

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

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE EM MODELOS ANIMAIS DE
EFEITOS ADVERSOS MOTORES INDUZIDOS PELO HALOPERIDOL**

JIVAGO RÖPKE RODRIGUES

BELO HORIZONTE – 2017

JIVAGO RÖPKE RODRIGUES

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE EM MODELOS ANIMAIS DE
EFEITOS ADVERSOS MOTORES INDUZIDOS PELO HALOPERIDOL**

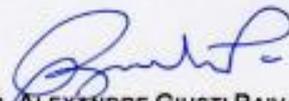
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas Área de Concentração: Farmacologia
Orientador: Prof.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

BELO HORIZONTE – 2017

**"PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE EM
MODELOS ANIMAIS DE EFEITOS ADVERSOS MOTORES
INDUZIDOS PELO HALOPERIDOL"**

JIVAGO RÖPKE RODRIGUES

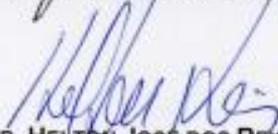
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 11 de julho de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



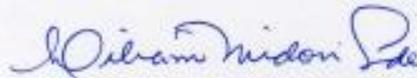
PROF. DR. ALEXANDRE GIUSTI PAIVA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS



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



PROF. DR. HELTON JOSÉ DOS REIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. LILIAM MIDORI IDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI



PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA
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, 11 de julho de 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

RÖPKE RODRIGUES, JIVAGO

Participação do sistema endocanabinóide em modelos animais de efeitos adversos motores induzidos pelo haloperidol [manuscrito] / JIVAGO RÖPKE RODRIGUES. - 2017.

89 f.

Orientador: Fabricio Moreira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1.Sistema endocanabinóide. 2.Haloperidol.
3.Discinesia tardia. 4.Catalepsia. I.Moreira, Fabricio .
II.Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto Ciências Biológicas. III.Título.

AGRADECIMENTOS

A minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado;

Ao meu orientador, Professor Fabricio de Araujo Moreira, por aceitar me orientar neste trabalho e por ter me proporcionado grandes ensinamentos;

As colaboradoras, Professora Fabíola Ribeiro e Talita Vieira;

Aos demais professores e funcionários da UFMG pela dedicação e auxílio;

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia por ter proporcionado a realização deste curso de doutorado;

As agências de fomento, CAPES e CNPq, pela concessão de bolsas.

RESUMO

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE EM MODELOS ANIMAIS DE EFEITOS ADVERSOS MOTORES INDUZIDOS PELO HALOPERIDOL

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico em que ocorrem sintomas como desconexão com a realidade, alterações de humor e cognição, dentre outros. A principal abordagem de tratamento consiste nos medicamentos antipsicóticos, que atuam, principalmente, como antagonistas dos receptores de dopamina do tipo D₂. Por meio deste mecanismo, alguns antipsicóticos induzem graves efeitos adversos motores, sendo eles a síndrome parkinsoniana, no início do tratamento, e a discinesia tardia, após tratamento crônico. Fisiologicamente, os neurônios dopaminérgicos podem estar sobre controle do sistema endocanabinoide, constituído pelos endocanabinoides anandamida e 2-aracnodoilglicerol (2-AG), pelas suas enzimas de síntese e hidrólise, bem como por seus receptores. Considerando essas evidências, o presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que a administração de inibidores da hidrólise dos endocanabinóides atenua as alterações motoras induzidas pelo haloperidol. Foram utilizados modelos animais preditivos de efeitos motores agudos, a catalepsia em camundongos, e crônicos, os movimentos de mastigação no vazio (MMV) em ratos. Além disso, foi verificada a participação dos receptores CB₁, TRPV1 e 5-HT_{1A} nestes efeitos. Os resultados evidenciaram que o aumento nos níveis de endocanabinoides, através da inibição das enzimas responsáveis por sua degradação, atenua os efeitos adversos motores, agudos e crônicos induzidos pelo haloperidol. A inibição da hidrólise de anandamida atenua a catalepsia via ativação de receptores TRPV1 e a discinesia tardia via ativação de receptores CB₁. A inibição da hidrólise 2-AG inibe a catalepsia e a discinesia tardia através da ativação de receptores CB₁. Receptores 5-HT_{1A} não parecem estar envolvidos. Além disso, em animais tratados cronicamente com haloperidol, houve um aumento na expressão de receptores CB₁, exclusivamente naqueles em que o fármaco de fato induziu aumento de MMVs. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que o sistema endocanabinoide modula os efeitos adversos motores induzidos pelo haloperidol.

Palavras-chave: antipsicóticos, haloperidol, catalepsia, discinesia tardia, dopamina, endocanabinóide, serotonina.

ABSTRACT

PARTICIPATION OF THE ENDOCANNABINOID SYSTEM ON HALOPERIDOL INDUCED MOTOR SIDE-EFFECTS

Schizophrenia is a psychiatric disorder in which symptoms are disconnection with reality, mood and cognition alterations. The main treatment consists in antipsychotic drugs, which mainly act as dopamine D₂ receptor antagonists. Through this mechanism, some antipsychotics induce serious motor side effects, such as parkinsonian syndrome at the beginning of treatment and tardive dyskinesia after chronic treatment. Physiologically, dopaminergic neurons may be under control of the endocannabinoid system, consisting of the endocannabinoids anandamide and 2-aracnodoylglycerol (2-AG), their enzymes of synthesis and hydrolysis, as well as for their receptors. Considering these evidences, the present study aimed to test the hypothesis that the administration of endocannabinoid hydrolysis inhibitors attenuates the motor alterations induced by haloperidol. . Were used predictive animal models of acute motor side effects, catalepsy, in mice, and chronic, vacuous chewing movements (VCM), in rats. In addition, the participation of CB₁, TRPV1 and 5-HT_{1A} receptors was verified in these effects. The results showed that the increase in endocannabinoid levels, by inhibiting the enzymes responsible for their degradation, attenuates the acute and chronic motor adverse effects induced by haloperidol. Inhibition of anandamide hydrolysis attenuates catalepsy via activation of TRPV1 receptors and tardive dyskinesia via activation of CB₁ receptors. Inhibition of 2-AG hydrolysis inhibits catalepsy and tardive dyskinesia through the activation of CB₁ receptors. 5-HT_{1A} receptors do not appear to be involved. In addition, in animals chronically treated with haloperidol, there was an increase in CB₁ receptor expression, exclusively in those in which the drug actually induced increase of VCMs. These results are consistent with the hypothesis that the endocannabinoid system modulates the adverse motor effects induced by haloperidol.

Key words: antipsychotic drugs, haloperidol, catalepsy, tardive dyskinesia, dopamine, endocannabinoid, serotonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da neurotransmissão dopaminérgica;

Figura 2: Representação das vias dopaminérgicas em cérebro de camundongo adulto;

Figura 3: Representação das vias direta e indireta do movimento;

Figura 4: Representação dos componentes do sistema endocanabinóide;

Figura 5: Esquematização do delineamento experimental no teste da catalepsia;

Figura 6: Esquematização do delineamento experimental para o teste de avaliação de discinesia tardia;

Figura 7: Curva dose-resposta do haloperidol sobre a catalepsia;

Figura 8: Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida URB597 sobre a catalepsia induzida por haloperidol;

Figura 9: Efeito do inibidor da hidrólise de 2-aracdonoilglicerol sobre a catalepsia induzida por haloperidol;

Figura 10: Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida, URB597, e do antagonista de receptores CB₁, AM251, sobre a catalepsia induzida por haloperidol;

Figura 11: Efeito do inibidor da hidrólise de 2-aracdonoilglicerol, JZL184, e do antagonista de receptores CB₁, AM251, sobre a catalepsia induzida por haloperidol;

Figura 12: Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida, URB597, e do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635, sobre a catalepsia induzida por haloperidol;

Figura 13: Efeito do inibidor da hidrólise de 2-aracdonoilglicerol, JZL184, e do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635, sobre a catalepsia induzida por haloperidol;

Figura 14: Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida, URB597, e do antagonista de receptores TRPV1, SB366791, sobre a catalepsia induzida por haloperidol

Figura 15: Efeito do inibidor da hidrólise de 2-aracdonoilglicerol, JZL184, e do antagonista de receptores TRPV1, SB366791, sobre a catalepsia induzida por haloperidol;

Figura 16: Efeito do tratamento de quatro semanas com haloperidol na indução de movimentos de mastigação no vazio;

Figura 17: Efeito do tratamento crônico com haloperidol na indução de movimentos de mastigação no vazio;

Figura 18: Efeito do tratamento com haloperidol durante a exposição a droga (4 semanas) e após a retirada;

Figura 19: Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida, URB597, sobre os MMV induzidos por haloperidol;

Figura 20: Efeito do inibidor da hidrólise de 2-aracdonoilglicerol, JZL184, sobre os MMV induzidos por haloperidol;

Figura 21: Efeito do antagonista de receptores CB₁, AM251, sobre a ação do URB597 nos MMV induzidos por haloperidol;

Figura 22: Efeito do antagonista de receptores CB₁, AM251, sobre a ação do JZL184 nos MMV induzidos por haloperidol;

Figura 23: Efeito do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY1006351, sobre a ação do URB597 nos MMVs induzidos por haloperidol;

Figura 24: Efeito do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635, sobre a ação do JZL184 nos MMV induzidos por haloperidol;

Figura 25: Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida, URB597, e do antagonista de receptores TRPV1, SB366791, nos MMV induzidos por haloperidol;

Figura 26: Efeito do inibidor da hidrólise de 2-aracondoiliglicerol, JZL184, e do antagonista de receptores TRPV1, SB366791, nos MMV induzidos por haloperidol;

Figura 27: Expressão de proteína CB₁ no estriado de animais tratados cronicamente com decanoato de haloperidol;

Figura 28: Correlação entre o número de MMV e a expressão CB₁.

Figura 29: Esquematização dos efeitos do URB597 e JZL184 na catalepsia induzida por haloperidol

Figura 30: Esquematização dos efeitos do URB597 e JZL184 nos MMV induzidos por haloperidol e dos efeitos da indução de MMV na expressão de CB₁ no estriado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico

AEA: Anandamida

2-AG: 2-aracdonoilglicerol

ATV: Area tegmental ventral

AMPc: Monofosfato Cíclico de Adenosina ATP:

CB₁: Receptores canabinoides do tipo 1

CB₂: Receptores canabinoides do tipo 2

DT: Discinesia tardia

DO: Discinesia orofacial

DA: Dopamina

DOPA: Diidróxifenilalanina

EtNH₂: Etil amina

FAAH: Hidrolase de amidas de ácidos graxos

GABA: Ácido gama-aminobutírico

G_{αs}: Proteína G estimulatória

G_{αi}: Proteína G inibitória

GPI: Globo pálido interno

GPe: Globo pálido externo

I.P: Intraperitoneal

I.M: Intramuscular

MGL: Monoacilglicerol lipase

MMV: Movimentos de mastigação no vazio

n: número de animais por grupo

PKA: Proteína Quinase A

SN: Substância negra

TRPV1: Receptores de potencial transitório do Tipo vanilóide 1

$\Delta 9$ -THC : $\Delta 9$ – tetrahydrocannabinol

5-HT: Serotonina

5-HT_{1A}: Receptores para serotonina do tipo 1A

K⁺: íons de potássio

Ca²⁺: íons de cálcio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
Esquizofrenia e dopamina.....	14
Controle motor	17
Medicamentos antipsicóticos	20
Efeitos adversos agudos e crônicos dos antipsicóticos	23
Modelos Animais de efeitos adversos dos antipsicóticos	25
O sistema endocanabinóide.....	27
Sistema endocanabinóide e Controle Motor	30
JUSTIFICATIVA	31
OBJETIVOS	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
Animais.....	33
Drogas	34
Experimentos de avaliação de catalepsia	35
Experimentos de avaliação de discinesia tardia	36
<i>Western Blotting</i>	38
Análises Estatísticas	41
RESULTADOS	42
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

INTRODUÇÃO

Esquizofrenia e dopamina

A esquizofrenia é considerada um dos transtornos psiquiátricos mais graves, em que ocorre a desorganização dos processos mentais relacionados ao pensamento, emoções e percepções. Caracteriza-se pela presença de sintomas psicóticos positivos, como delírios e alucinações, e sintomas negativos, que envolvem embotamento afetivo e depressão. Associados a estes aparecem sintomas cognitivos, como déficits de atenção, memória e aprendizado (HOWES; KAPUR 2014; HOWES et al., 2012). Devido à heterogeneidade dos sintomas, acredita-se que mais de um sistema de neurotransmissão esteja envolvido no seu mecanismo fisiopatológico. A primeira teoria proposta foi chamada teoria dopaminérgica, segundo a qual os sintomas positivos ocorreriam devido a uma hiperfunção deste neurotransmissor (SEEMAN; SEEMAN, 2014).

A dopamina (3-hidroxitiramina) é um metabólito do aminoácido tirosina, o qual é convertido a diidroxifenilalanina (DOPA) e esta por sua vez é convertida em dopamina (DA) pela enzima L-aminoácido descarboxilase aromática (IVERSEN; IVERSEN 2007). Uma vez liberada na fenda sináptica a dopamina sensibiliza receptores específicos e é recaptada, através do transportador de dopamina (DAT). Após a recaptação, é desaminada pela ação da enzima monoamina oxidase (MAO) (FISONE et al., 2007).

As funções fisiológicas controladas pela dopamina no sistema nervoso central e periférico são mediadas por cinco subtipos de receptores de dopamina (D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅), pertencentes à família de receptores acoplados a proteína G. De acordo

com a sua função em inibir ou estimular a produção do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPC), a proteína G pode ser classificada como estimulatória (Gas) ou inibitória (Gai). Com base no tipo de proteína G acoplado, os receptores para dopamina são classificados em duas classes: D₁ (D₁ e D₅) ou D₂ (D₂, D₃ e D₄) (KEBABIAN; CALNE 1979; MEMO et al., 1987).

Uma representação ilustrativa do modelo de neurotransmissão dopaminérgica está apresentado na figura 1.

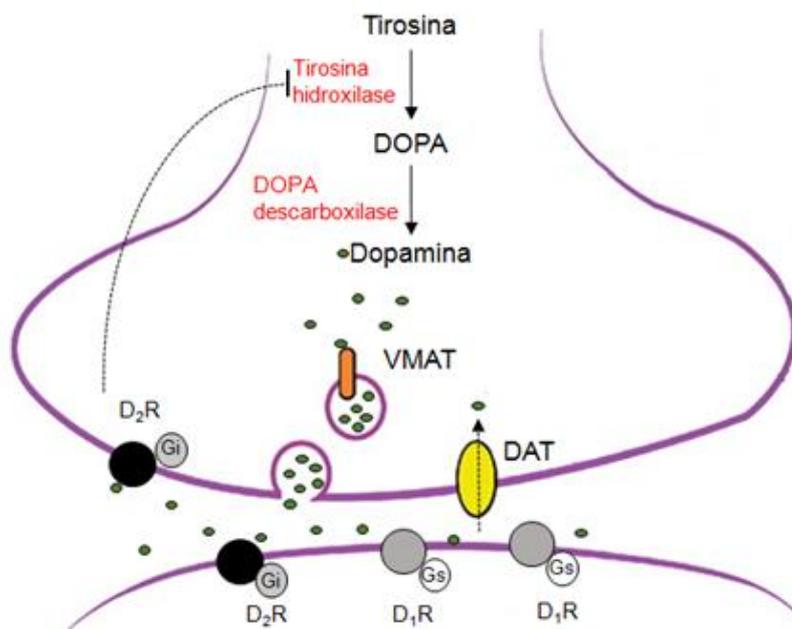


Figura 1: Representação da neurotransmissão dopaminérgica. Adaptado de SHAO et al. 2011

Os receptores da família D₁ estão acoplados a proteína G estimulatória, a qual ativa a adenilato-ciclase, que, por sua vez, produz AMPc que ativa a proteína quinase A (PKA). Duas moléculas de AMPc se ligam a cada uma das duas subunidades

reguladoras da PKA, expondo as subunidades catalíticas. Em seguida, essas subunidades podem fosforilar outras proteínas. A modulação da síntese de AMP cíclico (AMPC) através dos receptores para dopamina resulta na regulação da proteína quinase A (PKA) (SVENNINGSSON et al., 2004). Já os receptores da família D₂, estão acoplados a proteína G inibitória, que inibe principalmente a via dependente de AMP por inibição da atividade de adenilato-ciclase, diminuindo a produção de cAMP a partir de ATP, o que, por sua vez, resulta em diminuição da atividade da PKA (GIRAULT, 2012).

Existem quatro vias de neurotransmissão dopaminérgica: tuberoinfundibular, nigroestriatal, mesocortical, e mesolímbica (Figura 2). A via tuberoinfundibular, se refere a um grupo de neurônios dopaminérgicos no núcleo arqueado do hipotálamo que projeta para a eminência mediana e controla a secreção de prolactina. A via nigroestriatal consiste em neurônios cujos corpos celulares se originam na substância negra e chegam no estriado dorsal (SOURKES et al., 1963; WANG et al. 2009; STUBER et al., 2010). Na via mesocortical, neurônios da área tegmental ventral (ATV) projetam para os lobos frontais do cérebro, particularmente o córtex pré-frontal e estão envolvidos na cognição e emoção. Por último, os neurônios da via mesolímbica também se originam na ATV e inervam o estriado ventral, também conhecido como o núcleo accumbens. Esta via está implicada na resposta de recompensa e prazer (NESTLER; CARLEZON 2006).

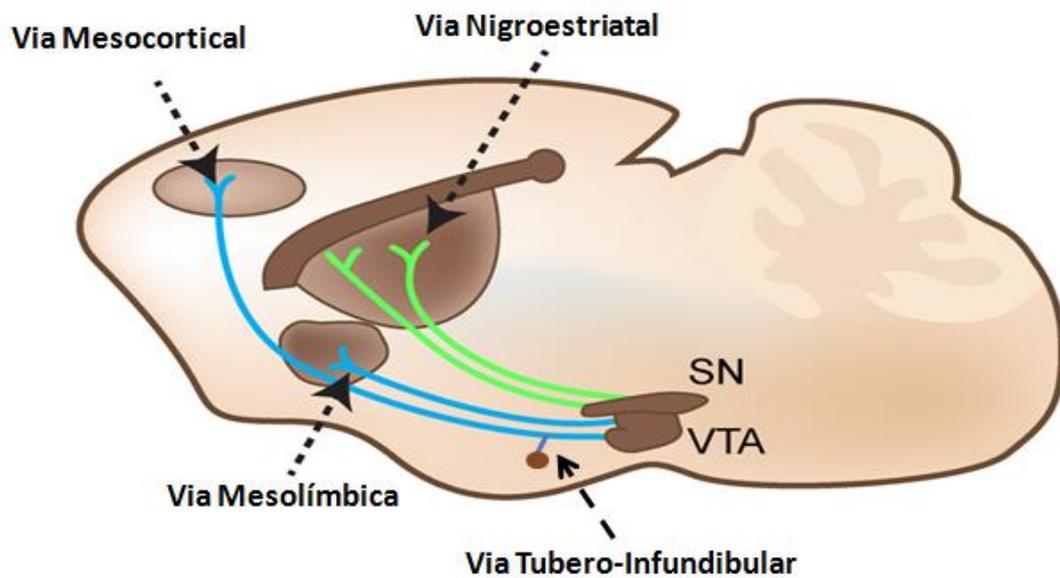


Figura 2. Representação das vias dopaminérgicas em cérebro de camundongo adulto.

Plano sagital. Adaptado de MONEY, STANWOOD 2013

VTA: área tegmental ventral;

SN: Substância Negra

Controle motor

Os movimentos executados pelos músculos estriados esqueléticos, são comandados pelo córtex cerebral e modulados por estruturas sub-corticais, entre elas as que compõem os núcleos da base, substância negra, núcleo subtalâmico, núcleo rubro, formação reticular e o tálamo (FREEZE et al., 2013).

