

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

JULIANA DOS REIS BASTOS

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE EM RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR DE
DOPAMINA**

Belo Horizonte

2020

JULIANA DOS REIS BASTOS

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE EM RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR DE
DOPAMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Aline Silva de Miranda

Co-orientador estrangeiro: Prof. Dr. Jared. W. Young

Belo Horizonte

2020

043 Bastos, Juliana dos Reis.

Participação do sistema endocanabinóide em respostas comportamentais induzidas pela inibição do transportador de dopamina [manuscrito] / Juliana dos Reis Bastos. - 2020.

74 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira. Coorientadores: Prof^a. Dra. Aline Silva de Miranda e Prof. Dr. Jared W. Young.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Dopamina. 3. Receptor CB1 de Canabinoide. 4. Receptor CB2 de Canabinoide. 5. Hiperatividade Motora. I. Moreira, Fabrício de Araújo. II. Miranda, Aline Silva de. III. Young, Jared. W.. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 612:615

"PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE EM RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA"

JULIANA DOS REIS BASTOS

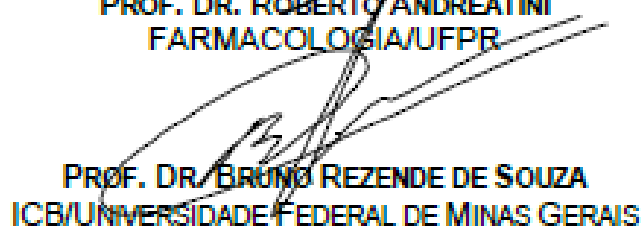
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 23 de junho de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DRA. DANIELLE MACÉDO GASPAR
MEDICINA/UFC

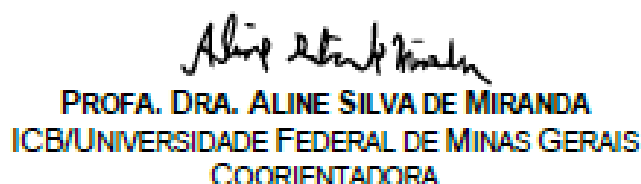


PROF. DR. ROBERTO ANDREATINI
FARMACOLOGIA/UFPR

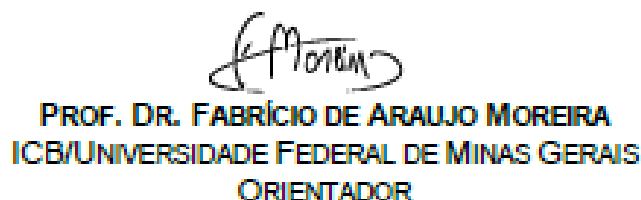


PROF. DR. BRUNO REZENDE DE SOUZA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Victor R. Santos
PROF. DR. VICTOR RODRIGUES SANTOS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. ALINE SILVA DE MIRANDA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COORIENTADORA



PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 23 de junho de 2020

Aos meus pais, por todo amor de sempre.

E para minha avó Osvaldina pela força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Selma e Julio, por todo apoio e compreensão, especialmente durante o percurso e conclusão dessa etapa da minha vida.

Agradeço ao meu orientador Fabrício, com quem tive o benefício de conviver desde a Iniciação Científica até o Doutorado. Admiro sua paciência e respeito para lidar com as pessoas nas mais diferentes situações, além de tê-lo como referência de Cientista e Professor.

À minha co-orientadora Aline, por toda presteza e atenção com que sempre me atendeu. Agradeço todos os conselhos e ideias que compartilhamos.

Ao Prof. Jared Young por ter prontamente me aceito em seu laboratório durante o Doutorado Sanduíche, e aos demais colegas, especialmente à Mahalah, Molly e Melissa pelo suporte com os experimentos.

À Prof. Daniele e todos os colegas com quem convivi durante esse tempo de LNP. Como são muitos anos de laboratório não vou citar todos, mas saibam que foram fundamentais pro meu crescimento profissional e pessoal. Em especial agradeço Thércia e Pedro pela convivência alegre e animada que ditam o clima do laboratório até hoje. À Jadna, que muito além de colaboradora, se tornou uma grande amiga. À minha IC Nicole, que ajudou em vários experimentos que estão nessa Tese. E claro, a todos que fazem o LNP agora: Anna, Aline, Dayane, Laila, Lia, Nícia e Rayssa meu muito obrigada por terem me acompanhado, mas principalmente por terem me ouvido e acolhido no final desse percurso. Meu carinho mais sincero por todas vocês.

Agradeço também os colegas dos laboratórios vizinhos, especialmente à Isabel, Paula, Carla, Carol e Giovani pela companhia e afeto durante essa caminhada. E aos técnicos Rinaldo e Webster, pelo trabalho na criação dos animais experimentais e apoio sempre quando necessário.

À minha irmã Simone, pelo incentivo e parceria constantes. E à toda minha família, por serem o porto-seguro onde encontro todo amor e carinho para seguir adiante. Especialmente a minha avó Osvaldina, pelo maior exemplo de força que poderia ter e por ter criado uma família tão linda e unida como a nossa.

Às minhas amigas mais do que queridas: Camila, Jaqueline, Lorrana, Luciana, Mariana e Thayse por sempre poder compartilhar todas as minhas angústias e alegrias. Agradeço também à minha psicóloga Ana Luíza que tem me ajudado a passar por momentos de dificuldade e por contribuir pra que eu entenda meus sentimentos com mais clareza.

Agradeço a todos que fizeram da UFMG uma Universidade de excelência, especialmente à todos os companheiros da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia por todo aprendizado desses últimos anos.

Por fim, agradeço à banca examinadora, pela disponibilidade e atenção dispensada na leitura desta Tese e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro necessário para realização desse trabalho.

RESUMO

A inibição do transportador de dopamina (DAT) induz alterações comportamentais em animais que podem ser relacionadas a fase maníaca do Transtorno Bipolar (TB) em humanos. Torna-se, por isso, um importante instrumento para elucidar a fisiopatologia desse transtorno. As interações entre os sistemas dopaminérgicos e canabinóide tem sido amplamente estudadas na tentativa de identificar alvos de potencial terapêutico. Compõe o sistema endocanabinóide os receptores CB₁ e CB₂, os ligantes endógenos e as enzimas que sintetizam e degradam esses ligantes. Nesse sentido, buscamos avaliar como os efeitos da inibição aguda (farmacológica) e crônica (genética) de DAT são influenciados pelo sistema endocanabinóide, através da administração de agonistas, antagonistas ou inibidores de duas enzimas de degradação que compõe esse sistema. Analisamos os efeitos desses moduladores em animais C57Bl6 que receberam em seguida a injeção aguda de GB12909, um inibidor de DAT. Os animais foram então submetidos a teste para avaliar a atividade locomotora (campo aberto ou *Behavioral Pattern Monitor - BPM*) e ao teste de inibição pré-pulso (*Prepulse Inhibition - PPI*). Também avaliamos os efeitos do antagonista CB₁ AM251 em animais com baixa expressão de DAT (DAT KD). Observamos que a dose de 3 mg/Kg do antagonista CB₁ foi capaz de prevenir tanto o aumento de locomoção induzido pelo GBR12909 como o que foi exibido pelos animais DAT KD. De maneira interessante, a administração de THC também preveniu o aumento de locomoção induzido pelo GBR12909. Concluimos, portanto, que o receptor canabinóide do tipo CB₁ participa da resposta induzida pela inibição de DAT e pode ser um dos alvos farmacológicos no desenvolvimento de drogas anti-mania.

Palavras-chave: CB₁, CB₂, transportador de dopamina, hiperatividade

ABSTRACT

Dopamine transporter (DAT) inhibition induces behavioral changes in animals that can be related to maniac state of Bipolar Disorder (BD) in humans. Due that is an important tool for elucidate the physiopathology of BD. The interactions of dopaminergic and endocannabinoid systemns have been widely studied in attempt to find new therapeutic targets. Endocannabinoid system is compond by CB₁ and CB₂ receptors, endogenous ligants and enzymes for syntese and degradation of this ligants. In this line, we research how acute (pharmacological) or chronic (genetic) inihibion of DAT is influencied by endocannabinoid system thought administration of agonists, antagonists and two inhibitors of enzymes that degradate endocannabinoid ligants. We analyse this effects in C57Bl6 mice that received an injection of GBR12909, a DAT inhibitor, thereafter. This mice were submitted to locomotors analyses (open field or Behavioral Pattern Monitor – BPM) and Prepulse Inhibiont test (PPI). We also evaluated the effects of CB₁ antagonist AM251 in mice with down expression of DAT (DAT KD mice). We observed that 3 mg/Kg dose of AM251 was able to prevent as the increase of locomotion induced by GBR12909 as what exhibided by DAT KD mice. Interesantly the administration of THC also prevent the increase of locomotion induced by GBR12909. We conclude that CB₁ receptor participate of DAT inhibition induced responses and can be a possible pharmacological target for new anti-maniac drugs.

Keywords: CB₁, CB₂, Dopamine transporter, hyperactivity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais subtipos do Transtorno Bipolar (TB).....	18
Figura 2: Neurotransmissão dopaminérgica.....	20
Figura 3: Ilustração do Sistema Endocanabinóide.....	25
Figura 4: Delineamento experimental – Parte A.....	31
Figura 5: Efeito da administração aguda de GBR12909 em três diferentes protocolos.....	33
Figura 6: Curva dose-resposta do Carbonato de Lítio.....	34
Figura 7: Efeito do pré-tratamento agudo com Carbonato de Lítio na hiperlocomoção induzida pela dose de 10 mg/Kg de GBR12909 no protocolo com habituação.....	35
Figura 8: Efeito do pré-tratamento agudo com Carbonato de Lítio na hiperlocomoção induzida pela dose de 15 mg/Kg de GBR12909 no protocolo com habituação.....	35
Figura 9: Efeito do pré-tratamento subcrônico com Carbonato de Lítio na hiperlocomoção induzida pela dose de 15 mg/Kg de GBR12909 no protocolo com habituação.....	36
Figura 10: Efeito do pré-tratamento agudo com Carbonato de Lítio na hiperlocomoção induzida pela dose de 15 mg/Kg de GBR12909 no protocolo sem habituação.....	37
Figura 11: Curva dose-resposta do agonista inverso de receptores CB ₁ , AM251.....	37
Figura 12: Efeito do agonista inverso CB ₁ AM251 na hiperlocomoção induzida por GBR12909 no protocolo sem habituação.....	38
Figura 13: Efeito do pré-tratamento com agonista inverso CB ₁ AM251 na dose de 3 mg/Kg na hiperlocomoção induzida por 15 mg/Kg de GBR12909 avaliado no protocolo sem habituação.....	39
Figura 14: Curva dose-resposta do agonista CB ₂ JWH133.....	39
Figura 15: Efeito do pré-tratamento com o agonista de receptores CB ₂ JWH133 na hiperlocomoção induzida por GBR12909 no protocolo sem habituação.....	40
Figura 16: Curva dose-resposta do Canabidiol.....	40

Figura 17: Efeito do pré-tratamento Canabidiol na hiperlocomoção induzida por 15 mg/Kg de GBR12909 avaliado no protocolo sem habituação.	41
Figura 18: Representação do monitor de padrão comportamental.	44
Figura 19: Delineamento experimental – Parte B.	46
Figura 20: Efeito dos pré-tratamentos com AM251 e THC na hiperlocomoção induzida por 16 mg/Kg de GBR12909 avaliados no BPM.	48
Figura 21: Efeito do antagonista CB1 AM251 no número de rearings induzido pela administração de 16 mg/Kg de GBR12909 no BPM.	49
Figura 22: Efeito do antagonista CB1 AM251 no teste de inibição pré-pulso.	50
Figura 23: Efeito do antagonista CB1 na distância percorrida por animais DAT KD e Wild type.	51
Figura 24: Efeito do antagonista CB1 AM251 no nº. de rearings em animais DAT KD e wild type.	52
Figura 25: Efeito dos moduladores endocanabinóides na distância percorrida pelos animais após a administração de 16mg/KG de GBR12909.	72
Figura 26: Efeito dos moduladores endocanabinóides no número de rearings após a administração de 16 mg/Kg de GBR12909.	73
Figura 27: Efeito dos moduladores endocanabinóides no teste de inibição pré-pulso após a administração de 16 mg/Kg de GBR12909.	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-AG	-	2-aracondonoilglicerol
AEA	-	aracondonoiletanolamida (também denominada anandamida)
AM251	-	agonista inverso
AM630	-	Antagonista de receptor CB ₂ /agonista inverso
AMPC	-	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ANOVA	-	Teste de Variância
ATV	-	Área tegmentar ventral
BPM	-	Monitor de Comportamento Padrão” (do inglês <i>Behavioral Pattern Monitor</i>)
CB ₁	-	Receptor canabinóide tipo 1
CB ₂	-	Receptor canabinóide tipo 2
CBD	-	Canabidiol
D ₁	-	Receptor de dopamina da subfamília 1
D ₂	-	Receptor de dopamina da subfamília 2
DAT	-	transportador de dopamina
KD	-	Baixa expressão (do inglês <i>knockdown</i>)
dB	-	decibéis
E.P.M.	-	Erro padrão da média
FAAH	-	Enzima amido-hidrolase de ácidos graxos (<i>fatty acid amide hydrolase</i>)
GBR12909	-	Inibidor de DAT
JWH133	-	agonista de receptores tipo CB ₂
JZL184	-	Inibidor da enzima MGL, que hidrolisa o 2-AG
MAO	-	enzima monoamino oxidase
MGL	-	Enzima monoacil glicerol lipase (do inglês <i>monoacylglycerol lipase</i>)
PPI	-	teste de inibição pré-pulso (do inglês <i>prepulse inhibition</i>)
RNA _m	-	ácido ribonucleico mensageiro
SNC	-	Sistema Nervoso Central
TB	-	Transtorno Bipolar
TH	-	Enzima tirosina hidroxilase
THC	-	delta-9-tetrahydrocannabinol
URB597	-	Inibidor da enzima FAAH, que hidrolisa a anandamida
WT	-	wild-type

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. Transtorno Bipolar/ Mania.....	17
2.2. Fisiopatologia do TB: Dopamina e Mania.....	19
2.3. Modelos experimentais para TB/Mania.....	21
2.4. Inibição de DAT como modelo tipo-mania	23
2.5. Sistema Endocanabinóide	24
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo geral	27
4.2. Objetivos específicos	28
PARTE A: AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO	
AGUDA DE DAT NO CAMPO ABERTO	29
5. MATERIAIS.....	29
5.1. Animais.....	29
5.2. Drogas.....	29
6. MÉTODOS	30
6.1. Avaliação Comportamental	30
6.2. Análise Estatística.....	32
7. RESULTADOS.....	32

7.1. Padronização do protocolo de indução da hiperlocomoção.....	32
7.2. Validação preditiva do modelo com Carbonato de Lítio.....	34
7.3. Efeito do pré-tratamento com agonista inverso/antagonista CB ₁ AM251.....	37
7.4. Efeito do pré-tratamento com agonista CB ₂ JWH133.....	39
7.5. Efeito do pré-tratamento com Canabidiol.....	40
7.6. Tabela resumo dos Resultados da Parte A.....	41
PARTE B: AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA INIBIÇÃO	
AGUDA E CRÔNICA DE DAT NO BPM E NO TESTE DE INIBIÇÃO PRÉ-PULSO	42
8. MATERIAIS.....	42
8.1. Animais.....	42
8.2. Drogas.....	42
9. MÉTODOS.....	43
9.1. BPM (Behavioral Pattern Monitor).....	43
9.2. Teste de Inibição Pré-Pulso (<i>Prepulse Inhibition - PPI</i>).....	44
9.3. Delineamento Experimental.....	45
9.3.1. 1ª etapa: Pré-tratamento agudo com moduladores endocanabinóides em animais C57 tratados com GBR12909.....	45
9.3.2. 2ª etapa: Pré-tratamento com AM251 em animais knockdown para DAT.....	46
9.4. Análise Estatística.....	46
10. RESULTADOS:.....	47
10.1. 1ª etapa: Pré-tratamento agudo com moduladores endocanabinóides em animais C57 tratados com GBR12909.....	47

10.2.	2ª etapa: Pré-tratamento com AM251 em animais DAT KD.....	51
10.3.	Tabela resumo dos Resultados da Parte B	53
11.	DISCUSSÃO.....	54
11.1.	Avaliação da hiperatividade em modelos animais de mania.....	54
11.2.	Participação de receptores CB ₁ na resposta locomotora induzida pela inibição de DAT	56
11.3.	Participação de receptores CB ₂ na resposta locomotora induzida pela inibição de DAT	57
11.4.	Efeito do THC na resposta locomotora induzida pela inibição de DAT.....	58
11.5.	Efeito do Canabidiol na resposta locomotora induzida pela inibição de DAT	59
11.6.	Avaliação do teste de PPI em modelos animais tipo-mania.....	60
12.	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE A - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA PERCORRIDA NO BPM	72
	APÊNDICE B - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE REARINGS NO BPM	73
	APÊNDICE C –RESULTADOS DO TESTE DE INIBIÇÃO PRÉ-PULSO (PPI).....	74

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno Bipolar (TB) é uma doença psiquiátrica caracterizada por flutuações no humor, que variam da depressão à mania. A fase maníaca está relacionada principalmente à presença de humor elevado, expansível ou irritável, além de sinais auxiliares, que podem ser agitação psicomotora, prejuízos no sono, autoestima elevada, agressividade, irritação, euforia, pensamentos confusos e alta busca por recompensa (YOUNG; DULCIS, 2015).

Diversas hipóteses têm sido apontadas para a etiologia desse transtorno. Uma delas assinala o aumento da neurotransmissão dopaminérgica como gatilho para os sintomas da fase maníaca (ASHOK *et al.*, 2017; COUSINS; BUTTS; YOUNG, 2009; MUNEER, 2017). Baseada nessa e em outras premissas, a inibição do transportador de dopamina (DAT) é utilizada como indutora desse transtorno em modelos animais, (BEYER; FREUND, 2017; SHARMA *et al.*, 2016; YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). Observa-se como consequência o aumento da locomoção, impulsividade e da resposta de sobressalto (QUEIROZ *et al.*, 2015; RALPH-WILLIAMS *et al.*, 2003; VAN ENKHUIZEN *et al.*, 2012, 2014), ou seja, fenótipos comportamentais semelhantes aos sintomas exibidos pelos pacientes.

Propomos investigar a participação do sistema endocanabinóide nos efeitos induzidos pela inibição de DAT, considerando as interações deste sistema com a liberação de dopamina e as suas promissoras características como alvo terapêutico. Nossa hipótese é que o bloqueio de receptores CB₁ e/ou ativação de receptores CB₂ podem reverter o prejuízo comportamentais decorrentes da inibição genética ou farmacológica de DAT.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Transtorno Bipolar/ Mania

O Transtorno Bipolar (TB) está entre os mais debilitantes dos transtornos psiquiátricos, sendo caracterizado pela ocorrência de episódios de mania e depressão. Tanto a depressão unipolar quanto o TB podem reduzir a longevidade através de suicídio, por exemplo, ou por piora do prognóstico de doenças médicas gerais comuns, tais como doenças cardíacas e diabetes (THASE; DENKO, 2008). Apesar da menor incidência de casos entre os Transtornos de Humor, o TB foi apontado como tendo o maior percentual de casos graves na Cidade de São Paulo, especialmente aqueles associados aos do tipo I (ANDRADE *et al.*, 2012).

