



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

DANYELLE SILVA AMARAL

**Avaliação da associação de canabidiol e nitroprussiato de sódio no prejuízo sensório-
motor induzido pelo tratamento agudo com MK-801**

Ribeirão Preto

2023

DANYELLE SILVA AMARAL

**Avaliação da associação de canabidiol e nitroprussiato de sódio no prejuízo sensório-
motor induzido pelo tratamento agudo com MK-801**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dr^a. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

Ribeirão Preto

2023

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

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação Biblioteca Central
USP Ribeirão Preto

Amaral, Danyelle Silva

Avaliação da Associação de Canabidiol e Nitroprussiato de Sódio no Prejuízo Sensorio-Motor Induzido pelo Tratamento Agudo com MK-801; orientadora, Elaine Aparecida Del-Bel Belluz Guimarães. - 2023.

125 p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

1. Esquizofrenia. 2. Modelos animais de esquizofrenia. 3. Teste de inibição pré-pulso. 4. CBD. 5. NPS.

Nome: AMARAL, Danyelle Silva

Título: Avaliação da associação de canabidiol e nitroprussiato de sódio no prejuízo sensório-motor induzido pelo tratamento agudo com MK-801

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À minha família, com amor, admiração e gratidão pela compreensão. Aos amigos, pelo carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.
A todos os pacientes com esquizofrenia.

AGRADECIMENTOS

À Elaine Del-Bel, minha mãe científica.

À minha família, meu refúgio.

Ao meu melhor amigo Drauzio, não consigo expressar minha gratidão.

Ao Pira, por me incentivar a ir atrás dos meus sonhos, mesmo que tenha que abrir mão de muitas coisas.

Ao Leoncio, pelas reflexões no biotério, pelos desabafos, por tudo que me ensinou. Temos que aceitar que tudo tem prazo de validade.

Ao Belchior, por sempre me ajudar a tomar decisões e me ensinar a argumentar, mesmo inconscientemente.

À Dona Neuza, por me ensinar tanto sobre a vida, a humanidade e suas individualidades.

À Célia, por toda ajuda com experimentos e por me ensinar que sempre há uma solução para o problema.

Ao Charlie, por me acolher em momentos difíceis dessa jornada.

À Glauce e ao Maurício, por todo apoio e inspiração.

Ao João Francisco, o Jhony Francis, meu amigo e pai científico, por toda a amizade, acolhimento e ensinamentos.

Ao Matias, minha terceira mãe, obrigada pela amizade e por cuidar tanto de mim.

A todos do laboratório, minha família científica, por todo companheirismo, apoio e aprendizado.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia pelo apoio.

Aos animais, que tanto amo. Obrigada por todo o conhecimento proporcionado à ciência e à humanidade. Não tenho palavras e nem o direito de agradecer, mas obrigada.

A todos os pacientes de esquizofrenia, que me inspiraram por todo o caminho.

À minha querida Unifal, pois minha formação não se iniciou e nem terminará aqui.

Ao departamento de Fisiologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto à Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

A todos que passaram pela pandemia, juntos fomos uma rede de apoio.

Ao universo e ao acaso, por me proporcionar toda essa experiência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Mais importante que uma técnica, é cabeça.
Observação, disciplina, trabalho e conclusões.
Saber interpretar resultados e formular
hipóteses.”

(Ricardo Leão)

RESUMO

AMARAL, Danyelle Silva. Avaliação da associação de canabidiol e nitroprussiato de sódio no prejuízo sensorio-motor induzido pelo tratamento agudo com MK-801. 2023. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico, incapacitante e sem cura que acomete aproximadamente 24 milhões de pessoas no mundo. Sua etiologia é pouco elucidada, mas parece envolver diversos neurotransmissores, como glutamato, GABA, dopamina, serotonina, endocanabinoides e óxido nítrico. A terapia antipsicótica não é completamente eficaz para tratar toda a sintomatologia do transtorno e pode promover diversos efeitos colaterais. Uma alteração importante observada em pacientes com esquizofrenia é a deficiência no processamento de informações, avaliada pelo teste de inibição pré-pulso (PPI), o qual é uma ferramenta translacional importante na busca de drogas com perfil antipsicótico. Os antagonistas do receptor de glutamato N-metil-D-aspartato e drogas que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica prejudicam o teste de PPI. Compostos como canabidiol (CBD) e nitroprussiato de sódio (NPS) apresentam perfil terapêutico em ensaios pré-clínicos e clínicos relacionados a esquizofrenia. Essas drogas interagem com diversos sistemas de neurotransmissores por meio de mecanismos ainda pouco compreendidos. A combinação de fármacos pode viabilizar a utilização de doses menores dos mesmos, com diminuição de seus efeitos colaterais, aumentando a tolerabilidade, a adesão ao tratamento e o impacto benéfico na variedade de sintomas apresentados na esquizofrenia. Assim, o presente estudo visou avaliar se a associação de CBD e NPS de forma aguda é capaz de atenuar ou abolir déficits comportamentais e moleculares gerados pelo MK-801. Camundongos Suíços machos divididos em diferentes regimes de tratamento farmacológico foram submetidos a ensaios comportamentais (teste PPI e actímetro). O tratamento agudo com MK-801 (0,5 mg/kg causou prejuízo no teste de PPI, diminuiu os movimentos horizontais e verticais no teste do actímetro e promoveu aumento na expressão da proteína c-Fos no córtex pré-frontal medial pré-límbico (PrL) e infra límbico (IL), estriado dorsomedial e dorsolateral (DL) e *accumbens* core e shell. O CBD (60 mg/kg), NPS (2,5 mg/kg) preveniram o comprometimento no teste de PPI induzido por MK-801. No entanto, a associação de CBD e NPS em doses subefetivas não foi eficaz em prevenir esse prejuízo, mas impediu o aumento na expressão de c-Fos no córtex pré-frontal medial e no estriado DL. A associação de doses subefetivas de CBD e NPS não preveniu o PPI e o comprometimento motor induzido pelo MK-801. Nossos dados mostram que o MK-801 e o teste de PPI representam uma ferramenta apropriada para investigar novos compostos com potencial atividade antipsicótica e sugerem que a interação entre o sistema encanabinoide e nitrérgico é complexa, cujos os mecanismos envolvidos não são completamente claros, mas podem depender da interferência na neurotransmissão mediada por glutamato.

Palavras-chave: Esquizofrenia. Modelos animais de esquizofrenia. Teste de inibição pré-pulso. CBD. NPS. Dizocilpina.

ABSTRACT

AMARAL, Danyelle Silva. Evaluation of the association of cannabidiol and sodium nitroprusside in sensory-motor impairment induced by acute treatment with MK-801. 2023. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Schizophrenia is a chronic, disabling and incurable psychiatric disorder that affects approximately 24 million people worldwide. Its etiology is poorly understood, but it seems to involve several neurotransmitters, such as glutamate, GABA, dopamine, serotonin, endocannabinoids and nitric oxide. Antipsychotic therapy is not entirely effective in treating all the symptomatology of the disorder and can promote several side effects. A critical alteration observed in patients with schizophrenia is the impairment in information processing, assessed by the prepulse inhibition test (PPI), which is an essential translational tool in the search for drugs with an antipsychotic profile. N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antagonists and drugs that increase dopaminergic neurotransmission impair the PPI test. Compounds such as cannabidiol (CBD) and sodium nitroprusside (NPS) have a therapeutic profile in preclinical and clinical trials in schizophrenia. These drugs interact with several neurotransmitter systems through mechanisms that are still poorly understood. The combination of drugs can enable the use of smaller doses of the same, with a decrease in their side effects, increasing tolerability, adherence to treatment and the beneficial impact on the variety of symptoms presented in schizophrenia. Thus, the present study aimed to assess whether the combined acute treatment of CBD and NPS can attenuate or abolish behavioral and molecular deficits generated by MK-801. Male Swiss mice divided into different pharmacological treatment regimens were subjected to behavioral tests (PPI and actimeter). Acute treatment with MK-801 (0.5 mg/kg) caused impairment in the PPI test, decreased horizontal and vertical movements in the actimeter test, and increased c-Fos protein expression in the prelimbic medial prefrontal cortex (PrL) and infralimbic (IL), dorsomedial and dorsolateral (DL) striatum, and core and shell *accumbens* CBD (60 mg/kg), NPS (2.5 mg/kg) prevented MK-induced PPI test impairment -801. However, the association of CBD and NPS at sub-effective doses was ineffective in preventing this damage. However, it prevented increased c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and the DL striatum. The association of sub-effective doses of CBD and NPS did not prevent PPI and motor impairment induced by MK-801. Our data show that MK-801 and the test of PPI represent an appropriate tool to investigate new compounds with potential for antipsychotic activity and suggest that the interaction between the cannabinoid and nitrenergic system is complex, whose mechanisms involved are not completely clear but may depend on interference in glutamate-mediated neurotransmission.

Keywords: Schizophrenia. Animal models of schizophrenia. Prepulse inhibition test. CBD. NPS. Dizocilpine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------|---|
| CA1 | Região 1 do Corno de Amon |
| 2-AG | 2-araquidonoil glicerol |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidina |
| 7NI | 7-nitroindazol |
| AcbC | <i>Accumbens Core</i> |
| AcbSh | <i>Accumbens Shell</i> |
| $C_6H_8O_7H_2O$ | Ácido cítrico monohidrato |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| FAAH | Amida hidrolase de ácidos graxos |
| VTA | Área ventral tegmental |
| AB | Avidina-biotina |
| CA3 | CA3 Região 3 do Corno de Amon |
| CBD | Canabidiol |
| TRPV | Canais potenciais de receptores transitórios, subtipo vanilóide |
| $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ | Citrato de sódio dihidrato tribásico |
| PVC | Cloreto de polivinila |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal |
| RSC | Córtex retrosplenial |
| dB | Decibéis |
| THC | Delta-9-tetraidrocanabidiol |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| ROS | Espécie reativa de oxigênio |
| $C_2H_6O_2$ | Etilenoglicol |
| NADPH | Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida |
| PB | Fosfato de sódio |
| Na_2HPO_4 | Fosfato de sódio dibásico anidro |
| $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ | Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado |
| $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | Fosfato de sódio monobásico monohidratado |
| PBS | Fosfato-salino |
| DG | Giro denteado |

| | |
|---|---|
| GMPc | Guanosina monofosfato cíclico |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| IL | Infra-límbico |
| PPI | Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto |
| i.p. | Intraperitoneal |
| MA | Med associates |
| Iba-1 | Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 |
| MAO | Monoamino oxidase |
| AEA | N-araquidonoil-etanolamina |
| NPS | Nitroprussiato de sódio |
| NMDA | N-metil-d-aspartato |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| NO | Óxido nítrico |
| PFA | Paraformaldeído |
| PrL | Pré-límbico |
| GFAP | Proteína glial fibrilar ácida |
| PKA | Proteína quinase A |
| PKC | Proteína quinase C |
| PPAR γ | Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma |
| GPCR | Receptores acoplados a proteínas G |
| mGlu | Receptores metabotrópicos acoplados à proteína G |
| CA1 | Região 1 do Corno de Amon |
| CA3 | Região 3 do Corno de Amon |
| C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | Sacarose |
| NOS | Sintases do óxido nítrico |
| eNOS | Sintases do óxido nítrico endotelial |
| iNOS | Sintases do óxido nítrico induzível |
| nNOS | Sintases do óxido nítrico neuronal |
| SNC | Sistem nervoso central |
| GMS | Sítio modulador de glicina |
| BH ₄ | Tetra-hidrobiopterina |
| VMAT2 | Transportador vesicular de monoamina 2 |

| | |
|----------------------------|---|
| $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ | Triton® X-100 |
| $C_4H_{11}NO_3$ | Trizma ® base |
| VEI1 | Veículo 1 |
| VEI2 | Veículo 2 |
| AMPA | A-amino-3-hidroxi-5-metilisoxaole-4-propionato |
| WIN 55212-2 | [4,5- dihidro-2- metil- 4 (4- morfolinilmetil)- 1- (1- naftalenilcarbonil)- 6H-pirrolo [3,2,1ij] quinolin- 6- ona] |
| LTP | Potenciação de longo prazo |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Eventos que envolvem a formação de NO e as suas funções pré-sinápticas | 28 |
| Figura 2- Inibição Pré-Pulso | 38 |
| Figura 3- Tempo do PPI | 51 |
| Figura 4- Regiões e áreas analisadas dos encéfalos de camundongos | 53 |
| Figura 5- Protocolo experimental | 61 |
| Figura 6- Protocolo experimental 2 | 63 |
| Figura 7- Protocolo experimental 3 | 65 |
| Figura 8- Teste de actímetro: Efeito do CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801 | 70 |
| Figura 9- Teste de PPI: Efeito do CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801 | 72 |
| Figura 10- Startle: Efeito do CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801 | 73 |
| Figura 11 – Teste de actímetro: Efeito de doses subefetivas de CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801 | 74 |
| Figura 12 – Teste de PPI: Efeito de doses subefetivas de CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801 | 75 |
| Figura 13- Startle: Efeito de doses subefetivas de CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801 | 76 |
| Figura 14- Avaliação da Expressão de c-Fos | 77 |
| Figura 15- Representação da expressão de c-Fos no Córtex pré-frontal e Estriado DL | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Teste de actímetro: Efeito do CBD e NPS | 67 |
| Tabela 2 – Teste de PPI (%): Efeitos do CBD e NPS | 68 |
| Tabela 3- Efeitos do tratamento medicamentoso no Startle | 68 |
| Tabela 4- Uma Visão Geral da aplicação de CBD e as concentrações usadas no teste de PPI | 87 |
| Tabela 5 – Uma Visão Geral da aplicação de NPS e as concentrações utilizadas no teste de PPI | 93 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1- Lista de consumíveis utilizados nos experimentos | 45 |
| Quadro 2- Lista de aparelhos utilizados nos experimentos | 45 |
| Quadro 3- Anticorpo primário utilizado na imuno-histoquímica | 57 |
| Quadro 4- Anticorpo secundário utilizado na imuno-histoquímica | 57 |
| Quadro 5 - Soluções para diafanização e tempo de cada | 58 |

