

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Tratamento com HU-910, um agonista de receptores CB2, reverte alterações
comportamentais em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo de
receptores NMDA**

ISADORA LOPES CORTEZ

RIBEIRÃO PRETO

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ISADORA LOPES CORTEZ

Tratamento com HU-910, um agonista de receptores CB2, reverte alterações comportamentais em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo de receptores NMDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

RIBEIRÃO PRETO

2021

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Cortez, Isadora Lopes

Tratamento com HU-910, um agonista de receptores CB2, reverte alterações comportamentais em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo de receptores NMDA / Isadora Lopes Cortez; orientador: Francisco Silveira Guimarães. – Ribeirão Preto, 2021.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2021.

1. HU-910 2. Esquizofrenia 3. CB2 4. Canabinoide.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CORTEZ, Isadora Lopes

Título: Tratamento com HU-910, um agonista de receptores CB2, reverte alterações comportamentais em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo de receptores NMDA.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ____ / ____ / 2021

Banca examinadora

Prof. Dr.: Francisco S. Guimarães:

FMRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Rafael Guimarães dos Santos:

FMFRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Vanessa Costhek Abílio:

UNIFESP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sheila e Vanderlei, que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio e dedicação a mim e à minha formação. Obrigada por me ensinarem que é preciso correr atrás daquilo que se deseja e por sempre acreditarem que eu seria capaz. Espero que sintam por mim o mesmo orgulho que sinto por vocês.

Aos meus tios, Carlos e Bernadete, pelo que fizeram por mim durante minha graduação. Essa conquista não seria possível sem meu título de Bacharela em Ciências Biomédicas, e esse título eu devo muito a vocês.

À toda minha família e à minha irmã, pelo carinho, preocupação e apoio e por entenderam minha constante ausência.

Aos meus amigos de pós-graduação e de outros momentos da vida. Obrigada pelas conversas, apoio, incentivo e pelas festas e noites nos bares de Ribeirão Preto. Um agradecimento especial a Gabriela, minha amiga de graduação, que todo dia estava disposta a ouvir toda pequena conquista e todos os meus desabafos. Esse trajeto todo seria ainda mais pesado se não fosse por vocês.

À minha amiga e “mãe científica”, Nicole. Obrigada por me ensinar, me orientar e pela paciência em todas as vezes que eu precisei de ajuda ou de correção. Obrigada pelas palavras de incentivo e conforto quando o peso e o desespero do mestrado me atingiram com força. Te admiro demais.

Ao meu orientador, Francisco Guimarães, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos acadêmicos e culturais, por sua orientação humana e pelo seu exemplo de profissional e ser humano.

Ao meu coorientador, Felipe Gomes, pela sua orientação, por sua paciência e por ser sempre tão acessível. Você também é exemplo de um excelente profissional e orientador.

Aos meus colegas e colegas de laboratório, especialmente a Adriana, Amanda, Andreza, Débora, Naielly e Thamyris, pelo convívio diário, regado a muita compreensão e harmonia. Obrigada por transformarem o laboratório em um lugar agradável e acolhedor, pelas discussões científicas e conselhos acadêmicos. Adorei conhecer cada uma de vocês!

À Prof^a Dr^a Elaine Del Bel por abrir as portas de seu laboratório e me receber, contribuindo de maneira significativa para esse trabalho. Ao Dr. João Francisco, por sua orientação e ajuda ativa nesse trabalho. Obrigada por ceder seu tempo.

Á todos os funcionários da Faculdade de Medicina, principalmente, do Departamento de Farmacologia e todo corpo técnico por realizarem com competência e prontidão todo o trabalho base essencial para que nós, pós-graduandos, possamos realizar o nosso.

Aos demais docente do Departamento de Farmacologia com quem tive a oportunidade de discutir este trabalho. Obrigada por contribuírem não só para a melhor interpretação dos dados obtidos e para os rumos do trabalho, mas também para meu crescimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro essencial. O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

RESUMO

RESUMO

CORTEZ, I. L. **Tratamento com HU-910, um agonista de receptores CB2, reverte alterações comportamentais em um modelo de esquizofrenia baseado no antagonismo de receptores NMDA.** 2021. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2021.

Os fármacos utilizados para o tratamento da esquizofrenia, apesar de atenuarem os sintomas positivos da doença, não melhoram os sintomas negativos e os prejuízos cognitivos e possuem baixa tolerabilidade, resultando em altos índices de descontinuação do tratamento. Evidências recentes sugerem que o sistema endocanabinoide pode ser um novo alvo no tratamento da esquizofrenia. O receptor CB2 modula a neurotransmissão dopaminérgica e atenua o efeito de citocinas pró-inflamatórias e a ativação microglial, alterações observadas em pacientes com esquizofrenia. Modelos animais baseados na administração de antagonistas de receptores NMDA, como o MK-801, e de drogas que potencializam a neurotransmissão dopaminérgica, como a anfetamina, são amplamente utilizados para o estudo da neurobiologia da esquizofrenia e de drogas com propriedades antipsicóticas. Nesse estudo avaliamos a capacidade do HU-910, uma agonista de receptores CB2, em reverter alterações comportamentais relacionadas à esquizofrenia em modelos baseados no tratamento agudo e repetido com MK-801 e no tratamento agudo com anfetamina, bem como a capacidade do composto em induzir a tétrede canabinoide, um conjunto de alterações comportamentais (analgesia, hipolocomoção, catalepsia e hipotermia) resultante da ativação de receptores CB1. Em camundongos machos C57BL/6, o tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) preveniu a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 (0,25 mg/kg), mas não pela anfetamina (2,5 mg/kg). O HU-910, *per se*, diminuiu a atividade locomotora basal dos animais. Adicionalmente, o tratamento agudo com o HU-910 (3, 10 e 30 mg/kg) atenuou o prejuízo induzido pela administração de MK-801(0,25 mg/kg) e de anfetamina (5 mg/kg) no teste de inibição pelo pré-pulso. O tratamento repetido por 14 dias com MK-801 (0,5 mg/kg) não induziu prejuízo de interação social, porém promoveu déficit cognitivo no teste de reconhecimento de objetos e esse prejuízo foi revertido pelo tratamento repetido com HU-910. O

pré-tratamento com AM630 (0,1 e 0,3 mg/kg), um antagonista de receptores CB2, não bloqueou os efeitos do HU-910 no teste de reconhecimento de objetos. Entretanto, o AM630 (1 mg/kg) bloqueou o efeito do HU-910 na hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg). O tratamento agudo com HU-910 possuiu efeito antinociceptivo no teste da placa quente, entretanto não induziu outras alterações que caracterizam a téttrade canabinoide. Esses resultados sugerem que o HU-910 produz efeitos tipo-antipsicóticos em modelo animal baseado no antagonismo de receptores NMDA. Além disso, o tratamento agudo com o HU-910 não induz os quatro efeitos da téttrade canabinoide, indicando ausência de ação sobre receptores CB1.

Palavras-chaves: HU-910; esquizofrenia; CB2; canabinoide

ABSTRACT

ABSTRACT

CORTEZ, I. L. **Treatment with HU-910, a CB2 receptors agonist, reverses the behavioral changes in a model of schizophrenia based on antagonism of NMDA receptors.** 2021. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2021.

Drugs used for schizophrenia treatment, despite attenuating the positive symptoms, do not improve the negative symptoms and cognitive impairments. In addition, they show low tolerability, which has been associated with high rates of treatment discontinuation. Recent evidence suggests that the endocannabinoid system may be a target for schizophrenia treatment. The CB2 receptor modulates dopaminergic neurotransmission, attenuates the effects of pro-inflammatory cytokines and microglial activation. All these changes have been observed in schizophrenia patients. Animal models based on the administration of NMDA receptor antagonists, such as MK-801, and drugs that potentiate dopaminergic neurotransmission, such as amphetamine, are widely used to study the neurobiology of schizophrenia and drugs with antipsychotic properties. Here, we evaluated whether HU-910, a CB2 receptor agonist, would reverse schizophrenia-related behavioral changes in models based on acute and repeated treatment with MK-801 and acute treatment with amphetamine. We also investigated the ability of HU-910 to induce the cannabinoid tetrad, a set of behavioral changes (analgesia, hypolocomotion, catalepsy, and hypothermia) resulting from CB1 receptors activation. In male C57BL/6 mice, the acute treatment with HU-910 (30 mg/kg) prevented MK-801-induced hyperlocomotion (0.25 mg/kg) but not amphetamine-induced hyperlocomotion (2.5 mg/kg). HU-910, per se, decreased the animals' basal locomotor activity. Also, the acute treatment with HU-910 (3, 10, and 30 mg/kg) attenuated the impairments in the pre-pulse inhibition test induced by MK-801 (0.25 mg/kg) and amphetamine (5 mg/kg). The repeated treatment with MK-801 (0.5 mg/kg) for 14 days did not induce social interaction impairment but promoted cognitive deficit in the object recognition test, which was reversed by repeated treatment with HU-910. Pretreatment with the CB2 receptor antagonist AM630 (0.1 and 0.3 mg/kg) did not block the effects of HU-910 in the object recognition test. However, AM630

(1 mg/kg) blocked the effect of HU-910 on the MK-801-induced hyperlocomotion. The acute treatment with HU-910 had an antinociceptive effect in the hot plate test. However, it did not induce other changes that characterize the cannabinoid tetrad. These results suggest that HU-910 produces antipsychotic-like effects in an animal model based on the antagonism of NMDA receptors. Also, acute treatment with HU-910 does not induce the cannabinoid tetrad, indicating no action on CB1 receptors.

Keywords: HU-910; schizophrenia; CB2; cannabinoids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental do tratamento repetido com MK-801 e HU-910.

Figura 2. Desenho experimental do tratamento repetido com MK-801, AM630 e HU-910.

Figura 3. Representação esquemática da tétrede canabinoide.

Figura 4. Tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) previne a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 (0,25 mg/kg).

Figura 5. Tratamento agudo com HU-910 não previne a hiperlocomoção induzida pela anfetamina (2,5 mg/kg).

Figura 6. Tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) reduz a atividade locomotora espontânea dos animais.

Figura 7. Tratamento agudo com HU-910 (3, 10 e 30 mg/kg) atenua o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com anfetamina (5 mg/kg).

Figura 8. Tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) atenua o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com MK-801 (0,25 mg/kg).

Figura 9. O tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) não produz prejuízo no teste de interação social.

Figura 10. Tratamento repetido com HU-910 (30 mg/kg) reverte o prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos induzido pelo pré-tratamento com MK-801 (0,5 mg/kg).

Figura 11. AM630 (1 mg/kg) bloqueia o efeito do tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg).

Figura 12. AM630 (0,1 mg/kg) não bloqueia o efeito do tratamento repetido com HU-910 (30 mg/kg) no prejuízo induzido pelo tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) no RO.

Figura 13. Tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) não induziu prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos.

Figura 14. Tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) não induz a tétrede canabinoide, diferentemente do tratamento com WIN55,212-2 (5 mg/kg).

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Esquizofrenia	21
1.1.1. Aspectos gerais do transtorno.....	21
1.1.2. Neurobiologia da esquizofrenia: da hipótese dopaminérgica à hipótese glutamatérgica	23
1.1.3. Modelos farmacológicos para estudo da esquizofrenia	26
1.2. Sistema endocanabinoide	28
1.3. Receptores CB2 e esquizofrenia	29
1.3.1. Receptores CB2 e a neurotransmissão dopaminérgica	30
1.3.2. Receptores CB2 e neuroinflamação	32
1.4. HU-910, um agonista de receptor canabinoides tipo 2 (CB2)	34
2. HIPÓTESE	36
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Animais	40
4.2. Drogas	40
4.3. Procedimentos experimentais	41
4.3.1. Hiperlocomoção	41
4.3.2. Atividade Locomotora.....	42
4.3.3. Teste de inibição pelo pré-pulso (PPI)	43
4.3.4. Tratamento repetido com HU-910 em um modelo baseado na administração repetida de MK-801	44
4.3.4.1. <i>Interação Social (IS)</i>	46
4.3.4.2. <i>Reconhecimento de Objetos (RO)</i>	46
4.3.5. Tétrade Canabinoide.....	48
4.3.5.1. <i>Catalepsia</i>	49
4.3.5.2. <i>Medida da temperatura da cauda</i>	49

4.3.5.3. <i>Atividade locomotora</i>	49
4.3.5.4. <i>Atividade antinociceptiva</i>	50
4.4. Análise estatística dos dados	50
5. RESULTADOS	53
5.1. Experimento 1: Efeito do HU-910 sobre a hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg).....	53
5.2. Experimento 2: Efeito do HU-910 sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina (2,5 mg/kg).....	53
5.3. Experimento 3: Efeito do HU-910 sobre a atividade locomotora.....	55
5.4. Experimento 4: Efeito do HU-910 sobre o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com anfetamina (5 mg/kg).....	56
5.5. Experimento 5: Efeito do HU-910 sobre o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com MK-801 (0,25 mg/kg).....	57
5.6. Experimento 6: Efeito do tratamento repetido com HU-910 sobre os prejuízos nos testes de IS e RO induzidos pelo tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg)	58
5.7. Experimento 7: Efeito do pré-tratamento com AM630 (1 mg/kg) sobre o efeito do HU-910 (30 mg/kg) na hiperlocomoção induzida pelo tratamento com MK-801 (0,25 mg/kg).....	61
5.8. Experimento 8: Efeito do pré-tratamento com AM630 (0,1 mg/kg) sobre o efeito do HU-910 (30 mg/kg) no prejuízo induzido pelo tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) no RO	62
5.9. Experimento 9: Efeito do pré-tratamento com AM630 (0,3 mg/kg) sobre o efeito do HU-910 (30 mg/kg) no prejuízo induzido pelo tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) no RO	64
5.10. Experimento 10: Efeito do tratamento com HU-910 (30 mg/kg) na tétrede canabinoide.....	66
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÃO	78
8. REFERÊNCIA	80

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquizofrenia

1.1.1. Aspectos gerais do transtorno

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico e complexo que acomete cerca de 1% da população mundial, se destacando como uma das principais causas de incapacidade (OMS, 2017). A expectativa de vida de um indivíduo diagnosticado com esquizofrenia é reduzida em 15 anos (Chang et al., 2011) e o risco de mortalidade do paciente com o transtorno é de duas a três vezes maior em relação à população geral (McGrath et al., 2008). Apesar de anos de intensa pesquisa, as causas da esquizofrenia ainda não são completamente elucidadas, porém, assim como para grande parte dos transtornos psiquiátricos, acredita-se que a esquizofrenia seja resultado da interação de diversos fatores etiológicos como, por exemplo, fatores genéticos, psicológicos e socioambientais (Lewis & Lieberman, 2000).

A manifestação clínica é heterogênea e os sintomas são geralmente organizados em três grupos, denominados sintomas positivos, negativos e cognitivos (Wong & Van Tol, 2003). Os sintomas positivos são caracterizados por alucinações, delírios e transtornos de pensamento, eventos ausentes na população geral sadia. Já os sintomas negativos são caracterizados pela perda de funções psicológicas presentes na população geral, englobando o embotamento afetivo, perda de motivação, distúrbios de expressão de afeto e de interação social (Wong & Van Tol, 2003). Por fim, os sintomas cognitivos estão relacionados a prejuízos na execução de tarefas como memória, atenção e função intelectual do indivíduo acometido (Weickert et al., 2000).

O transtorno é comumente diagnosticado no final da adolescência e início da vida adulta após o primeiro episódio psicótico. A esquizofrenia resulta em elevado impacto econômico, tanto com gastos diretos, como hospitalizações e a farmacoterapia, quanto com gastos indiretos, uma vez que o paciente pode apresentar longos períodos de incapacidade e improdutividade. Em 2006, apenas no estado de São Paulo, o custo total direto com a esquizofrenia foi estimado em R\$222 milhões, representando 2,2% do total de gastos em saúde do estado (Leitão et al., 2006).

Os primeiros fármacos para o tratamento da esquizofrenia foram desenvolvidos nas décadas de 1950 e 1960 e possuem como principal mecanismo de ação o bloqueio de receptores dopaminérgicos D2. Essa primeira geração de antipsicóticos, também chamados de antipsicóticos típicos, inclui a clorpromazina e o haloperidol. Embora efetivos no tratamento dos sintomas positivos, esses fármacos possuem eficácia limitada contra os sintomas negativos e cognitivos, além de provocarem os chamados efeitos extrapiramidais, caracterizados pelas distonias agudas, Parkinsonismo, acatisia e discinesia tardia. Assim, novos antipsicóticos foram desenvolvidos na tentativa de serem eficazes em doses que não causariam os efeitos extrapiramidais. Essa segunda geração de antipsicóticos, também chamados de antipsicóticos atípicos, como a clozapina e risperidona, por exemplo, têm ação sobre diversos receptores, como receptores D4, D2 e de serotonina (5-HT) (Graeff & Guimarães, 2012).

Entretanto, apesar do desenvolvimento de novos modelos animais e técnicas moleculares para investigar a neurobiologia da esquizofrenia, nenhum aumento significativo na eficácia dos novos antipsicóticos tem sido demonstrado

em comparação aos fármacos desenvolvidos na década de 1950, com exceção da clozapina, cujo uso, no entanto, é prejudicado pelo potencial desenvolvimento de agranulocitose grave em cerca de 1% dos usuários (Lewis & Lieberman, 2008; Lieberman et al., 2005). Além disso, esses fármacos apresentam pouco ou nenhum efeito sobre os sintomas negativos e cognitivos e também produzem diversos efeitos adversos (Elvevag & Goldberg, 2000; Hanson et al., 2010). A baixa tolerabilidade desses fármacos, somado a falta de eficácia, resulta em uma alta taxa de abandono do tratamento (Lieberman et al., 2005), evidenciando a necessidade do desenvolvimento de novas drogas que sejam melhor toleradas e mais eficazes para o tratamento dos sintomas positivos e negativos e nos déficits cognitivos da esquizofrenia.