Os núcleos da base podem ser divididos em: corpo estriado dorsal, constituído de caudado e putâmen (neostriado) e globo pálido interno e externo (paleostriado), e corpo estriado ventral, formado pela substância inominada, núcleo accumbens e

tubérculo olfatório (KRAVITZ; KREITZER, 2012; MONEY, STANWOOD 2013). As vias de controle motor são divididas em via direta e via indireta.

A via direta do movimento é um circuito que facilita a iniciação e execução de movimentos. Passa através do núcleo caudado, putâmen e globo pálido e abrange também a substância negra. O globo pálido (interno) e a substância negra (pars reticulata), enviam projeções GABAérgicas inibitórias para o tálamo, o qual inibe o córtex motor. A inibição da inibição talâmica leva a um aumento na atividade motora cortical (KRAVITZ; KREITZER 2012; FREEZE et al., 2013).

Quando um movimento é planejado, o córtex pré-frontal envia projeções glutamatérgicas para o caudado e putâmen. Estes enviam projeções GABAérgicas para o globo pálido (interno) e substância negra (pars reticulata). Uma vez inibidos, deixam de inibir o tálamo, que passa a enviar projeções glutamatérgicas para o córtex motor (CALABRESI et al., 2014a).

Simultaneamente, na via indireta, o córtex motor ativa o caudado e putamen, através de projeções glutamatérgicas. Uma vez ativadas, estas estruturas inibem o globo pálido externo, que tonicamente inibe o núcleo subtalâmico. Estes sinais são, portanto, reduzidos, o que permite ativação do núcleo subtalâmico, que, então ativa o globo pálido interno e substância negra (pars reticulata) (CALABRESI et al., 2014b; FREEZE et al., 2013). Assim levam ao aumento da inibição do tálamo, o que impede a ativação do córtex motor, que competiriam com o movimento voluntário (Figura 3).

Adicionalmente existem projeções GABAérgicas provenientes da substância negra (pars reticulata) para o tronco encefálico (tegmento mesopontino) que desempenham um importante papel no controle do tônus muscular postural e da locomoção.

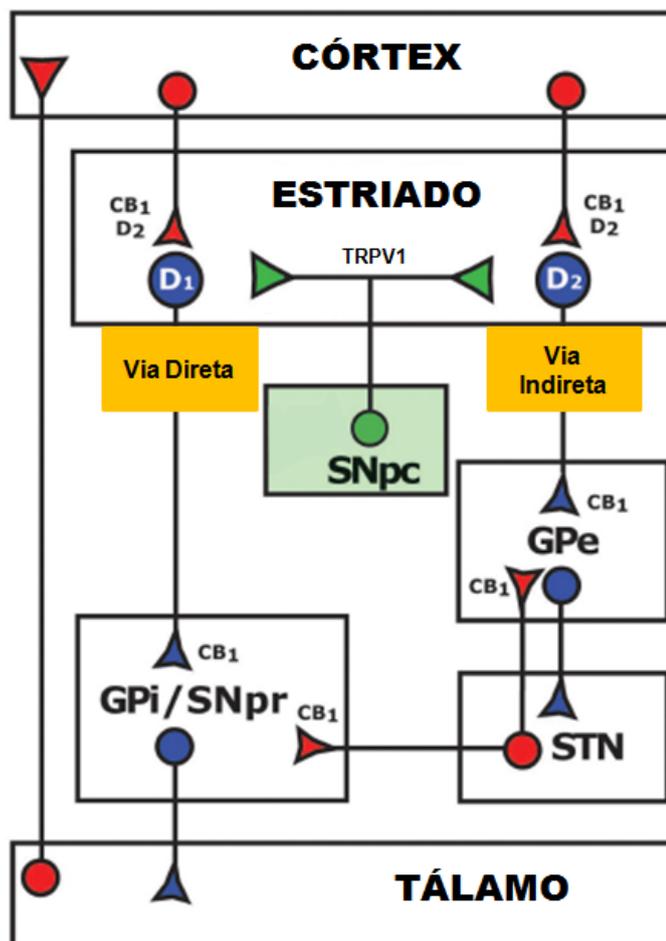


Figura 3: Representação das vias direta e indireta do movimento. Adaptado de MORERA-HERRERAS et al. 2012

Em vermelho: Projeções glutamatérgicas

Em azul: Projeções GABAérgicas

Em verde: Projeções Dopaminérgicas

Medicamentos antipsicóticos

A principal abordagem no tratamento da esquizofrenia consiste no uso de medicamentos antipsicóticos. Estes são também utilizados no tratamento de outros transtornos, como o transtorno bipolar e esquizoafetivo e a depressão refratária (LALLY; MACCABE, 2015). Os antipsicóticos foram introduzidos na prática clínica no início da década de 1950, após a descoberta ao acaso dos efeitos da clorpromazina, um derivado do anti-histamínico prometazina e pertencente à classe das fenotiazinas (MOREIRA, GUIMARÃES, 2007). Foram inicialmente chamados neurolépticos e estão divididos em dois grupos: Antipsicóticos Típicos ou de primeira geração e Antipsicóticos Atípicos ou de segunda geração, sendo classificados de acordo com o seu mecanismo de ação e o tipo de efeitos terapêuticos e adversos (GERLACH, 1991; MCCREARY; NEWMAN-TANCREDI, 2015).

O mecanismo da ação terapêutico dos antipsicóticos típicos ocorre por meio do antagonismo dos receptores de dopamina do tipo D_2 na via mesolímbica, que reduz a hiperatividade responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia. No entanto estes medicamentos também antagonizam receptores D_2 em outras vias dopaminérgicas. O bloqueio da via nigro-estriatal resulta em efeitos adversos motores, também chamados de extrapiramidais, Estes efeitos podem se manifestar cedo ou após um longo período do início do tratamento e incluem distonia (contrações musculares anormais), acatisia (inquietação), síndrome Parkinsoniana (tremor, bradicinesia/hipocinesia, rigidez) e discinesia tardia (tremor e movimentos orofaciais), uma das variantes tardias destes sintomas (BERNAGIE et al., 2016). O bloqueio da via túbero infundibular pode resultar em galactorreia e ginecomastia (MILLER, 2009).

O haloperidol é um dos antipsicóticos típicos mais amplamente utilizados e pertence à classe das butirofenonas. No Brasil, é comercializado sob duas formas: sal

(lactato) e éster (decanoato), sendo o último uma forma de liberação lenta. Em humanos, o decanoato de haloperidol atinge o pico de concentração plasmática no sétimo dia após a administração (JANN; ERESHEFSKY;SAKLAD,, 1985; KOROLKOVAS, 2008).

Como os demais membros da classe, o haloperidol, além de ter reduzida eficácia frente aos sintomas negativos, podem também ocasionar efeitos adversos.

Estes fatores impulsionaram a busca por novos fármacos que não apresentassem efeitos extrapiramidais e fossem eficazes em sintomas tanto positivos quanto negativos. (GAUR et al., 2008). Assim surgiu a segunda geração de antipsicóticos, também chamados de atípicos, uma vez que possuem características farmacológicas diferenciadas dos demais, por atuarem conjuntamente sobre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, com características de antagonistas ou agonistas parciais. O principal critério para a classificação como atípico é a promoção de ação antipsicótica em doses que não induzam a efeitos extrapiramidais, além da eficácia sobre os sintomas negativos (STRANGE, 2001). Os medicamentos desta geração apresentam menor probabilidade de induzir sintomas extrapiramidais e melhoram os sintomas positivos em pacientes resistentes aos fármacos de primeira geração (WORREL et al 2000). Entretanto podem ocasionar outros efeitos adversos, incluindo ganho de peso, resistência à insulina, dislipidemias, e sintomas cardíacos, tais como arritmia e hipertensão. A Clozapina, protótipo da classe, apresenta um risco de agranulocitose, que exige a necessidade de um acompanhamento regular. (HENDERSON et al., 2000) Além disso, possuem elevado custo, fazendo com que os antipsicóticos típicos ainda sejam largamente empregados (CRYSTAL et al., 2009).

Além do antagonismo dopaminérgico, fármacos desta classe, incluindo a clozapina, ziprasidona, quetiapina e o aripiprazol, possuem efeitos agonistas

(parciais) nos receptores de serotonina do tipo 5-HT_{1A}. Os receptores 5-HT_{1A} são acoplados à proteína G inibitória e estão amplamente distribuídos em no encéfalo, tais como em áreas corticais, hipocampo, hipotálamo, e os núcleos da rafe. Também possuem funções de autoreceptor, controlando a liberação e neurotransmissão serotoninérgica (CREED; NOBREGA, 2013). A observação de que antipsicóticos atuam em receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, bem como o conhecimento de que certas drogas psicotomiméticas agem via serotonina, levou à hipótese do envolvimento da serotonina na esquizofrenia, baseada na atribuição dos efeitos psicotomiméticos da dietilamida do ácido lisérgico (LSD), um agonista 5-HT_{2A}. Foi proposto que a atividade serotoninérgica pode estar diminuída na esquizofrenia (WOOLLEY; SHAW, 1954).

A hipofunção do córtex pré-frontal medial (hipofrontalidade) é considerada importante na fisiopatologia da esquizofrenia, uma vez que é fundamental nos comportamentos de tomada de decisão, processamento da atenção e controle de impulsos (POMAROL-CLOTET et al., 2010). Compostos capazes de reverter a hipofrontalidade representam potenciais estratégias de tratamento para a esquizofrenia e entre eles estão incluídos agonistas 5-HT_{1A}, uma vez que ocasionam o aumento dos níveis de dopamina nessa região (ICHIKAWA et al., 2001). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que tanto os agonistas 5-HT_{1A} e antagonistas 5-HT_{2A} produzem despolarização de membrana, que culmina no aumento da liberação dopaminérgica. Além disso, o WAY100635, um antagonista 5-HT_{1A}, atenua parcialmente a capacidade de clozapina, olanzapina e risperidona de aumentar liberação de dopamina no córtex pré-frontal (ARANEDA; ANDRADE, 1991)

Efeitos adversos agudos e crônicos dos antipsicóticos

Os efeitos adversos agudos dos antipsicóticos incluem distonia, acatisia e síndrome Parkinsoniana (BERNAGIE et al., 2016).

A distonia geralmente se manifesta precocemente na terapia e pode ter flutuações de acordo com o estresse e é caracterizada por contrações anormais dos músculos da cabeça, pescoço, costas, olhos e membros (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013) .

A síndrome Parkinsoniana também ocorre agudamente após a administração de antipsicóticos e é caracterizada por tremores, rigidez muscular e dificuldade em iniciar movimentos (CAROFF et al., 2011).

A acatisia pode começar cedo ou ter o início mais demorado e é definida pelo sentimento subjetivo de inquietação, muitas vezes acompanhada pelo desejo de se mover e incapacidade de sentar-se. Os sintomas mais frequentemente afetam as extremidades inferiores e variam com estresse e excitação (CORRELL, 2008).

Quanto aos efeitos adversos crônicos, a discinesia tardia (DT), é o mais impactante. A DT consiste em uma síndrome que abrange uma variedade de desordens motoras. O termo “discinesia tardia” foi proposto por Faurbye e colaboradores. em 1964, em que a palavra “tardia” é usada para descrever que os sintomas se iniciam após algum tempo de tratamento (geralmente após três meses de exposição em pacientes jovens e um mês em pacientes idosos) (AIA et al., 2011). Antes da criação deste termo a síndrome era referida com outras terminações como “discinesia persistente”, “síndrome buco-língua-mastigatória” ou “síndrome da insuficiência extrapiramidal terminal” (CASEY, 1999).

É caracterizada por movimentos anormais involuntários, que atingem principalmente a região orofacial, com movimentos de mastigação, protrusão da

língua além de movimentos de piscar os olhos. Em alguns casos, podem também atingir o pescoço, os membros superiores e o tronco (CASEY, 1999) (GARDOS; COLE 1983). Ocorre em torno de 10 a 20% dos pacientes tratados com neurolépticos típicos e pode ser persistente por anos após o término do tratamento e em muitos casos, irreversível. Em geral instala-se lentamente e seu curso é bastante variado, sendo mais grave em pacientes idosos. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000).

Os sintomas são exacerbados pelo estresse e podem variar de acordo com faixa etária, embora a prevalência seja maior com o aumento da idade. Pode causar complicações como problemas dentários e dificuldade na deglutição e alimentação. Quando atinge a glote e o diafragma pode ocasionar problemas respiratórios (RICH; RADWANY 1994).

Até o momento não existe uma explicação clara para o desenvolvimento da DT. Muitas hipóteses são sugeridas para entender como a síndrome se estabelece. Estas, incluem a supersensibilidade dopaminérgica, excitotoxicidade e formação de radicais livres (WOLFARTH; OSSOWSKA 1989; TSAI et al., 1998; LISTER et al., 2016). A hipótese da supersensibilidade dopaminérgica é a mais aceita e segundo ela, a DT ocorreria devido ao aumento compensatório no número de receptores dopaminérgicos em resposta ao seu bloqueio crônico, o que desencadearia um estado hiperdopaminérgico (RUBINSTEIN et al., 1990). No entanto, a mesma apresenta algumas inconsistências já que em modelos animais o aumento da expressão de receptores D₂ ocorre de modo semelhante em animais tratados com haloperidol que apresentam alto número de movimentos de mastigação no vazio (MMV) e aqueles que apresentam valores baixos de MMV (TURRONE; REMINGTON; NOBREGA, 2002).

Algumas evidências também demonstram a participação do sistema serotoninérgico nos sintomas da DT. A serotonina modula a atividade dopaminérgica na via nigroestriatal, através de projeções dos núcleos da rafe e os sintomas da discinesia são exacerbados com o tratamento concomitante entre antipsicóticos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina, que ocasiona o aumento de seus níveis. Além disso, os antipsicóticos atípicos, que exercem antagonismo/agonismo parcial serotoninérgico apresentam reduzida incidência de efeitos motores (CALEY, 1998; WALLMAN; GAGNON; PARENT, 2011).

Modelos Animais de efeitos adversos dos antipsicóticos

Alguns dos efeitos adversos dos antipsicóticos podem ser estudados em modelos animais. Estes são de extrema importância para o estudo de distúrbios comportamentais relacionados a distúrbios mentais. Entretanto estes modelos devem preencher alguns critérios de validade, sendo os mais importantes as validações construtiva, facial e preditiva (IVERSEN, 1987). A validade de construção faz referência ao mecanismo imitador do mecanismo neurobiológico. A validade facial se baseia na semelhança entre as alterações comportamentais observadas no modelo e as observadas na doença. Já a validade preditiva refere-se à especificidade e a sensibilidade do modelo para a detecção de efeitos farmacológicos, evitando resultados falsos positivos ou falsos negativos (GOBIRA et al., 2013).

Os modelos para a avaliação de efeitos adversos agudos avaliam capacidade de indução de catalepsia, que consiste na dificuldade em iniciar um movimento, e possui validade preditiva para a indução de efeitos adversos extrapiramidais em humanos, e neste caso as doses capazes de induzir catalepsia

em ratos e camundongos correlacionam-se com aquelas que induzem efeitos extrapiramidais em seres humanos (HOFFMAN; DONOVAN, 1995).

Quanto aos efeitos adversos crônicos, a DT é estudada, principalmente, em ratos. A DT em ratos se manifesta como discinesia orofacial (DO). O modelo reproduz a síndrome de maneira muito semelhante como ocorre em humanos, sendo que alguns indivíduos são mais susceptíveis e o aumento da incidência é diretamente proporcional à idade (CASEY; DANIEL, 2000; KULKARNI, DHIR 2011).

A administração em longo prazo de antipsicóticos típicos leva a uma síndrome de movimentos de mastigação, caracterizados por movimentos verticais da mandíbula, podendo estar acompanhados de tremor facial e protrusões da língua. Os MMV são considerados análogos às discinesias orofaciais ocorrentes em humanos com discinesia tardia (GUNNE et al., 1986; BLANCHET et al., 2012).

O Sistema endocanabinoide

O uso de *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, é descrito por volta de 4000 a.C, na China, onde era utilizada para o tratamento de reumatismo, constipação e crises epilépticas, além do uso em rituais religiosos devido aos efeitos psicoativos (TOUW, 1981).

Somente em 1964 foi isolado o principal composto psicoativo da maconha, o Δ^9 Tetraidrocanabinol (Δ^9 THC) (GAONI; MECHOULAM 1964). Posteriormente, o mesmo foi sintetizado e possibilitou o estudo mais específico sobre os efeitos de sua administração sistêmica, embora seu mecanismo de ação permanecesse desconhecido.

Em 1988, Devane e colaboradores caracterizaram, em cérebro de ratos, um receptor específico de ligação para canabinóides, o qual foi chamando de receptor canabinóide do tipo 1 (CB₁) (DEVANE et al., 1988). Em 1990 o mesmo foi clonado e teve sua estrutura identificada, sendo classificado como pertencente à família dos receptores acoplados a proteína G ou metabotrópicos (MATSUDA et al., 1990).

Uma vez identificado o receptor, passou-se a procurar seus ligantes endógenos. A araquidonil-etanolamida (anandamida) foi o primeiro composto endógeno com atividade canabinoide, isolada em 1992 (DEVANE, et al., 1992). Em 1993 foi isolado um subtipo periférico de receptor canabinóide, o receptor CB₁ (MUNRO, 1993) e em 1995, descoberto um segundo canabinóide endógeno, o 2-aracdonoilglicerol (2-AG) (MECHOULAM et al., 1995).

A anandamida é sintetizada através da hidrólise da N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NArPE), a qual é encontrada na membrana plasmática, na membrana mitocondrial e no retículo endoplasmático. A reação é catalisada pela fosfolipase D, por um mecanismo dependente de Ca²⁺ (OKAMOTO et al., 2004). Mediante estímulo, é liberada do interior das células através de um transportador de membrana e na fenda sináptica atua como neurotransmissor de ação retrógrada, em terminais pré e pós-sinápticos (DI MARZO et al. 1994). Ao término de sua ação, a anandamida é recaptada pelas células e transportada para dentro das células através do transportador de anandamida FAAH-like (FLAT) e então é hidrolisada pela ação da enzima hidrolase de amina de ácidos graxos, também conhecida como FAAH, do inglês, *fatty acid amide hydrolase* (FU et al., 2012).

A anadamida também é um agonista de receptores TRPV1, um subtipo de receptores não seletivo de canais para cátions, descoberto em 1997. Este receptor foi o primeiro receptor para vanilóides a ser caracterizado (CATERINA et al.,1997). São

assim chamados devido a um dos seus principais agonistas, a capsaicina, um derivado da pimenta, possuir um grupamento homovanilil na sua estrutura (SZALLASI; BLUMBERG, 1999).

Deste modo, a anandamida é considerada também um endocanabinóide/endovanilóide.

O 2-AG é formado através da hidrólise de fosfolipídeos de membrana através da fosfolipase C, liberando diacilgliceróis, os quais sofrem ação da diacilglicerol lipase D, α ou β (TANIMURA et al., 2010). Foi inicialmente isolado do intestino de cães e se verificou similaridades com a anandamida, uma vez que se ligava a receptores CB_1 e CB_2 e levava a inibição da adenilato ciclase, como o Δ^9 -THC (MECHOULAM et al., 1995). É metabolizado pela enzima monoacilglicerol lipase (MGL), que consiste em uma hidrolase de serina que degrada preferencialmente monoacilgliceróis e ácidos graxos (AHN; MCKINNEY; CRAVATT, 2008).

Diferente da anandamida, que possui maior afinidade pelos receptores CB_1 , o 2-AG possui afinidade semelhante para ambos receptores CB_1 e CB_2 . Ambos receptores são acoplados a proteína $G_{i/o}$ (MACKIE, 2008) Figura 4.

