHSEN, A., YOSHIKAWA, T., MIURA, Y., NAKAMURA, T., NAGANUMA, F., SHIBUYA, K., IIDA, T., HARADA, R., OKAMURA, N., WATANABE, T., YANAI, K. Mechanism of the histamine H3 receptor-mediated increase in exploratory locomotor activity and anxiety-like behaviours in mice. **Neuropharmacology**, 2014, 188:194.

MONTI, J.M. Involvement of histamine in the control of the waking state. **Life Sciences**, 1993, 53(17), 1331:1338.

NIETO-ALAMILLA, G., MÁRQUEZ-GÓMEZ, R., GARCÍA-GÁLVEZ, A., MORALES-FIGUEROA, G., ARIAS-MONTAÑO, J. The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. **Molecular Pharmacology**, 2016, 649:673.

NUNES-DE-SOUZA, V., NUNES-DE-SOUZA, R.L., RODGERS, J.R., CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT2 receptor activation in the med brain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behavior in mice. **Behavior Brain Research**, 2008, 187, 72:79.

ORSETTI, M., PIERA, G., CARLO, G. Histamine H3-receptor antagonism improves memory retention and reverses the cognitive deficit induced by scopolamine in a two trial place and cognition task. **Behavioural Brain Research**, 2001, 124, 235:242.

- PANULA, P., TAKAGI, H., INAGAKI, N., YAMATODANI, A., TOHYAMA, M., WADA, H., KOTILAINEN, E. Histamine-containing nerve fibers innervate human cerebellum. **Neuroscience Letters**, 1993, 160, 53:56.
- PANULA, P., CHAZOT, P.L., COWART, M., GUTZMER, R., LEURS, R., LIU, W.L.S., STARK, H., THURMOND, R.L., HAAS, H.L. Internacional Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. **Pharmacological Reviews**, 2015, 67, 601:655.
- PAXINOS, G., FRANKLIN, K.B.J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. **Elsevier Science**, California, 2001.
- PÉREZ-GARCÍA, C., MORALES, L., CANO, M.V., SANCHO, I., ALQUALCIL, L.F. Effects of histamine H3 receptors ligands in experimental models of anxiety and depression. **Psychopharmacology**, 1999, 142, 215:220.
- PHILLIPS, J.R., HEWEDI, D.H., EISSA, A.M., MOUSTAFA, A.A.. The Cerebellum and Psychiatric Disorders. **Frontiers in Public Health**, 2015, 3:66.
- PIRI, M., AYAZI, E., ZARRINDAST, M.R. Involvement of the dorsal hippocampal dopamine D2 receptors in histamine induced anxiogenic-like effects in mice. **Neuroscience Letters**, 2013, 550, 139:144.
- POPA, L.S.; HEWITT, A.L.; EBNER, T.J. The cerebellum for jocks and nerds alike. **Frontiers in Systems Neuroscience**, 2014, 8, 113.
- PRUT, L., BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, 2003, 463, 3:33.
- RAHIMI-BALAEI, M., AFSHARINEZHAD, P., BAILEY, K., BUCHOK, M., YEGANEH, B., MARZBAN, H. Embryonic stages in cerebellar afferent development. **Cerebellum & Ataxias**, 2015, 2:7.
- REEBER, S.L., OTIS, T.S., SILITOE, R.V. New roles for the cerebellum in health and disease. **Frontiers in Systems Neuroscience**, 2013, doi: 10.3389/fnsys.2013.00083.
- RIVEROS, M.E., FORRAY, M.I., TORREALBA, F. Infralimbic cortex activation and motivated arousal induce histamine release. **Behavioral Pharmacology**, 2015, 26, 338:344.
- SACHETTI, B., SCELFO, B., STRATA, P. Cerebellum and Emotional Behavior – Review. **Neuroscience**, 2009, 162, 756-762.
- SADEK, B., STARK, H. Cherry-picked ligands at histamine receptor subtypes. **Neuropharmacology**, 2016, 106, 56:73.
- SAKAI, N., ONODERA, K., MAEYAMA, K., YANAI, K., WATANABE, T. **Life Sciences**, 1991, 48, 2397:2404.
- SANNA, M.D., GHELARDINI, C., THURMOND, R.L., MASINI, E., GALEOTTI, N. Behavioral phenotype of histamine H4 knockout mice: Focus on central neuronal functions. **Neuropharmacology**, 2017, 114, 48:57.