SUMÁRIO

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 1.1 | ESQUIZOFRENIA | 20 |
| 1.2 | HIPÓTESES FARMACOLÓGICAS DA ESQUIZOFRENIA | 21 |
| 1.2.1 | DOPAMINA E ESQUIZOFRENIA | 21 |
| 1.2.2 | SEROTONINA E ESQUIZOFRENIA | 23 |
| 1.2.3 | GLUTAMATO E ESQUIZOFRENIA | 24 |
| 1.2.4 | NO E ESQUIZOFRENIA..... | 26 |
| 1.2.5 | NITROPRUSSIATO DE SÓDIO E ESQUIZOFRENIA | 29 |
| 1.2.6 | SISTEMA ENDOCANABINOIDE E ESQUIZOFRENIA | 31 |
| 1.3 | MODELOS EXPERIMENTAIS DE ESQUIZOFRENIA | 34 |
| 1.4 | DEFICIÊNCIA NO PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES NA ESQUIZOFRENIA | 36 |
| 1.5 | EFEITOS ADVERSOS DOS ANTIPSICÓTICOS..... | 39 |
| 1.6 | ASSOCIAÇÕES MEDICAMENTOSAS PARA TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA | 40 |
| 2 | OBJETIVOS DO PROJETO..... | 43 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL:..... | 43 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS: | 43 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 3.1 | MATERIAIS | 45 |
| 3.2 | SOLUÇÕES E TAMPÕES PREPARADOS | 45 |
| 3.2.1 | TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO (PB; 0,2M; PH 7,4) | 46 |
| 3.2.2 | TAMPÃO FOSFATO-SALINO (PBS; 0,1M; PH 7,4)..... | 46 |
| 3.2.3 | SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA TRIS (TBS; 0,1M; PH 7,4) | 46 |
| 3.2.4 | TAMPÃO A (PH 7,4) | 46 |
| 3.2.5 | TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO (PH 6,0) | 47 |
| 3.2.6 | SOLUÇÃO DE MONTAGEM..... | 47 |
| 3.2.7 | SOLUÇÃO SACAROSE | 47 |
| 3.2.8 | SOLUÇÃO ANTICONGELANTE..... | 48 |
| 3.2.9 | PFA 8% (PARAFORMALDEÍDO; 8%; PH 7,4) | 48 |
| 3.2.10 | PFA 4% (PH 7,4) | 48 |
| 3.2.11 | SOLUÇÃO FIXADORA DE SOMOGYI | 48 |
| 3.3 | DROGAS..... | 49 |
| 3.4 | ANIMAIS | 49 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 3.5 | TESTE DE PPI | 50 |
| 3.6 | ACTÍMETRO | 51 |
| 3.7 | REMOÇÃO E CONGELAMENTO DOS TECIDOS | 52 |
| 3.8 | OBTENÇÃO DAS SECÇÕES DE TECIDO CEREBRAL..... | 52 |
| 3.9 | GELATINIZAÇÃO DAS LÂMINAS PARA MICROSCOPIA..... | 53 |
| 3.10 | IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 54 |
| 3.10.1 | 1º PARTE: INCUBAÇÃO COM O ANTICORPO PRIMÁRIO | 55 |
| 3.10.2 | 2º PARTE: REVELAÇÃO | 57 |
| 3.11 | QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C-FOS | 59 |
| 3.12 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 59 |
| 3.13 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 60 |
| 3.13.1 | EXPERIMENTO 1: TESTE DE PPI E ACTÍMETRO: EFEITOS DO CBD E NPS | 60 |
| 3.13.2 | EXPERIMENTO 2: TESTE DE PPI E ACTÍMETRO: A CAPACIDADE DO NPS E CBD DE PREVENIR OS EFEITOS INDUZIDOS POR MK-801..... | 62 |
| 3.13.3 | EXPERIMENTO 3: TESTE DE PPI E ACTÍMETRO: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO CDB E NPS NO PREJUÍZO INDUZIDO POR MK-801 | 64 |
| 4 | RESULTADOS | 67 |
| 4.1 | TESTE DE PPI E ACTÍMETRO: EFEITOS DO CBD E NPS..... | 67 |
| 4.2 | DETERMINAÇÃO DE DOSES EFETIVAS E SUBEFETIVAS DE CBD E NPS NO PREJUÍZO INDUZIDO POR MK-801 NO PARADIGMA PPI E ACTÍMETRO | 69 |
| 4.3 | EFEITO DE DOSES SUBEFETIVAS DE CBD E NPS NO PREJUÍZO INDUZIDO POR MK-801 NO PARADIGMA PPI E ACTÍMETRO | 73 |
| 4.3.1 | AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-FOS..... | 76 |
| 4.3.1.1 | Córtex pré-frontal medial pré-límbico e infra-límbico..... | 77 |
| 4.3.1.2 | AcbC e AcbSh | 79 |
| 4.3.1.3 | Estriado DM e DL | 80 |
| 4.3.1.4 | DG | 80 |
| 4.3.1.5 | CA1 e CA3 do hipocampo dorsal..... | 81 |
| 4.3.1.6 | RSC | 81 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 84 |
| 5.1 | MODELO DO DESENHO EXPERIMENTAL | 84 |
| 5.2 | EFEITOS DO CBD..... | 86 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.3 | EFEITOS DO NPS..... | 90 |
| 5.4 | EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE CBD E NPS..... | 94 |
| 5.5 | ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-FOS EM REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL..... | 95 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 102 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 103 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é um distúrbio mental crônico, debilitante e incurável que normalmente tem sua emergência ao no final da adolescência ou no início da vida adulta (MCCUTCHEON; REIS MARQUES; HOWES, 2020a). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022), esse transtorno afeta cerca de 24 milhões de pessoas no mundo e pode promover a redução da expectativa de vida em até vinte anos (HJORTHØJ *et al.*, 2017). Apesar dos avanços recentes, o tratamento ainda é um grande desafio. Ainda mais preocupante é que pacientes sem a terapia adequada ficam incapacitados de estudar, trabalhar, além de gerar não somente mais gastos em relação à hospitalização e tratamento, como também a deterioração da sua qualidade de vida (CHONG *et al.*, 2016). Aumentar a aderência ao tratamento e prevenir a recaída é fundamental para a melhora do prognóstico, redução do sofrimento pessoal e dos custos da saúde pública necessários para o tratamento e controle desse transtorno. No Brasil, o custo total da recaída no tratamento da esquizofrenia foi estimado em R\$ 1,07 bilhão no ano de 2013, sendo que cada paciente com recaída apresentou um gasto médio de R\$12.108,00 (TAY-TEO *et al.*, 2014).

Os indivíduos que sofrem de esquizofrenia manifestam uma série de alterações no comportamento, classificadas em três grupos de sintomas: positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas positivos são caracterizados por fenômenos mentais que estão ausentes em indivíduos sadios [delírios, alucinações (auditivas e visuais), distúrbio do pensamento e hiperatividade]. Em contraste, os sintomas negativos são descritos pela perda ou prejuízo significativo de funções psicológicas normais, com a ocorrência retraimento de social, anedonia (incapacidade de sentir prazer) e falta de motivação (GALDERISI *et al.*, 2018; MCCUTCHEON; REIS MARQUES; HOWES, 2020a). Já os sintomas cognitivos atingem funções executivas, atenção seletiva, memória de trabalho e funcionamento intelectual geral (MCCUTCHEON; REIS MARQUES; HOWES, 2020a; STORCHAK; EHLIS; FALLGATTER, 2021).

1.2 HIPÓTESES FARMACOLÓGICAS DA ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é conhecida por ser um transtorno complexo. Embora tenha etiologia ainda desconhecida, existem várias hipóteses que tentam explicar sua gênese (MCCUTCHEON; REIS MARQUES; HOWES, 2020b). Tais hipóteses são resultantes da ação de drogas na clínica ou na observação do efeito de drogas psicotomiméticas.

O mecanismo por trás das alterações observadas na psicose pode estar associado a distúrbios inflamatórios (MÜLLER, 2018), desregulação do sistema imunológico (VELÁSQUEZVELÁSQUEZ *et al.*, 2019), distúrbios do neurodesenvolvimento, que incluem anormalidades genéticas (FERNANDEZ *et al.*, 2019; MAYO *et al.*, 2019). Há ainda o envolvimento de vários neurotransmissores, entre outros, a dopamina, glutamato, serotonina, óxido nítrico, GABA, sendo necessário ser entendida dentro de um contexto multifatorial (BANSAL; CHATTERJEE, 2021). Mais recentemente, estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que o sistema endocanabinoide desempenha um papel importante na esquizofrenia, uma vez que participa de vários processos comportamentais e fisiológicos, subjacentes ao transtorno (FAKHOURY, 2017; LEWEKE *et al.*, 2018).

1.2.1 Dopamina e Esquizofrenia

Se alguém perguntasse a qualquer clínico ou pesquisador de saúde mental nos últimos 50 anos qual neurotransmissor está associado à psicose, a resposta imediata seria a dopamina e, especificamente, a hiperatividade da dopamina nos receptores tipo D2 da dopamina na via mesolímbica (MELTZER, STAHL, 1976; STAHL, 2000). A teoria da disfunção dopaminérgica continua a ser bem difundida para explicar os sintomas da esquizofrenia, sobretudo os sintomas positivos (GRACE, 2016). Ela preconiza que o aumento da neurotransmissão dopaminérgica na via mesolímbica (que parte da área tegmental ventral para o núcleo *accumbens*), estaria envolvida com a emergência dos sintomas positivos desse transtorno (MAIA; FRANK, 2017). Em contrapartida, a diminuição dessa neurotransmissão na via mesocortical (que liga a área tegmental ventral ao córtex pré-frontal) estaria envolvida com os sintomas negativos (NACHSHONI *et al.*, 2016). Neurônios dopaminérgicos

localizados na substância negra se projetam para o estriado, formando a via nigroestriatal. Já a via tuberoinfundibular é formada por neurônios que partem do núcleo arqueado hipotalâmico para a glândula pituitária (KLEIN *et al.*, 2019).

A neurotransmissão dopaminérgica se inicia a partir do aminoácido tirosina, o qual é posteriormente convertido em Levodopa, pela ação da enzima tirosina hidroxilase. Levodopa por sua vez é convertida em dopamina, pela enzima L-Aminoácido aromático descarboxilase (ou DOPA descarboxilase). Em seguida, o neurotransmissor é armazenado em vesículas por meio do transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2). O sistema dopaminérgico é composto por duas famílias de receptores, o subgrupo D1 e o subgrupo D2. A família D1 inclui o subtipo D1 e D5, já a família D2 inclui os subtipos D2, D3 e D4 (MISHRA, SINGH, SHUKLA, 2018; BHATIA, LENCHNER, SAADABADI, 2020). O uso de fármacos antipsicóticos, que atenuam a neurotransmissão dopaminérgica, por antagonizarem receptores de dopamina do tipo D2 apresentam efeitos terapêuticos, sobretudo nos sintomas positivos da esquizofrenia (URS; PETERSON; CARON, 2017a). A neurotransmissão termina com a degradação da dopamina pela enzima monoamino oxidase (MAO), a qual está presente na membrana de mitocôndrias, ou pela recaptação pelo transportador de dopamina (DAT; KLEIN *et al.*, 2019).

A família D1 têm alta densidade em regiões como núcleo *accumbens*, estriado, bulbo olfatório e substância negra. São essenciais na regulação do sistema de recompensa, atividade motora, memória e aprendizado (MISHRA; SINGH; SHUKLA, 2018; VEKSHINA *et al.*, 2017). Juntamente com a estimulação da enzima adenilato ciclase, ativam a enzima fosfolipase C, levando à liberação de cálcio intracelular e ativação da proteína quinase C, a qual é dependente de cálcio. Receptores D1 e D5 também estão presentes no rim, inibindo a enzima Na/K ATPase por meio das vias PKA e PKC (proteína quinase A e C, respectivamente; KLEIN *et al.*, 2019; MISHRA; SINGH; SHUKLA, 2018).

Já a família D2 (D2, D3 e D4) atua inibindo a adenilato ciclase e são expressos principalmente no estriado, no globo pálido externo, núcleo *accumbens*, hipocampo, amígdala e córtex cerebral. Estes, têm grande importância na sinalização para a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos humanos e no desenvolvimento neuronal (OLIVETTI *et al.*, 2020; VEKSHINA *et al.*, 2017). Camundongos geneticamente modificados para superexpressar os receptores de dopamina do tipo D2 no corpo estriado, exibem múltiplos comportamentos semelhantes ao que é observado na esquizofrenia (KELLENDONK *et al.*, 2006).

Embora outros sistemas de neurotransmissores estejam implicados na etiologia da esquizofrenia e da psicose (ver abaixo), o sistema dopaminérgico continua sendo o principal

alvo dos medicamentos antipsicóticos, e a disfunção dos circuitos centrais de dopamina continua sendo o mecanismo hipotético predominante desse transtorno (URS; PETERSON; CARON, 2017b).

1.2.2 Serotonina e Esquizofrenia

Enquanto de um lado a hipótese dopaminérgica deu esperança para o tratamento da psicose com antagonistas de receptores tipo D2, por outro lado, criou um dilema para os pacientes com psicose secundária à doença de Parkinson ou doença de Alzheimer, uma vez que esse tipo de tratamento piora o quadro desses pacientes, agravando a condição motora em portadores de Parkinson e elevando o risco de morte na doença de Alzheimer (CONNORS *et al.*, 2018; STAHL, 2016; WETMORE *et al.*, 2021). A observação de quebra de paradigma para esses transtornos psicóticos foi a eficácia do antagonismo de receptores de serotonina 2A, sem atuação nos D2, no tratamento destes sintomas secundários devido à doença de Parkinson e demência (CARACI *et al.*, 2020; CUMMINGS *et al.*, 2018; STAHL, 2016).

Essa descoberta levou à questão de saber se a serotonina é hiperativa nos receptores serotonina 2A nesses distúrbios, da mesma forma como ocorre quando os alucinógenos psicodélicos causam psicose (MAHMOOD *et al.*, 2022; WETMORE *et al.*, 2021). A ativação excessiva dos receptores de serotonina 2A na psicose da doença de Parkinson ou Alzheimer pode ser devido ao excesso de liberação de serotonina e consequente ativação de receptores serotonina 2A, a um aumento na expressão dos receptores serotonina 2A, ou ambos (CONNORS *et al.*, 2018; STAHL, 2016). Independentemente do mecanismo de ativação, a consequência será a liberação de glutamato, visto que alguns dos neurônios glutamatérgicos se projetam para a área tegmental área ventral (VTA) e o ativam (MORALES; MARGOLIS, 2017). Dessa forma, esse processo pode então ativar ainda mais a via mesolímbica como parte de uma reação em cadeia que leva à psicose, causando alucinações auditivas típicas e delírios paranoides. Enquanto as alucinações e delírios sugerem ser precipitados pela superativação da via mesolímbica, os neurônios que conduzem a hiperatividade do glutamato no córtex visual podem ainda mais comumente causar alucinações visuais em resposta à sua superativação (para revisão, BURSTEIN, 2021).

1.2.3 Glutamato e Esquizofrenia

A hipótese dopaminérgica pode explicar alguns aspectos da psicopatologia da esquizofrenia, especialmente os sintomas positivos (GRACE, 2016). No entanto, com a possível exceção da clozapina, os antipsicóticos típicos possuem efeitos insignificantes nos sintomas negativos e cognitivos, que são os preditores mais fortes de incapacidade nesse transtorno (LIM *et al.*, 2016; NACHSHONI *et al.*, 2016). Na hipótese glutamatérgica, a noção de que a psicose é devida a uma hiperatividade dopaminérgica é na realidade uma consequência de uma hipofunção glutamatérgica no córtex pré-frontal. Assim, sugere-se a hipofunção cortical glutamatérgica para explicar a fisiopatologia dos sintomas desse transtorno (BALU, 2016).

Corroborando com essa hipótese, uma grande variedade de genes relacionados com a esquizofrenia estão envolvidos na sinalização do glutamato (HUNG; LIN; LANE, 2021; TRUBETSKOY *et al.*, 2022). O glutamato é considerado o neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro. Ele ativa os receptores metabotrópicos acoplados à proteína G (mGlu) e os receptores ionotrópicos. Os receptores ionotrópicos são divididos em três subtipos com base em sua sensibilidade à ligantes seletivos de alta afinidade, sendo eles os receptores N-metil-d-aspartato (receptor NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metilisoaxole-4-propionato (AMPA) e cainato (para revisão ver, KIM *et al.*, 2020).

A base da teoria glutamatérgica é sustentada pela capacidade dos antagonistas de receptor NMDA em exacerbar os sintomas pré-existent em pacientes com esquizofrenia e induzir psicose semelhante à observada nesse transtorno em voluntários humanos (KRYSTAL *et al.*, 1994; LAHTI *et al.*, 1995). O canal iônico receptor NMDA convencional é heterotetramérico, consistindo em duas subunidades GluN1 e duas GluN2. Após sua ativação pelo glutamato, o receptor NMDA permite o influxo não seletivo de cálcio e sódio e saída de potássio (CORREA *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2020). Para que ocorra essa ativação, é necessário que ocorra exclusivamente três eventos simultâneos: (I) despolarização pós-sináptica, tipicamente por ativação de receptores AMPA, para remover o bloqueio de magnésio do canal de cátions GluN1; (II) ocupação do sítio modulador de glicina (GMS) em GluN1 por glicina ou D-serina; e (III) ligação do neurotransmissor glutamato ao seu receptor em GluN2 para abrir o canal e permitir a entrada de cálcio. O cálcio induz uma cascata de eventos intracelulares que medeiam a plasticidade sináptica funcional aguda local e mudanças na expressão gênica que promovem a plasticidade estrutural neural a longo prazo (BALU,

2016; KIM *et al.*, 2020).

Embora existam mais de 20 classes diferentes de interneurônios GABAérgicos baseada na morfologia (DEFELIPE *et al.*, 2013), tem sido sugerido que na esquizofrenia há uma perda de um tipo particular desse grupo neuronal caracterizados por conterem a proteína de ligação ao cálcio, denominada parvalbumina (ENWRIGHT *et al.*, 2018; KAAR *et al.*, 2019a). Os interneurônios parvabulminérgicos são neurônios de pico rápido que são críticos para a geração de oscilações síncronas na frequência da banda gama, um tipo de oscilação neuronal de alta frequência ligada à memória de trabalho e outros processos cognitivos e perceptivos complexos (GONZALEZ-BURGOS; CHO; LEWIS, 2015).