O TB é dividido em tipo I e tipo II, de acordo com os sintomas. Para o diagnóstico do tipo I considera-se a presença de sintomas maníacos e/ou depressivos por pelo menos uma semana. Já o tipo II é principalmente caracterizado pela hipomania, que se diferencia da mania pela menor severidade dos sintomas que, nesse caso, não constituem um episódio maníaco completo e pela presença de pelo menos um episódio depressivo (Figura 1). Alterações de humor com duração mínima de quatro dias consecutivos são incluídas nos episódios hipomaníacos (BRENNER; SHYN, 2014).

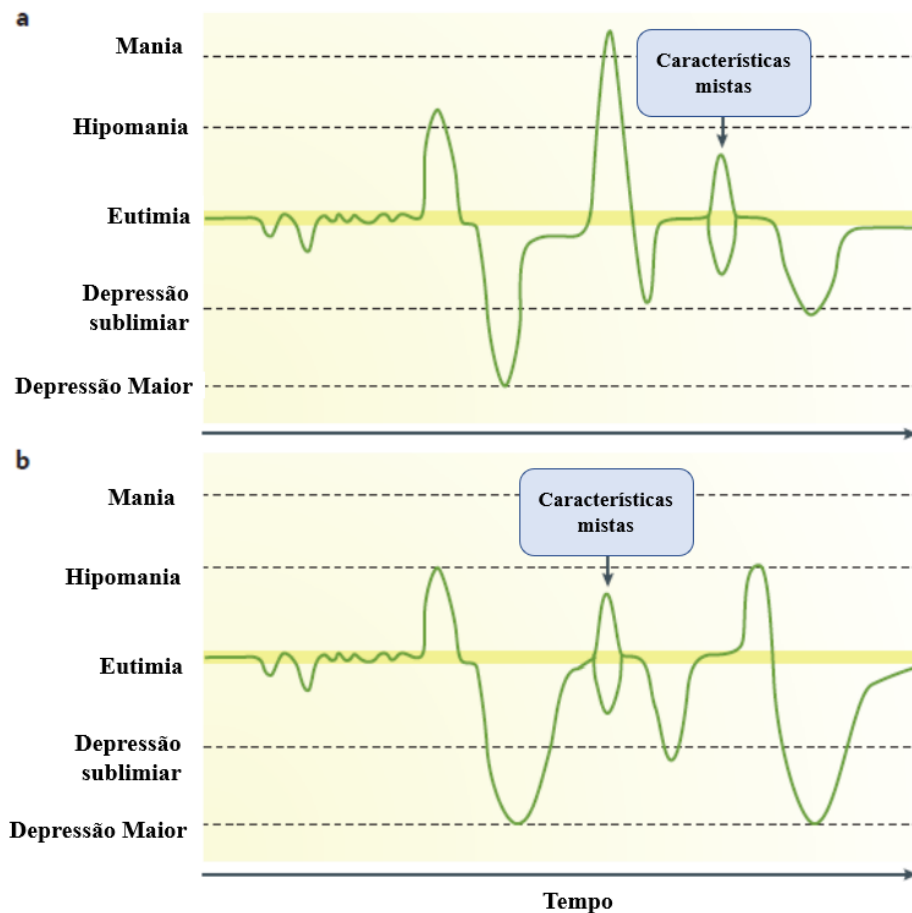


Figura 1: Principais subtipos do Transtorno Bipolar (TB).

O TB tipo I é caracterizado por pelo menos um episódio de mania (a) enquanto o TB tipo II é caracterizado por pelo menos um episódio de hipomania e um episódio depressivo (b). Episódios de características mistas podem ocorrer nos dois subtipos. [imagem modificada de: VIETA et al., 2018].

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, em sua 5ª edição, considera que o critério A para diagnóstico da mania é a persistência de atividade ou energia aumentada (ASSOCIATION, 2014). De fato, a hiperatividade é o sintoma mais comum entre os pacientes, seguido da presença de pensamentos acelerados e aumento da pressão do discurso (MARTINO; VALERIO; PARKER, 2020). Outros sintomas, chamados de auxiliares, também são considerados para o diagnóstico, tais como prejuízos no sono, autoestima elevada, agressividade, irritação, euforia e alta busca por recompensa (YOUNG; DULCIS, 2015).

Fármacos estabilizadores do humor, como lítio, valproato e carbamazepina, são a primeira escolha para o tratamento do transtorno bipolar, especialmente da fase maníaca. Entretanto, alguns antipsicóticos atípicos como olanzapina, risperidona, quetiapina e

aripiprazol, são utilizados como adjuvantes no tratamento ou até como monoterapia, em alguns casos (MUNEER, 2017; YATHAM *et al.*, 2013).

2.2.Fisiopatologia do TB: Dopamina e Mania

A fisiopatologia do TB ainda não é completamente compreendida. Aponta-se que o surgimento dos sintomas pode se dar por alterações em vias de sinalização intracelulares (BERK *et al.*, 2011; MALETIC; RAISON, 2014), mudanças na expressão de genes (ABREU; BRAGANÇA, 2015; GREENWOOD *et al.*, 2006; HARRISON; GEDDES; TUNBRIDGE, 2018; STEARDO *et al.*, 2019), processos inflamatórios (BERK *et al.*, 2011; MUNEER, 2016; NIU *et al.*, 2019) ou pelo funcionamento atípico de algumas vias neurais (MALETIC; RAISON, 2014; MANJI *et al.*, 2003; NEWBERG *et al.*, 2008). O principal indício clínico que aponta para a disfunção de vias dopaminérgicas durante a fase maníaca é o uso eficaz de antipsicóticos atípicos no tratamento de pacientes com TB (GRANDE *et al.*, 2016; YATHAM *et al.*, 2018).

A neurotransmissão dopaminérgica (Figura 2A) tem início a partir do aminoácido tirosina, que é convertido em L-dopa, pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Levodopa por sua vez é convertida em Dopamina, pela enzima L-Aminoácido aromático descarboxilase (ou DOPA descarboxilase), e em seguida é armazenada em vesículas por meio do transportador vesicular de monoaminas (VMAT2). Os receptores dopaminérgicos são metabotrópicos e agrupados nos subgrupos D1 (D1 e D5) e D2 (D2, D3 e D4), de acordo com propriedades estruturais e farmacológicas. O término da neurotransmissão acontece pela degradação da dopamina pela enzima monoamino oxidase (MAO), presente na membrana de mitocôndrias, ou pela recaptação pelo transportador de dopamina (DAT).

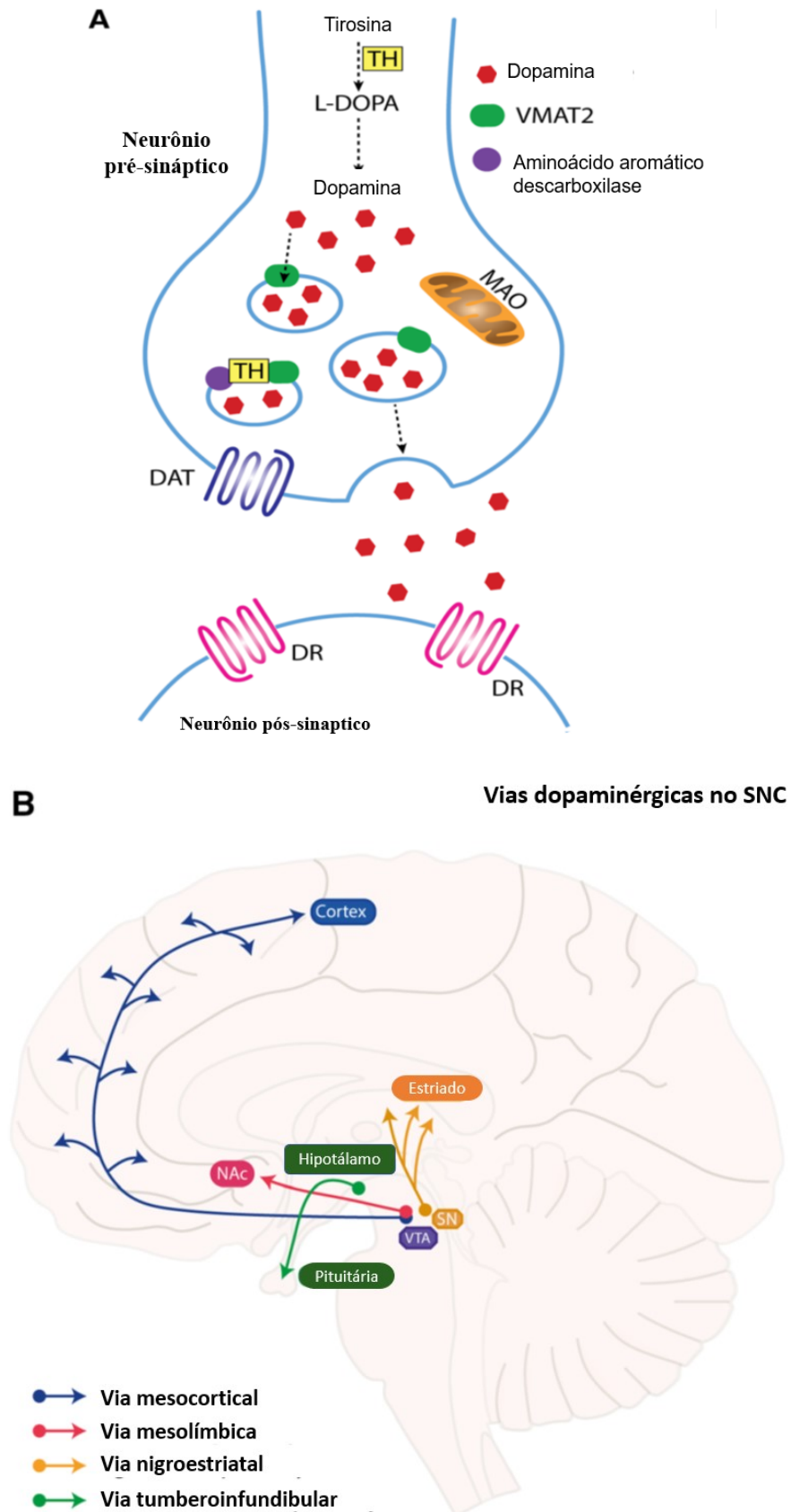


Figura 2: Neurotransmissão dopaminérgica.
A: Elementos envolvidos na síntese e degradação da dopamina. B: Vias dopaminérgicas cerebrais.
 Imagens modificadas de KLEIN et al., 2019.

Existem quatro vias dopaminérgicas principais no cérebro. As vias mesolímbica e mesocortical têm origem na área tegmentar ventral (ATV) e se projetam para o núcleo acumbente e para o córtex, respectivamente. Neurônios dopaminérgicos localizados na substância nigra se projetam para o estriado, formando a via nigroestriatal. Já a via tuberoinfundibular é formada por neurônios que partem do núcleo arqueado hipotalâmico para a glândula pituitária (Figura 2B).

De fato, várias das alterações comportamentais exibidas pelos pacientes são processadas em regiões cerebrais com comunicação dopaminérgica, como estruturas mesolímbicas e mesocorticais (ASHOK *et al.*, 2017; COUSINS; BUTTS; YOUNG, 2009), o que justifica o sucesso desses medicamentos no tratamento. Além disso, a presença de certos polimorfismos do gene que codifica o transportador de dopamina parece conferir susceptibilidade para o desenvolvimento do TB (GREENWOOD *et al.*, 2006; HAYDEN; NURNBERGER, 2006; PINSONNEAULT *et al.*, 2011).

2.3. Modelos experimentais para TB/Mania

A ciclagem entre os estados depressivo, maníaco, de eutimia (sem sintomas) e a possível presença de episódios mistos são as principais características do TB. E justamente esses são os principais limitadores para o desenvolvimento de modelos animais que mimetizem a progressão desse transtorno. Por isso, enquanto se busca um modelo para o transtorno em si, a maioria dos estudos são realizadas utilizando modelos tipo-depressivos ou tipo-mania, ou seja, opta-se por estudar os estados separadamente (BEYER; FREUND, 2017; KATO; KUBOTA; KASAHARA, 2007; MACHADO-VIEIRA; KAPCZINSKI; SOARES, 2004; SHARMA *et al.*, 2016; YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). Embora não contemplem a complexidade dos

sintomas observada durante cada fase, são úteis na busca para compreender a fisiopatologia desse transtorno e para a pesquisa por novos tratamentos.

Modelos animais para estudo de doenças psiquiátricas devem atender, ainda que parcialmente, três critérios de validade: de face (ou aparente), de constructo e preditiva. A validade de face é relativa à semelhança entre a sintomatologia e o comportamento observado no animal. A validade de constructo reproduz fatores neurobiológicos desencadeantes do transtorno, de forma consistente com a fundamentação teórica. Já a validade preditiva diz como o modelo responde aos medicamentos utilizados para o tratamento. Baseado nesses aspectos, modelos animais podem ser classificados como farmacológicos (induzidos pela injeção de drogas), nutricionais (p. ex. alterando a dieta dos animais), genéticos (p. ex. animais nocautes) e ambientais (p. ex. privando os animais de sono) (KATO; KUBOTA; KASAHARA, 2007; MACHADO-VIEIRA; KAPCZINSKI; SOARES, 2004).

Dentre os sintomas exibidos pelos pacientes a hiperatividade é o parâmetro mais facilmente reproduzível em roedores, por isso é amplamente avaliado (SHARMA *et al.*, 2016; YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). A validade de face desse parâmetro foi elegantemente demonstrada por Perry e colaboradores, que identificaram diferenças na exploração do ambiente entre pacientes bipolares e esquizofrênicos utilizando o teste do “Monitor de Comportamento Padrão” (do inglês *Behavioral Pattern Monitor – BPM*), que avalia diferentes aspectos da hiperatividade de forma equivalente em humanos e roedores. Eles observaram que pacientes em fase maníaca do TB ou com esquizofrenia gastam mais tempo caminhando e explorando o novo ambiente que os indivíduos saudáveis. Entretanto, somente os indivíduos em mania interagem com os diversos objetos ali dispostos de forma persistente e simultânea. Embora não seja possível estabelecer uma relação direta desses parâmetros com a sintomatologia do TB, eles podem ser relevantes para distinguir o comportamento tipo-mania

de outros transtornos psiquiátricos em animais, uma vez que a hiperatividade é avaliada em diversos distúrbios psiquiátricos (PERRY *et al.*, 2010; YOUNG *et al.*, 2007).

Naturalmente as validades de constructo e preditiva variam de acordo com o método escolhido para induzir a hiperatividade nos animais. A injeção intracerebroventricular (icv) de ouabaína, por exemplo, é utilizada como indutora de hiperlocomoção por sua ação inibidora sobre a Bomba Na⁺/K⁺ ATPase que causa um desbalanço iônico similar aos apresentados por pacientes em mania. Sua validade preditiva tem sido extensivamente demonstrada especialmente com o Lítio, um dos fármacos de primeira escolha para o tratamento do TB (EL-MALLAKH *et al.*, 2003; VALVASSORI *et al.*, 2019).

2.4. Inibição de DAT como modelo tipo-mania

Potencializar a neurotransmissão dopaminérgica é uma das formas de induzir comportamentos tipo-mania em animais. Nesse sentido, é bem estabelecido que as anfetaminas, drogas que inibem a recaptção de dopamina, são capazes de desencadear agitação psicomotora semelhante à observada em pacientes bipolares (FREY; VALVASSORI; *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2014; VALVASSORI *et al.*, 2015). Da mesma forma, a inibição seletiva do transportador de dopamina (DAT) pela administração de GBR12909 foi inicialmente proposta por Young e colaboradores baseados na hiperlocomoção desencadeada por essa droga (YOUNG *et al.*, 2010) e, posteriormente, Queiroz e colaboradores demonstraram que o pré-tratamento subcrônico com lítio é capaz de reverter esses efeitos, corroborando sua validade como modelo do comportamento tipo-mania (QUEIROZ *et al.*, 2015). Animais com baixa expressão de DAT também exibem hiperlocomoção quando expostos ao BPM, permitindo avaliar os efeitos da inibição crônica desse transportador (KWIATKOWSKI *et al.*, 2017).

Além da hiperatividade, outros parâmetros avaliados em animais podem ser relacionados à comportamentos exibidos pelos pacientes durante a fase maníaca. Um deles é a resposta de sobressalto, avaliada no teste de inibição pré-pulso (do inglês *prepulse inhibition - PPI*), que é uma medida do funcionamento do filtro sensorio-motor, que diz sobre a capacidade do indivíduo em filtrar as informações do ambiente externo. Pacientes bipolares apresentam déficits no teste de inibição pré-pulso, indicando que possuem um prejuízo no filtro sensorio-motor (MAO *et al.*, 2019; PERRY *et al.*, 2001; SÁNCHEZ-MORLA *et al.*, 2016). Em animais o bloqueio farmacológico com GBR12909 causa prejuízo nessa resposta (KWEK; VAN DEN BUUSE, 2013) e o mesmo é observado em animais que não expressam esse transportador (RALPH *et al.*, 2001; YAMASHITA *et al.*, 2006). Entretanto, animais com baixa expressão de DAT exibem maior magnitude na resposta de sobressalto mas não tem prejuízos no PPI, sugerindo que basta um pequeno aumento na disponibilidade desse transportador para um efeito protetor (RALPH-WILLIAMS *et al.*, 2003).

2.5.Sistema Endocanabinoide

Em 1964 os pesquisadores Mechoulam e Gaoni elucidaram a estrutura química do delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), marcando o início das pesquisas com canabinóides, o que levaria à identificação do sistema endocanabinoide (DI MARZO, 2006; MECHOULAM *et al.*, 2014). Desde então, diversos trabalhos apontam esse sistema como potencial alvo terapêutico para diversas doenças, incluindo transtornos psiquiátricos (CARVALHO; VAN BOCKSTAELE, 2012; PACHER; SÁNDOR BÁTOKAI; GEORGE KUNOS, 2006). O sistema endocanabinoide é composto principalmente pelos receptores CB₁ e CB₂, pelos ligantes endógenos aracdonoiletanolamida (também denominada anandamida) e 2-aracdonoilglicerol (2-AG) e pelas enzimas envolvidas na síntese e degradação desses dois ligantes.

