UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

JOÃO FRANCISCO CORDEIRO PEDRAZZI

Mecanismos envolvidos no perfil antipsicótico do canabidiol

Ribeirão Preto
2018

JOÃO FRANCISCO CORDEIRO PEDRAZZI

Mecanismos envolvidos no perfil antipsicótico do canabidiol

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor
em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz
Guimarães

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pedrazzi, João Francisco Cordeiro

Mecanismos envolvidos no perfil antipsicótico do canabidiol / João Francisco Cordeiro Pedrazzi; orientadora: Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães – Ribeirão Preto, 2018.

124p. : il.; 30 cm

Tese (Doutorado em Neurociências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2018. Canabidiol, anfetamina, mecanismo de ação, processamento de informações, metilação do DNA, inibição pré-pulso.

1. Canabidiol. 2. Processamento de informações. 3. TRPV1.
4. Anandamida. 5. fosfo-histona acetilada. 6. BDNF. 7. Hipocampo.
8. Metilação do dna. 9. Córtex pré-frontal. 10. Estriado ventral.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pedrazzi, João Francisco Cordeiro Pedrazzi. Mecanismos envolvidos no perfil antipsicótico do canabidiol.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor
em Neurociências

Aprovado em: _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Neurofisiologia Molecular, Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo - USP, sob a orientação da Professora Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães.

**À minha mãe e
ao meu pai.**

**Às minhas filhas e
à minha esposa.**

**À minha avó e
à minha tia.**

**À minha sobrinha,
À minha irmã e
ao meu cunhado.**

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor sem medidas, pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim nos momentos em que nem eu mesmo acreditava. Sem eles, minha jornada até aqui não seria possível. É principalmente na minha família que enxergo esperança em um mundo melhor, mais justo, tolerante, de amor e união, valores que têm sido reforçados desde a minha infância. Aprendi que honestidade e caráter não são qualidades, mas sim obrigação. Minha avó o pilar de todos nós não poderia deixar de ser mencionada, a pessoa mais sábia que conheço e de uma fé inabalável. Seu exemplo de vida e o grande incentivo que me dá desde o momento que abri meus olhos após pouco mais de seis meses de gestação me motiva a ser uma pessoa cada vez melhor e a não desistir dos meus objetivos. Os meus pais, o meu grande porto seguro, exemplos de carinho, amor, força de vontade, dedicação e luta. Seus conselhos sempre são cirúrgicos, vocês são meus exemplos de vida. A minha tia, que é detentora de garra e espírito aventureiros fascinantes, me ensinou a nadar sem ter nenhum domínio nesse quesito, que sempre que podia me levava ao Campus da USP entre visitas ao museu e as realizações dos tão esperados piqueniques. Contrariando a ciência, descobri que posso ter três corações (dois pulsando fora do meu corpo). As minhas duas filhas são o amor materializado com fator de impacto imensurável, que me fazem esquecer eventuais problemas do cotidiano, onde um simples abraço, beijo, olhar ou sorriso já acalmam muitas das minhas angústias.

À professora ***Elaine Del Bel*** pela orientação, convívio e que abriu as portas do laboratório me concedendo a oportunidade de fazer ciência. É um grande privilégio e honra fazer parte de um laboratório referência em pesquisa, que permite conhecermos e trocarmos experiências com pesquisadores de todas as partes do Brasil e do mundo. Tudo isso fruto do empenho e dedicação da nossa chefe, que nos incentiva a não nos acomodarmos e permanecermos na zona de conforto. O interesse deve ser constante, assim como a luta para conquistarmos os nossos objetivos é o exemplo que levo dela para a vida científica.

À minha mulher, namorada, amiga e mãe das minhas maiores riquezas ***Amanda Sales*** pelo amor, convívio, amizade, paciência e grande ajuda na condução e discussão dos experimentos. A minha admiração por você é infinita, uma mãe extremamente carinhosa e zelosa, companheira e de uma competência gigantesca em qualquer campo que assuma para trabalhar.

Aos professores ***Francisco Guimarães e Felipe Gomes*** pelo grande suporte científico.

À professora ***Sâmia Joca*** por ter gentilmente cedido seus conhecimentos e laboratório para a realização dos experimentos que envolveram a metilação do DNA.

Aos amigos do laboratório que tanto me engrandeceram pessoal, profissionalmente e porque não “caloricamente” em virtude dos bolos de aniversários, churrascos, festas de aniversário, idas a cantina e a restaurantes. Com certeza a presença de vocês foi preponderante para a minha chegada até aqui, seja pelo apoio técnico-intelectual, seja pelo apoio emocional. Fico muito feliz de ter compartilhado momentos importantes da minha vida com vocês, de ter conversado sobre diversos temas do cotidiano, com destaque as abordagens político-culturais e gastronômicas, que sempre foram de excelência. Há um ditado que gosto muito de dizer: “quem tem amigos tem um tesouro”, me orgulho muito de ter enriquecido durante esse tempo.

Aos amigos pós-graduandos e funcionários de outros laboratórios que fiz durante essa jornada. As conversas nos corredores e na copinha sempre foram recheadas de humor aliviando a tensão dos experimentos que não tiveram o resultado esperado.

Aos *professores* do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento para o meu crescimento científico.

Aos *membros da banca examinadora* desse trabalho pela disponibilidade e atenção.

Aos *funcionários* da Faculdade de Odontologia e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aos *funcionários* do biotério pelo cuidado e zelo com os animais utilizados nos experimentos.

À **DEUS e a Nossa Senhora Aparecida** por estarem sempre nos meus pensamentos me confortando, até mesmo nos momentos em que questiono a minha fé.

À **FAPESP** processo: 2015/06515-8 *e ao CNPq* pelo apoio financeiro e institucional.

Aos animais utilizados na pesquisa científica meu reconhecimento e respeito.

***”Cada um de nós é, sob uma
perspectiva cósmica, precioso.”***

Carl Sagan

RESUMO

Pedrazzi, J.F.C. **Mecanismos envolvidos no perfil antipsicótico do canabidiol**. 2018. 124 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A esquizofrenia é uma desordem altamente incapacitante que atinge cerca de 1% da população, envolvendo desequilíbrio da neurotransmissão dopaminérgica e uma hipofunção glutamatérgica. Portadores dessa doença apresentam deficiência do processamento de informações caracterizada por prejuízo no teste de inibição pré-pulso (*prepulse inhibition* – PPI). Essa condição pode ser reproduzida em modelos experimentais, pelo tratamento com psicoestimulantes, como a anfetamina (ANF) e atenuado/revertido pelo tratamento com antipsicóticos. O canabidiol (CBD) é o principal componente não psicotomimético da *Cannabis sativa*. Estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que o CBD apresenta perfil antipsicótico, com baixa indução de efeitos adversos. Contudo, até o momento poucos estudos foram realizados com o objetivo de investigar os mecanismos farmacológicos e/ou moleculares envolvidos nesse perfil. Os prováveis mecanismos envolvidos com as propriedades antipsicóticas do CBD parecem envolver a ativação de receptores TRPV1 e o aumento da sinalização do endocanabinoide anandamida. No presente estudo, demonstramos que os receptores TRPV1 e o aumento da disponibilidade de anandamida parecem participar do perfil antipsicótico do CBD. Nessas investigações, não observamos participação dos receptores 5-HT1A. A microinjeção de CBD no córtex pré-frontal (CPF), estrutura envolvida com a fisiopatologia da esquizofrenia e um provável sítio para ação de antipsicóticos, não atenuou o prejuízo induzido por ANF no PPI. Recentemente, mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, têm sido associados à fisiopatologia da esquizofrenia. Nesse sentido, avaliamos o envolvimento da metilação do DNA em estruturas envolvidas com a neurobiologia da esquizofrenia regulada por CBD, sobre as respostas comportamentais induzidas por drogas psicotomiméticas. Verificamos que a ANF causa um aumento da metilação global no estriado ventral, efeito bloqueado pelo pré-tratamento com CBD e de forma semelhante com o antipsicótico clozapina (CLZ). Não observamos alterações na metilação global no CPF. O tratamento com MK-801 não alterou a metilação global nas duas estruturas anteriormente citadas. Protocolo experimental semelhante foi utilizado em mais duas abordagens: (i) a expressão do fator neurotrófico do cérebro (BDNF), relacionado com a manutenção, crescimento e diferenciação dos neurônios está aumentada no hipocampo dos animais tratados com a associação CBD e ANF, padrão semelhante foi observado com a associação CLZ e ANF. (ii) a expressão de fosfo-histona acetilada, um marcador que indica alterações na cromatina, intimamente ligada com as alterações da expressão gênica está aumentada no núcleo acumbens e CPF dos animais tratados com a associação CBD e ANF. Os dados aqui apresentados sugerem que os receptores TRPV1 e o endocanabinoide anandamida parecem estar envolvidos com o perfil antipsicótico do CBD. Pela primeira vez foi demonstrado que tanto o pré-tratamento com CBD ou CLZ podem alterar o aumento da metilação global de DNA induzido por ANF. Além disso, a expressão de BDNF no hipocampo e a expressão de fosfo-histona acetilada podem ser outros mecanismos que merecem atenção em relação ao perfil antipsicótico do CBD.

Palavras-chave: canabidiol, processamento de informações, TRPV1, anandamida, fosfo-histona acetilada, BDNF, hipocampo, metilação do dna, córtex pré-frontal, estriado ventral

ABSTRACT

Pedrazzi, J.F.C. **Mechanisms involved in cannabidiol antipsychotic profile. 2018.** 124 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Schizophrenia is a highly disabling disorder that affects about 1% of the population and involves impaired dopaminergic neurotransmission and glutamatergic hypofunction. Patients with this disorder have a deficiency in information processing characterized by disruption in the prepulse inhibition (PPI) test. This condition can be reproduced in experimental models by treatment with psychostimulants such as amphetamine and attenuated / reversed by treatment with antipsychotics. Cannabidiol (CBD) is the main non-psychotomimetic component of *Cannabis sativa*. Clinical and preclinical studies suggest that CBD has an antipsychotic profile, with low induction of adverse effects. However, to date, few studies have been carried out to investigate the pharmacological and / or molecular mechanisms involved in this outcome. The likely mechanisms involved with the antipsychotic properties of CBD appear to involve activation of TRPV1 receptors and increased endocannabinoid anandamide signaling. In the present study, we demonstrated that TRPV1 receptors and the increased availability of anandamide appear to participate in the CBD antipsychotic profile. In these investigations, we did not observe participation of 5-HT1A receptors. Microinjection of CBD in the prefrontal cortex, structure involved in the pathophysiology of schizophrenia and a probable site of antipsychotic action, did not attenuate the amphetamine-induced disruption in PPI. Recently, epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, have been associated with the pathophysiology of schizophrenia. In this sense, we also evaluated the involvement of DNA methylation in structures involved with the neurobiology of CBD-regulated schizophrenia on behavioral responses induced by psychotomimetic drugs. We found that amphetamine causes increased global methylation in the ventral striatum, an effect blocked by pre-treatment with CBD and similarly with the antipsychotic clozapine. We did not observe changes in the global methylation in prefrontal cortex. Treatment with MK-801 did not alter the global methylation in the two aforementioned structures. Similar experimental protocol was used in two other approaches: (i) brain neurotrophic factor (BDNF) expression, related to the maintenance, growth and differentiation of neurons is increased in the hippocampus of animals treated with CBD and amphetamine; a similar pattern was observed with the association clozapine and amphetamine. (ii) the expression of acetylated phospho-histone, a marker indicating changes in chromatin, closely linked to changes in gene expression is increased in the nucleus accumbens and CPF in animals treated with the CBD and amphetamine combination. The data presented here suggest TRPV1 receptors and the endocannabinoid anandamide seem to be involved with the antipsychotic profile of CBD. For the first time it has been shown that both pre-treatment with CBD or clozapine may alter the increase in overall DNA methylation induced by amphetamine. In addition, the expression of BDNF in the hippocampus and the expression of acetylated phospho-histone may be different mechanisms that deserve attention in relation to the antipsychotic profile of CBD.

Keywords: cannabidiol, information processing, TRPV1, anandamide, phosphoacetylated histone, BDNF, hippocampus, dna methylation, prefrontal cortex, ventral striatum

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG:	2-araquidonoil-glicerol
ATV:	área tegmental ventral
BDNF:	fator neurotrófico derivado do cérebro (brain-derived neurotrophic factor)
CBD:	canabidiol
CLZ:	clozapina
CPZ:	capsazepina
DAB:	tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina
DAT:	transportador de dopamina (dopamine active transporter)
Delta-9-THC:	Delta-9-tetrahydrocannabinol
FAAH:	amida hidrolase de ácidos graxos (fatty acid amide hydrolase)
GABA:	ácido gama-aminobutírico (gamma-aminobutyric acid)
GAD-67:	ácido glutâmico descarboxilase
HPC:	hipocampo
NAC:	núcleo acumbens
NMDA:	N-metil-D-Aspartato
p-AcH3:	fosfo-histona acetilada
P:	pulso
PP:	pré-pulso
PPI:	inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (prepulse inhibition)
SNC:	sistema nervoso central
TRPV1:	receptor vaniloide de potencial transitório 1
6-OHDA:	6-hidroxidopamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias dopaminérgicas do SNC.....	25
Figura 2: Número de internações antes e após a implementação da terapia antipsicótica.....	29
Figura 3: Glândulas de resina presentes em folhas do gênero feminino da <i>Cannabis sativa</i> e esquema dos principais componentes encontrados na planta.	34
Figura 4: Esquema simplificado do mecanismo de inibição pré-pulso (PPI).	35
Figura 5: Esquema simplificado da metilação do DNA.....	43
Figura 6: Regiões selecionadas do encéfalo de camundongo para a quantificação de p-AcH3.....	51
Figura 7: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com CPZ no PPI.	61
Figura 8: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com CPZ na hiperlocomção induzida por ANF no Campo Aberto.	62
Figura 9: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com WAY100635 no PPI.....	64
Figura 10: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com WAY100635 na hiperlocomção induzida por ANF no Campo Aberto.....	65
Figura 11: Efeito do pré-tratamento com URB597 no prejuízo induzido por ANF no PPI....	66
Figura 12: Efeito do pré-tratamento com URB597 na hiperlocomção induzida por ANF. ...	67
Figura 13: Efeito do pré-tratamento com AA-5-HT no prejuízo induzido por ANF no PPI. .	68
Figura 14: Efeito do pré-tratamento com AA-5-HT na hiperlocomção induzida por ANF no Campo Aberto	69
Figura 15: Efeito da microinjeção de CBD no CPF sobre o prejuízo induzido por ANF no PPI.	70
Figura 16: Identificação do sítio de inserção das cânulas no CPF no plano ântero-posterior de camundongos.	71
Figura 17: Efeito do pré-tratamento com CBD no prejuízo induzido por ANF no PPI.....	72

Figura 18: Efeito do pré-tratamento com CBD na expressão de p-AcH3 no CPF, estriado dorsal e NAC induzido por ANF	73
Figura 19: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ no prejuízo induzido por ANF no PPI.	74
Figura 20: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na expressão de BDNF no HPC induzido por ANF.....	75
Figura 21: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na metilação global induzida por ANF no CPF.	76
Figura 22: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na metilação global induzida por ANF no estriado ventral.	76
Figura 23: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ no prejuízo induzido por MK-801 no PPI.	77
Figura 24: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ sobre a expressão de BDNF no HPC.	78
Figura 25: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na metilação global induzida por MK-801 no CPF.	79
Figura 26: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na metilação global induzida por MK-801 no estriado ventral.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do CBD em diferentes modelos experimentais de sintomas da esquizofrenia.....	37
Tabela 2 - Efeito do CBD sobre sintomas associados à fisiopatologia da esquizofrenia.....	38
Tabela 3 - Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com CPZ na resposta de sobressalto acústico.	62
Tabela 4 - Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com WAY100635 na resposta de sobressalto acústico.	65
Tabela 5 - Efeito do pré-tratamento com URB597 na resposta de sobressalto acústico.	67
Tabela 6 - Efeito do pré-tratamento com AA-5-HT na resposta de sobressalto acústico.....	69
Tabela 7 - Efeito da microinjeção de CBD no CPF na resposta de sobressalto acústico.....	71
Tabela 8 - Efeito do pré-tratamento com CBD na resposta de sobressalto acústico.	73
Tabela 9 - Efeito do CBD ou CLZ na resposta de sobressalto acústico.	75
Tabela 10 - Efeito do CBD ou CLZ na resposta de sobressalto acústico.	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Esquizofrenia: Conceito e História.....	22
1.1.1 Antipsicóticos	26
1.2 Marcadores biológicos na esquizofrenia	30
1.2.1 BDNF: um provável marcador?	30
1.2.2 A deficiência do processamento de informações na esquizofrenia	32
1.3 <i>Cannabis sativa</i> e seu Potencial Farmacológico	34
1.3.1 Perfil Antipsicótico do CBD	35
1.3.2 Mecanismo de ação do CBD	39
1.4 A investigação e atuação de drogas com perfil antipsicótico na participação de mecanismos epigenéticos na esquizofrenia	40
 2 OBJETIVOS	 44
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 46
3.1 Animais.....	47
3.2 Drogas.....	47
3.3 Avaliação do Comportamento	48
3.3.1 Teste de campo aberto	48
3.3.2 Teste de PPI.....	48
3.4 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula no CPF	49
3.5 Congelamento e processamento dos tecidos para localização de cânula e imunohistoquímica	49
3.6 Reação imunohistoquímica para o marcador molecular fosfo-histona acetilada (p-AcH3)	50
3.7 Quantificação dos núcleos neuronais marcados pela imunohistoquímica p-AcH3.....	50
3.8 Coleta de tecidos e análise da metilação global do DNA.....	52
3.9 Coleta de tecidos e dosagem dos níveis de BDNF (ELISA)	52
3.10 Análise estatística	53
 4 DESENHO EXPERIMENTAL	 54
4.1 Parte I: Mecanismos farmacológicos envolvidos no perfil antipsicótico do CBD.....	55

4.2 Parte II: Investigação do CPF como substrato neural para a ação antipsicótica do CBD ..	57
4.3 Parte III: Mecanismos moleculares envolvidos no perfil antipsicóticos do CBD	57
5 RESULTADOS	59
5.1 Mecanismos farmacológicos envolvidos no perfil antipsicótico do CBD	60
5.1.1 Experimentos 1 e 2: Participação dos receptores TRPV1 no potencial antipsicótico do CBD	60
5.1.2 Experimentos 3 e 4: Participação dos receptores 5-HT1A no potencial antipsicótico do CBD	63
5.1.3 Experimentos 5 e 6: Investigação do aumento da sinalização de anandamida pelo composto URB-597	66
5.1.4 Experimentos 7 e 8: Investigação do aumento da sinalização do endocanabinoide anandamida e bloqueio farmacológico de receptores TRPV1	68
5.2 Investigação do CPF como substrato neural para a ação antipsicótica do CBD	70
5.2.1 Experimento 9: Microinjeção de CBD no CPF	70
5.3 Mecanismos moleculares envolvidos no perfil antipsicóticos do CBD	72
5.3.1 Experimento 10: Efeito do pré-tratamento com CBD no prejuízo induzido por ANF sobre a expressão do marcador fosfo-histona acetilada (p-AcH3)	72
5.3.2 Experimento 11: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ no prejuízo induzido por ANF sobre a expressão de BDNF no hipocampo e metilação global no CPF e estriado ventral	74
5.3.3 Experimento 12: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ no prejuízo induzido por MK-801 sobre a expressão de BDNF no hipocampo e metilação global no CPF e estriado ventral	77
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICES	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia: Conceito e História

A esquizofrenia é considerada o mais grave dos transtornos mentais, com grandes impactos para a vida do paciente, familiares e socioeconômicos. O termo esquizofrenia é derivado do grego no qual significa: schizo = divisão, cisão; phrenos = mente. Histórico conceitual desse transtorno data do final do século XIX e da descrição da demência precoce pelo psiquiatra alemão Emil Kraepelin. Outro cientista que teve importante influência sobre o conceito atual de esquizofrenia foi o psiquiatra suíço Eugen Bleuler.

Kraepelin (1856-1926) estabeleceu uma classificação de transtornos mentais baseado no modelo médico e teve como objetivo delinear a existência de doenças com etiologia, sintomatologia, curso e resultados comuns. Ele nomeou uma dessas entidades de demência precoce, devido à observação de que sua manifestação datava do início da vida e quase invariavelmente levava a problemas psiquiátricos. Seus sintomas característicos incluíam alucinações, perturbações na atenção, compreensão e fluxo de pensamento, esvaziamento afetivo e sintomas catatônicos. A etiologia era endógena, uma vez que era considerado que o transtorno surgia devido a causas internas.

Posteriormente, Bleuler (1857-1939) criou o termo “esquizofrenia” (esquizo = divisão, phrenia = mente) que substituiu o termo demência precoce. Esse cientista conceituou o termo para indicar a presença de uma ruptura entre pensamento, emoção e comportamento nos pacientes afetados. Para explicar melhor sua teoria relativa às rupturas mentais internas nesses pacientes, Bleuler descreveu sintomas fundamentais (ou primários) específicos da esquizofrenia que se tornaram conhecidos como os quatro “As”: **a**ssociação frouxa de ideias, **a**mbivalência, **a**utismo e alterações de **a**feto, além disso, também descreveu os sintomas acessórios, ou secundários, que incluíam alucinações e delírios (Ey, Bernard, & Brisset, 1985; Silva, 2006).

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico de etiologia multifatorial envolvendo variáveis genéticas, modificações neuroquímicas e alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). A pluralidade de suas manifestações promove uma doença de quadros distintos que atinge cerca de 1% da população mundial (Weiss e Feldon, 2001; Lau et al, 2003; Harrinson e Weinberger, 2005). Esse transtorno geralmente emerge no início da idade adulta ou no final da adolescência, raramente em crianças e é frequentemente incapacitante ao paciente, sobretudo em locais onde os serviços de saúde são precários, o que gera um alto custo econômico e social

(Silverstein et al., 2013). Em geral, homens apresentam os sintomas da doença antes do que as mulheres, e ainda uma maior tendência a experimentar formas mais graves da doença, sobretudo uma maior robustez dos sintomas negativos (Riecher-Rössler et al., 2018). Além disso, dados da organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que esse transtorno afeta mais de 23 milhões de pessoas em todo o mundo, e por estar associada a uma incapacidade considerável afeta drasticamente o desempenho educacional e ocupacional. Ainda, pacientes esquizofrênicos apresentam 2 a 3 vezes maiores chances de ter a vida interrompida precocemente em relação à população em geral. Isso geralmente ocorre devido às comorbidades como doenças cardiovasculares, metabólicas e infecciosas, além do estigma, discriminação e violação dos direitos humanos que os portadores da doença estão sujeitos. Vale ressaltar, que 50% dos pacientes diagnosticados com a doença tornam-se significante e permanentemente incapacitados (Rupp e Keith, 1993). A esquizofrenia é caracterizada por três grandes grupos de sintomas, classificados como positivos, negativos e cognitivos (Andreasen et al., 1995; Wong et al., 2003). Os sintomas positivos seriam fenômenos mentais ausentes em indivíduos sadios e são caracterizados principalmente por alucinações, ideias delirantes, desfragmentação do pensamento, agitação psicomotora. O termo “sintomas negativos” é utilizado para descrever a perda da motivação, comprometimento social e embotamento afetivo (Andreasen et al., 1995). Os sintomas cognitivos afetam funções como a atenção, memória e funcionamento intelectual geral (Wong et al., 1997).

As principais hipóteses acerca do desequilíbrio de sistemas neurotransmissores provavelmente envolvidos com a sintomatologia da esquizofrenia são resultado da observação do efeito de drogas conhecidas como psicotomiméticas. Esse é o caso dos agonistas dopaminérgicos diretos, como a apomorfina, drogas que promovem a liberação de dopamina, como a anfetamina (ANF) e seus análogos, e dos antagonistas de receptores glutamatérgicos-subtipo N-metil D-Aspartato (NMDA), como a fenciclidina (Moore et al., 1999; Bird et al., 2001; Lipska e Weinberger, 2005) e MK-801 (Long et al., 2006, Gomes et al., 2015). Esses compostos induzem sintomas positivos em indivíduos saudáveis e pioram sintomas pré-existentes nos portadores de esquizofrenia. Adicionalmente, a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia é baseada em duas observações principais: (i) drogas que aumentam os níveis de dopamina na via mesolímbica (projeção do feixe prosencefálico medial da área tegmental ventral (ATV) a regiões límbicas, incluindo o núcleo acumbens (NAC) promovem o surgimento de sintomas positivos da doença em indivíduos sadios e exacerbam sintomas pré-existentes

em portadores de esquizofrenia; (ii) o antagonismo de receptores dopaminérgicos do subtipo D2 é um pré-requisito para a eficácia terapêutica da maioria dos antipsicóticos sobre os sintomas positivos da doença (Davis et al., 1991; Seeman e Kapur, 2000). Os sintomas negativos da esquizofrenia seriam atribuídos à redução de dopamina na via mesocortical, via neuronal que conecta a ATV ao córtex cerebral, em particular aos lobos frontais (Figura 1). Além disso, a hipofunção cortical glutamatérgica, também é sugerida para explicar a fisiopatologia dos sintomas dessa doença. Uma ampla variedade de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que há desregulação na sinalização do glutamato em humanos e em modelos animais de esquizofrenia. Além disso, diversos genes implicados na esquizofrenia estão envolvidos na sinalização do glutamato (Phillips e Silverstein, 2003; Lisman et al., 2008; Adell et al., 2012; Lin et al., 2012). Dessa maneira, uma sinalização glutamatérgica anormal afeta inúmeras vias, como por exemplo: as projeções glutamatérgicas para interneurônios GABAérgicos na via descendente cortico-tronco cerebral; onde em um funcionamento normal, esses sinais limitam a atividade da dopamina na via mesolímbica através de interneurônios na área tegmental ventral (ATV) por meio de inativação tônica. Uma diminuição na sinalização do glutamato via receptores NMDA, reverte essa inibição tônica e leva à hiperexcitação dos receptores dopaminérgicos na região límbica, resultando no surgimento dos sintomas positivos da esquizofrenia. Concomitantemente, uma diminuição da neurotransmissão glutamatérgica aferente pode diretamente diminuir a atividade no córtex, resultando nos sintomas negativos e cognitivos desse transtorno (Lin et al., 2012). Assim, o desequilíbrio do sistema dopaminérgico e a hipofunção do sistema glutamatérgico na esquizofrenia sugerem uma interação íntima e recíproca destes sistemas, sugerindo que as anormalidades do sistema glutamatérgico podem afetar a transmissão dopaminérgica e vice-versa na fisiopatologia dessa desordem (Lau et al., 2003; Javitt, 2007).