Em indivíduos saudáveis, a dopamina no córtex pré-frontal, através dos receptores dopaminérgicos, controla o disparo de interneurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos, que culminam com a regulação do disparo rítmico de neurônios piramidais liberadores de glutamato. Os neurônios piramidais regulam a atividade neuronal de qualquer um dos neurônios espinhosos médios do estriado, que expressam receptor NMDA e receptores dopaminérgicos ou neurônios da substância negra parte compacta do mesencéfalo, que também liberam dopamina nos neurônios espinhosos médios estriatais. Em condições que mimetizam a esquizofrenia, uma perda de dopamina no córtex pré-frontal (hipodopaminergia) ou inibição da atividade neuronal de interneurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos leva à superexcitabilidade de neurônios piramidais. A atividade aumentada de neurônios piramidais poderia levar ao aumento da atividade dos neurônios espinhosos médios do estriado diretamente ou através do aumento da liberação de dopamina (hiperdopaminergia) no corpo estriado pelos neurônios da substância negra parte compacta. (para revisão MCCUTCHEON; KRYSTAL; HOWES, 2020a). Ou seja, o prejuízo no funcionamento dos receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos levam à ausência de impulsos de inibição aos neurônios glutamatérgicos, aumentando a atividade do glutamato principalmente no córtex pré-frontal, que pode estar relacionado a sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia e distúrbios psiquiátricos relacionados (MCCUTCHEON; KRYSTAL; HOWES, 2020a).

Corroborando com essa teoria, estudos *post mortem* em pacientes com esquizofrenia sugerem que há uma redução na densidade de interneurônios parvalbuminérgicos no córtex frontal havendo redução não significativa nos níveis de RNA mensageiro (mRNA) para parvalbumina Assim, há uma robusta evidência de que o sistema GABAérgico é deficiente na esquizofrenia e que os interneurônios contendo parvalbumina podem ser um importante alvo para terapias associadas a esse transtorno (KAAR *et al.*, 2019b).

Assim, hipóteses baseadas na desregulação de outros neurotransmissores como, acetilcolina e GABA, também têm sido propostas para explicar a fisiopatologia da esquizofrenia (MARQUES *et al.*, 2020; PAUL *et al.*, 2022). Sobretudo, é importante ressaltar que todas as teorias propostas envolvem vias interconectadas, e é provável que em muitas diferentes formas de psicose, mais de uma dessas vias está envolvida (DEAN, 2017).

1.2.4 NO e Esquizofrenia

Desde meados do século XIX, nitritos e nitratos eram conhecidos por serem vasoativos, e eram utilizados na prática médica, apesar de dos mecanismos envolvidos na ativação de tais compostos serem desconhecidos (LAUDER BRUNTON, 1867). Em 1980, Furchgott e Zawadzki observaram que a estimulação do endotélio vascular liberava um fator de relaxamento sanguíneo, que ficou conhecido como fator de relaxamento derivado do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Posteriormente esse fator foi identificado como o óxido nítrico (NO) por Moncada e seu grupo de pesquisa (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Na mesma década, foi demonstrada a produção de NO em neurônios glutamatérgicos cerebelares após ativação de receptores NMDA (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988). Desde então, um profundo conhecimento sobre os papéis fisiológicos e patológicos do NO foi desvendado (GHIMIRE *et al.*, 2017).

Em consonância com a importância do NO como uma molécula de sinalização chave, bem como os alvos *downregulation* de sua via, essa molécula tem despertado o interesse em pesquisas farmacológicas relacionadas a vários distúrbios cerebrais (PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019; SHIM; SHUMAN; DUNCAN, 2016; TRIPATHI; KARTAWY; AMAL, 2020). Assim, além da sua atuação no sistema nervoso central, o NO é um mediador do sistema cardiovascular, renal, pulmonar, endócrino e imune onde é um mediador primário em ações bactericidas e tumoral de macrófagos, sendo capaz de se difundir através das membranas biológicas celulares, incluindo as do sistema nervoso central (SNC; para revisão ver, GARTHWAITE, 2016). fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

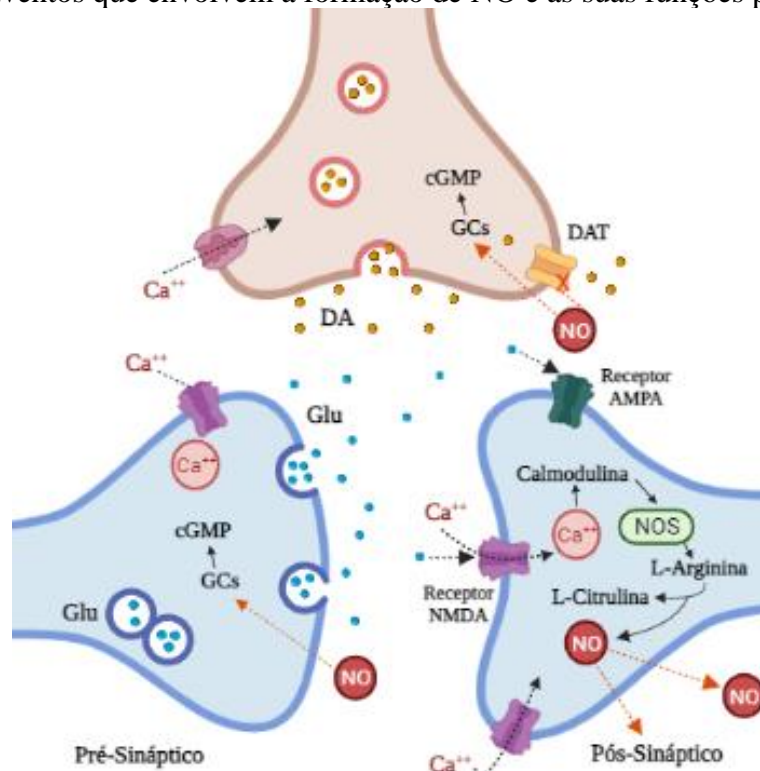
As enzimas que são responsáveis pela síntese do NO são chamadas de sintases do óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide synthase*; NOS) e podem ser encontradas em três isoformas, a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS), ambas constitutivas, e a forma induzível, iNOS (LIND *et al.*, 2017). Essas enzimas (NOSs) catalisam a oxidação dependente de fosfato

de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) e tetra-hidrobiopterina (BH₄) de L-arginina em L- citrulina e produzem NO como um dos produtos da reação (GHIMIRE *et al.*, 2017).

Através de evidências obtidas em estudos de diversas outras anormalidades no sistema glutamatérgico, Müller e Schwarz (2007) descreveram que as alterações encontradas na esquizofrenia poderiam estar relacionadas ao sistema glutamatérgico e ao sistema nitrérgico. Nessa essa linha de raciocínio, vários estudos tem corroborado com essa hipótese, sugerindo uma provável associação entre sintomas negativos da esquizofrenia e níveis reduzidos de metabólitos de NO e do nucleotídeo guanosina monofosfato cíclico (GMPc) no plasma (MAIA DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; NAKANO *et al.*, 2010) e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com o transtorno (GATTAZ; CRAMER; BECKMANN, 1983a).

Estudos realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo* sugerem que o NO endógeno desempenha um efeito inibitório sobre os transportadores de monoaminas, sugerindo uma ação inibitória do NO sobre a recaptação de dopamina e aumento da liberação deste neurotransmissor (KISS; ZSILLA; VIZI, 2004; PENGLEE *et al.*, 2021; SALUM *et al.*, 2011). Trabalhos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que inibidores da NOS NG-nitro-L-arginina (L-NOARG) e 7-nitroindazol (7NI) previnem os efeitos disruptivos no teste de inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (do inglês, *prepulse inhibition*; PPI) causados pela administração de anfetamina (SALUM *et al.*, 2011) e metilfenidato (ISSY; DEL BEL, 2014a; ISSY; SALUM; DEL BEL, 2009). A capacidade dos inibidores de NO de atenuar o prejuízo no PPI possivelmente engloba uma diminuição nos níveis de GMPc (ISSY; SALUM; DEL BEL, 2009). Estudos pioneiros mostraram que os níveis de GMPc no líquido cefalorraquidiano foram menores em indivíduos neurotípicos (EBSTEIN *et al.*, 1976; GATTAZ; ROBERTS; BECKMANN, 1986). O tratamento com drogas antipsicóticas em pacientes com esquizofrenia aumentou em torno de 50% os níveis de GMPc do líquido cefalorraquidiano. (EBSTEIN *et al.*, 1976). Isso sugere que o incremento da atividade nitrérgica pode ser útil para a terapia de pacientes acometido por esse transtorno (ZOUHA; PITSIKAS, 2021).

Figura 1- Eventos que envolvem a formação de NO e as suas funções pré-sinápticas



Fonte: própria, utilizando o software Biorender. A ativação dos receptores NMDA por glutamato leva à abertura dos canais de Ca^{++} associados, com a consequente entrada de Ca^{++} , que se liga a uma cálcio-calmodulina que ativa a enzima do NO (NOS) com consequente conversão do aminoácido arginina em citrulina e NO. No neurônio pré-sináptico, o NO ativa a guanilato ciclase induzindo a formação de GMPC, que participa de uma variedade de funções como: fosforilação de proteínas, aberturas de canais de Ca^{++} , e atividade de fosfodiesterases. No interior do neurônio dopaminérgico, o NO ativa a via GCs/GMPc, que resulta na entrada de Ca^{++} e consequente aumento da liberação de DA. A DA liberada pode sofrer oxidação mediada pelo NO, em uma reação com o peroxinito. A inibição do transportador de DA (DAT) pelo NO pode reduzir a recaptação de DA, aumentando sua disponibilidade na fenda sináptica. O aumento da liberação de DA e glutamato no estriado e em outras regiões cerebrais podem ser induzidos pelo NO. Em particular, a subprodução desta molécula gasosa está associada a esta doença mental. Este último sugere que o incremento da atividade nitrérgica pode ser útil como terapia para a esquizofrenia. Diante do exposto, moléculas que aumentam a produção de NO, assim como doadoras de NO, podem representar uma classe de compostos viáveis. O nitroprussiato de sódio (NPS) é um doador de NO e é proposto como um fármaco promissor para o tratamento da esquizofrenia.

1.2.5 Nitroprussiato de Sódio e Esquizofrenia

O nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de NO, é usado clinicamente como um potente vasodilatador para o tratamento da hipertensão (WAGNER; KENREIGH, 2022). Em ensaios pré-clínicos, tem sido utilizado principalmente para investigar os efeitos citotóxicos do estresse nitrosativo (KRUNIC *et al.*, 2021; VARGA *et al.*, 2016). A decomposição do NPS gera subprodutos como espécie reativa de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*; ROS), que podem ser responsáveis predominantemente pela sua bioatividade (LEE *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2016).

Foi descoberto que doadores de NO, como o NPS, estimulam o crescimento neuronal *in vitro* (HINDLEY *et al.*, 1997) e foram propostos como novos medicamentos com potencial para tratar pacientes com doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, como a doença de Alzheimer (DUBEY; GULATI; RAY, 2018; HORTON; SCHIEFER, 2019). Trabalho de Bujas-Bobanovic e colaboradores (2000), observaram que a infusão de NPS em ratos, aboliu os comportamentos do tipo psicose e a expressão cerebral da proteína c-Fos, (marcador metabólico da ativação neuronal), induzidos pelo tratamento com a fenciclidina, antagonista de receptor NMDA. Entretanto, o mecanismo exato por trás deste efeito ainda não foi elucidado (BUJAS-BOBANOVIC *et al.*, 2000).

Estudo clínico, duplo cego, randomizado, controlado por placebo, conduzido por Hallak e colaboradores (2013) avaliou a eficácia e segurança de uma única administração intravenosa de NPS, nos sintomas positivos, negativos, de ansiedade e depressivos em 20 pacientes com esquizofrenia (com idades entre 19 e 40 anos), que estavam nos primeiros 5 anos da doença e recebendo medicação apropriada. Neste estudo, foi observado uma melhora rápida de todos os sintomas anteriormente citados após uma única infusão de NPS. Esses efeitos do NPS duraram 4 semanas após a infusão (HALLAK *et al.*, 2013). Um estudo clínico posterior realizado pelo mesmo grupo de pesquisa confirmou a eficácia do NPS observada anteriormente (MAIA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2015). O NPS administrado no mesmo esquema de tratamento do primeiro estudo aqui relatado (HALLAK *et al.*, 2013), reduziu distúrbios cognitivos (como funções executivas (memória de trabalho e atenção seletiva), característica típica geralmente interrompida em pacientes portadores de esquizofrenia (MAIA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Em contrapartida com os trabalhos descritos acima, estudos subsequentes não replicaram os resultados clínicos promissores com NPS (ADELINO *et al.*, 2021; BROWN *et*

al., 2019; STONE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018). Esse composto não expressou um perfil antipsicótico em ensaios clínicos nos quais os pacientes eram mais velhos, fumantes, que apresentavam sintomas negativos menos graves e com curso mais avançado da doença em relação aos estudos em que a eficácia do NPS foi revelada (ADELINO *et al.*, 2021; BROWN *et al.*, 2019; STONE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018). Essa inconsistência pode ser devido a diferenças nos protocolos experimentais, uma vez que nos estudos em que o NPS apresentou perfil antipsicótico, os participantes eram jovens, não fumantes, com sintomas negativos graves e estavam com o transtorno diagnosticado mais recentemente (HALLAK *et al.*, 2013; MAIA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2015). Além disso, há a suposição que o uso da nicotina pode ter sido um fator crítico da ineficácia do NPS, uma vez que ela interfere no NO e reduz a eficácia do NPS (CSORDAS; BERNHARD, 2013; GERZANICH *et al.*, 2001). Vale ressaltar, que em todos os estudos clínicos descritos que utilizaram o NPS, ele foi bem tolerado e nenhum efeito adverso foi observado nos pacientes, como alterações críticas na pressão arterial (ADELINO *et al.*, 2021; BROWN *et al.*, 2019; HALLAK *et al.*, 2013; MAIA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2015; STONE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018).

Os mecanismos pelos quais o NPS pode reduzir os sintomas psicóticos não foram totalmente elucidados. Sabe-se que o NPS é um vasodilatador rápido e de curta duração que parece estimular a perfusão cerebral e, conseqüentemente, pode atenuar a hipoperfusão cerebral (LEE *et al.*, 2022a; OLESEN *et al.*, 2018), uma característica comum na esquizofrenia (STEGMAYER *et al.*, 2017). Além da produção de NO no cérebro e aumento dos níveis de GMPc, o NPS pode modular a atividade dos receptores NMDA (TREVLOPOULOU; TOUZLATZI; PITSIKAS, 2016). Assim, esse fármaco parece exercer um efeito tônico na via NMDA-nNOS-GMPc, cuja função está prejudicada na esquizofrenia (CIEŚLIK *et al.*, 2021; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em consonância, várias evidências sugerem que o NPS apresenta perfil antipsicótico em modelos animais relacionados a sintomas da esquizofrenia induzidos pela manipulação farmacológica dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico (ISSY *et al.*, 2014, 2018a; TITULAER *et al.*, 2019, 2022).

De acordo com Hallak *et al.* (2011), deve haver algum tipo de interação específica entre o sistema endocanabinóide e o sistema glutamatérgico. Em seu estudo, este autor e seus colegas sugerem que estudar os efeitos do canabidiol (CBD), um canabinoide encontrado na planta *Cannabis sativa*, em modelos animais de psicose poderia melhorar o conhecimento científico sobre a interrelação entre sistemas glutamatérgicos e endocanabinóides, bem como direcionar para futuras pesquisas sobre a potencial farmacoterapia do CBD para o tratamento da esquizofrenia (CRIPPA *et al.*, 2015).