1.1.2. Neurobiologia da esquizofrenia: da hipótese dopaminérgica à hipótese glutamatérgica

Durante muito tempo, a hipótese dominante para explicar a neurobiologia da esquizofrenia foi a hipótese dopaminérgica, formulada a partir de duas observações. A primeira delas é que a administração de compostos que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica, como a anfetamina e a cocaína, induz sintomas psicóticos semelhantes aos experimentados por pacientes com esquizofrenia em pessoas saudáveis e exacerba os sintomas positivos em paciente com o transtorno (Seeman & Kapur, 2000). A segunda evidência que suporta a hipótese dopaminérgica é o fato de que o antagonismo de receptores dopaminérgicos D2 é o principal mecanismo pelos quais os antipsicóticos atualmente disponíveis produzem seus efeitos terapêuticos (Seeman & Kapur, 2000).

A hipótese sugere que uma atividade dopaminérgica excessiva na via mesolímbica estaria relacionada aos sintomas positivos. Posteriormente, foi incorporada ideia de que haveria uma redução na atividade na via dopaminérgica mesocortical, que estaria relacionada aos sintomas negativos (Davis et al., 1991). As demais vias dopaminérgicas, nigroestriatais e tuberoinfundibular, parecem não possuir relevância para o transtorno, entretanto possuem papel importante no que diz respeito aos efeitos colaterais dos antipsicóticos, principalmente os de primeira geração (Graeff & Guimarães, 2012). O bloqueio de receptores D2 na via nigroestriatal, via dopaminérgica relacionada ao controle motor, resulta no distúrbio motor conhecido como Parkinsonismo e o bloqueio de receptores D2 na via tuberoinfundibular, relacionada ao controle da liberação fisiológica da prolactina, resulta na hiperprolactinemia.

Embora o papel da dopamina (DA) na neurobiologia da esquizofrenia seja central e bem aceito, essa hipótese parece não ser suficiente para explicar, sozinha, a complexidade da manifestação clínica do transtorno. Além disso, o desequilíbrio dopaminérgico parece não ser intrínseco do sistema, e sim resultado de alterações de vias regulatórias aferentes (Grace, 2017). Krystal e colaboradores relataram os efeitos distintos da administração em humanos de anfetamina, que potencializa a neurotransmissão dopaminérgica, e ketamina, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Enquanto a administração de anfetamina resultou na manifestação de comportamentos relacionados aos sintomas positivos (distúrbios de pensamento e agitação psicomotora), a administração de ketamina produziu alterações relacionadas aos sintomas positivos, negativos e cognitivos (Krystal et al., 2005). Além disso, a administração de ketamina em pacientes com esquizofrenia exacerba os

sintomas positivos e déficit cognitivo (Lahti et al., 2001; Malhotra et al., 1997). Nesse contexto, a hipótese glutamatérgica sugere que uma hipofunção dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA estaria relacionada a alguns aspectos do transtorno (Jentsch & Roth, 1999).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e atua através de receptores metabotrópicos (mGLU) e ionotrópicos. Os primeiros possuem sete domínios transmembrana e, de acordo com sua homologia, farmacologia e segundos mensageiros, são divididos em três grupos: tipo I (mGLU 1 e 5), tipo II (mGLU 2 e 3) e tipo III (mGLU 4, 6, 7 e 8); enquanto os receptores ionotrópicos possuem três subtipos: NMDA, AMPA e cainato (Dingledine et al., 1999; Kew & Kemp, 2005). Dentre os receptores glutamatérgicos, os do tipo NMDA possuem papel mais relevante na esquizofrenia. Foi observado redução da expressão de NR1, que codifica a subunidade obrigatória GluN1 dos receptores NMDA, e de NR2, que codifica a subunidade GluN2, no córtex pré-frontal (CPF) em pacientes com esquizofrenia (Weickert et al., 2013). Entretanto, os estudos avaliando os níveis de expressão de NR1 e NR2 ainda são contraditórios, sendo reportado aumento, diminuição ou ainda nenhuma alteração na expressão desses mRNAs (Akbarian et al., 1996; Beneyto & Meador-Woodruff, 2008; Dracheva et al., 2001; Weickert et al., 2013). Mohn e colaboradores mostraram que o *knockdown* da subunidade GluN1 dos receptores NMDA acarreta alterações comportamentais tipo-esquizofrenia em camundongos. Essas alterações foram atenuadas pelo tratamento com antipsicóticos como haloperidol e clozapina (Mohn et al., 1999). Adicionalmente, drogas antagonistas de receptores NMDA, como a ketamina, fenciclidina e o MK-801, são capazes de induzir alterações comportamentais que se assemelham

aos sintomas da esquizofrenia em humanos saudáveis e em roedores (Tsai & Coyle, 2002). Essas evidências apontam não só para um papel do glutamato na esquizofrenia como também sugerem que os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico parecem exercer papéis distintos na neurobiologia do transtorno.

1.1.3. Modelos farmacológicos para o estudo da esquizofrenia

Diversos modelos animais para o estudo da esquizofrenia foram desenvolvidos nos últimos anos, sendo eles usualmente divididos em modelos genéticos, modelos baseados em alterações no neurodesenvolvimento e modelos farmacológicos (Jones et al., 2011). Os modelos farmacológicos são baseados nas alterações comportamentais relacionadas a esquizofrenia induzidas por drogas que potencializam a neurotransmissão dopaminérgica, como a anfetamina, e antagonistas dos receptores NMDA, como a fenciclinina, ketamina e MK-801. Em roedores, a administração aguda de estimulantes dopaminérgicos, como a anfetamina, resulta no aumento da atividade locomotora e prejuízo no teste de inibição pelo pré-pulso (PPI) (Mansbach et al., 1988; O'Neill & Shaw, 1999). Essas alterações comportamentais associadas à esquizofrenia induzidas pela anfetamina são revertidas pela administração de antipsicóticos como haloperidol e clozapina (Andersen & Pouzet, 2001).

A administração repetida de anfetamina também induz alterações tipo-esquizofrenia, como diminuição do PPI e prejuízo no teste de inibição latente, embora estudos tenham observado efeitos conflitantes em diversos esquemas de tratamento com a droga (Featherstone et al., 2007). Em roedores, a administração repetida de anfetamina induz sensibilização persistente, tendo

sido observada um ano após o tratamento com a droga (Paulson et al., 1991). O pré-tratamento com haloperidol e clozapina é capaz de prevenir essa sensibilização (Meng et al., 1998). Embora a sensibilização induzida pela administração repetida de anfetamina seja aceita como um modelo animal mais robusto do que uma única injeção, o tratamento repetido com anfetamina não induz alterações comportamentais que poderiam estar associadas aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia (Murray et al., 2008).

Animais tratados com drogas que antagonizam receptores NMDA apresentam prejuízos no filtro sensorio motor e em funções cognitivas, evidenciadas por testes como PPI e reconhecimento de objeto (RO) (Fejgin et al., 2007; Stefani & Moghaddam, 2005). Além dessas alterações cognitivas, o tratamento com antagonistas NMDA resultam também em prejuízo no teste de interação social (IS) (Rung et al., 2005).

Apesar dessas alterações serem observadas com o tratamento agudo, tem sido proposto que o tratamento crônico com antagonistas NMDA poderia representar melhor as alterações neuroquímicas, comportamentais e neuroanatômicas observadas em pacientes com esquizofrenia (Jentsch & Roth., 1999). Além disso, estudos mostraram a persistência dessas alterações até seis semanas após o fim do tratamento (Hashimoto et al., 2005; Jentsch & Roth, 1999; Nagai et al., 2009). Interessantemente, essas alterações foram revertidas pelo tratamento com antipsicóticos de segunda geração, como a clozapina, mas não com o antipsicótico de primeira geração haloperidol (Bruins et al., 2005; Hashimoto et al., 2005; Nagai et al., 2009). Sendo assim, a administração aguda e crônica de antagonistas de receptores NMDA tem sido intensamente utilizada

no estudo de substâncias com propriedades antipsicóticas e da fisiopatologia do transtorno (Bubeníková-Valešová et al., 2008).

1.2. Sistema endocanabinoide

O sistema endocanabinoide é um sistema de sinalização lipídica que desempenha um papel relevante no desenvolvimento do SNC, na plasticidade sináptica e na resposta à estímulos endógenos e ambientais (Lu & MacKie, 2016). É formado pelos receptores canabinoides (CB1R e CB2R), seus ligantes endógenos, denominados endocanabinoides, a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e pelas enzimas de síntese e degradação desses endocanabinoides (Campos et al., 2016). Diferentemente dos neurotransmissores clássicos, os endocanabinoides são produzidos e liberados sob demanda pelo neurônio pós-sináptico e se ligam aos receptores canabinoides usualmente localizados no neurônio pré-sináptico, atuando, assim, como neurotransmissores retrógrados (Kreitzer, 2005).

Os receptores canabinoides são da classe de receptores acoplados a proteína G e a ativação desses receptores resulta na inibição da adenilato ciclase, ativação de proteínas quinases e na modulação de canais iônicos voltagem-dependentes. Essas alterações intracelulares resultam, de forma geral, na diminuição da atividade neuronal e inibição da liberação de neurotransmissor (Lu & MacKie, 2016). Os receptores CB1 são os receptores canabinoides mais expressos no SNC, em áreas como o córtex, hipocampo, amígdala e outras áreas cerebrais envolvidas no controle das funções motoras e cognitivas, além de áreas relacionadas à motivação (Mackie, 2005). Os efeitos

psicoativos de preparações como a maconha, por exemplo, são geralmente atribuídos à ativação desses receptores. Em roedores, a administração de THC (fitocanabinoide presente na *Cannabis sativa*) ou de agonistas CB1 causa um conjunto de alterações comportamentais chamada “tétrade canabinoide”, caracterizada por diminuição da atividade locomotora espontânea (hipolocomoção), catalepsia, diminuição da temperatura corporal e analgesia (Silva et al., 2017).

Vários estudos investigam o envolvimento do sistema endocanabinoide em diversos transtornos psiquiátricos, dentre eles a esquizofrenia (Fakhoury, 2017). Um estudo clínico mostrou que os níveis de anandamida no líquido cerebrospinal de pacientes com esquizofrenia são oito vezes mais elevados quando comparado a indivíduos saudáveis (Giuffrida et al., 2004). Bioque e colaboradores relataram a diminuição das enzimas sintetizadoras dos endocanabinoides (NAPE e DAGL) em pacientes no primeiro episódio psicótico (Bioque et al., 2013). Além disso, alterações genéticas em CNR1 e CNR2, genes que codificam os receptores CB1 e CB2, respectivamente, foram associadas à maior susceptibilidade ao desenvolvimento do transtorno (Bae et al., 2014; Ujike et al., 2002) e à resposta ao tratamento com drogas antipsicóticas (Guidali et al., 2011). Essas evidências sugerem que o sistema endocanabinoide pode estar envolvido na complexa neurobiologia da esquizofrenia.

1.3. Receptores CB2 e esquizofrenia

Os receptores CB2 possuem 44% de homologia com os receptores CB1 (Munro et al., 1993) e, inicialmente, foi sugerido que esses receptores seriam

expressos somente na periferia, principalmente em células do sistema imune. Entretanto, com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e seletivas, foi possível demonstrar a expressão desses receptores no SNC (Chen et al., 2017). Os receptores CB2 são expressos em células da glia, como astrócitos e micróglia, e em algumas populações de neurônios (Chen et al., 2017; Luongo et al., 2014; Schatz et al., 1997; Zhang et al., 2017). Diferentemente dos receptores CB1, os receptores CB2 estão localizados em níveis pós- e pré-sináptico (Chen et al., 2017; Sánchez-Zavaleta et al., 2018).

Diversas evidências apontam que alterações nos receptores CB2 estão relacionadas à esquizofrenia. Foi descrito em pacientes com esquizofrenia um aumento na frequência de dois polimorfismos no CNR2 que resultam na perda de função desses receptores (Ishiguro et al., 2010). Além disso, pacientes com esquizofrenia aguda tratados com antipsicóticos e pacientes no primeiro episódio psicótico não tratados apresentaram menores níveis de receptores CB2 periféricos quando comparados à voluntários sadios (Bioque et al., 2013; De Marchi et al., 2003).

1.3.1. Receptores CB2 e a neurotransmissão dopaminérgica

Conforme discutido anteriormente, o desbalanço no sistema dopaminérgico é uma característica bem descrita da fisiopatologia da esquizofrenia (Grace & Gomes, 2019). A hiperatividade dopaminérgica estriatal está relacionada aos sintomas psicóticos do transtorno, como as alucinações e delírios. Diversas aferências modulam a neurotransmissão dopaminérgica alterando a liberação de dopamina, seus efeitos pós-sinápticos e o padrão de

disparo dos neurônios dopaminérgicos (Grace, 2017). De forma geral, aferências glutamatérgicas resultam na excitabilidade de neurônios dopaminérgicos enquanto aferências GABAérgicas inibem a atividade dopaminérgica (Fiorillo & Williams, 1998; Paladini & Tepper, 2016). A função dopaminérgica também pode ser modulada através da ativação de receptores D2 pré-sinápticos, resultando em feedback negativo da liberação de DA (Beckstead et al., 2004). Estudos indicam que o sistema endocanabinoide pode modular o sistema dopaminérgico e comportamentos relacionados à DA (Canseco-Alba et al., 2019; Manzanares et al., 2018; Xi et al., 2011).

Animais *knockout* para receptores CB2 (CB2KO) apresentam comportamentos comumente relacionados à sintomas da esquizofrenia, tais como prejuízo no teste de PPI, prejuízos cognitivos e aumento da resposta à cocaína (Ortega-Alvaro et al., 2011). A infusão local de AM630, antagonista dos receptores CB2, no núcleo accumbens (NAc) aumenta a atividade locomotora e o nível extracelular de DA em animais wild-type (WT) e *knockout* para receptores CB1 (CB1KO), mas não em animais CB2KO (Xi et al., 2011). Além disso, drogas que ativam receptores CB2, como o agonista JWH133, são capazes de atenuar o aumento da atividade locomotora induzida por cocaína, a autoadministração de cocaína e diminuir os níveis de DA no NAc em animais WT e CB1KO, mas não em animais CB2KO (Xi et al., 2011). Essas evidências indicam que os receptores CB2 modulam a função dopaminérgica. Entretanto, os mecanismos pelos quais tal modulação ocorre ainda não são completamente elucidados.

Os receptores CB2 são expressos no corpo celular de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) e em seus terminais no NAc, onde são co-localizados com receptores D2 (Aracil-Fernández et al., 2012;

Zhang et al., 2017). Estudos de eletrofisiologia mostram que a administração de JWH133 inibe o disparo de neurônios dopaminérgicos na VTA *in vivo* e *ex vivo* (Ma et al., 2019a). Ma e colaboradores mostraram também que a administração de JWH133 reduz a transmissão sináptica glutamatérgica em neurônios DA na VTA, porém o bloqueio farmacológico dessa transmissão sináptica não foi capaz de inibir os efeitos do JWH133 sobre a atividade neuronal dopaminérgica na região. Esse achado indica que os receptores CB2 poderiam atuar diretamente em neurônios dopaminérgicos na VTA (Ma et al., 2019a). Mais estudos são necessários para a melhor compreensão do papel modulatório dos receptores CB2 na neurotransmissão dopaminérgica e como a manipulação farmacológica desses receptores poderia ser benéfica no tratamento de transtornos psiquiátricos que envolvam o sistema dopaminérgico em sua neurobiologia, como a esquizofrenia.

1.3.2. Receptores CB2 e a neuroinflamação

A micróglia tem papel fisiológico importante no desenvolvimento sináptico e na plasticidade, além de realizar o escaneamento constante do ambiente através de seus prolongamentos (Wolf et al., 2017). Entretanto, a ativação prolongada dessas células pode resultar em danos e injúrias, como redução da expressão de parvalbumina em interneurônios GABAérgicos e poda sináptica anormal durante o desenvolvimento do SNC, eventos que tem sido associado à esquizofrenia (Perkins et al., 2020; Sellgren et al., 2019).

Pacientes com esquizofrenia apresentam aumento nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-6 e IL-8 e nos níveis de IL-1 β no líquido

cerebroespinhal (Lin et al., 1998; Söderlund et al., 2009; Zhang et al., 2002). Além disso, a resposta imune materna a infecções no período perinatal pode interferir no neurodesenvolvimento do feto e isso estaria relacionado a um maior risco de desenvolvimento do transtorno (Ashdown et al., 2006; Bland et al., 2010). Outra evidência que aponta uma desregulação imune em pacientes com esquizofrenia é o aumento da densidade de micróglia e de marcadores de ativação microglial em estudos *post-mortem* e de neuroimagem (Doorduyn et al., 2009; van Berckel et al., 2008; Van Kesteren et al., 2017).

A expressão de receptores CB2 em células da glia pode ser alterada dependendo do estado de ativação dessas células, sendo baixa no cérebro saudável e elevada em condições patológicas ou diante de estímulos internos e externos (Carlisle et al., 2002; Maresz et al., 2005). A ativação desses receptores inibe a liberação de mediadores inflamatórios e aumenta a liberação de citocinas anti-inflamatórias (Benito et al., 2008; Lisboa et al., 2016). Além disso, esses receptores modulam a ativação, proliferação e a migração de células da micróglia (Carrier et al., 2004; Ehrhart et al., 2005; Walter et al., 2003).

A deleção de receptores CB2 exacerba a resposta neuroinflamatória em modelos animais de injúria cerebral causada por isquemia/reperfusão e de encefalomielite autoimune (Palazuelos et al., 2008; Zarruk et al., 2012; M. Zhang et al., 2009). De maneira oposta, estudos com cultura de micróglia mostraram que o tratamento com agonistas CB2 seletivos, JWH133 e HU-308, reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Martín-Moreno et al., 2011; Ramírez et al., 2005). Estudos *in vivo* também mostram os efeitos anti-inflamatórios da ativação de receptores CB2 em modelos animais (Gómez-Gálvez et al., 2016; Palazuelos et al., 2009; Sagredo et al., 2009).

Uma vez que parte dos pacientes com esquizofrenia apresentam aumento na densidade de micróglia ativada e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, a modulação dessas alterações parece ser uma estratégia terapêutica promissora (Monji et al., 2013; Roche & Finn, 2010).