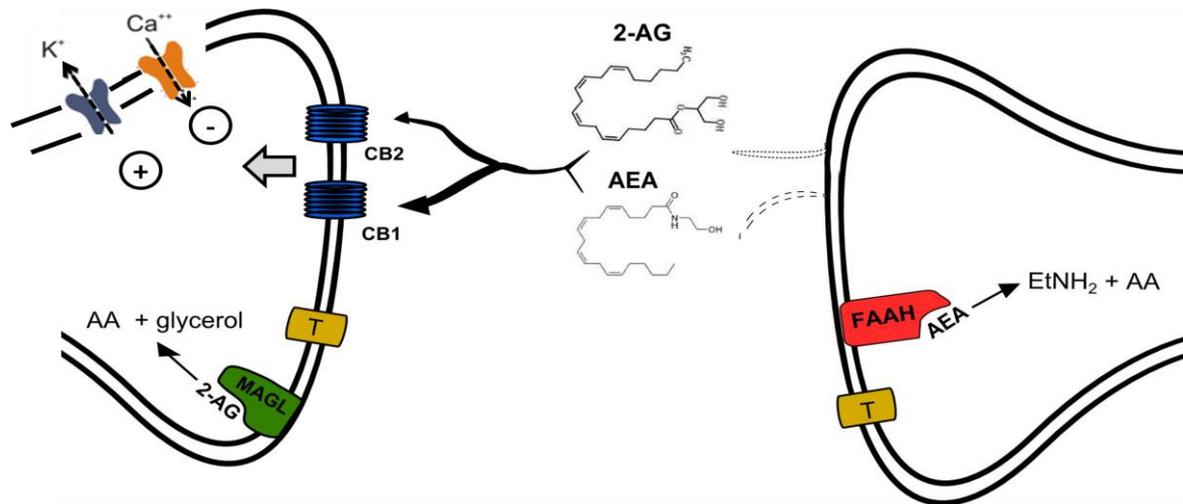


Figura 4. Representação dos componentes do sistema endocanabinoide

Adaptado de BATISTA et al. 2014

Sistema endocanabinoide e controle motor

Os primeiros estudos sobre os efeitos comportamentais do uso de *Cannabis sativa* foram realizados por Walton e colaboradores em 1938, nos quais foram descritos efeitos motores após a exposição a extratos de *Cannabis sativa*, os quais incluíam hipocinesia e catalepsia.

Na década de 1990, após o mapeamento da distribuição dos receptores CB₁ no cérebro tornou-se possível entender os efeitos comportamentais dos canabinóides (GLASS; FAULL; DRAGUNOW, 1997). Os efeitos motores como imobilidade e catalepsia observados após administração aguda de agonistas CB₁ podem ser

explicados após a observação de intensa expressão de receptores CB₁ nos núcleos da base e cerebelo (HERKENHAM et al., 1991).

A grande maioria dos neurônios do estriado consiste em neurônios GABAérgicos espinhosos de tamanho médio (MSNs) os quais, além de aferentes dopaminérgicos recebem aferentes glutamatérgicos. A dopamina controla o estado de excitabilidade dos MSNs por modulação da transmissão glutamatérgica (MISSALE et al., 1998). MSNs do estriado dorsal expressam elevado número de receptores CB₁, e estes se encontram co-localizados com receptores dopaminérgicos (D₁ e D₂) (HERKENHAM et al., 1991).

Em 1999, Giuffrida e colaboradores demonstraram que em ratos, durante sua movimentação livre, a liberação de dopamina era acompanhada pela liberação de anandamida no estriado dorsal, a qual pode atuar controlando a estimulação motora mediada pela dopamina (GIUFFRIDA *et al.*, 1999).

Nos anos seguintes, diversos estudos corroboraram esses efeitos relacionados à modulação de endocanabinóides na função motora em modelos animais de doença de Parkinson, doença de Huntington, discinesia induzida por levodopa e discinesia tardia (SEGOVIA et al., 2003; GLASS et al., 2004; VAN DER STELT et al., 2005; GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007; DOWIE et al., 2010).

Também foi verificado que a administração intracerebroventricular de anandamida atenua os MMV induzidos por haloperidol através da ativação de receptores CB₁ (RÖPKE et al., 2014).

Em experimentos de avaliação de catalepsia, o canabidiol, um importante componente da *Cannabis sativa*, que não possui efeitos psicoativos, reduz o tempo de imobilidade através do agonismo de receptores 5-HT_{1A} (GOMES; DEL BEL; GUIMARÃES, 2013; SONEGO et al., 2016).

JUSTIFICATIVA

Apesar do uso do haloperidol ser uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia, sua utilização pode desencadear uma série de efeitos adversos motores. Estes podem ser agudos, que incluem a síndrome parkinsoniana, acatisia e distonia, ou crônicos, que compreendem a discinesia tardia. Uma vez que estes sintomas causam desconforto e reduzem a adesão ao tratamento, se faz necessária a busca pelo melhor entendimento dos mesmos, bem como de tratamentos paliativos que possibilitem a sua atenuação sem alterações no efeito terapêutico do haloperidol.

OBJETIVOS

Geral

Investigar o efeito de compostos que interferem na neurotransmissão do sistema endocanabinóide através da inibição da hidrólise de seus componentes endógenos sobre alterações motoras induzidas por haloperidol.

Específicos

- Testar a hipótese de que o aumento do tônus endocanabinóide possa reduzir as alterações motoras decorrentes da administração aguda e crônica de haloperidol.
- Testar a hipótese de que ocorram diferenças relacionadas ao sistema endocanabinóide em animais tratados cronicamente com haloperidol que possuem sintomas relacionados a discinesia tardia em relação aos que não apresentam estes sintomas
- Avaliar a participação de receptores CB₁ e TRPV1 no aumento da neurotransmissão endocanabinóide
- Verificar a participação dos receptores 5-HT_{1A} nos efeitos exercidos pelos inibidores da hidrólise de endocanabinóides.
- Verificar se o tratamento crônico com o haloperidol altera a expressão de receptores CB₁ no estriado.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para o experimento de avaliação da catalepsia foram utilizados camundongos *Swiss* machos pesando entre 25 e 30 gramas, obtidos do CEBIO-UFMG. Para o experimento de avaliação da discinesia tardia foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 200 e 220 gramas.

Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (24°C) em ciclo claro escuro de 12h, com livre acesso a água e comida. Este procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 220/2014.

Drogas

As drogas foram injetadas em camundongos em uma diluição de 10 mL/kg e em ratos, de 1 mL/kg

Haloperidol – Cristália®

Dose 0,5 mg/kg (Curva dose respostas 0,1; 0,25; 0,5 mg kg)

Veículo: Solução salina

Decanoato de haloperidol – Janssen-Cilag®

Dose 38 mg/kg (RÖPKE *et al.*, 2014)

Veículo: Óleo de gergelim

URB597 – inibidor da hidrólise de anandamida, através da inibição da enzima hidrolase de amida de ácido graxo - Tocris[®]

(Curva dose resposta em camundongos nas doses de 0,1; 0,3 e 1 mg/kg e em ratos nas doses de 0,1; 0,25 e 0,5 mg/kg)

Dose utilizada em camundongos: 0,1 mg/Kg

Dose utilizada em ratos: 0,5 mg/kg

Veículo: 5% de cremophor, 5% de etanol e 90% de solução salina.

JZL184 – inibidor da hidrólise de 2-araquidonoilglicerol, através da inibição da enzima monoacilglicerol lípase - Tocris[®]

(Curva dose resposta em camundongos e ratos nas doses de 1; 3; 10 mg kg)

Dose utilizada em camundongos e ratos: 3 mg/Kg

Veículo: 5% de cremophor, 5% de etanol e 90% de solução salina.

AM251 – antagonista de receptores CB₁ -Tocris[®]

Dose utilizada em camundongos e ratos: 1mg/kg (KOMAKI *et al.*, 2015).

Veículo: 5% de cremophor, 5% de etanol e 90% de solução salina.

WAY100635 – antagonista de receptores 5-HT_{1A}, Tocris[®]

Dose utilizada em camundongos e ratos: 1mg/kg (PITSIKAS *et al.*, 2003)

Veículo: Solução salina

SB705498 – antagonista de receptores TRPV1, Tocris[®]

Dose utilizada em camundongos e ratos: 1mg/kg (MA *et al.*, 2016)

Veículo: Solução salina

Experimentos de avaliação de catalepsia

Delineamento experimental

Inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta de haloperidol, a fim de encontrar a dose ideal para indução de catalepsia, que foi definida em 0,5 mg/kg.

No primeiro experimento os animais foram submetidos a injeção dos inibidores da hidrólise de endocanabinóides (URB597 ou JZL184) ou veículo, por via intraperitoneal, 15 minutos antes da administração de haloperidol ou veículo, pela mesma via.

Nos demais experimentos, foram submetidos a administração de: Antagonista de receptores CB₁ (AM251) ou veículo

Antagonista de receptores 5-HT_{1A} (WAY100635) ou veículo

Antagonista de receptores TRPV1 (SB705498) ou veículo

Todos por via intraperitoneal, 15 minutos antes da administração dos inibidores de hidrólise de endocanabinóides e 30 minutos antes da administração de haloperidol. O teste foi realizado 30 minutos após a última injeção.

Teste de catalepsia

O teste de catalepsia consiste em colocar o animal em uma postura incomum sobre uma barra de vidro horizontal com 0,5 cm de diâmetro e elevada a 4 cm da superfície. Os animais são posicionados apenas com as patas dianteiras sobre a barra.

O tempo em que o animal permanece nessa posição é quantificado, uma vez que a catalepsia leva a dificuldade em iniciar um movimento. A Catalepsia é considerada concluída quando pelo menos uma pata dianteira toca a superfície ou quando o animal sube a superfície da barra. Caso o animal não saia da posição, o limite máximo de tempo definido foi de 300 segundos. (Fig. 5).

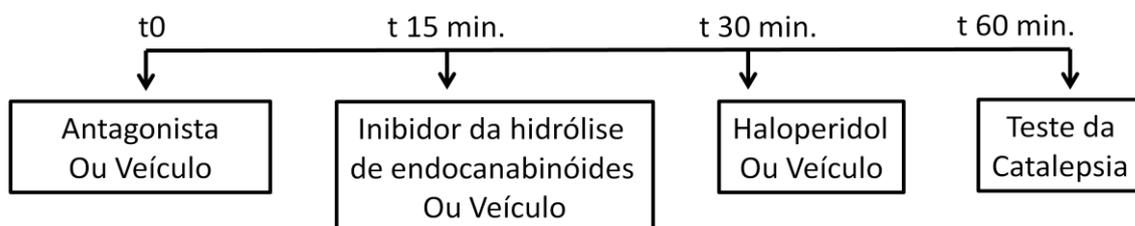


Fig 5. Esquemática do delineamento experimental no teste da catalepsia

Experimentos de Avaliação de discinesia tardia

Delineamento experimental

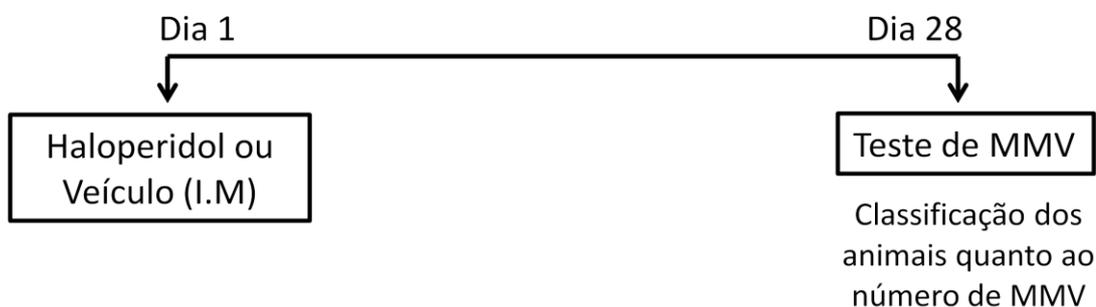
Os animais foram submetidos a uma única injeção de decanoato de haloperidol (38 mg/kg) por via intramuscular, o qual possui liberação lenta e corresponde a uma dose diária de 1mg/kg. Os animais do grupo controle receberam quantidades equivalentes de veículo (óleo de gergelim). O período de tratamento foi de quatro semanas, sendo que em seguida os animais tiveram o comportamento avaliado e em seguida foram administradas as demais drogas por via intraperitoneal.

Avaliação dos movimentos de mastigação no vazio

Para cada sessão de avaliação, os ratos foram observados individualmente por um período de 5 min em uma caixa de observação de vidro (20 × 20 × 20 cm), sem a presença de alimento e contendo espelhos abaixo do chão para permitir a visualização pelo observador. As observações começaram após um período de habituação de 5 minutos (EGAN et al, 1996). Cada movimento do maxilar não direcionado para qualquer material físico ou relacionado ao ato de autolimpeza ou roer foi contado como um único MMV.

Um ponto de corte foi estabelecido, como descrito por Egan e colaboradores (1994): para cada sessão de observação, o dobro da pontuação média do grupo controle foi designado um ponto de corte. Os animais tratados foram definidos como sendo MMV alto se tinham pontuações acima do ponto de corte.

Assim, os animais foram distribuídos por grupos MMV alto (acima do ponto de corte) e MMV baixo (abaixo do ponto de corte). (Fig. 6)



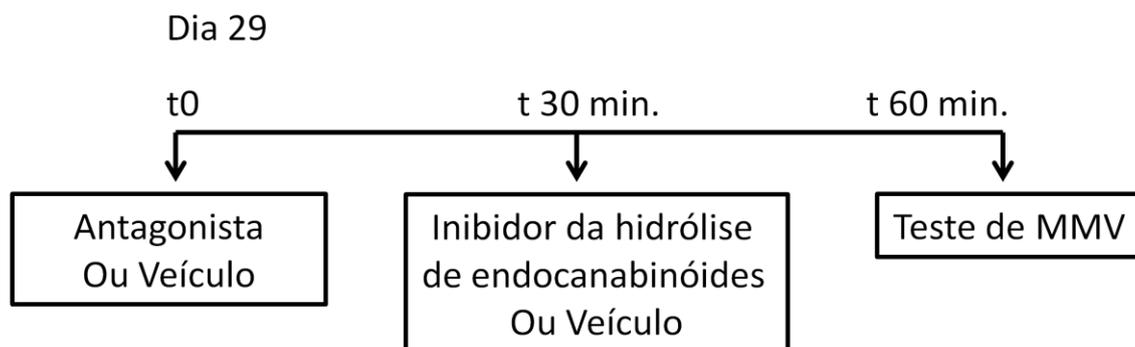


Fig 6. Esquematização do delineamento experimental para o teste de avaliação de discinesia tardia

Avaliação dos movimentos de mastigação no vazio após a retirada do haloperidol

Após o tratamento de quatro semanas, um grupo de animais foi submetido a avaliações de MMV após quatro, oito e doze semanas do término do tratamento.

Western Blotting

Preparação da Amostra

Após testes comportamentais os animais foram eutanasiados e os estriados retirados e armazenados a -80°C até o processamento.

As amostras foram homogeneizadas em tampão de RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM (pH=7,4), EDTA 1 mM, Nonidet P40 1%, PMSF 1 mM, Na deoxicolato 0,5%)

em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a 2040.35 G (Centrífuga Eppendorf 5415R) a 4°C por 15 minutos e a concentração total de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando a proteína albumina de soro bovino (BSA) (1mg/ml) como padrão.

Eletroforese em Gel, Transferência, Bloqueio e Incubação da Membrana com Anticorpo Primário

As amostras, contendo 30 µg de proteínas totais, foram desnaturadas em tampão de amostra (100 mM Tris-HCl pH=6,8, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol, 20% H₂O, 0,5% β-mercaptoetanol) a 100° C por 4 minutos, carregadas e separadas no gel de SDS-poliacrilamida (12 ou 15%) e, então transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno, PVDF (PVDF, Immobilon-P, Millipore, Massachusetts, USA). Após bloqueio de 24 horas em TBST (tampão Tris com 0,1% de tween 20) contendo 5% de leite sem gordura e 0,3% BSA, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase –GAPDH (1:2500, Santa Cruz Biotechnology Inc, sc-69879) e CB₁ (1:1000, Calbiochem, #209550).

Revelação da Membrana

Para a visualização das bandas, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente, por 1 hora, com anticorpos secundários anti-coelho (1:5000). As bandas de proteínas foram detectadas utilizando o sistema de detecção Western

ECL (Pierce) e a densidade foi quantificada pelo software Image J (Versão 1.44p, National Institute Health, USA).

Análises estatísticas

Os dados comportamentais foram analisados através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla comparação de Newman-Keuls ou teste t não-pareado e representados como média e erro padrão.

Os resultados de *western blotting* foram submetidos à ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Resultados de *western blotting* e alguns parâmetros comportamentais foram submetidos à correlação linear.

Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Em todas as análises utilizou-se o *software* GaphPad Prisma, versão 5.

RESULTADOS

Curva dose-resposta do haloperidol sobre a catalepsia

Inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta com haloperidol, a fim de encontrar a dose eficaz para indução de catalepsia em camundongos. As doses de 0,25 e 0,5 mg /kg foram efetivas, e a dose de 0,5 mg /kg foi utilizada como padrão, uma vez que é equivalente a dose terapêutica ($F_{3,36} = 9,593$, $p < 0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 7).

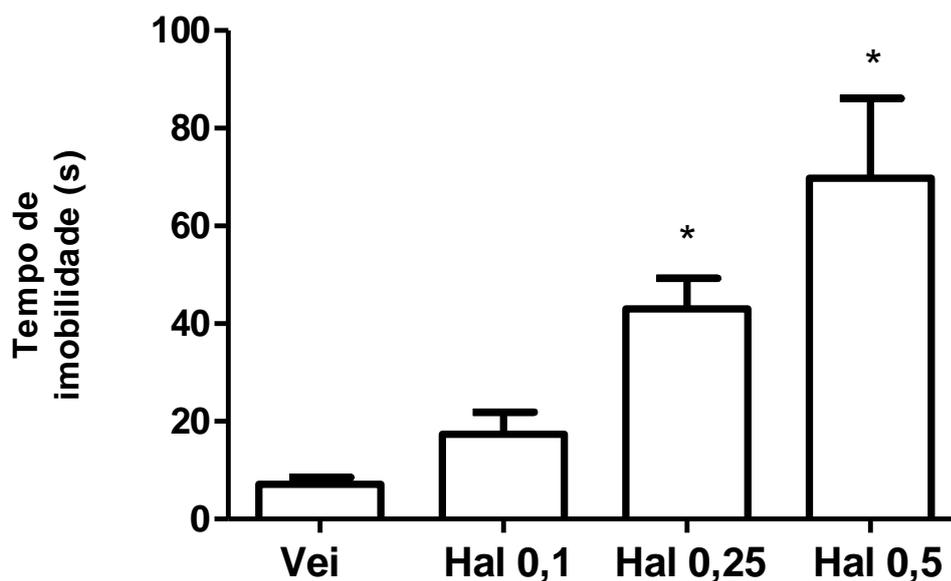


Fig.7 Curva dose-resposta do haloperidol na catalepsia em camundongos. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{3,36} = 9,593$; $n = 10$ /grupo.

Efeito do tratamento com os inibidores da hidrólise de anandamida, URB597, e 2-AG, JZL 184, sobre a catalepsia induzida por haloperidol

Foram administradas três doses (0,1; 0,3 e 1 mg /kg) do inibidor da hidrólise de anandamida URB597 e do inibidor da hidrólise de 2-araquidonilglicerol (1,3 e 10 mg /kg), previamente ao haloperidol. A injeção da menor dose de URB597 (0,1 mg /kg) promoveu a redução no tempo de imobilidade nos animais ($F_{4,37}= 9,29$ $p<0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 8).

A administração de JZL184, nas doses de 3 e 10, também ocasionou a diminuição do tempo de imobilidade na avaliação ($F_{4,35} = 13,27$ $<0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 9).