1.2.6 Sistema Endocanabinoide e Esquizofrenia

Outro alvo farmacológico promissor no contexto de esquizofrenia é o sistema endocanabinoide (canabinóides endógenos), que desempenha um papel importante em processos chaves do SNC, como no desenvolvimento cerebral, funções cerebrais (como humor e memória), plasticidade sináptica, processamento social e de recompensa, além de mecanismos celulares como as respostas imunes que podem desempenhar um papel importante em distúrbios psiquiátricos (LU; MACKIE, 2016). Este sistema consiste em pelo menos dois tipos de receptores (CB1 e CB2) acoplados à proteína G (GPCR) e ligantes endógenos que se acoplam a esses receptores (para revisão ver, LU; MACKIE, 2021).

Os receptores CB1 são encontrados em todo o SNC, com alta expressão nos núcleos da base (ANTONAZZO *et al.*, 2021), cerebelo (MARCAGGI, 2015), hipocampo (ALBAYRAM *et al.*, 2016), córtex e amígdala (FITZGERALD; MACKIE; PICKEL, 2019). Já os receptores CB2, são em sua maioria expressos nos tecidos periféricos, particularmente no sistema imunológico, mas também são expressos no cérebro, em células da glia, como microglia e astrócitos, e subpopulações específicas de neurônios (CHEN *et al.*, 2017). Além disso, têm sido propostos que os receptores CB2 desempenham um papel significativo em vários processos cerebrais envolvidos com a esquizofrenia, tais como modulação da neurotransmissão dopaminérgica (XI *et al.*, 2011), ativação microglial (KOMOROWSKA-MÜLLER; SCHMÖLE, 2020) e alterações neuroplásticas induzidas pelo estresse (RIBEIRO *et al.*, 2022).

Os dois canabinóides endógenos mais estudados são a N-araquidonoil-etanolamina (anandamida; AEA) e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) que, ao contrário da maioria dos neurotransmissores clássicos, são produzidos sob demanda de maneira dependente de cálcio após a despolarização celular ou estimulação do receptor (para revisão consulte, LU; MACKIE, 2021). Além disso, agem como mensageiros retrógrados, ou seja, são sintetizados sob demanda e liberados nos neurônios pós-sinápticos e se ligam aos receptores pré-sinápticos, regulando dessa forma a liberação de neurotransmissores inibitórios e excitatórios (LU; MACKIE, 2021).

A planta *Cannabis sativa* foi uma das primeiras plantas a ser utilizada pelo homem para obtenção de fibras, alimentação, rituais sociais e religiosos e agente medicinal para o alívio da dor (MECHOULAM, 2019). Ela contém mais de 100 compostos caracterizados derivados de uma estrutura de diterpeno, conhecido como “fitocanabinóides”, que interagem

com o sistema endocanabinoide (MECHOULAM, 2019). O principal componente psicotomimético da *cannabis sativa* é o delta-9-tetraidrocanabidiol (THC), isolado, identificado e sintetizado por Mechoulam e seu grupo de pesquisa (GAONI; MECHOULAM, 1964). O THC é responsável pelos efeitos subjetivos do uso recreativo da *Cannabis*, induz psicose em indivíduos saudáveis e estados ansiogênicos (MARTIN-SANTOS *et al.*, 2012). Em contraste, o CBD, o principal constituinte não psicotomimético dessa planta, e apresenta uma vasta ação terapêutica em diversos transtornos e condições (para revisão ver, GARCÍA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2020; LEGARE; RAUP-KONSAVAGE; VRANA, 2022; MARTIN-SANTOS *et al.*, 2012). Há um número considerável de ensaios clínicos usando CBD sozinho ou em combinação com outros fármacos (MORELLI *et al.*, 2014; RANA *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2021).

Estudos realizados em animais evidenciam que a biodisponibilidade oral do CBD fica entre 13-19% (MECHOULAM; PARKER; GALLILY, 2002), devido a intensos efeitos do metabolismo de primeira passagem e seus metabólitos apresentam excreção principalmente renal (HUESTIS, 2007). Concentrações plasmáticas e cerebrais mostraram-se ser dose-dependente em animais, sendo que a biodisponibilidade é aumentada quando em formulações de caráter lipídico (ZGAIR *et al.*, 2016). Em sua revisão sistemática abordando estudos farmacocinéticos em humanos, (MILLAR *et al.*, 2018) citaram que a meia vida ($t_{1/2}$) do CBD mostrou-se de 31 horas quando fumada; de 2-5 dias após administração oral crônica e de 1,4 a 10,9 horas após spray bucal. Assim, o CBD produz seus efeitos em curvas de dose-resposta em forma de sino, pode atuar por diferentes mecanismos de acordo com a via de administração, a concentração administrada ou a presença simultânea de outros canabinoides-ligantes (para revisão ver, CAMPOS *et al.*, 2017; LIGRESTI; DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2016).

Apesar dos mecanismos de ação do CBD não serem totalmente compreendidos há indicações que ele atua como um modulador alostérico negativo de receptores CB1 (LAPRAIRIE *et al.*, 2015a), reduz o metabolismo da AEA ao inibir a atividade da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*; (DE PETROCELLIS *et al.*, 2011), pode regular, direta ou indiretamente, a atividade do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ ; do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; SONEGO; PRADO; GUIMARÃES, 2021; VALLÉE *et al.*, 2017), receptores de adenosina (ASO *et al.*, 2019; MATOS *et al.*, 2015), receptor de serotonina 1A (CAMPOS; GUIMARÃES, 2008; FOGAÇA *et al.*, 2014) e membros da família dos canais potenciais de receptores transitórios, subtipo vanilóide (do inglês, *transient receptor potential channels*,

vanilloid subtype; TRPV; DE PETROCELLIS *et al.*, 2011). Além disso, também atenua o aumento da reatividade glial associada a condições patológicas (DOS-SANTOS-PEREIRA *et al.*, 2020; GOMES *et al.*, 2015c; TERRADILLOS *et al.*, 2022).

Estudos de ZUARDI e seu grupo (1995, 2006) e BHATTACHARYYA e colaboradores (2010) mostraram que o CBD induz efeitos do tipo antipsicótico e atenua os efeitos psicomiméticos induzidos por altas doses de THC em humanos saudáveis, sem, no entanto, causar efeitos motores adversos. Em consonância com esses resultados, estudos de neuroimagem mostraram que o CBD atua em regiões cerebrais envolvidas na neurobiologia de transtornos psiquiátricos, como córtex temporal medial e esquerdo, bem como o córtex pré-frontal e a ínsula (BHATTACHARYYA *et al.*, 2010; BORGWARDT *et al.*, 2008). Uma única dose oral de CBD em voluntários saudáveis alterou a atividade de repouso em regiões límbicas e paralímbicas do cérebro enquanto reduzia a ansiedade subjetiva associada ao procedimento de varredura (CRIPPA *et al.*, 2004). Esse fitocanabinoide também reduziu a atividade do complexo amígdala-hipocampo esquerdo, hipotálamo e córtex cingulado, bem como aumento da atividade no giro parahipocampal esquerdo, quando comparado com o grupo placebo. Em outra abordagem, indivíduos saudáveis tratados com CBD e submetidos a uma apresentação de rostos de medo, também apresentaram diminuição das atividades da amígdala e do córtex cingulado anterior e posterior e uma interrupção na conectividade amígdala-córtex cingulado anterior (FUSAR-POLI *et al.*, 2009, 2010).

Corroborando esses dados, em ensaio clínico duplo-cego randomizado conduzido por Leweke e colaboradores (2012) o CBD e o antipsicótico atípico amisulprida foram comparados em pacientes com esquizofrenia. Este estudo observou uma melhora clínica nos escores de sintomas da esquizofrenia nos pacientes tratados com CBD, além de promover menos efeitos adversos que o outro fármaco. A melhora dos sintomas positivos foi correlacionada com o aumento significativo nos níveis séricos de AEA (LEWEKE *et al.*, 2012). Isso sugere que o CBD isoladamente ou associado a outro composto pode ser um alvo em potencial para o tratamento de transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia (GARCÍA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2020).

Dentro desse contexto, no intuito de melhor elucidar esse tema na esquizofrenia e entender de que maneira os sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e endocanabinoide se inter-relacionam mais estudos pré-clínicos e clínicos são necessários, evidenciando a importância da escolha dos melhores modelos animais para a pesquisa da esquizofrenia experimental.

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ESQUIZOFRENIA

Um dos grandes desafios da pesquisa neuropsiquiátrica é o conhecimento relativamente limitado dos mecanismos moleculares das doenças (BLOKHIN *et al.*, 2020). A modelagem de transtornos psiquiátricos em roedores para melhorar esse conhecimento também é desafiador pelas mesmas razões (STEIMER, 2022). Embora em animais a modelagem genética (baseada em distúrbios em genes relacionados à esquizofrenia) e farmacológica, não reflitam necessariamente a fisiopatologia desse transtorno e nos efeitos de drogas no cérebro humano, o emprego de modelos *in vivo* usando agonistas e antagonistas de neurotransmissores pode fornecer novas informações sobre a fisiopatologia da esquizofrenia, o que pode levar a novas descobertas e/ou utilização de drogas (CRUNFLI *et al.*, 2022). Ensaios biológicos usando animais ou culturas celulares como modelos ainda estão surgindo, com o objetivo de fornecer mais informações sobre os efeitos induzidos pela administração de neuromoduladores e drogas antipsicóticas (GÜNERI; SCHEEL-KRÜGER; LUO, 2021; PEREZ-RANDO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2021).

A dopamina e o glutamato desempenham papéis distintos em termos de sinalização neuronal, mas ambos são propostos como os principais neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia (MCCUTCHEON; KRYSTAL; HOWES, 2020). A desregulação da neurotransmissão dopaminérgica, que culmina com a hiperfunção do sistema dopaminérgico mesolímbico, foi uma das primeiras teorias sobre a fisiopatologia da esquizofrenia, os primeiros modelos animais foram desenvolvidos com base na manipulação farmacológica desse sistema neurotransmissor para tentar mimetizar essa característica (ROBINSON; BECKER, 1986; WILCOX; ROBINSON; BECKER, 1986). Assim, a administração de agonistas indiretos da dopamina, como anfetamina, é utilizada como modelo farmacológico para estudo de sintomas desse transtorno (para revisão consultar, WINSHIP *et al.*, 2018).

Em humanos, a exposição repetida a anfetamina pode induzir sensibilização e também psicose (HARRO, 2015). A anfetamina é uma substância simpatomimética com mecanismo de ação complexo, atuando predominantemente no SNC. Induz liberação de dopamina de seus estoques intraneurais, assim como a liberação de serotonina e noradrenalina (FREYBERG *et al.*, 2016; REITH; GNEGY, 2020). Tal composto inibe a recaptação de dopamina no terminal axônico pré-sináptico, o que também pode explicar seu efeito farmacológico e também os efeitos tóxicos. Seu mecanismo de ação é complexo e envolve efeitos adicionais que afetam

os níveis extracelulares de catecolaminas, incluindo inibição da recaptação, efeito na exocitose, síntese e metabolismo de neurotransmissores (FREYBERG *et al.*, 2016; REITH; GNEGY, 2020). Nesse sentido, esses achados levantam a possibilidade de que a sensibilização às anfetaminas pode ser utilizada para modelar mais do que apenas psicose.

Dado que a hipofunção de receptores NMDA é tida como um dos fatores principais da esquizofrenia, intervenções farmacológicas que reproduzem essa característica provêm modelos farmacológicos para estudo desse transtorno (CRUNFLI *et al.*, 2022). A administração aguda e crônica de antagonistas desse receptor, tais como a fenciclidina, a cetamina e o MK-801 (ou [5R,10S]-[+]-5-metil-10,11-dihidro-5H - dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina ou Dizocilpina) induz e agrava sintomas similares aos positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia, o que reproduz a hipofunção do sistema glutamatérgico (ADLER *et al.*, 1999; MALHOTRA *et al.*, 1997).

O composto MK-801 possui uma afinidade, seletividade e potência inibitória maior do que a cetamina e a fenciclidina (WALLACH *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2015), portanto, esse composto é amplamente empregado em modelos animais para induzir alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas à esquizofrenia. Ele pertence à classe das aminas secundárias e atua como antagonista não competitivo de receptor NMDA, não apenas em neurônios, mas também em células da glia (BRANDÃO-TELES *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2015, 2021). Em roedores, nos efeitos comportamentais induzidos pelo MK-801 estão incluídos prejuízo no aprendizado espacial e na memória (SAWAHATA *et al.*, 2021; XIAO *et al.*, 2019), sociabilidade reduzida (BIAŁOŃ *et al.*, 2021; PERDIKARIS; DERMON, 2022; XIAO *et al.*, 2019), hipolocomoção (SANTILLÁN-URQUIZA *et al.*, 2019) ou hiperlocomoção (KRAEUTER *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2019) e perturbações de condicionamento de medo (BIAŁOŃ *et al.*, 2021; ZHAN *et al.*, 2021). A nível celular, o tratamento com antagonistas de receptor NMDA demonstrou causar degeneração e morte de células neuronais na região dos RSC, piriforme e entorrinal, amígdala e DG, mostrado em estudos pioneiros de Hováth e seu grupo (1997), e, posteriormente também observado no córtex cingulado posterior (KURODA *et al.*, 2015) e pré-frontal (WANG *et al.*, 2022).

Estudo conduzido em 2015 por Gomes e colaboradores mostrou que a administração repetida de MK-801 em camundongos prejudicou o desempenho nos testes de interação social e reconhecimento de objeto; modelos respectivamente relacionados aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. Esse composto também aumentou a expressão da proteína glial fibrilar ácida (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*; GFAP) em astrócitos no córtex pré-frontal medial e a porcentagem de células da microglia positivas para molécula adaptadora de

ligação de cálcio ionizado 1 (do inglês, *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*; Iba-1) com um fenótipo reativo no córtex pré-frontal medial e no hipocampo dorsal sem alterar o número de células positivas para Iba-1 (GOMES *et al.*, 2015d). Condição semelhante foi ressaltada por YU e seu grupo de pesquisa (2015), que observou aumento da expressão de GFAP no hipocampo de ratos tratados com injeção repetida de MK-801 por 6 dias e em culturas primárias de astrócitos do hipocampo de ratos incubadas com MK-801.

Além dos efeitos descritos acima, o MK-801 também causa deficiência no processamento de informações, refletido através do desempenho no teste de PPI (ANDRADE *et al.*, 2021; CORTEZ *et al.*, 2022; PEDRAZZI *et al.*, 2021a), um teste translacional (LI *et al.*, 2021) que será melhor descrito a seguir.

1.4 DEFICIÊNCIA NO PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES NA ESQUIZOFRENIA

Estudar a esquizofrenia através da modelagem farmacológica é um grande desafio para os cientistas porque os animais de laboratório (dos quais a maioria são roedores) não exibem funções mentais superiores, o que torna difícil determinar o estado mental do animal testado (STEIMER, 2022). Assim, um dos diversos testes comportamentais aplicados para estudo na esquizofrenia experimental é o teste de PPI. Quando estímulos de baixa intensidade de qualquer tipo de modalidade sensorial, seja auditiva, visual ou tátil, são imediatamente precedidos por estímulos inesperados do tipo sobressalto, como o reflexo de sobressalto ao pulso, a reação motora do sobressalto torna-se menos pronunciada ou até mesmo abolida. Esse fenômeno é conhecido como PPI e proporciona uma medida quantitativa do processamento central, filtrando estímulos irrelevantes (GÓMEZ-NIETO; HORMIGO; LÓPEZ, 2020). O processamento de informações, revelado pelo teste de PPI é considerado um biomarcador importante para a esquizofrenia (MENA *et al.*, 2016). O conceito de PPI como um biomarcador do *gating* sensorio-motor na esquizofrenia é apoiado não apenas pelas alterações observadas em pacientes com esse transtorno, mas também pela diminuição do PPI observada em famílias com alta suscetibilidade genética à esquizofrenia (GREENWOOD *et al.*, 2016).