1.4. HU-910, um agonista de receptor canabinoide tipo 2 (CB2)

O composto HU-910, um agonista dos receptores CB2, foi sintetizado pelo grupo do Prof. Raphael Mechoulam, da Hebrew University, Israel. Estudo recente sugere que, entre os agonistas CB2 disponíveis no mercado, ele seja um dos mais seletivos no sentido de ativar a via canônica do receptor, tendo pouco efeito como agonista tendencioso (“bias agonist”) quando comparado, por exemplo, com o HU-308 e JWH-133 (Soethoudt et al., 2017). Assim como estes compostos, o HU-910 foi capaz de atenuar a injúria no tecido hepático e a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas hepáticas induzida por isquemia/reperfusão (Horváth et al., 2012). Além disso, em um trabalho mais recente, o HU-910 promoveu melhora significativa na recuperação funcional de ratos após lesão cerebral traumática (LCT). Esse efeito foi abolido pelo pré-tratamento com o SR144528, um antagonista/agonista inverso de receptores CB2, e ausente em animais *knockout* para esses receptores (Magid et al., 2019).

Hipótese

2. HIPÓTESE

Considerando que o receptor CB2 parece ter um importante papel na modulação da liberação de dopamina na área tegmental ventral e pode inibir a ativação de micróglia, dois fenômenos associados às manifestações clínicas observadas na esquizofrenia, a hipótese do presente trabalho é a de que o tratamento agudo e repetido com HU-910 em camundongos teria efeito tipo-antipsicótico, em modelos animais de esquizofrenia baseados na administração de MK-801 e anfetamina. Além disso, esses efeitos seriam dependentes da ativação de receptores CB2.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a propriedades tipo-antipsicóticas do tratamento com HU-910 em modelos animais de esquizofrenia baseados no antagonismo de receptores NMDA e na administração de anfetamina.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se o tratamento agudo com o HU-910 inibe a hiperlocomoção induzida pelo tratamento com MK-801 ou anfetamina.
- Avaliar se o tratamento agudo com o HU-910 reverte o prejuízo induzido por anfetamina ou por MK-801 no teste de inibição pelo pré-pulso (PPI).
- Avaliar se o tratamento repetido com HU-910 reverte prejuízos induzidos pelo tratamento repetido com MK-801 nos testes de interação social (IS) e reconhecimento de objetos (RO).
- Avaliar se os efeitos do HU-910 sobre os prejuízos induzidos por MK-801 nos testes de RO e hiperlocomoção são dependentes da ativação do receptor CB2.
- Avaliar se o HU-910 produz os efeitos característicos da tétrede canabinoide.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com 7 semanas de idade no início do tratamento, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os animais permaneceram no biotério do departamento, em grupos de até 5 animais por caixa (41 x 33 x 17cm), sob ciclo de luz (12 h claro/12 h escuro, sendo o período claro iniciado as 6:00 h A.M.), temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade controlada, além de livre acesso à água e à comida, excetuando-se o período da realização dos testes comportamentais. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, registrado com o número 115/2019.

4.2. Drogas

- AM251 (Tocris, USA); veículo: 1% DMSO e salina. Dose de 1 mg/kg (baseado em Silva et al., 2017).
- AM630 (Tocris, USA); veículo: 1% DMSO e salina. Doses de 0,1 e 0,3 mg/kg para tratamento repetido (baseadas em Rodrigues da Silva et al., 2020) e 1 mg/kg para avaliação da atividade locomotora (baseado em Silva et al., 2017).
- Anfetamina (Pervitin®, Brasil); veículo: salina. Dose 2,5 mg/kg para teste de hiperlocomoção (baseado em Rodrigues da Silva et al., 2020) e 5 mg/kg para teste de PPI (baseado em Moreira & Guimarães, 2005).

- Clozapina (Sigma, EUA); Veículo: salina. Dose de 1 mg/kg (baseada em Rodrigues da Silva et al., 2020).
- HU-910 (Doado pelo Professor Raphael Mechoulam, Hebrew University, Israel); veículo: 3% DMSO, 2% Tween 80 e salina. Doses de 0,3; 1; 3; 10 e 30 mg/kg (baseada em Horváth et al., 2012).
- MK-801 (Sigma, EUA); veículo: salina. Doses de 0,25 mg/kg e 0,5 mg/kg para os testes agudos e para o tratamento repetido, respectivamente (baseadas em Rodrigues da Silva et al., 2020).
- WIN55,212-2 (Tocris, USA); Veículo: 2% Tween 80 e salina. Dose de 5 mg/kg (baseada em (Silva et al., 2017).

4.3. Procedimentos experimentais

4.3.1. Hiperlocomoção

A administração sistêmica aguda de drogas como a anfetamina e antagonistas de receptores NMDA, como o MK-801, aumentam a atividade locomotora e a reversão dessa hiperlocomoção pode ser um teste preditivo para atividade de drogas antipsicóticas (O'Neill & Shaw, 1999; Diana & Sagratella, 1994). Para avaliar se o tratamento com HU-910 preveniria a hiperlocomoção induzida por MK-801, os animais receberam uma injeção via intraperitoneal (i.p.) de HU-910 (0,3; 1; 3; 10 ou 30 mg/kg) ou salina. Após 10 minutos da primeira injeção, os animais receberam uma injeção de MK-801 (0,25 mg/kg) ou salina. Decorridos 20 minutos da segunda injeção, os animais foram posicionados no centro de uma arena circular de acrílico (40 cm de diâmetro x 40 cm de altura) onde puderam percorrer livremente toda a arena por um período de 20 minutos.

A distância total percorrida pelos animais foi registrada com o auxílio do software Any-Maze (Stoelting, Irlanda). Para avaliar o envolvimento dos receptores CB2 no efeito do HU-910 sobre a hiperlocomoção induzida por MK-801, os animais receberam uma injeção de AM630 (1 mg/kg; i.p.) ou veículo. Após 10 minutos da primeira injeção, os animais receberam uma injeção de HU-910 (30 mg/kg; i.p.) ou veículo. Em seguida, 10 minutos após, os animais receberam a terceira injeção, de MK-801 (0,25 mg/kg; i.p.) ou salina e, após 20 minutos da última injeção, foram posicionados na arena e a atividade locomotora foi avaliada por 20 minutos.

Para avaliar se o HU-910 seria capaz de prevenir a hiperlocomoção induzida por anfetamina, os animais foram tratados com uma injeção via intraperitoneal (i.p.) de HU-910 (3, 10, 30 e 60 mg/kg) ou veículo e após 20 ou 60 minutos (experimentos independentes), os animais foram tratados com uma segunda injeção (i.p.) de anfetamina (2,5 mg/kg) ou salina. Após 10 minutos da injeção de anfetamina, os animais foram submetidos à arena e a distância total percorrida foi registrada com o auxílio do software Any-Maze® durante 20 minutos.

4.3.2. Atividade locomotora

Para avaliar o efeito do HU-910 sobre a atividade locomotora, os animais receberam uma injeção (i.p.) de HU-910 (30 mg/kg) ou veículo e, após 30 minutos, foram submetidos à arena circular durante 20 minutos. Para avaliar o mecanismo de ação do HU-910 sobre a atividade locomotora, os animais foram tratados com uma injeção (i.p.) de AM251 (1 mg/kg), AM630 (1 mg/kg) ou

veículo. Após 10 minutos da primeira injeção, os animais receberam uma injeção (i.p.) de HU-910 (30 mg/kg) e, após 30 minutos, foram submetidos à arena circular e a atividade locomotora avaliada durante 20 minutos.

4.3.3. Teste de inibição pelo pré-pulso (PPI)

A resposta de sobressalto (geralmente classificada como uma resposta defensiva) a um estímulo intenso e repentino é atenuada pela apresentação de um estímulo prévio de mesma natureza, mas de menor intensidade. O teste de inibição pelo pré-pulso é um teste utilizado para avaliar a função do filtro sensorio-motor, sabidamente prejudicada em pacientes com esquizofrenia (Braff et al., 1999). Além disso, essa disfunção pode ser reproduzida em modelos animais para o transtorno e revertida pelo tratamento com antagonistas dopaminérgicos, como o antipsicótico de primeira geração, haloperidol (Mansbach et al., 1988).

O teste de PPI foi realizado simultaneamente em dois sistemas idênticos de resposta de sobressalto (Med Associates, EUA) com ruído de fundo constante de 65 dB. Após 5 minutos de habituação, os pulsos e pré-pulsos foram apresentados de maneira randômica durante 37 minutos. O pulso consiste em um ruído branco de 105 dB (com duração de 20 ms), enquanto o pré-pulso compreende tons puros de 7000 Hz e intensidades iguais a 80, 85 e 90 dB (com duração de 10 ms). O peso padrão foi apropriado para camundongos (40g) e o ganho no amplificador de células de carga foi ajustado para 150 unidades arbitrárias (AU). Após um período de aclimatação de 5 min, foi apresentado aos animais uma série de 10 estímulos de pulso para a habituação dentro da sessão

ao estímulo de sobressalto e não foram considerados para a análise estatística do teste.

O teste consistiu em 64 apresentações aleatórias de estímulo divididas em oito grupos diferentes (com intervalos regulares de 30 ms entre os estímulos), sendo apenas pulso (105 dB), pré-pulso isolado (80, 85 e 90 dB), pré-pulso + pulso (com intervalo de 100 ms) ou nenhum estímulo. A resposta média de sobressalto acústico aos testes de pulso (P) e de cada ensaio de pré-pulso + pulso (PP + P) foi registrada para cada animal e os resultados estão apresentados como porcentagem de inibição do sobressalto pelo pré-pulso (%PPI), calculada de acordo com a seguinte fórmula: $\%PPI = 100 - [100 \times (PP + P/P)]$.

Para avaliar se o HU-910 seria capaz de prevenir o prejuízo induzido pelo MK-801 no PPI, os animais receberam uma injeção (i.p.) de HU-910 (3, 10 e 30 mg/kg) ou veículo. Após 10 minutos, os animais receberam uma injeção (i.p.) de MK-801 (0,25 mg/kg; i.p.) ou salina. Decorridos 20 minutos desta última injeção, o teste foi iniciado. Para avaliar o efeito do HU-910 sobre os prejuízos induzidos pela anfetamina, um grupo independente de animais recebeu uma injeção (i.p.) de HU-910 (3, 10 e 30 mg/kg) ou veículo e após 20 minutos, uma injeção (i.p.) de anfetamina (5 mg/kg) ou salina. Decorridos 10 minutos desta última injeção o teste foi iniciado.

4.3.4. Tratamento repetido com HU-910 em um modelo baseado na administração repetida de MK-801

Para avaliar o efeito do tratamento repetido com HU-910, o MK-801 foi administrado duas vezes ao dia por 14 dias consecutivos (0,5 mg/kg; i.p.) e um dia após o fim do tratamento, portanto, no 15º dia de tratamento, as injeções de HU-910 (3, 10 e 30 mg/kg) ou clozapina (1 mg/kg) foram administradas uma vez ao dia por 7 dias consecutivos (i.p.). Após 48 horas da última injeção de HU-910, os animais foram submetidos aos testes de interação social e habituação a arena e 24 horas depois, ao teste de reconhecimento de objetos.

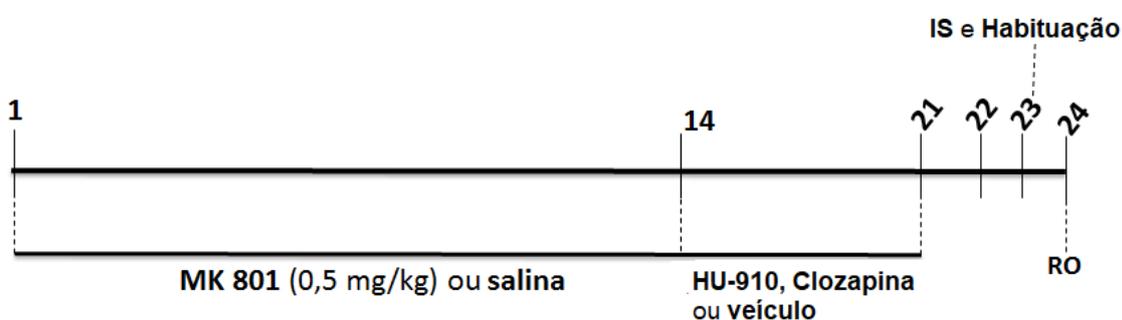


Figura 1. Desenho experimental do tratamento repetido com MK-801 e HU-910. Representação esquemática do procedimento experimental de pré-tratamento com MK-801, seguido pelo tratamento repetido HU-910 (3; 10 e 30 mg/kg) ou clozapina (1 mg/kg), mostrando os dias de tratamento e dos testes a serem realizados. IS, interação social; RO, reconhecimento de objeto.

Para avaliar o envolvimento dos receptores CB2 no efeito do HU-910 sobre o prejuízo causado pelo tratamento repetido com o antagonista dos receptores NMDA, o MK-801 foi administrado duas vezes ao dia por 14 dias consecutivos (0,5 mg/kg; i.p.). Nos 7 dias subsequentes, os animais foram tratados com AM630 (0,1 mg/kg ou 0,3 mg/kg; experimentos independentes; i.p.). Após 10 minutos da injeção do antagonista, os animais receberam uma

injeção de HU-910 (30 mg/kg; i.p.). Setenta e duas horas após a última injeção, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos.

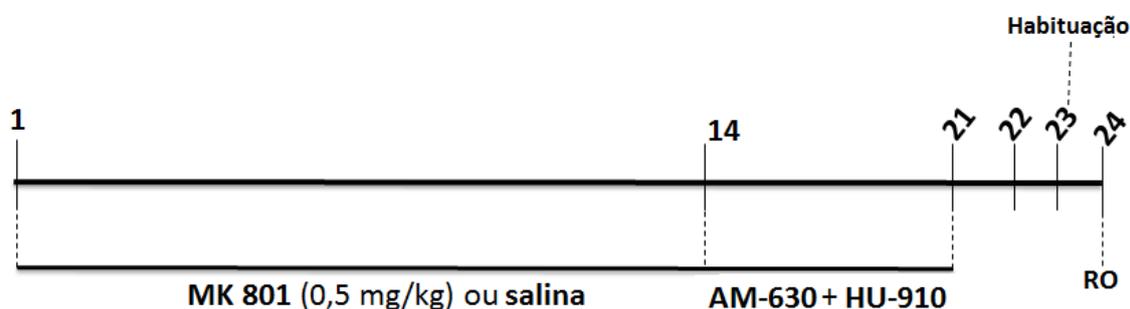


Figura 2. Desenho experimental do tratamento repetido com MK-801, AM630 e HU-910. Representação esquemática do procedimento experimental de pré-tratamento com MK-801, seguido pelo tratamento repetido com AM-630 (0,1 mg/kg ou 0,3 mg/kg) e HU-910 (30 mg/kg), mostrando os dias de tratamento e dos testes a serem realizados. RO, reconhecimento de objeto.

4.3.4.1. Interação Social (IS)

O teste de IS é utilizado para o estudo dos sintomas negativos da esquizofrenia (Ellenbroek & Cools, 2000). O teste foi realizado em uma caixa retangular de acrílico (28 x 17 x 13 cm), onde os animais (testado e não familiar) foram posicionados em lados opostos para explorar a caixa livremente por um período de 10 min. O tempo total de comportamentos sociais ativos executados pelo camundongo "teste", tais como cheirar, seguir, fazer *grooming* e subir sobre o camundongo não familiar, foram registrados. Os animais testados não foram previamente expostos à caixa do teste e ao animal não familiar.

4.3.4.2. Reconhecimento de Objetos (RO)

O teste de reconhecimento de objetos é baseado no comportamento natural dos camundongos em aproximarem-se e explorarem por mais tempo um

objeto novo em comparação a um objeto familiar, quando expostos a ambos os objetos ao mesmo tempo (Ennaceur, 2010). Sendo assim, este teste é utilizado para o estudo de funções cognitivas, como memória e aprendizagem, as quais estão diminuídas em modelos animais de esquizofrenia (Hashimoto et al., 2005).

No dia anterior ao teste, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação a arena, com duração de 15 minutos. No dia do teste, os animais foram posicionados na mesma arena contendo dois objetos idênticos, por um período de 10 min (sessão de aquisição) com liberdade para explorá-los. Após 60 minutos do fim da sessão de aquisição, um dos objetos foi substituído por um objeto novo com tamanho, textura e cor diferentes dos objetos anteriores. Os animais foram, então, novamente colocados na arena contendo este objeto novo e o objeto familiar por um período de 5 minutos, registrando-se o tempo de interação com cada objeto (sessão de retenção). Todos os objetos possuíam, aproximadamente, 16 cm de altura e peso suficiente para que não fossem deslocados pelos animais durante o experimento. Definiu-se exploração dos objetos como o direcionamento de sua face ao objeto até uma distância de 2 cm enquanto o observa, cheira ou toca.

Para análise do tempo de exploração entre o objeto novo e o familiar foi utilizado o índice de discriminação. Este índice foi calculado pela diferença entre a exploração do objeto novo (TN) e do objeto familiar (TF) dividido pelo tempo de exploração total do objeto familiar e novo $[DI = (TN - TF) / (TN + TF)]$. O resultado pode variar entre valores positivos e negativos, sendo valores positivos indicativos de maior tempo de exploração do objeto novo e valores negativos indicativo de maior tempo explorando o objeto familiar, enquanto zero indica ausência de preferência exploratória.

4.3.5. Tétrade Canabinoide

A tétrade canabinoide é um conjunto de quatro efeitos clássicos da ativação de receptores CB1. Em animais, são observadas a hipotermia, a catalepsia, a antinocicepção e a hipolocomoção. Esses efeitos estão relacionados com alguns efeitos adversos produzidos por tratamentos com agonistas do receptor CB1, incluindo dependência. Embora descrito como agonista seletivo CB2, a ausência de atividade agonista em receptores CB1 nas suas eventuais doses antipsicóticas é de relevância para seu uso clínico. Além disso, a catalepsia é um teste preditivo para avaliar a possível presença de efeito extrapiramidal em humanos, comum no tratamento com antipsicóticos de primeira geração (Gobira et al., 2013).

Para avaliar se o HU-910 produz os efeitos da tétrade canabinoides, os animais receberam injeções (i.p.) de veículo, HU-910 (30 mg/kg) ou WIN55-212-2 (5 mg/kg). Todos os animais foram submetidos à sequência de quatro testes, onde o WIN55,212-2 (agonista CB1/CB2) foi utilizado como controle positivo.