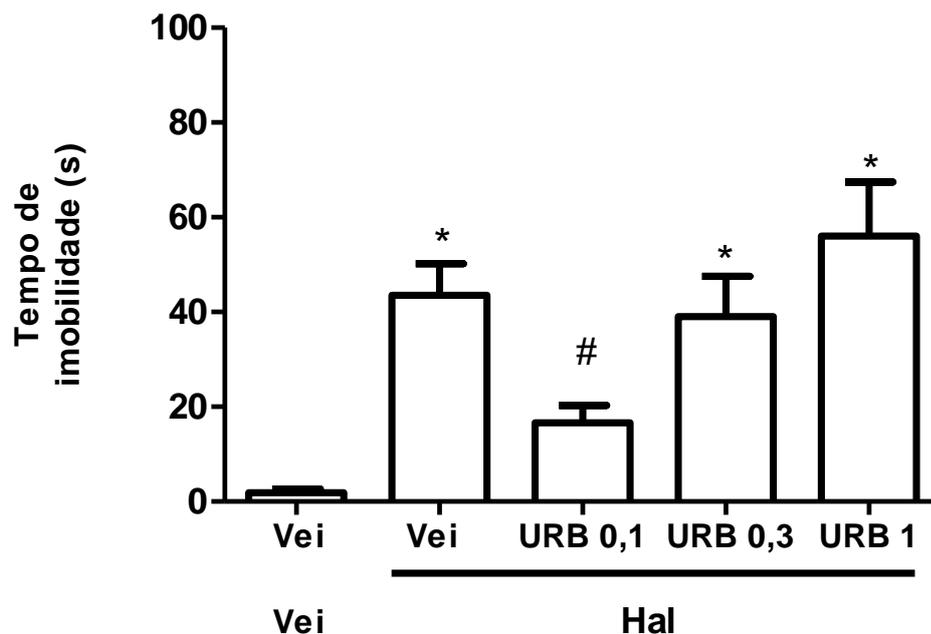


Fig. 8 Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida, URB597, na catalepsia induzida por haloperidol.. * $p<0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p<0,05$, comparado com o grupo veículo com haloperidol; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,37}= 9,29$; $n= 8-9$ /grupo

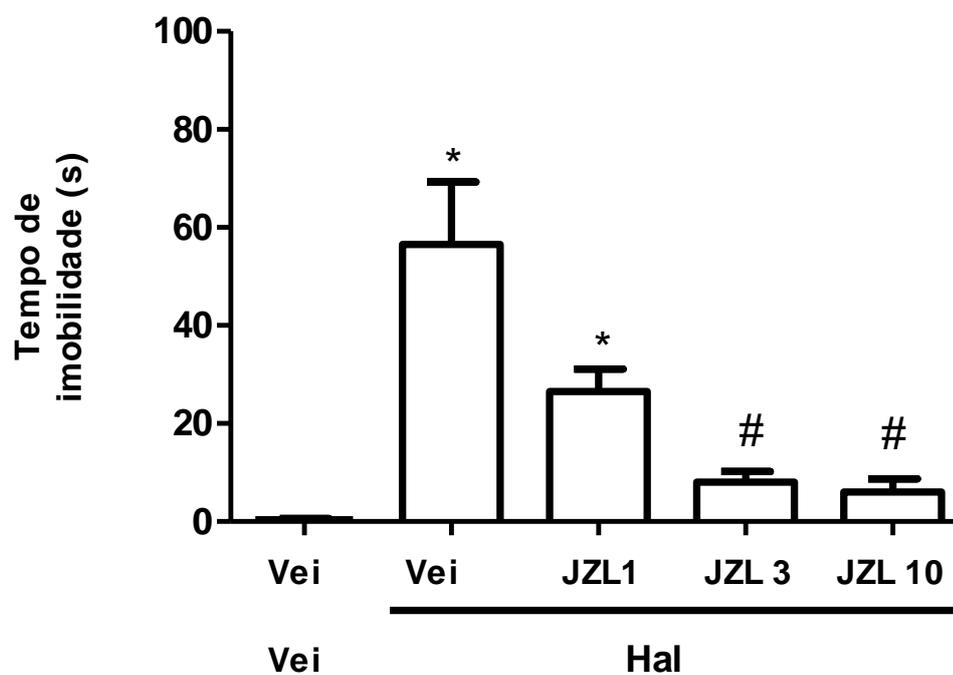


Fig. 9 Efeito do inibidor da hidrólise de 2-araquidonoilglicerol na catalepsia induzida por haloperidol. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,35} = 13,27$; $n = 8/\text{grupo}$.

Efeito do pré-tratamento com o antagonista de receptores CB₁, AM251, sobre os efeitos do URB597 e JZL184 na catalepsia induzida por haloperidol

Previamente às doses efetivas do URB597(0,1 mg/Kg), JZL184 (3 mg/Kg), os animais foram tratados com AM251 (1 mg/Kg), um antagonista seletivo para os receptores CB₁.

O antagonista não foi capaz de bloquear o efeito do URB597, evidenciando a não participação de receptores CB₁ no mesmo ($F_{4,35}=5,48$; $p<0,05$, teste de Newman-Keuls;Fig. 10).

Em relação ao JZL184, o antagonista impediu a redução no tempo de imobilidade, indicando a participação dos receptores CB₁ neste efeito ($F_{4,34}=8,37$; $p<0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 11).

O AM251 por si só não causou alterações no tempo de imobilidade nos animais tratados com haloperidol.

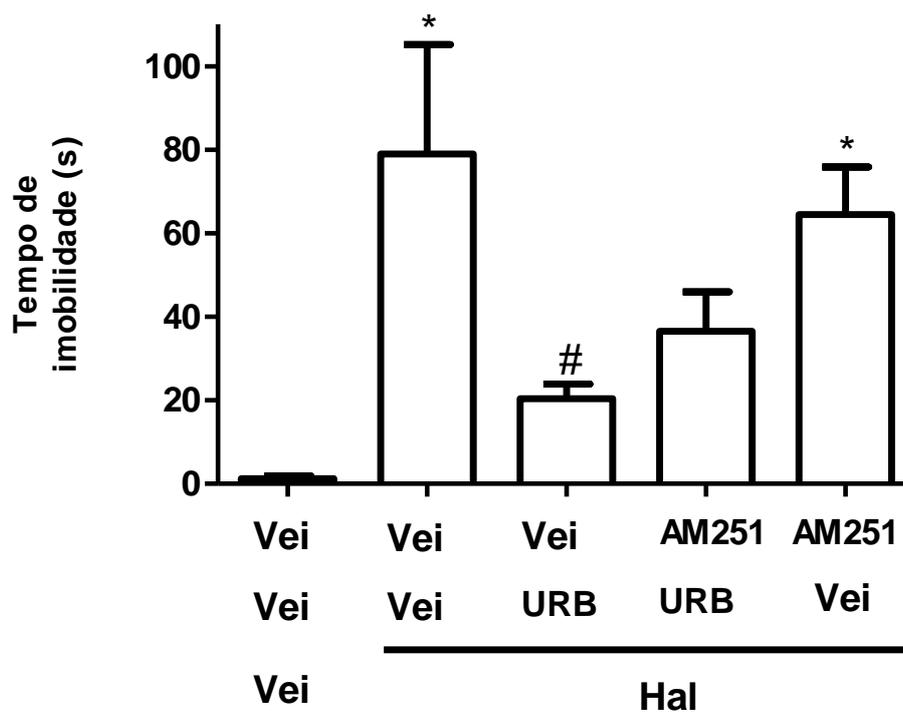


Fig 10 Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida URB597 e do antagonista de receptores CB₁, AM251, na catalepsia induzida por haloperidol. *p<0,05, comparado com o grupo veículo; # p<0,05, comparado com o grupo veículo + haloperidol; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; F_{4,35}=5,48; n= 8/grupo.

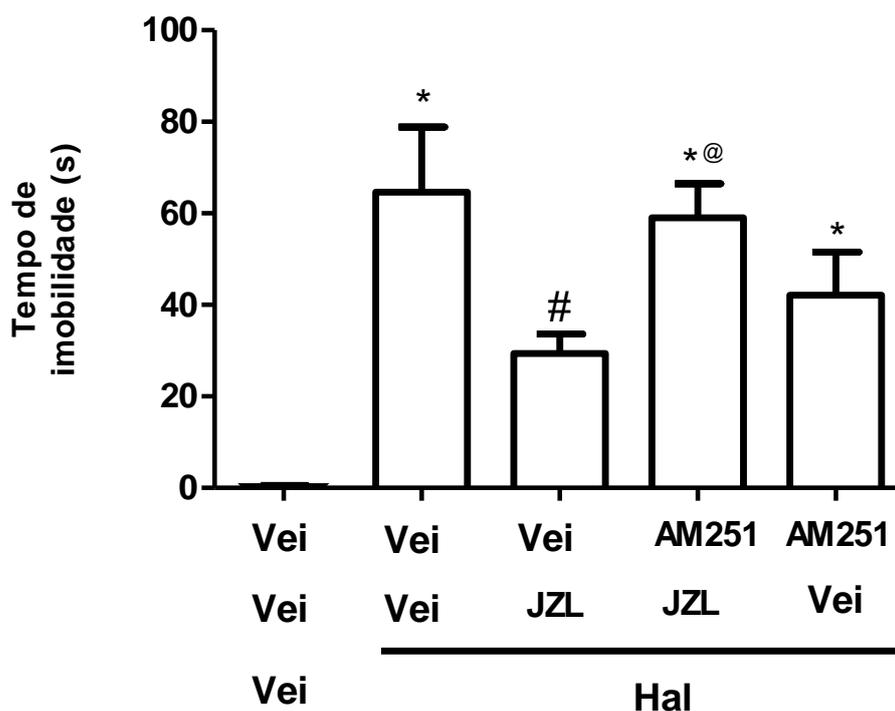


Fig. 11 Efeito do inibidor da hidrólise de 2 araquidonilglicerol, JZL184 e do antagonista de receptores CB_1 , AM251, na catalepsia induzida por haloperidol. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; @ $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + JZL + haloperidol. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,34} = 8,37$; $n = 8$ /grupo.

Efeito do pré-tratamento com o antagonista 5-HT_{1A}, WAY100635, sobre os efeitos do URB597 e do JZL184 na catalepsia induzida por haloperidol

Esse experimento testou se o antagonismo de receptores 5-HT_{1A} poderia interferir no tempo de imobilidade dos animais e modificar os efeitos do URB597 e JZL184 na catalepsia.

Anteriormente a administração de URB597(0,1 mg/Kg) e JZL184 (3 mg/Kg), os animais foram tratados com WAY100635 (1 mg/Kg), um antagonista seletivo para os receptores 5-HT_{1A}.

O antagonista não ocasionou alterações no efeito do URB597 ($F_{4,35}=5,48$; $<0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 12) e .do JZL184 ($F_{4,35} = 7,40 <0,05$, teste de Newman-Keuls;Fig. 13) e tampouco causou alterações significativas no tempo de imobilidade por si só.

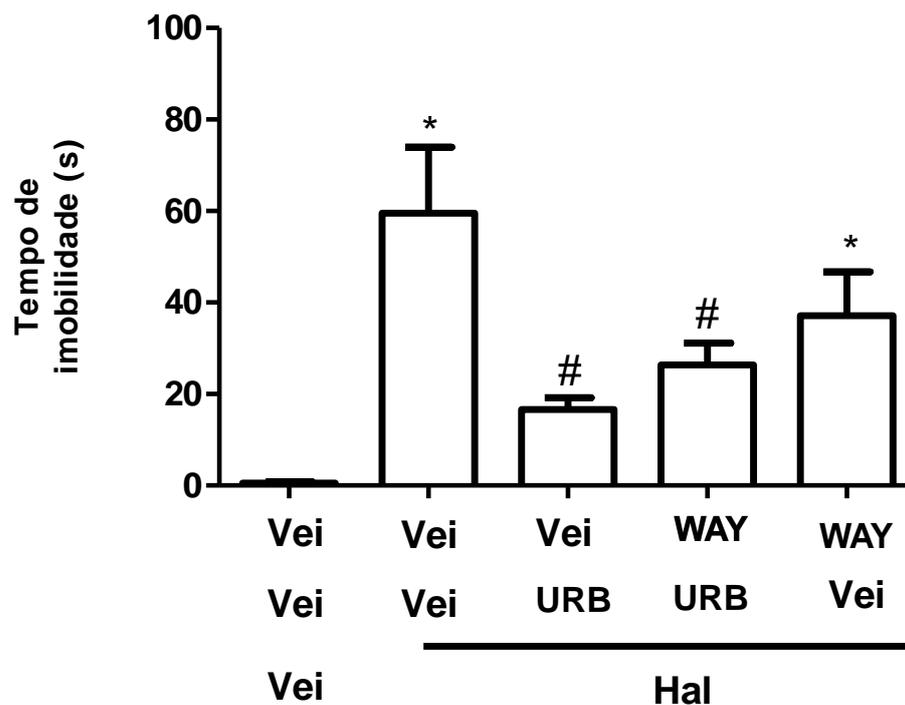


Fig. 12 Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida URB597 e do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635, na catalepsia induzida por haloperidol. *p<0,05, comparado com o grupo veículo; # p<0,05, comparado com o grupo veículo + haloperidol; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; F_{4,39}=7,39; n= 8/grupo.

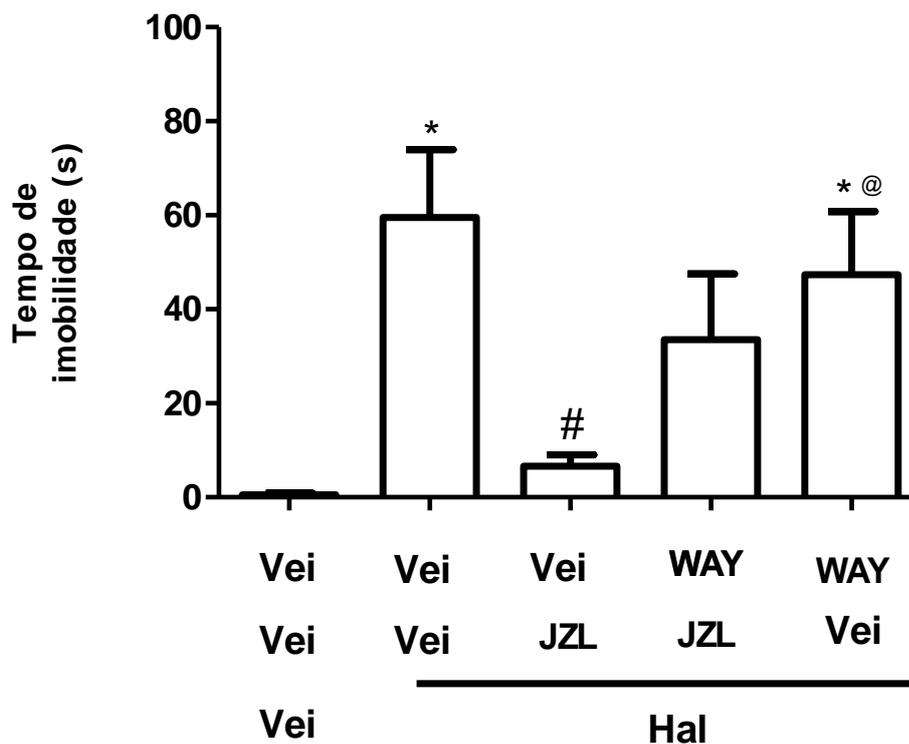


Fig. 13 Efeito do inibidor da hidrólise de 2 araquidonoilglicerol, JZL184 e do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635, na catalepsia induzida por haloperidol. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; @ $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + JZL + Haloperidol. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,35} = 7,40$; $n = 8/\text{grupo}$.

Efeito do pré-tratamento com o antagonista TRPV₁, SB366791, sobre os efeitos do URB597 e do JZL184 na catalepsia induzida por haloperidol

A fim de verificar o envolvimento dos receptores TRPV₁ nos efeitos mediados pelo URB597 e JZL184, foi pré-administrado o antagonista destes receptores, SB366791.

O SB366791 atenuou a resposta ao URB597, levando a uma não redução no tempo de imobilidade quando associado a este ($F_{4,35}=5,71 <0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 14).

O antagonismo TRPV₁ não levou a alterações no efeito do JZL184 ; ($F_{4,34}=11,91 <0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 15).

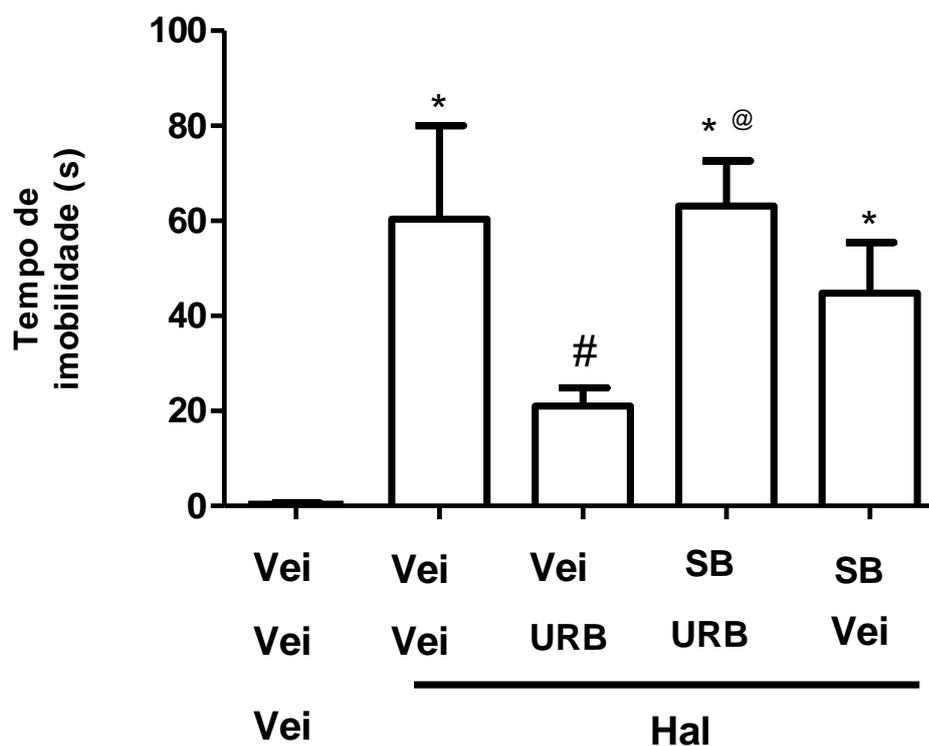


Fig. 14 Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida URB597 e do antagonista de receptores TRPV1, SB366791, sobre a catalepsia induzida por haloperidol. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; @ $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + URB + haloperidol. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,35} = 5,71$; $n = 8/\text{grupo}$.

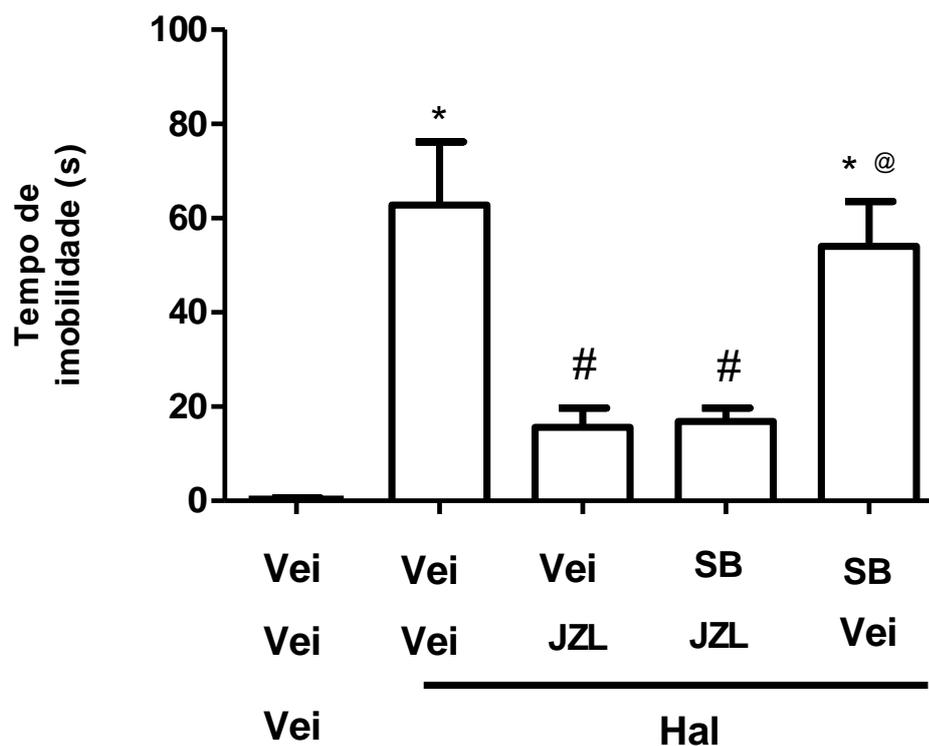


Fig. 15 Efeito do inibidor da hidrólise de 2-araquidonilglicerol, JZL184 e do antagonista de receptores TRPV1, SB366791, sobre a catalepsia induzida por haloperidol. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; @ $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + URB + haloperidol. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,34} = 11,91$; $n = 8/\text{grupo}$.