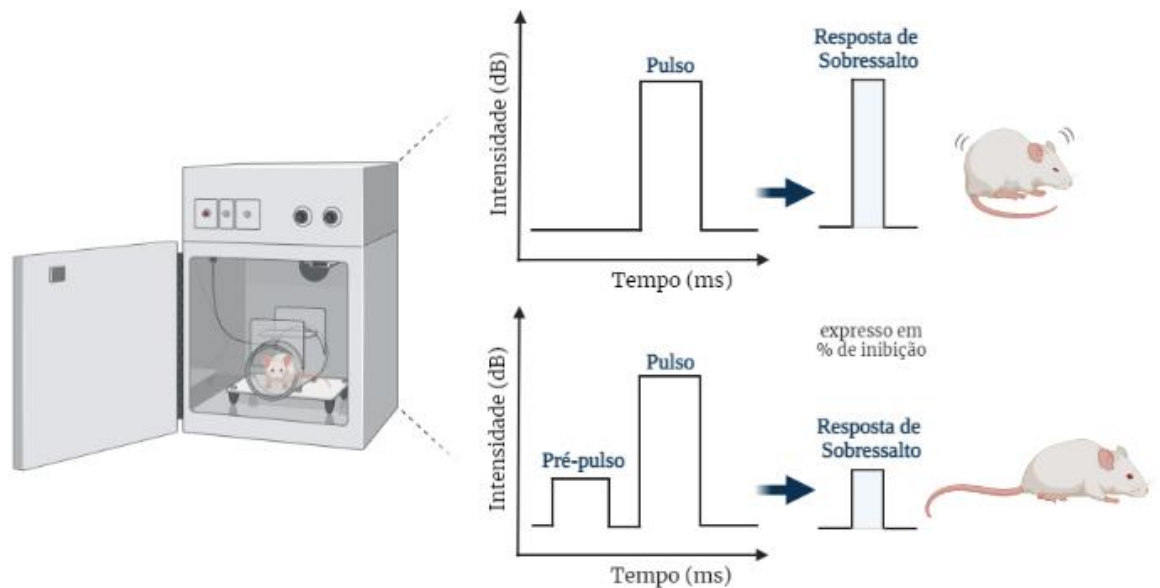
Esse paradigma comportamental foi descrito em humanos por Graham 1975 e é uma medida da supressão da resposta do sobressalto quando um estímulo menos intenso precede

um estímulo de maior intensidade por um curto intervalo de tempo (KHAN; POWELL, 2018). Pacientes com esquizofrenia podem apresentar prejuízo nesse ensaio, que geralmente é revertido pelo tratamento com antipsicóticos (LI *et al.*, 2021). Esse prejuízo no processamento de informações não é exclusivo da esquizofrenia e está presente em uma série de condições psiquiátricas como transtorno bipolar (SAN-MARTIN *et al.*, 2022), transtorno obsessivo-compulsivo (MANNING *et al.*, 2021), estresse pós-traumático (PINELES *et al.*, 2016), demência (JAFARI; KOLB; MOHAJERANI, 2020), autismo (CHENG *et al.*, 2018) e síndrome de Tourette (ISAACS; RIORDAN, 2020).

O prejuízo no PPI pode ser farmacologicamente induzido em animais e em seres humanos por agonistas dopaminérgicos diretos como a apomorfina, ou drogas que promovem a liberação de dopamina como a anfetamina, e/ou antagonistas de receptores NMDA, como MK-801, ketamina e fenciclidina, bem como por agonistas de receptores de serotonina ou compostos que aumentam a neurotransmissão serotoninérgica (para revisão ver, STEEDS; CARHART-HARRIS; STONE, 2015). Isso é corroborado pela constatação de que os psicoestimulantes dopaminérgicos (agonistas dos receptores de dopamina) produzem estados ou sintomas do tipo psicótico que são revertidos por drogas antipsicóticas clássicas (isto é, antagonistas dos receptores de dopamina tipo D2; STEEDS; CARHART-HARRIS; STONE, 2015). Drogas serotoninérgicas psicotomiméticas (agonistas dos receptores de serotonina 2A) e antagonistas dos receptores ionotrópicos do glutamato também induzem sintomas semelhantes à psicose que podem ser explicados (principalmente) pela reversão por drogas antipsicóticas atípicas, um achado que fornece suporte para as hipóteses mais modernas serotoninérgicas e glutamatérgicas da esquizofrenia (para revisão ver (STEEDS; CARHART-HARRIS; STONE, 2015; WINSHIP *et al.*, 2018).

Para avaliação do PPI em modelos experimentais, um pulso curto de som é apresentado imediatamente antes de um estímulo de sobressalto (como uma explosão de ruído branco em um alto nível de decibéis), o qual amortece a resposta de sobressalto subsequente (Figura 2; PEDRAZZI *et al.*, 2021). Foi observado que a resposta gama evocada durante a avaliação da inibição pré-pulso está diretamente relacionada ao comportamento sensório-motor (HUDSON *et al.*, 2016). Esse comportamento medido por meio do teste de PPI é compartilhado entre as espécies, sendo um fenômeno muito robusto. É conservado entre as espécies, sobretudo de mamíferos e não requer aprendizado, embora sua expressão seja regulada por processos cognitivos superiores (PELEG-RAIBSTEIN *et al.*, 2015).

Figura 2- Inibição Pré-Pulso



Fonte: Própria, utilizando *software* Biorender. Reflexo de sobressalto é uma resposta natural de defesa, incontrolável e espontânea, que envolve uma rápida contração dos músculos da face e do corpo em resposta a um estímulo sensorial intenso e inesperado e envolve estruturas do tronco cerebral. A inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto consiste na diminuição da resposta de sobressalto a um estímulo intenso (pulso) quando este é precedido imediatamente (30-500ms) por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso). A redução do reflexo de sobressalto pode ser considerada como uma medida operacional do processamento de informações, evento no qual o organismo discrimina informações excessivas. Geralmente, o PPI é expresso como a porcentagem de inibição da amplitude do sobressalto em resposta a múltiplas apresentações do pulso precedido pelo pré-pulso.

O mecanismo fisiológico básico do reflexo de sobressalto acústico é mediado por estruturas localizadas no tronco encefálico, um circuito que envolve o nervo vestibulococlear (também conhecido como nervo auditivo ou nervo acústico), núcleo coclear ventral, lemnisco lateral, núcleo reticular caudal da ponte, interneurônio espinhal, neurônios motores do corno anterior, nervos periféricos e os músculos (DAVIS *et al.*, 1982; KOCH; SCHNITZLER, 1997; LEE *et al.*, 1996). A inibição do reflexo de sobressalto é regulada de maneira complexa por estruturas prosencefálicas como hipocampo, amígdala, núcleo *accumbens* e córtex pré-frontal medial (FENDT; LI; YEOMANS, 2001; KOCH; SCHNITZLER, 1997).

O desempenho prejudicado no PPI pode ser revertido através do tratamento com antipsicóticos como haloperidol, olanzapina (KAYGISIZ *et al.*, 2022) e clozapina (DE OLIVEIRA; NAGAISHI; BARBOSA SILVA, 2017; LI *et al.*, 2019). Estudos do nosso grupo de pesquisa com modelos preditivos de esquizofrenia em roedores, o MK-801, anfetamina e ketamina prejudicaram o desempenho de roedores no teste de PPI (ANDRADE *et al.*, 2021; CORTEZ *et al.*, 2022; ISSY *et al.*, 2018a, 2020; PEDRAZZI *et al.*, 2021b). Esse prejuízo foi

prevenido por drogas com potencial propriedade antipsicótica, como o CBD (GOMES *et al.*, 2015a, 2015b; PEDRAZZI *et al.*, 2021) e o NPS (ISSY *et al.*, 2018b).

Em outro grupo de pesquisa, Kaygisiz e colaboradores (2022) observaram que a galangina, composto flavonoide com atividade inibidora da acetilcolinesterase, diminuiu o prejuízo no PPI induzida por apomorfina semelhante a donepezila, haloperidol e à olanzapina. Além disso, a galangina diminuiu a escalada induzida por apomorfina e a hiperlocomoção induzida por MK-801 semelhante ao haloperidol e à olanzapina, porém, sem induzir catalepsia, efeito adverso que pode surgir em resposta ao uso de antipsicóticos (KAYGISIZ *et al.*, 2022). Essa capacidade dos déficits no PPI poderem ser revertidos por antipsicóticos, fornece validade farmacológica (preditiva) a esses modelos e ao teste em si e enfatiza quão robusto é o teste para avaliar no campo pré-clínico os possíveis compostos candidatos a terem perfil antipsicótico (CRUNFLI *et al.*, 2022; WINSHIP *et al.*, 2018)

1.5 EFEITOS ADVERSOS DOS ANTIPSICÓTICOS

Os psicofármacos estão entre os grupos farmacológicos mais prescritos no mundo. Em vários países, foram realizadas investigações para determinar como esses agentes são prescritos em vários ambientes: público ou privado, em pacientes ambulatoriais e em pacientes hospitalizados (GAVIRIA *et al.*, 2015; SUSHMA *et al.*, 2015). A farmacoterapia tradicional, baseada na teoria dopaminérgica da esquizofrenia, tem limitações. Aproximadamente 25% dos pacientes são resistentes à terapia (REMINGTON *et al.*, 2017). Além disso, a taxa de síndrome metabólica entre os pacientes é elevada, como ganho de peso, anormalidade na glicose e metabolismo lipídico, o que piora a qualidade de vida e predis põe os pacientes a desenvolverem doenças cardiovasculares (HEALD *et al.*, 2017; HENDERSON *et al.*, 2015).

Os pacientes com esquizofrenia têm riscos aumentados de dislipidemia ou hiperlipidemia (aumento dos lipídios no sangue, principalmente do colesterol e dos triglicerídeos) e isso está relacionado aos maus hábitos alimentares e de estilo de vida. Além disso, a dislipidemia pode ser exacerbada por determinados antipsicóticos. (para revisão consultar, KANAGASUNDARAM *et al.*, 2021). Pillinger e colaboradores (2020), realizam ensaios clínicos randomizados e cegos comparando 18 antipsicóticos e placebo no tratamento agudo da esquizofrenia. Avaliaram a associação entre alteração metabólica e alteração

psicopatológica, estimando a correlação entre alteração da gravidade dos sintomas e alteração dos parâmetros metabólicos. Com isso, observaram diferenças marcantes entre os antipsicóticos em termos de efeitos colaterais metabólicos, com olanzapina e clozapina exibindo os piores perfis. Constataram que o aumento do peso inicial, sexo masculino e etnia não branca são preditores de suscetibilidade a alterações metabólicas induzidas por essa classe de fármacos (PILLINGER *et al.*, 2020).

Um outro efeito adverso da terapia antipsicótica é que sua administração a longo prazo, em geral de fármacos classificados como típicos, como o haloperidol e a clorpromazina, podem regular positivamente receptores D2 (antagonizam em maior extensão os receptores D2). Em animais, produzem supersensibilidade do receptor manifestada por supersensibilidade comportamental à estimulação da dopamina e distúrbios do movimento; em pacientes psicose de supersensibilidade (CHOUINARD *et al.*, 2017). Efeitos motores adversos como a discinesia tardia e parkinsonismo farmacológico culminam com a baixa adesão ao tratamento (STRASSNIG; ROSENFELD; HARVEY, 2017; SULTAN *et al.*, 2016).

Muitas vezes os pacientes recorrem à polifarmácia antipsicótica, ou seja, uso concomitante de dois ou mais antipsicóticos para tratar pacientes com esquizofrenia resistentes ao tratamento (GUINART; CORRELL, 2020). São frequentes os cenários clínicos em que a combinação de psicofármacos é considerada uma opção: situações perigosas para si ou para terceiros, agitação psicomotora, necessidade de medicação hipnótica, tratamento de fases agudas e manutenção de perturbações mentais (GARGOLOFF *et al.*, 2022; GUINART; CORRELL, 2020). Assim, a alta mortalidade associada à esquizofrenia acompanhada à baixa eficácia dos tratamentos disponíveis quando comparado a outros transtornos psiquiátricos faz dela um foco de estudo de extrema importância.

1.6 ASSOCIAÇÕES MEDICAMENTOSAS PARA TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA

A terapêutica medicamentosa atual inclui fármacos que isoladamente são eficazes em muitos transtornos. É comum a prescrição simultânea/combinção de duas drogas que resultam na potencialização do efeito de cada droga isoladamente (BIOQUE *et al.*, 2020; WODARCZYK *et al.*, 2017). Quando isso acontece e um dos compostos interfere com o outro alterando o efeito esperado, ocorre interação medicamentosa (YILDIRIM; KILINÇ,

2017). Se a alteração for quantitativa, o efeito próprio do fármaco pode aumentar (sinergia), diminuir (antagonismo parcial) ou cessar (antagonismo total; WIJESINGHE, 2016).

O efeito sinérgico quando benéfico pode apresentar diversas vantagens como o aumento da eficácia terapêutica (i) a redução dos efeitos adversos devido à possibilidade de uso de menores doses dos fármacos associados sem prejuízo da intensidade do efeito (GALLING *et al.*, 2017); (ii) a obtenção de maior duração de efeito pelo impedimento, por exemplo, da excreção do fármaco; (iii) a combinação de latência curta com duração de efeito prolongada, entre outras (LIN *et al.*, 2013). As desvantagens da interação medicamentosa, no entanto, consistem na soma de efeitos indesejáveis quando os fármacos associados têm o mesmo perfil toxicológico (FLEISCHHACKER; UCHIDA, 2014). Por isso, deve-se atentar para que medicamentos em uso simultâneo tenham diferente espectro de efeitos adversos (IVERSEN *et al.*, 2018).

Apesar dos estudos mostrarem claramente o efeito terapêutico do NPS na esquizofrenia, em doses mais elevadas seu efeito vasodilatador pode promover aumento da perfusão cerebral ou algum outro efeito vascular modulado pelo NO (HALLAK *et al.*, 2013). Na administração do CBD em tratamento de transtornos psicóticos e epilepsia são observados efeitos colaterais como sonolência, cansaço, diarreia e alterações de apetite/peso (IFFLAND; GROTENHERMEN, 2017), alterações da viabilidade celular, capacidade reduzida de fertilização e inibição do metabolismo hepático e dos transportadores de drogas (por exemplo a glicoproteína-p; MACHADO BERGAMASCHI *et al.*, 2011).

Partindo desse pressuposto, neste estudo, hipotetizamos que o uso concomitante de CBD e NPS, analisando o efeito antipsicótico por meio do teste de PPI, possibilitará a utilização de doses menores dos mesmos, diminuindo os efeitos adversos de cada um e aumentando a tolerabilidade e aderência ao tratamento, o que poderá melhorar o prognóstico dos pacientes que não respondem ao tratamento convencional.

2 OBJETIVOS DO PROJETO

2.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar o efeito da associação de doses subefetivas de CBD e NPS no prejuízo induzido pelo MK-801 em modelos preditivos para a ação de antipsicóticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) determinar as doses subefetivas de CBD, em prevenir o prejuízo causado pelo MK-801 nos testes de PPI e actímetro;
- 2) determinar as doses subefetivas de NPS, em prevenir o prejuízo causado pelo MK-801 nos testes de PPI e actímetro;
- 3) avaliar se a associação de doses subefetivas de CBD e de NPS, em prevenir o prejuízo causado pelo MK-801 nos testes de PPI e actímetro;
- 4) avaliar a expressão da proteína c-Fos no córtex pré-frontal (pré-límbico e infra-límbico; PrL e IL, respectivamente), no estriado dorsal (dorso-lateral e dorso-medial), na região CA1 (Região 1 do Corno de Amon) e CA3 (Região 3 do Corno de Amon) do hipocampo, no giro denteado (DG), no núcleo *accumbens* (porção Core e Shell, AcbC e AcbSh, respectivamente) e no córtex retrosplenial (RSC), após o tratamento com MK-801, precedido ou não pelo tratamento com doses subefetivas de CBD e NPS após os testes de actímetro e PPI.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

No decorrer dos experimentos foram utilizados os consumíveis e aparelhos descritos a seguir a seguir (Quadro 1 e Quadro 2, respectivamente).

Quadro 1- Lista de consumíveis utilizados nos experimentos

| Tipo | Fabricante |
|---|---------------------------|
| Agulha descartável 30G | BD PrecisionGlide |
| Lâminas | Knittel Glass |
| Lamínula | Knittel Glass |
| Luvas | Medix Brasil |
| Pipeta Pasteur | RBR |
| Ponteiras 10ul, 200ul, 1000ul, 5ml e 10ml | Axygen |
| Seringa descartável | BD Plastipak |
| Tubo eppendorf 200ul, 2ml, 5 e 10ml | Eppendorf |
| Tubo Falcon 15ml e 50ml | Greiner |
| Entellan 100ml | EMD Millipore Corporation |
| Tissue-Tek 118ml | Sakura |

Fonte: Própria.