Figura 1: O esquema acima identifica as regiões relacionadas com as principais vias dopaminérgicas que estão localizadas no SNC. A via nigroestriatal, que compreende a substância negra e os núcleos caudado e putâmen, os quais juntos são conhecidos como estriado; este trato está associado a facilitação de movimentos voluntários. Os neurônios dopaminérgicos da ATV dão origem a duas vias: a mesolímbica, com projeções para o NAC e outros constituintes do sistema límbico, e está relacionada com as emoções e a memória; e a mesocortical, que se projeta principalmente para o CPF, relacionada à regulação do afeto e ao pensamento orientado para metas, entre outros. A via conhecida como túbero-infundibular (não representada na figura), a qual compreende os núcleos arqueado e paraventricular e a eminência mediana do hipotálamo, e promove a inibição da liberação de prolactina pela hipófise. (retirado de <http://neuromed92.blogspot.com.br> 29/05/2018).

As hipóteses neuroquímicas da esquizofrenia, embora estejam bem compreendidas na abordagem das alterações referentes à neurotransmissão e suas vias de sinalização, pouco esclarecem as causas dessas anormalidades e o surgimento dos diferentes sintomas nos portadores da doença. Nesse sentido, a hipótese conhecida como two-hit (dois insultos) sugere uma combinação de suscetibilidade genética associada a um insulto durante o desenvolvimento pode preparar um indivíduo para um evento posterior que, em última instância, leva ao aparecimento completo da doença (Bayer et al., 1999). Assim, múltiplos fatores genéticos interagem com fatores ambientais, podendo afetar o neurodesenvolvimento com a criação de redes anormais de sinalização no SNC (van Os e Murray et al., 2008). Essa rede, no entanto, pode não se tornar anormal até a idade adulta, sugerindo que um evento na

adolescência ou pós-adolescência (segundo hit), como o abuso de drogas e traumas pode ter grande influência no surgimento e desenvolvimento do transtorno (Giovannoli et al., 2016).

1.1.1 Antipsicóticos

A esquizofrenia é uma condição crônica que exige tratamento para aliviar os sintomas e melhorar as condições de vida dos pacientes. Até a metade do século XX (década de 50) não havia ferramentas adequadas para o tratamento de doentes acometidos por esta doença. Dessa maneira, uma das poucas soluções era “internar” os pacientes em hospitais ou asilos até o fim de suas vidas. Esse panorama melhorou com a descoberta casual dos efeitos da Clorpromazina, graças à intensa busca pelo cirurgião francês Henry-Marie Laborit de compostos capazes de aliviar a grande tensão relacionada a procedimentos cirúrgicos. Laborit administrava aos pacientes um conjunto de substâncias que ele denominava de “Coquetel Lítico”, no qual um dos constituintes era um anti-histamínico conhecido como Prometazina (López-Muñoz et al., 2004). A procura por novos anti-histamínicos que pudessem ser utilizados com essa finalidade, Laborit recebeu um composto denominado Clorpromazina, sintetizado em 1950 por Paul Charpentier e testado farmacologicamente por Simone Courvoisier. Ao administrar esse composto nos pacientes, Laborit observou que os pacientes ficavam e assumiam estarem mais relaxados e calmos, demonstrando desinteresse frente à inquietação do período pré-operatório (López-Muñoz et al., 2004). A partir dessas observações, foi sugerido o potencial uso da Clorpromazina como um tranquilizante, que mais tarde a partir de ensaios clínicos apresentou eficácia na restauração da qualidade de vida de pacientes internados em hospitais psiquiátricos. A partir desse feito histórico conhecido como a “revolução farmacológica da psiquiatria” (figura 2) possibilitou-se que os doentes mentais enclausurados em asilos e sanatórios pudessem ser medicados em sua própria residência e em boa parte dos casos conviverem normalmente em sociedade, já que tinha uma ação relativamente específica sobre sintomas psicóticos (Graeff, Guimarães e Zuardi, 1999). O grande potencial clínico observado com a clorpromazina incentivou as indústrias farmacêuticas a investigarem outros compostos com esse perfil. A tioridazina e a flufenazina, bem como novas classes de drogas como as butirofenonas (exemplo: haloperidol) foram desenvolvidas logo após a descoberta da clorpromazina (Ashton, 1992; Buckley, 1999).

Os diferentes antipsicóticos apresentados até aqui, mesmo com estruturas químicas diferentes apresentam efeitos farmacológicos semelhantes e possuem grande relevância no tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia. Contudo, esses fármacos promovem

efeitos colaterais motores importantes, e por essa razão também ficaram conhecidos como neurolépticos, antipsicóticos clássicos, típicos ou de primeira geração (Keepers e Casey, 1986).

Com a introdução das drogas antipsicóticas atípicas, que promovem menos efeitos colaterais motores que o grupo anterior, o termo antipsicótico passou a ser mais utilizado para descrever a ação das drogas utilizadas no tratamento de psicoses (Marder, et al., 1991). Os efeitos colaterais desencadeados pelo tratamento com antipsicóticos típicos ocorrem no sistema motor extrapiramidal, produzindo sintomas de parkinsonismo (caracterizado por rigidez muscular, tremores, redução da expressão facial e lentidão de movimentos), acatisia (sentimentos de desassossego, inquietação, ansiedade e agitação), discinesia tardia (movimentação repetitiva e incontrolável na região da boca e lábios, às vezes em outra parte do corpo), distonia aguda (espasmo muscular dos olhos, língua, pescoço e tronco), “síndrome neuroléptica aguda” (caracterizada por rigidez muscular, febre, sudorese excessiva e alterações do batimento cardíaco e da pressão arterial). Outros efeitos colaterais centrais dessas substâncias ocorrem no sistema neuroendócrino, produzindo alterações na secreção de alguns hormônios hipofisários que resultam em sintomas como ginecomastia (desenvolvimento de glândulas mamárias em homens), galactorrêia (formação do leite em mulheres) e amenorréia (bloqueio da menstruação e consequentemente da ovulação). Os antipsicóticos também afetam o SNC autônomo, porque bloqueiam os receptores colinérgicos (tipo muscarínico) e adrenérgicos (alfa-adrenoceptores tipo 1), causando os seguintes sintomas: secura da boca e da pele, midríase, dificuldade de acomodação visual, taquicardia, constipação intestinal, retenção urinária, hipotensão arterial e hipotensão postural. Essas drogas, apesar de não interferirem na ereção, inibem a ejaculação, e causam sedação e sonolência. Os sintomas extrapiramidais são os mais comuns, e são responsáveis pela baixa adesão e desistência ao tratamento (Marder et al., 1991). O mecanismo de ação dos antipsicóticos típicos parece ser mediado pela neurotransmissão dopaminérgica. Esses medicamentos têm como característica principal bloquear a dopamina no nível dos receptores pré e pós-sinápticos (Tallman, 2000). Esse mecanismo de ação foi primeiramente descrito por Carlsson e Lindqvist em 1963. Em experimentos com ratos, observou-se que a administração de clorpromazina ou haloperidol resultava em acumulação do metabólito de dopamina em áreas cerebrais ricas nessa substância. Essa descoberta foi complementada com a informação de que as drogas antipsicóticas clássicas também podiam bloquear a formação e liberação de dopamina nos neurônios responsáveis pela regulação da síntese e liberação de dopamina. A dopamina atua sobre diferentes tipos de receptores, os subreceptores D1, D2, D3, D4, e D5.

Os estudos realizados com animais e seres humanos constataram que a afinidade pelo receptor D2 é o mecanismo que melhor se correlaciona com os efeitos comportamentais dos antipsicóticos. A análise farmacológica dos compostos antipsicóticos clássicos concluiu que essas drogas se caracterizam por antagonizar os receptores D2, embora possam atuar em vários outros receptores. Com isso, estabeleceu-se uma correlação entre a afinidade pelos diferentes receptores e os efeitos terapêuticos e colaterais dos antipsicóticos (Reynolds, 1992). Além disso, o êxito dos antipsicóticos clássicos era restrito aos sintomas positivos, junto a uma parcela considerável de pacientes que não respondiam ao tratamento (Buckley, 1999; Marder & Van Putten, 1995; Tallman, 2000). Assim, iniciou-se a busca de outros antipsicóticos, que promovessem alívio nos sintomas negativos e pudessem auxiliar os pacientes refratários. Essa ação distinta levou a chamar esses novos compostos de antipsicóticos atípicos, em oposição aos clássicos ou típicos (Buckley, 1999).

Entre os antipsicóticos atípicos podemos destacar a clozapina (CLZ). Esse composto é uma dibenzodiazepina que foi desenvolvida em 1961. Esse fármaco é aprovado para o tratamento em casos de esquizofrenia refratária e promove efeitos motores adversos em menor escala se comparada à primeira geração de antipsicóticos como a clorpromazina e haloperidol (Warnez e Alessi-Severini, 2014). Kane e colaboradores (1988) e estudos de metanálises (Breir et al., 1994) salientam que a CLZ é mais eficaz que qualquer outro antipsicótico de primeira ou segunda geração tornando-se a droga de escolha para o tratamento de pacientes refratários (Siskind et al., 2016). Não há dúvidas que a CLZ é uma droga altamente eficaz na prática clínica diária e muitos pacientes que fazem o uso dela a toleram bem e experimentam um notável alívio dos sintomas positivos e negativos, promovendo uma qualidade de vida satisfatória (Orsolini et al., 2016). Esse fármaco tem o perfil de atuar em diversos receptores e, em relação ao sistema dopaminérgico, apresenta maior afinidade pelos receptores dos tipos D1 e D4 do que pelos receptores D2 (Bunney, 1992). Além disso, a CLZ é caracterizada por uma rápida dissociação dos receptores D2, fenômeno responsável pelo efeito antipsicótico mais robusto e menor propensão a causar sintomas extrapiramidais e hiperprolactinemia (Vauquelin et al., 2012). Como citado anteriormente, a múltipla afinidade por receptores pela CLZ também incluem: 5-HT1A, 5-HT1C, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT6, receptores α 1 e α 2 adrenérgicos, H1, H3 histaminérgicos, receptores H4 e receptores muscarínicos M1 e M5 (Sthal, 2014). A afinidade da CLZ, especialmente aos receptores adrenérgicos, histaminérgicos e muscarínicos, podem explicar alguns de seus efeitos adversos, contudo outros efeitos desse tipo não se relacionam ao perfil de antagonizar ou ativar outros receptores (Bastiampillai et al., 2017). Além disso,

algumas populações incluindo idosos e adolescentes podem ser particularmente vulneráveis aos efeitos adversos da CLZ, apesar de sua eficácia comprovada (Bishara e Taylor, 2014). Um dos principais efeitos adversos causados pelo tratamento com CLZ e outros antipsicóticos atípicos como a quetiapina é a agranulocitose e a neutropenia (Li e Cameron, 2012). Pacientes que fazem o uso desses antipsicóticos devem fazer exames de sangue frequentes para a contagem de leucócitos, células importantes para o sistema imunológico e que participam ativamente na maquinaria de defesa do corpo. Além desses efeitos, o ganho de peso e diabetes também podem ser desencadeados pelo uso dessa classe de antipsicóticos (Henderson et al., 2000). Diante do exposto, os antipsicóticos em geral são eficazes no tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia, poucos como a CLZ são efetivos contra os sintomas negativos e não há dados concretos desse grupo de drogas atuando no alívio dos sintomas cognitivos. Dessa forma, a busca por novos fármacos que sejam eficazes no tratamento de todos os grupos os sintomas da esquizofrenia e apresentem um perfil reduzido de efeitos colaterais é de grande importância e interesse por parte da comunidade científica.

Figura 2: Número de internações antes e após a implementação da terapia antipsicótica
- O gráfico revela o número de pacientes esquizofrênicos em centros psiquiátricos antes e após o surgimento dos antipsicóticos. Após a entrada da terapia antipsicótica houve uma drástica queda no número de internações relacionadas com esse transtorno mental. Imagem retirada de <https://www.madinamerica.com>.

1.2 Marcadores biológicos na esquizofrenia

Há uma intensa busca por diferentes marcadores biológicos que potencialmente poderiam auxiliar a compreensão da esquizofrenia, facilitar seu diagnóstico e contribuir com sua evolução terapêutica. Estudo clínico conduzido por Arnold e colaboradores (2015) observou que em pacientes esquizofrênicos há uma diminuição no volume hipocampal, podendo ser um possível biomarcador para essa desordem.

A diminuição da expressão da proteína ácido glutâmico descarboxilase (GAD-67) é consistente em pacientes esquizofrênicos e com transtorno bipolar com psicose, sendo que em animais a expressão dessa enzima é diminuída pela estimulação crônica de receptores dopaminérgicos D2 e pelo bloqueio de curta duração de receptores NMDA (Kalkman e Loetscher, 2003). Estudos já ligaram a disfunção no sistema imunológico com sintomas característicos da esquizofrenia (Jones et al., 2005; Strous e Shoenfeld, 2006). Foi sugerido que o aumento de receptores dopaminérgicos em células T pode estar relacionado com a gravidade dos sintomas em pacientes esquizofrênicos (Brito-Melo et al., 2014).

1.2.1 BDNF: um provável marcador?

As neurotrofinas são uma classe importante de moléculas de sinalização no cérebro responsáveis pelo direcionamento de axônios, crescimento de neurônios, maturação de sinapses durante o desenvolvimento e plasticidade sináptica. Esta família de moléculas inclui o fator de crescimento nervoso (NGF) (Levi-Montalcini, 1966), bem como neurotrofinas 3 e 4 (Hohn et al., 1990). Destes, o BDNF é o melhor caracterizado em termos de seu papel na plasticidade sináptica (Lohof et al., 1993; Levine et al., 1995, 1998; Kossel et al., 2001) atividade e relacionado a diversas doenças psiquiátricas. Ao longo do desenvolvimento, o BDNF atua sinalizando o crescimento axonal de forma adequada (Yoshii e Constantine-Paton, 2010). O BDNF é secretado pelos tecidos-alvo e se liga aos seus principais receptores tirosina quinase B (TrkB) que internalizam-se e sinalizam para o núcleo da célula estimulando o crescimento de neuritos (Yoshii e Constantine-Paton, 2010). Essa neurotrofina é fundamental para o desenvolvimento adequado e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, GABAérgicos, colinérgicos e serotoninérgicos sendo considerado um marcador em doenças neuropsiquiátricas (Pillai e Mahadik, 2008).

O BDNF também desempenha funções essenciais no cérebro maduro na plasticidade sináptica (Poo, 2001) e é crucial para os processos de aprendizagem e memória (Lu et al., 2008). O BDNF e o TrkB estão localizados em neurônios pré e pós-sinápticos, onde o é liberado de maneira atividade celular-dependente. (Waterhouse e Xu, 2009). A sinalização pré-sináptica de BDNF promove a liberação de neurotransmissores, enquanto a sinalização pós-sináptica está envolvida no aumento da função do canal iônico, incluindo o receptor do glutamatérgico ionotrópico NMDA, bem como canais de sódio e potássio (Rose et al., 2004). O BDNF atua tanto nas sinapses excitatórias quanto inibitórias (Kovalchuk et al., 2004), evidências em modelos experimentais sugerem que ele pode modular tanto a atividade neuronal espontânea quanto a estimulada (Schuman, 1999; Tyler et al., 2006).

Tem sido proposto que distúrbios cognitivos e emocionais persistentes, que ocorrem no desenvolvimento alterando a expressão do BDNF, incluindo modificações genéticas, na circuitaria dos sistemas neurotransmissores e ambientais conduzem a perfis patológicos comportamentais e neuronais associadas à esquizofrenia (Durany e Thome, 2004). Estudos *post-mortem* em tecidos de pacientes esquizofrênicos demonstraram alterações no BDNF em regiões cerebrais como CPF e HPC. Nessa direção, esses trabalhos sugerem que a expressão de BDNF está aumentada no córtex de portadores esquizofrênicos em comparação com controles saudáveis (Takahashi et al., 2000), enquanto outros relatam que BDNF e TrkB estão diminuídos nessa mesma região (Weickert et al., 2003; Hashimoto et al., 2005b). Alguns estudos demonstraram níveis aumentados dessa neurotrofina no HPC (Iritani et al., 2003), enquanto outros relatam diminuição do BDNF (Durany et al., 2001). Estudos mostram ainda que o receptor TrkB está diminuído no HPC (Takahashi et al., 2000). Embora esses dados sejam contraditórios é possível que esses efeitos sejam devido à terapia antipsicótica administrada em longo prazo nos pacientes submetidos a esses estudos. De forma independente, esses achados podem sugerir que a esquizofrenia pode estar associada à expressão desequilibrada nos níveis de BDNF em regiões importantes na neurobiologia do transtorno, ou ainda uma manifestação secundária de condições patológicas ou ação do tratamento com antipsicóticos. Nesse contexto, mais estudos são necessários para determinar como a expressão do BDNF pode estar alterada nos pacientes nas etapas iniciais da doença em relação aos pacientes que já fazem o uso da terapia antipsicótica no decorrer dos anos. Estudos de ressonância magnética mostraram que alterações estruturais consistentes são comuns em pacientes esquizofrênicos, incluindo ventrículos aumentados (Boos et al.,

2007) e substância cinzenta reduzida, particularmente no córtex e no HPC (Banaj et al., 2018). Estas descobertas sugerem que a possível desregulação do BDNF durante o desenvolvimento cerebral nos pacientes pode estar associada à redução da massa cinzenta. Vale ressaltar, que outras abordagens produziram dados conflitantes em relação aos níveis de BDNF no soro de indivíduos com esquizofrenia. Alguns detectaram níveis séricos de BDNF diminuídos (Pillai, 2008); outros relatam que não existem diferenças entre indivíduos sadios e portadores da doença (Durany e Thome, 2004). Estudos semelhantes foram conduzidos em pacientes que faziam o uso regular de antipsicóticos, no caso da CLZ, ela parece aumentar os níveis séricos de BDNF, enquanto outros fármacos, como a risperidona, não apresentaram diferenças em relação aos tratamentos controles (Pillai, 2008). Ainda não está claro como os níveis séricos de BDNF se correlacionam com os níveis cerebrais e como é a participação dele nos sintomas da doença. Nesse sentido, estudo de Niitsu e colaboradores (2014) demonstrou uma correlação positiva entre os níveis séricos de BDNF e os sintomas negativos em pacientes esquizofrênicos. Ainda, outro estudo descreveu que os níveis séricos de BDNF estão diminuídos no primeiro episódio de psicose em portadores dessa doença (Toll e Mané, 2015).

1.2.2 A deficiência do processamento de informações na esquizofrenia

O prejuízo no processamento de informações, embora não seja exclusivo da esquizofrenia, também pode ser utilizado como um marcador biológico (Swerdlow et al., 2015), além de ser uma ferramenta importante para a busca de novos fármacos no campo pré-clínico, uma vez que é um modelo translacional e preditivo para a ação de antipsicóticos. Embora não seja possível reproduzir totalmente as complexas manifestações dos distúrbios psiquiátricos nos modelos animais (Marcotte et al., 2001), algumas estratégias experimentais reproduzem sintomas característicos da esquizofrenia, como é o caso desse modelo (Weiss e Feldon, 2001). Na prática, o prejuízo no processamento de informações é revelado pelo prejuízo na inibição do reflexo de sobressalto, teste denominado de inibição pré-pulso (do inglês prepulse inhibition - PPI). O reflexo de sobressalto é uma resposta natural de defesa, incontrolável e espontânea, que envolve uma rápida contração dos músculos da face e do corpo em resposta a um estímulo sensorial intenso e inesperado auditivo, visual ou tátil (Weiss e Feldon, 2001). A inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto foi descrita em humanos por Graham (1975) e consiste

na diminuição da resposta de sobressalto a um estímulo intenso (pulso) quando este é precedido imediatamente (30-500ms) por um estímulo mais fraco (pré-pulso). A redução do reflexo de sobressalto pode ser considerada como uma medida operacional do processamento de informações (figura 3) através do qual o organismo filtra informações excessivas (Hoffman e Ison, 1980). Em algumas doenças psiquiátricas, como é o caso da esquizofrenia, do transtorno obsessivo compulsivo, da desordem do pânico e mania, além das doenças de Huntington e Tourette, pode ocorrer deficiência desse processamento (Geyer e Heinssen, 2005). Experimentalmente, agonistas dopaminérgicos diretos, drogas que intensificam a neurotransmissão dopaminérgica, antagonistas de receptores de glutamato, agonistas de receptores serotoninérgicos e/ou drogas que induzem liberação de serotonina prejudicam o PPI (Hutchison e Swift, 1999; Geyer et al., 2001; Winslow et al., 2001). Por sua vez, drogas antipsicóticas como o haloperidol, a CLZ e a risperidona impedem e/ou reverterem prejuízo no teste de PPI (Geyer et al., 2001). Considerando que esse é um fenômeno observado em diferentes espécies, que requer parâmetros similares tanto em humanos quanto em roedores, o teste de PPI constitui uma estratégia experimental importante utilizada para a investigação de distúrbio no processamento de informações, com caráter preditivo para efeito do tipo antipsicóticos (Weiss e Feldon, 2001). Em roedores, a habilidade de drogas em antagonizar efeitos comportamentais de drogas psicotomiméticas, como a estereotipia, hiperlocomoção, diminuição da interação social e prejuízo no teste de PPI, é preditiva de atividade do tipo antipsicótica e assim, permitindo explorar e investigar o potencial terapêutico de novas substâncias junto aos seus prováveis mecanismos de ação (Lipska e Weinberg, 2000; Iversen, 1987; Kilts, 2001). Enquanto o reflexo de sobressalto é mediado por estruturas do tronco encefálico, a inibição desse reflexo é regulada de maneira complexa por estruturas prosencefálicas como o HPC, a amígdala, o NAC e o CPF (Zhang et al., 2000; Lacroix et al., 2000; Swerdlow et al., 2001). Uma vez que a esquizofrenia engloba conjuntos de sintomas diversos é relevante a investigação de mecanismos farmacológicos e moleculares específicos nas estruturas encefálicas envolvidas na fisiopatologia da doença.

Figura 3: Esquema simplificado do mecanismo de inibição pré-pulso (PPI). O PPI é caracterizado por uma redução na amplitude de sobressalto que ocorre em resposta a um estímulo auditivo intenso, quando este é precedido imediatamente (30-500ms) por um estímulo também sonoro, porém mais fraco (pré-pulso). Drogas que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica (exemplo: ANF) e antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (exemplo: MK-801) prejudicam a redução na amplitude de sobressalto mesmo com a apresentação do pré-pulso.

1.3 *Cannabis sativa* e seu Potencial Farmacológico

A *Cannabis sativa* é uma planta utilizada com diferentes finalidades desde o início das civilizações para fins medicinais, recreativos, produção de tecidos e resinas. A planta é dioica, apresentando os gêneros macho e fêmea. Com o passar do tempo o uso rotineiro da *Cannabis* foi sujeito a sanções sociais e legais devido aos seus efeitos psicotrópicos e potencial de abuso. Entre os mais de 500 compostos presentes na planta, estão os fitocanabinoides, que totalizam mais de 100 compostos, destacando os mais abundantes: canabinol, o canabidiol (CBD) e o delta 9-THC. Os fitocanabinoides (figura 4) ocorrem na folhas do gênero feminino em glândulas de resina chamados de tricomas (Nature Outlook, 2015). O delta 9-THC atua por ativar receptores denominados de CB1 e CB2. O primeiro é encontrado no SNC e em nervos periféricos e é responsável pelos efeitos subjetivos observados com o delta 9-THC (Howlett et al., 2002). O segundo está localizado na periferia, particularmente, em células do sistema imunológico. Contudo, recentemente os receptores CB2 foram também descritos no SNC (Pertwee, 2008). O CBD representa o maior constituinte não psicotomimético da *Cannabis sativa* e é capaz de antagonizar os efeitos ansiogênicos e psicotomiméticos de altas

doses do delta 9-THC (Zuardi et al., 1982; 2006) As substâncias endógenas que interagem com os receptores CB1 e CB2 foram chamadas de endocanabinoides, o primeiro a ser descoberto foi a anandamida (AEA), sendo o termo “ananda” oriundo do sânscrito, que significa felicidade serena (Devane et al., 1992), o segundo foi o 2-aracdonil-glicerol (2-AG) descoberto por Mechoulam e colaboradores (1995) e outros logo em seguida (Pacher et al., 2006). O sistema endocanabinoide, que inclui os receptores canabinoides e seus ligantes endógenos, além dos mecanismos de síntese e inativação dos endocanabinoides, possui a habilidade de modular vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, como exemplos: (i) a liberação de neurotransmissores no SNC e periférico, (ii) a percepção da dor e (iii) as funções cardiovascular, gastrointestinal e hepática. Dessa maneira, esse sistema representa um alvo potencial da farmacoterapia moderna Di Marzo, 2008).

Figura 4: Glândulas de resina presentes em folhas do gênero feminino da *Cannabis sativa* e um quadrodiluído dos principais componentes encontrados nessa planta. Retirado de <https://www.nature.com/articles/525S2a>.