SCHMAHMAAN, J.D., WEILBURG, J.B., SHERMAN, J.C. The neuropsychiatry of the cerebellum – insights from the clinic. **The Cerebellum**, 2007, 6, 254:267.

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

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

SCHNEIDER, E.H., SEIFERT, R. The histamine H4 receptor and the central and peripheral nervous system: A critical analysis of the literature. **Neuropharmacology**, 2016, 106, 116:128.

SERAFIM, K.R., GIANLORENÇO, A.C.L., DAHER, F.P., MATTIOLI, R. H1 histamine receptors in the amygdala are involved in emotional memory but do not mediate anxiety-related behaviors in mice submitted to EPM testing. **Brain Research Bulletin**, 2012, 89, 1:7.

SHIROMA, A., NISHIMURA, M., NAGAMINE, H., MIYAGI, T., HOKAMA, Y., WATANABE, T., MURAYAMA, S., TSUTSUI, M., TOMINAGA, D., ISHIUCHI, S. Cerebellar Contribution to Patter Separation of Human Hippocampal Memory Circuits. **Cerebellum**, 2016, 645-662.

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

SIMONS, F.E.R., SIMONS, K.J. The Pharmacology and use of H1 receptor antagonist drugs. **Drug Therapy**, 1994, 330, 1663:1670.

SONG, Y.N., LI, H.Z., ZHU, J.N., GUO, C.L., WANG, J.J. Histamine improves rat rota-rod and balance beam performances through H2 receptors in the cerebellar interpositus nucleus. **Neuroscience**, 2006, 140, 33:43.

TASHIRO, M., SUKURADA, Y., MOCHIZUK, H., HORIKAWA, E., MARUYAMA, M., OKAMURA, N., WATANUKI, S., ARAI, H., MASATOSHI, I., YANAI, K. Effects of a sedative antihistamine, D-chlorpheniramine, on regional cerebral perfusion and performance during simulated car driving. **Human Psychopharmacology**, 2008, 23, 139:150.

TOKUNAGA, S., TSUTSUI, R., OBARA, Y., ISHIDA, T., KAMEI, C. Effects of Histamine H1-antagonists on sleep-awake state in rats placed on a grid suspended over water or on sawdust. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 2009, 32(1), 51:54.

TOYOTA, H., DUGOVIC, C., KOEHL, M., LAPOSKY, A.D., WEBER, C., NGO, K., WU, Y., LEE, D.H., YANAI, K., SAKURAI, E., WATANABE, T., LIU, C., CHEN, J., BARBIER, A.J., TUREK, F.W., FUNG-LEUNG, W.P., LOVENBERG, T.W. Behavioral characterization of mice lacking histamine H(3) receptors. **Molecular Pharmacology**, 2002, 62, 389:397.

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

VAN RUITENBEEK, P., VERMEEREN, A., SMULDERS, F.T., SAMBETH, A., RIEDEL, W.J. Histamine H1 receptor blockade predominantly impairs sensory processes in human sensorimotor performance. **British Journal of Pharmacology**, 2009, 157(1), 76:85.

WILSON, R.C., VACEK, T., LANIER, D.L., DEWSBURY, D.A. Open field behaviors in murine rodents. **Behavioral Biology**, 1976, 17, 495:506.

YAMAURA, H., HIRAI, H., YANAGIHARA, D. Postural dysfunction in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. **Neuroscience**, 2013, 243, 126:135.4

YASUDA, S.H., YASUDA, R.P. Affinities of Brompheniramine, Chlorpheniramine, and Terfenadine at the Five Human Muscarinic Cholinergic Receptor Subtypes. **Pharmacotherapy**, 1999, 19(4), 447:451.

YEUNG, M., TREIT, D., DICKSON, C.T. Ventral hippocampal histamine increases the frequency of evoked theta rhythm but produces anxiolytic-like effects in the elevated plus maze. **Neuropharmacology**, 2016, 106, 146:155.

YUE, J.X., WANG, R.R., YU, J., TANG, Y.Y., HOU, W.W., LOU, G.D., ZHANG, S.H., CHEN, Z. Histamine Up Regulates Nav1.8 Expression in Primary Afferent Neurons Via H2 Receptors: Involvement in Neuropathic Pain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 2014, 20(10), 883:892.

ZARRINDAST, M.R. TAHERI, S., REZAYOF, A. The Effects of Histaminergic Agents in the Nucleus Accumbens of Rats in the Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Iran Journal of Psychiatry**, 2010, 5, 11:17.

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