Quadro 2- Lista de aparelhos utilizados nos experimentos

| Tipo | Modelo | Fabricante |
|---------------------------|---------------|--------------------------|
| Actímetro | LE8810-LE8811 | Panlab/Harvard Apparatus |
| Câmera para microscópio | DFC365FX | Leica |
| Criostato | CM1850 | Leica |
| Microscópio | DM6 B | Leica |
| Shaket Gyromax | 737R | Amex Instruments |
| The Startle Reflex System | SOF-825 | Med associates |

Fonte: Própria.

3.2 SOLUÇÕES E TAMPÕES PREPARADOS

Ao longo dos experimentos foram preparados soluções e tampões descritos a seguir.

3.2.1 Tampão fosfato de sódio (PB; 0,2M; pH 7,4)

Para 1 litro de fosfato tamponado (do inglês, Phosphate Buffered; PB) 0,2M utiliza-se uma mistura de 5,52g de fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) e 22,72g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4). Dissolver o sódio monobásico monohidratado e o fosfato de sódio dibásico anidro em água destilada, em temperatura ambiente, em agitador magnético. Após preparo, manter refrigerado a 4°C.

3.2.2 Tampão fosfato-salino (PBS; 0,1M; pH 7,4)

Para 1 litro de salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) 0,1M utiliza-se uma mistura de 9g de cloreto de sódio (NaCl), 500ml de PB 0,2M (descrito anteriormente). Completa-se o volume com água destilada.

3.2.3 Solução Salina Tamponada Tris (TBS; 0,1M; pH 7,4)

Para 1 litro de TBS 0,1M utiliza-se uma mistura de 120g de Trizma ® base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) e 36g de cloreto de sódio, dissolvidos em água destilada.

3.2.4 Tampão A (pH 7,4)

Para 1 litro de Tampão A utiliza-se uma mistura de 2,23g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, fosfato de sódio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 9g de cloreto de sódio, 0,15% de Triton®

X-100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$), dissolvidos em água destilada.

3.2.5 Tampão Citrato de Sódio (pH 6,0)

Para 1 litro de tampão citrato de sódio, utiliza-se uma mistura de 0,378g de ácido cítrico monohidrato ($C_6H_8O_7H_2O$) e 2,41g de citrato de sódio dihidrato tribásico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), dissolvidos em água destilada.

3.2.6 Solução de montagem

Para 500ml de solução de montagem, utiliza-se uma mistura de 200ml de água destilada, 0,5g de gelatina em pó tipo A, 200ml de PB 0,2M (como descrito anteriormente), 50ml de álcool absoluto, 50ml de PB 0,1M. Recomenda-se dissolver a gelatina na água aquecida à 60°C, em seguida, acrescentar o PB 0,2M, o álcool absoluto e, por último, o PB 0,1M.

3.2.7 Solução sacarose

Para 100ml de solução de sacarose, utiliza-se uma mistura de 30g de sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) e 100ml de PB 0,1M (ou 50ml de PB 0,2M e 50ml de água destilada).

3.2.8 Solução anticongelante

Para 400ml de solução anticongelante utiliza-se uma mistura de 125ml de PB 0,2M, 125ml de água destilada, 75g de sacarose e 150ml de etilenoglicol ($C_2H_6O_2$). Recomenda-se primeiramente dissolver a sacarose em PB 0,2M e, posteriormente, adicionar o etilenoglicol.

3.2.9 PFA 8% (Paraformaldeído; 8%; pH 7,4)

Para 1 litro de PFA 8% utiliza-se uma mistura de 64g de PFA, 1 litro de água destilada e 10 gotas de hidróxido de sódio em solução (NaOH). Recomenda-se aquecer a água à 60°C para dissolver o PFA e gotear o hidróxido de sódio (até que a mistura fique cristalina). O PFA 8% deve ser mantido a 4°C por até um mês.

3.2.10 PFA 4% (pH 7,4)

Para 1 litro de PFA4% utiliza-se uma mistura de 500ml de PFA8% e 500ml de PB 0,2M (como descrito anteriormente). Depois de pronta a solução deve ser utilizada em até uma semana.

3.2.11 Solução Fixadora de Somogyi

Para 2 litros de solução fixadora de Somogyi utiliza-se uma mistura de 1 litro de PFA 8% (como descrito anteriormente), 4ml de glutaraldeído 25%, 300ml de ácido pícrico e 696ml

de PB 0,1M.

3.3 DROGAS

O NPS e MK-801 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram diluídos em solução estéril salina (NaCl 0,9%; 10 ml/kg). O CBD (Prati-Donaduzzi) foi dissolvido 1% em dimetilsulfóxido (DMSO), 2% em Tween80 e 97% em solução salina. A administração de NPS (0,05, 0,5, 1 e 2,5mg/kg), MK-801 (0,5mg/kg) e CBD (15, 30 e 60 mg/kg) foram realizadas sistemicamente, pela via intraperitoneal (i.p.). As doses utilizadas foram baseadas em trabalhos já publicados do nosso grupo de pesquisa com NPS (ISSY *et al.*, 2018b) e CBD (GOMES *et al.*, 2015). Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes dos ensaios.

3.4 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Suíços machos, com idade entre 7-8 semanas, peso de aproximadamente 30-35g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (Origem: Taconic Farms Inc.), campus Ribeirão Preto. Todos os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (ciclo de luz às 7 horas da manhã). Foram alimentados com dieta padrão do biotério e livre acesso à água e alocados em gaiolas de polietileno (30cm de comprimento x 37cm de largura x 16 cm de altura), em grupos de aproximadamente seis animais por caixa, no biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), respeitando todos os critérios de ética em experimentação animal. Os procedimentos foram realizados na fase clara do ciclo, entre 9 h e 16:30 h. Foi feito todo o esforço possível para minimizar o estresse, a dor e o desconforto dos animais. Todos os procedimentos experimentais descritos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP-USP em reunião realizada em 16 de abril de 2021 (número do protocolo nº 2021.1.129.58.8), de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da

Experimentação Animal (CONCEA).

3.5 TESTE DE PPI

Para realização do teste de PPI foram utilizadas duas caixas de sobressalto que consistem em gaiolas de barras de aço inoxidável com dimensões internas de 25x9x9cm, suspensas em uma armação de cloreto de polivinila (PVC) - ENV-262A Med Associates (MA). Cada uma dessas gaiolas foi abrigada em uma caixa maior (64 x 60 x 40cm) fabricada em madeira com atenuação acústica (ENV-018S MA). Nesse teste, a resposta de sobressalto do animal gera uma pressão nesta plataforma que é captada por sensores e um amplificador transdutor (PHM 250-60);

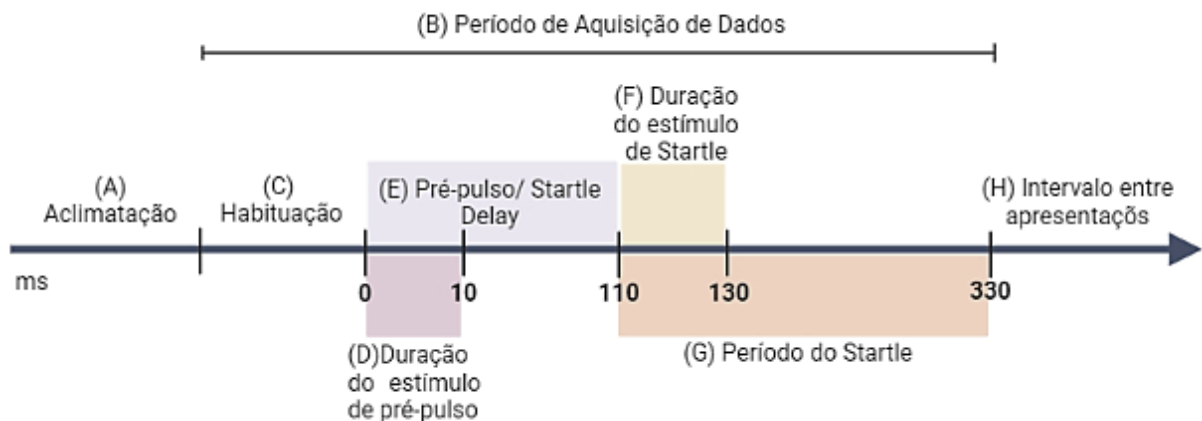
Figura 2) gerando um sinal analógico que é digitalizado e analisado por um programa computacional (Startle Reflex, versão 4.10 MA) que representa graficamente os sinais dessa resposta.

A apresentação dos estímulos, duração, intensidade e amplitude foram computadorizadas através de uma interface 729 - MA. A resposta do sobressalto foi medida durante os primeiros 200ms após a apresentação do estímulo de sobressalto. O teste de inibição pré-pulso foi composto por três etapas: A) Aclimação: Período de 5 minutos, durante o qual nenhum estímulo foi apresentado. Consiste na manutenção do animal na gaiola de aço onde o teste foi realizado com ruído de fundo (background) pré-estabelecido; B) Habituação: Após a aclimação foi realizada a habituação ao estímulo de sobressalto e determinação da linha de base, por meio de 10 apresentações do pulso com intervalo entre os estímulos de 30s. O objetivo desta etapa foi a estabilização da resposta de sobressalto ao pulso. C) Inibição da resposta de sobressalto ao pulso: Essa etapa foi composta por 8 apresentações pseudorandomizadas dos diferentes estímulos que compõem o teste: (1) pulso (P; 105 dB de ruído branco, duração de 20ms), (2) pré-pulso (PP; 80, 85 ou 90 dB de som puro, frequência de 7000 Hz, duração de 10ms), (3) pré-pulso seguido de pulso (PP+P) com 100ms de intervalo entre eles e (4) nulo. Durante essa sessão os estímulos foram apresentados em intervalos regulares de 30 segundos, sendo 20 de cada categoria. Geralmente, o PPI é expresso como a porcentagem de inibição da amplitude do sobressalto em resposta a múltiplas

apresentações do pulso precedido pelo pré-pulso, em função da amplitude da resposta apenas ao pulso, o que é expresso na seguinte fórmula:

$$\%PPI = \left[100 - \left(PP + \frac{P}{P} \right)^{100} \right]$$

Figura 3- Tempo do PPI



Fonte: Própria, utilizando *software* Biorender. As definições de cada período de tempo do PPI representado na são as seguintes: (A) *Aclimação*, período (5min) durante o qual o programa está em execução, mas nenhum estímulo é apresentado e nenhum dado é coletado. (B) *Período de Aquisição de Dados* = valor definido pelo usuário que define o período de tempo em que os dados são registrados. Ele consiste no período de *Habituação*, no *Pré-pulso/Statle Delay* e no estímulo de *Startle*. (C) *Habituação* = valor definido pelo usuário usado para estabelecer uma linha de base do comportamento atual do animal. (D) *Duração do estímulo de pré-pulso* = valor definido pelo usuário que é a duração do tom de pré-pulso. Um tom de pré-pulso de 10 ms é usado no exemplo acima. (E) *Pré-pulso/ Statle Delay* = valor definido pelo usuário que é o tempo entre o início do estímulo de pré-pulso e o início do estímulo de *Startle*. O pré-pulso/ *Statle Delay* deve ser maior ou igual à duração do estímulo de pré-pulso. No exemplo acima, o atraso de pré-pulso/*Statle Delay* está definido para 100 ms. (F) *Duração do estímulo de Startle* = valor definido pelo usuário que determina a duração do estímulo de sobressalto (pulso). Está definido para 20 ms no exemplo acima. (G) *Período do Startle* = O *Período do Startle* começa no início do estímulo do pulso. A duração do período do *Startle* é igual ao *Período de Aquisição de Dados* menos o período de *habituação* menos o *Pré-pulso/ Statle Delay*.

3.6 ACTÍMETRO

Para controlar possíveis efeitos motores das drogas, a atividade locomotora foi avaliada individualmente em um actímetro fotoelétrico (Actitrack, Panlab, Barcelona, Espanha) durante 5 min. O aparato consiste em uma arena quadrada (45x45x20cm), contendo

32 *lasers* infravermelhos, sendo, 1 a cada intervalo de 2,5cm, onde o animal pode andar livremente. O aparelho avalia de forma automática os parâmetros movimentos horizontais, movimentos verticais e movimentos estereotipados.

3.7 REMOÇÃO E CONGELAMENTO DOS TECIDOS

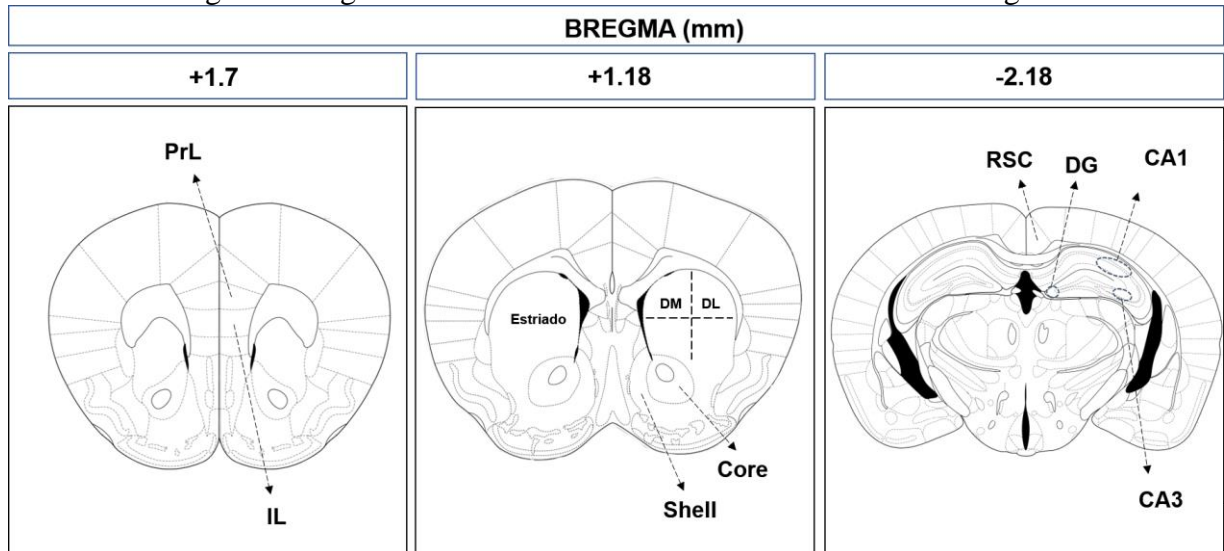
Imediatamente após o término da exposição ao teste de PPI, os animais foram anestesiados com uma dose letal de ketamina (100 mg/kg; i.p.) e xilazina (14 mg/kg; i.p.). Os encéfalos foram cuidadosamente expostos e removidos e colocados em tubos *Falcon* contendo 10ml de solução fixadora de Somogyi, onde foram mantidos por 48h a 4°C. Essa técnica tem a finalidade de remover o sangue dos tecidos bem como fixá-lo, evitando que ocorram autólise e comprometimento das estruturas a serem analisadas. Após esse período, os encéfalos foram submersos em solução de sacarose 30%, para crioproteção, onde permaneceram 24 horas a 4° C ou até que demonstrassem saturação. Após a saturação, congelamento do tecido foi realizado com isopentano 99% (C₅H₁₂ - Vetec®) mantido em gelo seco, à -40° C. Os encéfalos foram armazenados em *freezer*, à -80°C, até serem processados.

3.8 OBTENÇÃO DAS SECÇÕES DE TECIDO CEREBRAL

As secções foram escolhidas baseadas em trabalhos que, através da técnica de imunohistoquímica, avaliaram estruturas relacionadas com a neurobiologia da esquizofrenia (GOMES et al., 2015a, 2015b; ZUO et al., 2009). São elas: córtex pré-frontal medial (PrL e IL, respectivamente; Bregma 1.94 a 1.7mm), estriado dorsal (dorso-lateral e dorso-medial) e Núcleo *Accumbens* (Core e Shell, AcbC e AcbSh; Bregma 1.54a 0.98mm), córtex retrosplenial (RSC; Bregma -1,82 a -2.3mm), giro denteado (DG) e região CA1 (Região 1 do Corno de Amon) e CA3 (Região 3 do Corno de Amon) do hipocampo dorsal (Bregma -1,82 a -2.3mm; Figura 4). Secções adjacentes foram obtidas nas regiões de interesse com 30µm de espessura em criostato (CM1850 Leica®) com temperatura de -20° C (±1). Apenas o hemisfério direito

foi avaliado. Todas as regiões descritas foram localizadas de acordo com as coordenadas do atlas cerebral de camundongos PAXINOS; FRANKLIN; FRANKLIN, 2001.