Experimento de avaliação da Discinesia Tardia

Parte dos animais tratados cronicamente com decanoato de haloperidol, apresentaram indução de elevado número de MMV, comportamento característico da discinesia tardia, após quatro semanas de exposição a droga (Fig.16).

Em seguida os mesmos animais foram divididos conforme o número de MMV (alto e baixo), considerando aqueles com um valor alto como portadores do sintoma relacionado à discinesia tardia e selecionados para os demais experimentos. Aqueles com baixo MMV não diferiram do grupo controle ($F_{2,27} = 134,7$; $p < 0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig 17).

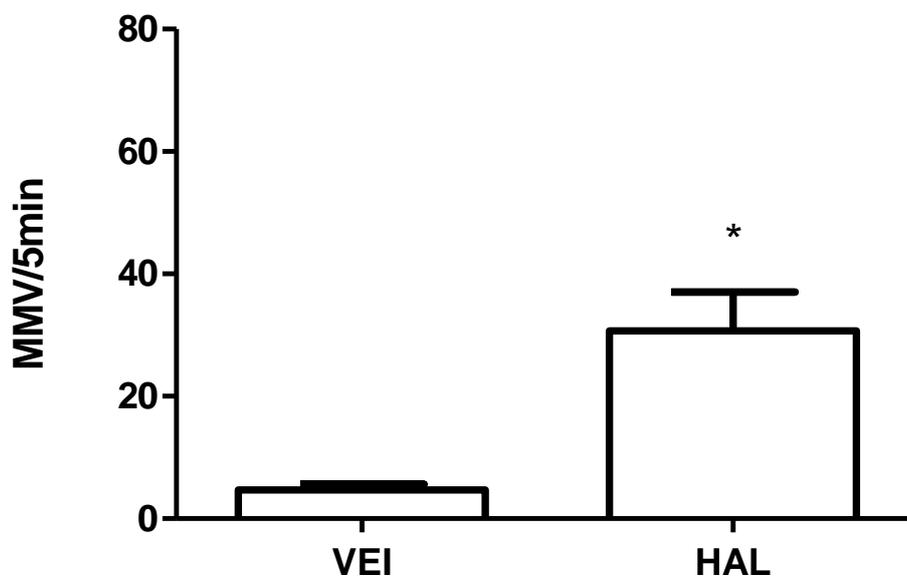


Fig.16 Efeito do tratamento de quatro semanas com haloperidol na indução de movimentos de mastigação no vazio. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; Teste t não pareado, $n = 10-20$ /grupo.

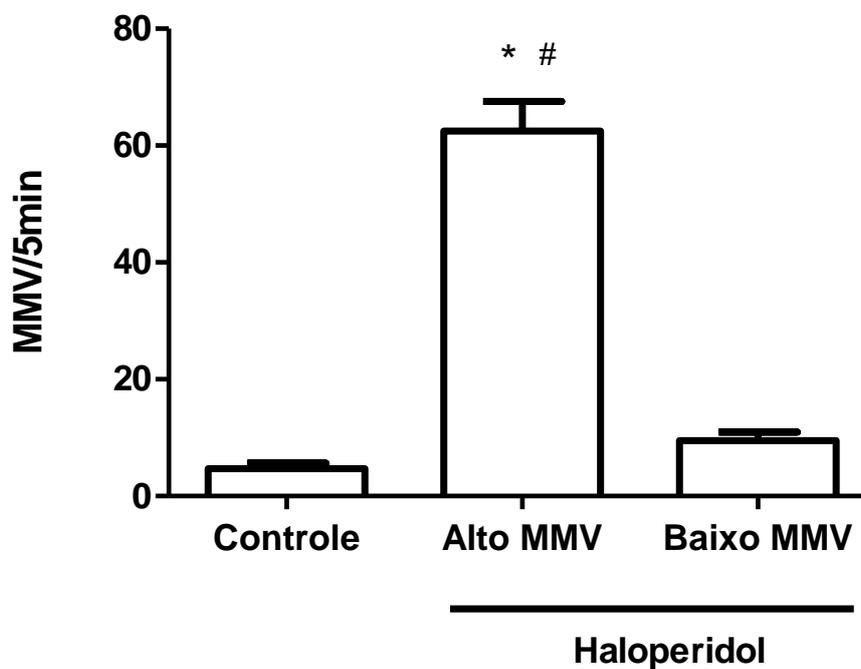


Fig. 17 Efeito do tratamento crônico com haloperidol na indução de movimentos de mastigação no vazio. Animais separados conforme número de MMV * $p < 0,05$,

comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo haloperidol baixo MMV; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{2,27} = 134,7$; $n=8-12$.

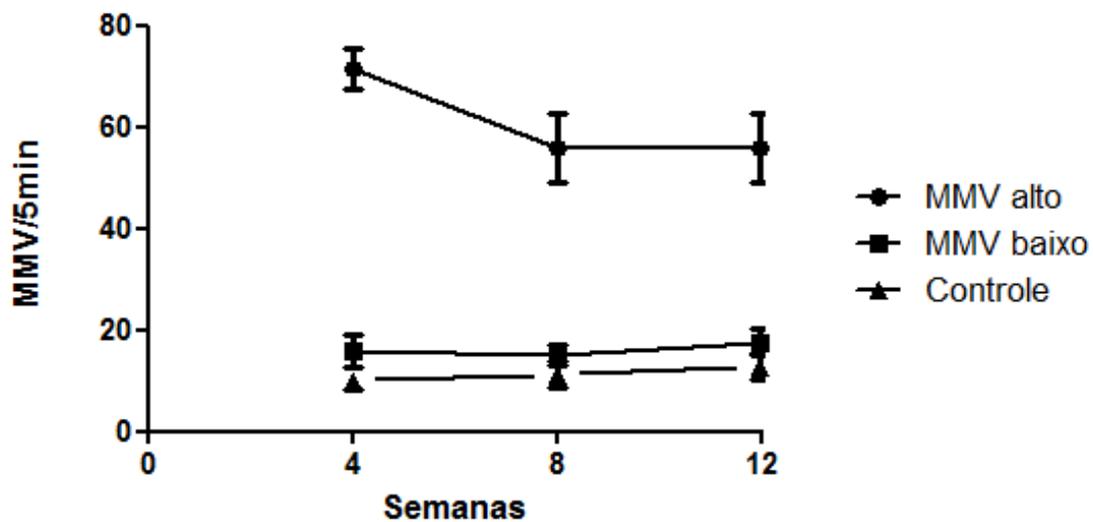


Fig 18. Efeito do tratamento com haloperidol durante a exposição a droga (4 semanas) e após a retirada. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls;

Efeito do tratamento com os inibidores da hidrólise de anandamida, URB597, e 2-AG, JZL 184, sobre os movimentos de mastigação no vazio induzidos por haloperidol

A fim de verificar se os inibidores da hidrólise de endocanabinóides eram capazes de atenuar os MMV, os animais foram tratados com três doses (0,1; 0,25 e 0,5 mg/kg) de URB597 e de JZL184 (1, 3 e 10 mg/kg).

A dose de 0,5 mg/kg de URB597 ($F_{4,24}=13,37 <0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 19) e as três doses de JZL184, ($F_{4,21}=31,89 <0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 20), ocasionaram a atenuação dos MMV. A dose de 3 mg/kg do JZL184 foi a utilizada nos demais experimentos.

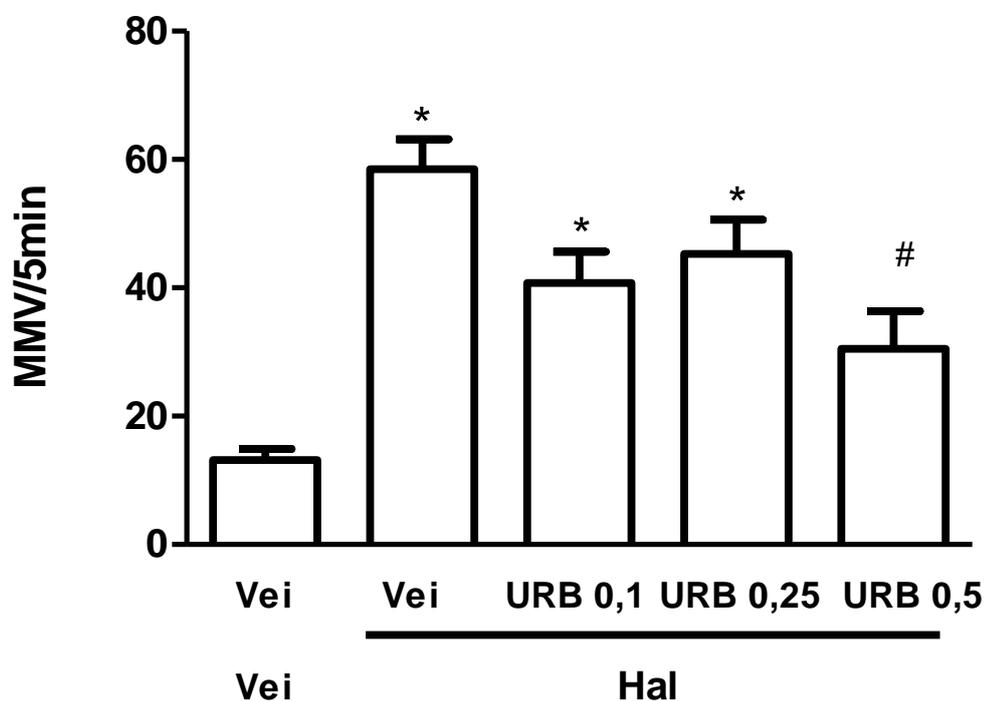


Fig. 19 Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida URB597 sobre os MMV induzidos por haloperidol. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,24} = 13,37$; $n = 5-6$ /grupo.

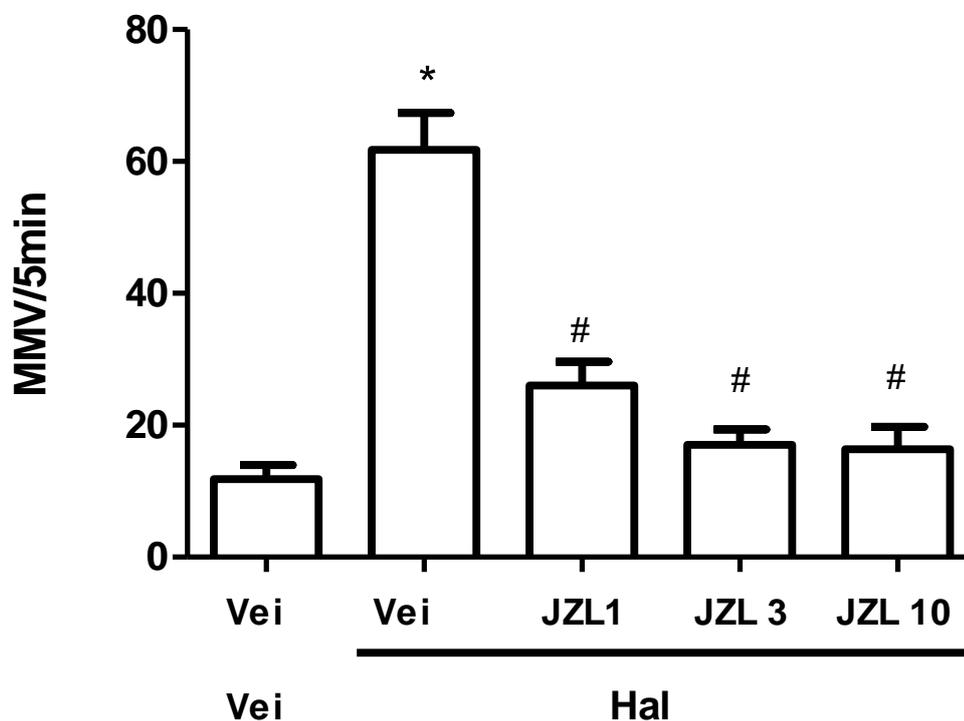


Fig. 20 Efeito do inibidor da hidrólise de 2 araquidonilglicerol JZL184 sobre os MMV induzidos por haloperidol. Dados analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. * Diferença em relação ao grupo veículo (Veil); # Diferença em relação ao grupo haloperidol. $F_{4,21}=31,89$; $n= 6-7$ /grupo.

Efeito do pré-tratamento com o antagonista de receptores CB₁, AM251, sobre os efeitos do URB597 e JZL184 nos movimentos de mastigação no vazio induzidos por haloperidol

O pré-tratamento com o antagonista CB₁, AM251 foi capaz de bloquear os efeitos das doses eficazes de URB597, ($F_{23,4} = 32,30$ $p < 0,05$; Fig. 21) e JZL184, ($F_{4,24} = 12,99$, $p < 0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig.22), na atenuação dos MMV, indicando o envolvimento de receptores CB₁ em tais efeitos. O AM251 sozinho não ocasionou alterações significativas.

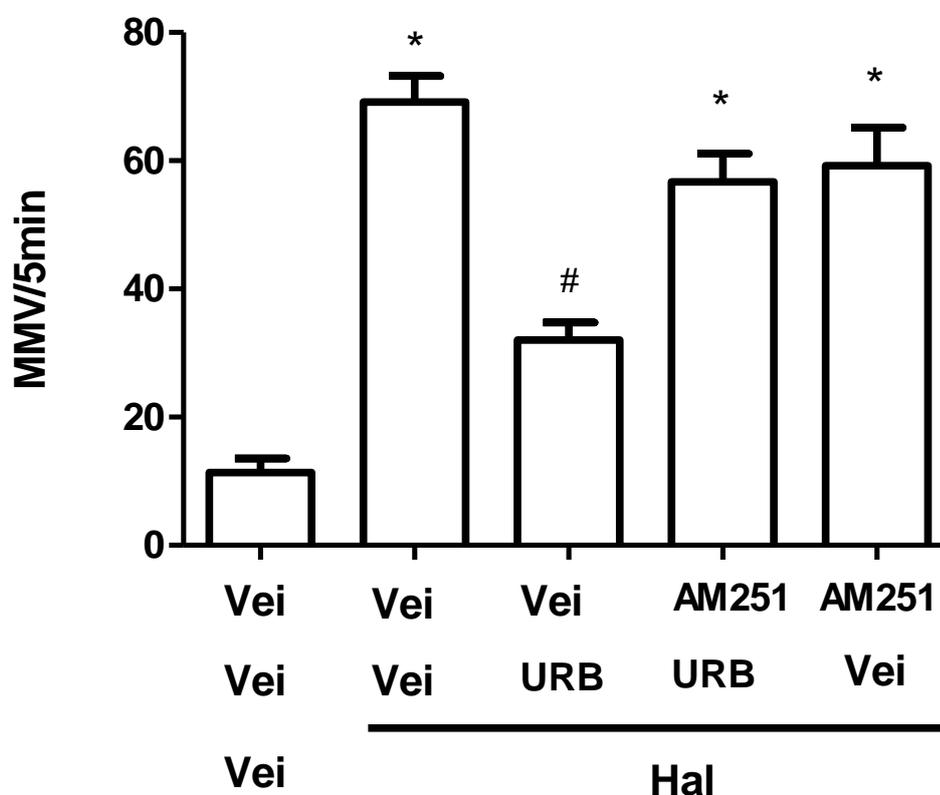


Fig. 21 Efeito do antagonista de receptores CB₁, AM251 sobre a ação do URB597 nos MMV induzidos por haloperidol. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{23,4} = 32,30$; $n = 5-6$ /grupo.

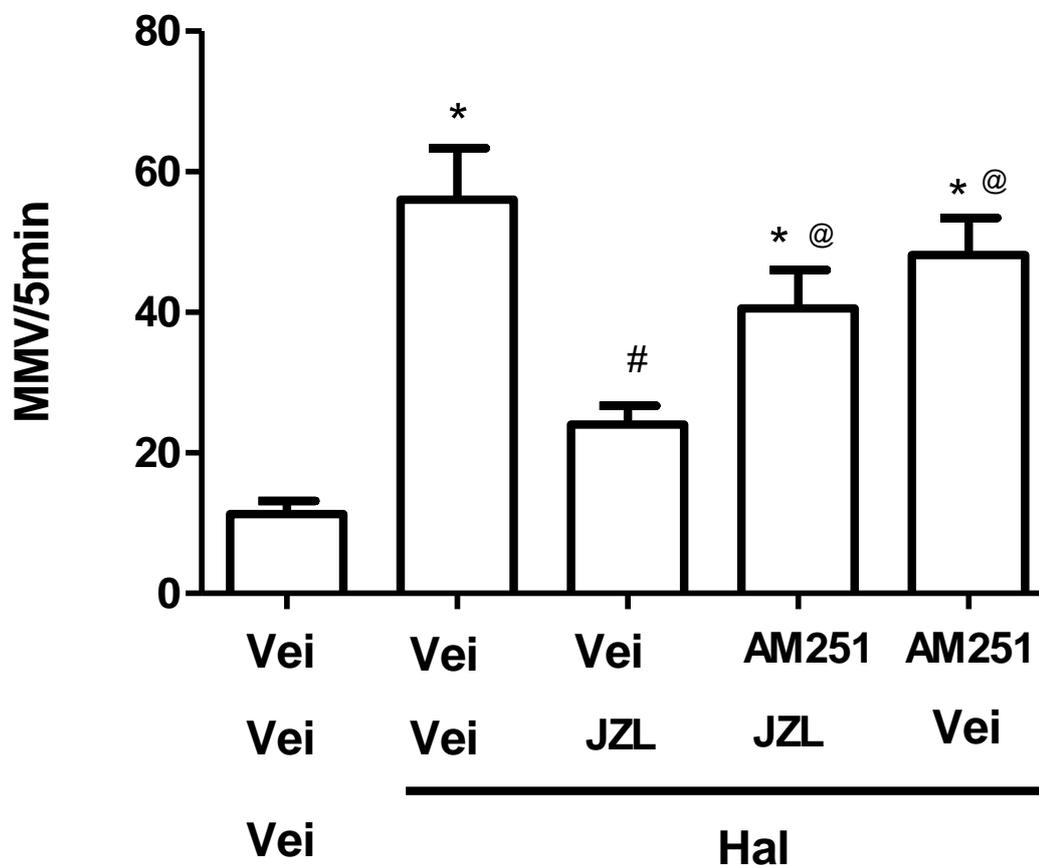


Fig. 22 Efeito do antagonista de receptores CB_1 , AM251 sobre a ação do JZL184 nos MMV induzidos por haloperidol. Dados analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. * Diferença em relação ao grupo veículo (Vei); #Diferença em relação ao grupo veículo, veículo, haloperidol (Hal).@ Diferença em relação ao grupo veículo + JZL + Haloperidol. $F_{4,24} = 12,99$; $n = 5-7$ /grupo.