A síntese dos endocanabinodes ocorre sob demanda, isso é, em resposta a algum estímulo prévio e não são armazenados em vesículas (PIOMELLI, 2003). As principais enzimas envolvidas na degradação dos endocanabinóides são a amido-hidrolase de ácidos graxos (*fatty acid amide hydrolase*, FAAH) e a monoacilglicerol lipase (*monoacylglycerol lipase*, MAGL), que degradam anandamina e 2-AG, respectivamente. A inibição do funcionamento dessas enzimas é capaz de potencializar os efeitos desses neurotransmissores (PIOMELLI, 2003). Ambos receptores, CB₁ e CB₂, são acoplados a uma proteína G inibitória, reduzindo os níveis de AMPc (HOWLETT; ABOOD, 2017; MECHOULAM; PARKER, 2013; PIOMELLI, 2003).

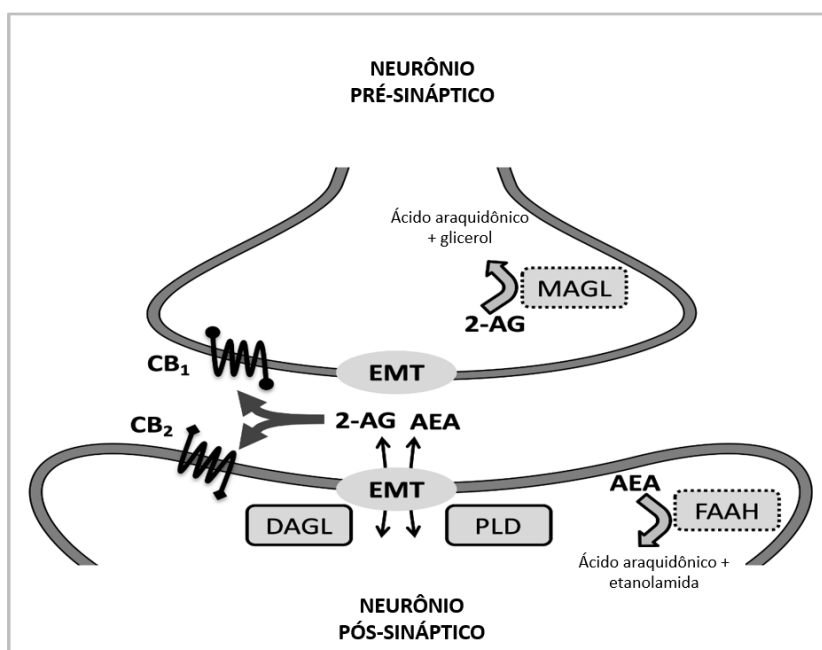


Figura 3: Ilustração do Sistema Endocanabinóide.

2-AG: 2-araquidonil glicerol; AEA: araquidonoil etanolamida (anandamida); FAAH: amido-hidrolase de ácidos graxos; MAGL: monoacil glicerol lipase; CB₁: receptor canabinóide tipo 1; CB₂: receptor canabinóide tipo 2. Imagem modificada de Asth et al, 2020 (em submissão).

Os receptores canabinóides do tipo CB₁ são abundantemente expressos no cérebro (BUSQUETS GARCIA *et al.*, 2016; HERKENHAM *et al.*, 1990; PETTIT *et al.*, 1998), incluindo áreas relacionadas à sintomatologia do transtorno bipolar como córtex cingulado, hipocampo, amígdala basal e estriado (ASHTON *et al.*, 2005). Estão presentes em neurônios

glutamatérgicos e gabaérgicos (KATONA *et al.*, 1999; MARSICANO; LUTZ, 1999) e, por isso, participam de várias respostas comportamentais. Em relação a neurotransmissão dopaminérgica, regulam as vias nigroestriatal e mesocorticolímbica, (COVEY *et al.*, 2017; EL KHOURY *et al.*, 2012; FITZGERALD; SHOBIN; PICKEL, 2012; MATEO *et al.*, 2017).

A expressão de receptores CB₂ no SNC foi demonstrada mais recentemente. São mais abundantemente expressos nas células imunes da periferia, mas também podem ser encontrados no cérebro em células da glia e neurônios (GONG *et al.*, 2006; ONAIVI, EMMANUEL S., 2007). Estudos mostram a expressão desse receptor em neurônios hipocámpais e da substância nigra, além da micróglia (ATWOOD; MACKIE, 2010; BRUSCO, A. *et al.*, 2008; BRUSCO, ALICIA *et al.*, 2008; ONAIVI, E S *et al.*, 2012). Há evidências também de expressão em neurônios dopaminérgicos da ATV (ZHANG *et al.*, 2014, 2017). Há aumento da imunoreatividade para o RNAm desse receptor em outras regiões cerebrais, como estriado e córtex (GONG *et al.*, 2006). Essa aparente baixa expressão têm potencial terapêutico, uma vez que drogas seletivas para esse receptor tendem a ter menos efeitos psicotrópicos (ATWOOD; MACKIE, 2010).

A liberação de anandamida no estriado aumenta após a injeção do agonista D₂ quinpirole, e esse efeito é bloqueado pela administração do antagonista seletivo, raclopride (GIUFFRIDA *et al.*, 1999). A cocaína, por sua vez, é capaz de induzir a liberação de 2-AG na ATV e, assim ativar receptores CB₁ localizados em neurônios GABAérgicos, desinibindo assim neurônios dopaminérgicos (WANG *et al.*, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Estima-se que aproximadamente 1% da população seja acometida pelo transtorno bipolar ao longo da vida (BLANCO *et al.*, 2017; GRANDE *et al.*, 2016). Tanto a depressão unipolar quanto o transtorno bipolar podem reduzir a longevidade por piora do prognóstico de outras doenças, tais como doenças cardiovasculares e diabetes (THASE; DENKO, 2008). Pode ser incapacitante devido ao seu início precoce, gravidade e cronicidade, causando prejuízos social e profissional (FERRARI *et al.*, 2016). Além disso, existe uma alta prevalência de tentativas e mortes por suicídio em pacientes com transtorno bipolar (COSTA *et al.*, 2015; LATALOVA; KAMARADOVA; PRASKO, 2014; SCHAFFER *et al.*, 2015).

Ainda não existe um modelo animal que reproduza as flutuações de humor características desse transtorno, por isso é de extrema importância utilizar os modelos disponíveis para buscar compreender a neurobiologia desse transtorno. Propomos investigar a participação do sistema endocanabinóide considerando suas interações com a dopamina e suas promissoras características como alvo terapêutico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Testar a hipótese de que o sistema endocanabinóide esteja envolvido nos efeitos decorrentes da inibição farmacológica (GBR12909) ou genética (*knockdown*) do transportador de dopamina em testes preditivos para o comportamento tipo-mania.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Validar o modelo tipo-mania induzido pelo GBR12909 em camundongos da linhagem C57Bl/6J no campo aberto;
- 2) Verificar se a modulação do sistema endocanabinóide reverte os efeitos comportamentais induzidos pelo GBR12909;
- 3) Comparar os resultados da inibição aguda de DAT (por meio do GBR12909) com a inibição crônica, utilizando animais com baixa expressão para esse transportador (animais DAT KD).

Diante das diferentes abordagens empregadas para investigar os efeitos da modulação do sistema endocanabinóide frente a inibição do transportador de dopamina, dividimos metodologia e resultados em duas partes:

A: Avaliação de comportamento induzido pela inibição aguda de DAT no campo aberto

B: Avaliação de comportamentos induzidos pela inibição aguda e crônica de DAT no BPM e no teste de inibição pré-pulso

PARTE A: AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO AGUDA DE DAT NO CAMPO ABERTO

5. MATERIAIS

5.1. Animais

Os testes comportamentais foram realizados em camundongos machos da linhagem C57BL/6Junib, com idade entre 10 e 15 semanas e pesando de 20 a 30 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da UFMG, com adequado controle de luz e temperatura, livre acesso à ração e água, e sob ciclo claro-escuro de 12h/12h, sendo os testes realizados sempre durante a fase clara. Os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UFMG sob o número de protocolo 078/2014.

5.2. Drogas

Utilizamos o inibidor seletivo do transportador de dopamina GBR12909 (Sigma Aldrich®), diluído em salina 0,9%, nas doses de 5, 10 e 15mg/kg. Para validação do modelo utilizamos o Carbonato de Lítio (Sigma Aldrich®), nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e diluído em 4% de HCl e 96% de salina 0,9%. Para avaliar a participação de receptores CB₁, utilizamos o agonista inverso AM251(Sigma Aldrich®), nas seguintes doses: 0,1; 0,3; 1 e 3 mg/Kg. Também utilizamos Canabidiol (CBD – BSPG), diluído em 5% de tween 80 e 95% de salina estéril 0,9%, nas doses de 15, 30 e 60 mg/Kg. A participação de receptores CB₂ foi avaliada por meio da administração do agonista JWH133 (Tocris Bioscience®), nas doses de 0,3; 1 e 3

mg/Kg. AM251 e JWH133 foram diluídos em cremofor, etanol e salina na proporção 1:1:18 (vol/vol).

6. MÉTODOS

6.1. Avaliação Comportamental

Avaliamos o comportamento dos camundongos C57BL/6J no campo aberto frente a três diferentes protocolos de administração de GBR12909 (Figura 4A), com o objetivo de avaliar qual o mais robusto para as etapas seguintes. O primeiro protocolo consistiu na habituação de 10 min seguida da injeção de GBR ou salina e exposição na arena por mais 20min. No segundo os animais eram colocados no campo aberto imediatamente após a injeção e a distância percorrida era avaliada durante os 30 min seguintes. No terceiro os animais recebiam a injeção de GBR12909 e 2h depois eram expostos ao campo aberto.

Os pré-tratamentos (Figura 4B) consistiram na administração de Carbonato de Lítio ou de um dos moduladores do sistema endocanabinóide, além dos grupos que receberam veículo. O intervalo entre o pré-tratamento e a próxima injeção foi de 20 min para o Carbonato de Lítio e de 30 min para as demais drogas. Após esse tempo os animais recebiam GBR12909 ou salina e logo em seguida o comportamento no campo aberto era observado durante 30 min. No protocolo de pré-tratamento subcrônico (Figura 4C) os animais receberam 5 injeções de Carbonato de Lítio ou veículo, com intervalo de 12h entre elas e no dia teste o pré-tratamento foi realizado, conforme o protocolo com habituação de 10 min.

Todas as drogas foram administradas pela via intraperitoneal e comparadas com o respectivo controle, em experimentos independentes. Os experimentos foram filmados com auxílio de uma câmera de vídeo localizada 2,0 metros acima do campo aberto.

Simultaneamente, com auxílio do software ANY-MAZE (versão 4.5), a distância total percorrida pelos animais foi registrada.

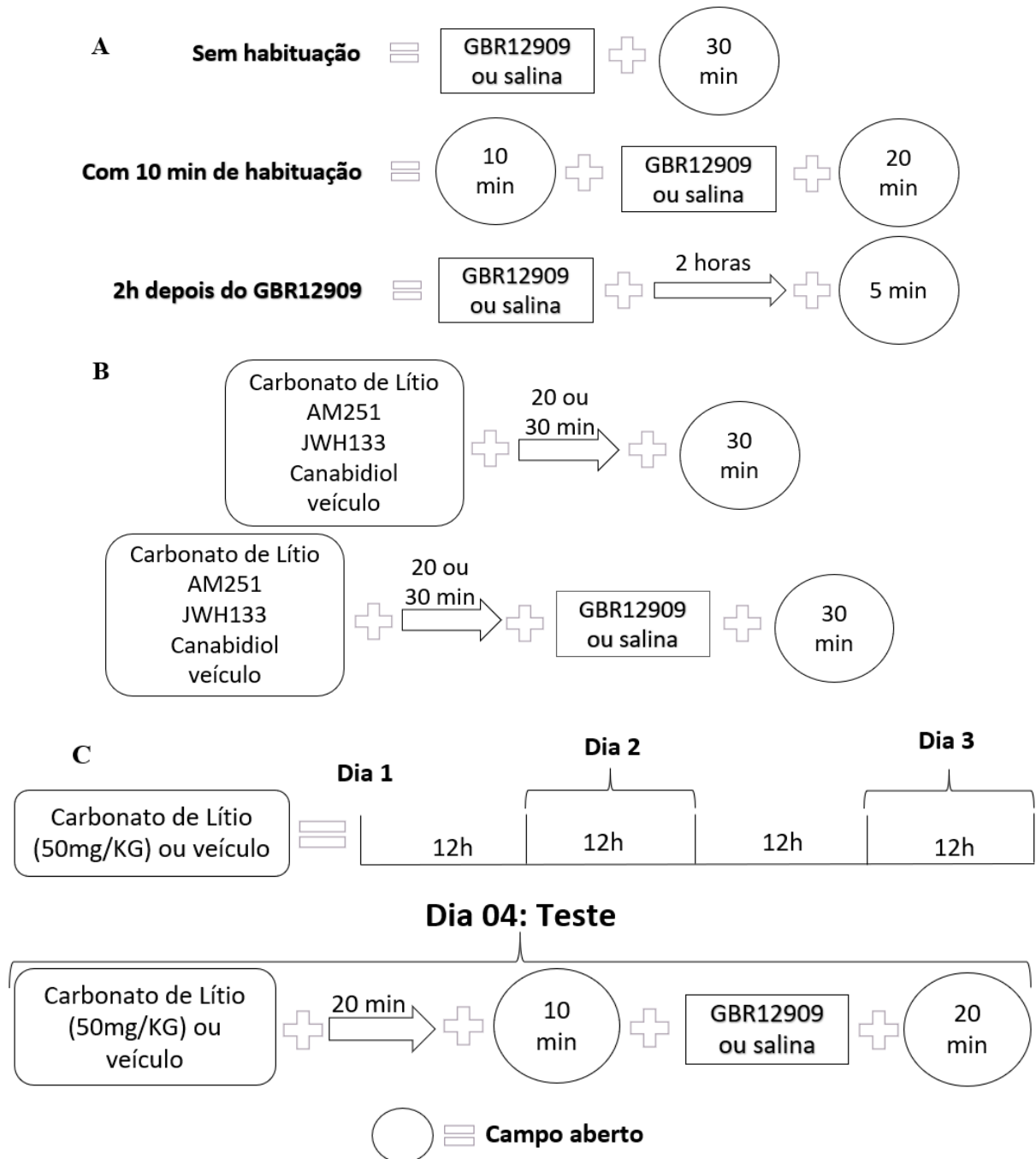


Figura 4: Delineamento experimental – Parte A.

A: Diagramas esquemáticos dos três diferentes protocolos utilizados para avaliar a hiperlocomoção induzida pelo GBR12909. B: Diagramas demonstrativos dos intervalos de pré-tratamentos. C: Esquema do pré-tratamento subcrônico com o Carbonato de Lítio.

6.2. Análise Estatística

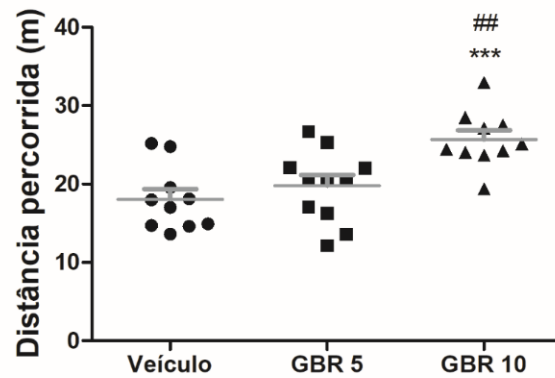
A análise estatística foi realizada por meio do software Prism8 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) pra Windows. Os grupos foram comparado pelo teste ANOVA de uma ou duas vias, de acordo com a quantidade de variáveis independentes, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ para todos os casos. Os dados estão expressos como a média +/- erro padrão da média, apresentados em cinza. Os pontos correspondem à distância total percorrida por animal.

7. RESULTADOS

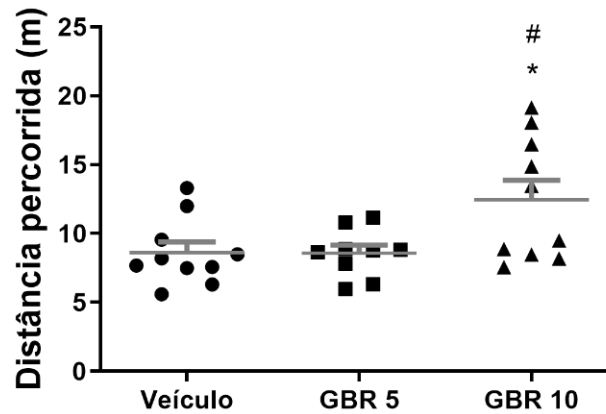
7.1. Padronização do protocolo de indução da hiperlocomoção

Para verificar qual o protocolo mais sensível em detectar os efeitos do GBR12909 na locomoção, avaliamos três diferentes possibilidades. O grupo de animais que recebeu GBR12909 na dose de 10 mg/Kg exibiu aumento de locomoção nos protocolos sem habituação [$F(2, 28) = 9,549$; *** $p = 0,0007$] e com [$F(2, 26) = 4,970$; * $p = 0,0149$]. Nenhuma das doses de GBR12909 diferiu do grupo controle no protocolo de exposição a arena 2h depois da injeção [$F(2, 27) = 0,9680$; $p = 0,3926$] (Figura 5).

A



B



C

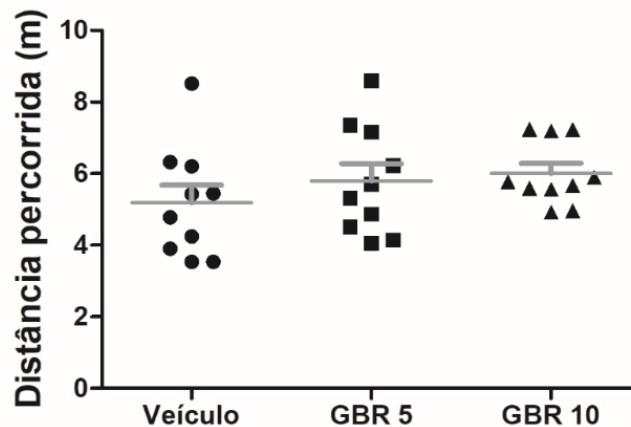


Figura 5: Efeito da administração aguda de GBR12909 em três diferentes protocolos.

A: distância total percorrida logo após a administração de GBR12909 avaliada por 30 min no campo aberto; n = 10-11-10. B: distância total após a injeção de GBR no protocolo com habituação de 10 min; correspondente ao intervalo de 11 a 30 min no campo aberto; n = 10-9-10. C: distância percorrida 2h após a administração de GBR avaliada por 5 min no campo aberto; n = 10/grupo.

Dados expressos como média +/- EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni.

* em relação ao grupo veículo e # em relação ao grupo GBR5. .

7.2. Validação preditiva do modelo com Carbonato de Lítio

Avaliamos se a administração de Carbonato de Lítio influencia a locomoção basal dos animais. O pós-teste de Bonferroni mostrou que a maior dose testada 100 mg/kg diminuiu a locomoção em relação aos grupos veículo e Li 25. Já a dose de 50 mg/Kg foi diferente somente em relação ao grupo veículo [F (3,34) = 11,80; *** p <0,0001] (Figura 6).