Figura 4- Regiões e áreas analisadas dos encéfalos de camundongos



Fonte: adaptado de PAXINOS; FRANKLIN; FRANKLIN, 2001 Representação ilustrativa do bregma das secções para análise de células positivas para c-Fos. No primeiro quadrante, simbolizado pelo Bregma +1.7mm, se encontra a representação ilustrativa do córtex pré-frontal medial pré-límbico e infra-límbico (PrL e IL, respectivamente). No segundo quadrante, de Bregma +1.18mm, está representado o núcleo *accumbens* porção Core (AcbC) e Shell (AcbSh), bem como o estriado dorsal, subdividido em dorsomedial (DM) e dorsolateral (DL). No terceiro quadrante, representado pela figura de Bregma -2.18, se encontra o córtex retrosplenial (RSC), giro denteado (DG) e Região 1 do Corno de Amon (CA1) e Região 3 do Corno de Amon (CA3) do hipocampo.

3.9 GELATINIZAÇÃO DAS LÂMINAS PARA MICROSCOPIA

A gelatinização das lâminas é um processo muito importante, pois permite a aderência das secções cerebrais às lâminas (RAMOS-VARA, 2017). Para tal, as lâminas foram lavadas em água fervente e sabão Sigma Clean ou Extran, em uma diluição de 0,01%; agitadas e aquecidas à 60°C por 15 min e o excesso de água foi drenado. Posteriormente foram enxaguadas em água destilada fervente por 8 vezes, retirando o excesso e secadas em estufa à 37°C. Foi preparado uma solução de gelatina a 0,5% (para 400ml de solução): 400ml de água destilada (entre 50-60°C); 2g de gelatina tipo A da Sigma; 0,2g (*Chromium Potassium Sulfate* – CrK(SO₄)₂.12H₂O). As cestas de lâminas foram mergulhadas em 1 cuba contendo álcool 100%: por 3 min, 1 cuba contendo acetona P.A. por 3min e 01 cuba com a solução de gelatina (0,5%) por 3 min. Posteriormente as lâminas foram secadas em estufa a 37°C por um período

de 24 horas e armazenadas em papel alumínio.

3.10 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A coloração imuno-histoquímica explora a ligação específica entre um anticorpo e um antígeno para identificar e localizar antígenos específicos em células e tecidos (MAGAKI *et al.*, 2019). Uma vez que ocorra a ligação antígeno-anticorpo, o complexo poderá ser demonstrado por uma reação colorida que pode ser vista sob um microscópio óptico ou de luz ultravioleta (TAYLOR, 2020). O desenvolvimento neural e a plasticidade do cérebro adulto dependem de sinais que ativam programas coordenados de expressão gênica, os quais levam a alterações de curto e longo prazo na estrutura e função do cérebro. A transdução dos sinais intracelulares, iniciada pela interação do ligante com o receptor leva, subsequentemente, a alterações na expressão gênica (TYSSOWSKI *et al.*, 2018).

No final do século XX, foi descrito um terceiro “sistema mensageiro” intracelular. Um grupo de genes de transcrição rápida cujo produto proteico, em muitos casos, age diretamente alterando a expressão gênica e levando a respostas fenotípicas alternativas (MORGAN; CURRAN, 1989; RASMUSSEN *et al.*, 1984; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988). Esses genes têm duas características importantes: 1) expressão rápida e transitória seguida ao aparecimento do estímulo; 2) ativação da transcrição independente de síntese de proteínas. Tais genes são, então, denominados genes de expressão imediata ou primária (GALLO *et al.*, 2018).

O gene *c-fos* é um gene de expressão primária que vem sendo bastante estudado em distúrbios psiquiátricos (GALLO *et al.*, 2018; ISSY *et al.*, 2020; ISSY; DEL BEL, 2014). Dentro da neurociência experimental, a imuno-histoquímica para a proteína *c-Fos*, permite a caracterização generalizada dos efeitos de muitos tipos diferentes de manipulações experimentais na atividade neuronal, tornando-se um método relevante para entender as relações entre drogas, cérebro e comportamento, frente a estímulos agudos, sendo utilizado como marcador de atividade neuronal (CHUNG, 2015; MINATOHARA; AKIYOSHI; OKUNO, 2016, para revisões). No presente estudo, foi realizada a imuno-histoquímica para a proteína *c-Fos*, a qual teve duração de 3 dias, conforme o protocolo descrito a seguir.

3.10.1 1ª Parte: Incubação com o Anticorpo Primário

Passo 1: Lavagem com tampão A: A fim de evitar resultado falso positivo, o aparecimento de coloração de “fundo” ou marcações inespecíficas, é necessário que pontos suscetíveis a atrair proteínas sejam inibidos ou anulados. Para que isso ocorra, nós utilizamos uma mistura de tampão PBS, usado para lavagem e diluição de soros, com um detergente (nesse caso o Triton X100), a qual é conhecida como tampão A (cujo protocolo de preparação foi descrito anteriormente). Foram feitas 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada.

Passo 2: Recuperação antigênica com tampão citrato: A recuperação antigênica tem a finalidade de recuperar antígenos que foram obstruídos pela fixação com formol e é feita em altas temperaturas (ZHANG *et al.*, 2018). A solução de tampão citrato 0,1M a pH 6,0 é a mais utilizada para essa recuperação. Foram feitos 2 banhos com o tampão citrato, sendo o primeiro com duração de 5 minutos e em temperatura ambiente, e o outro com duração de 30 minutos a 70°. Em seguida, espera-se esfriar naturalmente.

Passo 3: Lavagem com tampão A: Foram feitas 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada.

Passo 4: Bloqueio da peroxidase endógena, por 30 minutos: A técnica de imunoperoxidase é comumente usada para a caracterização antigênica de células e tecidos (SHIELD *et al.*, 2018). No entanto, a ocorrência de células endógenas que são positivas para a peroxidase é frequente, o que dificulta tais avaliações (BUTLER; BARHAM; HEIDENREICH, 2019). Em alguns casos, chega a não ser possível distinguir entre essas células e células coradas com anticorpos, por isso, é necessário bloquear as peroxidases endógenas. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito por uma mistura de H₂O₂ a 0,5% e tampão A. Para saber a quantidade de H₂O₂ que correspondia a 0,5% usamos a fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$30\% \times V_1 = 0,5 \times V_2$$

Passo 5: Lavagem com tampão A: Foram feitas 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada.

Passo 6: Bloqueio das reações inespecíficas feito com: albumina sérica bovina (BSA) 2% + Tampão A + Soro 5%, por 60 minutos: A marcação de fundo inespecífica (*background*), quando intensa, dificulta ou torna mesmo impossível a interpretação de reações imuno-histoquímicas fracas. Existem dois aspectos principais que podem ser causa de marcação de fundo, a ligação inespecífica do anticorpo aos componentes teciduais, seja por

ligações hidrofóbicas ou interações iônicas e/ou a presença de enzimas endógenas. O background pode também ser atribuído à presença de biotina endógena. Para reduzir a marcação inespecífica do anticorpo ao tecido é aconselhada a pré-incubação do tecido com soro normal. Em teoria, este bloqueio funciona uma vez que as proteínas no soro normal vão ocupar os locais no tecido que estão carregados, reduzindo desta forma a ligação inespecífica do anticorpo ao tecido. O soro normal utilizado deve ser da mesma espécie do anticorpo secundário, para que não interfira na reação imunológica que ocorre no procedimento de imuno-histoquímica. Outra forma de evitar este tipo de marcação inespecífica é a utilização de tampão de lavagem com detergente. O bloqueio da atividade das enzimas endógenas também é importante para reduzir a marcação inespecífica. A utilização de métodos imuno-histoquímicos que apresentam como marcador enzimas semelhantes às que existem no tecido (endógenas), podem gerar problemas de marcação inespecífica, uma vez que as enzimas endógenas podem reagir com o substrato usado para localizar o marcador e levantar problemas de interpretação e falsos positivos (RAMOS-VARA, 2017). Dessa forma, realizamos o bloqueio das reações inespecíficas utilizando BSA 2%, e Soro 5% (específico do anticorpo secundário) diluído em tampão A.

Passo 7: Incubação com anticorpo primário: Os soros de anticorpos são desenvolvidos após a imunização de animais-alvos, dos quais os anticorpos produzidos são obtidos por via direta ou indireta (KALYUZHNY, 2016). Assim, existem dois tipos de anticorpos, policlonais e monoclonais. Os soros de anticorpos policlonais são produzidos em diversas espécies animais, porém, mais comumente em coelho, cavalo, cabra e galinha (DELAHAUT, 2017). Os soros policlonais, quando comparados ao monoclonais, tem a vantagem de serem mais propensos a identificar isoformas múltiplas (epítomos) da proteína alvo (BIANCHI et al., 2018). Além disso, eles podem ter propriedades imunomoduladoras ou anti-inflamatórias e são usados para fins de tratamento em várias patologias, como os anti-soros de veneno de cobra, tétano e raiva Clique ou toque aqui para inserir o texto.(SAPSUTTHIPAS *et al.*, 2015). Já no caso da produção de anticorpos monoclonais, os animais recebem injeções com o antígeno purificado, e após a obtenção de uma resposta imune os linfócitos B (células produtoras de anticorpos) são colhidos no baço (RAMOS-VARA, 2017). Devido a curta vida das células B, elas são fundidas com células de mieloma, em seguida é feita a seleção de hibridomas (célula híbrida produzida) que tenham a especificidade desejada (RAMOS-VARA, 2017). O hibridoma é uma célula imortal, que produz antígenos específicos para um único epítomo (HNASKO; STANKER, 2015). A vantagem do soro monoclonal é a sua maior especificidade quando comparado ao soro policlonal (RAMOS-VARA, 2017).

Nesse trabalho utilizamos 1 anticorpo primário, que foi diluído em tampão A:

Quadro 3- Anticorpo primário utilizado na imuno-histoquímica

| Anticorpo primário | Hospedeiro | Diluição | Fabricante | Catálogo |
|--------------------|------------|----------|------------|----------|
| Anti-c-Fos | Coelho | 1:2000 | Santa Cruz | 52 |

Fonte: Própria.

3.10.2 2º Parte: Revelação

Passo 1: Lavagem com tampão A: Foram feitas 3 lavagens com duração de 5 minutos cada.

Passo 2: Preparação e incubação com anticorpo secundário, 90 minutos: O anticorpo secundário possui marcação, tem o seu sinal amplificado devido ao anticorpo primário, e a escolha depende da espécie e do isotipo (classe) de imunoglobulina que foi usado no anticorpo primário (MAGAKI *et al.*, 2019). O anticorpo deve ser diluído no tampão A. A quantidade de solução que deve ser usada em cada poço varia de acordo com o número de secções.

Quadro 4- Anticorpo secundário utilizado na imuno-histoquímica

| Anticorpo secundário | Espécie alvo | Hospedeiro | Diluição | Fabricante | Catálogo |
|----------------------|--------------|------------|----------|-------------|-------------|
| | Coelho | Cabra | 1:200 | Vector Labs | BA-1000-1,5 |

Fonte: Própria.

Passo 3: Lavagem com tampão A: Foram feitas 3 lavagens com duração de 5 minutos cada.

Passo 4: Incubação com o complexo avidina-biotina (AB) por 2 horas: A avidina é uma glicoproteína extraída da clara de ovo que possui quatro sítios de ligação por molécula e apresenta alta afinidade por uma vitamina de baixa massa molecular chamada biotina. Essa glicoproteína tem um sítio de ligação para a biotina e pode ser ligada, através de outros locais, a um anticorpo (biotinilado) ou qualquer outra macromolécula, como uma enzima, fluorocromos ou outro marcador (HYTÖNEN, 2020). Um dos métodos mais comuns de avidina-biotina é o complexo AB (JAIN; CHENG, 2017). Nesse caso o anticorpo secundário é biotinilado e usa-se como reagente um complexo de avidina misturada com biotina ligada com marcador apropriado (RAMOS-VARA, 2017). A avidina e a biotina são deixadas juntas,

em agitação, por aproximadamente 30 minutos antes de serem aplicadas, resultando na formação de um grande complexo com numerosas moléculas de marcador (RAMOS-VARA, 2017). Recomenda-se prepara-lo durante a incubação com o anticorpo secundário.

Passo 5: Lavagem com tampão A: Fazer 3 lavagens com duração de 5 minutos cada.

Passo 6: Lavagem com TBS 0,25M – pH 7,4: Os tampões de lavagem são utilizados para remover os reagentes entre as diferentes etapas de protocolos de marcação imunohistoquímica. Esta solução ajuda a manter as características morfológicas dos anticorpos e dos seus epítomos, de forma a facilitar a ligação específica necessária numa reação imunohistoquímica (RAMOS-VARA, 2017). Foram feitas 3 lavagens com TBS 0,25M.

Passo 7: Revelação com DAB (3,3'-diaminobenzidina; máximo 10 minutos): Neste trabalho usamos o cromogênio DAB, que é o mais favorável da enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP), o qual após a oxidação forma um polímero de cor marrom, insolúvel e estável no local do antígeno alvo (THOMAS; LEMMER, 2005). A DAB foi dissolvida em TBS 0,1M (20ml de TBS 0,1M para cada 10mg de DAB). Quando estava próximo de encubar adicionamos 3 μ l de H₂O₂ 30%. Por ser extremamente tóxica, recomenda-se ter muito cuidado ao manusear a DAB.

Passo 8: Lavar com TBS 0,25M: Foram feitas 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada.

Passo 9. Montagem das lâminas: Para a montagem das lâminas, já gelatinizadas, utilizamos solução de montagem e deixamos secar em temperatura ambiente por, no mínimo 24 horas.

Passo 10. Diafanização: As lâminas foram colocadas em uma rede apropriada e mergulhadas em cada um dos tanques da bateria de desidratação (Quadro 5).

Quadro 5 - Soluções para diafanização e tempo de cada

| Solução | Tempo (min) |
|---|-------------|
| H ₂ O | 3 |
| Álcool 70% | 3 |
| Álcool 95% | 3 |
| Álcool absoluto I | 3 |
| Álcool absoluto II | 3 |
| Xilol 1:1 (50% xilol + 50% álcool absoluto) | 3 |
| Xilol I | 3 |
| Xilo II | 3 |

Fonte: Própria.

Após remoção das lâminas do xilol, as lamínulas foram adicionadas às lâminas com a aplicação de Entelan e secadas em temperatura ambiente por, no mínimo, 24 horas. Após esse período as lâminas foram limpas com clorofórmio e, assim, prontas para serem vistas sob o microscópio.

3.11 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA c-Fos

A quantificação da proteína c-Fos foi baseada no descrito por ISSY et al., 2016. As imagens foram obtidas em um aumento de 20X, através de uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio de luz e projetadas em um computador equipado com o programa Leica Application Suite, versão 3.0.4, para configurações de luz e cores. Os ajustes realizados na câmera e na intensidade da luz foram otimizados para evitar saturação do sinal e mantidos constantes até o final da quantificação. As células foram consideradas positivas para proteína c-Fos quando apresentavam “manchas” marrons acinzentadas dentro dos núcleos e contadas de 2 a 3 secções adjacentes sob microscopia de luz. Uma vez digitalizadas, a contagem relativa de imunorreatividade foi expressa em um número de células/0,1 mm² automaticamente por configurações no *software* de análise de imagem Fiji ImageJ 1.53e (Wayne Rasband and contributors National Institutes of Health, USA), que identificou e contou neurônios imunomarcados de acordo com um nível de cinza que foi determinado empiricamente antes da análise. A fim de que somente os núcleos corretos fossem contados, foram excluídas da contagem as marcações inespecíficas.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de PPI foram analisados por análise de variância de duas vias (RM-ANOVA) com tratamento e intensidade de pré-pulso (três níveis: PPI80; PPI85; PPI90) como fatores. Resposta de sobressalto, os diferentes parâmetros comportamentais registrados no actímetro e os resultados obtidos na imuno-histoquímica para c-Fos foram analisados por ANOVA de uma via. O teste de Tukey foi usado para análise *post hoc*. Todos os dados são

expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para todos os experimentos, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

3.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os camundongos foram submetidos a uma sessão de pré-teste do PPI, para uma divisão dos grupos e seus respectivos tratamentos de maneira homogênea, conferindo uma confiabilidade maior aos dados obtidos no presente estudo. Quatro dias após o pré-teste os camundongos foram submetidos ao teste PPI para os desafios farmacológicos. Os camundongos utilizados para o primeiro experimento foram reutilizados para o segundo experimento, com intervalo de sete dias. Em todos os casos, os animais foram novamente submetidos ao teste de PPI em intervalos de 3 a 4 dias para garantir a eliminação do fármaco. Para avaliação dos efeitos de doses subefetivas de CBD e NPS associadas no modelo MK-801 utilizamos grupos independentes para evitar a recorrência do tratamento psicotomimético. Este estudo foi dividido nos experimentos detalhados a seguir.