1.3.1 Perfil Antipsicótico do CBD

Uma vez que o tratamento com antipsicóticos não aliviam todos os sintomas da esquizofrenia e também causam sérios efeitos indesejados é de grande relevância a busca e exploração por novos fármacos e de sistemas neurotransmissores que possam participar da fisiopatologia da esquizofrenia.

Diante dessa premissa, o CBD é um fitocanabinoide ativo encontrado em altas concentrações em preparações de extratos de *Cannabis sativa* (cerca de 40%). Esse composto apresenta um grande potencial terapêutico no tratamento de diversas condições, como certos tipos de epilepsia e em um possível tratamento em estados de psicose (Pertwee, 2008).

A primeira evidência de que o CBD poderia apresentar propriedades do tipo antipsicóticas foi obtida pela observação de que os efeitos subjetivos semelhantes aos observados nas psicoses em voluntários sadios pelo delta 9-THC, como a desfragmentação do pensamento, alterações da percepção e resistência à comunicação, poderiam ser inibidos pelo CBD (Zuardi et al., 2006). No mesmo ano, pacientes de um hospital psiquiátrico na África do Sul, após a utilização de uma variedade de *Cannabis* praticamente desprovida de CBD, apresentaram maior frequência de episódios psicóticos agudos (Rottanburg, 1982). Estudos pré-clínicos do nosso grupo de pesquisa revelaram o potencial antipsicótico do CBD em prejuízo induzido por ANF no teste de PPI (Pedrazzi et al., 2015) e MK-801 (Gomes et al., 2014). Adicionalmente, foi observado que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam alterações comportamentais que incluem prejuízo no PPI, que são revertidas pela CLZ e CBD (Levin et al., 2012). A tabela 1 e 2 respectivamente apresentam um sumário dos efeitos do CBD obtidos em modelos experimentais preditivos para ação de antipsicóticos e seus efeitos em ensaios clínicos com pacientes esquizofrênicos. Adicionalmente, Malone e colaboradores (2009) demonstraram que o CBD foi capaz de reverter a diminuição da interação social em ratos causada por baixas doses de delta-9-THC. Em concordância com essas observações, o CBD, semelhante à CLZ, reverte a hiperatividade e o prejuízo da interação social em ratos, provocados por MK-801 (Gururajan et al., 2012). Recentemente um estudo conduzido em 88 pacientes com esquizofrenia, o CBD foi administrado durante 6 semanas junto a medicação antipsicótica usual, como um adjuvante. O estudo concluiu que a adição do CBD no tratamento reduziu os sintomas da esquizofrenia sem induzir eventos adversos graves (GW Pharmaceuticals).

Tabela 1: Efeito do CBD em diferentes modelos experimentais de sintomas da esquizofrenia.

Estudo	Espécie	Dose de CBD	Resultados	Referências
Estereotipia induzida por apomorfina	Ratos	60 mg/kg	Redução	Zuardi et al., 1991
Expressão de C-Fos	Ratos	120 mg/kg	Aumento da expressão no NAC	Guimarães et al., 2004
Hiperlocomção induzida por ANF	Camundongos	30-60 mg/kg	Redução	Guimarães et al., 2005
Prejuízo induzido por MK-801 no teste de PPI	Camundongos	5 mg/kg	Redução	Long et al., 2006
Prejuízo na interação social induzido por delta-9-THC	Camundongos	20 mg/kg	Redução	Malone et al., 2009
Prejuízo na interação social e hiperlocomção induzida por MK-801	Camundongos	3 mg/kg	Redução	Gururajan et al., 2012
Prejuízo no PPI em linhagem SHR	Ratos	30 mg/kg	Redução	Levin et al., 2014
Prejuízo no reconhecimento de objetos e interação social induzido por MK-801	Camundongos	30-60 mg/kg	Redução	Gomes et al., 2015
Prejuízo induzido por ANF no PPI	Camundongos	30-60 mg/kg	Redução	Pedrazzi et al., 2015

Tabela 2: Efeito do CBD sobre sintomas associados à fisiopatologia da esquizofrenia.

Estudo	Indivíduos	Dose CBD	Resultados	Referências
Estudo de Caso	Um indivíduo	1200 mg/dia	Melhora dos sintomas	Zuardi et al., 1995
Estudo de Caso	Três pacientes resistentes ao tratamento convencional	40 – 1280 mg/dia	Melhora leve em um dos pacientes	Zuardi et al., 2006
Estudo de Caso	Seis pacientes com psicose associada a Doença de Parkinson	150 mg/dia	Melhora significativa	Zuardi et al., 2009
Estudo de Caso	Dois pacientes com Transtorno Bipolar	600 - 1220 mg/dia	Nenhuma melhora dos sintomas	Zuardi et al., 2010
Estudo duplo-cego randomizado CBD X Amisulprida	42 pacientes esquizofrênicos com paranoia aguda	800 mg/dia de CBD ou Amisulprida	Melhora clínica significativa de ambos os tratamentos. CBD causou menores efeitos colaterais	Leweke et al., 2012
Estudo duplo-cego randomizado CBD X Placebo	Primeiro episódio de esquizofrenia paranoide	600 mg/dia	Melhora dos sintomas psicóticos	Leweke et al., 2013
Estudo duplo-cego randomizado CBD X Placebo	43 Pacientes esquizofrênicos ou com transtorno psicótico relacionado	1000 mg/dia ou placebo em duas doses	Melhora significativa nos sintomas positivos e melhor desempenho cognitivo e funcionamento geral	McGuire et al., 2018

O CBD aparentemente produz efeitos antipsicóticos sem produzir efeitos extrapiramidais, que representam efeitos colaterais dos antipsicóticos típicos, como Parkinsonismo farmacológico, distonia aguda, tremor perioral e discinesia tardia (KANE, 2001). Neste sentido o CBD assim como o antipsicótico atípico CLZ, aumenta a expressão da proteína c-Fos no NAC, mas não em regiões motoras como o estriado dorsal, característica dos antipsicóticos típicos como o haloperidol, provavelmente relacionada com as manifestações motoras adversas dessa classe de antipsicóticos (Guimarães et al., 2004). Essa observação indica que o CBD produz ativação neuronal na via mesolímbica e provavelmente, menor potencial para os efeitos motores indesejáveis, mais uma vez corroborando o provável perfil atípico desse composto (Zuardi, 2008).

1.3.2 Mecanismo de ação do CBD

Ainda há poucos estudos que investigaram os mecanismos farmacológicos, celulares e moleculares envolvidos no perfil antipsicótico do CBD. Estudo conduzido por Bhattacharyya e colaboradores (2012) demonstrou que o CBD exerce efeitos opostos aos do delta-9-THC sobre a ativação do estriado, CPF e córtex temporal medial. Esses mecanismos podem contribuir com os efeitos da *Cannabis sativa* sobre os sintomas psicóticos e com a habilidade do CBD em antagonizar os efeitos do delta-9-THC. É provável que o CBD não atue somente em receptores específicos tal como o delta-9-THC. O CBD é capaz de facilitar a sinalização dos endocanabinoides através da inibição da recaptação celular de anandamida e sua hidrólise enzimática pela amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), porém, em oposição ao delta-9-THC apresenta baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2. (Thomas, 1998; Petit, 1998). O CBD pode ativar um canal iônico denominado receptor vaniloide com potencial transitório 1 TRPV1 (Bisogno, 2001) e aumentar a sinalização mediada pela adenosina através da inibição de sua receptação (Carrier et al., 2006). Estudo conduzido por Long e colaboradores (2006) observou que o efeito do CBD na atenuação do prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801 foi bloqueado pelo tratamento com capsazepina (CPZ), um antagonista do receptor TRPV1, contudo não são conhecidos os efeitos do bloqueio de receptores TRPV1 sobre os efeitos do CBD em modelos baseados na hiperfunção dopaminérgica. Os receptores TRPV1 são denominados receptores vaniloides pelo fato de seu principal agonista, a capsaicina, a resiniferatoxina (RTX), possuírem em sua estrutura química o grupamento homovanilil (Szalassi e Blumberg, 1999). Esses canais estão expressos em regiões cerebrais relacionadas

ao processamento de informações, tais como o córtex, hipocampo (HPC), amígdala central, estriado, hipotálamo, substância negra, formação reticular e cerebelo (Szalassi e Blumberg, 1999; Mezey, 2000). A anandamida é um agonista endógeno (Devane et al., 1992) de receptores TRPV1 expressos em terminais nervosos pós-sinápticos (Brown, 2007). É sugerido que a propriedade antipsicótica do CBD esteja relacionada à sua habilidade de aumentar a disponibilidade de anandamida (Izzo, 2009; Schubart et al., 2013). Em estudo conduzido por Leweke e colaboradores (2012) foi observado que os pacientes tratados com CBD apresentaram maiores níveis séricos de anandamida, associados com a melhora dos sintomas clínicos. Em modelos animais de psicose, a ação farmacológica do bloqueio da degradação de anandamida atenua o comportamento induzido por ANF e fenciclidina (Seillier et al., 2010). Dessa maneira, o uso de inibidores da FAAH podem ser de grande interesse como um possível tratamento da esquizofrenia, e alvo para o entendimento do mecanismo de ação do CBD. Existem evidências de que o CBD possa agir sobre outros alvos, além do sistema endocanabinoide. Estudos demonstram que o CBD parece apresentar propriedades agonísticas nos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} (Russo et al., 2005; Gomes et al., 2012), sendo que a interação parece estar envolvida em sua ação ansiolítica (Campos e Guimarães, 2008; Resstel et al., 2009). Há evidências relevantes do papel dos receptores 5HT_{1A} em doenças psiquiátricas como a esquizofrenia; exemplo conhecido é que antipsicóticos atípicos possuem afinidade por esses receptores (Burnet et al., 1996; Newman-Tancredi et al., 2010). Estudos post-mortem revelaram expressão alterada de receptores 5-HT_{1A} em pacientes com esquizofrênia (Bantick et al., 2001). É sugerido que as propriedades dos agonistas 5-HT_{1A} melhoram os sintomas negativos e déficits cognitivos pelo estímulo e liberação de dopamina no CPF (Ichikawa e Meltzer, 2000).

1.4 A investigação e atuação de drogas com perfil antipsicótico na participação de mecanismos epigenéticos na esquizofrenia

Na década de 40, Conrad Hal Waddington buscava explicar como distintos tipos celulares poderiam ser gerados a partir de células contendo o mesmo genoma. Waddington acreditava que os genes eram importantes para determinar o desenvolvimento do organismo, mas que algumas modificações poderiam ocorrer alterando o desenvolvimento normal, e a isso ele chamou de embriologia causal ou “epigenética” (Slack, 2001). Diferentes fenótipos celulares seriam resultantes da interação entre genes e ambiente. Atualmente a epigenética é compreendida como o modo pelo qual as experiências e o ambiente podem acarretar

alterações estáveis na estrutura da cromatina, alterando a expressão gênica e a codificação de proteínas, sem que haja alterações na sequência de bases do DNA (Holliday, 2006). Tem sido proposto que mecanismos epigenéticos promovam efeitos de longa duração em neurônios maduros, podendo assim interferir com mecanismos neurais complexos, tais como a plasticidade e a neurogênese (Tsankova et al., 2007). De fato, a remodelação da cromatina decorrente de alteração epigenética modula a expressão gênica na medida em que o aumento (heterocromatina) ou diminuição (eucromatina) da condensação da cromatina dificulta ou facilita, respectivamente, o acesso da maquinaria transcricional a regiões promotoras específicas, resultando em mudança nos níveis de RNA mensageiro e de proteínas expressas (Tsankova et al., 2006, 2007; Krishnan e Nestler, 2008). Recentemente, as modificações epigenéticas foram relacionadas à neurobiologia de doenças psiquiátricas (Tsankova et al., 2007). Os estudos relacionados aos transtornos mentais focam dois mecanismos principais: acetilação de histonas e metilação do DNA.

As histonas estão intimamente relacionadas com o padrão de expressão gênica, tanto a fosforilação da histona H3, quanto a acetilação de histona H3 e H4 estão associados com o aumento da expressão gênica (Berger, 2001). A metilação do DNA (figura 5) consiste na adição de um radical metil ao carbono 5 da citosina em dinucleotídeos citosina-fosfatoguanina (CpGs), catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Evidências sugerem que a metilação do DNA contribui para a regulação da expressão gênica, neurodesenvolvimento e na fisiopatologia de doenças do cérebro (Abdolmaleky, et al., 2004; Cedar e Bergman, 2009). O papel do epigenoma na etiologia da esquizofrenia tem sido investigado há mais de 60 anos (Osmond e Smythies, 1952). Estudo de Pollin e colaboradores (1961) observaram que a administração crônica de L-metionina, um doador de radical metil e o precursor de metionina S-adenosil, conhecido pelos seus efeitos antidepressivos, exacerbava os sintomas psicóticos em pacientes esquizofrênicos, o que proporcionou uma forte evidência para “hipótese de transmetilação” da psicose (Pollin, et al., 1961). Posteriormente, estudos em pacientes esquizofrênicos demonstraram alterações na metilação do DNA em leucócitos (Shimabukuro et al., 2007) e aumento da expressão de DNMTs em interneurônios GABAérgicos no CPF (Zhubi et al., 2009).

Durante a diferenciação celular e desenvolvimento as alterações na metilação do DNA desempenham um papel chave nas modificações epigenéticas. Evidências sugerem que a hipermetilação, normalmente está relacionada à inibição de expressão de determinado gene, esse efeito é controlado pelas DNMTs, que estão amplamente expressas no cérebro (Baylin et al., 2001; Herman e Baylin, 2003; Noh et al., 2007). É bem estabelecido que a hipometilação

em regiões gênicas promotoras podem resultar em sua ativação e consequente síntese proteica. Além disso, há observações que a hipermetilação de citosinas dentro de ilhas CpG está ligada à transcrição reduzida de genes no cérebro (Jones e Takai, 2001). O DNA hipometilado desempenha um papel na farmacologia dos antipsicóticos. Por exemplo, estudos demonstram que vários derivados da dibenzepina, tais como a CLZ, quetiapina e olanzapina, mas não das butiferas, como o haloperidol, induzem a remodelação da cromatina e ativam a demetilação do DNA em regiões promotoras de genes associados à neurotransmissão GABAérgica (Dong et al., 2008). A natureza das doenças psiquiátricas sugere uma via comum que pode estar envolvida na baixa regulação de múltiplos genes através de mecanismos epigenéticos. Dessa forma, o epigenoma vem sendo considerado um possível alvo farmacológico para o tratamento de diversas doenças (Boyadjieva e Varadinova, 2012). Esses estudos fortalecem a ideia de que o SNC possui mecanismos controlados epigeneticamente, que afetam a regulação da expressão de genes envolvidos na modulação de processos emocionais, cognitivos e seus distúrbios correlacionados, de modo que a desregulação desses mecanismos, em uma ou mais região encefálica, pode contribuir para a fisiopatologia de diversas doenças, inclusive a esquizofrenia. Nesse sentido, é crescente o número de estudos investigando a relação entre a esquizofrenia e os mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e a possibilidade de que drogas com ação antipsicótica sejam capazes de modular tais mecanismos, resultando no efeito comportamental desejado (Abdolmaleky et al., 2004). Estudos anteriores sugerem que a anandamida produz efeitos através de mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA (Paradisi et al., 2008. Pasquariello et al., 2009) e que ela, via receptor CB1, induz aumento da atividade das enzimas DNMTs e consequentemente da metilação do DNA em genes associados à diferenciação de queratinócitos (Paradisi et al., 2008). Estudo publicado em 2013 demonstrou que o CBD é capaz de modular a diferenciação celular na pele, e de forma pioneira, foi sugerido que sua ação esteja relacionada à metilação do DNA (Pucci et al., 2013). Modificações epigenéticas causadas por drogas de abuso desempenham um papel importante na plasticidade neuronal e nas respostas comportamentais (McCowan et al., 2015). Mychasiuk e colaboradores (2013) demonstraram aumento da metilação global no CPF e NAC em ratos tratados cronicamente com ANF. Essas alterações se estenderam ao padrão de metilação/expressão em 4 genes do CPF e 13 do NAC.

Adicionalmente, estudo conduzido em 2016 por Todd e colaboradores, demonstrou que a coadministração de CBD e delta-9-THC induz alterações na expressão de histona-acetilase 3 (H3K9/14ac) na ATV de forma sinérgica. Vale ressaltar, que a acetilação da

histona 3 na via mesolímbica está relacionada com as propriedades de abuso de drogas psicotomiméticas (Kumar et al., 2005), fato pouco explorado com compostos canabinoides. Diante do exposto, até o momento, não foi investigado se o modelo de prejuízo no processamento de informações induzido por alteração da neurotransmissão dopaminérgica ou glutamatérgica apresenta componentes epigenéticos e se eventuais alterações são modificadas por drogas com perfil antipsicótico.

Figura 5: Esquema simplificado da metilação do DNA. O processo ocorre com a adição de um radical metil ao carbono 5 de um nucleotídeo de citosina catalisada pela enzima DNMT.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Deste estudo foi investigar os prováveis mecanismos de ação do CBD, explorando sua farmacologia e os possíveis mecanismos moleculares envolvidos com seu perfil antipsicótico em modelos preditivos para ação dessas drogas.

2.2 Objetivos específicos

1. avaliar a participação dos receptores vaniloides TRPV1, receptores do sistema serotoninérgico do tipo 5-HT1A, da inibição da hidrólise enzimática da anandamida nos efeitos obtidos pela aplicação sistêmica de CBD sobre a hiperlocomoção e o prejuízo induzido no teste de PPI pela ANF;
2. avaliar a participação do CPF nos efeitos do CBD no prejuízo induzido pela ANF no teste de PPI;
3. avaliar a expressão de p-AcH3 (fosfo-histona acetilada) em regiões límbicas, após as interações entre o CBD e ANF nos animais submetidos ao teste de PPI.
4. avaliar a metilação global do DNA em estruturas cerebrais como CPF e estriado ventral, após as interações entre o CBD e ANF e CBD e MK-801 nos animais submetidos ao teste de PPI.
5. avaliar a expressão de BDNF no HPC, após as interações entre CBD e ANF e CBD e MK-801 nos animais submetidos ao teste de PPI.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Suíços machos (25-30 gramas) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto. Todos os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (ciclo de luz às 7 horas da manhã). Foram alimentados com dieta padrão do biotério e livre acesso à água e mantidos em grupos de aproximadamente cinco animais por caixa. Foram respeitados todos os critérios de ética em experimentação animal. Todos os procedimentos descritos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP, número de protocolo 2015.1.143.58.6).

3.2 Drogas

Para o tratamento farmacológico foram realizadas administrações sistêmica intraperitoneal das seguintes drogas:

- 1) Anfetamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), uma substância psicotomimética estimulante do sistema nervoso central, diluído em solução de NaCl 0,9% estéril.
- 2) Capsazepina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), um antagonista do receptor vanilóide TRPV1, dissolvida em Tween 80 1%/etanol 1%/ solução de NaCl 0,9% estéril.
- 3) Canabidiol (Hebrew University, Jerusalem, Israel), um fitocanabinoide, dissolvido em Tween 80 2%/solução de NaCl 0,9% estéril.
- 4) WAY100635 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, diluído em solução de NaCl 0,9% estéril.
- 5) URB597 (Calbiochem, USA), um inibidor seletivo da enzima FAAH, diluído em Tween 80 2%/ solução de NaCl 0,9% estéril.
- 6) Araquidonoil Serotonina (AA-5-HT) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), composto com perfil simultâneo de inibir a hidrólise e recaptação de anandamida e antagonizar receptores TRPV1, diluído em 10% DMSO e 90% NaCl 0,9% estéril.
- 7) Clozapina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), um antipsicótico atípico diluído em solução NaCl 0,9% estéril e 0.5% de ácido glacial acético (v/v).

Para o tratamento sistêmico a via de administração foi intraperitoneal (i.p.; 10ml/kg). O canabidiol (30 ou 60nmol; 0.2 μl) para injeção no córtex pré-frontal foi diluído em óleo de semente de uva (volume total).

3.3 Avaliação do Comportamento

3.3.1 Teste de campo aberto

A atividade locomotora foi registrada e analisada com o auxílio do Software Any-Maze (Stoelting, USA) por meio da observação da distância total percorrida (cm) e da velocidade média empregada (cm/s). O comportamento do animal posicionado em uma arena de acrílico de 40 cm de diâmetro foi filmado durante 10 minutos por meio de uma câmera de vídeo posicionada em um tripé. Foi utilizada iluminação de baixa intensidade durante o experimento.

3.3.2 Teste de PPI

Foram utilizadas duas caixas de sobressalto que consistem em gaiolas de barras de aço inoxidável com dimensões internas de 25x9x9cm, suspensas em uma armação de PVC - ENV-262A Med Associates (MA). Cada uma dessas gaiolas é abrigada em uma caixa maior (64 x 60 x 40 cm) fabricada em madeira com atenuação acústica (ENV-018S MA). A resposta de sobressalto do animal gera uma pressão nesta plataforma que é captada por sensores e amplificada (PHM 250-60, amplificador MA) gerando um sinal analógico que é digitalizado e analisado por um programa computacional (Startle Reflex, versão 4.10 MA) que representará graficamente os sinais dessa resposta. A apresentação dos estímulos, duração, intensidade e amplitude também foram computadorizadas através de uma interface 729 - MA. A resposta do sobressalto foi medida durante os primeiros 200ms após a apresentação do estímulo de sobressalto. O teste de inibição pré-pulso é composto por três etapas: A) Aclimação: Período de 5 minutos, durante o qual nenhum estímulo é apresentado. Consiste na manutenção do animal na gaiola de aço ou cilindro acrílico onde o teste é realizado, com ruído de fundo (background) pré-estabelecido; B) Habituação: Após a aclimação é realizada a habituação ao estímulo de sobressalto e determinação da linha de base, por meio de 10 apresentações do pulso com intervalo entre os estímulos de 30s. O objetivo desta etapa é a estabilização da resposta de sobressalto ao pulso. C) Inibição da resposta de sobressalto ao pulso (PPI): Essa etapa é composta por apresentações aleatórias dos diferentes estímulos que compõem o teste: (1) pulso (P; 105 dB de ruído branco, duração de 20ms), (2) pré-pulso (PP; 80, 85 ou 90 dB de som puro, frequência de 7000 Hz, duração de 10ms), (3) pré-pulso seguido de pulso (PP+P) com 100ms de intervalo entre eles e (4) nulo. Durante essa sessão os

estímulos são apresentados em intervalos regulares de 30 segundos, sendo 20 de cada categoria. Geralmente, o PPI é expresso como a porcentagem de inibição da amplitude do sobressalto em resposta a múltiplas apresentações do pulso precedido pelo pré-pulso, em função da amplitude da resposta apenas ao pulso, o que é expresso na seguinte fórmula: $\%PPI = [100 - (PP + P/P) * 100]$.

3.4 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula no CPF

Os camundongos foram anestesiados com uma associação de ketamina e xilazina com concentração final de 70% de ketamina (70mg/kg) e 30% de xilazina (30mg/kg), 1.5 ml/kg i.p. Para implantação de cânula no CPF foram utilizadas as seguintes coordenadas retiradas do atlas de Franklin e Paxinos (1997): ântero-posterior: +2.1 mm; lateral $\pm$ 0.3 mm e profundidade de -2.3 mm a partir da dura. A cânula foi fixada ao crânio por meio de capacete confeccionado com resina acrílica odontológica. Um mandril foi colocado no interior de cada cânula para prevenir obstruções. Os animais receberam antibiótico durante os 7 primeiros dias pós-cirúrgicos. O antibiótico foi preparado utilizando-se 5 g de amoxicilina 250 mg (Uni-Amox – União Química) dissolvida em 1 litro de água filtrada, mantida nos bebedouros e trocada diariamente.

3.5 Congelamento e processamento dos tecidos para localização de cânula e imunohistoquímica

Após os testes de PPI os animais foram anestesiados com dose letal da associação ketamina e xilazina e submetidos à perfusão intracardíaca. Essa técnica tem a finalidade de remover o sangue dos tecidos bem como fixá-los, evitando que ocorram autólise e comprometimento das estruturas a serem analisadas. Foi realizada a infusão lenta de uma solução fosfato-salina (PBS) a 0.01M com pH 7.4 seguida do fixador paraformaldeído (PFA 4%) em tampão fosfato (PB 0.1 M; pH 7.4). Após extração, os encéfalos foram mantidos no fixador (PFA 4%) por duas horas e crioprotetidos com sacarose 30% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 durante 48 horas a 4°C, sendo em seguida congelados com isopentano à -40°C. Depois de devidamente identificados os tecidos foram mantido no *freezer* -20°C. Os cortes histológicos (30 μ m) foram obtidos em criostato (Leica®, modelo CM1850) e montados em lâminas previamente gelatinizadas.

3.6 Reação imunohistoquímica para o marcador molecular fosfo-histona acetilada (p-AcH3)

Resumidamente, em tecido fixado, procede-se: Enxágue 1: lavagem das secções 3X5min., em Tampão A (PBS 0,1M + Triton 0,15%, pH 7.4) –Bloqueio 1 da atividade a enzima peroxidase - 13 - endógena: incubação em Tampão A contendo H₂O₂ %, durante 20 min. Enxágue 2: lavagem das secções 4X5min, em Tampão. Bloqueio 2 com BSA 5% + Tampão A + soro chicken 5%. Enxágue 3: lavagem das secções 1X5 min., em Tampão A. Incubação do anticorpo primário: fosfo-histona acetilada (anti-p-AcH3; 1:2000) diluídos em Tampão A, durante 18 horas, sob agitação. Enxágue 4: lavagem das secções 3X5min., em Tampão A. Para aumentar a visualização da ligação foi empregado o método de marcação indireta. O tecido foi incubado por 90 minutos com o anticorpo secundário dirigido contra a região constante do anticorpo primário (uma anti-IgG de coelho, Vectastain, Vector Laboratories) na concentração de 1:400, diluído em Tampão A, que carrega um marcador, a Biotina. Enxágue 5: lavagem das secções 3X5min., em Tampão A. Para eliminar o excesso de anticorpos e aqueles ligados inespecificamente. Após enxágue o tecido foi incubado com o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (soluções A e B Vectastain, Vector Laboratories) por 2h, sob agitação. Desta forma, o complexo Avidina/Biotina se liga a moléculas de Biotina do anticorpo secundário amplificando a marcação. Enxágue 6: lavagem das secções 3X5min., em Tampão A e lavagem das secções 3X5., em Tampão de acetato de sódio. Após o enxágue, foi utilizado método colorimétrico para revelação da atividade da peroxidase usando o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) em meio contendo H₂O₂ 3% e níquel, em tampão acetato de sódio, por 3 minutos. Posteriormente, os cortes foram montados em lâminas e submetidos a uma série de concentração crescente de álcoois para a desidratação do tecido (75,95 e 100%, 100% + xilol, 3min. cada) sendo diafanizados a seguir em xilol.