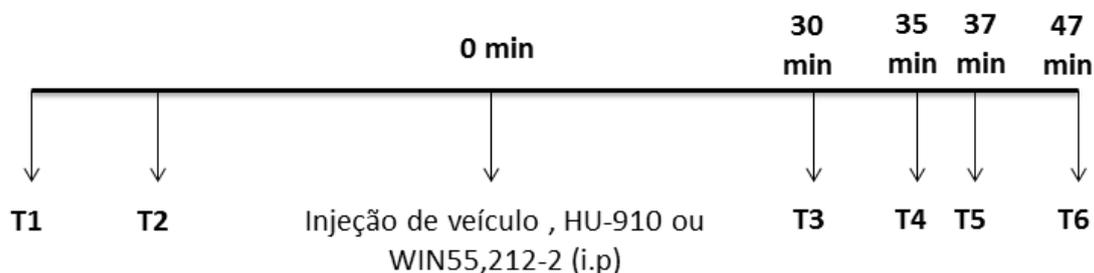


Figura 3. Representação esquemática da tétrade canabinoides. T1: Temperatura basal da cauda. T2: medida basal da placa quente. T3: teste da catalepsia. T4: medida da temperatura da cauda. T5: teste da atividade locomotora. T6: teste da placa quente.

4.3.5.1. Catalepsia

O teste da catalepsia consiste em registrar o tempo que o animal permanece imóvel em uma posição imposta pouco comum. Para o teste foi utilizado uma barra fixa de vidro, a uma altura de 4 cm da superfície da bancada (Sanberg et al., 1988). Após 30 minutos da injeção das drogas ou veículo, os animais foram posicionados de tal forma que suas patas dianteiras ficaram apoiadas sobre a barra de vidro. O tempo que ambas as patas permaneceram sobre a barra foi registrado, sendo o tempo máximo de teste de 300 segundos (Gomes et al., 2013).

4.3.5.2. Medida da temperatura da cauda

Com uma câmera térmica, Termovisor Modelo NV 384 (THERMOCOM®, Nashua, NH 03062, EUA), a temperatura da cauda dos animais foi registrada antes (basal) e 35 minutos após a injeção das drogas ou veículo. Para a captura das imagens, a câmera foi posicionada a uma distância de 50 cm do animal. Foram registradas cinco fotos de cada animal, sendo coletadas as medidas de 5 pontos distintos da cauda em cada imagem. A medida para cada imagem foi calculada como a média destes pontos e, para o resultado final, a média após o tratamento foi subtraída da média no basal.

4.3.5.3. Atividade locomotora

Este teste avalia possíveis efeitos motores das drogas administradas. Após 37 minutos das injeções, os animais foram colocados, individualmente, em

uma arena circular de acrílico (40 cm de diâmetro x 40 cm de altura) e a distância total percorrida durante 10 minutos foi registrada e determinada pelo software Any-maze®.

4.3.5.4. Atividade antinociceptiva

Para analisar a atividade antinociceptiva foi utilizado o teste da placa quente, que consiste em avaliar a nocicepção térmica manifestada pelo reflexo de lambar ou de retirada das patas. Os animais foram posicionados em um cilindro de plexiglas de 10 cm de diâmetro sobre uma placa quente, mantida a aproximadamente 56°C. Foi registrada uma medida basal para os comportamentos de lambar as patas, “sapatear” ou pular. Após a manifestação desses comportamentos, os animais foram imediatamente retirados do aparato. Após 45 minutos decorridos das injeções, novas medidas de latência para os mesmos comportamentos foram feitas. O tempo máximo de permanência sobre a placa quente em cada medida foi de 30 segundos, a fim de evitar danos teciduais aos animais (Kinsey et al., 2011). Os resultados foram expressos em delta do tempo em segundos, calculado subtraindo o valor após tratamento do valor basal.

4.4. Análise estatística dos dados

Para todos os testes realizados os dados foram analisados utilizando a ANOVA de uma via, duas vias e medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey. Os grupos experimentais foram compostos de 6-10 animais, baseados em

estudos prévios utilizando os mesmos métodos (Rodrigues da Silva et al., 2020; Gomes et al., 2015). As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Efeito do HU-910 sobre a hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg).

Houve aumento pronunciado na atividade locomotora nos animais tratados com MK-801 em relação ao grupo tratado com salina ($F_{(6,30)}=8,90$; $p<0,05$). O pré-tratamento com o HU-910 preveniu a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 quando administrado na dose de 30 mg/kg ($p<0,05$ vs. veículo+MK-801, pós-teste Tukey; Figura 4).

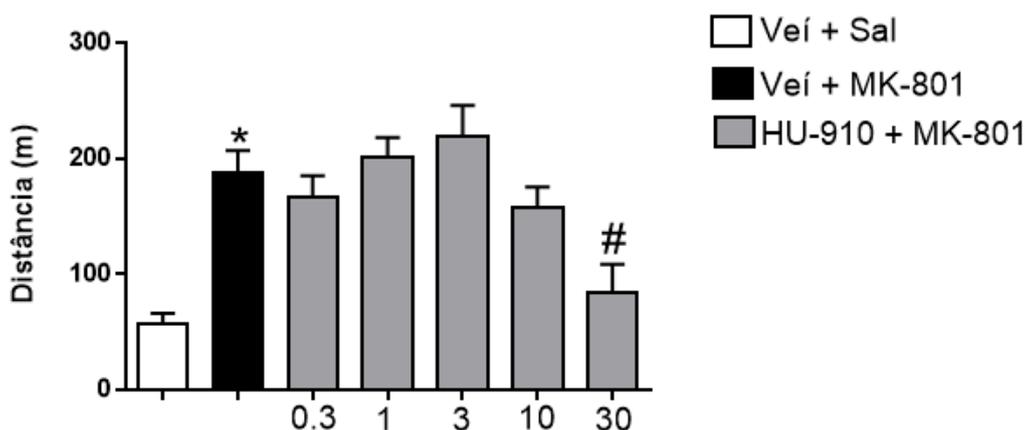


Figura 4. Tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) previne a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 (0,25 mg/kg). Os animais receberam uma injeção (i.p.) de veículo ou HU-910 e 10 minutos depois, uma segunda injeção de salina ou MK-801. Após 20 minutos da última injeção, a atividade locomotora foi avaliada no campo aberto durante 20 minutos ($n=5-6$ /grupo). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo+salina e # $p<0,05$ em relação ao grupo veículo+MK-801. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

5.2. Experimento 2: Efeito do HU-910 sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina (2,5 mg/kg).

Os animais tratados com anfetamina apresentaram aumento significativo da atividade locomotora quando comparado ao grupo controle. O pré-tratamento

com o HU-910 não atenuou a hiperlocomção induzida quando administrado 20 minutos antes da anfetamina ($F_{(6,48)}=8,09$; $p>0,05$; Figura 5A). O mesmo foi observado quando administrado 60 minutos antes da anfetamina, onde, novamente, nenhuma das doses testadas foi capaz de prevenir o aumento da atividade locomotora induzido pelo anfetamina ($F_{(5,29)}=6,84$; $p<0,05$; Figura 5B).

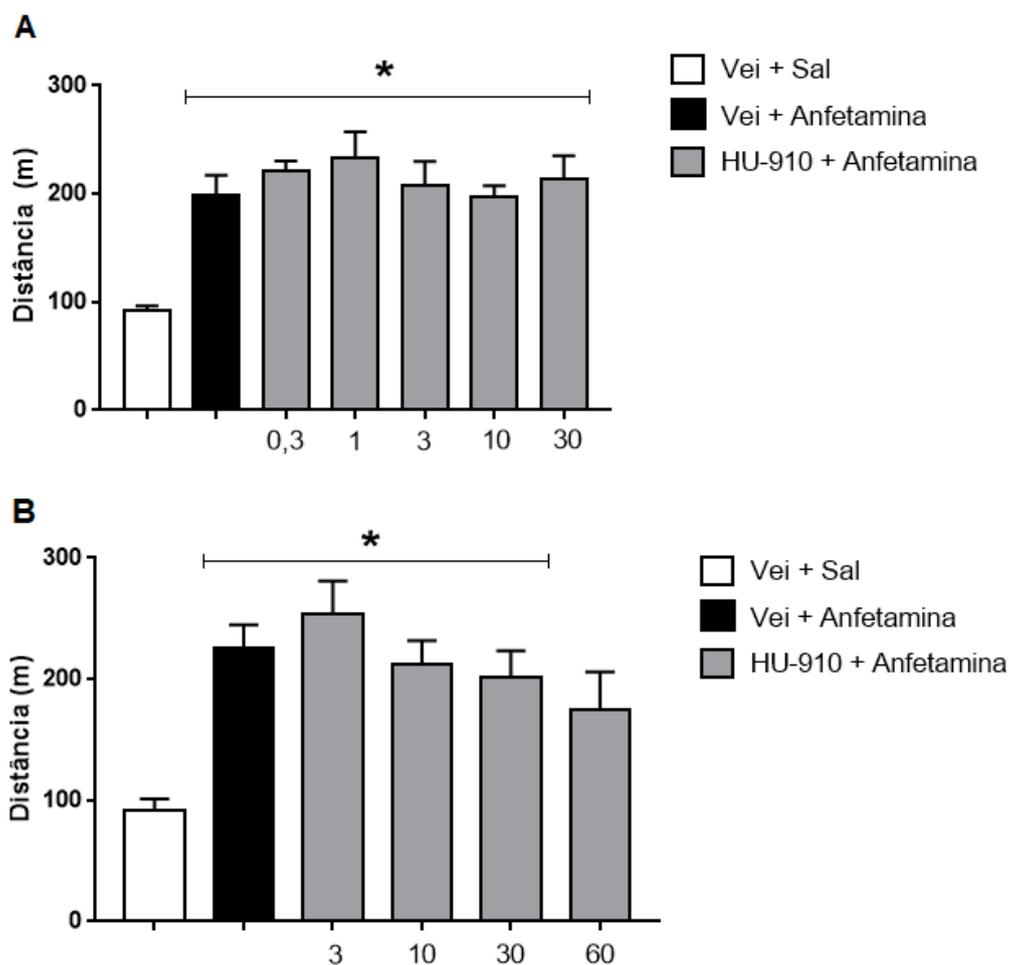


Figura 5. Tratamento agudo com HU-910 não previne a hiperlocomção induzida pela anfetamina (2,5 mg/kg). **A.** Os animais receberam uma injeção (i.p.) de HU-910 e depois de 20 minutos, uma segunda injeção de anfetamina. Após 10 minutos da última injeção, a atividade locomotora dos animais foi avaliada no campo aberto durante 20 minutos ($n=8$ /grupo). **B.** Os animais receberam uma injeção (i.p.) de HU-910 e depois de 60 minutos, uma segunda injeção de anfetamina. Após 10 minutos da última injeção, a atividade locomotora dos animais foi avaliada no campo aberto durante 20 minutos ($n=5-7$ /grupo). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo+salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

5.3. Experimento 3: Efeito do HU-910 sobre a atividade locomotora.

O tratamento com HU-910 (30 mg/kg) reduziu a atividade locomotora dos animais quando comparado ao grupo controle ($F_{(5, 39)}=4,20$; $p<0,05$; Figura 6A). O pré-tratamento com o AM251 (1 mg/kg) e AM630 (1 mg/kg) não bloqueou o efeito hipolocomotor induzido pelo HU-910 na dose testada. A ANOVA de duas vias indicou que não houve efeito do primeiro tratamento (administração de veículo, AM251 ou AM630) ($F_{(2,42)}=2,82$; $p>0,05$), houve efeito do segundo tratamento (administração de veículo ou HU-910) ($F_{(1,42)}=22,89$; $p<0,05$), entretanto não houve interação entre os tratamentos ($F_{(2,42)}=0,64$; $p>0,05$). Os antagonistas CB1 e CB2 não tiveram efeito *per se*.

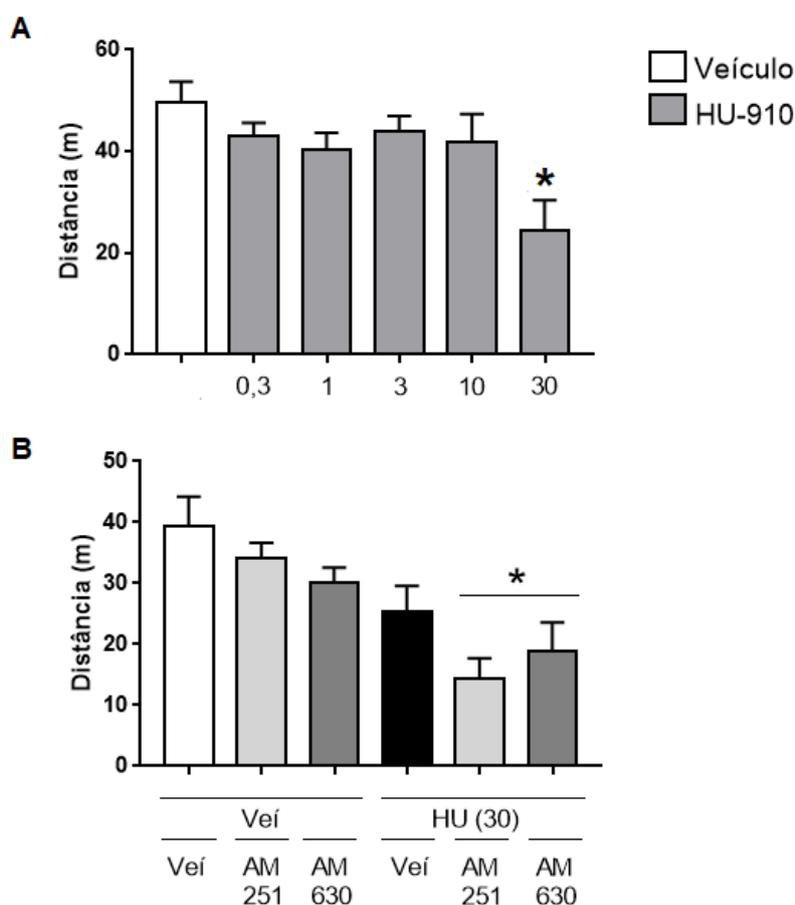


Figura 6. Tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) reduz a atividade locomotora espontânea dos animais. A. Animais receberam uma injeção de veículo ou HU-910 30

minutos antes do teste do campo aberto (n=7-9/grupo). *p<0,05 em relação ao grupo veículo. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. **B.** Animais receberam uma injeção de veículo, AM251 (1 mg/kg) ou AM630 (1 mg/kg). Após 10 minutos, os animais receberam uma segunda injeção de veículo ou HU-910. Após 30 minutos da última injeção, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (n=8/grupo) *p<0,05 em relação do grupo veículo+veículo. Os dados estão apresentados como média ± EPM. ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey.

5.4. Experimento 4: Efeito do HU-910 sobre o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com anfetamina (5 mg/kg).

O tratamento agudo com anfetamina promoveu diminuição significativa na porcentagem de inibição pelo pré-pulso em todas as intensidades de pré-pulso. ANOVA de medidas repetidas indicou efeito geral significativo do tratamento ($F_{(5, 45)} = 5,54$; $p < 0,05$), da intensidade de pré-pulso ($F_{(2, 90)} = 13,37$; $p < 0,05$) e interação entre os fatores tratamento e intensidade de pré-pulso ($F_{(10, 90)} = 2,29$). Adicionalmente, a ANOVA de uma via para cada intensidade de pré-pulso revelou que na intensidade de 80 dB, o HU-910 atenuou o prejuízo induzido pela anfetamina em todas as doses testadas ($F_{(5,45)} = 2,92$; $p > 0,05$). Para intensidade de 85 dB e 90 dB, foi observado que o HU-910 atenuou o prejuízo apenas na dose de 3 mg/kg (85 dB: $F_{(5,45)} = 4,63$; $p > 0,05$; 90 dB: $F_{(5,45)} = 7,77$; $p > 0,05$) (Figura 9). Nenhum dos tratamentos alterou a resposta de sobressalto.

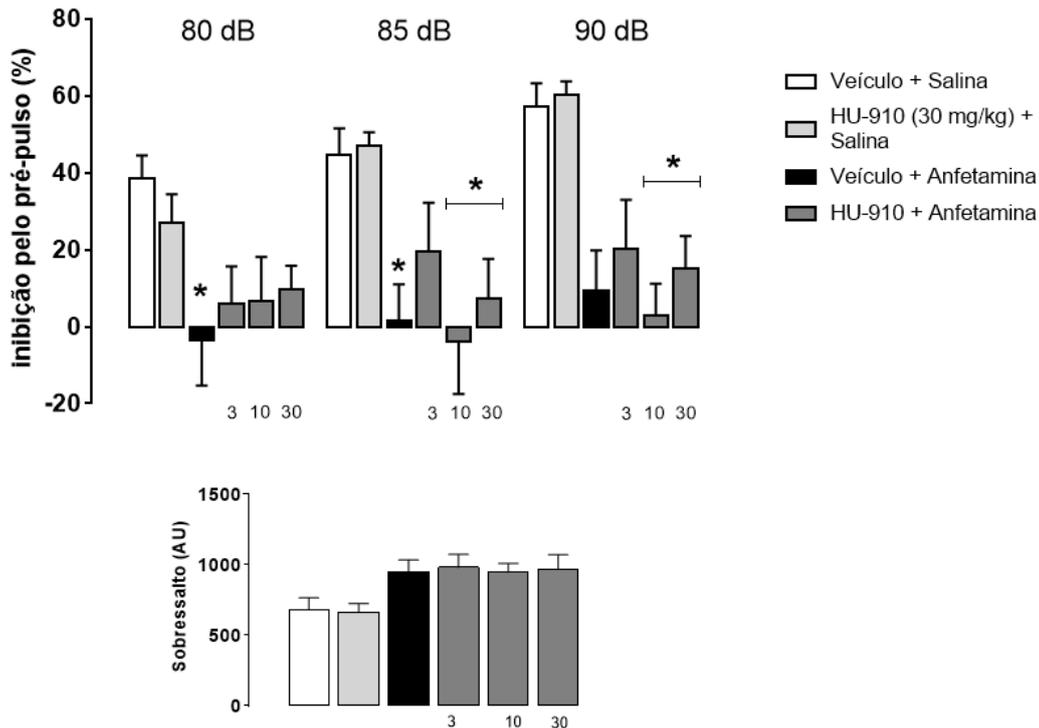


Figura 7. Tratamento agudo com HU-910 (3, 10 e 30 mg/kg) atenua o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com anfetamina (5 mg/kg). Os animais receberam uma injeção (i.p.) de veículo ou HU-910 e depois de 20 minutos, uma segunda injeção de salina ou anfetamina. Decorridos 10 minutos da última injeção os animais foram submetidos ao teste do PPI (n=10/grupo). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+salina. ANOVA de uma via para cada intensidade de pré-pulso seguida do teste de Tukey.