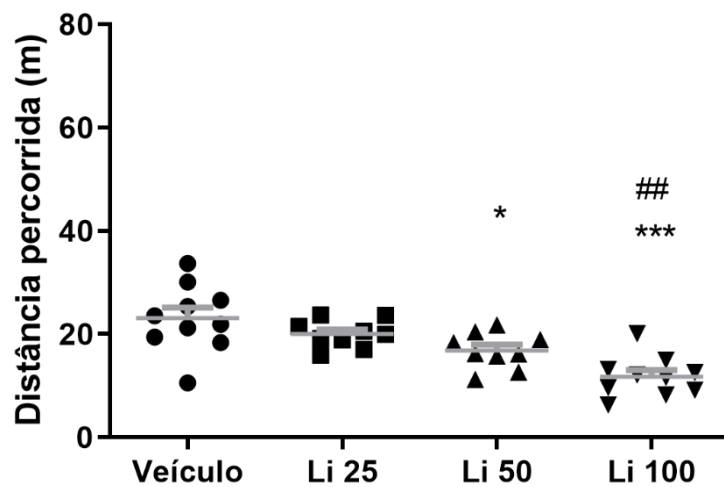


Figura 6: Curva dose-resposta do Carbonato de Lítio.

*Distância total percorrida em 30min; n = 10-9-9-10. Dados expressos como média +/- EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni, * em relação ao grupo veículo e # em relação Li25.*

Na etapa seguinte buscamos avaliar se as doses de 25 e 50 mg/ Kg de Carbonato de Lítio eram capazes de reverter a hiperlocomoção induzida pela dose de 10 mg/Kg de GBR12909 no protocolo com habituação. Observa-se que o Carbonato de Lítio não interfere na locomoção após a injeção de GBR12909 [F (3,29) = 3,569; * p = 0,0260] (Figura 7).

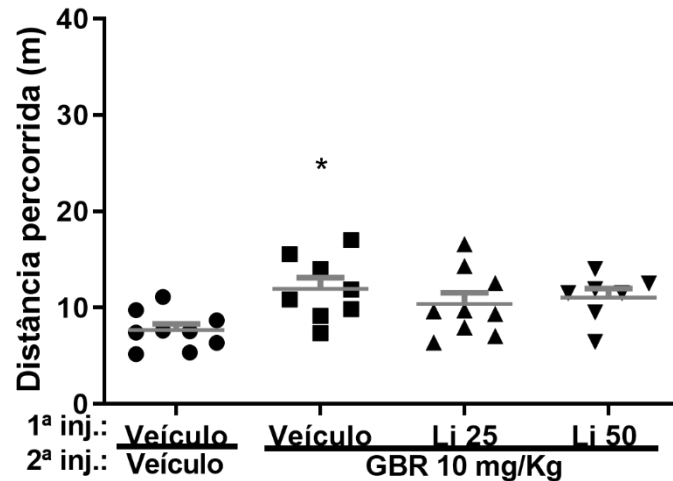


Figura 7: Efeito do pré-tratamento agudo com Carbonato de Lítio na hiperlocomoção induzida pela dose de 10 mg/Kg de GBR12909 no protocolo com habituação.

Distância total percorrida durante os 20min seguintes à injeção de GBR12909; $n = 9-8-9-7$ Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni, * em relação ao grupo veículo.

Embora a dose de 10 mg/Kg tenha aumentado a locomoção no experimento anterior, optamos por aumentar a dose de GBR12909 para 15mg/Kg, seguindo trabalhos anteriores do nosso grupo (BASTOS *et al.*, 2018). Entretanto, observamos que nenhuma das doses testadas preveniu a hiperlocomoção induzida por essa dose de GBR12909 durante os 20 min avaliados [$F(3,33) = 3,378$; * $p = 0,0297$] (Figura 8).

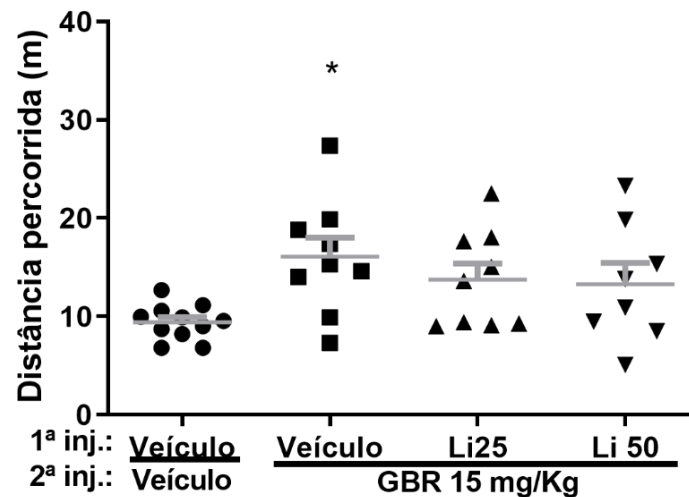


Figura 8: Efeito do pré-tratamento agudo com Carbonato de Lítio na hiperlocomoção induzida pela dose de 15 mg/Kg de GBR12909 no protocolo com habituação.

Distância total percorrida durante os 20min seguintes à injeção de GBR12909; $n = 11-9-9-8$. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni, * em relação veículo + veículo

Como o pré-tratamento agudo com Carbonato de Lítio não foi capaz de reverter a hiperlocomoção induzida pelo GBR12909, avaliamos os efeitos da administração subcrônica da dose de 50 mg/Kg desse composto. Embora o ANOVA de duas vias mostre efeito do GBR12909 [F (1, 31) = 5,586; * p = 0,0246], o pós-teste de Bonferroni não mostrou diferença entre os grupos veículo + veículo e veículo + GBR. Dessa forma, não é possível apontar os efeitos do tratamento subcrônico com Carbonato de Lítio no grupo que também recebeu GBR12909, embora o Lítio também tenha efeito [F (1, 31) = 6,734; * p = 0,0143]. Não há interação entre os dois fatores [F (1, 31) = 1,913; p = 0,1765] (Figura 9).

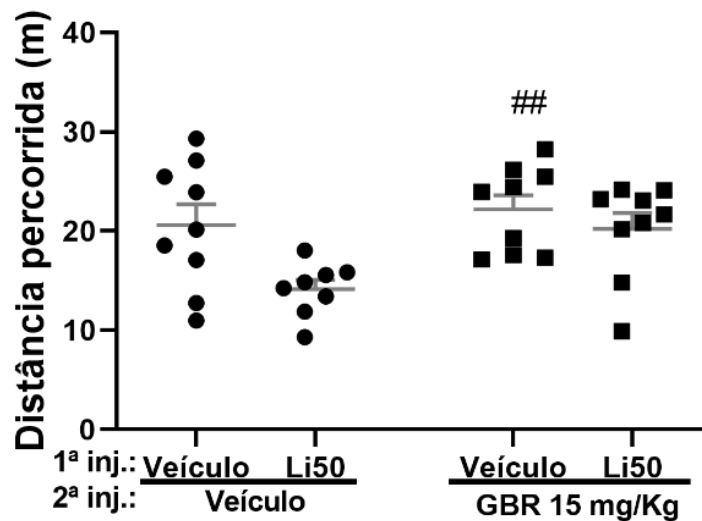


Figura 9: Efeito do pré-tratamento subcrônico com Carbonato de Lítio na hiperlocomoção induzida pela dose de 15 mg/Kg de GBR12909 no protocolo com habituação.

*Distância total percorrida durante os 20min seguintes à injeção de GBR12909; n = 9-8-9-9.
Dados expressos como média +/- EPM. ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni;
em relação ao grupo veículo + Li 50.*

Diante da ausência do efeito do GBR12909 no experimento subcrônico, testamos novamente o pré-tratamento com Carbonato de Lítio agudo, mas dessa vez no protocolo sem habituação. Desse modo, a distância percorrida foi analisada nos 30min seguintes a administração de GBR12909 na dose de 15 mg/Kg. Observamos que nesse protocolo o grupo veículo + GBR exibiu hiperlocomoção [Efeito do GBR: F (1, 36) = 17,64; *** p = 0,0002] e houve também efeito do Carbonato de Lítio [F (1, 36) = 4,200; * p = 0,0478], mas não houve

interação entre esses fatores [F (1, 36) = 1,045; p = 0,3135]. O pós-teste de Bonferroni não mostrou diferença do grupo Li 50+GBR com os demais (Figura 10).

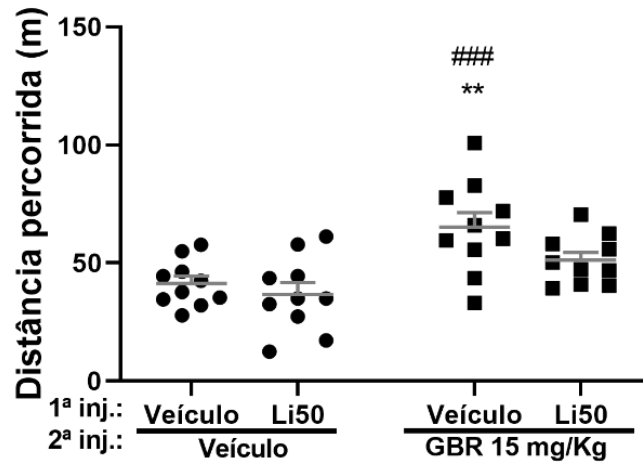


Figura 10: Efeito do pré-tratamento agudo com Carbonato de Lítio na hiperlocomoção induzida pela dose de 15 mg/Kg de GBR12909 no protocolo sem habituação.

Distância total percorrida durante os 30min seguintes à injeção de GBR12909, n = 10/grupo. Dados expressos como média +/- EPM. ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni, * em relação ao grupo veículo + veículo e # Li 50 + veículo.

7.3.Efeito do pré-tratamento com agonista inverso/antagonista CB₁ AM251

Avaliamos se somente a administração do agonista inverso de receptores CB₁ já é capaz de alterar a locomoção dos animais. Nenhuma das doses testadas alterou a locomoção [F (3,35) = 0,2692; p = 0,8471] (Figura 11).

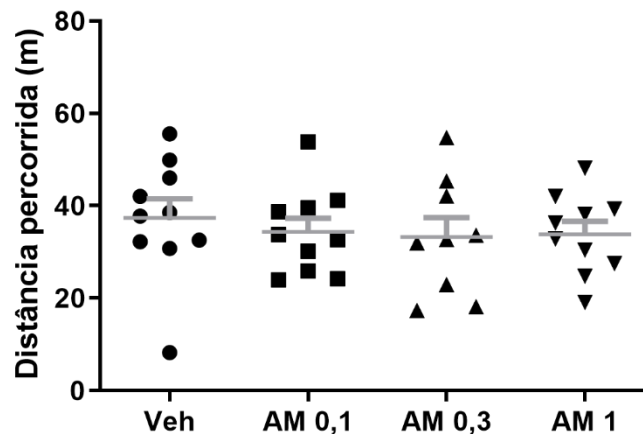


Figura 11: Curva dose-resposta do agonista inverso de receptores CB₁, AM251.

Distância total percorrida durante 30 min. Locomoção, n = 10,10,9 e 10 respectivamente. Dados expressos como média +/- EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni.

Houve efeito do GBR em relação ao grupo controle (veículo + veículo) mas não há diferença estatística entre os grupos que receberam AM251 e GBR12909 e o grupo que recebeu veículo + GBR12909 [$F(4,45) = 6,873$; *** $p = 0,0002$] (Figura 12), indicando que o pré-tratamento não teve efeito em prevenir a hiperlocomoção.

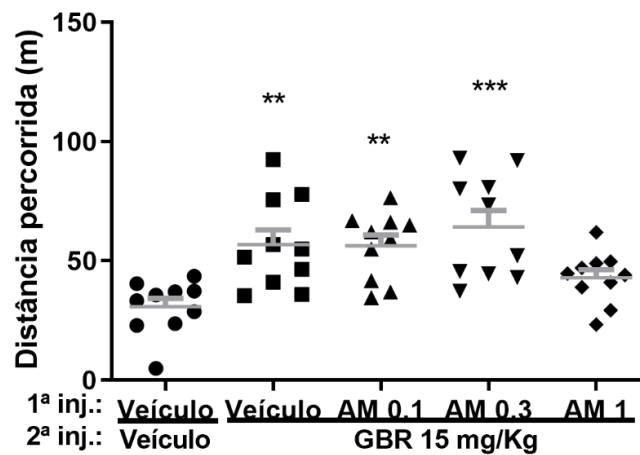


Figura 12: Efeito do agonista inverso CB_1 AM251 na hiperlocomoção induzida por GBR12909 no protocolo sem habituação.

Distância percorrida durante os 30 min seguintes a injeção; $n = 10$ /grupo.

*Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni, * em relação ao grupo veículo + veículo.*

Optamos por testar uma dose maior de AM251, nesse caso a de 3 mg/Kg, que também está na faixa de ação seletiva para receptores CB_1 . Observamos que essa dose foi capaz de reverter o aumento de locomoção induzido pelo GBR12909. [Efeito do GBR12909: $F(1, 36) = 12,46$; ** $p = 0,0012$]; [Efeito do AM251: $F(1, 36) = 10,68$; ** $p = 0,0024$]; [Interação: $F(1, 36) = 0,8767$; $p = 0,3554$] (Figura 13).

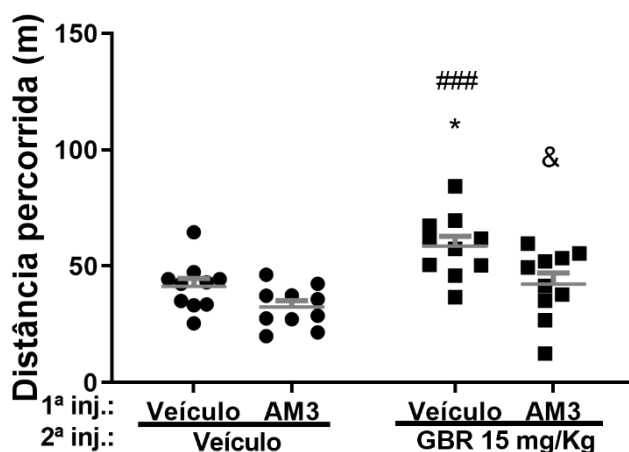


Figura 13: Efeito do pré-tratamento com agonista inverso CB₁ AM251 na dose de 3 mg/Kg na hiperlocomoção induzida por 15 mg/Kg de GBR12909 avaliado no protocolo sem habituação.

Distância total percorrida em 30 min, logo após a injeção de GBR12909, $n = 10/\text{grupo}$. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni, * em relação ao grupo veículo + veículo; # em relação ao grupo AM3 + veículo; & em relação ao grupo veículo + GBR.

7.4. Efeito do pré-tratamento com agonista CB₂ JWH133

Nenhuma das doses testadas do agonista de receptores CB₂, JWH133 alterou a locomoção basal dos animais [$F(3,34) = 1,994$; $p = 0,1333$] (Figura 14).

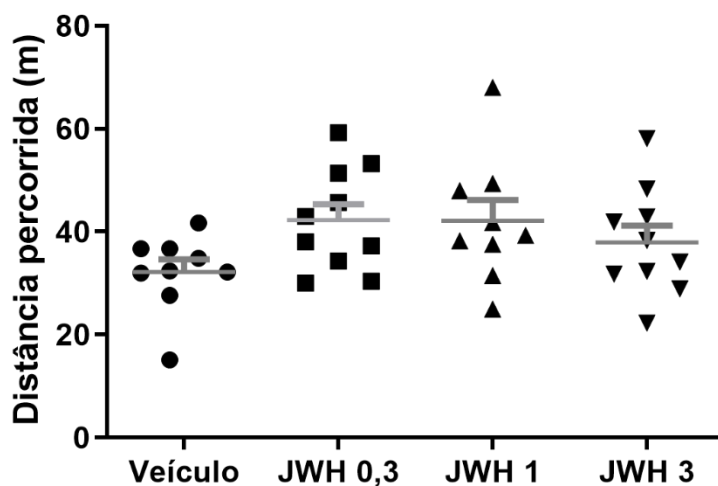


Figura 14: Curva dose-resposta do agonista CB₂ JWH133.

Distância total percorrida durante 30 min; $n = 9, 10, 9, 10$ respectivamente. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni.

Embora o GBR12909 tenha induzido o aumento da locomoção nos grupos em que foi administrado, o pré-tratamento com agonista de receptores CB₂ JWH133 não foi capaz de

reverter esse efeito em nenhuma das doses testadas [F (4,45) = 5,204; ** p = 0,0016]. (Figura 15).

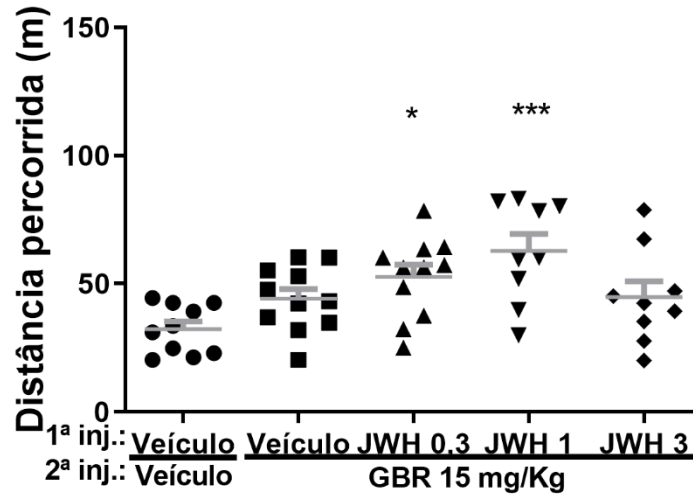


Figura 15: Efeito do pré-tratamento com o agonista de receptores CB_2 JWH133 na hiperlocomoção induzida por GBR12909 no protocolo sem habituação.

Distância total percorrida durante 30 min; n = 10,11,11,9,9, respectivamente.
 Dados expressos como média +/- EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni
 * em relação ao grupo veículo + veículo.

7.5.Efeito do pré-tratamento com Canabidiol

A administração de Canabidiol não interfere na locomoção basal dos animais, como demonstra a curva dose resposta [F (3,36) = 1,499; p = 0,2312] (Figura 16).

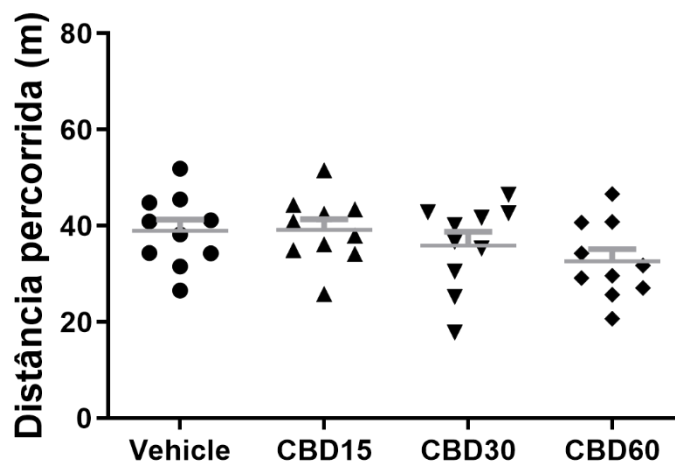


Figura 16: Curva dose-resposta do Canabidiol.