Efeito do pré-tratamento com o antagonista 5-HT_{1A}, WAY100635, sobre os efeitos do URB597 e do JZL184 nos movimentos de mastigação no vazio induzidos por haloperidol

O antagonismo de receptores 5-HT_{1A} não acarretou em alterações nos efeitos mediados pelo URB597 ($F_{4,20} = 16,63$; Fig. 23) e JZL184 ($F_{4,24} = 31,27$, $p < 0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 24).

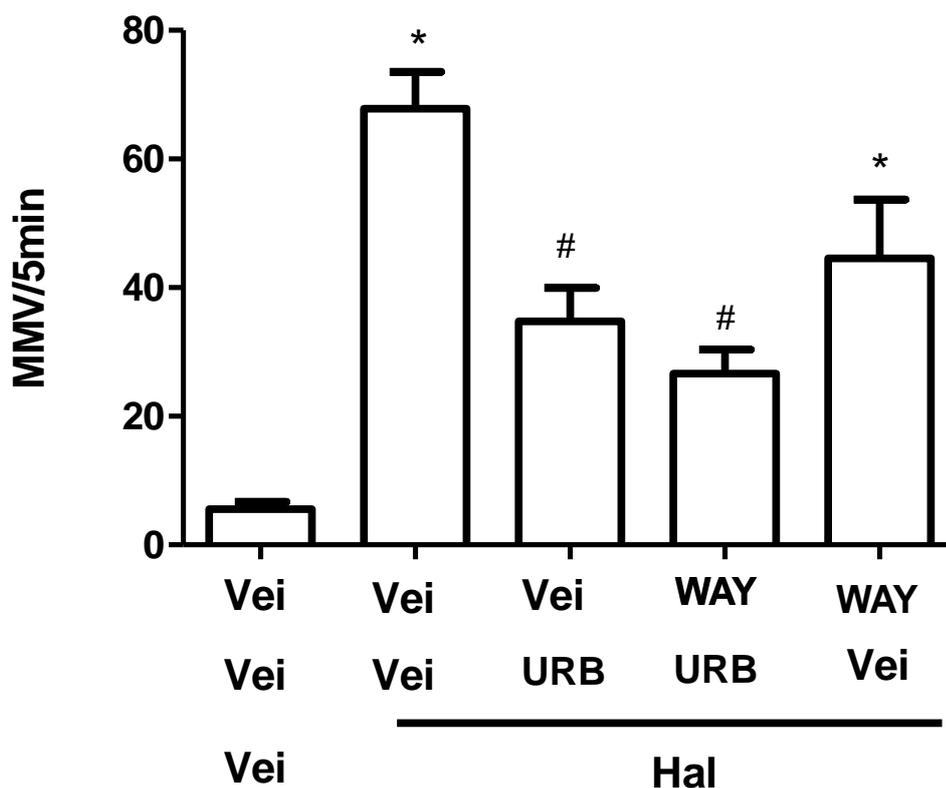


Fig. 23 Efeito do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY1006351 sobre a ação do URB597 nos MMVs induzidos por haloperidol. Dados analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. * Diferença em relação ao grupo veículo (Veil); # Diferença em relação do grupo haloperidol (Hal). $F_{4,20} = 16,63$; $n=5$ /grupo.

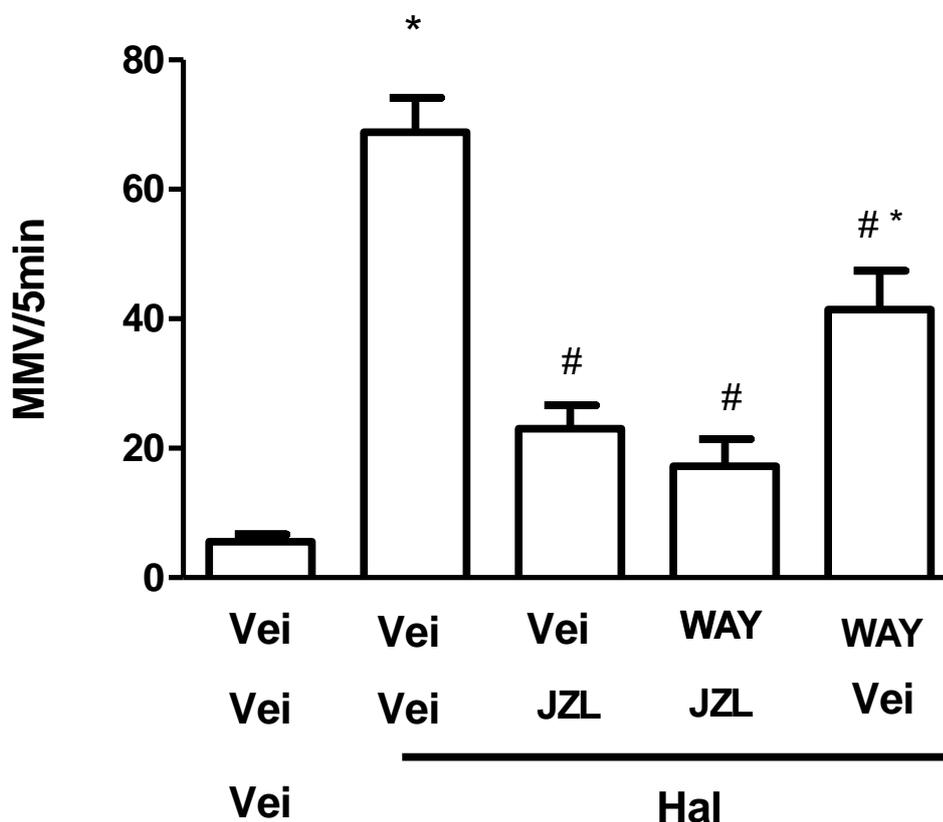


Fig. 24 Efeito do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635 sobre a ação do JZL184 nos MMV induzidos por haloperidol. Dados analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. * Diferença em relação ao grupo veículo (Vei); #Diferença em relação ao grupo haloperidol (Hal). $F_{4,24} = 31,27$; $n = 5-7/\text{grupo}$.

Efeito do pré-tratamento com o antagonista TRPV₁, SB366791, sobre os efeitos do URB597 e do JZL184 nos movimentos de mastigação no vazio induzidos por haloperidol

A administração de antagonista TRPV1 não causou modificações nos efeitos mediados pelo URB597, diferentemente do que foi verificado nos experimentos de catalepsia, ($F_{4,20} = 19,35$ $p < 0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 25). Em relação aos efeitos do JZL184 também não foram evidenciadas alterações, ($F_{4,20} = 24,17$ $p < 0,05$, teste de Newman-Keuls; Fig. 26).

Os receptores TRPV1 parecem não estar envolvidos nos efeitos do URB597 e JZL184 sobre os sintomas crônicos induzidos pelo haloperidol.

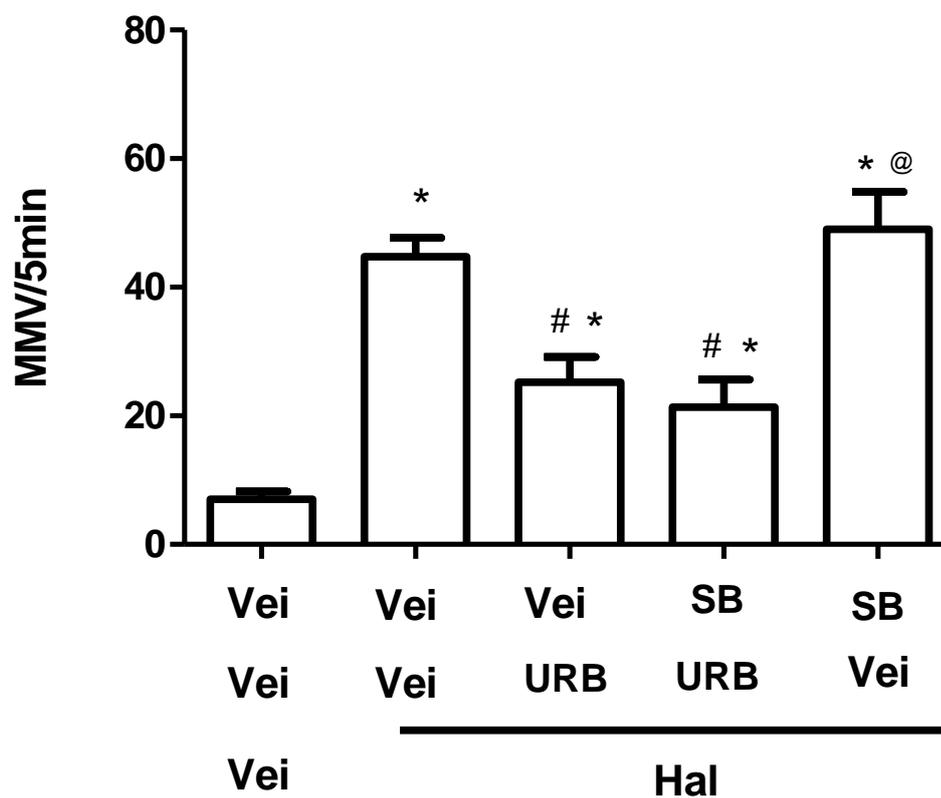


Fig. 25 Efeito do inibidor da hidrólise de anandamida URB597 e do antagonista de receptores TRPV1, SB366791 nos MMV induzidos por haloperidol.. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; @ $p < 0,05$, comparado com os grupos veículo + URB +haloperidol e SB + URB + haloperidol. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,20} = 19,35$; $n = 5$ /grupo

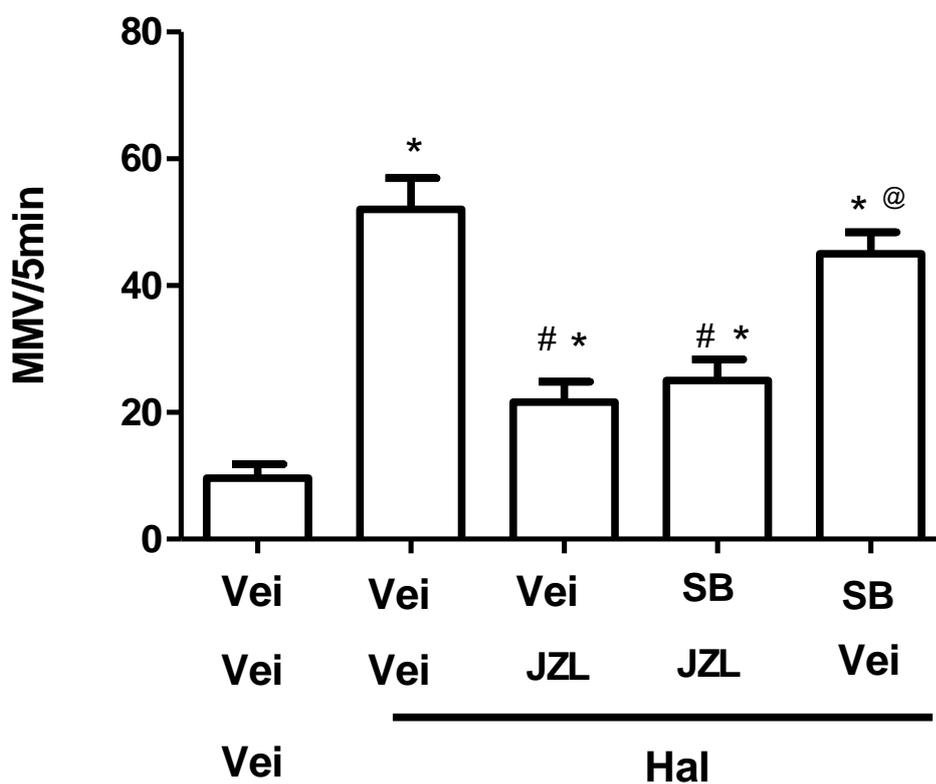


Fig. 26 Efeito do inibidor da hidrólise de 2-araquidonilglicerol, JZL184 e do antagonista de receptores TRPV1, SB366791 nos MMV induzidos por haloperidol.. * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo + haloperidol; @ $p < 0,05$, comparado com os grupos veículo + JZL +haloperidol e SB + JZL + haloperidol. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $F_{4,20} = 24,17$; $n = 5$ /grupo

Efeito do tratamento crônico com haloperidol na expressão de receptores CB₁ no estriado

Nas avaliações comportamentais foi verificado que em animais com alta frequência de MMV, o aumento do tônus endocanabinoide é capaz de atenuar estes sintomas e que estes efeitos ocorrem através da ativação de receptores CB₁. Em concordância com estes dados, foi evidenciado que em animais com elevado número de MMV ocorre um aumento da expressão de CB₁ no estriado dos mesmos, enquanto que nos animais que também foram tratados com haloperidol e que não tiveram a indução destes sintomas, não ocorreram alterações em relação a expressão de CB₁ $F_{2,11} = 9,99$, $p < 0,05$, teste de Bonferroni (Fig. 27).

Além disso, ocorre uma correlação positiva entre o número de MMV e o nível de expressão CB₁ (Fig. 28)

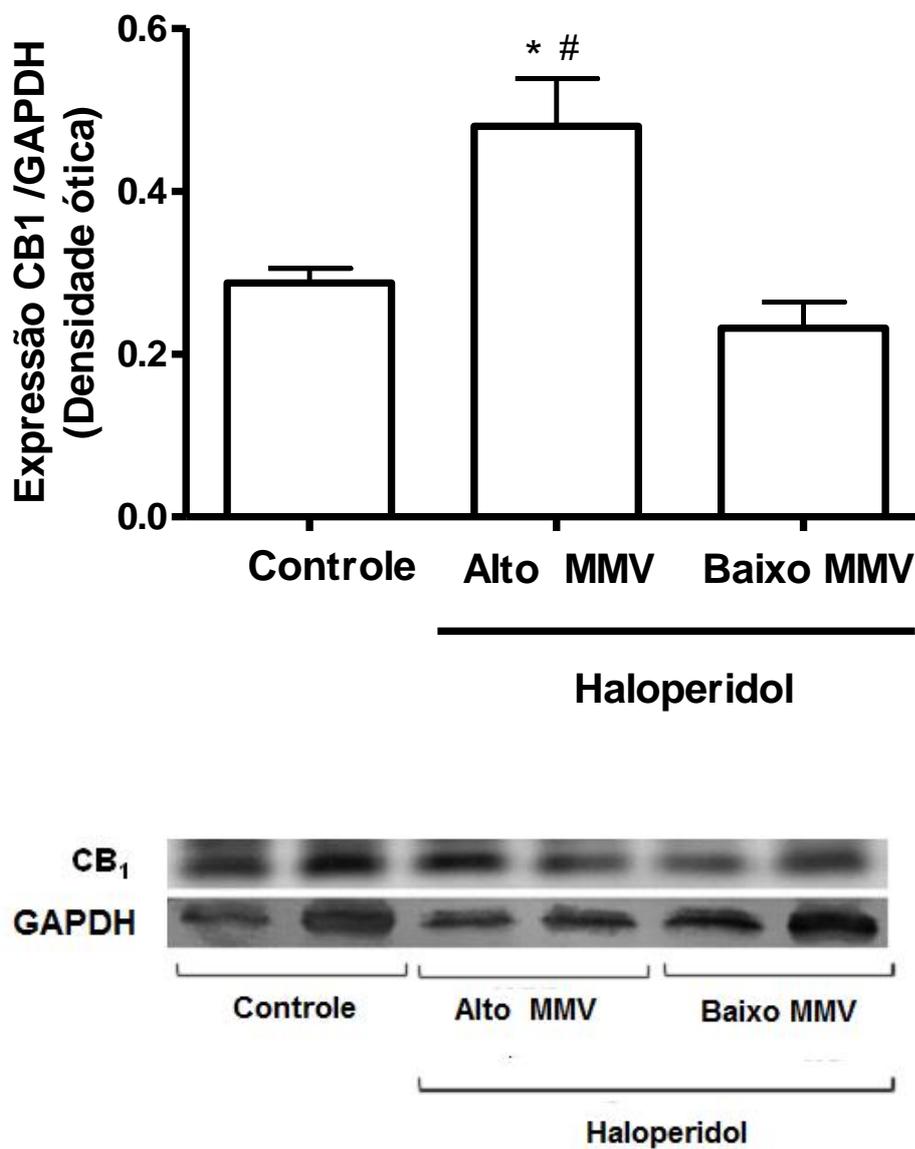


Fig. 27 Expressão de proteína CB₁ no estriado de animais tratados cronicamente com decanoato de haloperidol. $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo baixo MMV. ANOVA seguido por teste de Bonferroni $F_{2,11}=9,99$; $n = 4-5$ /grupo

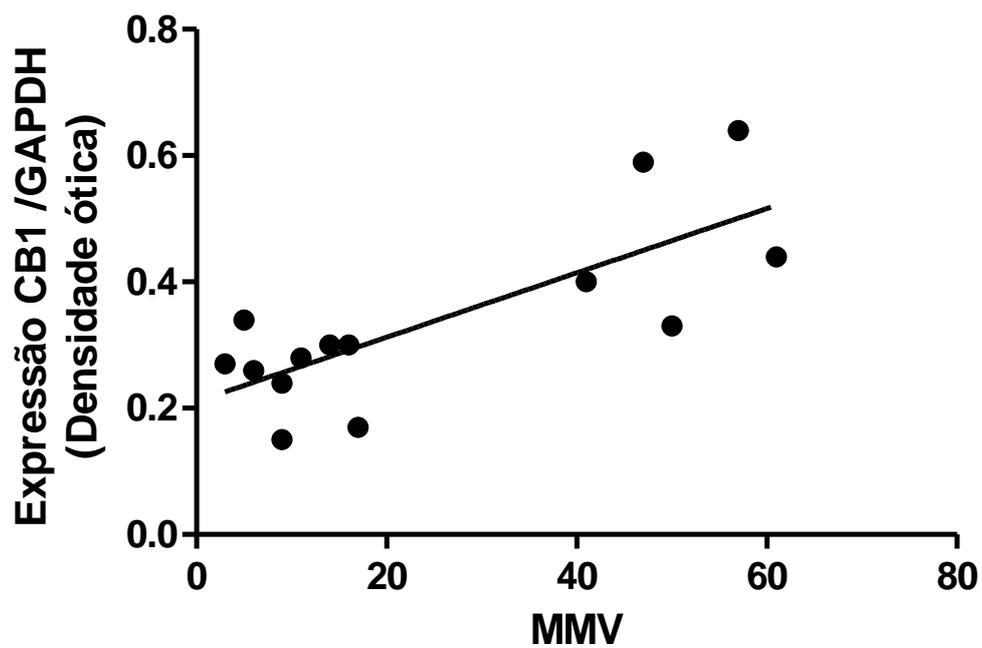


Fig. 28 Correlação entre o número de MMV e a expressão CB₁. Regressão linear. R 0,7695; p=0,0013

DISCUSSÃO

No presente estudo investigou-se a participação do sistema endocanabinóide em modelos animais de efeitos adversos motores induzidos pelo haloperidol. Os resultados evidenciaram que o aumento do tônus endocanabinóide, através da inibição das enzimas responsáveis por sua degradação, é capaz de atenuar os efeitos adversos motores, agudos e crônicos, induzidos pelo haloperidol.

A inibição da hidrólise da anandamida atenua a catalepsia via ativação de receptores TRPV1 e a discinesia tardia via ativação de receptores CB₁. O aumento do tônus do 2-AG é capaz de reduzir os sintomas da catalepsia e discinesia tardia através da ativação de receptores CB₁. Também foi evidenciado que, em animais tratados cronicamente com haloperidol e que tiveram a presença de sintomas relacionados DT (MMV alto) houve um aumento da expressão de receptores CB₁ no estriado. Enquanto em animais tratados e que não foram classificados com DT (MMV baixo), não ocorreu diferença na expressão CB₁.