3.7 Quantificação dos núcleos neuronais marcados pela imunohistoquímica p-AcH3

As imagens foram obtidas com câmera fotográfica Leica® (DFC420) acoplada a um microscópio da mesma procedência. O programa utilizado para avaliação da densidade de neurônios marcados foi o “NIH Image” 1.60, desenvolvido pelo U.S. National Institutes of Health, de domínio público (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Foi realizada a contagem automática do número de células marcadas positivamente para o marcador em três regiões aleatoriamente selecionadas, em cada estrutura, em duas ou três secções adjacentes. Foram

obtidas médias das três leituras realizadas em cada secção e posteriormente das secções adjacentes analisadas. Para o NAC foram analisadas secções representativas do intervalo que compreende os plates 15-25, para o estriado dorsolateral os plates 18-30 e para o CPF os plates 13-19 (baseado em Atlas de Franklin e Paxinos, 1997). A análise foi realizada com a objetiva de 20X e a leitura foi realizada em uma área fixa de $382 \times 286 \mu\text{m}$. Os dados obtidos foram normalizados para uma área de 0.1 mm^2 . Representações das áreas analisadas são fornecidas na figura 6.

Figura 6: Regiões selecionadas do cérebro de camundongo para a quantificação de p-Ach3. As áreas evidenciadas na figura exemplificam locais selecionados para a quantificação do marcador fosfo-histona acetilada (p-Ach3). A análise foi realizada em objetiva 20X e a área selecionada foi de $382 \times 286 \mu\text{m}^2$. Na figura estão representados uma porção rostral do estriado dorsolateral (EDL) uma porção caudal para o NAC e uma porção caudal para o CPF (PFC), (Bregma 1.54 mm). Imagem adaptada de Franklin e Paxinos, 2001.

3.8 Coleta de tecidos e análise da metilação global do DNA

Imediatamente após o teste de PPI os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 5% (10 ml/kg) e decapitados em seguida. As estruturas encefálicas (CPF e estriado ventral) foram dissecadas homogeneizadas em tampão RIPA (Tris-HCl 50mM pH 8,0; NaCl 150 mM, EDTA 2mM pH 8,0; NP-40 1%; deoxicolato de sódio 0.5%; SDS 0.1%) complementado com inibidor de protease (10% v/v; #P2714, Sigma-Aldrich) e armazenadas em -80°C até o momento da análise. O DNA foi extraído utilizando o kit AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep (APMN-BL-GDNA-50; Axygen Biosciences, USA) de acordo com instruções do fabricante. O DNA purificado foi digerido com a enzima Nuclease P1 (#P2640, Sigma-Aldrich; 2 U/μg de DNA, 4 h a 65°C em tampão acetato 20 mM pH 5.3) e com a enzima fosfatase alcalina (#N7640, Sigma-Aldrich; 0,3 U/μg de DNA, 2 h a 65°C em Tris-HCl 20 mM pH 7.5). O DNA foi precipitado com etanol e NaCl 5 M a -20°C, por no mínimo 48 h. Em seguida foi centrifugado a 4°C, 10000 g por 15 min. O pellet foi ressuspendido em água ultra pura. Em seguida, foi realizada a leitura da quantidade de DNA total pelo leitor de placas SpectraMax 190 (versão 6.2.1, Molecular Devices, Sunnyvale, CA; absorvância de 280/260 nm) e as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. O DNA metilado purificado foi quantificado pelo kit DNA Methylation EIA (#589324, Cayman Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. A absorvância produzida pelo ensaio foi medida pelo leitor de placas SpectraMax 190 190 (versão 6.2.1, Molecular Devices, Sunnyvale, CA; absorvância de 280/260 nm). Diversas concentrações de 5-metil-2'-deoxicitidina foram utilizadas para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos como citidina metilada/ DNA total (pg/ng).

3.9 Coleta de tecidos e dosagem dos níveis de BDNF (ELISA)

Imediatamente após o teste de PPI os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 5% (10 ml/kg) e decapitados em seguida. Uma alíquota do HPC triturado foi homogeneizada em 100μL de tampão de lise (20mM Tris-HCL; pH 8.0; 137mM NaCl; 10% glycerol; cocktail inibidor de protease, P2714, Sigma), centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4 °C, após esta etapa o sobrenadante foi coletado. O conteúdo de BDNF foi avaliado utilizando o kit de ELISA (BDNF Emax EIA Assay System, Promega), de acordo com a metodologia empregada por Sales et al., 2011. A concentração das amostras foi calculada com base na curva padrão, construída com purificado de BDNF humano recombinante. Os níveis

de proteínas totais foram determinadas pela reação de Bradford (#B6916, Sigma), seguindo o manual de instruções do fabricante e utilizadas para normalizar os resultados referentes a expressão de BDNF.

3.10 Análise estatística

Os resultados do teste de PPI foram submetidos a uma ANOVA de medidas repetidas tendo como medida repetida a intensidade de pré-pulso e como fator independente o tratamento. A análise de campo aberto, os dados moleculares (expressão de P-AcH3, BDNF e análise da metilação do DNA) foram comparados por ANOVA de um fator. Em caso de efeitos significantes detectados nas ANOVAS, o teste de Duncan foi utilizado para as comparações múltiplas. O nível de significância foi de $p < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 22.0. Os gráficos foram construídos com o auxílio do programa GraphPadPrism 7.0. Em todos os gráficos apresentados as barras representam a média $\pm$ erro padrão da média.

4 DESENHO EXPERIMENTAL

4.1 Parte I: Mecanismos farmacológicos envolvidos no perfil antipsicótico do CBD

1. Participação dos receptores TRPV1 no mecanismo de ação do CBD

RACIONAL: Estudos *in vitro* de Bisogno e cols. (2001) demonstraram que o CBD apresenta afinidade pelos receptores TRPV1. Adicionalmente, o bloqueio desses receptores pela CPZ impede a habilidade do CBD de prevenir prejuízo induzido por MK-801 (LONG et al., 2006). Nosso **objetivo** foi investigar se o pré-tratamento com a CPZ 1 e 5mg/kg (Dos-Santos-Pereira et al., 2016) injetada sistemicamente bloqueia a habilidade do CBD de impedir o prejuízo no PPI e a hiperlocomoção induzidos por ANF.

Experimentos 1 e 2: Grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de PPI e ao teste de Campo Aberto. Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10ml/kg; V) ou CPZ (1 ou 5mg/kg; CPZ), seguida por uma aplicação i.p. de veículo (10ml/kg) ou CBD (30 ou 60mg/kg; CBD) que precederam a aplicação i.p. de salina (10ml/kg) ou ANF (10mg/kg no PPI e 5mg/kg no Campo Aberto; ANF). As drogas foram administradas com intervalo de 20 minutos. Esse também foi o intervalo entre a última aplicação e o teste de PPI ou teste de Campo Aberto.

Subgrupos: V+V+SAL, V+CBD+SAL, V+V+ANF, V+CBD+ANF, V+CBD+ANF, CPZ+V+SAL, CPZ+CBD+SAL, CPZ+V+ANF, CPZ+CBD+ANF; n=6-8 por tratamento.

2. Participação dos receptores 5-HT1A no mecanismo de ação do CBD

RACIONAL: A afinidade do CBD pelos receptores 5-HT1A está relacionada ao seu potencial ansiolítico (Campos e Guimarães, 2008; Resstel et al., 2009). Antipsicóticos atípicos como a CLZ e o aripiprazol apresentam afinidade por esses receptores desempenhando efeitos terapêuticos sobre os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia (Burnet et al., 1996; Newman-Tancredi, 2010). Dessa forma, nosso **objetivo** foi investigar se o pré-tratamento com a droga WAY100635, um antagonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT1A, bloqueia a habilidade do CBD de impedir o prejuízo no PPI e a hiperlocomoção induzidos por ANF.

Experimentos 3 e 4: Grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de PPI e ao teste de Campo Aberto. Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10ml/kg; V) ou

WAY 100635 (0.1mg/kg; WAY), seguida por uma aplicação i.p. de veículo (10ml/kg) ou CBD (30 ou 60mg/kg; CBD) que precederam a aplicação i.p. de salina (10ml/kg) ou ANF (10mg/kg no PPI e 5mg/kg no Campo Aberto; ANF). As drogas foram administradas com intervalo de 20 minutos. Esse também foi o intervalo entre a última aplicação e o teste de PPI ou teste de Campo Aberto.

Subgrupos: V+V+SAL, V+CBD+SAL, V+V+ANF, V+CBD+ANF, V+CBD+ANF, WAY+V+SAL, WAY+CBD+SAL, WAY+V+ANF, WAY+CBD+ANF; n=6-7 por tratamento.

3. Participação da anandamida no mecanismo de ação do CBD

RACIONAL: É sugerido que a propriedade antipsicótica do CBD esteja relacionada à sua habilidade de aumentar a disponibilidade de anandamida. Estudos clínicos demonstraram uma correlação positiva entre os níveis séricos de anandamida e a melhora clínica em pacientes tratados com CBD (Leweke et al., 2012). Dessa forma, nosso **objetivo** foi investigar se o pré-tratamento com a droga URB597, um inibidor seletivo da enzima FAAH e que compartilha esse mecanismo de ação com o CBD, previne o prejuízo no PPI e a hiperlocomoção induzidos por ANF.

Experimentos 5 e 6: Grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de PPI e ao teste de Campo Aberto. Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10ml/kg; V) ou URB597 (0.1, 0.3 e 1mg/kg), seguida por uma aplicação i.p. de salina (10ml/kg) ou ANF (10mg/kg no PPI e 5mg/kg no Campo Aberto; ANF). As drogas foram administradas com intervalo de 20 minutos. Esse também foi o intervalo entre a última aplicação e o teste de PPI ou teste de Campo Aberto.

Subgrupos: V+SAL, URB+SAL, V+ANF, URB+ANF; n=8 por tratamento.

4. Efeito concomitante da anandamida e dos receptores TRPV1 no mecanismo de ação do CBD

Segundo racional já apresentado, nosso **objetivo** foi investigar o efeito do tratamento sistêmico com o composto AA-5-HT (araquidonoil serotonina), que simultaneamente inibe a hidrólise enzimática de anandamida e antagoniza receptores TRPV1 na hiperlocomoção e prejuízo no PPI induzidos por ANF.

Experimentos 7 e 8: Grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de PPI e ao teste de Campo Aberto. Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10ml/kg; V) ou AA-5-HT (5mg/kg), seguida por uma aplicação i.p. de salina (10ml/kg) ou ANF (10mg/kg no PPI e 5mg/kg no Campo Aberto; ANF). As drogas foram administradas com intervalo de 20 minutos. Esse também foi o intervalo entre a última aplicação e o teste de PPI ou teste de Campo Aberto.

Subgrupos: V+SAL, AA-5-HT+SAL, V+ANF, AA-5-HT+ANF; n=6 por tratamento.

4.2 Parte II: Investigação do CPF como substrato neural para a ação antipsicótica do CBD

RACIONAL: Há poucos estudos pré-clínicos empregando injeções diretas de CBD em regiões importantes do cérebro associadas ao efeito de antipsicóticos atípicos, tais como o CPF. Resultados anteriormente obtidos pelo grupo com a microinjeção de CBD no NAC nos incentivaram a investigar outros substratos potencialmente relacionados ao efeito do CBD no teste de PPI (Pedrazzi et al., 2015).

Experimento 9: Uma semana após a implantação de cânula no CPF, os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (0.2 µl) ou CBD (30 ou 60nmol; 0.2 µl) seguida 5 minutos depois de uma aplicação intraperitoneal de salina (10 ml/kg) ou ANF (10 mg/kg), sendo submetidos, 5 minutos após ao teste de PPI.

Subgrupos: V+SAL, CBD+SAL, V+ANF, CBD+ANF; n=8 por tratamento.

4.3 Parte III: Mecanismos moleculares envolvidos no perfil antipsicóticos do CBD

1. Expressão da proteína fosfo-histona acetilada (p-AcH3)

RACIONAL: Há poucos estudos abordando a expressão de marcadores de ativação neuronal que se acumulam no SNC de forma estrutura-específica (Nestler et al., 2009) em resposta a interações entre antipsicóticos e fármacos psicotomiméticos como a ANF. Dessa maneira, nosso **objetivo** foi reproduzir a atenuação do prejuízo induzido por ANF no teste de PPI pelo CBD, e após o sacrifício dos animais investigar a expressão de p-AcH3 nas estruturas: CPF, estriado dorsal e NAC.

Experimento 10: Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10ml/kg; V) ou CBD (30 ou 60mg/kg), seguida por uma aplicação i.p. de salina (10ml/kg) ou ANF (5mg/kg), sendo submetidos 20 minutos após ao teste de PPI. Após o teste de PPI, os animais foram sacrificados, perfundidos e seus encéfalos delicadamente retirados para a realização dos ensaios de imunohistoquímica para p-AcH3.

Subgrupos: V+SAL, CBD+SAL, V+ANF, CBD+ANF; n=8 por tratamento.

2. Participação do BDNF e de mecanismos epigenéticos no perfil antipsicótico do CBD

RACIONAL: Estudos têm sugerido alterações na expressão de BDNF no cérebro de pacientes esquizofrênicos. Poucos estudos investigaram como interações entre drogas antipsicóticas e psicotomiméticas alteram essa expressão. Adicionalmente, a participação de alterações epigenéticas nos modelos experimentais dos sintomas da esquizofrenia foi, até o momento, pouco explorada. No entanto, é considerável o potencial farmacológico de estratégias que tem como alvos mecanismos epigenéticos, principalmente aqueles relacionados à metilação do DNA no sistema nervoso central (para revisão Day et al., 2014). A ocorrência de alterações epigenéticas desencadeadas pela exposição aguda a psicoestimulantes ou drogas com potencial para adicção é conhecida (Wong et al., 2010). Dessa maneira, nosso **objetivo** foi reproduzir a atenuação do prejuízo induzido por ANF ou MK-801 no teste de PPI pelo CBD. Ao final do ensaio os animais foram sacrificados para investigação da expressão de BDNF e metilação global do DNA.

Experimentos 11 e 12: Após o teste de PPI, os animais foram sacrificados, seus cérebros foram delicadamente retirados e as estruturas: HPC, estriado ventral e CPF foram dissecadas. O HPC dos animais foi destinado para investigar a expressão de BDNF, o CPF e estriado ventral foram utilizados para os ensaios de metilação global. Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10ml/kg; V) ou CBD (30 ou 60mg/kg), seguida por uma aplicação i.p. de salina (10ml/kg) ou ANF (5mg/kg) ou MK-801 (0.5mg/kg), sendo submetidos 20 minutos após ao teste de PPI. Nessa abordagem realizamos um controle positivo com o antipsicótico atípico CLZ (5mg/kg), que foi administrada 50 minutos antes do teste de PPI.

Subgrupos experimento 11: V+SAL, CBD+SAL, V+ANF, CBD+ANF, CLZ+S, CLZ+A n=8 por tratamento.

Subgrupos experimento 12: V+SAL, CBD+SAL, V+MK-801, CBD+MK-801, CLZ+S, CLZ+MK-801 n=8 por tratamento.

5 RESULTADOS

5.1 Mecanismos farmacológicos envolvidos no perfil antipsicótico do CBD

5.1.1 Experimentos 1 e 2: Participação dos receptores TRPV1 no potencial antipsicótico do CBD

O tratamento agudo com ANF (10mg/kg) promoveu prejuízo significativo na resposta de PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com CBD, nas doses de 30 e 60mg/kg, bloqueou o efeito da ANF nas intensidades de pré-pulso de 80 e 90 dB, além de atenuar esse prejuízo na intensidade de 85 dB (Figura 7B). O pré-tratamento com CPZ (1mg/kg) impediu o efeito do CBD (60mg/kg) nas intensidades de 80 e 85 dB (Figuras 7A e B), essa mesma associação piorou o prejuízo induzido por ANF na intensidade de 90 dB (Figura 7C). O pré-tratamento com CPZ (5mg/kg) impediu o efeito do CBD (30mg/kg) na intensidade de 80 dB (Figura 7A).

A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito geral significativo do tratamento [$F(14,99)=9,297$; $p<0,001$] e da intensidade do pré-pulso [$F(2,198)=5,024$; $P=0,007$], mas não revelou interação entre os fatores intensidade de pré-pulso e tratamento [$F(28,198)=0,762$; $P=0.801$]. A aplicação dos tratamentos V+CBD+SAL, nas doses de 30 e 60mg/kg e a aplicação de CPZ +V+SAL (1 e 5 mg/kg) não produziram modificações no PPI. Houve um aumento significativo na resposta de sobressalto acústico nos animais tratados com V+CBD30+ANF, e uma redução significativa nos animais tratados com CPZ5+CBD60+ANF [$F(13,103)=2,686$; $P=0,003$; Duncan, $p<0.05$]. Nos demais grupos não foram encontradas alterações na resposta de sobressalto acústico (Tabela 3).

O tratamento com ANF (5mg/kg) promoveu aumento significativo da atividade locomotora (distância total percorrida no campo aberto). O pré-tratamento com CBD, nas doses de 30 e 60mg/kg, bloqueou esse efeito. A CPZ *per se* não alterou o desempenho motor e a hiperlocomação induzida por ANF.. A aplicação de CPZ (5mg/kg) em associação com CBD (30mg/kg) bloqueou a hiperlocomação induzida por ANF (Figura 8), ONE WAY ANOVA, [$F(14,77)=6,455$; $p<0,0001$; Duncan, $p<0.05$].

Figura 7: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com CPZ no PPI. A ANF promoveu prejuízo significativo na resposta de pré-pulso (%) em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com CBD atenuou o prejuízo induzido pela ANF nas intensidades de 80 e 90 dB. O pré-tratamento com CPZ (1mg/kg) bloqueou o efeito do CBD (60mg/kg) nas intensidades de 80, 85 e 90 dB. O pré-tratamento com CPZ (5mg/kg) bloqueou o efeito do CBD (30mg/kg) na intensidade de pré-pulso de 80 dB. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Duncan, $p<0.05$. * $p<0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL. # $p<0.05$ em comparação ao grupo V+V+ANF. ** $p<0.05$ em comparação ao grupo V+CBD+ANF.

Tabela 3: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com CPZ na resposta de sobressalto acústico. O tratamento com V+CBD30+ANF, promoveu aumento significativo na resposta de sobressalto, enquanto o tratamento CPZ5+CBD60+ANF promoveu redução significativa (UA – unidades arbitrárias). ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL.

Grupo	Pulso (U.A.)	Grupo	Pulso (U.A.)
V + V + SAL	824.3 $\pm$ 102.9	CPZ 1 + CBD 30 + ANF	722.3 $\pm$ 46.86
V + CBD 60 + SAL	716.5 $\pm$ 83.32	CPZ 1 + CBD 60 + ANF	609.3 $\pm$ 145.5
V + V + ANF	840.3 $\pm$ 59.19	CPZ 5 + V + SAL	651.6 $\pm$ 85.43
V + CBD 30 + ANF	1149 $\pm$ 117.5*	CPZ 5 + CBD 60 + SAL	713.5 $\pm$ 134.8
V + CBD 60 + ANF	885 $\pm$ 72.33	CPZ 5 + V + ANF	596.1 $\pm$ 73.49
CPZ 1 + V + SAL	632.3 $\pm$ 89.08	CPZ 5 + CBD 30 + ANF	706.9 $\pm$ 97.53
CPZ 1 + CBD 60 + SAL	761.6 $\pm$ 142.5	CPZ 5 + CBD 60 + ANF	498.6 $\pm$ 66.28*
CPZ 1 + V + ANF	815 $\pm$ 87.57

Figura 8: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com CPZ na hiperlocomção induzida por ANF no Campo Aberto. A ANF induziu aumento da distância percorrida total no teste de Campo Aberto, o pré-tratamento com CBD (30 e 60mg/kg) bloqueou essa resposta. O tratamento CPZ5 + CBD30 + ANF apresentou uma redução significativa da distância total percorrida em relação ao tratamento VEH + VEH + ANF; ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+ANF.

5.1.2 Experimentos 3 e 4: Participação dos receptores 5-HT_{1A} no potencial antipsicótico do CBD

O tratamento agudo com ANF promoveu prejuízo significativo na % de PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com CBD, na dose de 30mg/kg, bloqueou o efeito da ANF no teste de PPI na intensidade de pré-pulso de 80 dB (Figura 9). O pré-tratamento com WAY100635 não foi capaz de bloquear o efeito do CBD (Figura 3).

A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito geral significativo do tratamento [$F(9,70)=5,582$; $p<0,001$] e da intensidade do pré-pulso [$F(2,140)=7,125$; $P=0,001$], mas não houve interação entre os fatores intensidade de pré-pulso e tratamento [$F(18,140)=0,895$; $P=0,585$]. A aplicação de V+CBD+SAL, nas doses de 30 e 60mg/kg e a aplicação de WAY100635+V+SAL não produziram modificações no PPI. Houve uma diminuição significativa na resposta de sobressalto acústico nos animais tratados com WAY+V+SAL e WAY+V+ANF, [$F(9,79)=2,756$; $P=0,008$; Duncan, $p<0,05$]. Nos demais grupos não foram observadas alterações na resposta de sobressalto acústico (Tabela 4).

Figura 9: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com WAY100635 no PPI. A ANF promoveu prejuízo significativo na % de PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. Na intensidade de 80 dB o pré-tratamento com a dose de 30 mg/kg de CBD foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF. O pré-tratamento com WAY100635 não foi capaz de bloquear o efeito do CBD. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+ANF. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+ANF.

Tabela 4: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com WAY100635 na resposta de sobressalto acústico. Os tratamentos WAY+V+SAL e WAY+V+ANF, apresentaram diminuição significativa na resposta de sobressalto. (UA – unidades arbitrárias). ONEWAY ANOVA, *post hoc* Duncan, * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL.

Grupo	Pulso (U.A.)	Grupo	Pulso (U.A.)
V + V + SAL	658 $\pm$ 123.21	WAY + V + SAL*	399.4 $\pm$ 65.9*
V + CBD 60 + SAL	701 $\pm$ 59.64	WAY + CBD 60 + SAL	672.1 $\pm$ 92.82
V + V + ANF	857.6 $\pm$ 89.1	WAY + V + ANF*	419.3 $\pm$ 48.3*
V + CBD 30 + ANF	841.9 $\pm$ 74.72	WAY + CBD 30 + ANF	812.4 $\pm$ 85.32
V + CBD 60 + ANF	798.6 $\pm$ 145.74	WAY + CBD 60 + ANF	769.2 $\pm$ 124.29

O tratamento com ANF (5mg/kg) promoveu aumento significativo da distância percorrida total no Campo Aberto. O pré-tratamento com CBD (60mg/kg) foi capaz de bloquear esse aumento. O pré-tratamento com WAY100635 *per se* não alterou o desempenho motor e a hiperlocomução induzida por ANF nos animais. Embora o tratamento WAY100635 + CBD60 + ANF ter apresentado um aumento total da distância percorrida, esse tratamento não apresentou diferença em relação ao tratamento VEH + CBD60 + ANF (figura 10), ONE WAY ANOVA, [F(9,51)=16,35; $p < 0,0001$; Duncan, $p < 0.05$].

Figura 10: Efeito do CBD precedido pelo pré-tratamento com WAY100635 na hiperlocomução induzida por ANF no Campo Aberto. A ANF induziu aumento da distância percorrida total no teste de Campo Aberto, o pré-tratamento com CBD (60mg/kg) bloqueou essa resposta. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+SAL.

5.1.3 Experimentos 5 e 6: Investigação do aumento da sinalização de anandamida pelo composto URB-597

PPI: O tratamento agudo com ANF promoveu prejuízo significativo na % de PPI de todas as intensidades de pré-pulso analisadas. Em todas as intensidades de PPI, o prejuízo induzido pela ANF foi atenuado pelo URB597 (0.3mg/kg em todas as intensidades, e 1mg/kg na intensidade de 90 dB, Figura 11).

A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$F(5,40) = 8.899, P < 0.001$], da intensidade de pré-pulso [$F(2,80) = 5.713, P = 0.005$] e interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F(10,80) = 2.009, P = 0.043$]. A aplicação de URB597+SAL não produziu modificações no PPI.

Não foram observadas alterações significativas na resposta de sobressalto acústico (Tabela 5).

Figura 11: Efeito do pré-tratamento com URB597 no prejuízo induzido por ANF no PPI. O prejuízo induzido por ANF foi atenuado pelo pré-tratamento com URB597 (0.3 e 1mg/kg). Apenas a maior dose de URB597 foi utilizada como controle. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+ANF.

Tabela 5: Efeito do pré-tratamento com URB597 na resposta de sobressalto acústico. Não houve alteração na resposta de sobressalto acústico em nenhum dos tratamentos. (UA – unidades arbitrárias). ONEWAY ANOVA, *post hoc* Duncan.