Distância total percorrida durante 30 min no campo aberto; n = 10/grupo.
 Dados expressos como média +/- EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni.

Novamente o grupo veículo + GBR12909 não foi estatisticamente diferente do grupo veículo + veículo. Entretanto, podemos observar que nenhuma das doses de canabidiol testadas como pré-tratamento preveniu a hiperlocomoção induzida pelo GBR12909. [F (4,43) = 7,846; $p < 0,0001$] (Figura 17).

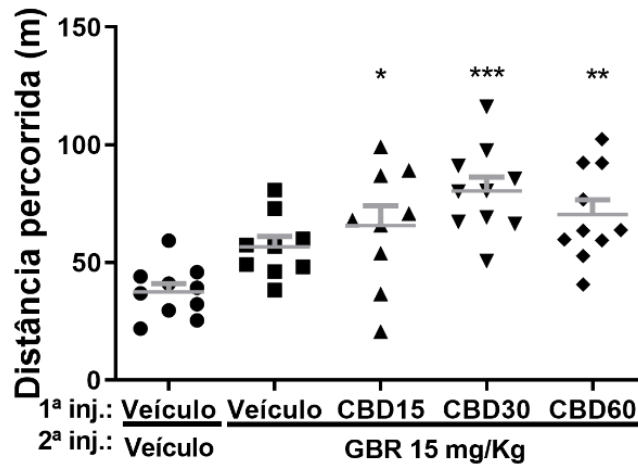


Figura 17: Efeito do pré-tratamento Canabidiol na hiperlocomoção induzida por 15 mg/Kg de GBR12909 avaliado no protocolo sem habituação.

Distância total percorrida em 30 min, logo após a injeção de GBR12909; $n = 10, 9, 9, 10$ e 10 respectivamente. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni, * em relação ao grupo veículo + veículo.

7.6. Tabela resumo dos Resultados da Parte A

Droga	Mecanismo de ação	Curva dose-resposta	Hiperlocomoção induzida por GBR12909
Carbonato de Lítio	Inibição da via AKT/GSK3 β (dentre outros)	+/-	↓
AM251	Antagonista CB ₁	-	↓
JWH133	Agonista CB ₂	-	-
Canabidiol	Aumenta níveis de anandamida	-	-

PARTE B: AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA INIBIÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE DAT NO BPM E NO TESTE DE INIBIÇÃO PRÉ-PULSO

8. MATERIAIS

8.1. Animais

Na primeira etapa dos experimentos utilizamos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6J, a partir de 8 semanas de idade, fornecidos pelo Jackson Laboratory. Fêmeas e machos com baixa expressão do transportador de dopamina (DAT KD, do inglês *knockdown*) e seus respectivos *wild-type*, de background C57BL, foram utilizados na segunda etapa de experimentos. Todos animais foram mantidos no biotério da University of California in San Diego (UCSD) sob ciclo claro-escuro de 12h (19h-7h claro) e as análises comportamentais foram realizadas durante a fase escura, após 1 semana de aclimação ao biotério e a cada dia de teste os animais permaneciam 1h após na sala de experimentos também para aclimação. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*, exceto durante os testes comportamentais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da UCSD (UCSD Institutional Animal Care and Use Committee).

8.2. Drogas

Para inibição aguda do transportador de dopamina utilizou-se a dose de 16 mg/Kg de GBR 12909 dihydrochloride (Sigma Aldrich®), diluído em salina 0,9%. Já para a modulação do sistema endocanabinóide utilizamos as seguintes drogas:

- AM251, doses 0,3; 1 e 3 mg/Kg (Tocris Bioscience®): Antagonista de receptor CB₁

- JZL184, doses 1,6; 5,1 e 16 mg/Kg (Cayman Chemical®): Inibidor da enzima MGL, que hidrolisa o 2-AG
- AM630, doses 1; 3 e 10 mg/Kg (Cayman Chemical®): Antagonista de receptor CB₂/agonista inverso
- URB597, doses 0,3; 1 e 3 mg/Kg (Cayman Chemical®): Inibidor da enzima FAAH, que hidrolisa a anandamida
- Canabidiol ou CBD, doses 0,3; 1 e 3 mg/Kg (Cayman Chemical®):
- Δ9-Tetrahydrocannabinol ou THC, doses 0,3; 1 e 3 mg/Kg (fornecido pelo Instituto Nacional de Drogas de Abuso - National Institute on Drug Abuse - NIDA, Baltimore, MD):

CBD foi dissolvido em 5% de Tween 80 e 95% de salina 0,9%. O THC, que estava dissolvido em etanol, foi obtido após a evaporação desse sob um fluxo de nitrogênio, e o resíduo foi diluído em propileno glicol e Tween 80 na proporção de 1:1 e em seguida em salina. As demais drogas foram diluídas em cremofor, etanol e salina na proporção 1:1:18. As soluções foram administradas via intraperitoneal, a 10 ml/Kg, com exceção do THC, que foi a 5 ml/Kg.

9. MÉTODOS

9.1. BPM (Behavioral Pattern Monitor)

O monitor de padrão comportamental, do inglês *Behavioral pattern monitor* (BPM) (San Diego Instruments, San Diego, CA) são caixas de acrílico (30.5 × 61 × 38 cm), com onze orifícios de 1,25 cm de diâmetro, dispostos como mostrado na Figura 18, e possuem sensores infravermelhos que permitem avaliar atividades locomotora (distância e transições) e exploratória (“*nosepoking*” e “*rearings*”) dos animais. Cada caixa é fechada para minimizar a entrada de luz e som externos. Cada sessão teve 45 min de duração e foi realizada apenas com

luz branca dentro de cada câmara. Antes do teste os animais eram aclimatados por pelo menos 60 min na sala de experimentação e os testes foram realizados durante a fase escura do ciclo.

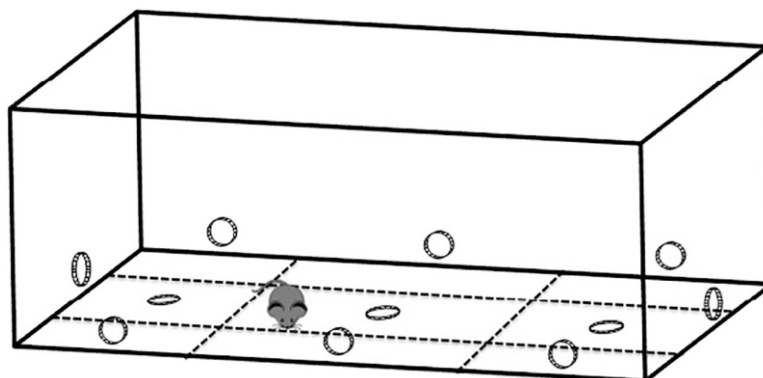


Figura 18: Representação do monitor de padrão comportamental.
(Behavioral pattern monitor – BPM. Imagem retirada de Kwiatkowski et al., 2019.)

9.2. Teste de Inibição Pré-Pulso (*Prepulse Inhibition - PPI*)

Utilizamos oito câmaras (SR-LAB, San Diego Instruments, USA), cada uma composta por um cilindro de acrílico de 5 cm de diâmetro, mantido dentro de uma caixa ventilada que atenua o som do ambiente externo e caixas de som posicionados acima dos cilindros transmitem os estímulos sonoros para o interior das câmaras. Os movimentos dos animais são transduzidos por acelerômetros piezoelétricos, posicionados sob os cilindros, e armazenados e digitalizados por um sistema de interface computacional.

O teste é iniciado após 5 min de habituação e durante todo o tempo o ambiente permanece iluminado e o som de fundo mantido em 65dB. Os pulsos de sobressalto tiveram duração de 40 ms e os pré-pulso de 20 ms, com intervalos entre os estímulos variando de 3 a 12 s (7 s de média). As sessões de sobressalto são compostas de 6 blocos. O primeiro consiste em cinco pulsos de 120 dB e o segundo de estímulos pré-pulsos de 69 (pp4), 73 (pp8) e 81 (pp16) dB antes do pulso de 100dB. O terceiro bloco os mesmos estímulos pré-pulsos de 69, 73 e 81 são pareados com os pulsos de 120 dB. Variações dos intervalos entre os estímulos pré-

pulso são apresentadas no quarto bloco, sendo o estímulo pré-pulso de 73 DB seguido do pulso de 120 dB por 25, 50 100, 200 e 500 ms. O quinto bloco inclui somente estímulos sonoros de sobressalto, com pulsos de 80, 90, 100, 110 e 120 dB. No último bloco são cinco estímulos de 120 dB que servirão para avaliar a habituação, quando analisados junto com os estímulos de 120 dB dos blocos anteriores. O valor de PPI foi calculado como a porcentagem de pontos de cada intensidade prepulso baseada no pulso de 120 dB com cada bloco: $\%PPI = 100 - [(magnitude\ do\ sobressalto\ pro\ prepulso + pulso / magnitude\ de\ sobressalto\ para\ pulso\ sozinho) * 100]$.

9.3.Delineamento Experimental

9.3.1. 1ª etapa: Pré-tratamento agudo com moduladores endocanabinóides em animais C57 tratados com GBR12909

A primeira etapa de experimentos teve como objetivo avaliar se alguma das seis drogas moduladoras do sistema endocanabinóide era efetiva em prevenir os efeitos induzidos pelo GBR12909 nos testes do BPM e PPI em animais C57 (n=7-8/grupo). Todas as drogas utilizadas como pré-tratamento ou seu respectivo veículo foram administrados 30 min antes do início do teste no BPM e os animais recebiam GBR12909 ou salina 20 min depois da primeira injeção, ou seja, 10 min antes do início do teste no BPM. Após os 45 min desse primeiro teste os animais eram imediatamente transferidos para as câmaras do PPI. Um intervalo mínimo de uma semana

foi respeitado entre os experimentos para garantir que houve a completa metabolização das diferentes drogas utilizadas.

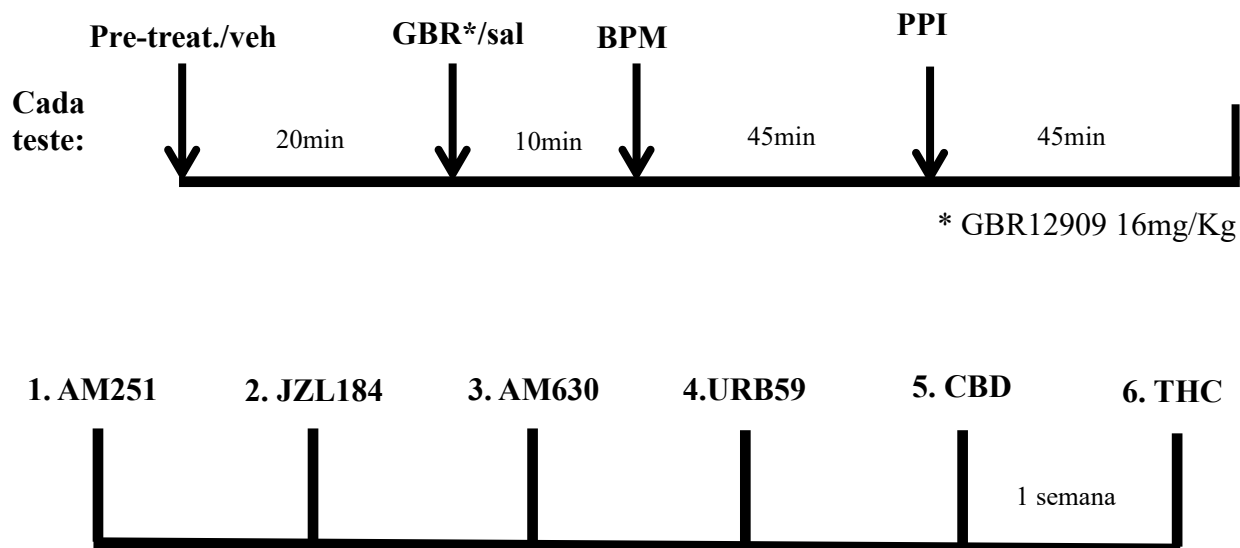


Figura 19: Delineamento experimental – Parte B.

A: Diagrama demonstrativo dos intervalos entre a administração das drogas e os testes comportamentais. B: Diagrama da ordem em que os diferentes moduladores endocanabinóides foram administrados.

9.3.2. 2ª etapa: Pré-tratamento com AM251 em animais knockdown para DAT

Após 1h de aclimatação na sala de experimentos os animais foram pre-tratados com AM251, na dose de 3 mg/Kg, 30 min antes do início do teste no BPM, que teve duração de 45min.

9.4. Análise Estatística

Os dados de cada experimento foram analisados por ANOVA de duas vias. Quando não houve diferença entre sexos ou interação de sexo com os outros fatores, os dados foram colapsados e novamente analisados. Utilizamos o software Biomedical Data Programs (BMDP)

statistical software (Statistical Solutions Inc., Saugus, MA) e o valor de alfa foi estabelecido em 0,05. Para comparações entre grupos utilizou-se o pós-teste de Tukey.

10. RESULTADOS:

10.1. 1ª etapa: Pré-tratamento agudo com moduladores endocanabinóides em animais C57 tratados com GBR12909

10.1.1. Efeito na distância percorrida

Nenhuma das drogas testadas como pré-tratamento teve interação com o fator sexo ou alterou a distância percorrida pelos animais em relação ao grupo controle. A administração de GBR12909 na dose de 16 mg/Kg foi efetiva em aumentar a distância percorrida em todos os experimentos testados (Figura 20 e APÊNDICE). Apenas AM251 [F (3,119) = 5.72, p=0.0011] e THC [F (3,117) = 4.02, p=0.0092] tiveram efeito, mas o pós-teste não mostrou diferença entre os grupos. Não houve interação entre esses pré-tratamentos e o GBR12909 [Interação AM251 and GBR: F (3,119) = 0,66, p=0,5767; Interação THC and GBR: F (3,117) = 1.18, p=0.3205].

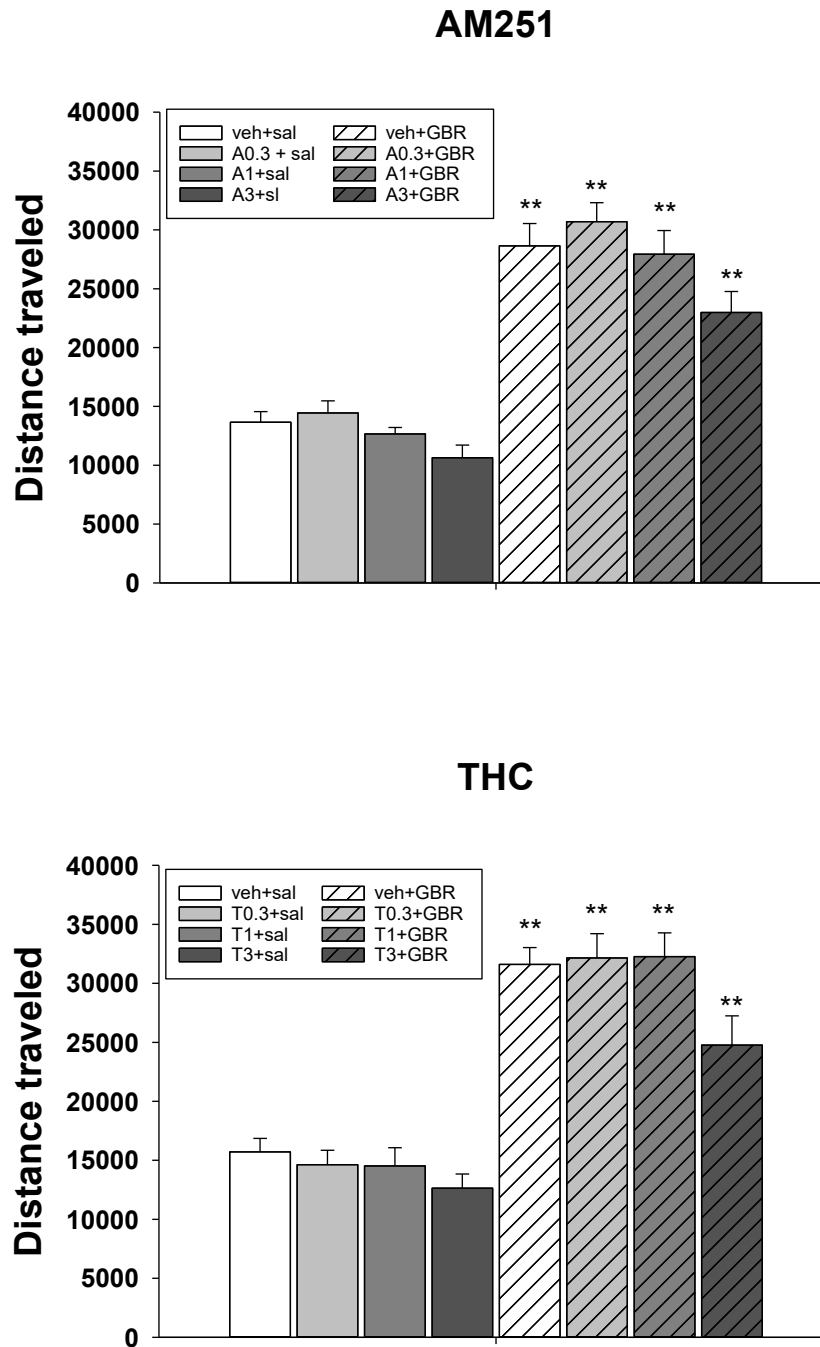


Figura 20: Efeito dos pré-tratamentos com AM251 e THC na hiperlocomção induzida por 16 mg/Kg de GBR12909 avaliados no BPM.

Dados agrupados sem o fator sexo e apresentados como média +/- EPM., n = 14-16. ** p < 0,05 em relação ao grupo veh+sal.

10.1.2. Efeito no número de Rearings

Não houve interação do fator sexo com nenhuma das drogas testadas e, por isso, os dados foram agrupados. Nenhum pré-tratamento alterou o número de rearings. Houve efeito da administração de GBR12909, mas o pós-teste de Tukey só mostrou diferença entre os grupos veh+sal e veh+GBR no experimento com AM251. A maior dose do AM251 (3 mg/KG) preveniu esse efeito [F (3,119) = 7.91, p=0.0001] mas não houve interação entre os fatores AM251 e GBR [F (3,119) = 1.52, p=0.2127]. (Figura 21 e APÊNDICE).