Existem diversas evidências na literatura que sustentam o papel modulador do sistema endocanabinóide sobre a atividade dopaminérgica nos núcleos da base em modelos de doenças como a Doença de Parkinson e de Huntington (GLASS; FAULL; DRAGUNOW, 1993; CRAWLEY et al., 1993; GLASS et al., 1997; SAÑUDO-PEÑA; WALKER, 1997; SAÑUDO-PEÑA et al., 1998; SIERADZAN, et al., 2001; GARCÍA-ARENBICIA et al., 2007; DOWIE, et al., 2010). Além disso, evidências experimentais já apontaram o sistema endocanabinoide como uma possível abordagem farmacológica no tratamento das discinesias induzidas por levodopa (JULIAN et al., 2003).

Estes efeitos em sua maior parte são mediados por receptores CB₁ que estão amplamente distribuídos pelo encéfalo e possuem vasta expressão nos núcleos da base (MARTÍN et al., 2008).

Os receptores CB₁ localizados em neurônios estriatais projetam-se tanto para a substância negra pars reticulata / globus pallidus interno (via direta) como para o globus pallidus externo (via indireta). Ambos os grupos de neurônios têm GABA como um neurotransmissor. Devido a essa localização a ativação ou a inibição deste sistema de sinalização pode ter uma influência importante na modulação em diferentes respostas motoras, algumas inclusive opostas (FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009a; FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2011b).

Já é estabelecido que a liberação de dopamina é acompanhada da liberação de anandamida no estriado dorsal de ratos durante a execução de movimentos como forma de controlar a estimulação da atividade motora pela dopamina (GIUFFRIDA et al., 1999). Além disso, os efeitos de canabinóides e dopamina podem ser contrários, uma vez que antagonistas CB₁ são capazes de aumentar estereotípias mediadas por dopamina e bloquear a liberação de dopamina induzida por anfetamina no núcleo accumbens (MARTÍN et al., 2008; KLEIJN et al., 2012).

Do mesmo modo, a região dos núcleos da base possui alta expressão de receptores CB₁ e CB₂ bem como elevada concentração de endocanabinóides e a administração de anandamida por via intracerebroventricular de fato reduz o número de MMV em animais tratados cronicamente com haloperidol (RÖPKE et al., 2014).

Portanto, a influência de canabinóides na atividade motora depende da sua interação com o sistema dopaminérgico. Além de endocanabinóides, a administração de canabinóides sintéticos (Δ^9 -THC, WIN 55.212-2, CP 55.940) também induz a inibição do comportamento motor (NAVARRO et al., 1993; MORERA-HERRERAS, et

al., 2012). Além disso, o antagonismo de receptores CB₁ induz hiperlocomoção e em animais nocaute para estes receptores também ocorrem alterações motoras (LEDENT et al., 1999).

Embora estes estudos demonstrem o envolvimento CB₁ nestas respostas, existem também evidências da participação de receptores TRPV1, na mediação de efeitos da anandamida. Além de agonista CB₁, a anandamida também possui afinidade por receptores TRPV1 (REF). A inibição da degradação da anandamida resulta na elevação dos seus níveis com um conseqüente aumento da sua recaptação, podendo aumentar os efeitos sobre receptores TRPV1, uma vez que eles se encontram no lado citosólico das membranas (BELTRAMO, 1997) (DE PETROCELLIS *et al.*, 2001) (O'SULLIVAN, 2007).

Deste modo, inibidores da hidrólise de anandamida, em doses baixas, teriam maior ligação TRPV1. Enquanto que em doses mais elevadas estes mecanismos poderiam ficar saturados, ocorrendo maior ação via CB₁.

Assim como os receptores CB₁, os receptores TRPV1 também são expressos nos núcleos da base e apesar de compartilharem um mesmo agonista, podem desencadear efeitos comportamentais opostos (CASAROTTO *et al.*, 2012).

Com base nos dados encontrados neste estudo em relação a catalepsia, onde somente a menor dose de URB597 foi efetiva na redução do tempo de imobilidade e o antagonismo TRPV1 preveniu a ocorrência deste efeito, podemos sugerir que o mesmo ocorre através da sua ativação.

Algumas evidências na literatura são controversas, uma vez que em alguns estudos já foi relatado que a ativação de TRPV1 pela anandamida reduz a taxa de disparo de neurônios dopaminérgicos na via nigro-estriatal (DE LAGO *et al.*, 2004), no

entanto outros autores relatam um aumento da liberação de dopamina na SNpc (MARINELLI *et al.*, 2003)

Com base nos resultados que encontramos nos experimentos de catalepsia, podemos sugerir que a ativação TRPV1 pela anandamida poderia ocasionar a melhora da catalepsia através de um aumento da liberação de dopamina na via nigroestriatal, enquanto que o 2-AG através da ativação CB₁, ocasionaria este efeito por mecanismos indiretos.

Sustentando a hipótese de que o aumento da neurotransmissão endocanabinóide poderia ocasionar a redução dos MMV, sintoma relacionado a discinesia tardia, verificamos que, além deste efeito ocasionado tanto pela inibição da hidrólise de anandamida e 2-AG, através da ativação CB₁, houve também um aumento da expressão destes receptores no estriado dos animais que tiveram o desenvolvimento de elevada frequência de MMV, diferentemente daqueles também tratados com haloperidol nos quais não foram verificadas alterações. Este fato demonstra que apenas o tratamento crônico com haloperidol não é capaz de modificar a densidade de receptores CB₁. Sendo este um dos possíveis mecanismos pelos quais alguns animais, mesmo sob o mesmo tratamento e iguais condições, desenvolvem sintomas preditivos de discinesia tardia. Assim como em humanos, os sintomas relacionados à DT em ratos são persistentes mesmo após a retirada do tratamento e o número de MMV se mantém elevado.

Em um estudo prévio foi verificado que a administração intracerebroventricular de anandamida em ratos que tiveram o desenvolvimento de MMV após o tratamento com haloperidol, foi capaz de atenuar este comportamento, sem levar a alterações na locomoção dos animais. O antagonismo CB₁ ocasionou a reversão deste efeito (RÖPKE *et al.*, 2014). Estes dados corroboram o resultado

encontrado onde o aumento indireto dos níveis de endocanabinóides também ocasiona a melhora destes sintomas.

Cabe ressaltar a importância da separação dos animais tratados que apresentam elevado número de MMV daqueles que não apresentam a mesma intensidade do sintoma, uma vez que não está esclarecido o porque, mesmo em humanos, alguns indivíduos estão mais susceptíveis ao desenvolvimento de discinesia tardia mesmo compartilhando o mesmo tipo de tratamento,

O modelo de MMV para a discinesia tardia é amplamente utilizado para a avaliação de substâncias que possam interferir nos sintomas, bem como na tentativa de entender o estabelecimento e a manutenção da síndrome, uma vez que seu mecanismo fisiopatológico ainda é controverso (QAYYUM et al., 2013). Uma das facilidades deste modelo é a utilização de uma formulação de liberação lenta de haloperidol, na forma de éster (decanoato), que possibilita que com uma única administração, a liberação do fármaco ocorra durante quatro semanas (RÖPKE et al., 2014).

Uma das principais vantagens deste método é a reduzida indução de estresse ao animal, uma vez estudos já evidenciaram que o estresse é um fator relevante para a piora dos sintomas (ANDREASSEN; JORGENSEN, 1995). Desta maneira, possibilita um maior controle dessa variável e assim uma maior confiabilidade.

Estudos anteriores já demonstraram que o tratamento com antipsicóticos ou a lesão por 6-hidroxidopamina, leva a supra-regulação de receptores CB₁ no estriado, em decorrência da redução da atividade ou deficiência de receptores D₂ (ANDERSSON et al., 2005; MAILLEUX; VANDERHAEGHEN, 1993).

No entanto verificamos que apenas o tratamento com haloperidol não é suficiente para ocasionar o aumento da expressão de CB₁ no estriado, uma vez que

animais tratados e que apresentação número baixo de MMV não diferiram do grupo controle. Uma possível explicação pode ser o nível de ocupação de receptores D₂, uma vez que é sugerido que animais com maior número de MMV tenham maior ocupação de receptores D₂ (TURRONE et al., 2003).

Em estudos eletrofisiológicos, agonistas CB₁ aumentam a taxa de disparo de neurônios da SNpc (MELIS; GESSA; DIANA, 2000; MORERA-HERRERAS et al., 2008). Contudo, como são pouco expressos nesta região (MÁTYÁS et al., 2006) a sua ação ocorre de forma indireta. Na SNpr, onde existe uma maior concentração destes receptores, sua ativação inibe a liberação de glutamato (SZABO et al., 2000), resultando em uma redução na transmissão GABAérgica e como consequência desencadeia um aumento na atividade de neurônios da SNpr (MORERA-HERRERAS et al., 2008). Isto permite que os endocanabinóides exerçam modulação nesta via.

Neurônios que expressam CB₁ estão localizados no estriado e enviam projeções para o GP e a SN. No estriado há evidências de que a ativação D₂ aumenta a liberação de endocanabinóides (BELTRAMO, 1997)

Por ambos receptores (CB₁ e D₂) atuarem através do mesmo complexo de proteína G é sugerido que eles interajam (GIUFFRIDA et al., 1999).

Em um estudo realizado em células transfectadas com receptores D₂ e CB₁ foi evidenciado que o haloperidol pode inibir alostericamente a associação de CB₁ a G α i. Este efeito possivelmente ocorra devido a heteromerização entre eles, uma vez que o haloperidol não desencadeia esses efeitos na ausência de receptores D₂, assim como o antagonismo D₂ combinado com o agonismo CB₁ promove o acoplamento CB₁ a G α s e inibe o recrutamento CB₁ de β -arrestina, inibindo assim sua internalização (BAGHER et al., 2016).

Em relação aos efeitos do 2-AG existem relativamente poucos estudos sobre os seus mecanismos de regulação, fato que possa ocorrer devido ao 2-AG ter sido descoberto depois da anandamida, que se tornou o principal foco da pesquisa em endocanabinóides por muito anos (MECHOULAM *et al.*, 1995). No entanto o 2-AG é o endocanabinóide mais abundante no cérebro (MECHOULAM *et al.*, 1995). Além disso, o 2-AG atua como um agonista total para receptores CB₁, enquanto a anandamida é um agonista parcial (STELLA; SCHWEITZER; PIOMELLI, 1997; SAVINAINEN *et al.*, 2001).

Além disso, foi verificado que a enzima DGL α , responsável pela síntese do 2-AG, é expressa em grande quantidade na ATV e que o 2-AG medeia a supressão da excitação de neurônios dopaminérgicos nesta região (MÁTYÁS *et al.*, 2009).

Os receptores CB₁ são expressos em aferentes glutamatérgicos e GABAérgicos na ATV (FREUND *et al.*, 2003) e estudos eletrofisiológicos demonstraram que o 2-AG contribui para a plasticidade de neurônios glutamatérgicos nesta região (MELIS *et al.*, 2004, 2006).

O 2-AG demonstra ter um papel modulatório indireto sobre neurotransmissão dopaminérgica, uma vez que a modulação de aferências glutamatérgicas tem um papel importante na regulação da atividade neuronal na ATV (OVERTON; CLARK, 1997).

Existe também a possibilidade de que a anandamida e o 2-AG possam atuar de forma combinada em algumas respostas. Em um estudo prévio em que foi utilizado o duplo bloqueio das enzimas FAAH e MAGL em ratos, houve a ocorrência de respostas comportamentais muito semelhantes àsquelas desencadeadas pelo agonista CB₁, Δ 9-THC. Entre estas respostas estão a presença de catalepsia e antinocicepção e também efeitos similares no teste de discriminação da droga, onde

80% dos animais tiveram respostas similares àqueles tratados com $\Delta 9$ -THC. Todos os efeitos foram inibidos pela administração de antagonista CB_1 (LONG et al., 2009).

Além da dopamina, muitas evidências implicam no envolvimento do sistema serotoninérgico nos sintomas da discinesia tardia. As inervações serotoninérgicas nos núcleos da base se originam primariamente no núcleo dorsal da rafe (WALLMAN; GAGNON; PARENT, 2011) e os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos, na substância negra e área tegmental ventral, também recebem inervações serotoninérgicas diretas dos núcleos da rafe (NEDERGAARD et al., 1988; CREED, NOBREGA, 2013). A serotonina exerce influencia inibitória sobre a transmissão dopaminérgica estriatal, uma vez que quando sua atividade é reduzida, ocorre um aumento na atividade de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal (DRAY, OAKLEY 1976).

Evidências sugerem a participação do sistema serotoninérgico nos sintomas da discinesia tardia. Uma vez que a serotonina modula a atividade dopaminérgica e os sintomas na discinesia são exacerbados com o tratamento concomitante entre antipsicóticos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina, que ocasiona o aumento de seus níveis. Além disso, os antipsicóticos atípicos, que exercem antagonismo ou agonismo parcial serotoninérgico apresentam reduzida incidência de efeitos motores (CALEY, 1998). Do mesmo modo, a ativação $5HT_{1A}$ melhora os efeitos da levodopa na redução da catalepsia em ratos lesionados com 6-hidroxidopamina (SHARIFI et al., 2015).

Alguns trabalhos demonstraram a modulação do sistema serotoninérgico via sistema endocanabinóide, onde camundongos nocaute para receptor CB_1 apresentam um reduzido acoplamento funcional de receptores de $5-HT_{1A}$ $5-HT_{2A}$ (MATO et al., 2007; ASO et al., 2009). Outros estudos demonstraram a facilitação exercida entre os

dois sistemas. O canabidiol facilita a neurotransmissão mediada pelo receptor 5-HT_{1A} e é capaz de atenuar a catalepsia induzida por haloperidol, assim como reduzir a expressão de proteína c-fos no estriado dorsolateral de camundongos. (RUSSO et al., 2005) (SONEGO et al., 2016).

Entretanto nossos resultados não evidenciaram a participação serotoninérgica nos efeitos mediados pelo aumento da neurotransmissão endocanabinóide. Deve se levar em consideração que testamos apenas o subtipo 5-HT_{1A}.

Uma vez que vários estudos já demonstraram o papel regulatório dos endocanabinóides sobre a neurotransmissão dopaminérgica em diferentes mecanismos, de forma direta e indireta, podemos sugerir o antagonismo agudo D₂ pelo haloperidol leva a modificações na interação entre o sistema dopaminérgico e endocanabinóide, capazes de serem revertidas aumentando o tônus endocanabinóide.

Já o antagonismo crônico, ocasiona modificações moleculares neste sistema, com um aumento da expressão de receptores CB₁ em animais com desenvolvimento de sintomas preditivos de discinesia tardia.

Estes dados sustentam a hipótese de que a discinesia tardia poderia ocorrer devido a um desequilíbrio entre os sistemas dopaminérgico e endocanabinóide, onde o aumento da expressão CB₁ seria compensatório, sendo o aumento do tônus endocanabinóide capaz de atenuar os sintomas.

Deste modo, nossos resultados sugerem que o sistema endocanabinóide exerce efeito modulatório sobre as alterações dopaminérgicas que desencadeiam efeitos motores após a administração de haloperidol.

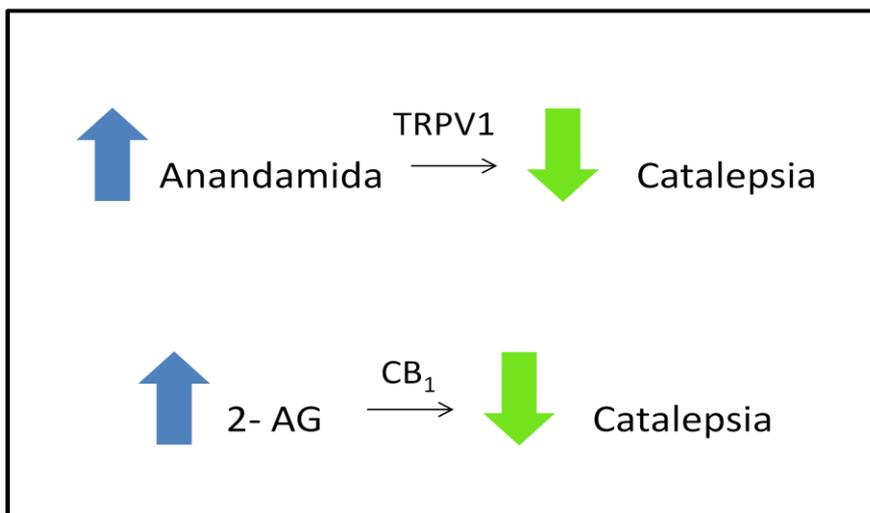


Fig. 29. O aumento dos níveis de endocanabinóides, através da inibição das suas enzimas de degradação, atenua a catalepsia induzida por haloperidol através da ativação CB₁ ou TRPV1.

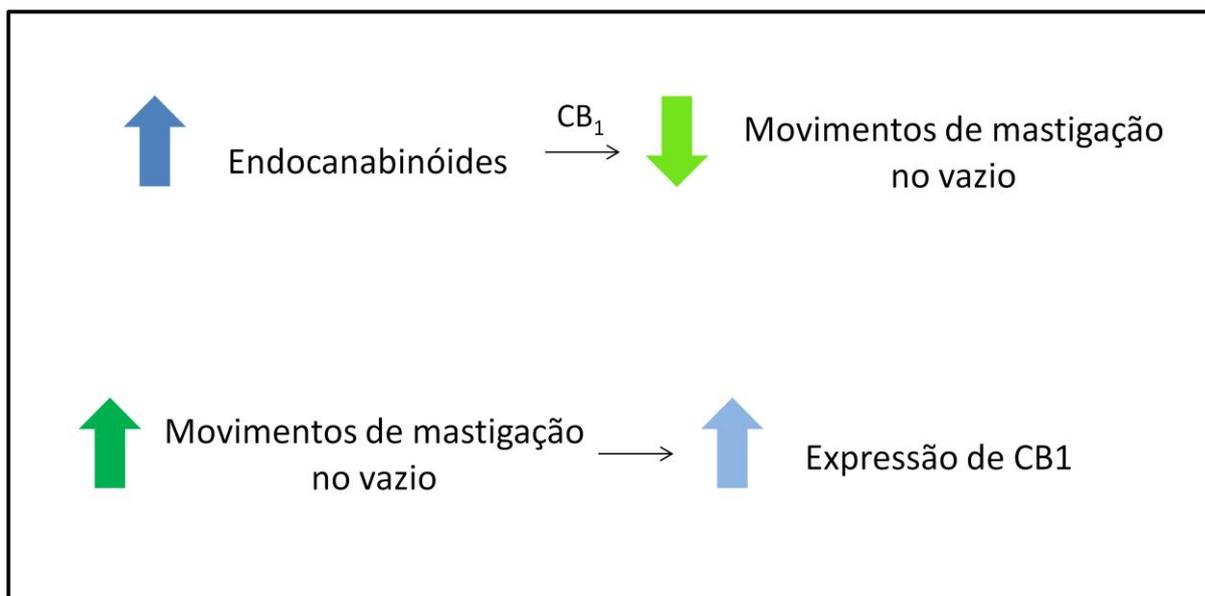


Fig. 30. O aumento dos níveis de endocanabinóides, através da inibição das suas enzimas de degradação, atenua os MMV induzidos por haloperidol, através da ativação CB₁. A indução de MMV leva ao aumento da expressão de CB₁ no estriado em ratos.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o aumento do tônus endocanabinóide pode reduzir a catalepsia induzida pelo haloperidol por dois diferentes mecanismos: através da ativação de receptores TRPV1 pela anandamida e de receptores CB₁ pelo 2-AG.

De outra forma, atenuam os efeitos do tratamento crônico com haloperidol através da ativação CB₁.

Corroborando a importância deste receptor nos efeitos crônicos do haloperidol, foi evidenciado um aumento da sua expressão no estriado de animais com sintomas preditivos de discinesia tardia.

Estes dados confirmam estudos prévios relacionados à regulação da função dopaminérgica por endocanabinóides e sustentam a hipótese de que existem diferenças relacionadas ao sistema endocanabinóide em animais tratados cronicamente com haloperidol que possuem sintomas relacionados a discinesia tardia em relação aos que não apresentam estes sintomas, podendo ser uma das possíveis causas da discinesia tardia, o desequilíbrio do sistema endocanabinóide, que passa a ter sua função reduzida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, K.; MCKINNEY, M. K.; CRAVATT, B. F. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chemical Reviews*, v. 108, n. 5, p. 1687–1707, 2008.