Grupo	Pulso (U.A.)
V + SAL	541.3 ± 67.43
URB + SAL	356.6 ± 40.72
V + ANF	580.4 ± 86.03
URB 0.1 + ANF	595.6 ± 90.58
URB 0.3 + ANF	779 ± 62.41
URB 1 + ANF	669.3 ± 151.3

Campo Aberto: O tratamento com ANF promoveu aumento significativo da distância percorrida total. O pré-tratamento com URB597 não modificou a hiperlocomoção induzida pela ANF (figura 12), ONE WAY ANOVA [F(5,47)=4,538; $P=0,002$; Duncan, $p<0.05$].

Figura 12: Efeito do pré-tratamento com URB597 na hiperlocomoção induzida por ANF. O tratamento V+ANF induziu aumento da distância percorrida total no teste de Campo Aberto. O pré-tratamento com URB597, em nenhuma das doses testadas, atenuar essa resposta; ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, * $p<0.05$ em comparação ao grupo V+SAL.

5.1.4 Experimentos 7 e 8: Investigação do aumento da sinalização do endocanabinoide anandamida e bloqueio farmacológico de receptores TRPV1

O tratamento agudo com ANF promoveu prejuízo significativo na intensidade de pré-pulso de 85 dB. Em todas as intensidades de pré-pulso, o pré-tratamento com AA-5-HT apresentou prejuízo em relação ao grupo controle. Na intensidade de 85 dB o pré-tratamento com AA-5-HT piorou o efeito em relação ao tratamento V+ANF (Figura 13).

A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$F(3,20) = 11.227, P < 0.001$], não houve efeito significativo da intensidade de pré-pulso [$F(2,40) = 1.182, P = 0.317$] e nem interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F(6,40) = 1.031, P = 0.419$]. A aplicação de AA-5-HT+SAL não produziu modificações no PPI.

Não foram observadas alterações significativas na resposta de sobressalto acústico (Tabela 6).

Figura 13: Efeito do pré-tratamento com AA-5-HT no prejuízo induzido por ANF no PPI. A ANF causou prejuízo na intensidade de pré-pulso de 80 dB. Em todas as intensidades de pré-pulso a associação AA-5-HT + ANF promoveu prejuízo em relação ao grupo controle. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL.

Tabela 6: Efeito do pré-tratamento com AA-5-HT na resposta de sobressalto acústico. Não houve alteração na resposta de sobressalto acústico em nenhum dos tratamentos. (UA – unidades arbitrárias). ONEWAY ANOVA, *post hoc* Duncan.

Grupo	Pulso (U.A.)
V + SAL	699.2 ± 101
AA-5-HT + SAL	466 ± 36.87
V + ANF	757.7 ± 60.1
AA-5-HT + ANF	617.8 ± 66.13

Campo Aberto: O tratamento com ANF (5mg/kg) promoveu aumento significativo da distância percorrida total no Campo Aberto. O pré-tratamento com AA-5-HT (5mg/kg) foi capaz de bloquear esse aumento. O tratamento com AA-5-HT + salina não alterou o desempenho motor nos animais (figura 14). ONE WAY ANOVA, [F(3,20) = 10.29, $P = 0.0003$].

Figura 14: Efeitos do pré-tratamento com AA-5-HT na hiperlocomoção induzida por ANF no Campo Aberto. A ANF induziu aumento da distância percorrida total no teste de Campo Aberto, o pré-tratamento com AA-5-HT bloqueou essa resposta. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+SAL. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+ANF.

5.2 Investigação do CPF como substrato neural para a ação antipsicótica do CBD

5.2.1 Experimento 9: Microinjeção de CBD no CPF

O tratamento sistêmico agudo com ANF promoveu prejuízo significativo na % de PPI na intensidade de 80 dB. A microinjeção de CBD no CPF, em nenhuma concentração foi capaz de atenuar/prevenir esse prejuízo. Ainda, as duas concentrações de CBD em associação com ANF apresentaram prejuízo significativo em relação ao grupo Veículo + Salina (Figura 15).

A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$F(4,34)=4.668, P=0.004$], não houve efeito significativo da intensidade de pré-pulso [$F(2,68)=0.330, P=0.720$] e nem interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F(8,68)=1.534, P=0.162$]. A aplicação de CBD no CPF não produziu modificações no PPI. Não houve diferenças significativas na resposta de sobressalto acústico entre os tratamentos (Tabela 7).

Figura 15: Efeitos da microinjeção de CBD no CPF sobre o prejuízo induzido por ANF no PPI. A ANF causou prejuízo na intensidade de pré-pulso de 80 dB. A microinjeção de CBD no CPF não foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p<0.05$. * $p<0.05$ em comparação ao grupo Veículo + Salina.

Tabela 7: Efeito da microinjeção de CBD no CPF na resposta de sobressalto acústico. Não houve alteração na resposta de sobressalto acústico em nenhum dos tratamentos. (UA – unidades arbitrárias). ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan.

Grupo	Pulso (U.A.)
V + SAL	335.5 +/- 60.37
CBD 60 + SAL	344.4 +/- 85.98
V + ANF	636.3 +/- 179.4
CBD 30 + ANF	484.9 +/- 89.59
CBD 60 + ANF	520.9 +/- 191.6

Inserção e localização das Cânulas no CPF. Secções adjacentes e representativas dos terços cerebrais rostral, medial e caudal, obtidas em criostato foram armazenadas em solução anticongelante e montadas sequencialmente em lâminas gelatinizadas. A técnica de coloração cresil violeta para substância de Nissl foi utilizada para a localização do sítio de inserção das cânulas no CPF (Figura 16). As cinco secções apresentadas ilustram a variedade de inserções no plano ântero-posterior do encéfalo dos camundongos (Bregma 1.98 mm a 1.54 mm).

Figura 16: Identificação do sítio de inserção das cânulas no CPF no plano ântero-posterior de camundongos. O local de inserção das cânulas está representado nas figuras acima em formato de ponto. As imagens foram retiradas do atlas Paxinos & Watson de camundongo. Os animais que tiveram as cânulas inseridas fora do CPF foram excluídos das análises de PPI.

5.3 Mecanismos moleculares envolvidos no perfil antipsicóticos do CBD

5.3.1 Experimento 10: Efeito do pré-tratamento com CBD no prejuízo induzido por ANF sobre a expressão do marcador fosfo-histona acetilada (p-Ach3)

PPI: O tratamento agudo com ANF promoveu prejuízo significativo na % de PPI na intensidade de 85 e 90 dB. O pré-tratamento com CBD na dose de 30mg/kg atenuou o prejuízo induzido por ANF na intensidade de 85 dB, enquanto a dose de 60mg/kg de CBD foi capaz de atenuar esse prejuízo na intensidade de 90 dB (Figura 17). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$F(4,27)=5.572, P=0.002$], efeito significativo da intensidade de pré-pulso [$F(2,54)=8.833, P<0.01$], e interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F(8,54)=2.545, P=0.031$]. Não houve diferenças significativas na resposta de sobressalto acústico entre os tratamentos (Tabela 8).

Expressão de p-Ach3: a associação CBD (30 e 60mg/kg) e ANF promoveu um aumento da expressão de p-Ach3 em todas as estruturas analisadas (Figura 18). ONE WAY ANOVA, CPF [$F(4,31)=3.223, P=0.028$], Estriado Dorsal [$F(4,50)=37.56, P<0.001$] e NAC [$F(4,32)=6.556, P<0.001$].

Figura 17: Efeito do pré-tratamento com CBD no prejuízo induzido por ANF no PPI. A ANF causou prejuízo na intensidade de pré-pulso de 85 e 90 dB. O pré-tratamento com CBD nas doses de 30 e 60 mg/kg respectivamente foram capazes de atenuar o prejuízo induzido por ANF nas intensidades de 85 e 90 dB. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p<0.05$. * $p<0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL.

Tabela 8: Efeito do pré-tratamento com CBD na resposta de sobressalto acústico. Não houve alteração na resposta de sobressalto acústico em nenhum dos tratamentos. (UA – unidades arbitrárias). ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan.

Grupo	Pulso (U.A.)
V + SAL	629.9 ± 115.2
CBD 60 + SAL	770.1 ± 131.1
V + ANF	771 ± 73.91
CBD 30 + ANF	937.8 ± 128
CBD 60 + ANF	871 ± 136.8

Figura 18: Efeito do pré-tratamento com CBD na expressão de p-Ach3 no CPF, estriado dorsal e NAC induzido por ANF. A - a interação entre as duas doses de CBD e ANF promoveu um aumento significativo na expressão de p-Ach3 em todas as regiões analisadas. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+SAL. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+ANF. B - fotomicrografias representativas indicando a imunoreatividade para p-Ach3 no CPF, estriado dorsal e NAC (20X barra de escala = 150 μ m).

5.3.2 Experimento 11: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ no prejuízo induzido por ANF sobre a expressão de BDNF no hipocampo e metilação global no CPF e estriado ventral

PPI: O tratamento agudo com ANF promoveu prejuízo significativo na % de PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com CBD em ambas as doses foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF no PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas, de forma semelhante o pré-tratamento com CLZ apresentou o mesmo efeito (Figura 19). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$(F_{6,48}) = 13.647, P < 0.001$], efeito significativo da intensidade de pré-pulso [$(F_{2,96}) = 8.517, P < 0.001$], e interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$(F_{12,96}) = 2.370, P = 0.01$]. Não houve diferenças significativas na resposta de sobressalto acústico entre os tratamentos (Tabela 9).

Figura 19: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ no prejuízo induzido por ANF no PPI. A ANF causou prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. Ambas as doses de CBD foram capazes de atenuar o prejuízo induzido por ANF em todas as intensidades de pré-pulso. O controle positivo com o antipsicóticos atípico CLZ teve efeito semelhante. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+SAL. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+ANF.

Tabela 9: Efeito do CBD ou CLZ na resposta de sobressalto acústico. Não houve alteração na resposta de sobressalto acústico em nenhum dos tratamentos. (UA – unidades arbitrárias). ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan.

Grupo	Pulso (U.A.)
V + SAL	532.2 ± 81.36
CBD 60 + SAL	530.8 ± 72.41
V + ANF	749.1 ± 78.52
CBD 30 + ANF	740.2 ± 49.64
CBD 60 + ANF	669.9 ± 76.08
CLZ + SAL	493.1 ± 94.14
CLZ + ANF	556.1 ± 49.45

Expressão de BDNF no HPC: O tratamento agudo com ANF não alterou a expressão de BDNF no HPC, contudo as associações entre CBD+ANF e CLZ+ANF apresentaram diferenças significativas no padrão de expressão de BDNF em comparação ao tratamento V+ANF (figura 20). ONE WAY ANOVA, [(F6,43= 3.78, $P=0.004$)].

Figura 20: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na expressão de BDNF no HPC induzido por ANF. A interação entre as duas doses de CBD e ANF promoveu um aumento significativo na expressão de BDNF no HPC efeito semelhante ao observado na interação CLZ+ANF. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, $p<0.05$. # $p<0.05$ em comparação ao grupo V+ANF.

Metilação global no CPF: O tratamento agudo com ANF não alterou a metilação global no CPF, enquanto o tratamento CLZ+SAL aumentou a metilação global nessa estrutura (Figura 21). ONE WAY ANOVA, [(F6,43= 3.434 $P=0.007$)].

Figura 21: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na metilação global induzida por ANF no CPF. O tratamento agudo com ANF não promoveu alterações na metilação global no CPF. O tratamento CLZ+SAL promoveu um aumento significativo da metilação global nessa estrutura. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, $p<0.05$. * $p<0.05$ em comparação ao grupo V+SAL. # $p<0.05$ em comparação ao grupo V+ANF.

Metilação global no estriado ventral: O tratamento agudo com ANF promoveu aumento da metilação global no estriado ventral. O pré-tratamento com ambas as doses de CBD foi capaz de impedir esse aumento. O pré-tratamento com CLZ apresentou efeito semelhante (Figura 22). ONE WAY ANOVA, [(F6,41= 4.901, $P<0.001$)].

Figura 22: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na metilação global induzida por ANF no estriado ventral. O tratamento agudo com ANF promoveu aumento da metilação global no estriado ventral. A interação entre as duas doses de CBD e ANF promoveram uma diminuição significativa na metilação global induzida por ANF, efeito semelhante ao observado na interação CLZ+ANF. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, $p<0.05$. * $p<0.05$ em comparação ao grupo V+SAL. # $p<0.05$ em comparação ao grupo V+ANF.

5.3.3 Experimento 12: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ no prejuízo induzido por MK-801 sobre a expressão de BDNF no hipocampo e metilação global no CPF e estriado ventral

PPI: O tratamento agudo com MK-801 promoveu prejuízo significativo na % de PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com CBD na dose de 30 mg/kg foi capaz de atenuar esse prejuízo na intensidade de 80 dB, enquanto a dose de 60mg/kg o atenuou na intensidade de 85 dB. O pré-tratamento com CLZ foi capaz de atenuar o prejuízo nas intensidades de 80 e 85 dB (figura 23). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [(F6,45)= 8.564, $P < 0.001$], efeito significativo da intensidade de pré-pulso [(F2,90) = 10.547, $P < 0.001$], e interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [F(12,90) = 1.707, $P = 0.078$]. Não houve diferenças significativas na resposta de sobressalto acústico entre os tratamentos (Tabela 10).

Figura 23: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ no prejuízo induzido por MK-801 no PPI. O MK-801 causou prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. A dose de 30 mg/kg de CBD foi capaz de atenuar o prejuízo na intensidade de 80 dB, enquanto a dose de 60 mg/kg o atenuou na intensidade de 85 dB. A CLZ atenuou o prejuízo induzido por MK-801 nas intensidades de 80 e 85 dB. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+SAL. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+MK-801.

Tabela 10: Efeito do CBD ou CLZ na resposta de sobressalto acústico. Não houve alteração na resposta de sobressalto acústico em nenhum dos tratamentos. (UA – unidades arbitrárias). ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan.

Grupo	Pulso (U.A.)
V + SAL	665.2 ± 93.79
CBD 60 + SAL	566 ± 65.06
V + MK-801	870.9 ± 131.4
CBD 30 + MK-801	596.8 ± 80.96
CBD 60 + MK-801	901.7 ± 135.1
CLZ + SAL	614 ± 69.36
CLZ + MK-801	437.6 ± 45.82

Expressão de BDNF no HPC: O tratamento agudo com MK-801 não alterou a expressão de BDNF no HPC. Não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (Figura 24). ONE WAY ANOVA, [(F6,43)= 3.78, $P=0.004$].

Figura 24: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ sobre a expressão de BDNF no HPC. Não foram encontradas diferenças significativas na expressão de BDNF entre os tratamentos. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, $p<0.05$.

Metilação global no córtex pré-frontal: O tratamento agudo com MK-801 não alterou a metilação global no CPF, enquanto os tratamentos CBD 60+SAL e CLZ+SAL promoveram aumento da metilação global nessa estrutura (Figura 25). ONE WAY ANOVA, [(F6,32= 7.183, $P<0.001$)].

Figura 25: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na metilação global induzida por MK-801 no CPF. O tratamento agudo com MK-801 não promoveu alterações na metilação global no CPF. Os tratamentos CBD 60+SAL e CLZ+SAL promoveram um aumento significativo da metilação global nessa estrutura. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, $p<0.05$. * $p<0.05$ em comparação ao grupo V+SAL. # $p<0.05$ em comparação ao grupo V+MK-801.

Metilação global no estriado ventral: O tratamento agudo com MK-801 não alterou a metilação global no estriado ventral. O tratamento CLZ+MK-801 aumentou a metilação global nessa estrutura (figura 26). ONE WAY ANOVA, [(F6,33= 2.583, $P=0.036$)].

Figura 26: Efeito do pré-tratamento com CBD ou CLZ na metilação global induzida por MK-801 no estriado ventral. O tratamento agudo com MK-801 não promoveu alterações na metilação global no estriado ventral. O tratamento CLZ+MK-801 promoveu um aumento significativo da metilação global nessa estrutura. ONE WAY ANOVA, *post hoc* Duncan, $p<0.05$. * $p<0.05$ em comparação ao grupo V+SAL. # $p<0.05$ em comparação ao grupo V+MK-801.

6 DISCUSSÃO

Investigações anteriores do nosso grupo demonstrou que o CBD atenua o prejuízo induzido por ANF no teste de PPI (Pedrazzi et al., 2015). Esse estudo corrobora a hipótese de que o CBD apresenta perfil do tipo antipsicótico em modelo preditivo para esse efeito (Zuardi et al., 1982; 2008).

Nossos resultados sugerem a participação dos receptores TRPV1, ao menos em parte, nos efeitos descritos para o CBD no teste de PPI. Para testar essa hipótese o tratamento com CBD foi precedido pela aplicação de CPZ um antagonista de receptores TRPV1. Nossos dados sugerem, ainda que parcialmente, o envolvimento do sistema vaniloide no mecanismo de ação do CBD. Curiosamente a menor dose de CPZ (1mg/kg) foi a mais efetiva em bloquear os efeitos do CBD no prejuízo induzido por ANF no PPI. A CPZ (1mg/kg) bloqueou o efeito da dose de 60mg/kg de CBD nas três intensidades de pré-pulso analisadas, enquanto o pré-tratamento com capsazepina na dose de 5mg/kg bloqueou apenas a dose de 30 mg/kg de CBD na intensidade de 80 dB.

O receptor TRPV1 foi clonado a partir de células de ratos localizadas no gânglio da raiz dorsal, tais receptores são um subtipo não seletivo de canais para cátions relacionados com a família de receptores de potencial transitório (Caterina et al, 1997; Cortright e Szallasi, 2004). A descoberta desses receptores impulsionou os campos das pesquisas da transdução somatosensorial e da dor em nível molecular. Adicionalmente, estudo de Bisogno e colaboradores (2001), em ensaios *in vitro*, sugeriu que o CBD pode ativar os receptores do tipo TRPV1. Posteriormente, estudo do grupo de Long (2006) observou que o efeito do CBD na atenuação do prejuízo no teste de PPI induzido pelo antagonista glutamatérgico MK-801 é bloqueado pelo pré-tratamento com CPZ. No sistema nervoso central, esse receptor é expresso nos terminais pós-sinápticos e é ativado pela anandamida, um ligante endógeno do sistema canabinoide (Brown, 2007). Os receptores TRPV1 estão expressos em regiões relacionadas ao processamento de informações, como o córtex, HPC, amígdala central e estriado, (Koch e Schnitzler, 1997; Swerdlow e Geyer, 1998; Mezey et al, 2000).

A CPZ também bloqueia canais de cálcio (Docherty et al., 1997) e receptores colinérgicos nicotínicos (Liu e Simon, 1997), dessa maneira esses mecanismos podem contribuir com esses efeitos. Até então, poucos estudos investigaram o papel da ativação dos receptores TRPV1 na esquizofrenia. Contudo, a ativação desses receptores pode estar indiretamente envolvidos na esquizofrenia através da sua influência na neurotransmissão dopaminérgica (Tzavara et al., 2006) e glutamatérgica (Fawley et al., 2014).

Adicionalmente, o CBD promove o aumento dos níveis de anandamida através da inibição da hidrólise enzimática e recaptção desse endocanabinoide (Izzo et al., 2009).

Existem interações funcionais entre o sistema dopaminérgico e os endocanabinoides. Antipsicóticos como o haloperidol, que bloqueia receptores dopaminérgicos do tipo D2 diminuem os sintomas positivos da esquizofrenia. Estudos de microdiálise mostraram que o estímulo de D2 no estriado aumenta a liberação de anandamida (Giuffrida et al., 1999). Izzo e colaboradores (2009) observaram que o CBD pode facilitar a neurotransmissão mediada pela anandamida ao inibir sua enzima de degradação (FAAH). É sugerido que a propriedade antipsicótica do CBD esteja relacionada à sua habilidade de aumentar a disponibilidade de anandamida (Schubart et al., 2013). Em modelos animais de psicose, a ação farmacológica do bloqueio da degradação de anandamida atenua esse comportamento induzido por ANF e fenciclidina (Seillier et al., 2010). A elevação dos níveis de anandamida observados em pacientes esquizofrênicos é sugerida como sendo uma adaptação compensatória ao estado da doença (Leweke et al., 2012). Dessa maneira, o uso de inibidores da FAAH é de grande interesse como um possível tratamento da esquizofrenia, e alvo para o entendimento do mecanismo de ação do CBD. Na presente abordagem, a inibição da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), que promove a hidrólise da anandamida pelo composto URB597 (Piomelli et al., 2006), impediu o prejuízo induzido por ANF no teste de PPI, resultados semelhantes aos observados com o CBD (Pedrazzi et al., 2015). Nesse estudo, o pré-tratamento com URB597 (0.3 mg/kg em todas intensidades, e 1 mg/kg na intensidade de 90 dB) foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF. Contudo, não foi capaz de impedir a hiperlocomoção induzida por ANF no teste de Campo Aberto. Em estudo de Luque-Rojas e colaboradores em 2013, o mecanismo de ação semelhante ao do URB597 no teste de PPI foi observado pela atenuação da hiperatividade induzida pelo agonismo dopaminérgico nos receptores de dopamina do tipo D2 e D3. Além disso, em ratos, o tratamento com um inibidor do transporte de anandamida (AM404) conteve as respostas comportamentais associadas com a ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D2 (Beltramo et al., 2000). A propriedade do sistema endocanabinoide em agir como um relevante modulador negativo dos comportamentos mediados por receptores D1 e D2 também foi demonstrada por Martín e colaboradores em 2008.

O URB597 também atenua os efeitos do antagonista NMDA fenciclidina (Seillier et al., 2010). Em conjunto, nossos dados sugerem que o aumento da concentração de anandamida e a mobilização dos receptores TRPV1 possam participar dos efeitos do CBD. No sistema nervoso central a anandamida está presente em regiões que os receptores TRPV1 estão expressos, incluindo HPC e núcleos basais, regiões que também expressam níveis elevados do receptor canabinoide CB1, para os quais a anandamida é também um agonista endógeno

(Devane et al., 1992). O efeito da anandamida nos receptores TRPV1 e CB1 é regulado pela FAAH e provavelmente pela captação de anandamida pelo seu transportador celular (Hillard et al., 2000). É possível que a inibição da hidrólise e recaptção da anandamida pelo CBD resultem em uma potenciação da ação da anandamida, via receptores TRPV1 e CB1. Adicionalmente, a ativação dos receptores TRPV1 pela anandamida leva à despolarização aumentada das membranas pós-sinápticas. Além disso, a ativação do CB1 e do TRPV1 parece exercer efeitos opostos (Piomelli et al., 2003). É sugerido que a propriedade antipsicótica do CBD esteja relacionada à sua habilidade de aumentar a disponibilidade de anandamida (Schubart et al., 2013).

As doses testadas de CPZ não impediram o efeito do CBD sobre a hiperlocomoção. De forma interessante a associação da dose de 30 mg/kg de CBD com a CPZ (5 mg/kg) bloqueou a hiperlocomoção induzida por ANF, sugerindo uma interação sinérgica entre os compostos. Resultado semelhante foi observado com o composto araquidonoil serotonina, AA-5-HT (5mg/kg) sobre a hiperlocomoção induzida por ANF. Esse composto tem como ação inibir a hidrólise e recaptção de anandamida bloqueando a sua enzima de degradação, a FAAH, além de antagonizar receptores TRPV1 (Bisogno et al., 1998). Em oposição aos resultados no teste de campo aberto, a associação AA-5-HT + ANF prejudicou o PPI em todas as intensidades analisadas, sugerindo que o aumento da sinalização por anandamida no efeito antipsicótico do CBD possa envolver os receptores TRPV1. Nesse sentido, há a sugestão que a mobilização de anandamida possa estar atuando nos receptores CB1, intensificando o prejuízo induzido por ANF. Estudos recentes demonstraram que o composto AA-5-HT apresenta efeito analgésico, em modelo de indução de dor por formalina em ratos como descrito no estudo de Maione e colaboradores (2007). Adicionalmente, esse composto apresentou efeito ansiolítico em camundongos submetidos no teste de Labirinto em Cruz Elevado (Micale et al., 2008).

É sugerido que a ativação dos receptores TRPV1 e CB1 tenha efeitos opostos nos neurônios (ativação x inibição, respectivamente), portanto, a relativa atividade da anandamida em cada receptor deve ser responsável pelos efeitos bifásicos frequentemente relatados do CBD (Zuardi et al., 2012). Os receptores TRPV1 são expressos em diversas regiões cerebrais e dentre suas funções estão a neuroproteção, neurotoxicidade e a modulação da atividade do receptor CB1 (Kim et al., 2007; Szallasi e Di Marzo, 2000). Os endovaniloides, nos quais a anandamida está incluída, são os ligantes endógenos dos receptores TRPV1 (Van Der Stelt e Di Marzo, 2004) e seus papéis nos processos comportamentais ainda estão sendo revelados.

Estudo conduzido por Crawley et al., 1993 demonstrou que a injeção de anandamida de forma dose-dependente induz hipolocomoção em camundongos submetidos ao teste de Campo Aberto. Adicionalmente, González (2006) confirmou esse efeito em ratos, provavelmente relacionado com a diminuição da atividade dopaminérgica nigroestriatal, uma vez que a anandamida de forma significativa diminui a liberação de dopamina estimulada por íons K⁺ dos terminais nigroestriatais. Esses efeitos foram completamente revertidos pela CPZ, indicando um papel dos receptores TRPV1, que estão localizados em neurônios dopaminérgicos na modulação dos efeitos hipocinéticos da anandamida. Além disso, foi demonstrado que o aumento da atividade locomotora em camundongos KO para o transportador de dopamina (DAT) foi atenuado pelo tratamento com inibidores da recaptação de anandamida: VDM11, AM404 e pelo AA-5-HT. Esses efeitos também foram bloqueados pela CPZ (Tzavara et al. 2006). Em geral, os receptores TRPV1 parecem ser alvo farmacológico do CBD, contudo há duas observações para a interpretação dessa evidência: primeiro, estudos *in vitro* mostraram que a CPZ potencializa os efeitos do CBD (Drysdale et al., 2006) e segundo, a CPZ não é um antagonista exclusivo de receptores TRPV1 (Docherty et al., 1997 ; Liu e Simon, 1997), o que explica, em parte, o resultado observado no campo aberto. Outra hipótese é a de que as estruturas críticas para os comportamentos analisados tenham uma expressão/ativação distinta de receptores TRPV1, explicando seus efeitos distintos sobre o processamento de informação e a hiperlocomoção.