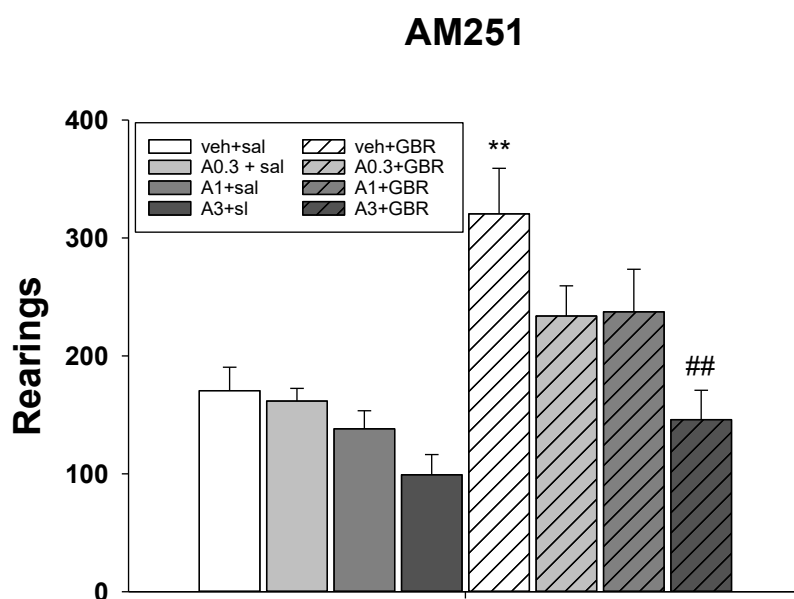


Figura 21: Efeito do antagonista CB1 AM251 no número de rearings induzido pela administração de 16 mg/Kg de GBR12909 no BPM.

Dados agrupados e apresentados como média +/- EPM, n = 15-16/grupo.

** em relação ao grupo veh+sal e ## em relação ao grupo veh+GBR

10.1.3. Efeitos na resposta de inibição pré-pulso

Não houve efeito do sexo por isso os dados foram agrupados. No teste de Inibição pré-pulso observamos que o GBR12909 diminui a porcentagem do PPI nas três intensidades de estímulos pré-pulso testadas [$F(1, 119) = 30.81, p = 0.0000$], indicando que esses animais exibem uma piora na resposta de sobressalto (mais assustados). O pré-tratamento com antagonista CB_1 AM251 não foi efetivo em prevenir essa resposta [AM251: $F(3, 119) = 1.89, p = 0.1344$] (Figura 22).

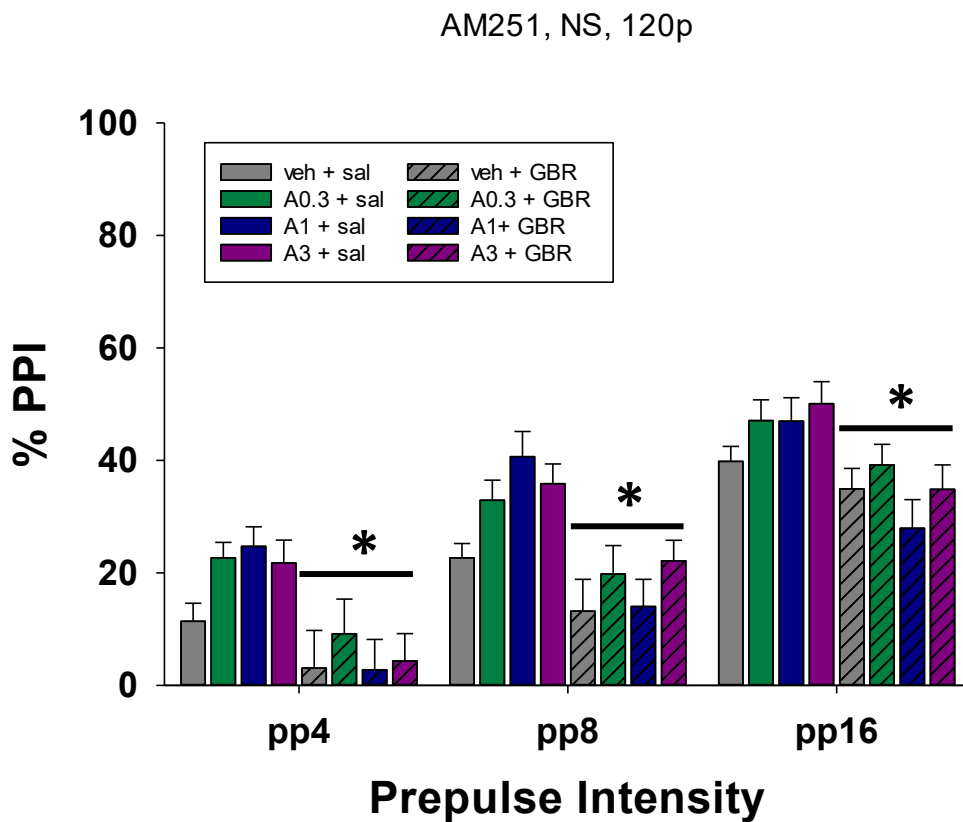


Figura 22: Efeito do antagonista CB_1 AM251 no teste de inibição pré-pulso.
 Intensidade dos estímulos pré-pulso: pp4 = 69 dB, pp8 = 73 dB e pp16 = 81 dB.
 Dados representados como média + E.P.M., n = 15-16/grupo.

10.2. 2ª etapa: Pré-tratamento com AM251 em animais DAT KD

10.2.1. Efeitos na distância percorrida

Animais DAT KD exibiram um aumento na distância percorrida em relação aos animais wild type [Efeito do genótipo: $F(1,49) = 45.26, p = 0.0000$]. AM251 na dose de 3 mg/Kg atenuou o aumento da locomoção nos animais nocaute [Efeito AM251: $F(1,49) = 7.36, p = 0.0092$]. Não houve interação entre os fatores sexo e pré-tratamento [$F(1,45) = 0.43, p = 0.5132$] e entre pré-tratamento e genótipo [$F(1,49) = 1.60, p = 0.2120$] (Figura 23).

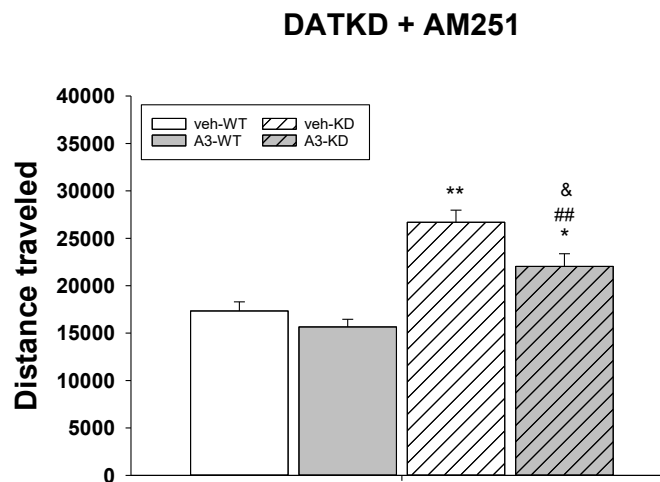


Figura 23: Efeito do antagonista CB1 na distância percorrida por animais DAT KD e Wild type.

Dados agrupados e apresentados como média \pm E.P.M.. * em relação ao grupo veh-WT;

em relação ao grupo A3-WT e & em relação ao grupo veh-KD.

10.2.2. Efeitos no número de Rearings

Animais com baixa expressão de DAT exibiram aumento no número de rearings em relação aos animais wild type [Efeito genótipo: Gene $F(1,49) = 22.24$, $p = 0.0000$]. O antagonista CB_1 , AM251, não teve efeito em prevenir o aumento no número de rearings nos animais nocaute [Efeito do AM251: $F(1,49) = 3.18$, $p = 0.0807$]. Não houve interação entre os fatores sexo e AM251 [$F(1,45)=0.57$, $p=0.4558$] e gene e AM251 [$F(1,49)=0.77$, $p=0.3838$] (Figura 24).

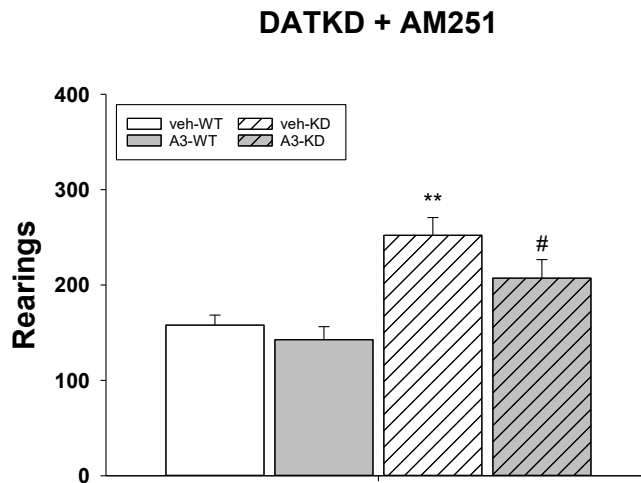


Figura 24: Efeito do antagonista CB_1 AM251 no n.º. de rearings em animais DAT KD e wild type.

Dados agrupados e apresentados como média e E.P.M.

* Em relação ao grupo veh-WT e # em relação ao A3-WT

10.3. Tabela resumo dos Resultados da Parte B

	Droga	Mecanismo de ação	Hiperlocomoção	Hiperexploração	PPI
GBR 12909	AM251	Antagonista CB₁	↓	↓	-
	THC	Agonista CB₁ and CB₂	↓	-	-
	JZL184	Inibidor da MAGL	-	-	-
	AM630	Antagonista CB ₂	-	-	-
	URB597	Inibidor da FAAH	-	-	-
	CBD	Aumenta níveis de anandamida	-	-	-
DAT KD	AM251	antagonista CB₁	↓	↓	NT

11. DISCUSSÃO

A inibição de DAT é capaz de induzir mudanças comportamentais em animais e o estudo dessas alterações são uma das formas disponíveis para elucidar as relações entre diferentes vias cerebrais. Nesse trabalho buscamos avaliar as interações do sistema endocanabinóide com o sistema dopaminérgico, utilizando a inibição farmacológica de DAT, através da administração do inibidor seletivo GBR12909, e também genética, com animais com baixa expressão desse transportador. Já a participação do sistema endocanabinóide foi avaliada pela administração de drogas que atuam em diferentes etapas da neurotransmissão, como na degradação de ligantes endógenos e no bloqueio de receptores.

11.1. Avaliação da hiperatividade em modelos animais de mania

Algumas das alterações comportamentais induzidas pela inibição de DAT podem ser úteis também para compreender a fisiopatologia de algumas doenças, dentre elas, a fase maníaca do TB. O comportamento mais comumente avaliado em modelos animais para mania é a alteração na locomoção e, embora não seja um parâmetro utilizado no diagnóstico, já foi demonstrado que pacientes em mania apresentam hiperatividade (HENRY *et al.*, 2010; PERRY *et al.*, 2009, 2010; YOUNG *et al.*, 2007). A inibição de DAT é capaz de desencadear essa resposta comportamental e sua utilização como modelo do comportamento tipo-maníaco tem sido amplamente demonstrada, seja com a administração de GBR12909 (BASTOS *et al.*, 2018; QUEIROZ *et al.*, 2015; VAN ENKHUIZEN *et al.*, 2012) ou em animais DAT KD (KWIATKOWSKI *et al.*, 2017). O efeito do GBR12909 se mostrou robusto, uma vez que desencadeou hiperlocomoção tanto durante a fase clara como na fase escura.

Cabe destacar que anfetaminas também são utilizadas para avaliar o comportamento tipo-mania em animais, embora o fato dessas substâncias não serem seletivas limite a interpretação de alguns resultados.

Demonstramos parcialmente a validade preditiva do GBR12909 como indutor do comportamento tipo-mania em animais, com a administração de carbonato de lítio, fármaco estabilizador do humor de primeira escolha para o tratamento de pacientes bipolares. A dose de 50 mg/Kg atenuou o aumento de locomoção induzido pelo GBR12909 em animais C57Bl6, o que está de acordo com outros dados obtidos por nosso grupo em animais da linhagem Swiss (BASTOS *et al.*, 2018). O pré-tratamento com Carbonato de Lítio tem se mostrado eficaz em atenuar o aumento de locomoção induzido por GBR12909, tanto de forma aguda como crônica (BASTOS *et al.*, 2018; QUEIROZ *et al.*, 2015; VAN ENKHUIZEN *et al.*, 2015). A diminuição da locomoção basal após a administração de doses altas dessa substância pode estar relacionada a sua estreita faixa terapêutica. A inibição de DAT como modelo tipo-mania também já foi validada com Valproato e Aripiprazol revertendo hiperlocomoção (BASTOS *et al.*, 2018; VAN ENKHUIZEN *et al.*, 2012).

A validade preditiva de outros modelos que levam em conta alterações na neurotransmissão dopaminérgica para o surgimento do comportamento tipo-mania em animais também já foi demonstrada com o lítio. O tratamento crônico foi capaz de prevenir a hiperlocomoção induzida por d-anfetamina (FREY; ANDREAZZA; *et al.*, 2006) e pela privação do sono paradoxal (DAL-PONT *et al.*, 2019), enquanto a injeção aguda preveniu os efeitos induzidos pelo metilfenidato (SOUZA *et al.*, 2016). Cabe destacar que os resultados do lítio revertendo o comportamento induzidos pela administração de anfetaminas variam entre diferentes espécies (FLAISHER-GRINBERG; EINAT, 2010; LAN; EINAT, 2019), sendo importante avaliar se o mesmo ocorre com outros psicoestimulantes. Interessantemente notar também que o lítio foi capaz de reverter tanto a hiperlocomoção quanto os comportamento tipo-

depressivos induzidos por uma única injeção de ouabaína, demonstrando a preditabilidade farmacológica dos modelos animais de transtorno bipolar (VALVASSORI *et al.*, 2019).

Diversos alvos tem sido apontados para a ação do lítio. De importância para os efeitos anti-mania destacamos a inibição da via AKT/GSK3, por sua relação com a neurotransmissão dopaminérgica. A ativação de receptores D2 pode recrutar a via β -arrestina 2, que mantém AKT inativa, deixando GSK3 ativa livre. O lítio age tanto desestabilizando o complexo formado por β -arrestina/Proteína fosfatase 2/AKT quanto inibindo diretamente GSK3 β (BEAULIEU, 2011). Esses efeitos decorrentes do recrutamento de β -arrestina 2 parecem explicar o mecanismo como lítio, valproato e lamotrigina atuam como estabilizadores do humor (DEL'GUIDICE; BEAULIEU, 2015).

11.2. Participação de receptores CB₁ na resposta locomotora induzida pela inibição de DAT

Mostramos que o receptor canabinóide CB₁ parece mediar as respostas comportamentais analisadas tanto no campo aberto como no *BPM*. O antagonismo/agonismo inverso desse receptor previniu o aumento da locomoção e o aumento do número de rearings tanto em animais que receberam GBR12909, quanto em animais DAT KD.

Os ligantes endógenos canabinóides podem ativar receptores CB₁ localizados em neurônios GABAérgicos da ATV, diminuindo assim a liberação de GABA, que deixa de inibir neurônios dopaminérgicos (COVEY *et al.*, 2017; OLESON *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015; WENZEL *et al.*, 2018), resultando em aumento dos níveis de dopamina em estruturas mesocorticolímbicas. Portanto, o bloqueio de receptores CB₁ resulta no efeito oposto, ou seja, o aumento da liberação de GABA levando a inibição de neurônios dopaminérgicos na ATV, o que pode explicar os resultados obtidos com o antagonista/agonista inverso AM251 no presente

trabalho. A ativação de receptores CB₁ na ATV parece ser mediada principalmente pelo 2-AG e, um dos indícios é a alta expressão de diacilglicerol lipase- α (DGL- α), enzima envolvida na síntese desse neurotransmissor, em neurônios dessa estrutura (MÁTYÁS *et al.*, 2008).

O bloqueio de CB₁ também é capaz de reverter a hiperlocomoção induzida por outros psicoestimulantes como a metanfetamina (RODRIGUEZ *et al.*, 2011), d-anfetamina (TZAVARA *et al.*, 2009) e cocaína (DELIS *et al.*, 2017; GOBIRA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2020). A dose 3mg/Kg de AM251, entretanto, não foi capaz de alterar o aumento de locomoção aguda induzida por cocaína, mas preveniu a sensibilização (CORBILLE *et al.*, 2007). A falta de seletividade da cocaína explica os resultados obtidos por nosso grupo. De fato, a ativação de receptores mGluR1 e α 1 parecem mediar a mobilização de 2-AG pela cocaína (WANG *et al.*, 2015).

11.3. Participação de receptores CB₂ na resposta locomotora induzida pela inibição de DAT

Nem a ativação e nem o antagonismo de receptores do tipo CB₂ foi capaz de prevenir o aumento de locomoção e no número de rearings induzido pelo GBR12909.

Ao contrário de CB₁, receptores CB₂ são expressos em neurônios dopaminérgicos localizados na VTA e, por isso, sua ativação inibe a liberação de dopamina (ZHANG *et al.*, 2014). Altas doses de JWH133 (10 e 20 mg/Kg) são eficazes em diminuir a auto-administração e a hiperlocomoção induzidas por cocaína em camundongos (XI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015). Outro trabalho do nosso grupo também mostrou que a administração de 20 mg/Kg de JWH133 previne a hiperlocomoção induzida pela cocaína (GOBIRA *et al.*, 2019). Já uma dose menor, de 1 mg/Kg, preveniu tanto a aquisição quanto a expressão da sensibilização induzidas pela cocaína, mas não foi suficiente para alterar a hiperlocomoção aguda, (LOPES *et al.*, 2020).

Todos esses efeitos foram bloqueados pela administração do antagonista CB₂ AM630 (GOBIRA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2020).

Animais knockout para receptores CB₂ exibem aumento de locomoção e prejuízo na habituação ao campo aberto (LIU *et al.*, 2017). Já animais que superexpressam esses receptores são menos responsivos aos efeitos psicoestimulantes da cocaína (ARACIL-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). A deleção de receptores CB₂ somente em neurônios dopaminérgicos aumenta a hiperatividade induzida por cocaína e anfetamina mas não por metanfetamina (CANSECO-ALBA *et al.*, 2020). Embora a cocaína seja capaz de mobilizar 2-AG por mecanismos que não dependem exclusivamente da neurotransmissão dopaminérgica, como mencionado anteriormente, as baixas doses de JWH133 utilizadas nesse trabalho não permitem descartar a participação de CB₂ nas respostas induzida pelo GBR12909.

Interessantemente, existe associação entre uma das isoformas do gene CNR2, que codifica o receptores CB₂, e pacientes bipolares (MINOCCI *et al.*, 2011). De fato, esse receptor tem grande potencial terapêutico, não só pela sua localização em neurônios dopaminérgicos, mas por também serem expressos em células da glia (ATWOOD; MACKIE, 2010). A administração de um agonista CB₂ seletivo, por exemplo, pode inibir a ativação microglial, reduzindo assim os níveis de mediadores pró-inflamatórios exibido por pacientes com TB (ARJMAND *et al.*, 2019).