5.5. Experimento 5: Efeito do HU-910 sobre o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com MK-801 (0,25 mg/kg).

O tratamento agudo com MK-801 promoveu diminuição significativa na porcentagem de inibição pelo pré-pulso em todas as intensidades testadas e esse efeito foi atenuado pelo tratamento com HU-910 (30 mg/kg). A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito geral significativo do tratamento ($F_{(5, 47)}=16,13$; $p < 0,05$) e da intensidade de pré-pulso ($F_{(2, 94)}=34,07$; $p < 0,05$), mas não interação

entre os fatores tratamento e intensidade de pré-pulso ($F_{(10, 94)}=0,47$; $p>0,05$).

Os tratamentos não alteraram a resposta de sobressalto ao pulso.

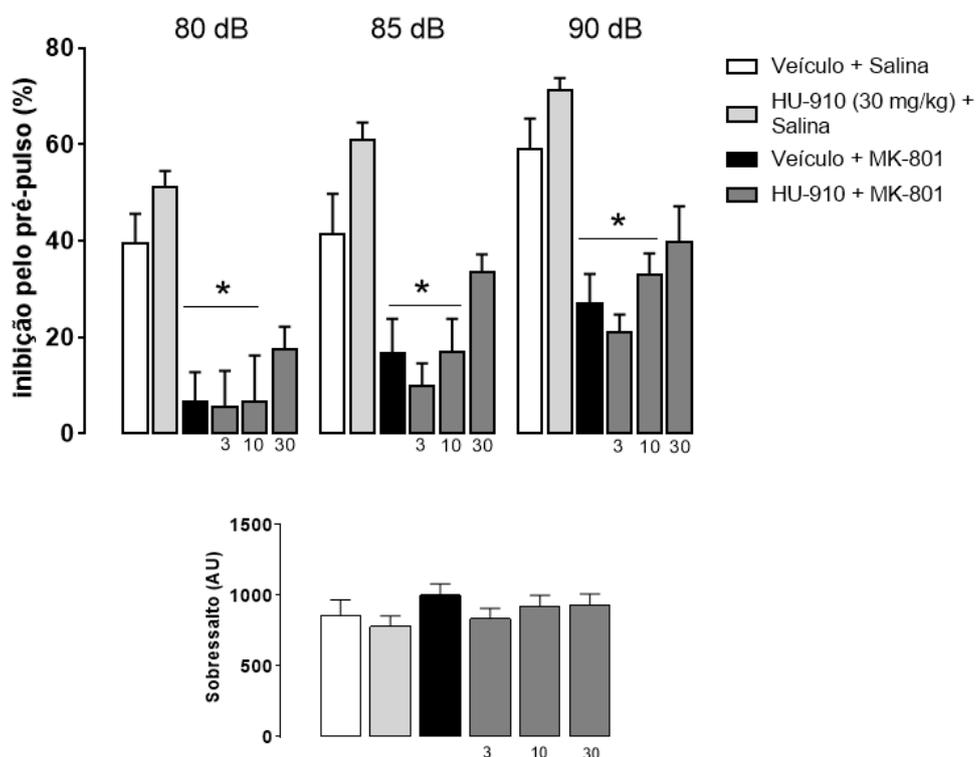


Figura 8. Tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) atenua o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com MK-801 (0,25 mg/kg). Os animais receberam uma injeção (i.p.) de veículo ou HU-910 e depois de 10 minutos, uma segunda injeção de salina ou MK-801. Decorridos 10 minutos da última injeção os animais foram submetidos ao teste do PPI ($n=9$ /grupo). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo+salina. ANOVA medidas repetidas seguida do teste de Tukey.

5.6 Experimento 6: Efeito do tratamento repetido com HU-910 sobre os prejuízos nos testes de IS e RO induzidos pelo tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg).

Interação Social: o tratamento repetido com MK-801 não induziu prejuízo no teste de IS ($F_{(7,50)}=0,64$, $p>0,05$; Figura 7).

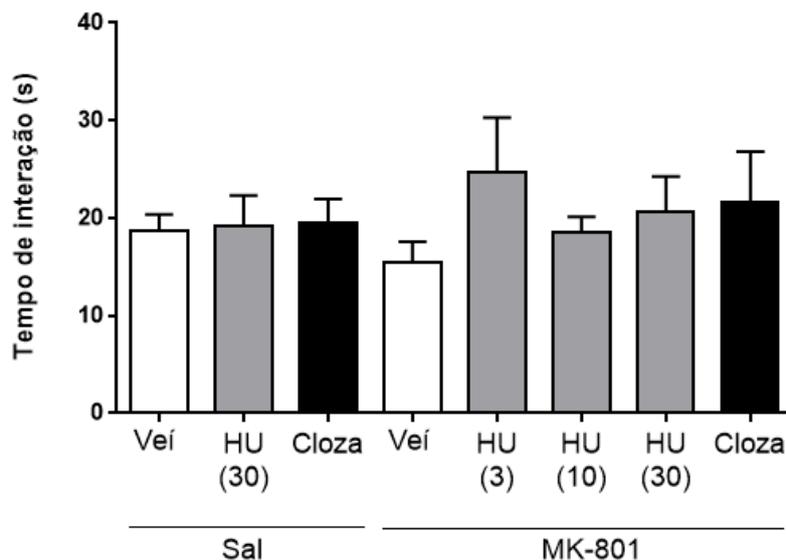


Figura 9. O tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) não produz prejuízo no teste de interação social. Os animais foram tratados duas vezes ao dia com MK-801 (i.p.) ou salina por 14 dias consecutivos. Após o fim do tratamento com MK-801, os animais foram tratados uma vez ao dia com veículo, clozapina (1 mg/kg) ou HU-910. Após 48hs da última injeção, os animais foram submetidos ao teste de IS (n=8-10/grupo). Os dados estão apresentados como a média ± EPM. ANOVA de uma via.

Reconhecimento de Objetos: na sessão de aquisição, houve preferência pela exploração do objeto localizado à direita em relação ao objeto localizado à esquerda nos grupos salina+HU-910, salina+clozapina e MK-801+HU-910 (30 mg/kg) ($p < 0,05$, teste t de *Student*; Figura 8A). Na sessão de retenção, o tempo de exploração do objeto novo foi significativamente maior nos grupos salina+veículo, salina+HU-910, salina+clozapina, MK-801+HU-910 (3 mg/kg) e MK-801+HU-910 (30 mg/kg) ($p < 0,05$, teste t de *Student*; Figura 8B). Os animais tratados com MK-801+veículo apresentaram prejuízo cognitivo no teste, evidenciado pelo menor índice de discriminação em relação ao grupo salina+veículo ($F_{(7,49)}=2,74$; $p < 0,05$; Figura 8C). Essa alteração não foi observada nos animais tratados com HU-910 (3, 10 e 30 mg/kg) ou clozapina ($p > 0,05$ vs. salina+veículo, pós-teste de Tukey).

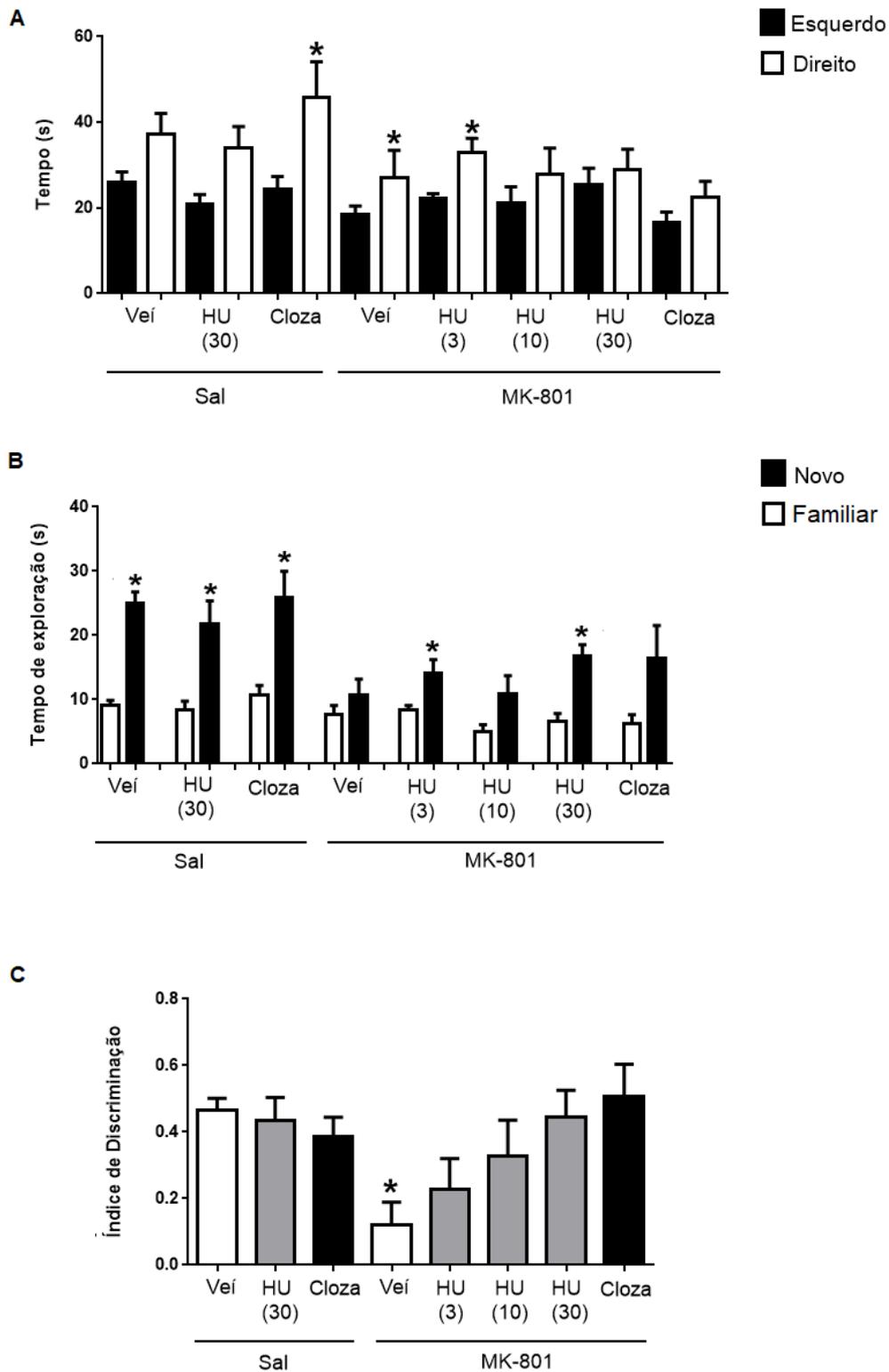


Figura 10. Tratamento repetido com HU-910 (30 mg/kg) reverte o prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos induzido pelo pré-tratamento com MK-801 (0,5 mg/kg). Os animais foram tratados duas vezes ao dia com MK-801 (i.p.) ou salina por 14 dias consecutivos. Após o fim do tratamento com MK-801, os animais foram tratados uma vez ao dia com veículo, clozapina ou HU-910. Após 72 h da última injeção,

os animais foram submetidos ao teste de RO (n=8-10/grupo). **A.** Tempo de exploração dos objetos idênticos na sessão de aquisição. *p<0,05 em relação ao objeto localizado à esquerda, teste t de *Student* para cada grupo de tratamento. **B.** Tempo de exploração dos objetos novo e familiar. *p<0,05 em relação ao objeto familiar, teste t de *Student* para cada grupo de tratamento. **C.** Índice de discriminação dos animais. *p<0,05 em relação ao grupo salina+veículo. Os dados estão apresentados como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

5.7 Experimento 7: Efeito do pré-tratamento com AM630 (1 mg/kg) sobre o efeito do HU-910 (30 mg/kg) na hiperlocomoção induzida pelo tratamento com MK-801 (0,25 mg/kg).

O pré-tratamento com AM630 (1 mg/kg) bloqueou o efeito do HU-910 (30 mg/kg) em prevenir a hiperlocomoção induzida por MK-801 ($F_{(4,22)}=7,85$; $p<0,05$; Figura 11).

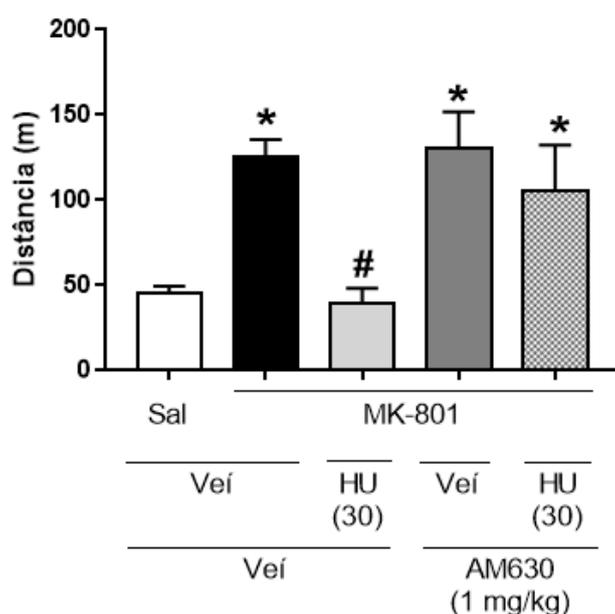


Figura 11. AM630 (1 mg/kg) bloqueia o efeito do tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg). Os animais receberam uma injeção (i.p.) de veículo ou AM630 e, após 10 minutos, uma segunda injeção de veículo ou HU-910. Após 10 minutos da segunda injeção, os animais receberam uma terceira injeção de salina ou MK-801. Decorridos 20 minutos da última

injeção, foram submetidos ao campo aberto (n=5-7/grupo). Os dados estão apresentados como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+veículo+veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo+veículo+MK-801; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

5.8 Experimento 8: Efeito do pré-tratamento com AM630 (0,1 mg/kg) sobre o efeito do HU-910 (30 mg/kg) no prejuízo induzido pelo tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) no RO.

Na sessão de aquisição, não houve preferência por algum por objetos idênticos em nenhum dos grupos ($p > 0,05$; Figura 12A). Na sessão de retenção, o tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar foi significativamente maior nos grupos salina+veículo+veículo, MK-801+veículo+HU+910 e MK-801+AM630+HU-910 ($p < 0,05$; Figura 12B). Os animais tratados com MK-801+veículo+veículo apresentaram menores índices de discriminação em relação aos animais tratados com salina+veículo+veículo. Essa diminuição foi atenuada pelo tratamento com HU-910 e revertida pelo tratamento com AM630+HU-910 ($F_{(4,25)}=3,52$; $p > 0,05$; Figura 12C).

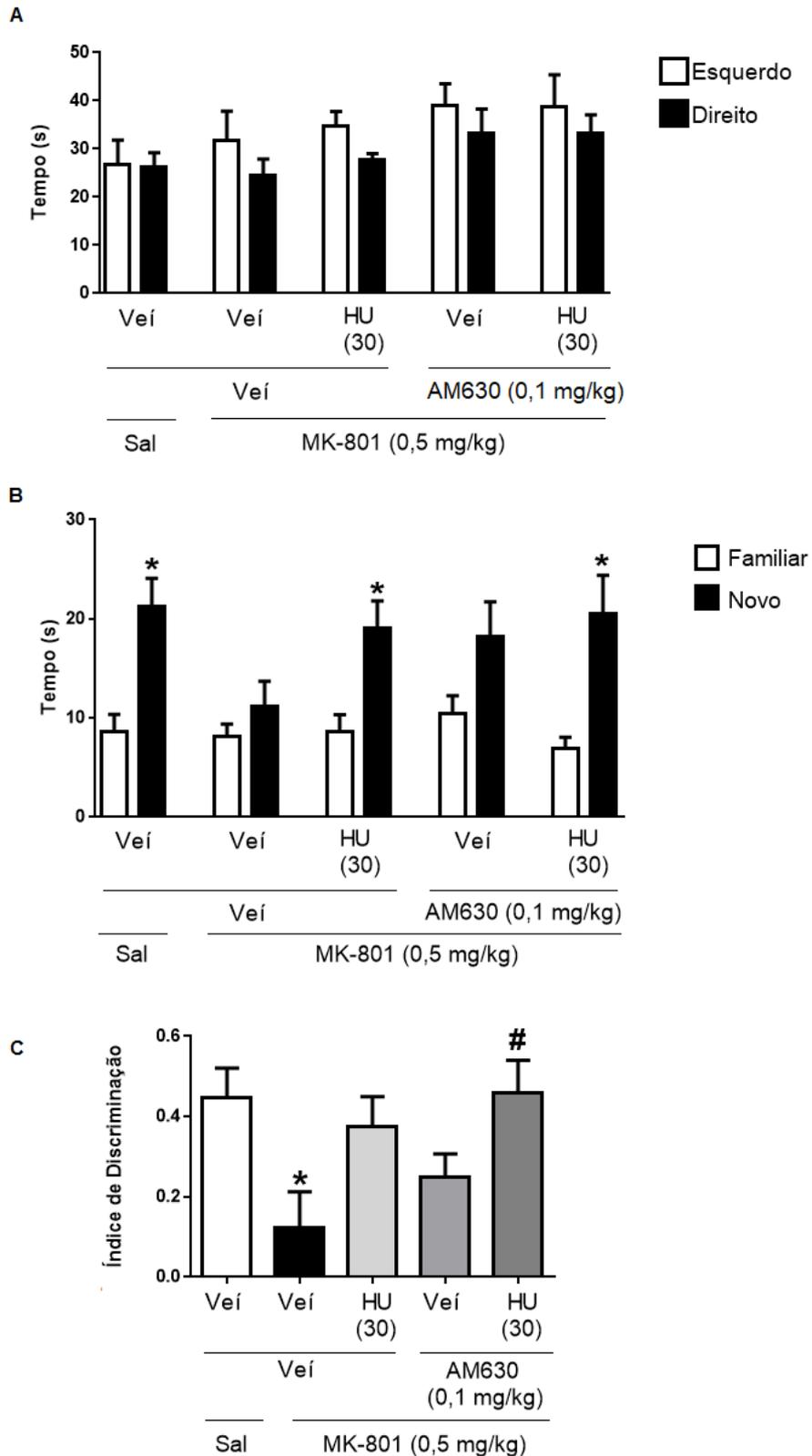


Figura 12. AM630 (0,1 mg/kg) não bloqueia o efeito do tratamento repetido com HU-910 (30 mg/kg) no prejuízo induzido pelo tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) no RO. Os animais foram tratados duas vezes ao dia por 14 dias consecutivos

com salina ou MK-801. Nos 7 dias subsequentes, os animais receberam uma injeção de veículo ou AM630 e após 10 minutos uma injeção de veículo ou HU-910. Decorridas 72 h da última injeção os animais foram submetidos ao teste de RO (n=6/grupo). **A.** Tempo de exploração dos objetos idênticos na sessão de aquisição. Teste t de *Student* para cada grupo de tratamento. **B.** Tempo de exploração dos objetos familiar e novo na sessão de retenção. *p<0,05 indica diferença no tempo de exploração do objeto novo em comparação ao objeto familiar, teste t de *Student* para cada grupo de tratamento. **C.** Índice de discriminação de objetos. *p<0,05 em relação ao grupo salina+veículo+veículo; #p<0,05 em relação ao grupo MK-801+veículo+veículo. Os dados estão apresentados como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

5.9 Experimento 9: Efeito do pré-tratamento com AM630 (0,3 mg/kg) sobre o efeito do HU-910 (30 mg/kg) no prejuízo induzido pelo tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) no RO.