Outra hipótese testada foi à participação dos receptores serotoninérgicos, do tipo 5HT1A no mecanismo de ação do CBD. Existem 14 subtipos de receptores serotoninérgicos conhecidos nos mamíferos, sendo o receptor 5-HT1A um dos mais abundantes (Barnes e Sharp, 1999). Os receptores 5-HT1A encontram-se em regiões pré e pós-sinápticas em diversas áreas do cérebro. Estudos do início da década de 90 sugerem que a ativação desses receptores está envolvida no mecanismo de ação de drogas ansiolíticas, antidepressivas e antipsicóticas (Graeff et al., 1996). Estudos anteriores demonstraram a habilidade do CBD de atuar como agonista desses receptores, exercendo perfil ansiolítico (Russo et al., 2005; Gomes et al., 2012). Assim como no teste de PPI, nossos resultados no Campo Aberto não demonstraram a participação efetiva desses receptores na habilidade do CBD de bloquear a hiperlocomoção induzida por ANF, uma vez que, o pré-tratamento com um antagonista de receptores 5-HT1A (WAY100635; 0.1 mg/kg) não foi capaz de impedir a ação do CBD (60 mg/kg). Embora não haja diferenças estatísticas significantes entre o tratamento V + CBD 60 + ANF e o tratamento WAY100635 + CBD 60 + ANF, o último apresentou um aumento da locomoção em relação ao grupo V + V + SAL. Uma possibilidade é que a ativação dos

receptores 5-HT_{1A} atenua a hiperatividade límbica, efeito que foi observado em ratos estressados (Shumake et al., 2002) e em humanos deprimidos. (Mayberg et al., 2000; Goldapple et al., 2004). Esse efeito pode envolver a atenuação de liberação de glutamato local. (Strosnajer et al., 1996). Há evidências relevantes do papel dos receptores 5-HT_{1A} em doenças psiquiátricas como a esquizofrenia, exemplo conhecido é que antipsicóticos atípicos, como o aripiprazol possuem afinidade por esses receptores (Burnet et al., 1996; Newman-Tancredi, 2010). Em ratos tratados com o antagonista de receptores NMDA, fenciclidina, apresentaram diminuição da interação social, que foi revertido pelo pré-tratamento com aripiprazol e pelo composto SSR181507, um antagonista de receptores D₂ e agonista 5-HT_{1A}. Esses efeitos foram bloqueados com a administração do WAY100635 (Newman-Tancredi, 2005). Além disso, estudos post-mortem revelaram expressão alterada de receptores 5-HT_{1A} no CPF de pacientes com esquizofrenia (Burnet et al., 1996; Bantick et al., 2001). A capacidade do CBD de facilitar a neurotransmissão mediada por 5-HT_{1A} permanece pouco compreendida. De forma interessante, foi observado em camundongos que o efeito anticataléptico do CBD foi prevenido pelo WAY100635, antagonista de receptores 5-HT_{1A} (Gomes et al., 2013; Sonogo et al., 2016). Contudo, não permanecem claros se a melhora dos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia pelo CBD envolve a ativação dos receptores 5-HT_{1A}, mais estudos devem ser endereçados para responder essa hipótese.

Em trabalho anterior, já havíamos descrito que a aplicação de CBD no núcleo acumbens promove efeitos similares àqueles observados pela injeção sistêmica de CBD. Tanto o núcleo acumbens, quanto o CPF são consideradas regiões importantes para o efeito terapêutico de antipsicóticos (Seeman et al., 2002).

O CPF é uma região criticamente envolvida no processamento de informações (Koch et al., 1996; Braff e Swerdlow, 1997). Adicionalmente, é sugerido que o mecanismo de ação de antipsicóticos atípicos, como a CLZ, seja dependente do bloqueio de receptores dopaminérgicos corticais, entre outros efeitos, o que contribuiria com o caráter atípico desses fármacos (Miller et al., 2000). O CPF modula de forma importante o PPI, a diminuição de dopamina nessa região é um fator crítico para os distúrbios desse circuito neural que está relacionado com a esquizofrenia (Csernaszky et al., 1993). Em ratos, o córtex pré-frontal medial (CPFm) regula o PPI de uma forma consistente com as observações clínicas, uma vez que o prejuízo no PPI é induzido por intervenções que diminuem a atividade dopaminérgica nessa região pela infusão de 6-OHDA (Bubser e Koch, 1994; Koch e Bubser, 1994). Além disso, a depleção de dopamina pela infusão intra-CPFm de antagonistas D₂, como o SCH 23390 ou a sulpirida também causam prejuízos no PPI (Ellenbroek et al., 1996). Foi

observado que a redução da neurotransmissão dopaminérgica nessa região cerebral prejudica o PPI devido a uma desinibição das fibras glutamatérgicas descendentes, que promovem um aumento da atividade dopaminérgica no NAC (Koch and Bubser 1994). Estudos sugerem que as eferências que partem do HPC ao CPFm e não as que partem do NAC estão relacionadas com o prejuízo no PPI devido a ativação hipocampal (Saint Marie et al., 2010). Estudo conduzido por Bhattacharyya e colaboradores (2012) utilizando medida de ativação cerebral em voluntários sadios, demonstrou que o delta-9-THC, principal componente psicotomimético da *Cannabis sativa* e o CBD, de forma diferente modulam a função de regiões cerebrais envolvidas no processamento de estímulos salientes e processos cognitivos. Esse grupo demonstrou que o CBD exerce efeitos opostos aos do delta-9-THC sobre a ativação do estriado, CPF e córtex temporal medial. Esses mecanismos podem contribuir com a habilidade do CBD em antagonizar os efeitos do delta-9-THC. Nesse sentido, a microinjeção de CBD no CPF poderia sugerir a mobilização dessa estrutura no nosso modelo experimental. As duas concentrações de CBD (30 e 60nmol) microinjetadas no CPF não foram capazes de impedir o prejuízo induzido pelo tratamento sistêmico com ANF no teste de PPI.

Em outra abordagem, que envolveu o perfil de expressão de p-Ach3, reproduzimos o efeito do CBD no prejuízo induzido por ANF no teste de PPI (Pedrazzi et al., 2015). Em relação ao perfil de expressão da p-Ach3 no CPF, estriado dorsal e NAC, a ANF *per se* não promoveu aumento em nenhuma dessas regiões quando comparada ao tratamento controle, efeito semelhante foi observado com o tratamento com o CBD. Contudo, curiosamente, a associação entre as duas doses de CBD e ANF promoveu um aumento da expressão desse marcador em todas as estruturas analisadas. Rotllant e Armario (2012) descreveram um aumento da expressão de histona fosforilada no resíduo de serina 10 (pH3S10) no estriado dorsal e NAC de ratos após o desafio agudo com ANF. Em todas essas regiões que expressaram pH3S10 também havia neurônios positivos para a proteína c-fos. Outros trabalhos demonstraram maior acetilação das histonas H3 e H4 no estriado após administração aguda e crônica de cocaína que afeta as regiões promotoras de alguns genes importantes, como *c-fos*, *fosB*, *bdnf* e *cdk5* (Kumar et al., 2005; Renthall et al., 2008). Mais particularmente, a administração aguda de cocaína aumentou a fosfoacetilação da histona 3 no promotor de *c-fos* (Kumar et al., 2005) e a administração crônica de ANF reduziu a expressão de c-Fos no estriado através de mecanismos que envolveram o recrutamento induzido por FosB, da desacetilase 1 e do aumento da metilação de histona 3 no promotor do gene *c-fos* (Renthall et al., 2008). Estudo de Todd e colaboradores (2016) observou um aumento da expressão de p-

Ach3 em tratamento repetido entre a associação de CBD e delta-9-THC na ATV, estruturas como o NAC não apresentaram diferenças em relação ao tratamento controle. Ainda, trabalho de Dos-Santos-Pereira observou que o tratamento repetido com L-DOPA aumenta a expressão de p-Ach3 no estriado dorsal de camundongos submetidos a lesão por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Esse efeito é bloqueado pela associação sistêmica de CBD e CPZ. Adicionalmente, a remodelação da cromatina mediada pela hiperacetilação da histona 3 na via mesolímbica é suscetível de promover alterações na transcrição de diversos genes que promovem a manutenção neuroadaptativa na via mesolímbica (Kurdistani et al., 2004). Não podemos descartar que as linhagens de animais utilizadas, o regime e doses das drogas empregadas nesses estudos, além dos métodos utilizados no processamento dos tecidos e ensaios de imunohistoquímica podem ser variáveis importantes no perfil de marcação das estruturas mencionadas. A identificação dos genes-alvo específicos que participam desses efeitos é uma ferramenta que pode elucidar um pouco desses questionamentos. Possíveis candidatos incluem os genes envolvidos na expressão de receptores D2 e de BDNF, que são influenciados por modificações da histona 3 induzidas por canabinoides e psicoestimulantes (Schmidt et al., 2012).

Tem sido proposta uma associação entre os níveis de BDNF e a manifestação da esquizofrenia. Diversos estudos têm investigado os níveis de BDNF no plasma de pacientes com a doença, além de como os antipsicóticos alteram a expressão dessa neurotrofina. No presente estudo observamos que a associação entre CBD e ANF promove aumento na expressão de BDNF no HPC, resultado semelhante ao observado com a associação da CLZ e ANF. Contudo, não observamos alterações na expressão de BDNF no grupo de animais tratados com as interações entre CBD ou CLZ e MK-801. Em ambos os casos tanto o CBD, quanto a CLZ foram capazes de atenuar o prejuízo induzido pelos compostos psicotomiméticos. Em geral, estudos com modelos de depressão e ansiedade em roedores o CBD não altera os níveis de BDNF e dos receptores trkB no HPC e CPF, sugerindo que o efeito neuroprotetor do CBD não esteja envolvido com a ativação de trkB (Zanelati et al., 2010; Campos et al., 2012a). Esse perfil parece ser diferente em outros modelos, por exemplo: Magen e colegas (2010) demonstraram que o tratamento com CBD evitou a diminuição da expressão de BDNF no HPC em um modelo de encefalopatia hepática induzida pela ligação do ducto biliar, de forma semelhante o CBD também aumentou os níveis de BDNF no hipocampo de ratos submetidos a um modelo de estresse oxidativo induzido por ANF (Valvassori et al. 2011). Os antipsicóticos típicos e atípicos parecem regular a expressão de RNA mensageiro para BDNF no hipocampo e em outras regiões cerebrais de roedores de

forma diferente (Lipska et al., 2001; Fumagalli et al., 2004). Enquanto a redução da expressão do BDNF hipocampal induzida por MK-801 foi potenciada pelo haloperidol, essa redução foi normalizada por alguns compostos antipsicóticos atípicos (Fumagalli et al., 2003; 2004). A CLZ modula a expressão gênica em vias associadas com crescimento e diferenciação neuronal, incluindo BDNF (Bai et al., 2003; Rizing et al., 2013). Ainda, a CLZ foi capaz de reverter a diminuição dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal induzida pela ketamina, que assim como o MK-801 é um antagonista de receptores NMDA (Vasconcelos et al., 2015). Pouco se sabe a respeito de como os antipsicóticos regulam a expressão de BDNF no cérebro de pacientes esquizofrênicos. Estudo de Pedrini e colegas (2014) sugere que os níveis séricos de BDNF estão correlacionados com a dose diária de CLZ, e isso pode levar a uma melhora clínica dos pacientes sob o regime dessa droga. Dado o número de estudos que associaram o aumento nos níveis de BDNF com um melhor desempenho cognitivo (Carlino et al. 2013; Dincheva et al. 2012), é razoável supor que os níveis aumentados de BDNF no HPC encontrados em camundongos tratados com CBD poderia explicar o seu perfil em melhorar o desempenho de animais com déficits cognitivos (Gomes et al., 2015) e prejuízo no processamento de informações como observado no presente trabalho. Ainda, o CBD melhorou o desempenho cognitivo e emocional de camundongos submetidos a oclusão da artéria carótida comum bilateral, e foi capaz de aumentar os níveis de BDNF no HPC (Mori et al., 2017). Adicionalmente, foi demonstrado que camundongos deficientes em BDNF apresentaram prejuízo no teste de PPI, reforçando a ideia de que essa neurotrofina possa estar relacionada com a fisiopatologia da esquizofrenia (Lima-Ojeda et al., 2018). Contudo, pouco foi elucidado a respeito dos mecanismos pelos quais o CBD e a CLZ elevam os níveis de BDNF nos modelos citados acima. Além disso, em virtude dos resultados apresentados com o protocolo de administração aguda dos diferentes compostos é de grande interesse do nosso grupo conduzir investigações com o regime de tratamento repetido envolvendo o CBD e CLZ no prejuízo induzido pela anfetamina e MK-801 no PPI sobre o padrão de expressão do BDNF e outro marcadores moleculares.

Por fim, esse estudo abordou o envolvimento da metilação global do DNA no prejuízo induzido por anfetamina ou MK-801 no teste de PPI, como o papel dos pré-tratamentos com CBD ou CLZ em atenuar/bloquear esses efeitos. Selecionamos duas regiões do SNC intimamente envolvidas com a neurobiologia da esquizofrenia, que participam do processamento de informações e que são alvos da terapia com antipsicóticos: o CPF e o estriado ventral. Tanto o pré-tratamento com CBD e CLZ foram capazes de atenuar o prejuízo induzido no PPI seja pela ANF ou pelo MK-801. Assim, demos prosseguimento às análises de

metilação global nas estruturas citadas acima. O tratamento agudo com ANF foi capaz de aumentar a metilação global de DNA no estriado ventral, esse efeito foi bloqueado tanto pelo CBD, quanto pela CLZ. Não observamos alterações no padrão de metilação global induzido por ANF no CPF. O tratamento agudo com MK-801, embora tenha causado prejuízo robusto no teste de PPI não alterou a metilação global em nenhuma das duas estruturas.

Modificações epigenéticas causadas por drogas de abuso desempenham um papel importante na plasticidade neuronal e nas respostas comportamentais induzidas por drogas. Embora poucos estudos tenham investigado os efeitos da ANF na regulação epigenética, dados sugerem que a ANF atua em múltiplos níveis para alterar a interação histona/DNA e recrutar fatores de transcrição que causam a repressão de alguns genes e ativação de outros. É importante ressaltar, que alguns estudos também correlacionam a regulação epigenética induzida pela ANF com resultados comportamentais causados por esse fármaco, sugerindo, portanto, que o remodelamento epigenético está por trás das mudanças comportamentais induzidas por essa droga.

Estudo recente observou que a metilação global de DNA está aumentada no NAC, córtex frontal orbital e CPF de ratos após duas semanas da retirada de ANF administrada durante 14 dias (Mychasiuk et al., 2013). Este resultado sugere que a diminuição da expressão dos genes pode estar por trás dos efeitos em longo prazo causados pelo uso/abuso de psicoestimulantes. Outro estudo corrobora essa observação, a prole de ratas submetidas ao tratamento com metanfetamina apresentou hipermetilação do DNA em promotores de genes envolvidos na aprendizagem, memória e plasticidade sináptica (Izhak et al., 2014). Estes estudos indicam que os efeitos em longo prazo induzidos pela metanfetamina podem ser mediados por alterações na metilação do DNA.

O presente estudo reforça o papel da ANF nas alterações comportamentais observadas no prejuízo no PPI e no aumento da atividade locomotora. Nesse sentido, a utilização de drogas específicas que inibem a acetilação e metilação de histonas, assim como a metilação de DNA, podem ser uma alternativa importante para prevenir e/ou impedir o vício e abuso por essas drogas. Ainda, observamos que tanto o CBD quanto a CLZ foram capazes de impedir o aumento da metilação global no estriado ventral induzido por ANF. Essa estrutura é importante na modulação da neurotransmissão dopaminérgica, nela está contido o NAC, que é considerado um dos centros de convergência de diferentes neurotransmissores que regulam o PPI e recebe uma densa inervação dopaminérgica proveniente da ATV. (Koch et al., 1999). A aplicação direta de drogas que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica no NAC ou uma lesão que desencadeie aumento da sensibilidade dos receptores dopaminérgicos nesse núcleo

promovem prejuízo no teste de PPI (Swerdlow et al., 1992). Swerdlow e colaboradores (1986) observaram que baixas doses de apomorfina, que não modificavam a resposta de PPI em ratos controle, prejudicava o PPI de forma robusta em ratos que apresentavam sensibilização de receptores dopaminérgicos no NAC induzida por lesão com 6-OHDA. O prejuízo no PPI induzido por anfetamina é revertido pela diminuição de dopamina no NAC (Swerdlow et al. 1990). O PPI está prejudicado em ratos que receberam injeção intra-accumbens de dopamina, ou quinpirole, um agonista de receptores D2 (Swerdlow et al., 1992; Wan et al., 1994). Esses efeitos são revertidos por antagonista D2 (Swerdlow et al., 1994; Wan e Swerdlow, 1994). De forma contrária, a depleção de dopamina no NAC de ratos lesados com 6-OHDA, bloqueou o prejuízo induzido por anfetamina no teste de PPI. Ratos administrados com anfetamina apresentam aumento de influxo de dopamina no NAC e concomitante prejuízo no teste de PPI, quando simultaneamente medidos com microdiálise *in vivo* (Zhang et al., 2000). Estudo recente publicado por nosso grupo demonstrou que a microinjeção de CBD no NAC atenuou o prejuízo induzido no PPI pela administração sistêmica de ANF em camundongos (Pedrazzi et al., 2015). Esses dados reforçam o perfil antipsicótico do CBD e de forma inédita apresentam uma provável participação de mecanismos epigenéticos nesse perfil, uma vez que resultado semelhante foi observado com a CLZ. Contudo, novas abordagens que envolvam a participação da metilação em genes específicos induzida por essas drogas, assim como a participação das DNMTs poderão enriquecer as presentes observações desse estudo.

Diversos estudos em modelos animais têm demonstrado o potencial da CLZ em doses clinicamente relevantes em influenciar o remodelamento da cromatina e induzir a demetilação do DNA, a incapacidade do haloperidol ou risperidona em alterar esse perfil podem explicar porque a CLZ é considerada o “padrão ouro” entre os medicamentos utilizados no tratamento dos sintomas negativos em pacientes esquizofrênicos resistentes ao tratamento (Gray e Roth, 2007). Análises indicam que a ação da CLZ e seus derivados na remodelação da cromatina independem da sua ação na neurotransmissão das monoaminas (Guidotti e Grayson, 2014). Adicionalmente, leucócitos obtidos de pacientes esquizofrênicos tratados com CLZ ou haloperidol, demonstrou que o primeiro antipsicótico causava hipometilação global (Melas et al., 2012). Para melhor elucidar essa observação foram utilizados camundongos tratados com metionina ou submetidos à separação materna e em seguida os animais foram submetidos a uma série de modelos comportamentais associados a esquizofrenia. A CLZ ao contrário do haloperidol foi capaz de diminuir a atividade locomotora, melhorou a interação social e o PPI de ambos os grupos de animais. No mesmo sentido dos resultados comportamentais a CLZ também induziu remodelação na cromatina, aumentando a acetilação da histona 3 lisina 9,

como também facilitou a demetilação nos promotores de genes GABAérgicos do CPF e estriado dos animais tratados com metionina. Ainda, foi observado que doses clinicamente relevantes de clozapina, quetiapina e olanzapina foram capazes de alterar a expressão do DNA principalmente em genes de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos sendo responsáveis pelo aumento da expressão de GAD67, reelina e BDNF (Dong et al., 2007; Guidotti et al., 2011). Vale ressaltar, que as investigações em modelos pré-clínicos apresentam limitações devido à esquizofrenia ser uma doença exclusivamente humana e apresentar grande complexidade na sua fisiopatologia e neurobiologia. Contudo, estudos *post mortem* em cérebros de pacientes esquizofrênicos demonstram aumento da metilação em promotores de genes GABAérgicos e glutamatérgicos no CPF, junto a uma diminuição dos respectivos RNAs mensageiros. Diante do exposto, não podemos descartar o papel da CLZ em promover a demetilação em regiões cerebrais que há hipermetilação, extrapolando essa característica para o CBD, devido às semelhanças observadas no comportamento e nas medidas moleculares observadas nesse estudo. No futuro, a identificação de fatores que contribuem para a demetilação do DNA e uma melhor compreensão de como as drogas ativam ou inibem a expressão de genes associados à esquizofrenia podem melhor elucidar a compreensão desse transtorno e ampliar o entendimento do papel de fármacos com potencial antipsicóticos.

7 CONCLUSÃO

Em síntese, nossos dados sugerem que os receptores TRPV1 participam do efeito antipsicótico do CBD no teste de PPI. Curiosamente, a associação de CPZ (5 mg/kg) e CBD (30mg/kg) parece ter apresentado efeito sinérgico e bloqueado a hiperlocomoção induzida por ANF. Nossos dados não corroboram a participação dos receptores 5HT1A na mediação dos efeitos do CBD sobre a hiperlocomoção induzida por ANF. Nesse trabalho também demonstramos que a maquinaria molecular pode estar intimamente envolvida no perfil antipsicótico do CBD. O aumento da expressão tanto da p-Ach3 em regiões límbicas, quanto o BDNF no HPC nas associações entre CBD e ANF merecem novas abordagens para melhor elucidar esses efeitos. Finalmente, de maneira inédita demonstramos que o CBD assim como a CLZ apresentam perfil semelhante na diminuição da metilação global do DNA no estriado ventral induzido por anfetamina. Esses dados reforçam a participação de mecanismos epigenéticos na neurobiologia da esquizofrenia e sugerem que o CBD pode alterar o padrão de metilação global do DNA, resultado reforçado pelo tratamento com a CLZ, que apresentou perfil semelhante.

Os dados apresentados nesse estudo são originais e, em conjunto, ampliam a compreensão sobre a habilidade do CBD de antagonizar os efeitos de fármacos psicotomiméticos em modelos pré-clínicos. Há grande interesse por parte da comunidade médica/científica em compreender o mecanismo de ação do CBD e a participação do sistema endocanabinoide com o objetivo de ampliar as possibilidades de utilização clínica desse composto, uma vez que há limitações relacionadas à utilização dos antipsicóticos conhecidos, principalmente, no que diz respeito à diminuição do risco de efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdolmaleky, H.M. et al. Methylomics in psychiatry: modulation of gene–environment interactions may be through DNA methylation. **AmJMed Genet.** 127: 51–59, 2004.
- Adell, A, Jiménez-Sánchez L, López-Gil X, Romón T. Is the acute NMDA receptor hypofunction a valid model of schizophrenia? **Schizophr Bull.** 38: 9-14, 2012.
- Andreasen, N.C. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. **Lancet.** 346: 477-481, 1995.
- Arnold, S.J. Hippocampal volume is reduced in schizophrenia and schizoaffective disorder but not in psychotic bipolar I disorder demonstrated by both manual tracing and automated parcellation (FreeSurfer). **Schizophr Bull.** 41: 233-249, 2015.
- Bai, O.; Chlan-Fourney, J.; Bowen, R.; Keegan, D.; Li, X.M. Expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus after treatment with antipsychotic drugs. **J. Neurosci. Res.**, 71: 127–131, 2003.
- Banaj, N.; et al. Cognitive and psychopathology correlates of brain white/grey matter structure in severely psychotic schizophrenic inpatients. **Schizophr Res Cogn.** 21: 29-36, 2018.
- Bantick, R. A.; Deakin, J. F.; Grasby, P. M. The 5- HT1A receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? **J. Psychopharmacol.** 15: 37–46, 2001.
- Bastiampillai. T.; Allison, S.; Gupta, A. The clinical utility of therapeutic drug monitoring for clozapine. **Aust N Z J Psychiatry.** 51: 295-296, 2017.
- Barne, N. M.; Sharp, T. A review of 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology.** 38: 1083-1152, 1999.
- Bayer, T.A.; Falkai, P.; Maier, W. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". **J Psychiatr Res.** 33: 543-548, 1999.
- Baylin, S.B. et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum Mol Genet.** 10: 687–692, 2001.
- Beltramo, M.; et al. Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. **J Neurosci.** 20: 3401-347, 2000.

- Bhatttacharyya, S. et al. Induction of psychosis by Δ^9 -tetrahydrocannabinol reflects modulation of prefrontal and striatal function during attentional salience processing. **Arch Gen Psychiatry**. 69: 27-36, 2012.
- Berger, S.L. Molecular biology. The histone modification circus. **Science**. 292: 64-65, 2001.
- Bird, D.C. et al. Lack of phencyclidine-induced effects in mice with reduced neuronal nitric oxide synthase. **Psychopharmacology** 155: 299-309, 2001.
- Bishara, D; Taylor D. Adverse effects of clozapine in older patients: epidemiology, prevention and management. **Drugs Aging**. 31: 11–20, 2014.
- Bisogno, T. et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid receptors, on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **Br J Pharmacol**. 845-852, 2001.
- Boos, H.B.; Aleman, A.; Cahn, W.; Hulshoff Pol, H.; Kahn, R.S. Brain volumes in relatives of patients with schizophrenia: a meta-analysis. **Arch Gen Psychiatry**. 64: 297-304, 2007.
- Boyadjieva, N.; Varandinova, M. Epigenetics of psychoactive drugs. **J Pharm Pharmacol**. 64: 1349-1358, 2012.
- Braff, D.L.; Swerdlow, N.R. Neuroanatomy of schizophrenia. **Schizophr Bull**. 3: 509-512, 1997.
- Breier, A. Clozapine and noradrenergic function: support for a novel hypothesis for superior efficacy. **J Clin Psychiatry**. Suppl B: 122-125, 1994.
- Brito-Melo G.E.; et al. Increase in dopaminergic, but not serotonergic, receptors in T-cells as a marker for schizophrenia severity. **J Psychiatr Res**. 46: 738-742, 2012.
- Brown, A.J. Novel cannabinoid receptors. **Br J Pharmacol**. 152: 567-575, 2007.
- Bunney, B.S. Clozapine: a hypothesised mechanism for its unique clinical profile. **Br J Psychiatry Suppl**. 17: 17-21, 1992.
- Buckley, P.F. New antipsychotic agents: emerging clinical profiles. **J Clin Psychiatry**. 1: 12-17, 1999.