11.4. Efeito do THC na resposta locomotora induzida pela inibição de DAT

A administração de THC também atenuou a hiperlocomoção induzida pelo GBR12909. Alguns trabalhos de revisão mostram que o uso de *Cannabis* parece antecipar o início e exacerbar os sintomas de mania em pacientes com TB (GIBBS *et al.*, 2015; LOWE *et al.*, 2019; SIDELI *et al.*, 2020). Embora ainda sejam inconclusivos, pois metodologias variaram

entre os estudos analisados, é plausível supor que o sistema endocanabinoide pode estar envolvido em algumas das alterações observadas em pacientes com TB (ARJMAND *et al.*, 2019). Curiosamente, entretanto, nosso trabalho é o primeiro a avaliar a participação desse sistema em um modelo animal para o TB.

O THC atua como agonista tanto de receptores CB₁ como CB₂, o que gera uma resposta bifásica, ou seja, pode ser tanto recompensadora como aversiva. O efeito recompensador é mediado por CB₁ e foi observado com baixas doses (1 mg/Kg) de THC, enquanto altas doses (5 mg/Kg) induziram um comportamento aversivo, mediado por CB₂ (SPILLER *et al.*, 2019). No nosso trabalho a dose efetiva foi de 3 mg/Kg, que seria uma dose intermediária. Portanto podemos supor que o THC pode ter prevenido os efeitos induzidos pelo GBR12909 tanto pela ação em receptores CB₁ localizados em interneurônios glutamatérgicos, como pela ativação de receptores CB₂, em neurônios dopaminérgicos.

11.5. Efeito do Canabidiol na resposta locomotora induzida pela inibição de DAT

O canabidiol não foi capaz de reverter o aumento da locomoção induzido pelo GBR12909. O mecanismo de ação do canabidiol ainda não é completamente elucidado, mas acredita-se que possa potencializar a neurotransmissão canabinóide. Sabe-se que ele pode atuar inibindo o transportador de membrana de endocanabinoides e enzima que hidrolisa anandamida (BISOGNO *et al.*, 2001) e como modulador alostérico negativo de receptores CB₁ (LAPRAIRIE *et al.*, 2015), dentre outros mecanismos (CAMPOS *et al.*, 2016; LAPRAIRIE *et al.*, 2015). O canabidiol também foi inefetivo em reverter a hiperlocomoção no modelo animal tipo-mania induzido por d-anfetamina (VALVASSORI *et al.*, 2011). Além disso, o canabidiol não parece ter efeito no tratamento de pacientes bipolares (ZUARDI *et al.*, 2010). Portanto, até o presente momento, não há indícios que o canabidiol seja indicado para casos de TB.

11.6. Avaliação do teste de PPI em modelos animais tipo-mania

Observamos que o GBR12909 prejudicou a resposta dos animais no teste de inibição pré-pulso, entretanto nenhuma das drogas utilizadas como pré-tratamento foi capaz de prevenir esse déficit.

Além da hiperlocomoção, a inibição de DAT também é capaz de induzir outras alterações comportamentais, tais como prejuízos em tarefas de avaliação de risco (DE QUEIROZ *et al.*, 2018; VAN ENKHUIZEN *et al.*, 2014; VAN ENKHUIZEN; GEYER; YOUNG, 2013; YOUNG *et al.*, 2011), aumento da motivação (MILIENNE-PETIOT *et al.*, 2017), e déficit de memória (CHANG; YU; CHEN, 2018). Entretanto animais DAT KD não exibem prejuízo da resposta ao PPI em comparação com animais wild-type (RALPH-WILLIAMS *et al.*, 2003), ao contrario do que é observado em animais sem nenhuma expressão de DAT (RALPH *et al.*, 2001). Já a administração de GBR12909 causa prejuízo na resposta de sobressalto (DOUMA *et al.*, 2011; KWEK; VAN DEN BUUSE, 2013), como também observamos nos nossos experimentos. Isso indica que basta uma pequena disponibilidade de DAT para que não haja prejuízo dessa resposta.

Animais knockout para o receptor CB₁, ou tratados cronicamente com o antagonista desse receptor exibem prejuízo no PPI (ORTEGA-ÁLVARO *et al.*, 2015). De maneira interessante, a administração de THC prejudicou o PPI em ratos isolados e o antagonista CB₁ SR 141716 reverteu esse efeito, mas não alterou o comportamento nos animais mantidos agrupados (MALONE; TAYLOR, 2006). Já a administração crônica de AM251 restaurou os prejuízos de PPI causados pelo isolamento, possivelmente através de 2-AG (ZAMBERLETTI *et al.*, 2012). Outros agonistas canabinóides sintéticos também causam prejuízo no PPI (MARTIN *et al.*, 2003; SCHNEIDER; KOCH, 2002). O consumo crônico de *Canabis sativa*

também parece prejudicar a resposta sensório motora avaliada no PPI (KEDZIOR; MARTIN-IVERSON, 2006). Embora hajam dados conflitantes, esses resultados parecem indicar que o receptor CB₁ participa dessa resposta, sendo possível supor que o bloqueio desse receptor traz benefícios na resposta de sobressalto.

12. CONCLUSÕES

A inibição do transportador de dopamina, farmacológica ou genética, é utilizada como modelo animal de mania . Observamos que esse bloqueio induz aumento da locomoção em animais e que o pré-tratamento com Carbonato de Lítio é capaz de prevenir essa resposta, reproduzindo assim dados da literatura. Mostramos também que o antagonismo de receptor do tipo CB₁ previne a hiperatividade induzida pela inibição do DAT, tanto na forma aguda como crônica, sugerindo o envolvimento do sistema endocanabinóide no comportamento tipo-maníaco. Embora o agonista de receptores CB₂ não tenha sido efetivo em reverter as alterações induzidas pela inibição de DAT nesse trabalho, sua influência na neurotransmissão dopaminérgica não pode ser descartada.

Dessa forma concluímos que o antagonismo de receptor CB₁ tem potencial como alvo terapêutico para o TB, embora seus efeitos adversos sejam conhecidos (MOREIRA; CRIPPA, 2009). Mais estudos são necessários, portanto, para elucidar a participação do sistema endocanabinóide no TB, especialmente em aspectos da doença não avaliados nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

ABREU, T.; BRAGANÇA, M. The bipolarity of light and dark: A review on Bipolar Disorder and circadian cycles. *Journal of Affective Disorders*, v. 185, p. 219–229, 2015.

ANDRADE, L. H. *et al.* Mental disorders in megacities: Findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, 2012.

ARACIL-FERNÁNDEZ, A. *et al.* Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, n. 7, p. 1749–1763, 2012.

ARJMAND, S. *et al.* Bipolar disorder and the endocannabinoid system. *Acta Neuropsychiatrica*, 2019.

ASHOK, A. H. *et al.* The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: The state of the art and implications for treatment. *Molecular Psychiatry*, v. 22, n. 5, p. 666–679, 2017.

ASHTON, C. H. *et al.* Cannabinoids in bipolar affective disorder: a review and discussion of their therapeutic potential. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, v. 19, n. 3, p. 293–300, 2005.

ASSOCIATION, A. P. *DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*. [S.l.]: Artmed Editora, 2014.

ATWOOD, B. K.; MACKIE, K. *CB 2: A cannabinoid receptor with an identity crisis*. *British Journal of Pharmacology*. [S.l.: s.n.], 2010

BASTOS, J. R. *et al.* Inhibition of the dopamine transporter as an animal model of bipolar disorder mania: Locomotor response, neuroimmunological profile and pharmacological modulation. *Journal of Psychiatric Research*, v. 102, n. April, p. 142–149, jul. 2018.

BEAULIEU, J.-M. Beyond cAMP: the regulation of Akt and GSK3 by dopamine receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 4, n. November, p. 1–13, 2011.

BERK, M. *et al.* Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 3, p. 804–817, 2011.

BEYER, D. K. E. E.; FREUND, N. Animal models for bipolar disorder: from bedside to the cage. *International Journal of Bipolar Disorders*, v. 5, n. 1, p. 35, 2017.

BISOGNO, T. *et al.* Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology*, v. 134, n. 4, p. 845–852, 2001.

BLANCO, C. *et al.* Epidemiology of DSM-5 bipolar I disorder: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions - III. *Journal of Psychiatric Research*, v. 84, p. 310–317, 2017.

BRENNER, C. J.; SHYN, S. I. Diagnosis and management of bipolar disorder in primary care: a DSM-5 update. *The Medical clinics of North America*, v. 98, n. 5, p. 1025–48, 2014.

BRUSCO, A. *et al.* Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1139, p. 450–457, 2008.

BRUSCO, ALICIA *et al.* Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse*, v. 62, n. 12, p. 944–949, 2008.

BUSQUETS GARCIA, A. *et al.* Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. *F1000Research*, v. 5, n. 0, p. 990, 2016.

CAMPOS, A. C. *et al.* Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 119–127, 2016.

CANSECO-ALBA, A. *et al.* Behavioral effects of psychostimulants in mutant mice with cell- type specific deletion of CB2 cannabinoid receptors in dopamine neurons. p. 286–297, 2020.

CARVALHO, A. F.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Cannabinoid modulation of noradrenergic circuits: Implications for psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 38, n. 1, p. 59–67, 2012.

CHANG, P. K.; YU, L.; CHEN, J. C. Dopamine D3 receptor blockade rescues hyperdopamine activity-induced deficit in novel object recognition memory. *Neuropharmacology*, v. 133, p. 216–223, 2018.

CORBILLE, A.-G. *et al.* Role of Cannabinoid Type 1 Receptors in Locomotor Activity and Striatal Signaling in Response to Psychostimulants. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 26, p. 6937–6947, 2007.

COSTA, L. D. S. *et al.* Risk factors for suicide in bipolar disorder: A systematic review. *Journal of Affective Disorders*, v. 170, p. 237–254, 2015.

COUSINS, D. A.; BUTTS, K.; YOUNG, A. H. The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, v. 11, n. 8, p. 787–806, 2009.

COVEY, D. P. *et al.* Endocannabinoid modulation of dopamine neurotransmission. *Neuropharmacology*, v. 124, p. 52–61, 2017.

DAL-PONT, G. C. *et al.* Effects of lithium and valproate on behavioral parameters and neurotrophic factor levels in an animal model of mania induced by paradoxical sleep deprivation. *Journal of Psychiatric Research*, v. 119, n. August, p. 76–83, 2019.

DE QUEIROZ, A. I. G. *et al.* Antimanic activity of minocycline in a GBR12909-induced model of mania in mice: Possible role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. *Journal of Affective Disorders*, v. 225, n. June 2017, p. 40–51, 2018.

DEL'GUIDICE, T.; BEAULIEU, J. M. Selective disruption of dopamine D2-receptors/beta-arrestin2 signaling by mood stabilizers. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, v. 35, n. 3, p. 224–232, 2015.

DELIS, F. *et al.* Attenuation of cocaine-induced conditioned place preference and motor activity via cannabinoid CB2 receptor agonism and cb1 receptor antagonism in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 20, n. 3, p. 269–278, 2017.

DI MARZO, V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, n. 3 SPEC. ISS., p. 134–140, 2006.

DOUMA, T. N. *et al.* The amphetamine-chlordiazepoxide mixture, a pharmacological screen for mood stabilizers, does not enhance amphetamine-induced disruption of prepulse inhibition. *Behavioural Brain Research*, v. 225, n. 1, p. 377–381, 2011.

EINAT, H. Different behaviors and different strains: Potential new ways to model bipolar disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 31, n. 6, p. 850–857, 2007.

EL-MALLAKH, R. S. *et al.* Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. *Bipolar disorders*, v. 5, n. 5, p. 362–365, 2003.

EL KHOURY, M.-A. *et al.* Interactions between the cannabinoid and dopaminergic systems: Evidence from animal studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 38, n. 1, p. 36–50, 2012.

FERRARI, A. J. *et al.* The prevalence and burden of bipolar disorder: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Bipolar Disorders*, v. 18, n. 5, p. 440–450, 2016.

FITZGERALD, M. L.; SHOBIN, E.; PICKEL, V. M. Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: Implications for limbic and striatal output. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 38, n. 1, p. 21–29, 2012.

FLAISHER-GRINBERG, S.; EINAT, H. Strain-specific battery of tests for domains of mania: Effects of valproate, lithium and imipramine. *Frontiers in Psychiatry*, v. 1, n. APR, p. 1–10, 2010.

FREY, B. N.; VALVASSORI, S. S.; *et al.* Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v. 31, n. 5, p. 326–332, 2006.

FREY, B. N.; ANDREAZZA, A. C.; *et al.* Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sciences*, v. 79, n. 3, p. 281–286, 2006.

GIBBS, M. *et al.* Cannabis use and mania symptoms: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, v. 171, p. 39–47, 2015.

GIUFFRIDA, A. *et al.* Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature Neuroscience*, v. 2, n. 4, p. 358–363, 1999.

GOBIRA, P. H. *et al.* Opposing roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the stimulant and rewarding effects of cocaine. *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 10, p. 1541–1551, 14 set. 2019.

GONG, J. P. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research*, v. 1071, n. 1, p. 10–23, 2006.

- GRANDE, I. *et al.* Bipolar disorder. *The Lancet*, v. 387, n. 10027, p. 1561–1572, 2016.
- GREENWOOD, T. A. *et al.* Identification of additional variants within the human dopamine transporter gene provides further evidence for an association with bipolar disorder in two independent samples. *Molecular Psychiatry*, v. 11, n. 2, p. 125–133, 2006.
- HARRISON, P. J.; GEDDES, J. R.; TUNBRIDGE, E. M. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. *Trends in Neurosciences*, v. 41, n. 1, p. 18–30, 2018.
- HAYDEN, E. P.; NURNBERGER, J. I. Molecular genetics of bipolar disorder. *Genes, Brain and Behavior*, v. 5, n. 1, p. 85–95, 2006.
- HENRY, B. L. *et al.* Cross-species assessments of motor and exploratory behavior related to Bipolar Disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 34, n. 8, p. 1296–1306, 2010.
- HERKENHAM, M. *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. *Neurobiology*, v. 87, n. March, p. 1932–1936, 1990.
- HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E. *CB1 and CB2 Receptor Pharmacology*. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. v. 80.
- KATO, T.; KUBOTA, M.; KASAHARA, T. Animal models of bipolar disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 31, n. 6, p. 832–842, 2007.
- KATONA, I. *et al.* Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 11, p. 4544–4558, 1999.
- KEDZIOR, K. K.; MARTIN-IVERSON, M. T. Chronic cannabis use is associated with attention-modulated reduction in prepulse inhibition of the startle reflex in healthy humans. *Journal of Psychopharmacology*, v. 20, n. 4, p. 471–484, 2006.
- KLEIN, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.
- KWEK, P.; VAN DEN BUUSE, M. Modafinil disrupts prepulse inhibition in mice: Strain differences and involvement of dopaminergic and serotonergic activation. *European Journal of Pharmacology*, v. 699, n. 1–3, p. 132–140, 2013.
- KWIATKOWSKI, M. A. *et al.* Dopamine transporter knockdown mice in the behavioral pattern monitor: A robust, reproducible model for mania-relevant behaviors. [S.l.]: Elsevier Inc, 2017.
- LAN, A.; EINAT, H. Questioning the predictive validity of the amphetamine-induced hyperactivity model for screening mood stabilizing drugs. *Behavioural Brain Research*, v. 362, n. December 2018, p. 109–113, 2019.
- LAPRAIRIE, R. B. *et al.* Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, v. 172, n. 20, p. 4790–4805, 2015.
- LATALOVA, K.; KAMARADOVA, D.; PRASKO, J. Suicide in bipolar disorder: A

review. *Psychiatria Danubina*, v. 26, n. 2, p. 108–114, 2014.

LIU, Q. R. *et al.* Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2017.

LOPES, J. B. *et al.* The roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology*, v. 237, n. 2, p. 385–394, 2020.

LOWE, D. J. E. *et al.* Cannabis and mental illness: a review. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 269, n. 1, p. 107–120, 2019.

MACHADO-VIEIRA, R.; KAPCZINSKI, F.; SOARES, J. C. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 28, n. 2, p. 209–224, 2004.

MALETIC, V.; RAISON, C. Integrated Neurobiology of Bipolar Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, v. 5, n. August, p. 1–24, 2014.

MALONE, D. T.; TAYLOR, D. A. The effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on sensorimotor gating in socially isolated rats. *Behavioural Brain Research*, v. 166, n. 1, p. 101–109, 2006.

MANJI, H. K. *et al.* The underlying neurobiology of bipolar disorder. *World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, v. 2, n. 3, p. 136–46, 2003.

MAO, Z. *et al.* Prepulse inhibition in patients with bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.

MARSICANO, G.; LUTZ, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *European Journal of Neuroscience*, v. 11, n. 12, p. 4213–4225, 1999.

MARTIN, R. S. *et al.* Effects of cannabinoid receptor ligands on psychosis-relevant behavior models in the rat. *Psychopharmacology*, v. 165, n. 2, p. 128–135, 2003.

MARTINO, D. J.; VALERIO, M. P.; PARKER, G. The structure of mania: An overview of factorial analysis studies. *European Psychiatry*, v. 63, n. 1, 2020.

MATEO, Y. *et al.* Endocannabinoid Actions on Cortical Terminals Orchestrate Local Modulation of Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *Neuron*, v. 96, n. 5, p. 1112–1126.e5, 2017.

MÁTYÁS, F. *et al.* Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology*, v. 54, n. 1, p. 95–107, 2008.

MECHOULAM, R. *et al.* Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, n. 11, p. 757–764, 2014.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annual Review of Psychology*, v. 64, n. 1, p. 21–47, 2013.

MILIENNE-PETIOT, M. *et al.* Blockade of dopamine D1-family receptors attenuates the mania-like hyperactive, risk-preferring, and high motivation behavioral profile of mice with low dopamine transporter levels. *Journal of Psychopharmacology*, v. 31, n. 10, p. 1334–1346, 2017.

MINOCCI, D. *et al.* Genetic association between bipolar disorder and 524A>C (Leu133Ile) polymorphism of CNR2 gene, encoding for CB2 cannabinoid receptor. *Journal of Affective Disorders*, v. 134, n. 1–3, p. 427–430, 2011.

MOREIRA, F. A.; CRIPPA, J. A. S. The psychiatric side-effects of rimonabant. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 31, n. 2, p. 145–153, 2009.

MUNEER, A. Bipolar Disorder: Role of Inflammation and the Development of Disease Biomarkers. *Psychiatry Investigation*, p. 18–33, 2016.

MUNEER, A. Mixed States in Bipolar Disorder: Etiology, Pathogenesis and Treatment. *Chonnam Medical Journal*, v. 53, n. 1, p. 1, 2017.