Na sessão de aquisição, não houve preferência em nenhum dos grupos por algum dos objetos idênticos (p>0,05; Figura 12A). Na sessão de retenção, o tempo de exploração do objeto novo foi significativamente maior em comparação ao objeto familiar em todos os grupos, exceto no grupo MK-801+AM630+HU-910 (p>0,05; Figura 12B). Em relação ao índice de discriminação, não houve diferença em nenhum dos grupos em relação ao grupo salina+veículo+veículo (p>0,05; Figura 12C). Não houve alteração na atividade locomotora espontânea dos animais em nenhum dos grupos de tratamento (p>0,05; Figura 12D).

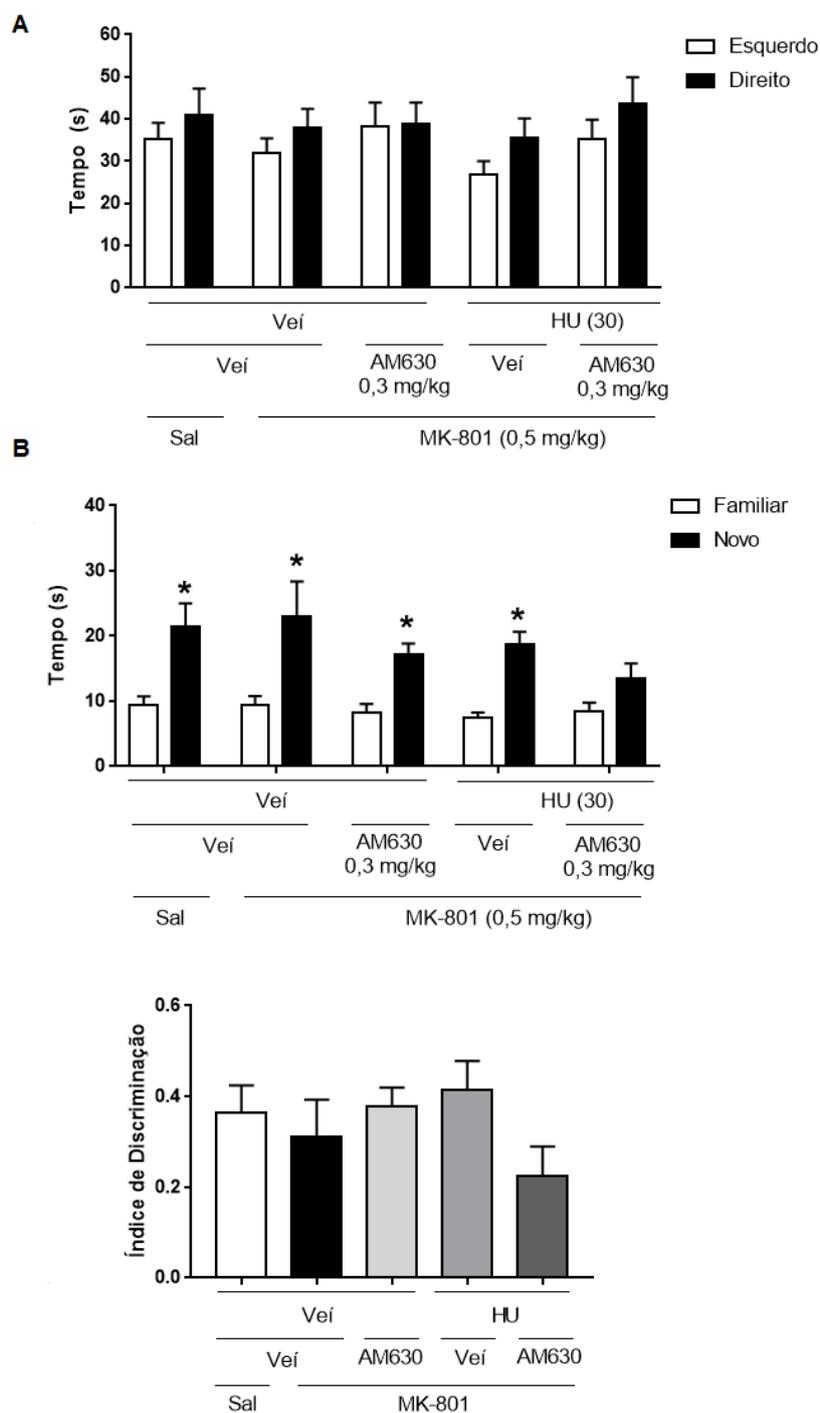


Figura 13. Tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) não induziu prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos. Os animais foram tratados duas vezes ao dia por 14 dias consecutivos com salina ou MK-801. Nos 7 dias subsequentes, os animais receberam uma injeção de veículo ou AM630 e após 10 minutos uma injeção de veículo ou HU-910. Decorridas 72 h da última injeção os animais foram submetidos ao teste de RO (n=10-12/grupo). **A.** Tempo de exploração dos objetos idênticos na

sessão de aquisição. Teste t de *Student* para cada grupo de tratamento. **B.** Tempo de exploração dos objetos familiar e novo na sessão de retenção. * $p < 0,05$ indica diferença no tempo de exploração do objeto novo em comparação ao objeto familiar, teste t de *Student* para cada grupo de tratamento. **C.** Índice de discriminação de objetos. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. ANOVA de uma via.

5.10 Experimento 10: Efeito do tratamento com HU-910 (30 mg/kg) na téttrade canabinoide.

O tratamento com WIN55,212-5 induziu as quatro alterações comportamentais características da téttrade canabinoide, causando a catalepsia ($F_{(2,14)}=46,23$; $p < 0,05$), antinocicepção ($F_{(2,14)}=9,06$; $p < 0,05$), hipolocomoção ($F_{(2,14)}=16,09$; $p < 0,05$) e hipotermia ($F_{(2,14)}=10,32$; $p < 0,05$, Figura 12). Após o tratamento com HU-910 não foram observados os efeitos de catalepsia e hipotermia quando comparado ao grupo veículo ($p > 0,05$ vs. veículo, pós-teste de Tukey). Contudo, foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo veículo nos testes de placa quente e hipolocomoção ($p < 0,05$ vs. veículo, pós-teste de Tukey; Figura 12), sugerindo efeito antinociceptivo e locomotor do HU-910.

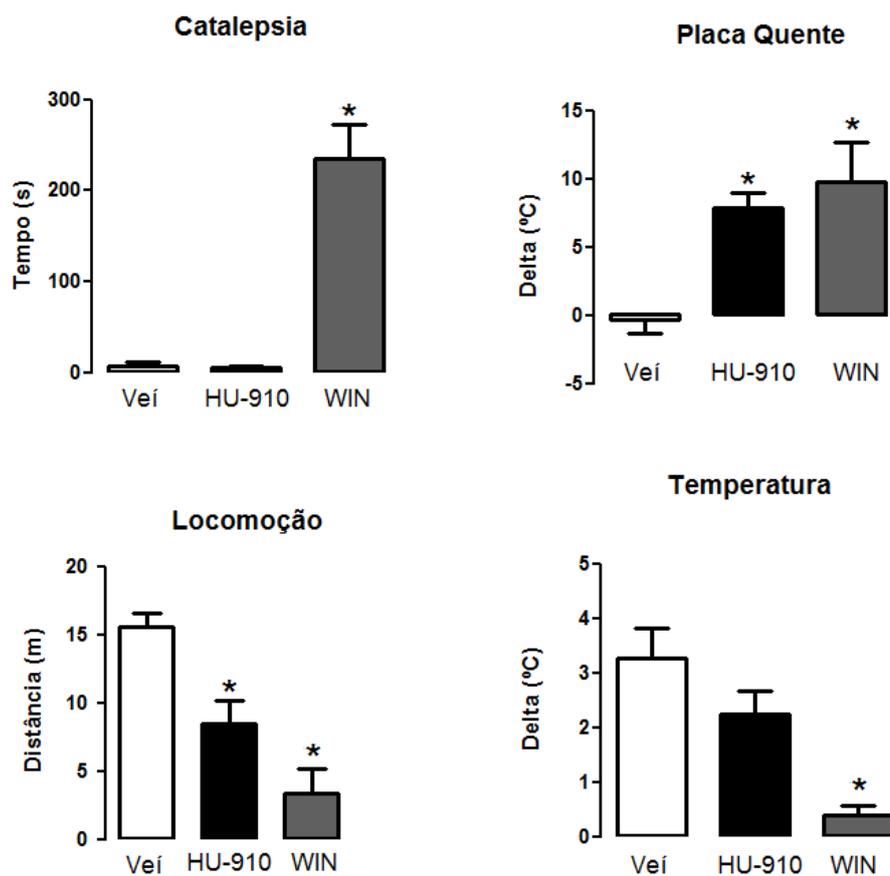


Figura 14. Tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) não induz a tétrede canabinoides, diferentemente do tratamento com WIN55,212-2 (5 mg/kg). Os animais receberam uma injeção (i.p.) de veículo, WIN55,212-2 ou HU-910 30 minutos antes da tétrede canabinoide. Os dados estão apresentados como média ± EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo. ANOVA de uma via seguida pelo teste de S-N-K.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A administração de antagonistas de receptores NMDA, como a ketamina, PCP e o MK-801, tem sido utilizada como modelo para o estudo de drogas com possível efeito antipsicótico. No presente estudo, observamos que o tratamento agudo com HU-910 (30 mg/kg) previne a hiperlocomoção induzida pela administração aguda de MK-801 e este efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com AM630. Esse dado sugere que o efeito do HU-910 em prevenir a hiperlocomoção induzida por MK-801 é dependente da ativação de receptores CB2. O canabidiol (CBD), um fitocanabinoide não psicotomimético presente na *Cannabis sativa*, assim como a clozapina, previne a hiperlocomoção induzida por ketamina e por anfetamina (Moreira & Guimarães, 2005). Interessantemente, dados não publicados do nosso grupo mostraram que o efeito do CBD em inibir a hiperlocomoção induzida pela anfetamina é bloqueado pelo pré-tratamento com o AM630 (Rodrigues, dados não publicados, 2020), sugerindo o envolvimento dos receptores CB2 neste efeito. Por atuar como inibidor da enzima FAAH, enzima que hidrolisa o endocanabinoide anandamida, o CBD poderia promover um aumento desse endocanabinoide, resultando na ativação indireta de receptores CB2 (Zuardi et al., 2012).

Apesar dos resultados observados na hiperlocomoção induzida por MK-801, o tratamento com HU-910 não foi capaz inibir a hiperlocomoção induzida por anfetamina em diferentes esquemas de administração. O efeito hiperlocomotor de psicoestimulantes resulta do aumento extracelular de DA em estruturas límbicas, como núcleo accumbens e estriado (Koob & Nestler, 1997). Ao inibir a recaptção de DA, a anfetamina facilita a neurotransmissão

dopaminérgica, aumentando a atividade locomotora. Entretanto, sugere-se que o MK-801 promove aumento da atividade locomotora ao bloquear receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos. Dessa forma, o antagonismo NMDA reduziria a atividade inibitória dos interneurônios sobre a liberação de dopamina no NAc (Yan et al., 1997). Como descrito anteriormente, a ativação de receptores CB2 expressos no corpo celular de neurônios dopaminérgicos na VTA resulta em diminuição da excitabilidade neuronal (Ma et al., 2019). Assim, o HU-910 no teste poderia atuar diminuindo a taxa de disparo potencialmente aumentada dos neurônios dopaminérgicos induzida pelo MK-801.

No campo aberto, o HU-910 diminui a atividade locomotora basal dos animais. Esse efeito hipolocomotor é observado também para o outro agonista seletivo de receptores CB2, o JWH-133. Xi e colaboradores mostraram que a infusão local de JWH-133 no NAc resultou na redução na locomoção em animais CB1KO, mas não em animais CB2KO (Xi et al., 2011). Além disso, a administração sistêmica do JWH-133 também induziu hipolocomoção em roedores (Kruk-Slomka et al., 2017). De maneira oposta, a deleção seletiva de receptores CB2 em neurônios dopaminérgicos na VTA (DAT-Cnr2 cKO) resulta em uma maior resposta locomotora à administração aguda de anfetamina e cocaína em comparação a animais WT (Canseco-Alba et al., 2019; Liu et al., 2017). Curiosamente, em nosso estudo o pré-tratamento com AM251 e AM630 não preveniu o efeito hipolocomotor do HU-910 nas doses utilizadas.

A administração crônica de antagonistas NMDA tem sido extensamente utilizada no estudo de alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroanatômicas relacionadas à esquizofrenia. A redução no tempo de interação social em roedores tem sido relacionada aos sintomas negativos do transtorno,

enquanto prejuízos no teste de reconhecimento de objetos estariam relacionados aos sintomas cognitivos (Gomes et al., 2015b). Estudos do nosso grupo mostraram que a administração crônica de MK-801 por 28 dias resulta em alterações comportamentais e comprometimento cognitivo em animais nos testes de interação social, reconhecimento de objetos e PPI, sendo essas alterações atenuadas pelo tratamento crônico com clozapina e com CBD (Gomes, et al., 2015a; Gomes, et al., 2015b). Nosso grupo também observou que o tratamento com MK-801, duas vezes ao dia, por 14 dias, também induz redução no tempo de interação social e prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos e essas alterações comportamentais são revertidas pelo tratamento repetido com CBD (Rodrigues da Silva et al., 2020). No teste de reconhecimento de objetos, o HU-910 reverteu o prejuízo induzido pelo MK-801. Uma vez que este teste mimetiza, em modelos animais, o prejuízo cognitivo observado em pacientes com o transtorno e que os antipsicóticos utilizados na clínica apresentam eficácia limitada nesse grupo de sintomas, drogas com esse perfil poderiam ser uma alternativa terapêutica necessária na clínica.

Embora bem descrito na literatura, o prejuízo induzido por antagonistas de receptores NMDA no comportamento de interação social e a validade do teste em roedores (Wilson & Koenig, 2014; Zoicas & Kornhuber, 2019), no nosso estudo não foi observado redução no tempo de interação social no grupo tratado com MK-801. O comportamento social de roedores é complexo e pode ser significativamente influenciado por diversos fatores. Eventos estressantes que ocorram ao longo da vida do animal podem afetar o comportamento social de roedores, diminuindo tempo de interação com um animal não familiar (Beery & Kaufer, 2015). Em uma análise mais detalhada dos dados, podemos observar

que o tempo de interação social dos animais salina+salina em nosso trabalho é menor que o tempo de interação dos animais controles dos trabalhos obtidos como referência para este estudo (Gomes, et al., 2015b; Rodrigues da Silva et al., 2020). Ainda que nenhum estressor intencional tenha sido utilizado nesse trabalho, fatores como background genético dos animais, condições de gestação da mãe e a condição do alojamento dos animais nas primeiras semanas de vida podem ter influenciado o comportamento social dos animais (Beery & Kaufer, 2015).

O teste do PPI é um teste comumente utilizado para avaliar a função do filtro sensorio-motor, que está prejudicada em pacientes com esquizofrenia (Braff et al., 1999). Essa disfunção pode ser reproduzida em modelos animais e revertida pelo tratamento com o antipsicótico de primeira geração, haloperidol (Mansbach et al., 1988). Nesse teste tanto o tratamento com anfetamina quanto com o MK-801 induziu prejuízo em todas as intensidades de pré-pulso avaliadas. Esses resultados corroboram com achados da literatura que mostram que a administração aguda de drogas como anfetamina e antagonistas de receptores NMDA resulta em prejuízo do filtro sensorio-motor (Long et al., 2006; Mansbach et al., 1988). Estudos mostram que a administração de antipsicóticos de primeira geração, como o haloperidol, e de segunda geração, como a clozapina e olanzapina, reduz o prejuízo induzido por apomorfina e anfetamina em ratos (Andersen & Pouzet, 2001; Rasmussen et al., 1997; Swerdlow & Geyer, 1993). De maneira similar, o tratamento com o CBD também foi capaz de atenuar o prejuízo no PPI induzido pelo tratamento agudo com MK-801 e com anfetamina (Long et al., 2006; Pedrazzi et al., 2015).