- Burnet, P. W.; Eastwood, S. L.; Harrison, P. J. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**. 15: 442–455, 1996.
- Campos, A.C.; Guimarães, F.S. Involvement of 5HT_{1A} receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**. 199: 223-230, 2008.
- Campos, A.C.; Brant, F.; Miranda, A.S.; Machado, F.S.; Teixeira, A.L. Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of cerebral malaria. **Neuroscience**. 2015 289: 166-80, 2015.
- Carlino, D.; De Vanna, M.; Tongiorgi, E. Is altered BDNF biosynthesis a general feature in patients with cognitive dysfunctions? **Neuroscientist**. 19: 345-353, 2013.
- Carlsson, A.; Lindqvist, M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)**. 20: 140-144, 1963.
- Carrier, E. J.; Auchampach, J. A.; Hillard, C. J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. **Proc. Natl Acad. Sci**. 103: 7895–7900, 2006.
- Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M. K.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; David, J. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. 389: 816-824, 1997.
- Cedar, H.; Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. **Nat Rev Genet**. 10: 295–304, 2009.
- Cortright, D. N.; Szallasi, A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. **Eur J Biochem**. 271: 1814-1819, 2004.
- Crawley, J.N.; Corwin, R.L.; Robinson, J.K.; Felder, C.C.; Devane, W.A.; Axelrod, J. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. **Pharmacol Biochem Behav**. 4: 967-972. 1993.
- Davis, K. L.; Kahn, G. Ko.; Davidson, M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. **Am J Psychiatry**. 148: 1474-1486, 1991.
- Devane, W.A.; Breuer A.; Sheskin T.; Järbe Tu.; Eisen M.S.; Mechoulam, R. A novel probe for the cannabinoid receptor. **J Med Chem**. 35: 2065-2069, 1992.

- Di Marzo, V. Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? **Nat. Rev. Discov.** 7: 438-455, 2008.
- Dincheva, I.; Glatt, C.E.; Lee, F.S. Impact of the BDNF Val66Met polymorphism on cognition: implications for behavioral genetics. **Neuroscientist.** 18: 439-451, 2012.
- Docherty, R.J.; Yeats, J.C.; Piper, A.S. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. **Br J Pharmacol.** 121: 1461-1467, 1997.
- Dong, E. et al. Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate nuclear DNA demethylation in the brain. **Proc Natl Acad Sci USA.** 105: 13614–13619, 2008.
- Dos-Santos-Pereira, M.; da-Silva, C.A.; Guimarães, F.S.; Del-Bel, E. Co-administration of cannabidiol and capsazepine reduces L-DOPA-induced dyskinesia in mice: Possible mechanism of action. **Neurobiol Dis.** 94: 179-195, 2016.
- Drysdale, A.J.; Ryan, D.; Pertwee, R.G.; Platt, B. Cannabidiol-induced intracellular Ca²⁺ elevations in hippocampal cells. **Neuropharmacology.** 621-631, 2006.
- Durany, N.; Michel, T.; Zöchling, R.; Boissl, K.W.; Cruz-Sánchez, F.F.; Riederer, P.; Thome, J. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses. **Schizophr Res.** 52: 79-86, 2001.
- Durany, N.; Thome, J. Neurotrophic factors and the pathophysiology of schizophrenic psychoses. **Eur Psychiatry.** 19: 326-337, 2004.
- Ey, H., Bernard, P., & Brisset, C. (1985). As psicoses esquizofrênicas. In *Manual de psiquiatria* (pp. 535-615). Rio de Janeiro: Masson.
- Fawley, J.A.; Hofmann, M.E.; Andresen, M.C. Cannabinoid 1 and transient receptor potential vanilloid 1 receptors discretely modulate evoked glutamate separately from spontaneous glutamate transmission. **J Neurosci.** 34: 8324-8333, 2014.
- Fumagalli, F.; Molteni, R.; Roceri, M.; Bedogni, F.; Santero, R.; Fossati, C. et al. Effect of antipsychotic drugs on brain-derived neurotrophic factor expression under reduced N-methyl-D-aspartate receptor activity. **J. Neurosci. Res.** 72: 622–628, 2003.
- Fumagalli, F.; Molteni, R.; Bedogni, F.; Gennarelli, M.; Perez, J.; Racagni, G.; Riva, M.A. Quetiapine regulates FGF-2 and BDNF expression in the hippocampus of animals treated with MK- 801. **Mol. Neurosci.** 15: 2109–2112, 2004.

- Geyer, M.A.; Thomson, K.K.; Braff, D.L.; Swerdlow, N.R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensório-motor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. **Psychopharmacology**. 156: 117-154, 2001.
- Geyer, M.A.; Heinssen, R. New approaches to measurement and treatment research to improve cognition in schizophrenia. **Schizophr Bull**. 31: 806-809, 2005.
- Giovanoli, S. Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia. **Transl Psychiatry**. 5;6:e772, 2016.
- Giuffrida, A.; et al. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. **Nat Neurosci**. 2: 358-363, 1999.
- Goldapple, K.; Segal, Z.; Garson, C.; Lau, M.; Bieling, P.; Kennedy, S.; Mayberg, H. Modulation of cortical-limbic pathways in major depression: treatment-specific effects of cognitive behavior therapy. **Arch Gen Psychiatry**. 1: 34-41, 2004.
- Gomes, F.V. et al. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT_{1A} receptors. **J Psychopharmacol**. 26: 104-113, 2012.
- Gomes, F.V.; Llorente, R.; Del Bel, E.A.; Viveros, M.P.; López-Gallardo, M, Guimarães, F.S. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. **Schizophr Res**. 164: 155-163, 2015.
- Graeff, F.G.; Guimarães, F.S.; De Andrade, T.G.; Deakin, J.F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**. 54:129-41. Review, 1996.
- Graeff, F. G.; Guimarães, F. S.; Zuardi, A. W. Medicamentos antipsicóticos. In F. G. Graeff & F. S. Guimarães (Eds.), **Fundamentos de psicofarmacologia** (pp. 69-91). São Paulo: Atheneu, 1999.
- Graham, F.K. The more or less startling effects of weak prestimulation. **Psychophysiology**. 12: 238-248, 1975.
- Gray, J.A.; Roth, B.L. The pipeline and future of drug development in schizophrenia. **Mol Psychiatry**. 12: 904-922, 2007.
- Guidotti, A.; et al. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. **Neuropharmacology**. 60: 1007-1016, 2011.

- Guidotti, A.; Grayson, D.R. Dna methylation and demethylation as targets for antipsychotic therapy. **Dialogues Clin Neurosci.** 16: 419-429, 2014.
- Guimarães, V.M.C.; Zuardi, A.W.; Del Bel, E.A.; Guimarães, F.S. Cannabidiol increases Fos expression in the nucleus accumbens but not in dorsal striatum. **Life Sci.** 75: 633-638, 2004.
- Gururajan, A.; Taylor, D.A.; Malone, D.T. Cannabidiol and clozapine reverse MK-801-induced deficits in social interaction and hyperactivity in Sprague-Dawle rats. **J Psychopharmacol.** 26: 1317-1332, 2012.
- GW Pharmaceuticals. GW Pharmaceuticals Announces Positive Proof of Concept Data in Schizophrenia. **London: GWP Press Release.** 2015.
- Harrison, P.J. & Weinberger D.R. Schizophrenia genes, gene expression, neuropathology: on the matter of their convergence. **Mol Psychiatry.** 10: 40-68, 2005.
- Hashimoto, T.; Bergen, S.E.; Nguyen, Q.L.; Xu, B.; Monteggia, L.M.; Pierri, J.N.; Sun, Z.; Sampson, A.R.; Lewis, D.A. Relationship of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB to altered inhibitory prefrontal circuitry in schizophrenia. **J Neurosci.** 25: 372-383, 2005.
- Henderson, D.C.; et al. Clozapine, diabetes mellitus, weight gain, and lipid abnormalities: A five-year naturalistic study. **Am J Psychiatry.** 157: 975-981, 2000.
- Herman, J.C.; Baylin, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med.** 349: 2042-2054, 2003.
- Hillard, C.J. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 61: 3-18, 2000.
- Holliday, R. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society.** 1: 76-80, 2006.
- Hoffman, H.S.; Ison, J.R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychol Rev.** 87: 175-189, 1980.
- Hohn, A.; Leibrock, J.; Bailey, K.; Barde, Y.A. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. **Nature.** 344: 339-341, 1990.

- Howlett, A.C. Barth, F.; Bonner, T.I.; Gabral, G.; Casellas, P.; Devane, W.A. International Union of Pharmacology. **Pharmacol Rev.** 54: 161-202, 2002.
- Hutchison, K.E.; Swift, R. Effect of d-amphetamine on prepulse inhibition of the startle reflex in humans. **Psychopharmacology.** 143: 394-400, 1999.
- Ichikawa, J.; Meltzer, H.Y. The effect of serotonin_{1A} receptor agonism on antipsychotic drug-induced dopamine release in rat striatum and nucleus accumbens. **Brain Res.** 858: 252–263, 2000.
- Iritani, S.; Niizato, K.; Nawa, H.; Ikeda, K.; Emson, P.C. Immunohistochemical study of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, TrkB, in the hippocampal formation of schizophrenic brains. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 27: 801-807, 2003.
- Iversen, S.D. Is it possible to model psychotic states in animals. **J. Psychopharmacol.** 4: 154– 176, 1987.
- Itzhak, Y.; Ergui, I.; Young, J.I. Long-term parental methamphetamine exposure of mice influences behavior and hippocampal DNA methylation of the offspring. **Mol Psychiatry.** 2014.
- Izzo, A.A. et al. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends Pharmacol Sci.** 30: 515-527, 2009.
- Javitt, D.C. Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, NMDA receptors, and dopamine-glutamate interactions. **Int Rev Neurobiol.** 78: 69-108, 2007.
- Jones, P.; Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science.** 293: 1068–1070, 2001.
- Jones, A.L. et al. Immune dysregulation and self-reactivity in schizophrenia: do some cases of schizophrenia have an autoimmune basis? **Immunol Cell Biol.** 83: 9-17, 2005.
- Kane, J.; Honigfeld, G.; Singer, J. et al. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. **Arch Gen Psychiatry.** 45: 789–796, 1988.
- Kane, J.M. Extrapyramidal side effects are unacceptable. **Eur Neuropsychopharmacology. Review.** 4: 397-403, 2001.

- Kalkman, H.O.; Loetscher, E. GAD(67): the link between the GABA-deficit hypothesis and the dopaminergic- and glutamatergic theories of psychosis. **J Neural Transm (Vienna)**. 110: 803-812, 2003.
- Keepers, G.A.; Casey, D.E. Clinical Management of Acute Neuroleptic-Induced Extrapiramidal Symptoms in Current Psychiatric Therapies, New York, Grune and Stratton, 1986.
- Kilts, C. D. The changing roles and targets for animal models of schizophrenia **Biol. Psychiatry**. 50, 845– 855, 2001.
- Kim, S.R.; Chung, Y.C.; Chung, E.S.; Park, K.W.; Won, S.Y.; Bok, E.; Park, E.S.; Jin, B.K. **Mol Neurobiol**. 35:245-54. Review, 2007.
- Koch, M.; Schnitzler, H.U. The acoustic startle response in rats-circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. **Behav Brain Res**. 89: 35–49, 1997.
- Kossel, A.H.; Cambridge, S.B.; Wagner, U.; Bonhoeffer, T. A caged Ab reveals an immediate/instructive effect of BDNF during hippocampal synaptic potentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 25: 14702-14707, 2001.
- Kovalchuk, Y.; Holthoff, K.; Konnerth, A. Neurotrophin action on a rapid timescale. **Curr Opin Neurobiol**. 14: 558-563, 2004.
- Krishnan, V.; Nestler, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**. 455: 894-902, 2008.
- Kumar, A. et al. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. **Neuron**. 48. 303-314, 2005.
- Kurdistani, S.K.; Tavazoie, S.; Grunstein, M. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. **Cell**. 117: 721-733, 2004.
- Lacroix, L.; Spinelli, S.; Broersen, L.M.; Feldon, J. Blockade of latent inhibition following pharmacological increase or decrease of GABA(A) transmission. **Pharmacol Biochem Behav**. 66: 893-901, 2000.
- Lau, Y-S. et al. Elevated neuronal NOS expression in chronic haloperidol-treated rats. **Neuropharmacology**. 45: 986-984, 2003.

- Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. **Harvey Lect.** 60: 217-259, 1966
- Levin, R. et al. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 35: 1748-1752, 2011.
- Levine, E.S.; Dreyfus, C.F.; Black, I.B.; Plummer, M.R. Differential effects of NGF and BDNF on voltage-gated calcium currents in embryonic basal forebrain neurons. **J Neurosci.** 15: 3084-3091, 1995.
- Leweke, F.M. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Transl Psychiatry.** 2: e94, 2012.
- Li, X.; Cameron, M.D. Potential role of a quetiapine metabolite in quetiapine-induced neutropenia and agranulocytosis. **Chem Res Toxicol.** 25: 1004–1011, 2012.
- Lima-Ojeda, J.M. et al. Altered prepulse inhibition of the acoustic startle response in BDNF-deficient mice in a model of early postnatal hypoxia: implications for schizophrenia. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.** 2018.
- Lin CH, Lane HY, Tsai GE. Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia. **Pharmacol Biochem Behav.** 100: 665-677, 2012.
- Lipska, B.K.; Khaing, Z.Z.; Weickert, C.S. Weinberger, D.R. BDNF mRNA expression in rat hippocampus and prefrontal cortex: effects of neonatal ventral hippocampal damage and antipsychotic drugs. **Eur. J. Neurosci.** 14: 135–144, 2001.
- Lipska, B.K. & Weinberg D.R. To Model a Psychiatric Disorder in Animals: Schizophrenia As a Reality Test. **Neuropharmacology** 23: 223-239, 2005.
- Liu, L.; Simon, S.A. Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. **Neurosci Lett.** May 30: 228:29-32, 1997.
- Lohof, A.M.; Ip, N.Y.; Poo, M.M. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. **Nature.** 1993 May 27;363(6427):350-3.
- López-Muñoz, F.; Alamo, C.; Rubio, G.; Cuenca, E. Half a century since the clinical introduction of chlorpromazine and the birth of modern psychopharmacology. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 28: 205-208, 2004.

- Long, L.E.; Malone, D.T.; Taylor, D.A. Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of PPI in mice. **Neuropsychopharmacology**. 31: 795-803, 2006.
- Lu, Y.; Christian, K.; Lu, B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiol Learn Mem**. 89: 312-323, 2008.
- Luque-Rojas, M.J. Hyperactivity induced by the dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole is attenuated by inhibitors of endocannabinoid degradation in mice. **Int J Neuropsychopharmacol**. 16: 661-676, 2012.
- Magen, I.; Avraham, Y.; Ackerman, Z.; Vorobiev, L.; Mechoulam, R.; Berry, E.M. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in mice with bile duct ligation. **J Hepatol**. 51: 528-534, 2009.
- Maione, S.; et al. Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. **Br J Pharmacol**. 150: 766-781, 2007.
- Malone, D.T.; Jongejan, D.; Taylor, D.A. Cannabidiol reverses the reduction in social interaction produced by low dose Delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 93: 91-96, 2009.
- Marcotte, E.R.; Pearson D.M.; Srivastava L.K. Animal models of schizophrenia: a critical review. **J Psychiatry Neurosci**. 26: 395-410. 2001.
- Marder, S.R.; Wirshing, W.C. Van Putten, T. Drug treatment of schizophrenia. Overview of recent research. **Schizophr Res**. 4: 81-90, 1991.
- Martín, A.B.; et al. Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2dopamine receptor-mediated motor behaviors. **Neuropsychopharmacology**. 33: 1667-1679, 2008.
- Mayberg, H.S.; Silva, J.A.; Brannan, S.K.; Tekell, J.L.; Mahurin, R.K.; McGinnis, S.; Jerabek, P.A. The functional neuroanatomy of the placebo effect. **Am J Psychiatry**. 5: 728-737, 2002.
- Melas, P.A.; Rogdaki, M.; Osby, U.; Schalling, M.; Lavebratt, C.; Ekstrom, T.J. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. **FASEB J**. 26: 2712-2718, 2012.

- Mezey, E. et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proc Natl Acad Sci.** 97: 3655–3660, 2000.
- Micale, V.; Cristino, L.; Tamburella, A.; Petrosino, S.; Leggio, G.M.; Drago, F.; Di Marzo, V. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. **Neuropsychopharmacology.** 34: 593-606, 2008.
- Moore, H.; West, A.R.; Grace, A.A. The regulation of forebrain dopamine transmission: relevance to the pathophysiology and psychopathology of schizophrenia. **Biological Psychiatry.** 46: 40-55, 1999.
- Moreira, F.A.; Guimarães, F.S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs. **Eur J Pharmacol.** 512: 199-205, 2005.
- Mori, M.A.; Meyer, E.; , Soares, L.M.; Milani, H.; Guimarães, F.S.; de Oliveira, R.M.W. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 75: 94-105, 2017.
- Mychasiuk, R.; Muhammad, A.; Ilnytsky, S.; Kolb, B. Persistent gene expression changes in NAc, mPFC, and OFC associated with previous nicotine or amphetamine exposure. **Behav Brain Res.** 256: 655-661, 2013.
- Newman-Tancredi, A. The importance of 5-HT1A receptor agonism in antipsychotic drug action: Rationale and perspectives. **Curr. Opin. Invest. Drugs.** 11: 802–812, 2010.
- Niitsu, T.; et al. A positive correlation between serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor and negative symptoms in schizophrenia. **Psychiatry Res.** 215: 268-273, 2014.
- Noh, J.S. et al. DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. **Proc Natl Acad Sci USA.** 102: 1749–1754, 2005.
- Orsolini, L.; Tomasetti, C.; Valchera, A. et al. An update of safety of clinically used atypical antipsychotics. **Exp Opin Drug Saf.** 15: 1329–1347, 2016.
- Osmond, H.; Smythies, J. Schizophrenia: a new approach. **J Ment Sci.** 98: 309-315, 1952

- Paradisi, A. et al. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. **The Journal of biological chemistry**. 283: 6005-6012, 2008.
- Pasquariello, N. et al. Regulation of gene transcription and keratinocyte differentiation by anandamide. **Vitamins and hormones**. 81: 441-467, 2009.
- Pedrazzi, J.F.; Issy, A.C.; Gomes, F.V.; Guimarães, F.S.; Del-Bel, E.A. Cannabidiol effects in the prepulse inhibition disruption induced by amphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**. 232: 3057-3065, 2015.
- Pedrini, M.; et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and clozapine daily dose in patients with schizophrenia: a positive correlation. **Neurosci Lett**. 491: 207-210, 2011.
- Pertwee, R.G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. **Br J Pharmacol**. 153: 199–215, 2008.
- Petitot, F. et al. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. **Life Sci**. 63: 1-6, 1998.
- Phillips, W.A.; Silverstein, S.M. Convergence of biological and psychological perspectives on cognitive coordination in schizophrenia. **Behav Brain Sci**. 26: 65-82, 2003.
- Pillai, A.; Mahadik, S.P. Increased truncated TrkB receptor expression and decreased BDNF/TrkB signaling in the frontal cortex of reeler mouse model of schizophrenia. **Schizophr Res**. 100: 325-333, 2008.
- Pillai, A. Brain-derived neurotropic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. **Neurosignals**. 16: 183-193, 2008.
- Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**. 4: 873-884. Review, 2003.
- Pollin, W.; Cardon, P.V. Jr.; Kety, S.S. Effects of amino acid feedings in schizophrenic patients treated with iproniazid. **Science**. 133: 104-105, 1961.
- Poo, M.M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci**. 2: 24-32, 2001.

- Pucci, M. et al. Epigenetic control of skin differentiation genes by phytocannabinoids. **British journal of pharmacology**. 170: 581-591, 2013.
- Renthal, W. et al. Delta FosB mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure. **J. Neurosci**. 28: 7344e7349. 2008.
- Resstel, L.B. 5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Br. J. Pharmacol**. 156: 181188, 2009.
- Reynolds GP. Developments in the drug treatment of schizophrenia. **Pharmacol Sci**. 13: 140, 1992.
- Riecher-Rössler, A.; Butler, S.; Kulkarni, J. Sex and gender differences in schizophrenic psychoses-a critical review. **Arch Womens Ment Health**. 2018.
- Rizing, M.A.; McQuillin, A.; Ng, A.; Robinson, M.; Harrison, A.; Zvelebil, M.; Hunt, S.; Gurling, H. A gene expression and systems pathway analysis of the effects of clozapine compared to haloperidol in the mouse brain implicates susceptibility genes for schizophrenia, **J. Psychopharmacol**. 26: 1218–1230, 2013.
- Rose, C.R.; Blum, R.; Kafitz, K.W.; Kovalchuk, Y.; Konnerth, A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. **Bioessays**. 26: 1185-1194, 2004.
- Rotllant, D.; Armario, A. Brain pattern of histone H3 phosphorylation after acute amphetamine administration: Its relationship to brain c-fos induction is strongly dependent on the particular brain área. **Neuropharmacology**. 62: 1073-1078, 2012.
- Rottanburg, D. et al. Cannabis-associated psychosis with hypomanic features. **Lancet**. 2: 1364-1366, 1982.
- Rupp, A.; Keith, S.J. The costs of schizophrenia. Assessing the burden. **Psychiatr Clin North Am**. 16: 413-423, 1993.
- Russo, E.B.; Burnett, A.; Hall., Parker.; K.K. Agonist properties of cannabidiol at 5HT1a receptor. **Neurochem Res**. 30: 1037-1043, 2005.
- Schmidt, H.D.; Sangrey, G.R.; Darnell, S.B.; Schassburger, R.L.; Cha, J.H.; Pierce, R.C.; Sadri-Vakili, G. Increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the ventral tegmental area during cocaine abstinence is associated with increased histone acetylation at BDNF exon I-containing promoters. **J Neurochem**. 120: 202-209, 2012.

- Schubart, C.D. et al. Cannabidiol as a potential treatment for psychosis. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24: 51-64, 2013.
- Schuman, E.M. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol.* 9: 105-109, 1999.
- Seeman, P.; Kapur, S. Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D2 receptors. Implications for atypical for antipsychotic action. *J. Psychiatry Neuroscience.* 57: 553-559, 2000.
- Seillier, A.; Advani, T.; Cassano, T.; Hensler, J.G.; Giuffrida, A. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase and CB1 receptor antagonism differentially affect behavioural responses in normal and PCP-treated rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13: 373–386, 2010.
- Shimabukuro, M.; et al. Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: a potential link between epigenetics and schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 41: 1042-1046, 2007.
- Shumake, J.; Edwards, E.; Gonzalez-Lima, F. Dissociation of septo-hippocampal metabolism in the congenitally helpless rat. *Neuroscience.* 2: 373-377, 1997.
- Silverstein, S.M.; Moghaddam, B., Wykes, T. Schizophrenia: evolution and synthesis. *The MIT press*, 390p, 2013.
- Siskind D, McCartney L, Goldschlager R, Kisely S. Clozapine v. first- and second-generation antipsychotics in treatment-refractory schizophrenia: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry.* 209: 385-392, 2016.
- Slack, J.M. (Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nature reviews Genetics.* 3: 889-895, 2002.
- Strosznajder, J.; Chalimoniuk, M.; Samochocki, M. Activation of serotonergic 5-HT1A receptor reduces Ca(2+)- and glutamatergic receptor-evoked arachidonic acid and No/cGMP release in adult hippocampus. *Neurochem Int.* 4:439-444, 1996.
- Szallasi, A.; Di Marzo, V. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci.* 23: 491-497. Review, 2000.
- Sonego, A.B.; Gomes, F.V.; Del Bel, E.A.; Guimaraes, F.S. Cannabidiol attenuates haloperidol-induced catalepsy and c-Fos protein expression in the dorsolateral striatum via 5-HT1A receptors in mice. *Behav Brain Res.* 309: 22-28, 2016.

- Stahl SM. Stahl's essential psychopharmacology: prescriber's guide. 5th ed. New York, NY: Cambridge University Press, p.xvi, 802, 2014.
- Strous, R.D. & Shoenfeld, Y. Schizophrenia, autoimmunity and immune system dysregulation: a comprehensive model updated and revisited. **J Autoimmun.** 27:71-80, 2006.
- Swerdlow, N.R.; Geyer, M.A. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. **Schizophr Bull.** 24: 285-301, 1998.
- Swerdlow, N.R.; Geyer, M. A.; Braff, D. L. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. **Psychopharmacology.** 156: 194-215, 2001.
- Swerdlow, N.R.; Gur, R.E.; Braff, D.L. Consortium on the Genetics of Schizophrenia (COGS) assessment of endophenotypes for schizophrenia: an introduction to this Special Issue of Schizophrenia. **Research. Schizophr Res.** 163: 9-16, 2015.
- Swerdlow, N.R.; Braff, D.L.; Geyer, M.A. Sensorimotor gating of the startle reflex: what we said 25 years ago, what has happened since then, and what comes next. **J Psychopharmacol.** 11: 1072-1081. 2016.
- Szalassi, A; Blumberg, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol.** 51: 159-212, 1999.
- Takahashi, M.; et al. Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. **Mol Psychiatry.** 5: 293-300, 2000.
- Tallman, J.F. Development of novel antipsychotic drugs. **Brain Res Brain Res Rev.** 31: 385-390, 2000.
- Thomas, B.F. et al. Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. **J Pharmacol Exp Ther.** 285: 285-292, 1998.
- Todd, S.M.; Zhou, C.; Clarke, D.J.; Chohan, T.W.; Bahceci, D.; Arnold, J.C. Interactions between cannabidiol and Δ_9 -THC following acute and repeated dosing: Rebound hyperactivity, sensorimotor gating and epigenetic and neuroadaptive changes in the mesolimbic pathway. **Eur Neuropsychopharmacol.** 27: 132-145, 2017.