AIA, P. G. *et al.* Tardive Dyskinesia. *Current Treatment Options in Neurology*, v. 13, n. 3, p. 231–241, 2011.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4 ed., 2000.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5 ed., 2013.

ANDERSSON, M. *et al.* Subchronic haloperidol increases CB1 receptor binding and G protein coupling in discrete regions of the basal ganglia. *Journal of Neuroscience Research*, v. 82, n. 2, p. 264–272, 2005.

ANDREASSEN, O. A.; JORGENSEN, H. A. The rat model of tardive dyskinesia: relationship between vacuous chewing movements and gross motor activity during acute and long-term haloperidol treatment. *Life Sciences*, v. 51, n. 24, p. 2263–2272, 1995.

ARANEDA, R.; ANDRADE, R. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience*, v. 40, n. 2, p. 399–412, 1991.

ASO, E. *et al.* Lack of CB1 receptor activity impairs serotonergic negative feedback. *Journal of Neurochemistry*, v. 109, n. 3, p. 935–944, 2009.

BAGHER, A. M. *et al.* Antagonism of dopamine receptor 2 long affects cannabinoid receptor 1 signaling in a cell culture model of striatal medium spiny projection neurons. *Molecular Pharmacology*, v. 89, n. 6, p. 652–666, 2016.

BATISTA, L. A. *et al.* Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs. *Behavioural pharmacology*, v. 25, n. 5-6, p. 425–33, 2014.

BELTRAMO, M. Functional Role of High-Affinity Anandamide Transport, as Revealed by Selective Inhibition. *Science*, v. 277, n. 5329, p. 1094–1097, 1997.

BERNAGIE, C. *et al.* Aripiprazole and Acute Extrapyramidal Symptoms in Children and Adolescents: A Meta-Analysis. *CNS Drugs*, v. 30, n. 9, p. 807–818, 2016.

BLANCHET, P. J. *et al.* Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. *Behavioral and Brain Functions*, v. 8, p. 12, 2012.

- CALABRESI, P. *et al.* Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, v. 17, n. 8, p. 1022–1030, 2014a.
- CALEY, C. F. Amitriptyline-induced anorgasmia reversed by nefazodone
Extrapyramidal reactions from concurrent SSRI and atypical antipsychotic use *Irish Journal of Psychological Medicine* v. 15, n. 2, p. 76–77, 1998.
- CAROFF SN, HURFORD I, LYBRAND J, C. E. Movement dis- orders induced by antipsychotic drugs: implications of the CATIE. *Schizophrenia Trial. Neurol Clin*, v. 29, p. 127–48, 2011.
- CASAROTTO, P. C. *et al.* Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB1) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, n. 2, p. 478–86, 2012.
- CASEY, D. E. Tardive dyskinesia and atypical antipsychotic drugs. *Schizophrenia Research*, v. 35 Suppl, p. S61–S66, 1999.
- CASEY, D. E. Tardive dyskinesia: Pathophysiology and animal models. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 61, n. SUPPL. 4, p. 5–9, 2000.
- CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, v. 389, p. 816–24, 1997.
- CORRELL, C. Antipsychotic use in children and adolescents: minimizing adverse effect to maximize outcomes. *J Am Child Adolesc Psychiatry*, v. 47, p. 9–20, 2008.
- CRAWLEY, J. N. *et al.* Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 46, n. 4, p. 967–972, 1993.
- CREED, M. C.; NOBREGA, J. N. The role of serotonin in the antidyskinetic effects of deep brain stimulation: focus on antipsychotic-induced motor symptoms. *Reviews in the neurosciences*, v. 24, n. 2, p. 153–66, 2013.
- CRYSTAL, S. *et al.* Broadened use of atypical antipsychotics: Safety, effectiveness, and policy challenges. *Health Affairs*, v. 28, n. 5, p. 1–14, 2009.
- DE LAGO, E. *et al.* Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: In vivo and in vitro evidence. *Brain Research*, v. 1007, n. 1-2, p. 152–159, 2004.
- DE PETROCELLIS, L. *et al.* The Activity of Anandamide at Vanilloid VR1 Receptors Requires Facilitated Transport across the Cell Membrane and Is Limited by Intracellular Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 16, p. 12856–12863, 2001.
- DEVANE, W. A. *et al.* Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, v. 258, n. 10, p. 1946–1949, 1992.

DEVANE, W. A. *et al.* Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain. *Molecular Pharmacology*, v. 34, p. 605–613, 1988.

DOWIE MJ, HOWARD ML, NICHOLSON LFB, FAULL RLM, HANNAN AJ, G. M. Behavioural and molecular consequences of chronic cannabinoid treatment in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience*, v. 170, p. 324–36, 2010.

DRAY, A.; OAKLEY, N. R. Effects of α -flupenthixol on dopamine and 5-hydroxytryptamine responses of substantia nigra neurones. *Neuropharmacology*, v. 15, p. 793–796, 1976.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J. *et al.* Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *British Journal of Pharmacology*, v. 163, n. 7, p. 1365–1378, 2011.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *British Journal of Pharmacology*, v. 156, n. 7, p. 1029–1040, 2009.

FISONE, G. *et al.* Signaling in the basal ganglia: Postsynaptic and presynaptic mechanisms. *Physiology and Behavior*, v. 92, n. 1-2, p. 8–14, 2007.

FREEZE, B. S. *et al.* Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 33, n. 47, p. 18531–9, 2013.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological reviews*, v. 83, n. 3, p. 1017–66, 2003.

FU, J. *et al.* A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. v. 15, n. 1, p. 64–69, 2012.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, n. October, p. 1646–1647, 1964.

GARCÍA-ARENCIBIA M. *et al.* Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res*, v. 1134, p. 162–70, 2007.

GARDOS, G.; COLE, J. Tardive Dyskinesia and Anticholinergic Drugs. *Am J Psychiatry*, v. 140:2, n. January, p. 2002–2002, 1983.

GAUR, N. *et al.* The biochemical womb of schizophrenia: A review. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 23, n. 4, p. 307–327, 2008.

GENE-JACK WANG *et al.* Imaging of Brain Dopamine Pathways: Implications for Understanding Obesity. *J Addict Med*, v. 3, n. 1, p. 8–18, 2009.

GERLACH, J. New antipsychotics: classification, efficacy, and adverse effects. *Schizophrenia bulletin*, v. 17, n. 2, p. 289–309, 1991.

GIRAULT, J. A. *Signaling in striatal neurons: The phosphoproteins of reward, addiction, and dyskinesia*. 1. ed. Elsevier Inc., 2012. v. 106.

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

GLASS M, VAN DELLEN C, BLAKEMORE C, H. A. F. Delayed onset of Huntington's disease in mice in a enriched environment correlates with delayed loss of Cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience*, v. 123, p. 207–212, 2004.

GLASS, M.; FAULL, R. L. M.; DRAGUNOW, M. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study on the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, v. 77, n. 2, p. 299–318, 1997.

GLASS, M.; FAULL, R. L. M.; DRAGUNOW, M. Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in huntington's disease. *Neuroscience*, v. 56, n. 3, p. 523–527, 1993.

GOBIRA, P. H. *et al.* Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. 2013.

GOMES, F. V.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol attenuates catalepsy induced by distinct pharmacological mechanisms via 5-HT_{1A} receptor activation in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 46, p. 43–47, 2013.

GUNNE, L. M. *et al.* Spontaneous chewing movements in rats during acute and chronic antipsychotic drug administration. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 25, n. 4, p. 897–901, 1986.

HENDERSON, D. C. *et al.* Clozapine, diabetes mellitus, weight gain, and lipid abnormalities: A five-year naturalistic study. *American Journal of Psychiatry*, v. 157, n. 6, p. 975–981, 2000.

HERKENHAM, M. *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience*, v. 11, n. 2, p. 563–583, 1991.

HOFFMAN, D. C.; DONOVAN, H. Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. *Psychopharmacology*, v. 120, n. 2, p. 128–133, 1995.

HOWES, O. D. *et al.* The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Archives of general psychiatry*, v. 69, n. 8, p. 776–86, 2012.

ICHIKAWA, J. *et al.* 5-HT_{2A} and D₂ receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT_{1A} receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. p. 1521–1531, 2001.

IVERSEN, S. D. Is it possible to model psychotic states in animals? *J Psychopharmacol.*, v. 1, p. 154–76, 1987.

IVERSEN, S. D.; IVERSEN, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in Neurosciences*, v. 30, p.188-93, 2007

JODI A. WORREL, PATRICIA A. MARKEN, STEPHANIE E. BECKMAN, A. V. L. R. Atypical antipsychotic agents: A critical review. *Primary Psychiatry*, v. 7, n. 5, p. 65–68, 2000.

KEBABIAN, JW. et al. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, v. 277, p. 93–96, 1979.

JULIAN, M. D. et al. Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience*, v. 119, n. 1, p. 309–318, 2003.

KLEIJN, J. et al. Effects of amphetamine on dopamine release in the rat nucleus accumbens shell region depend on cannabinoid CB1 receptor activation. *Neurochemistry International*, v. 60, n. 8, p. 791–798, 2012.

KOMAKI, A. et al. Study the effect of endocannabinoid system on rat behavior in elevated plus-maze. *Basic and Clinical Neuroscience*, v. 6, n. 3, p. 147–153, 2015.

KOROLKOVAS, A. Essentials of medicinal chemistry. Wiley, 6.ed, 2008.

KRAVITZ, A. V.; KREITZER, A. C. Striatal Mechanisms Underlying Movement, Reinforcement, and Punishment. *Physiology (Bethesda)*, v. 27, n. 3, 2012.

KULKARNI, S. K.; DHIR, A. *Animal models of tardive dyskinesia*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2011. v. 98.

LALLY, J.; MACCABE, J. H. Antipsychotic medication in schizophrenia: A review. *British Medical Bulletin*, v. 114, n. 1, p. 169–179, 2015.

LEDENT, C. et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, v. 283, n. January, p. 401–404, 1999.

LISTER, J. et al. Lipoic acid and haloperidol-induced vacuous chewing movements: Implications for prophylactic antioxidant use in tardive dyskinesia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 72, p. 23–29, 2017.

LONG, J. Z. et al. Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 48, p. 20270–5, 2009.

MA, S.-X. et al. Impairment of opiate-mediated behaviors by the selective TRPV1 antagonist SB366791. *Addiction Biology*, 2016.

MACKIE, K. Endocannabinoids and motor control . Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J. Neuroendocrino*, v. 20, p. 10–14, 2008.

MAILLEUX, P.; VANDERHAEGHEN, J. Dopaminergic Regulation of Cannabinoid Receptor mRNA Levels in the Rat Caudate-Putamen : An In Situ Hybridization Study.

Journal of Neurochemistry, v.61, n.5, p. 1705-12.,1993.

MARINELLI, S. *et al.* Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 23, n. 8, p. 3136–44, 2003.

MARTÍN, A. B. *et al.* Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 7, p. 1667–79, 2008.

MATO, S. *et al.* CB1 knockout mice display impaired functionality of 5-HT 1A and 5-HT2A/C receptors. *Journal of Neurochemistry*, v. 103, n. 5, p. 2111–2120, 2007.

MATSUDA, L. A *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.

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 are. *Neuropharmacology*, v. 54, n. 1, p. 95–107, 2009.

MÁTYÁS, F. *et al.* Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience*, v. 137, n. 1, p. 337–361, 2006.

MCCREARY, A. C.; NEWMAN-TANCREDI, A. Serotonin 5-HT1A Receptors and Antipsychotics - An Update in Light of New Concepts and Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 26, p. 3725–3731, 2015.

MECHOULAM, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MELIS, M. *et al.* Prefrontal Cortex Stimulation Induces 2-Arachidonoyl- Glycerol-Mediated Suppression of Excitation in Dopamine Neurons. *In Vivo, The Journal of Neuroscience* v. 24, n. 47, p. 10707–10715, 2004.

MELIS, M. *et al.* Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons. *Neurobiology of Disease*, v. 24, n. 1, p. 15–27, 2006.

MELIS, M.; GESSA, G. L.; DIANA, M. Different mechanisms for dopaminergic excitation induced by opiates and cannabinoids in the rat midbrain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 24, n. 6, p. 993–1006, 2000.

MEMO, M.; MISSALE, C.; SPANO, P. F. Multiple Transduction Mechanisms for Dopamine D2 Receptors in Anterior Pituitary Cells. *Receptor-Receptor Interactions* p. 23–35, 1987.

MILLER, R. Mechanisms of Action of Antipsychotic Drugs of Different Classes, Refractoriness to Therapeutic Effects of Classical Neuroleptics, and Individual

Variation in Sensitivity to their Actions: PART I. *Current Neuropharmacology*, v. 7, p. 302–314, 2009.

MISSALE, C. *et al.* Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, v. 78, n. 1, p. 189 – 225, 1998.

MONEY, K. M.; STANWOOD, G. D. Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 7, n. December, p. 260, 2013.

MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIPSICÓTICOS: HIPÓTESES DOPAMINÉRGICAS. [S.d.].

MORERA-HERRERAS, T. *et al.* Endocannabinoid modulation of dopaminergic motor circuits. *Frontiers in Pharmacology*, v. 3 JUN, n. November 2016, 2012.

MORERA-HERRERAS, T. *et al.* Involvement of subthalamic nucleus in the stimulatory effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on dopaminergic neurons. *Neuroscience*, v. 151, n. 3, p. 817–823, 2008.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

NAVARRO, M. *et al.* Motor disturbances induced by an acute dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol: Possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 45, n. 2, p. 291–298, 1993.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biological Psychiatry*, v. 59, n. 12, p. 1151–1159, 2006.

O'SULLIVAN, S. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British Journal of Pharmacology*, v. 152, p. 576–582, 2007.

OKAMOTO, Y. *et al.* Molecular Characterization of a Phospholipase D Generating Anandamide and Its Congeners. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 7, p. 5298–5305, 2004.

OLIVER D. HOWES AND SHITIJ KAPUR. A neurobiological hypothesis for the classification of schizophrenia: type A (hyperdopaminergic) and type B (normodopaminergic). *The British Journal of Psychiatry*, v. 205, p. 1–3, 2014.

OVERTON, P. G.; CLARK, D. Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain research. Brain research reviews*, v. 25, p. 312–34, 1997.

PITSIKAS, N. *et al.* The 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 improves rats performance in different models of amnesia evaluated by the object recognition task. *Brain Research*, v. 983, n. 1-2, p. 215–222, 2003.

POMAROL-CLOTET, E. *et al.* Medial prefrontal cortex pathology in schizophrenia as revealed by convergent findings from multimodal imaging. *Molecular psychiatry*, v. 15,

n. 8, p. 823–830, 2010.

QAYYUM RANA, A.; CHAUDRY, Z. M.; BLANCHET, P. J. New and emerging treatments for symptomatic tardive dyskinesia. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 7, p. 1329–1340, 2013.

RICH, M. W.; RADWANY, S. M. *Respiratory dyskinesia: An underrecognized phenomenon*. Chest. [S.l: s.n.], 1994

RÖPKE, J. *et al.* Anandamide attenuates haloperidol-induced vacuous chewing movements in rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 2014.

RUBINSTEIN, M. *et al.* Adaptive mechanisms of striatal D1 and D2 dopamine receptors in response to a prolonged reserpine treatment in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 252, n. 2, p. 810–816, 1990.

RUSSO, E. B. *et al.* Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochemical Research*, v. 30, n. 8, p. 1037–1043, 2005.

SAÑUDO-PEÑA, M. C. *et al.* Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, v. 248, n. 3, p. 171–174, 1998.

SAÑUDO-PEÑA, M. C.; WALKER, J. M. Role of the subthalamic nucleus in cannabinoid actions in the substantia nigra of the rat. *Journal of neurophysiology*, v. 77, n. 3, p. 1635–1638, 1997.

SAVINAINEN, J. R. *et al.* Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB₁ receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *British journal of pharmacology*, v. 134, n. 3, p. 664–72, 2001.

SEEMAN, M. V.; SEEMAN, P. Is schizophrenia a dopamine supersensitivity psychotic reaction? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 48, p. 155–160, 2014.

SEGOVIA G, MORA F, CROSSMAN AR, B. J. Effects of CB₁ Cannabinoid Receptor Modulating Compounds on the Hyperkinesia Induced by High-Dose Levodopa in the Reserpine-Treated Rat Model of Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, v. 18, p. 138–49, 2003.

SHAO, L. *et al.* Schizophrenia susceptibility gene dysbindin regulates glutamatergic and dopaminergic functions via distinctive mechanisms in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 46, p. 18831–6, 2011.

SHARIFI, H. *et al.* Effect of buspirone, fluoxetine and 8-OH-DPAT on striatal expression of bax, caspase-3 and Bcl-2 proteins in 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonian rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 5, n. 4, p. 491–495, 2015.

SIERADZAN, K.A.; FOX, MRCP; HILL DICK, F. A. R. C. J. M. B. Cannabinoids reduce dyskinesia in Parkinson's disease: *A. Neurology*, v. 57, p. 2108–2111, 2001.

SONEGO, A. B. *et al.* Cannabidiol attenuates haloperidol-induced catalepsy and c-Fos protein expression in the dorsolateral striatum via 5-HT_{1A} receptors in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 309, p. 22–28, 2016.

SOURKES, T. L. *et al.* Excretion of Dopamine, Catecholamine Metabolites and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Hepatolenticular Degeneration (Wilson's Disease). *Journal of Neurochemistry*, v. 10, n. 12, p. 947–951, 1963.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, v. 388, n. 6644, p. 773–778, 1997.

STRANGE P.G. Antipsychotic drugs: Importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev*, v. 53, p. 119–33, 2001.

STUBER, G. D. *et al.* Dopaminergic Terminals in the Nucleus Accumbens But Not the Dorsal Striatum Corelease Glutamate. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 24, p. 8229–8233, 2010.

SVENNINGSSON, P. *et al.* DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 44, p. 269–296, 2004.

SZABO, B. *et al.* Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*, v. 97, n. 1, p. 89–97, 2000.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, v. 51, p. 159–212, 1999.

TANIMURA, A. *et al.* The Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Produced by Diacylglycerol Lipase ?? Mediates Retrograde Suppression of Synaptic Transmission. *Neuron*, v. 65, n. 3, p. 320–327, 2010.

TOUW, M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of Psychoactive Drugs*, v. 13, n. 1, p. 23–34, 1981.

TSAI, G. *et al.* Markers of glutamatergic neurotransmission and oxidative stress associated with tardive dyskinesia. *American Journal of Psychiatry*, v. 155, n. 9, p. 1207–1213, 1998.

TURRONE, P. *et al.* The relationship between dopamine D₂ receptor occupancy and the vacuous chewing movement syndrome in rats. *Psychopharmacology*, v. 165, n. 2, p. 166–171, 2003.

TURRONE, P.; REMINGTON, G.; NOBREGA, J. N. The vacuous chewing movement (VCM) model of tardive dyskinesia revisited: Is there a relationship to dopamine D₂ receptor occupancy? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 26, n. 3, p. 361–380, 2002.

VAN DER STELT MFS, MICHAEL HILL M, CROSSMAN AR, PETROSINO S, DI MARZO V, B. J. A role for endogenous cannabinoids in the generation of Parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned non human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J*, v. 19, p. 140–2, 2005.

VINCENZO DI MARZO *et al.* Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. v.372, p.686-91, 1994

WALLMAN, M. J.; GAGNON, D.; PARENT, M. Serotonin innervation of human basal ganglia. *European Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 8, p. 1519–1532, 2011.

WOLFARTH, S.; OSSOWSKA, K. Can the supersensitivity of rodents to dopamine be regarded as a model of tardive dyskinesia? *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 13, n. 6, p. 799–840, 1989.

WOOLLEY, B. D. W.; SHAW, F. N. Evidence for the participation of serotonin in mental processes. *Annals New York Academy of Sciences*. 1954.