Nossos dados mostram que o tratamento com HU-910 atenua o prejuízo induzido pela administração de anfetamina e de MK-801 no teste de PPI. Khella e colaboradores mostraram que o tratamento agudo com o agonista de receptores CB2 JWH015 não altera o PPI *per se*, mas previne o prejuízo causado pelo tratamento com MK-801. Esse efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com AM630, mas não com o pré-tratamento com AM251 (Khella et al., 2014). Além disso, a ativação de receptores CB2 parece ser necessária para o efeito do VU0467154, um modulador alostérico positivo de receptores M4, em prevenir o prejuízo no PPI induzido por anfetamina, uma vez que o pré-tratamento com AM630 bloqueia o efeito dessa droga (Foster et al., 2016). Apesar de o presente estudo não ter avaliado como o HU-910 exerce seu efeito no teste do PPI, é possível sugerir que este seria via receptores CB2, uma vez que o pré-tratamento com AM630 bloqueia o efeito agudo do HU-910 sobre a hiperlocomoção induzida por MK-801. Além disso, os dados da literatura também suportam a possibilidade de a ativação de receptores CB2 reverterem o prejuízo no PPI. Entretanto, é importante ressaltar que para avaliar se a ativação desses receptores é necessária para o efeito do HU-910 no teste, o teste com pré-tratamento com AM630 seria necessário.

O pré-tratamento com AM630 na dose de 0,1 mg/kg não bloqueou o efeito do tratamento repetido com HU-910 em reverter o prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos. Tendo em vista que apenas uma dose do antagonista foi utilizada e uma curva de inibição não foi realizada previamente, o não bloqueio do efeito do HU-910 pode ser resultado de uma baixa dose do antagonista. Por isso, avaliamos se o pré-tratamento com AM630 na dose de 0,3 mg/kg bloquearia o efeito do HU-910 no teste. Entretanto, diferentemente do

esperado, o tratamento repetido com MK-801 não produziu prejuízo no teste, o que impossibilita conclusões sobre o efeito do HU-910 e se uma dose maior de AM630 conseguiria bloquear este efeito neste modelo. É interessante ressaltar que o tratamento repetido com doses relativamente altas interferem na seletividade das drogas, e a ação das mesmas em outros receptores é mais provável nesse tipo de tratamento. Sendo assim, é possível que o efeito do tratamento repetido com HU-910 no teste RO envolva outros mecanismos que não a ativação de receptores CB2.

Trabalhos que utilizam o modelo baseado no antagonismo de receptores NMDA têm demonstrado que a ativação de receptores serotoninérgicos atenua a hiperlocomoção induzida por esses antagonistas e reverte o prejuízo cognitivo no teste de RO causados pelo tratamento repetido com MK-801 (Meltzer et al., 2011). Adicionalmente, antipsicóticos de segunda geração que apresentam alguma eficácia sobre os sintomas negativos e cognitivos, como a clozapina, possuem atividade sobre receptores serotoninérgicos 5-HT e essa atividade estaria relacionada aos efeitos desses fármacos (Meltzer et al., 2011). Rodrigues e colaboradores observaram que o pré-tratamento com o antagonista de receptores 5-HT_{1A} (WAY100635) bloqueou os efeitos benéficos do CBD nos testes de IS e RO (Rodrigues da Silva et al., 2020). Este dado corrobora a hipótese de que os sintomas do transtorno são, ao menos em parte, relacionados ao sistema serotoninérgico e sua interconexão com o sistema dopaminérgico e, assim, a ativação desses receptores pode ser necessária para que um fármaco tenha ação sobre sintomas cognitivos e negativos (Stephan et al., 2009). Dessa forma, esses receptores seriam um alvo interessante na investigação do

mecanismo pelo qual o HU-910 apresenta efeito sobre sintomas cognitivos em modelo animal.

Foi observado que o tratamento agudo com HU-910 não induz os quatro efeitos clássicos da tétrede canabinoide. Drogas que ativam receptores CB1 produzem efeitos semelhantes aos observados para o delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ -THC), limitando seu emprego na clínica. Uma vez que o HU-910 não produziu as quatro alterações descritas na tétrede canabinoide, é pouco provável que o composto ative receptores CB1 na dose testada. Porém, foi observado diminuição da locomoção nos animais tratados com HU-910 na dose efetiva de 30mg/kg, reproduzindo o efeito observado no campo aberto após a administração do composto nessa mesma dose. Este efeito é observado também com o tratamento com haloperidol, antipsicótico típico utilizado na clínica, o qual promove redução da atividade locomotora espontânea de ratos e previne a hiperlocomoção induzida por anfetamina (Moreira & Guimarães, 2005). Entretanto, diferentemente deste antipsicótico típico e semelhante ao CBD (Zuardi et al., 1982), o HU-910 não causa catalepsia, teste comumente utilizado para avaliar a tendência de uma droga experimental em induzir efeitos extrapiramidais em humanos.

Foi observado um aumento na latência de retirada das patas nos animais tratados com HU-910 (30 mg/kg) no teste da placa quente, sugerindo efeito antinociceptivo. O promissor potencial analgésico de drogas canabinoides tem sido extensamente investigado na literatura, especialmente de agonistas de receptores CB2. O composto HUF-101, um derivado fluorado da molécula do CBD, também apresentou efeito antinociceptivo no teste da placa quente e esse efeito foi atenuado pelo pré-tratamento com o antagonistas CB1 e CB2,

sugerindo que a ativação desses receptores está envolvida no potencial analgésico do composto (Silva et al., 2017). Além disso, a administração de AM1241, agonista seletivo de receptores CB2, aumenta a latência de retirada da pata no teste de placa quente. Esse efeito foi bloqueado pelo antagonismo de receptores CB2, mas não pelo antagonismo de receptores CB1. Esses dados indicam que o efeito antinociceptivo do AM1241 é possivelmente mediado por receptores CB2 (Malan et al., 2001). Em um outro estudo, a administração de um agonista seletivo CB2, o O-3223, resultou em diminuição da nocicepção em animais no teste da formalina e este efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista de receptores CB2, SR144528 (Kinsey et al., 2011). Sendo assim, o efeito antinociceptivo induzido pelo HU-910 observado na tétrede canabinoide em nosso estudo corrobora com dados da literatura que demonstram o potencial analgésico de agonistas de receptores CB2.

Os mecanismos pelos quais os receptores canabinoides medeiam o efeito antinociceptivo ainda não são completamente descritos, entretanto uma das hipóteses seria a ação desses compostos em receptores CB2 periféricos, diminuindo a sensibilidade de neurônios aferentes primários (Malan et al., 2001). Em concordância com essa hipótese, Quartilho e colaboradores demonstraram que a administração local de agonista CB2 também é capaz de reduzir a hipersensibilidade térmica induzida por carragenina e este efeito é bloqueado pelo pré-tratamento com AM630 (Quartilho et al., 2003).

Conclusão

7. CONCLUSÃO

O tratamento agudo com o HU-910 preveniu alterações comportamentais relacionadas à esquizofrenia induzidas pelo MK-801 nos testes de hiperlocomoção e PPI. Adicionalmente, o tratamento repetido com HU-910, semelhante ao tratamento com antipsicótico de segunda geração clozapina, reverteu o prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos induzido pelo tratamento crônico com MK-801. Esses resultados sugerem que o composto HU-910 apresenta efeito tipo-antipsicótico em modelo animal baseado no antagonismo de receptores NMDA. Além disso, o tratamento agudo com o composto não induz os quatro efeitos da tétrede canabinoide, indicando ausência de ação sobre receptores CB1. Embora o possível mecanismo de ação do HU-910 não tenha sido profundamente estudado, foi observado que o pré-tratamento com AM630 bloqueia o efeito do HU-910 no teste de hiperlocomoção, sugerindo que o efeito agudo do HU-910 é mediado pela ativação de receptores CB2.

Referências

8. REFERÊNCIAS

- Akbarian, S., Sucher, N. J., Bradley, D., Tafazzoli, A., Trinh, D., Hetrick, W. P., Potkin, S. G., Sandman, C. A., Bunney, W. E., & Jones, E. G. (1996). Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-01-00019.1996>
- Andersen, M. P., & Pouzet, B. (2001). Effects of acute versus chronic treatment with typical or atypical antipsychotics on d-amphetamine-induced sensorimotor gating deficits in rats. *Psychopharmacology*, *156*(2–3). <https://doi.org/10.1007/s002130100818>
- Aracil-Fernández, A., Trigo, J. M., García-Gutiérrez, M. S., Ortega-Álvarez, A., Ternianov, A., Navarro, D., Robledo, P., Berbel, P., Maldonado, R., & Manzanares, J. (2012). Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. *Neuropsychopharmacology*, *37*(7), 1749–1763. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.22>
- Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., & Luheshi, G. N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: Implications for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *11*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001748>
- Bae, J. S. eo., Kim, J. Y. ongh., Park, B. L., Kim, J. H., Kim, B., Park, C. S. o., Kim, B. J., Lee, C. S., Lee, M., Choi, W. H. yu., Shin, T. M., Hwang, J., Shin, H. D. o., & Woo, S. Il. (2014). Genetic association analysis of CNR1 and CNR2 polymorphisms with schizophrenia in a Korean population. *Psychiatric Genetics*, *24*(5), 225–229. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000047>
- Beckstead, M. J., Grandy, D. K., Wickman, K., & Williams, J. T. (2004). Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron*, *42*(6), 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.019>
- Beery, A. K., & Kaufer, D. (2015). Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. *Neurobiology of Stress*, *1*(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.10.004>
- Beneyto, M., & Meador-Woodruff, J. H. (2008). Lamina-specific abnormalities of NMDA receptor-associated postsynaptic protein transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301604>
- Benito, C., Tolón, R. M., Pazos, M. R., Núñez, E., Castillo, A. I., & Romero, J. (2008). Cannabinoid CB 2 receptors in human brain inflammation. *British Journal of Pharmacology*, *153*(2), 277–285. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707505>
- Bioque, M., García-Bueno, B., MacDowell, K. S., Meseguer, A., Saiz, P. A., Parellada, M., Gonzalez-Pinto, A., Rodriguez-Jimenez, R., Lobo, A., Leza, J. C., & Bernardo, M. (2013). Peripheral endocannabinoid system dysregulation in first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology*, *38*(13), 2568–2577.

<https://doi.org/10.1038/npp.2013.165>

- Bland, S. T., Beckley, J. T., Young, S., Tsang, V., Watkins, L. R., Maier, S. F., & Bilbo, S. D. (2010). Enduring consequences of early-life infection on glial and neural cell genesis within cognitive regions of the brain. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24*(3), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.09.012>
- Braff, D. L., Swerdlow, N. R., & Geyer, M. A. (1999). Symptom correlates of prepulse inhibition deficits in male schizophrenic patients. *American Journal of Psychiatry*, *156*(4), 596–602. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.4.596>
- Bruins Slot, L. A., Kleven, M. S., & Newman-Tancredi, A. (2005). Effects of novel antipsychotics with mixed D2 antagonist/5-HT1A agonist properties on PCP-induced social interaction deficits in the rat. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.05.013>
- Bubeníková-Valešová, V., Horáček, J., Vrajová, M., & Höschl, C. (2008). Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *32*(5), 1014–1023. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.012>
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Sonego, A. B., & Guimarães, F. S. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research*, *112*, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.033>
- Canseco-Alba, A., Schanz, N., Sanabria, B., Zhao, J., Lin, Z., Liu, Q. R., & Onaivi, E. S. (2019). Behavioral effects of psychostimulants in mutant mice with cell-type specific deletion of CB2 cannabinoid receptors in dopamine neurons. *Behavioural Brain Research*, *360*(November 2018), 286–297. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.043>
- Carlisle, S. J., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C., & Cabral, G. A. (2002). Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *International Immunopharmacology*, *2*(1), 69–82. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00147-3)
- Carrier, E. J., Kearn, C. S., Barkmeier, A. J., Breese, N. M., Yang, W., Nithipatikom, K., Pfister, S. L., Campbell, W. B., & Hillard, C. J. (2004). Cultured Rat Microglial Cells Synthesize the Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol, Which Increases Proliferation via a CB2 Receptor-Dependent Mechanism. *Molecular Pharmacology*, *65*(4), 999–1007. <https://doi.org/10.1124/mol.65.4.999>
- Chang, C. K., Hayes, R. D., Perera, G., Broadbent, M. T. M., Fernandes, A. C., Lee, W. E., Hotopf, M., & Stewart, R. (2011). Life expectancy at birth for people with serious mental illness and other major disorders from a secondary mental health care case register in London. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019590>
- Chen, D. J., Gao, M., Gao, F. F., Su, Q. X., & Wu, J. (2017). Brain cannabinoid receptor 2: Expression, function and modulation. *Acta Pharmacologica Sinica*, *38*(3), 312–316. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.149>

- Davis, K. L., Kahn, R. S., Ko, G., & Davidson, M. (1991). Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. *American Journal of Psychiatry*, *148*(11), 1474–1486. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.11.1474>
- De Marchi, N., De Petrocellis, L., Orlando, P., Daniele, F., Fezza, F., & Di Marzo, V. (2003). Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids in Health and Disease*, *2*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-2-1>
- Diana, G., & Sagratella, S. (1994). Different capability of N-methyl-D-aspartate antagonists to affect locomotor/exploratory activity of mice in a computerized on-line open field test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *48*(1), 291–295. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90529-0](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90529-0)
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, *51*(1), 7–61.
- Doorduyn, J., De Vries, E. F. J., Willemsen, A. T. M., De Groot, J. C., Dierckx, R. A., & Klein, H. C. (2009). Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: A PET study. *Journal of Nuclear Medicine*, *50*(11), 1801–1807. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.066647>
- Dracheva, S., Marras, S. A. E., Elhakem, S. L., Kramer, F. R., Davis, K. L., & Haroutunian, V. (2001). N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.9.1400>
- Ehrhart, J., Obregon, D., Mori, T., Hou, H., Sun, N., Bai, Y., Klein, T., Fernandez, F., Tan, J., & Shytle, D. (2005). Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, *2*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-29>
- Ellenbroek, B. A., & Cools, A. R. (2000). Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behavioural Pharmacology*, *11*(3–4), 223–233. <https://doi.org/10.1097/00008877-200006000-00006>
- Elvevag, B., & Goldberg, T. E. (2000). Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. In *Critical Reviews in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v14.i1.10>
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. In *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Fakhoury, M. (2017). Role of the Endocannabinoid System in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Molecular Neurobiology*, *54*(1), 768–778. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9697-5>
- Featherstone, R. E., Kapur, S., & Fletcher, P. J. (2007). The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (Vol. 31, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.08.025>
- Fejgin, K., Safonov, S., Pålsson, E., Wass, C., Engel, J. A., Svensson, L., & Klamer, D.

- (2007). The atypical antipsychotic, aripiprazole, blocks phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1007/s00213-006-0658-y>
- Fiorillo, C. D., & Williams, J. T. (1998). Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature*, *394*(6688), 78–82.
<https://doi.org/10.1038/27919>
- Foster, D. J., Wilson, J. M., Remke, D. H., Mahmood, M. S., Uddin, M. J., Wess, J., Patel, S., Marnett, L. J., Niswender, C. M., Jones, C. K., Xiang, Z., Lindsley, C. W., Rook, J. M., & Conn, P. J. (2016). Antipsychotic-like Effects of M4 Positive Allosteric Modulators Are Mediated by CB2 Receptor-Dependent Inhibition of Dopamine Release. *Neuron*, *91*(6), 1244–1252.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.017>
- Giuffrida, A., Leweke, F. M., Gerth, C. W., Schreiber, D., Koethe, D., Faulhaber, J., Klosterkötter, J., & Piomelli, D. (2004). Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology*, *29*(11), 2108–2114.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300558>
- Gobira, P. H., Ropke, J., Aguiar, D. C., Crippa, J. A. S., & Moreira, F. A. (2013). Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, *35*(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1164>
- Gomes, F. V., Del Bel, E. A., & Guimarães, F. S. (2013). Cannabidiol attenuates catalepsy induced by distinct pharmacological mechanisms via 5-HT1A receptor activation in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *46*, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.06.005>
- Gomes, F. V., Issy, A. C., Ferreira, F. R., Viveros, M. P., Del Bel, E. A., & Guimaraes, F. S. (2015). Cannabidiol attenuates sensorimotor gating disruption and molecular changes induced by chronic antagonism of NMDA receptors in Mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *18*(5), 1–10.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu041>
- Gomes, F. V., Llorente, R., Del Bel, E. A., Viveros, M. P., López-Gallardo, M., & Guimarães, F. S. (2015). Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. *Schizophrenia Research*, *164*(1–3), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.015>
- Gómez-Gálvez, Y., Palomo-Garo, C., Fernández-Ruiz, J., & García, C. (2016). Potential of the cannabinoid CB2 receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *64*, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.03.017>
- Grace, A. A. (2017). Dopamine System Dysregulation and the Pathophysiology of Schizophrenia: Insights From the Methylazoxymethanol Acetate Model. In *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.11.007>
- Grace, A. A., & Gomes, F. V. (2019). The circuitry of dopamine system regulation and its

- disruption in schizophrenia: Insights into treatment and prevention. *Schizophrenia Bulletin*, 45(1), 148–157. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx199>
- Graeff, F. G., & Guimarães, F. S. (2012). Fundamentos de Psicofarmacologia. In *Fundamentos de Psicofarmacologia*.
- Guidali, C., Viganò, D., Petrosino, S., Zamberletti, E., Realini, N., Binelli, G., Rubino, T., Di Marzo, V., & Parolaro, D. (2011). Cannabinoid CB1 receptor antagonism prevents neurochemical and behavioural deficits induced by chronic phencyclidine. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1017/S1461145710000209>
- Hanson, E., Healey, K., Wolf, D., & Kohler, C. (2010). Assessment of pharmacotherapy for negative symptoms of schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*, 12(6), 563–571. <https://doi.org/10.1007/s11920-010-0148-0>
- Hashimoto, K., Fujita, Y., Shimizu, E., & Iyo, M. (2005). Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.07.002>
- Horváth, B., Magid, L., Mukhopadhyay, P., Bátkai, S., Rajesh, M., Park, O., Tanchian, G., Gao, R. Y., Goodfellow, C. E., Glass, M., Mechoulam, R., & Pacher, P. (2012). A new cannabinoid CB2 receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*, 165(8), 2462–2478. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01381.x>
- Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Ishikawa, M., Koga, M., Imai, K., Suzuki, Y., Morikawa, M., Inada, T., Watanabe, Y., Takahashi, M., Someya, T., Ujike, H., Iwata, N., Ozaki, N., Onaivi, E. S., Kunugi, H., Sasaki, T., Itokawa, M., Arai, M., ... Arinami, T. (2010). Brain Cannabinoid CB2 Receptor in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 67(10), 974–982. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.024>
- J.D., J., & R.H., R. (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: From NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20(3), 201–225. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181e2f08b>
- Jones, C., Watson, D., & Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1162–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>
- Kew, J. N. C., & Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. In *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z>
- Khella, R., Short, J. L., & Malone, D. T. (2014). CB2 receptor agonism reverses MK-801-induced disruptions of prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology*, 231(16), 3071–3087. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3481-x>
- Kinsey, S. G., Mahadevan, A., Zhao, B., Sun, H., Naidu, P. S., Razdan, R. K., Selley, D. E.,