- Toll, A.; Mané, A.. Brain-derived neurotrophic factor levels in first episode of psychosis: A systematic review. **World J Psychiatry**. 22: 154-159, 2015.
- Tsankova, N. M. et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature reviews Neuroscience**. 8: 355-367, 2007.
- Tsankova, N.M. et al. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature neuroscience**. 9: 519-525, 2006.
- Tyler, W.J.; et al. BDNF increases release probability and the size of a rapidly recycling vesicle pool within rat hippocampal excitatory synapses. **J Physiol**. 574: 787-803, 2006.
- Tzavara, E.T.; et al. Endocannabinoids activate transient receptor potential vanilloid 1 receptors to reduce hyperdopaminergia-related hyperactivity: therapeutic implications. **Biol Psychiatry**. 59: 508-515, 2006.
- Valvassori, S.S.; et al. Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J Psychopharmacol**. 25: 274-280, 2011.
- Vasconcelos, G.S.; Ximenes, N.C.; Soares de Sousa, C.N.; De Oliveira, T.Q.; Lima, LL.; et al. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenialike symptoms induced by ketamine in mice: participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms, **Schizophr. Res**. 165: 163–170, 2015.
- Van Der Stelt, M.; Di Marzo, V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **Eur J Biochem**. 10: 1827-1834. Review, 2004.
- Van Os, J.; Murray, R. Gene-environment interactions in schizophrenia. **Schizophr Bull**. 34: 1064-1065, 2008.
- Warnez S, Alessi-Severini S. Clozapine: a review of clinical practice guidelines and prescribing trends. **BMC Psychiatry**. 14: 102, 2014.
- Waterhouse, E.G.; Xu, B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. **Mol Cell Neurosci**. 42: 81-89, 2009.
- Weickert, C.S.; Hyde, T.M.; Lipska, B.K.; Herman, M.M.; Weinberger, D.R.; Kleinman, J.E. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. **Mol Psychiatry**. 8: 592-610, 2003.

- Weiss, S.M.; Feldon, J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia. **Psychopharmacology**. 156: 305-326, 2001.
- Winslow, J.T.; Parr, L.A.; Davis, M. Acoustic startle, prepulse inhibition, and fearpotentiated startle measured in rhesus monkeys. **Society of Biological Psychiatry**. 51: 859-866, 2002.
- Wong, A.H. et al. Neurocognitive deficits and neurological signs in schizophrenia. **Schizophr Res**. 23: 139-146, 1997.
- Wong, A.H.; et al. Identification of candidate genes for psychosis in rat models, and possible association between schizophrenia and the 14-3-3eta gene. **Mol Psychiatry**. 8: 156-166, 2003.
- Yoshii, A.; Constantine-Paton, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. **Dev Neurobiol**. 70: 304-322, 2010.
- Zanelati, T.V.; Biojone, C.; Moreira, F.A.; Guimarães, F.S.; Joca, S.R. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. **Br J Pharmacol**. 1: 122-128, 2010.
- Zhang, J.; Forstam, C.; Engel, J.A.; Svensson, L. Role of dopamine in prepulse inhibition of acoustic startle. **Psychopharmacology**. 149: 181-188, 2000.
- Zhubi, A.; et al. An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes. **Schizophr Res**. 111: 115-122, 2009.
- Zuardi, A.W.; Shirakawa, I.; Finkelfarb, E.; Karniol I.G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology**. 76: 245-250, 1982.
- Zuardi, A.W.; Rodrigues, J.A.; Cunha, J.M. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. **Psychopharmacology**. 104: 260-264, 1991.
- Zuardi, A.W.; Loureiro, S.R.; Rodrigues, C.R. Reliability, validity and factorial dimensions of the interactive observations scale for psychiatric inpatients. **Acta Psychiatr Scand**. 91: 247-251, 1995.
- Zuardi, A.W.; Crippa, J.A.S.; Hallak J.E.C.; Moreira F.A.; Guimarães F.S. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 39: 421-429, 2006.

- Zuardi, A.W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 30: 271-280, 2008.
- Zuardi, A.W.; Crippa, J.A.; Hallak, J.E. Cannabis sativa: the plant that can induce unwanted effects and also treat them. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. Suppl 1:S1-2, 2010.
- Zuardi, A.W.; Crippa, J.A.; Hallak, J.E.; Bhattacharyya, S.; Atakan, Z.; Martin-Santos, R.; McGuire, P.K.; Guimarães, F.S A critical review of the antipsychotic effects of cannabidiol: 30 years of a translational investigation. **Curr Pharm Des**. 18: 5131-40, 2012.

APÊNDICES

Apêndice A

Experimento 1: Perfil da metilação global em estruturas relacionadas a neurobiologia da esquizofrenia em desafio agudo ou repetido com ANF.

Nosso **objetivo** foi investigar o efeito tanto do tratamento agudo e repetido com ANF em grupos independentes de camundongos submetidos ao PPI e avaliar a metilação global em estruturas envolvidas com a fisiopatologia da esquizofrenia: córtex pré-frontal, estriado dorsal, estriado ventral e hipocampo para as posteriores interações com o CBD.

Protocolo: Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: agudo e repetido. O grupo agudo recebeu uma aplicação i.p. de salina (10 ml/kg) ou ANF (5 mg/kg) e após 10 minutos foram submetidos ao PPI. O grupo repetido foi tratado durante 10 dias com uma aplicação i.p. de salina (10 ml/kg) ou ANF (5mg/kg) e após 10 minutos foram submetidos ao teste de PPI.

Subgrupos: SAL (aguda), ANF (aguda), SAL (repetida) e ANF (repetida); n=8 por tratamento.

Resultados: Tanto o tratamento agudo quanto o crônico com ANF promoveram prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas em comparação ao seu controle salina (figura 1). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito geral significativo do tratamento [$F(3,28)=12,392$; $p<0,001$], intensidade do pré-pulso [$F(2,56)=18,668$; $p,0,001$], e interação entre os fatores intensidade de pré-pulso e tratamentos [$F(6,56)=2,942$; $P=0.014$]. O tratamento repetido com ANF promoveu aumento significativo da resposta de sobressalto acústico [$F(3,28)=3,62$; $P=0.025$; Duncan, $p<0.05$] (Tabela 1). Em relação aos níveis de metilação global a ONE WAY ANOVA detectou que o tratamento agudo com ANF diminuiu o perfil de metilação global no córtex pré-frontal [$F(3,24)=5,643$; $P=0.0045$; Duncan, $p<0.05$], promoveu aumento da metilação global no estriado ventral [$F(3,23)=3,062$; $P=0.0484$; Duncan, $p<0.05$]. O tratamento repetido com salina aumentou os níveis de metilação global no hipocampo, e por fim o tratamento repetido com ANF elevou os níveis de metilação em relação ao seu controle [$F(3,24)=5,874$; $P=0.0037$; Duncan, $p<0.05$]. Não houve diferenças na metilação global entre os tratamentos no estriado dorsal (figura 2).

Figura 1: A ANF promoveu prejuízo no PPI no protocolo agudo e repetido. Ambos os tratamentos com ANF promoveram prejuízo significativo na % de PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas em relação aos seus respectivos controles. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo Salina.

Figura 2: Efeito dos tratamentos agudo e repetido com ANF sobre a metilação global de DNA no córtex pré-frontal, estriado dorsal, estriado ventral e hipocampo. O tratamento agudo com ANF respectivamente aumentou e diminuiu a metilação global no estriado ventral e córtex pré-frontal. O tratamento repetido com salina aumentou a metilação global no hipocampo e esse efeito foi exacerbado pela ANF. ONE WAY ANOVA, post hoc Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo Salina. # $p < 0.05$ em comparação ao respectivo tratamento do outro regime de injeção.

Experimento 2: Microinjeção de CBD no córtex motor no prejuízo induzido por ANF no PPI.

Nosso **objetivo** foi investigar o efeito da microinjeção de CBD no córtex motor sobre o prejuízo induzido por ANF no teste de PPI. Animais com o sítio de microinjeção fora do córtex pré-frontal foram utilizados como controle negativo para os efeitos do CBD.

Protocolo: Após uma semana da cirurgia para a implantação unilateral de cânula no córtex motor os animais foram submetidos a uma sessão de PPI (pré-teste pós-cirúrgico).

Subgrupos: Veículo (óleo de semente uva; 0.2 μ L) + Salina, CBD (60 nmol; 0.2 μ L) + Salina, Veículo (óleo de semente de uva; 0.2 μ L) + ANF, CBD (60 nmol; 0.2 μ L) + ANF; n= 8 por tratamento. Imediatamente após a injeção central os animais foram tratados com salina ou ANF. O intervalo entre a injeção central e o início do teste de PPI foi de 5 minutos.

Resultados: O tratamento agudo com ANF promoveu prejuízo significativo na % de PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. A microinjeção de CBD no córtex motor não foi capaz de atenuar o prejuízo induzido pela ANF. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$F_{3,28} = 9.258$, $P \leq 0.000$], não houve efeito significativo da intensidade de pré-pulso [$F_{2,56} = 2.526$, $P = 0.089$], e nem interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F_{6,56} = 0.533$, $P = 0.781$]. A aplicação de CBD no córtex motor não produziu modificações no PPI (Figura 1).

Figura 1: Efeito da microinjeção de CBD no córtex motor sobre o prejuízo induzido por ANF PPI. A ANF causou prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. A microinjeção de CBD no córtex motor não foi capaz de atenuar o prejuízo em nenhuma das intensidades de pré-pulso. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+SAL.

Inserção e localização das Cânulas no Córtex Motor Secções adjacentes e representativas dos terços cerebrais rostral, medial e caudal, obtidas em criostato foram armazenadas em solução anticongelante e montadas sequencialmente em lâminas gelatinizadas. A técnica de coloração cresil violeta para substância de Nissl foi utilizada para a localização do sítio de inserção das cânulas no córtex motor (Figura 2). As cinco secções apresentadas ilustram a variedade de inserções no plano ântero-posterior do encéfalo dos camundongos (Bregma 1.98 mm a 1.54 mm).

Figura 2: Identificação do sítio de inserção das cânulas no córtex motor no plano ântero-posterior de camundongos. O local de inserção das cânulas está representado nas figuras acima em formato de ponto. As imagens foram retiradas do atlas Paxinos & Watson de camundongo.

Experimento 3: Associação do tratamento repetido entre CBD e ANF no PPI.

Nosso **objetivo** foi investigar se o efeito do tratamento repetido com CBD seria capaz de impedir o prejuízo induzido pelo tratamento repetido com ANF no PPI. Encontradas diferenças entre a associação do CBD e ANF em relação aos controles prosseguiríamos com as análises de expressão de marcadores gliais e FOS-B.

Protocolo: Durante dez dias os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10 ml/kg) ou CBD (30 ou 60 mg/kg), seguida 30 minutos depois de uma aplicação intraperitoneal de salina (10 ml/kg) ou ANF (5 mg/kg). Ao final desse regime de tratamento os animais foram submetidos, 20 minutos depois da segunda aplicação ao teste de PPI. Imediatamente após o teste, os animais foram anestesiados, sacrificados e os encéfalos cuidadosamente retirados e processados.

Subgrupos: V+SAL, CBD+SAL, V+ANF, CBD+ANF; n=8 por tratamento.

Resultados: A ANF causou prejuízo nas intensidades de 85 e 90 dB. Nenhuma dose de CBD foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF no PPI (figura 1). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [(F4,35)= 7.461, $P < 0.001$], efeito significativo da intensidade de pré-pulso [(F2,70) = 4.173, $P = 0.019$], e interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [F(8,70) = 3.374, $P = 0.003$].

Figura 1: Efeito do tratamento repetido entre CBD e ANF no PPI. A ANF causou prejuízo nas intensidades de pré-pulso de 85 e 90 dB. O pré-tratamento com CBD em nenhuma dose foi capaz de atenuar esse efeito. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+SAL.

COLABORAÇÕES

1. Colaboração Dr. Francisco S. Guimarães

Efeito do pré-tratamento com URB597 no prejuízo induzido por MK-801 no PPI.

Racional: Em estudo anterior do nosso grupo, o URB597 de forma dose-dependente foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF no teste de PPI, esse resultado nos animou a investigar o potencial desse composto na atenuação do prejuízo induzido por MK-801, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no teste de PPI.

Protocolo: Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10 ml/kg) ou URB597 (0.1, 0.3 e 1mg/kg; URB), seguida 30 minutos depois de uma aplicação i.p. de salina (10 ml/kg) ou MK-801 (0.5 mg/kg), sendo submetidos, 15 minutos depois da segunda aplicação ao teste de PPI.

Subgrupos: V+SAL, URB+SAL, V+MK-801, URB+MK-801; $n=6-8$ por tratamento.

Resultados: O tratamento agudo com MK-801 não promoveu prejuízo significativo em nenhuma das intensidades de PPI analisadas. Contudo o tratamento URB597 + MK-801 promoveu prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas (Figura 1). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$F_{5,38} = 10.304$, $P < 0.001$], da intensidade de pré-pulso [$F_{2,76} = 8.835$, $P < 0.001$], mas não revelou interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F_{10,76} = 1.202$, $P = 0.334$]. A aplicação de URB597+SAL não produziu modificações no PPI.

Figura 1: Efeito da associação URB597 e MK-801 no PPI. O MK-801 não causou prejuízo em nenhuma intensidade de pré-pulso, contudo as três doses de URB597 associadas ao MK-801 promoveram prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas, quando comparadas ao grupo controle. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+SAL.

Efeito do pré-tratamento com HU-910 no PPI.

Racional: Investigação do potencial antipsicótico do composto sintético HU-910, agonista de receptores CB2. Esse composto demonstrou potencial antipsicótico em camundongos suíços submetidos ao teste de Campo Aberto pelo grupo do professor Francisco Silveira Guimarães. Nesse modelo, a hiperlocomoção foi induzida por MK-801, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e foi bloqueada pelo pré-tratamento com HU-910. Nesse sentido, nosso objetivo foi investigar o efeito do tratamento sistêmico com HU-910 sobre o prejuízo induzido tanto por MK-801 quanto por ANF no teste de PPI.

Protocolo: Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10 ml/kg) ou HU-910 (10mg/kg), seguida 20 minutos depois de uma aplicação i.p. de salina (10 ml/kg) ou ANF (10 mg/kg) ou MK-801 (0.5mg/kg), sendo submetidos, 20 minutos depois da segunda aplicação ao teste de PPI.

Subgrupo – ANF: V+SAL, HU-910+SAL, V+ANF, HU-910+ANF; $n=7-8$ por tratamento.

Subgrupo – MK-801: V+SAL, HU-910+SAL, V+MK-801, HU-910+MK-801; $n=7-8$ por tratamento.

Resultados: - Grupo ANF: A ANF promoveu prejuízo significativo no PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com, HU-910, bloqueou o efeito da ANF em todas as intensidades de pré-pulso (Figura 1). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito geral significativo do tratamento [$F(3,26)=10,303$; $p < 0,001$], intensidade do pré-pulso [$F(2,52)=11,008$; $p=0,001$], mas não revelou interação entre os fatores intensidade de pré-pulso e tratamentos [$F(6,52)=1,976$; $p=0.086$]. A aplicação do tratamento HU-910 + Salina, não produziu modificações no PPI. Não houve alterações significativas na resposta de sobressalto acústico entre os diferentes tratamentos.

Figura 1: Efeito do pré-tratamento com HU-910 no sobre o prejuízo induzido por ANF no PPI. A ANF causou prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com HU-910 impediu o prejuízo induzido por ANF em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo Veículo + Salina. # $p < 0.05$ em comparação ao grupo Veículo + ANF.

Resultados: - Grupo MK-801: O MK-801 promoveu prejuízo significativo no PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com, HU-910, não foi capaz de bloquear o efeito do MK-801 em nenhuma das intensidades de pré-pulso analisadas (Figura 2). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito geral significativo do tratamento [$F(3,20)=6,414$; $p=0,003$], intensidade do pré-pulso [$F(2,40)=3,849$; $p=0,03$], mas não revelou interação entre os fatores intensidade de pré-pulso e tratamentos [$F(6,40)=1,484$; $p=0.208$].

Figura 3: Efeito do pré-tratamento com HU-910 no sobre o prejuízo induzido por MK-801 no PPI. O MK-801 causou prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. O pré-tratamento com HU-910 não foi capaz de impedir o prejuízo induzido por ANF em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo Veículo + Salina.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS: O papel dos receptores CB2 ainda permanece pouco elucidado. Evidências de estudos farmacológicos (Onaivi et al. 2008; Ishiguro et al. 2010; García Gutiérrez et al. 2012) e genéticos (Ortega - Alvaro et al. 2011) sugerem que esses receptores expressos no sistema nervoso central são capazes de modular comportamentos como a atividade locomotora, estereotipia e ansiedade. Além disso, esses receptores compartilham a propriedade dos receptores CB1 modulando a diminuição da liberação de neurotransmissores (Atwood et al. 2012). Contudo, devido as diferenças no perfil de expressão desses receptores, pode haver efeitos singulares entre CB1 e CB2 sobre comportamentos mais complexos processados através dos circuitos cerebrais.

Em estudo conduzido por Khella e colaboradores em 2014 observou que a ativação de receptores CB2 pelo composto JWH015 foi capaz de bloquear o prejuízo induzido por MK-801 em camundongos da linhagem balb/c. Esse efeito desaparecia quando os animais eram pré-tratados com o antagonista de receptores CB2, AM630. Há a especulação que a ativação de receptores CB2 no córtex pré-frontal poderia estar envolvida no bloqueio do prejuízo induzido por MK-801 no PPI observado nesse estudo, embora esses receptores também sejam expressos em outras regiões como o HPC, que participa da modulação do PPI (Brusco et al. 2008).

Nossos resultados demonstraram que o composto HU-910 foi capaz de impedir o prejuízo induzido por ANF em todas as intensidades de pré-pulso analisadas, mas não apresentou esse efeito sobre o prejuízo induzido por MK-801 no teste de PPI. Nesse sentido, é de nosso interesse utilizar outras doses de HU-910 nessas interações em experimentos futuros.

2A. Colaboração Dra. Carolina Issy

Efeito do sinergismo de CBD e Nitroprussiato de Sódio no prejuízo induzido por ANF no PPI.

Racional: Recentemente nosso grupo publicou dois trabalhos que respectivamente envolveram o sistema nitrérgico e endocanabinoide no prejuízo induzido por ANF no teste de PPI. No primeiro trabalho publicado por Issy e colaboradores (2014) foi observado que um doador de óxido nítrico, o Nitroprussiato de Sódio (NPS) foi capaz de forma dose-dependente atenuar o prejuízo induzido pela ANF no PPI. No segundo trabalho, publicado por Pedrazzi e colaboradores (2015) foi observado que o CBD e o URB597 de forma dose-dependente foram capazes de atenuar o prejuízo induzido por ANF no PPI. Adicionalmente, ensaios clínicos têm demonstrado que tanto o CBD, quanto o NPS apresentam potencial antipsicóticos (Zuardi et al., 2012; Hallak et al., 2013). O sistema nitrérgico e o endocanabinoide apresentam

neurotransmissão atípica e modulam diversos neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia e nos circuitos que envolvem o reflexo de sobressalto e sua inibição. Dessa maneira, decidimos investigar se doses sub-efetivas do CBD (5 mg/kg) e do NPS (0.05 mg/kg) apresentariam sinergismo na atenuação do prejuízo induzido por ANF no PPI.

Protocolo: Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10 ml/kg) ou CBD 5 mg/kg) seguida 20 minutos depois de uma aplicação i.p. de veículo (10 ml/kg) ou Nitroprussiato de Sódio (0.05 mg/kg; NPS) seguida, 20 minutos depois de uma aplicação i.p. de salina (10ml/kg) ou ANF (10mg/kg; ANF) sendo submetidos, 20 minutos depois da terceira aplicação ao teste de PPI.

Subgrupos: V+V+SAL, V+CBD+SAL, V+NPS+SAL, V+V+ANF, V+CBD+ANF, V+NPS+ANF, CBD+NPS+ANF; n=8 por tratamento.

Resultados: O tratamento agudo com ANF promoveu prejuízo significativo nas intensidades de pré-pulso de 80 e 90 dB. A dose sub-efetiva de CBD não foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF no teste de PPI, assim como a dose sub-efetiva de NPS. Em contrapartida, a associação de CBD e NPS de forma sinérgica foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF na intensidade de pré-pulso de 90 dB (Figura 1) A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$F_{6,49} = 8.911$, $P < 0.001$], da intensidade do pré-pulso [$F_{2,98} = 3.108$, $P = 0.040$], mas não houve interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F_{12,98} = 0.877$, $P = 0.573$].

Figura 1: Efeito do sinergismo de doses sub-efetivas de CBD e NPS no prejuízo induzido por ANF no PPI. A ANF promoveu prejuízo nas intensidades de pré-pulso de 80 e 90 dB. A dose sub-efetiva de CBD e a de NPS apresentaram efeito sinérgico atenuando o prejuízo induzido por ANF na intensidade de 90 dB. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS Resultados do nosso grupo demonstraram que o tratamento com doador de óxido nítrico (NO), o NPS, de forma dose-dependente reverteu o prejuízo induzido pela ANF no teste de PPI (Issy et al., 2014). Issy e colaboradores (2014) demonstraram que o aumento nos níveis de NO/GMP cíclico induzido pela administração sistêmica de NPS melhora o desempenho no teste de PPI, além disso, o pré-tratamento com NPS é capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF nesse teste. Adicionalmente estudos do nosso grupo demonstraram que o CBD de forma dose-dependente atenua o prejuízo induzido por ANF e MK-801 no teste de PPI (GOMES et al., 2014; Pedrazzi et al., 2015). Estudos sugerem que o perfil antipsicótico do CBD pode envolver o aumento da sinalização da anandamida e sua afinidade pelos receptores TRPV1 (Bisogno et al., 2001; Long et al., 2006; Schubart et al., 2013). A neurotransmissão nitrérgica e endocanabinoide participam da modulação de diversos neurotransmissores, como por exemplo, a dopamina. Nesse estudo observamos que a combinação de CBD e NPS em doses sub-efetivas atenuou o prejuízo induzido por ANF no teste de PPI, sugerindo que ambos os sistemas estão envolvidos no efeito comportamental observado. O resultado obtido nesse ensaio nos anima a prosseguir nas investigações que envolvem os dois sistemas neurotransmissores em prejuízo induzido por drogas psicotomiméticas no PPI.

2B. Colaboração Dra. Ana Carolina ISSY

Efeito do sinergismo de CBD e 7-Nitroindazole no prejuízo induzido por ANF no PPI.

Racional: O inibidor farmacológico da sintase do óxido nítrico 7-Nitroindazole (7NI) atenua o prejuízo induzido por metilfenidato no PPI (Issy et al. 2014). Efeitos semelhantes são observados com o CBD (Pedrazzi et al., 2015). A interação sinérgica entre esses compostos não é conhecida, considerada a habilidade de ambos, de modular respostas dopaminérgicas.

Protocolo: Os animais receberam uma aplicação i.p. de veículo (10 ml/kg) ou CBD 5 mg/kg) seguida 20 minutos depois de uma aplicação i.p. de veículo (10 ml/kg) ou 7NI (1 mg/kg; NPS) seguida, 20 minutos depois de uma aplicação i.p. de salina (10ml/kg) ou ANF (5mg/kg; ANF) sendo submetidos, 10 minutos depois da terceira aplicação ao teste de PPI.

Subgrupos: V+V+SAL, V+CBD+SAL, V+7NI+SAL, V+V+ANF, V+CBD+ANF, V+7NI+ANF, CBD+7NI+ANF; n=8 por tratamento.

Resultados: O tratamento agudo com ANF promoveu prejuízo significativo em todas as intensidades de pré-pulso. A dose sub-efetiva de CBD não foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por ANF no teste de PPI, assim como a dose sub-efetiva de 7NI. Em contrapartida, a associação de CBD e 7NI de forma sinérgica foi capaz de atenuar o prejuízo induzido por

ANF na intensidade de pré-pulso de 80 e 85 dB (Figura 1). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento [$F_{7,56} = 8.028$, $P < 0.001$], mas não da intensidade do pré-pulso [$F_{2,112} = 18.10$, $P = 0.168$], e nem da interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F_{14,112} = 0.448$, $P = 0.955$].

Figura 1: Efeito do sinergismo de doses sub-efetivas de CBD e 7NI no prejuízo induzido por ANF no PPI. A ANF promoveu prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso analisadas. A dose sub-efetiva de CBD e a de 7NI apresentaram efeito sinérgico atenuando o prejuízo induzido por ANF na intensidade de 80 dB. ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo V+V+SAL.

DISCUSSÕES DOS RESULTADOS: Nesse estudo observamos que a combinação de CBD e 7NI em doses sub-efetivas atenuou o prejuízo induzido por ANF no teste de PPI, sugerindo que ambos os sistemas estão envolvidos no efeito comportamental observado. Investigações anteriores do nosso grupo demonstrou que o 7NI apresenta potencial antipsicótico no prejuízo induzido por anfetamina no teste de PPI, além disso, ele é capaz de impedir o aumento da expressão de c-Fos em regiões cortico-límbicas induzido pelo metilfenidato (Issy et al., 2011; 2014). O resultado obtido nesse ensaio nos estimula a prosseguir nas investigações que envolvem a ação sinérgica nos dois sistemas em outros modelos comportamentais e moleculares.