NEWBERG, A. R. *et al.* Neurobiology of bipolar disorder. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 8, n. 1, p. 93–110, 2008.

NIU, Z. *et al.* The Relationship Between Neuroimmunity and Bipolar Disorder: Mechanism and Translational Application. *Neuroscience Bulletin*, v. 35, n. 4, p. 595–607, 2019.

OLESON, E. B. *et al.* Endocannabinoids Shape Accumbal Encoding of Cue-Motivated Behavior via CB1 Receptor Activation in the Ventral Tegmentum. *Neuron*, v. 73, n. 2, p. 360–373, 2012.

ONAIVI, E S *et al.* CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J Psychopharmacol*, v. 26, n. 1, p. 92–103, 2012.

ONAIVI, EMMANUEL S. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*, v. 54, n. 4, p. 231–246, 2007.

ORTEGA-ÁLVARO, A. *et al.* Differential Pharmacological Regulation of Sensorimotor Gating Deficit in CB1 Knockout Mice and Associated Neurochemical and Histological Alterations. *Neuropsychopharmacology*, v. 40, n. 11, p. 2639–2647, 2015.

PACHER, P.; SÁNDOR BÁT KAI; GEORGE KUNOS. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, v. 58, n. 3, p. 389–462, 2006.

PEREIRA, M. *et al.* Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: A marker of affect in mania? *Psychopharmacology*, v. 231, n. 13, p. 2567–2577, 2014.

PERRY, W. *et al.* A reverse-translational study of dysfunctional exploration in psychiatric disorders: from mice to men. *Archives of general psychiatry*, v. 66, n. 10, p. 1072–1080, 2009.

PERRY, W. *et al.* Quantifying over-activity in bipolar and schizophrenia patients in a human open field paradigm. *Psychiatry Research*, v. 178, n. 1, p. 84–91, 2010.

PERRY, W. *et al.* Sensorimotor gating deficits in bipolar disorder patients with acute psychotic mania. *Biological Psychiatry*, v. 50, n. 6, p. 418–424, 2001.

PETTIT, D. A. *et al.* Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res*, v. 51, n. 3, p. 391–402, 1998.

PINSONNEAULT, J. K. *et al.* Dopamine transporter gene variant affecting expression in human brain is associated with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*, v. 36, n. 8, p. 1644–1655, 2011.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 4, n. 11, p. 873–884, 2003.

QUEIROZ, A. I. G. *et al.* GBR 12909 administration as an animal model of bipolar mania: time course of behavioral, brain oxidative alterations and effect of mood stabilizing drugs. *Metabolic Brain Disease*, 2015.

RALPH-WILLIAMS, R. J. *et al.* Valproate attenuates hyperactive and perseverative behaviors in mutant mice with a dysregulated dopamine system. *Biological Psychiatry*, v. 53, n. 4, p. 352–359, 2003.

RALPH, R. J. *et al.* Prepulse inhibition deficits and perseverative motor patterns in dopamine transporter knock-out mice: Differential effects of D1 and D2 receptor antagonists. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 1, p. 305–313, 2001.

RODRIGUEZ, J. S. *et al.* Local pretreatment with the cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 attenuates methamphetamine intra-accumbens self-administration. *Neuroscience Letters*, v. 489, n. 3, p. 187–191, 2011.

SÁNCHEZ-MORLA, E. M. *et al.* Prepulse inhibition in euthymic bipolar disorder patients in comparison with control subjects. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 134, n. 4, p. 350–359, 2016.

SCHAFFER, A. *et al.* Epidemiology, neurobiology and pharmacological interventions related to suicide deaths and suicide attempts in bipolar disorder: Part I of a report of the International Society for Bipolar Disorders Task Force on Suicide in Bipolar Disorder. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, v. 49, n. 9, p. 785–802, 2015.

SCHNEIDER, M.; KOCH, M. The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 reduces sensorimotor gating and recognition memory in rats. *Behavioural Pharmacology*, v. 13, n. 1, p. 29–37, 2002.

SHARMA, A. N. *et al.* Modeling mania in preclinical settings: A comprehensive review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 66, p. 22–34, 2016.

SIDELI, L. *et al.* Cannabis Use and the Risk for Psychosis and Affective Disorders. *Journal of Dual Diagnosis*, v. 16, n. 1, p. 22–42, 2020.

SOUZA, L. S. *et al.* Lithium and valproate prevent methylphenidate-induced mania-like behaviors in the hole board test. *Neuroscience Letters*, v. 629, p. 143–148, 2016.

SPILLER, K. J. *et al.* Cannabinoid CB 1 and CB 2 receptor mechanisms underlie cannabis reward and aversion in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 9, p. 1268–1281, 2019.

STEARDO, L. J. *et al.* Sleep disturbance in bipolar disorder: Neuroglia and circadian rhythms. *Frontiers in Psychiatry*, v. 10, n. JUN, p. 1–12, 2019.

THASE, M. E.; DENKO, T. Pharmacotherapy of mood disorders. *Annual review of clinical psychology*, v. 4, p. 53–91, 2008.

TZAVARA, E. T. *et al.* CB1 receptor knockout mice are hyporesponsive to the behavior-stimulating actions of d-amphetamine: role of mGlu5 receptors. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 19, n. 3, p. 196–204, 2009.

VALVASSORI, S. S. *et al.* Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *Journal of Psychopharmacology*, v. 25, n. 2, p. 274–279, 2011.

VALVASSORI, S. S. *et al.* Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar Disorders*, v. 17, n. 5, p. 507–517, 2015.

VALVASSORI, S. S. *et al.* Validation of the animal model of bipolar disorder induced by Ouabain: face, construct and predictive perspectives. *Translational Psychiatry*, v. 9, n. 1, 2019.

VAN ENKHUIZEN, J. *et al.* Chronic valproate attenuates some, but not all, facets of mania-like behavior in mice. *Changes*, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

VAN ENKHUIZEN, J. *et al.* Modeling bipolar disorder in mice by increasing acetylcholine or dopamine: chronic lithium treats most, but not all features. *Psychopharmacology*, v. 232, n. 18, p. 3455–3467, 2015.

VAN ENKHUIZEN, J. *et al.* Reduced dopamine transporter functioning induces high-reward risk-preference consistent with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 39, n. 13, p. 3112–3122, 2014.

VAN ENKHUIZEN, J.; GEYER, M. A.; YOUNG, J. W. Differential effects of dopamine transporter inhibitors in the rodent Iowa gambling task: Relevance to mania. *Psychopharmacology*, v. 225, p. 661–674, 2013.

VIETA, E. *et al.* Bipolar disorders. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, 2018.

WANG, H. *et al.* Cocaine-Induced Endocannabinoid Mobilization in the Ventral Tegmental Area. *Cell Reports*, v. 12, n. 12, p. 1997–2008, 2015.

WENZEL, J. M. *et al.* Phasic Dopamine Signals in the Nucleus Accumbens that Cause

Active Avoidance Require Endocannabinoid Mobilization in the Midbrain. *Current Biology*, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2018.

XI, Z. X. *et al.* Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nature Neuroscience*, v. 14, n. 9, p. 1160–1168, 2011.

YAMASHITA, M. *et al.* Norepinephrine transporter blockade can normalize the prepulse inhibition deficits found in dopamine transporter knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 10, p. 2132–2139, 2006.

YATHAM, L. N. *et al.* Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) 2018 guidelines for the management of patients with bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, v. 20, n. 2, p. 97–170, 2018.

YATHAM, L. N. *et al.* *Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: Update 2013*. [S.l: s.n.], 2013. v. 15.

YOUNG, J. W. *et al.* A reverse-translational approach to bipolar disorder: Rodent and human studies in the Behavioral Pattern Monitor. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 31, n. 6, p. 882–896, 2007.

YOUNG, J. W. *et al.* GBR 12909 administration as a mouse model of bipolar disorder mania: Mimicking quantitative assessment of manic behavior. *Psychopharmacology*, v. 208, n. 3, p. 443–454, 2010.

YOUNG, J. W. *et al.* Increased risk-taking behavior in dopamine transporter knockdown mice: further support for a mouse model of mania. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, v. 25, n. 7, p. 934–943, 2011.

YOUNG, J. W.; DULCIS, D. Investigating the mechanism(s) underlying switching between states in bipolar disorder. *European Journal of Pharmacology*, v. 759, p. 151–162, 2015.

YOUNG, J. W.; HENRY, B. L.; GEYER, M. A. Predictive animal models of mania: Hits, misses and future directions. *British Journal of Pharmacology*, v. 164, n. 4, p. 1263–1284, 2011.

ZAMBERLETTI, E. *et al.* Chronic blockade of CB1 receptors reverses startle gating deficits and associated neurochemical alterations in rats reared in isolation. *British Journal of Pharmacology*, v. 167, n. 8, p. 1652–1664, 2012.

ZHANG, H.-Y. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 46, p. E5007–E5015, 2014.

ZHANG, H.-Y. *et al.* Expression of functional cannabinoid CB₂ receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addiction Biology*, v. 22, n. 3, p. 752–765, 2017.

ZHANG, H.-Y. *et al.* Species Differences in Cannabinoid Receptor 2 and Receptor Responses to Cocaine Self-Administration in Mice and Rats. *Neuropsychopharmacology*, v.

40, n. 4, p. 1037–1051, 2015.

ZUARDI, A. *et al.* Cannabidiol was ineffective for manic episode of bipolar affective disorder. *Journal of psychopharmacology*, v. 24, n. 1, p. 135–7, 2010.

APÊNDICE A - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA PERCORRIDA NO BPM

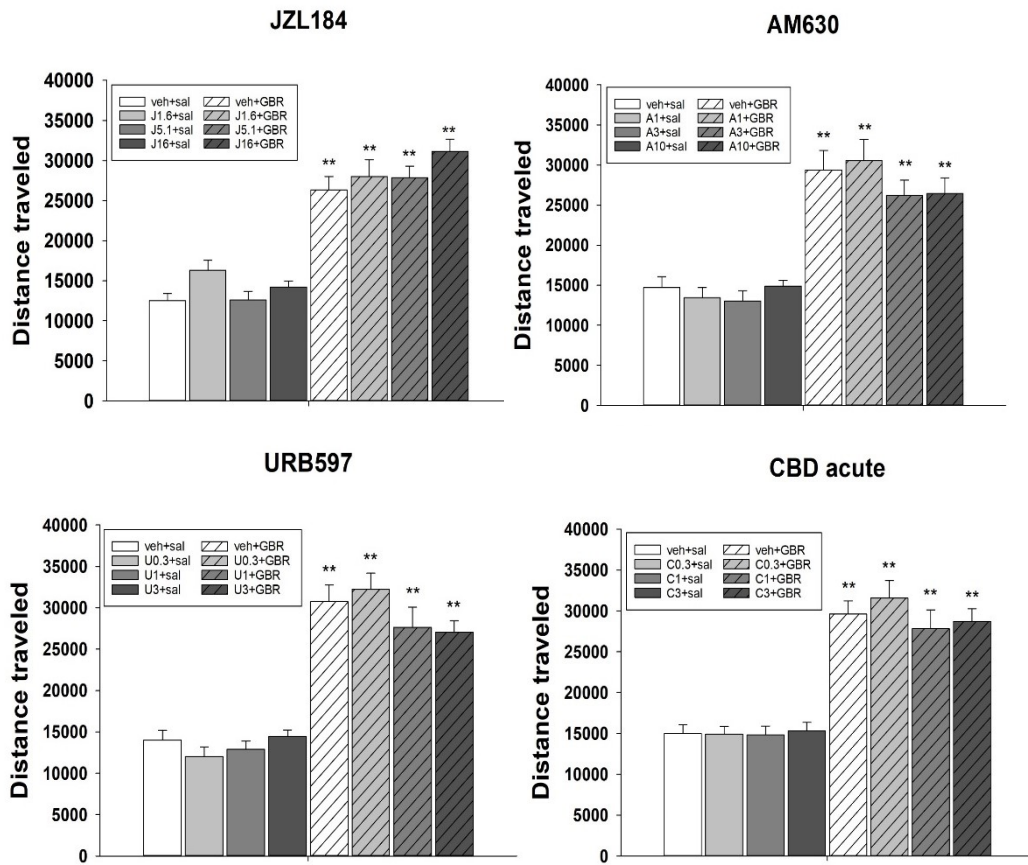


Figura 25: Efeito dos moduladores endocanabinóides na distância percorrida pelos animais após a administração de 16mg/KG de GBR12909.

APÊNDICE B - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE REARINGS NO BPM

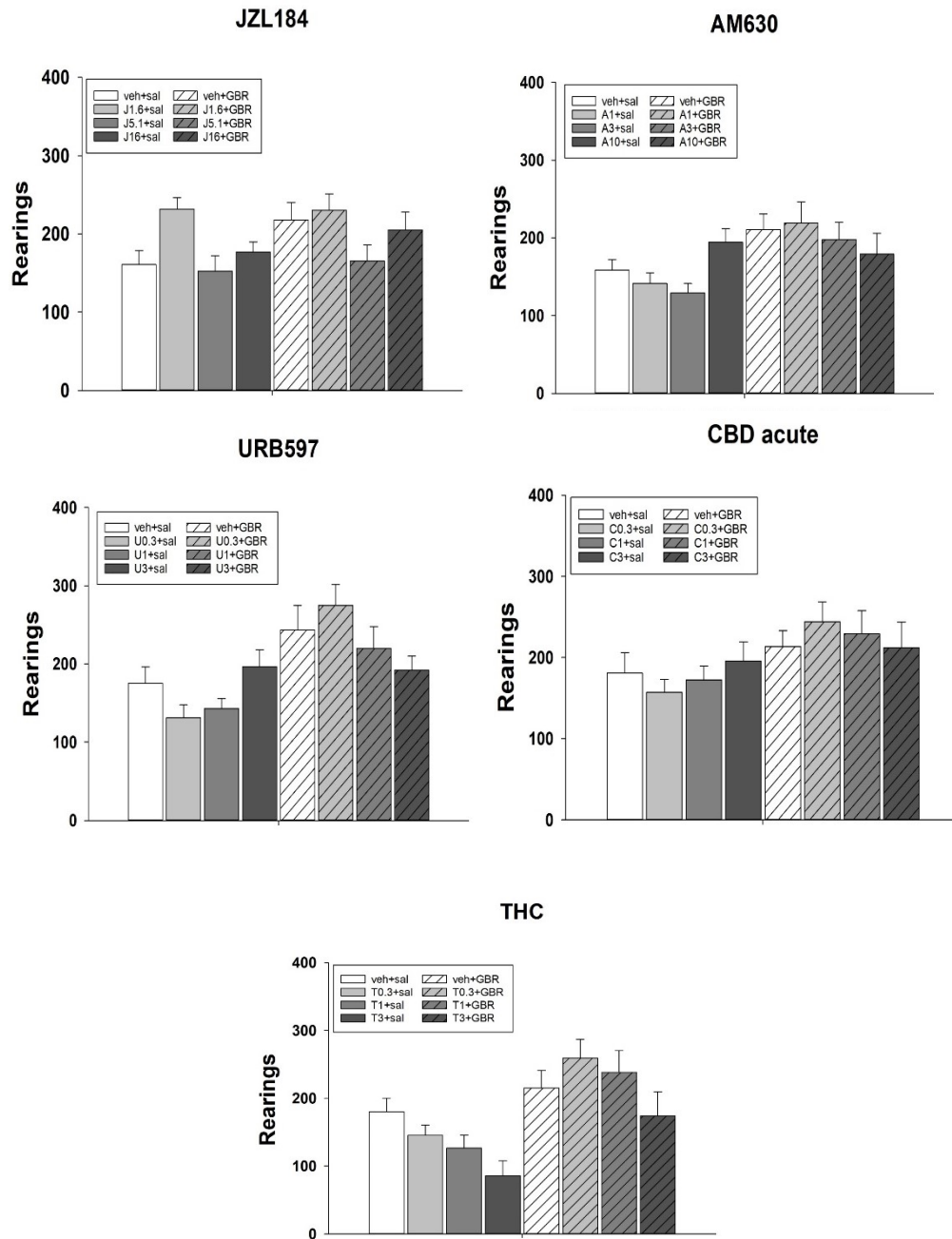


Figura 26: Efeito dos moduladores endocanabinóides no número de rearings após a administração de 16 mg/Kg de GBR12909.

APÊNDICE C – RESULTADOS DO TESTE DE INIBIÇÃO PRÉ-PULSO (PPI)

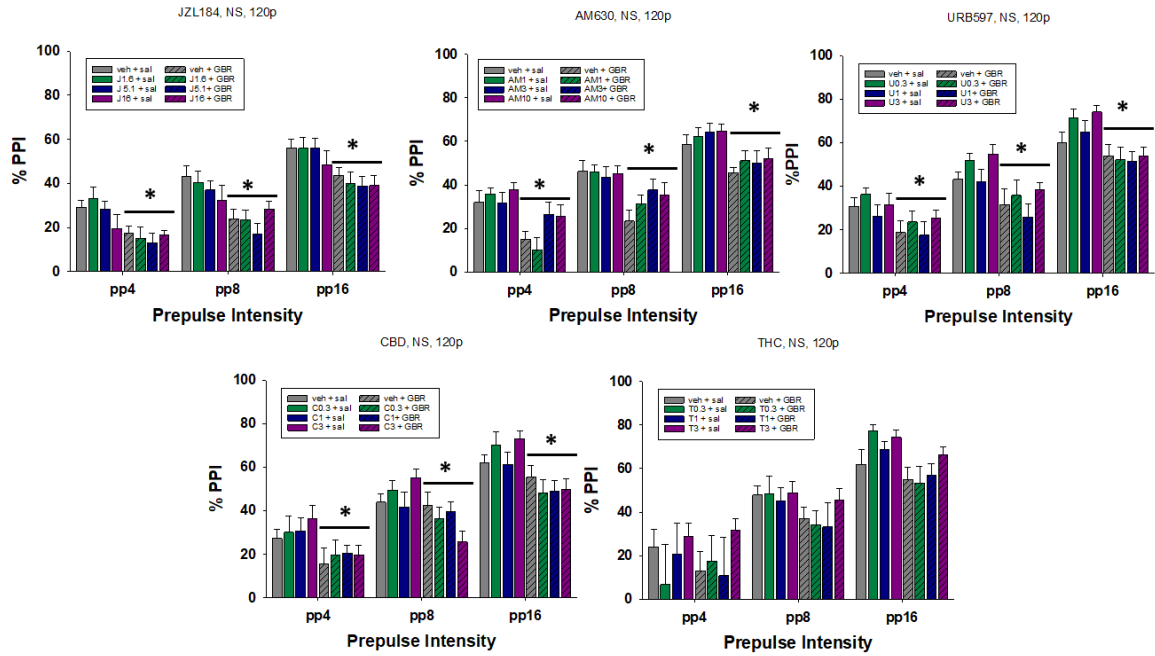


Figura 27: Efeito dos moduladores endocanabinóides no teste de inibição pré-pulso após a administração de 16 mg/Kg de GBR12909.