- Imad Damaj, M., & Lichtman, A. H. (2011). The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. *Neuropharmacology*, *60*(2–3), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.09.004>
- Koob, G. F., & Nestler, E. J. (1997). The neurobiology of drug addiction. In *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. <https://doi.org/10.1176/jnp.9.3.482>
- Kreitzer, A. C. (2005). Neurotransmission: Emerging roles of endocannabinoids. In *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.005>
- Kruk-Slomka, M., Banaszekiewicz, I., & Biala, G. (2017). The Impact of CB2 Receptor Ligands on the MK-801-Induced Hyperactivity in Mice. *Neurotoxicity Research*, *31*(3), 410–420. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9702-4>
- Krystal, J. H., Perry, E. B., Gueorguieva, R., Belger, A., Madonick, S. H., Abi-Dargham, A., Cooper, T. B., MacDougall, L., Abi-Saab, W., & Cyril D'Souza, D. (2005). Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: Implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Archives of General Psychiatry*. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.9.985>
- Lahti, A. C., Weiler, M. A., Michaelidis, T., Parwani, A., & Tamminga, C. A. (2001). Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00243-3](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00243-3)
- Leitão, R. J., Ferraz, M. B., Chaves, A. C., & Mari, J. J. (2006). Cost of schizophrenia: Direct costs and use of resources in the State of São Paulo. *Revista de Saude Publica*. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102006000200017>
- Lewis, D. A., & Lieberman, J. A. (2000). Catching up on schizophrenia: Natural history and neurobiology. In *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00111-2)
- Lewis, S., & Lieberman, J. (2008). CATIE and CUtLASS: can we handle the truth? *British Journal of Psychiatry*, *192*(3), 161–163. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.037218>
- Lieberman, J. A., Stroup, T. S., McEvoy, J. P., Swartz, M. S., Rosenheck, R. A., Perkins, D. O., Keefe, R. S. E., Davis, S. M., Davis, C. E., Lebowitz, B. D., Severe, J., & Hsiao, J. K. (2005). Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia. *New England Journal of Medicine*, *353*(12), 1209–1223. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051688>
- Lin, A., Kenis, G., Bignotti, S., Tura, G. J. B., De Jong, R., Bosmans, E., Pioli, R., Altamura, C., Scharpé, S., & Maes, M. (1998). The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: Increased serum interleukin-6. *Schizophrenia Research*, *32*(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(98\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(98)00034-6)
- Lisboa, S. F., Gomes, F. V., Guimaraes, F. S., & Campos, A. C. (2016). Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. In *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00005>
- Liu, Q. R., Canseco-Alba, A., Zhang, H. Y., Tagliaferro, P., Chung, M., Dennis, E.,

- Sanabria, B., Schanz, N., Escosteguy-Neto, J. C., Ishiguro, H., Lin, Z., Sgro, S., Leonard, C. M., Santos-Junior, J. G., Gardner, E. L., Egan, J. M., Lee, J. W., Xi, Z. X., & Onaivi, E. S. (2017). Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17796-y>
- Long, L. E., Malone, D. T., & Taylor, D. A. (2006). Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300838>
- Lu, H. C., & MacKie, K. (2016). An introduction to the endogenous cannabinoid system. In *Biological Psychiatry* (Vol. 79, Issue 7). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Luongo, L., Maione, S., & Di Marzo, V. (2014). Endocannabinoids and neuropathic pain: Focus on neuron-glia and endocannabinoid-neurotrophin interactions. *European Journal of Neuroscience*, *39*(3), 401–408. <https://doi.org/10.1111/ejn.12440>
- Ma, Z., Gao, F., Larsen, B., Gao, M., Luo, Z., Chen, D., Ma, X., Qiu, S., Zhou, Y., Xie, J., Xi, Z. X., & Wu, J. (2019a). Mechanisms of cannabinoid CB2 receptor-mediated reduction of dopamine neuronal excitability in mouse ventral tegmental area. *EBioMedicine*, *42*, 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.040>
- Ma, Z., Gao, F., Larsen, B., Gao, M., Luo, Z., Chen, D., Ma, X., Qiu, S., Zhou, Y., Xie, J., Xi, Z. X., & Wu, J. (2019b). Mechanisms of cannabinoid CB2 receptor-mediated reduction of dopamine neuronal excitability in mouse ventral tegmental area. *EBioMedicine*, *42*, 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.040>
- Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *168*, 299–325. <https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2-10>
- Magid, L., Heymann, S., Elgali, M., Avram, L., Cohen, Y., Liraz-Zaltsman, S., Mechoulam, R., & Shohami, E. (2019). Role of CB2 Receptor in the Recovery of Mice after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6063>
- Malan, T. P., Ibrahim, M. M., Deng, H., Liu, Q., Mata, H. P., Vanderah, T., Porreca, F., & Makriyannis, A. (2001). CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00321-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00321-9)
- Malhotra, A. K., Pinals, D. A., Adler, C. M., Elman, I., Clifton, A., Pickar, D., & Breier, A. (1997). Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00036-5)
- Mansbach, R. S., Geyer, M. A., & Braff, D. L. (1988). Dopaminergic stimulation disrupts sensorimotor gating in the rat. *Psychopharmacology*, *94*(4), 507–514. <https://doi.org/10.1007/BF00212846>
- Manzanas, J., Cabañero, D., Puente, N., García-Gutiérrez, M. S., Grandes, P., & Maldonado, R. (2018). Role of the endocannabinoid system in drug addiction.

- Biochemical Pharmacology*, 157, 108–121.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.09.013>
- Maresz, K., Carrier, E. J., Ponomarev, E. D., Hillard, C. J., & Dittel, B. N. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of Neurochemistry*, 95(2), 437–445.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x>
- Martín-Moreno, A. M., Reigada, D., Ramírez, B. G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., & De Ceballos, M. L. (2011). Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: Relevance to alzheimer's disease. *Molecular Pharmacology*, 79(6), 964–973.
<https://doi.org/10.1124/mol.111.071290>
- McGrath, J., Saha, S., Chant, D., & Welham, J. (2008). Schizophrenia: A concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiologic Reviews*, 30(1), 67–76. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxn001>
- Meltzer, H. Y., Horiguchi, M., & Massey, B. W. (2011). The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. *Psychopharmacology*, 213(2–3), 289–305. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2137-8>
- Meng, Z. H., Feldpaush, D. L., & Merchant, K. M. (1998). Clozapine and haloperidol block the induction of behavioral sensitization to amphetamine and associated genomic responses in rats. *Molecular Brain Research*, 61(1–2).
[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00196-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00196-X)
- Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., & Koller, B. H. (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81972-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81972-8)
- Monji, A., Kato, T. A., Mizoguchi, Y., Horikawa, H., Seki, Y., Kasai, M., Yamauchi, Y., Yamada, S., & Kanba, S. (2013). Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 42, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.12.002>
- Moreira, F. A., & Guimarães, F. S. (2005). Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *European Journal of Pharmacology*, 512(2–3), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.040>
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61–65.
<https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Murray, R. M., Lappin, J., & Di Forti, M. (2008). Schizophrenia: From developmental deviance to dopamine dysregulation. *European Neuropsychopharmacology*, 18(SUPPL. 3), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.04.002>
- Nagai, T., Murai, R., Matsui, K., Kamei, H., Noda, Y., Furukawa, H., & Nabeshima, T. (2009). Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors.

Psychopharmacology. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1240-6>

- O'Neill, M. F., & Shaw, G. (1999). Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology*, *145*(3), 237–250. <https://doi.org/10.1007/s002130051055>
- Ortega-Alvaro, A., Aracil-Fernández, A., García-Gutiérrez, M. S., Navarrete, F., & Manzanares, J. (2011). Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology*, *36*(7), 1489–1504. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.34>
- Paladini, C. A., & Tepper, J. M. (2016). Neurophysiology of Substantia Nigra Dopamine Neurons: Modulation by GABA and Glutamate. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, *24*, 335–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00017-9>
- Palazuelos, J., Aguado, T., Pazos, M. R., Julien, B., Carrasco, C., Resel, E., Sagredo, O., Benito, C., Romero, J., Azcoitia, I., Fernández-Ruiz, J., Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2009). Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain*, *132*(11), 3152–3164. <https://doi.org/10.1093/brain/awp239>
- Palazuelos, J., Davoust, N., Julien, B., Hatterer, E., Aguado, T., Mechoulam, R., Benito, C., Romero, J., Silva, A., Guzmán, M., Nataf, S., & Galve-Roperh, I. (2008). The CB2 cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: Involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(19), 13320–13324. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707960200>
- Paulson, P. E., Camp, D. M., & Robinson, T. E. (1991). Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology*, *103*(4). <https://doi.org/10.1007/BF02244248>
- Pedrazzi, J. F. C., Issy, A. C., Gomes, F. V., Guimarães, F. S., & Del-Bel, E. A. (2015). Cannabidiol effects in the prepulse inhibition disruption induced by amphetamine. *Psychopharmacology*, *232*(16), 3057–3065. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-3945-7>
- Perkins, D. O., Jeffries, C. D., & Do, K. Q. (2020). Potential Roles of Redox Dysregulation in the Development of Schizophrenia. In *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.03.016>
- Quartilho, A., Mata, H. P., Ibrahim, M. M., Vanderah, T. W., Porreca, F., Makriyannis, A., & Malan, T. P. (2003). Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB 2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology*. <https://doi.org/10.1097/00000542-200310000-00031>
- Ramírez, B. G., Blázquez, C., Gómez Del Pulgar, T., Guzmán, M., & De Ceballos, M. L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *Journal of Neuroscience*, *25*(8), 1904–1913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4540->

04.2005

- Rasmussen, K., Gates, M. R., Burger, J. E., & Czachura, J. F. (1997). The novel atypical antipsychotic olanzapine, but not the CCK-B antagonist LY288513, blocks apomorphine-induced disruption of pre-pulse inhibition. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13346-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13346-8)
- Roche, M., & Finn, D. P. (2010). Brain CB2 receptors: Implications for neuropsychiatric disorders. *Pharmaceuticals*, 3(8), 2517–2533. <https://doi.org/10.3390/ph3082517>
- Rodrigues da Silva, N., Gomes, F. V., Sonego, A. B., Silva, N. R. da, & Guimarães, F. S. (2020). Cannabidiol attenuates behavioral changes in a rodent model of schizophrenia through 5-HT_{1A}, but not CB1 and CB2 receptors. *Pharmacological Research*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104749>
- Rung, J. P., Carlsson, A., Markinhuhta, K. R., & Carlsson, M. L. (2005). (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; A model for negative symptoms of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.03.004>
- Sagredo, O., González, S., Aroyo, I., Pazos, M. R., Benito, C., Lastres-Becker, I., Romero, J. P., Tolón, R. M., Mechoulam, R., Brouillet, E., Romero, J., & Fernández-Ruiz, J. (2009). Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: Relevance for Huntington's disease. *Glia*, 57(11), 1154–1167. <https://doi.org/10.1002/glia.20838>
- Sanberg, P. R., Bunsey, M. D., Giordano, M., & Norman, A. B. (1988). The Catalepsy Test: Its Ups and Downs. *Behavioral Neuroscience*, 102(5), 748–759. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.102.5.748>
- Sánchez-Zavaleta, R., Cortés, H., Avalos-Fuentes, J. A., García, U., Segovia-Vila, J., Eriji, D., & Florán, B. (2018). Presynaptic cannabinoid CB2 receptors modulate [3 H]-Glutamate release at subthalamo-nigral terminals of the rat. *Synapse*, 72(11), 52–55. <https://doi.org/10.1002/syn.22061>
- Schatz, A. R., Lee, M., Condie, R. B., Pulaski, J. T., & Kaminski, N. E. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: A characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8034>
- Seeman, P., & Kapur, S. (2000). Schizophrenia: More dopamine, more D2 receptors. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.7673>
- Sellgren, C. M., Gracias, J., Watmuff, B., Biag, J. D., Thanos, J. M., Whittredge, P. B., Fu, T., Worringer, K., Brown, H. E., Wang, J., Kaykas, A., Karmacharya, R., Goold, C. P., Sheridan, S. D., & Perlis, R. H. (2019). Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0334-7>
- Silva, N. R., Gomes, F. V., Fonseca, M. D., Mechoulam, R., Breuer, A., Cunha, T. M., & Guimarães, F. S. (2017). Antinociceptive effects of HUF-101, a fluorinated

- cannabidiol derivative. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.012>
- Söderlund, J., Schröder, J., Nordin, C., Samuelsson, M., Walther-Jallow, L., Karlsson, H., Erhardt, S., & Engberg, G. (2009). Activation of brain interleukin-1B in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *14*(12), 1069–1071. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.52>
- Soethoudt, M., Grether, U., Fingerle, J., Grim, T. W., Fezza, F., De Petrocellis, L., Ullmer, C., Rothenhäusler, B., Perret, C., Van Gils, N., Finlay, D., Macdonald, C., Chicca, A., Gens, M. D., Stuart, J., De Vries, H., Mastrangelo, N., Xia, L., Alachouzos, G., ... Van Der Stelt, M. (2017). Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13958>
- Stefani, M. R., & Moghaddam, B. (2005). Transient N-methyl-D-aspartate receptor blockade in early development causes lasting cognitive deficits relevant to schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *57*(4), 433–436. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.031>
- Stephan, K. E., Friston, K. J., & Frith, C. D. (2009). Dysconnection in Schizophrenia: From abnormal synaptic plasticity to failures of self-monitoring. In *Schizophrenia Bulletin* (Vol. 35, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn176>
- Swerdlow, N. R., & Geyer, M. A. (1993). Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90193-W](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90193-W)
- Tsai, G., & Coyle, J. T. (2002). G <sc>LUTAMATERGIC</sc> M <sc>ECHANISMS IN</sc> S <sc>CHIZOPHRENIA</sc>. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *42*(1), 165–179. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.42.082701.160735>
- Ujike, H., Takaki, M., Nakata, K., Tanaka, Y., Takeda, T., Kodama, M., Fujiwara, Y., Sakai, A., & Kuroda, S. (2002). CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *7*(5), 515–518. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001029>
- van Berckel, B. N., Bossong, M. G., Boellaard, R., Kloet, R., Schuitemaker, A., Caspers, E., Luurtsema, G., Windhorst, A. D., Cahn, W., Lammertsma, A. A., & Kahn, R. S. (2008). Microglia Activation in Recent-Onset Schizophrenia: A Quantitative (R)-[11C]PK11195 Positron Emission Tomography Study. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.04.025>
- Van Kesteren, C. F. M. G., Gremmels, H., De Witte, L. D., Hol, E. M., Van Gool, A. R., Falkai, P. G., Kahn, R. S., & Sommer, I. E. C. (2017). Immune involvement in the pathogenesis of schizophrenia: A meta-analysis on postmortem brain studies. *Translational Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.4>
- Waldo Zuardi, A., Alexandre S. Crippa, J., E.C. Hallak, J., Bhattacharyya, S., Atakan, Z., Martin-Santos, R., K. McGuire, P., & Silveira Guimaraes, F. (2012). A Critical Review of the Antipsychotic Effects of Cannabidiol: 30 Years of a Translational

- Investigation. *Current Pharmaceutical Design*.
<https://doi.org/10.2174/138161212802884681>
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K., & Stella, N. (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-04-01398.2003>
- Weickert, C. S., Fung, S. J., Catts, V. S., Schofield, P. R., Allen, K. M., Moore, L. T., Newell, K. A., Pellen, D., Huang, X. F., Catts, S. V., & Weickert, T. W. (2013). Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.137>
- Weickert, T. W., Goldberg, T. E., Gold, J. M., Bigelow, L. B., Egan, M. F., & Weinberger, D. R. (2000). Cognitive Impairments in Patients With Schizophrenia Displaying Preserved and Compromised Intellect. *Archives of General Psychiatry*, 57(9), 907. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.9.907>
- Wilson, C. A., & Koenig, J. I. (2014). Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, 24(5), 759–773. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.11.008>
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 619–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Wong, A. H. C., & Van Tol, H. H. M. (2003). Schizophrenia: From phenomenology to neurobiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(3), 269–306. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00035-6)
- Xi, Z. X., Peng, X. Q., Li, X., Song, R., Zhang, H. Y., Liu, Q. R., Yang, H. J., Bi, G. H., Li, J., & Gardner, E. L. (2011). Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nature Neuroscience*, 14(9), 1160–1168. <https://doi.org/10.1038/nn.2874>
- Yan, Q. S., Reith, M. E. A., Jobe, P. C., & Dailey, J. W. (1997). Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00568-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00568-4)
- Zarruk, J. G., Fernández-López, D., García-Yébenes, I., García-Gutiérrez, M. S., Vivancos, J., Nombela, F., Torres, M., Burguete, M. C., Manzanares, J., Lizasoain, I., & Moro, M. A. (2012). Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.631044>
- Zhang, H. Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G. H., Yang, H. J., Liu, Q. R., Wu, J., Gardner, E. L., Bonci, A., & Xi, Z. X. (2017). Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addiction Biology*, 22(3), 752–765. <https://doi.org/10.1111/adb.12367>
- Zhang, M., Adler, M. W., Abood, M. E., Ganea, D., Jallo, J., & Tuma, R. F. (2009). CB2

receptor activation attenuates microcirculatory dysfunction during cerebral ischemic/reperfusion injury. *Microvascular Research*, 78(1), 86–94.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.03.005>

Zhang, X. Y., Zhou, D. F., Zhang, P. Y., Wu, G. Y., Cao, L. Y., & Shen, Y. C. (2002). Elevated interleukin-2, interleukin-6 and interleukin-8 serum levels in neuroleptic-free schizophrenia: Association with psychopathology. *Schizophrenia Research*.
[https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(01\)00296-1](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(01)00296-1)

Zoicas, I., & Kornhuber, J. (2019). The role of the n-methyl-d-aspartate receptors in social behavior in rodents. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225599>

Zuardi, A. W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E., & Karniol, I. G. (1982). Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by δ 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/BF00432554>