3.13.1 EXPERIMENTO 1: Teste de PPI e actímetro: Efeitos do CBD e NPS

O objetivo desse experimento foi confirmar se os fármacos CBD e NPS sozinhos não causariam efeitos motores no teste de actímetro, aqui avaliados os parâmetros estereotipia, movimentos horizontais e verticais e o prejuízo de PPI em diferentes intensidades de pré-pulso, aqui avaliadas em 80, 85 e 90 dB. Subgrupos experimentais: $n=6-8$ por tratamento. Imediatamente após o teste de actímetro os animais foram submetidos ao teste de PPI (Figura 5).

VEI1+ VEI2+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de veículo 1 (VEI1; 1% DMSO, 2% Tween80 e 97% solução salina), seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de veículo 2 (VEI2 solução salina), seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD15mg/kg+ VEI2+SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD15 mg/kg,

seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de solução salina, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD30mg/kg+ VEI2+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD30 mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de solução salina sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD60mg/kg+ VEI2+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD60 mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de solução salina sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

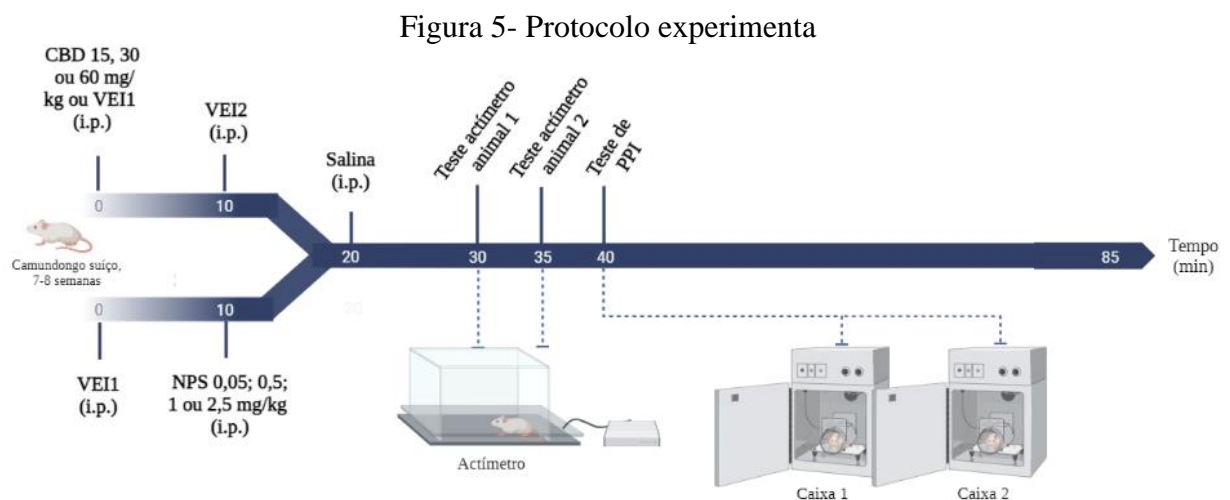
VEI1+ NPS0,05mg/kg+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS0,05mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ NPS0,5mg/kg+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS0,5mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ NPS1mg/kg+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS1mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ NPS2,5mg/kg+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS2,5mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

Este regime de três injeções garantiu que todos os animais recebessem o mesmo número de injeções.



Fonte: Própria, utilizando o *software* Biorender. Os animais receberam CBD (canabidiol) na dose de 15, 30 ou 60mg/kg, ou veículo 1 (VEI1; 1% DMSO, 2% Tween80 e 97% solução salina), seguida, 10min depois, pela aplicação de veículo 2 (VEI2; solução salina) ou NPS (nitroprussiato de sódio) na dose de 0,05, 0,5, 1 ou 2,5mg/kg, seguida, 10min depois, pelo tratamento com solução salina, sendo

submetidos, 10min depois, ao teste de actímetro e posteriormente ao teste de PPI (inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto). Todos os tratamentos foram injetados i.p. (intraperitonealmente).

3.13.2 EXPERIMENTO 2: Teste de PPI e actímetro: A capacidade do NPS e CBD de prevenir os efeitos induzidos por MK-801

O objetivo desse experimento foi reproduzir a capacidade do CBD em prevenir os efeitos do MK-801 no paradigma PPI (GOMES *et al.*, 2015a; PEDRAZZI *et al.*, 2021b), assim como avaliar se o NPS também previne esse prejuízo. Além disso, avaliamos se essas drogas preveniam os efeitos motores gerados pelo MK-801, no teste de actímetro. Com isso, determinamos as doses efetivas e subefetivas de CBD e NPS no paradigma PPI. Os Subgrupos experimentais consistiram em um n de se 6-8 animais por tratamento. Imediatamente após o teste de actímetro os animais foram submetidos ao teste de PPI (Figura 6).

VEI1+ VEI2+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ VEI2+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD15mg/kg+ VEI2+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD15 mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de solução MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD30mg/kg+ VEI2+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD30 mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD60mg/kg+ VEI2+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD60 mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos

depois de uma aplicação i.p. de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

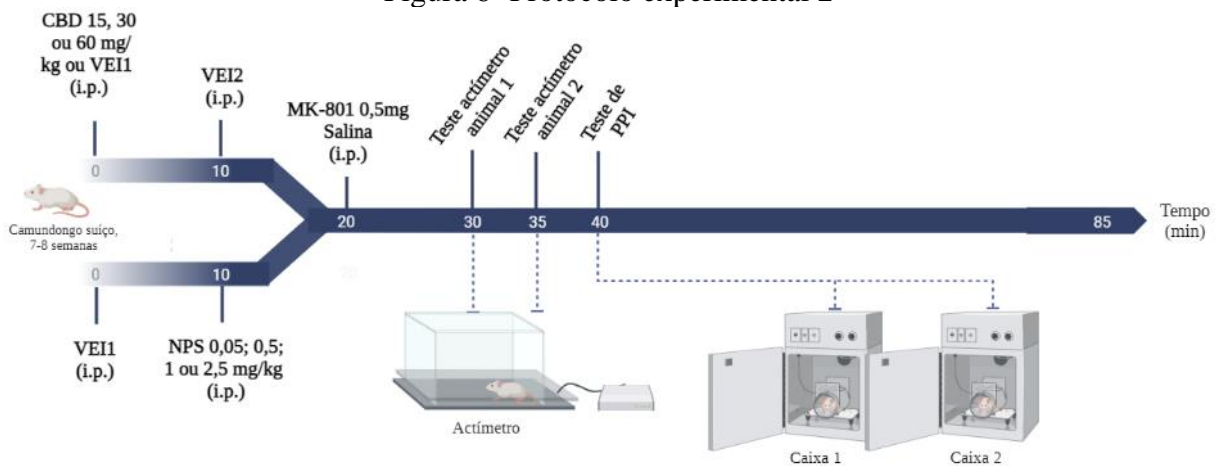
VEI1+ NPS0,05mg/kg+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS0,05mg/kg seguida 10 minutos depois de uma aplicação de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ NPS0,5mg/kg+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS0,5mg/kg seguida 10 minutos depois de uma aplicação de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ NPS1mg/kg+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS1mg/kg seguida 10 minutos depois de uma aplicação de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ NPS2,5mg/kg+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS2,5mg/kg seguida 10 minutos depois de uma aplicação de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

Figura 6- Protocolo experimental 2



Fonte: Própria, utilizando o *software* Biorender. Os animais receberam CBD (canabidiol) na dose de 15, 30 ou 60mg/kg, ou veículo (VEI1; 1% DMSO, 2% Tween80 e 97% solução salina), seguida, 10min depois, pela aplicação de veículo 2 (VEI2; solução salina) ou NPS (nitroprussiato de sódio) na dose de 0,05, 0,5, 1 ou 2,5mg/kg, seguida, 10min depois, pelo tratamento com MK-801 0,5mg/kg ou solução salina, sendo submetidos, 10min depois, ao teste de actímetro, seguido do teste de PPI (inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto). Todos os tratamentos foram injetados i.p. (intraperitonealmente).

3.13.3 EXPERIMENTO 3: Teste de PPI e actímetro: Efeito da associação CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801

Após determinadas as doses subefetivas no experimento anterior, avaliamos se o tratamento conjunto com essas doses subefetivas de CBD e NPS previnem a deficiência no processamento de informações no teste de PPI e efeitos motores no teste de actímetro, induzidos pelo MK-801. Subgrupos experimentais: n=6-8 por tratamento. Respeitando o mesmo delineamento dos experimentos anteriores, imediatamente após o teste de actímetro os animais foram submetidos ao teste de PPI.

VEI1+ VEI2+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD15mg/kg+ VEI2+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD15 mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de solução salina, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ NPS0,5mg/kg+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS0,5mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD15mg/kg+ NPS0,5mg/kg+ SAL: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD15 mg/kg, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS0,5mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de solução salina, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

VEI1+ VEI2+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

CBD15mg/kg+ VEI2+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD15 mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de VEI2, seguida 10 minutos depois de uma aplicação i.p. de solução MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

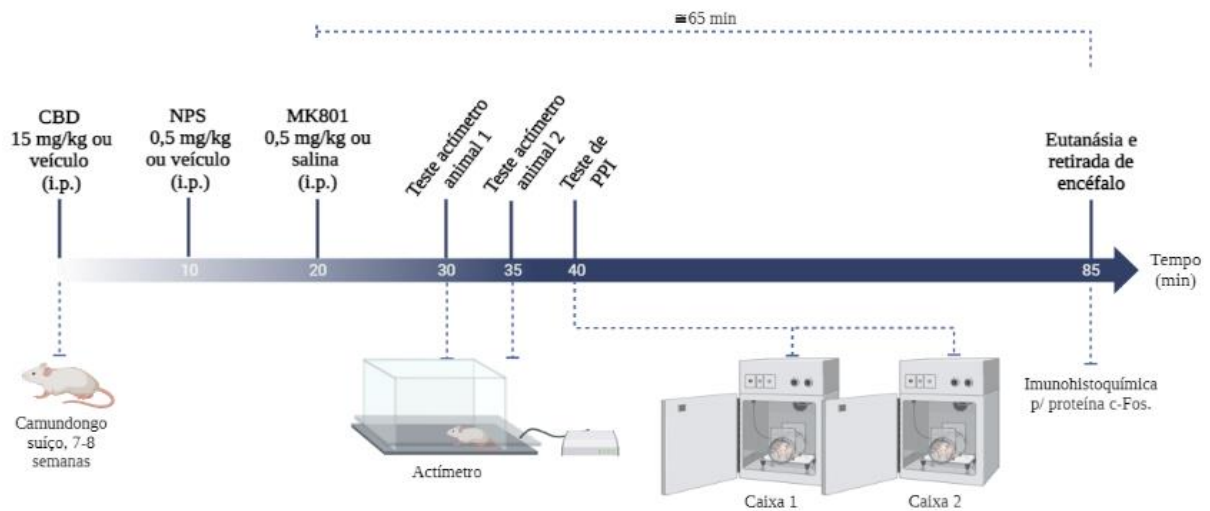
VEI1+ NPS0,5mg/kg+ MK-801 0,5mg/kg: Animais receberam a aplicação i.p. de VEI1, seguida 10 minutos depois pela aplicação i.p. de NPS0,5mg/kg seguida 10 minutos depois de uma aplicação de MK-801 0,5 mg/kg, sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste

de actímetro.

CBD15mg/kg+ NPS0,5mg/kg+ MK-801: Animais receberam a aplicação i.p. de CBD15mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de NPS0,5mg/kg, seguida 10 minutos depois de uma aplicação de MK-801 0,5 mg/kg sendo submetidos, 10 minutos depois ao teste de actímetro.

Imediatamente após o término do teste de PPI ($\cong 60$ min após o tratamento com MK-801), os animais foram eutanasiados e seus encéfalos foram cuidadosamente retirados. Obtivemos secções nas regiões de interesse, que foram submetidas a imuno-histoquímica para a proteína c-Fos.

Figura 7- Protocolo experimental 3



Fonte: Própria, utilizando o *software* Biorender. Os animais receberam CBD (canabidiol) 15mg/kg, ou veículo (1% DMSO, 2% Tween80 e 97% solução salina), seguida, 10min depois, pela aplicação de NPS (nitroprussiato de sódio) 0,5mg/kg, ou veículo (solução salina), seguida, 10min depois, pelo tratamento com MK-801 0,5mg/kg ou solução salina, sendo submetidos, 10min depois, ao teste de actímetro, seguido pelo teste de PPI (inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto). Todos os tratamentos foram injetados i.p (intraperitonealmente).

4 RESULTADOS

Seguem, abaixo, os resultados obtidos no presente estudo.

4.1 TESTE DE PPI E ACTÍMETRO: EFEITOS DO CBD E NPS

Como descrito no delineamento experimental, nosso primeiro passo foi confirmar se o CBD, NPS e seus respectivos veículos *per se* não causariam ruptura ou prejuízo de PPI em diferentes intensidades de pré-pulso analisadas (80, 85 e 90dB) e efeitos motores no teste de actímetro, que avaliou movimentos estereotipados, movimentos horizontais e verticais.

O teste de actímetro revelou que o tratamento com NPS 2,5 mg/kg diminuiu os movimentos estereotipados em relação aos animais que receberam solução salina [$F_{8, 49} = 15,24$, $p = <0,0001$], assim como reduziu os movimentos horizontais [$F_{8, 49} = 7,396$, $p = <0,0001$]. Além disso, a dose de 0,05 mg/kg de NPS aumentou os movimentos verticais [$F_{8, 49} = 5,644$, $p = <0,0001$]. Teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 1).

Tabela 1 – Teste de actímetro: Efeito do CBD e NPS

| Tratamento | Estereotipia | Movimento | Movimento |
|----------------|--------------|------------------|----------------|
| | (cts) | Horizontal (cts) | Vertical (cts) |
| Salina | 781 ± 49.99 | 1413 ± 221.40 | 31 ± 11.76 |
| CBD15-salina | 666 ± 33.44 | 1453 ± 146.90 | 25 ± 4.66 |
| CBD30-salina | 775 ± 48.23 | 1385 ± 68.68 | 32 ± 2.44 |
| CBD60-salina | 819 ± 29.66 | 1693 ± 218.40 | 38 ± 5.56 |
| NPS0,05-salina | 917 ± 42.30 | 1753 ± 93.68 | 68 ± 4.65* |
| NPS0,5-salina | 755 ± 85.67 | 1329 ± 101.00 | 41 ± 6.59 |
| NPS1-salina | 767 ± 60.29 | 1230 ± 131.30 | 35 ± 6.33 |
| NPS2,5-salina | 120 ± 44.81* | 219 ± 84.15* | 2 ± 1.01 |

Fonte: Própria. Os camundongos foram injetados via i.p. com salina ou CBD (canabidiol; 15, 30 ou 60 mg/kg) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,05, 0,5, 1 ou 2,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina. Foi realizada a contagem (cts) do número de movimentos estereotipados (estereotipia), horizontais e verticais. Os dados são apresentados como média ± SEM, ANOVA de uma via seguida de *post hoc* Tukey; $p < 0,05^*$ comparado com o grupo salina.

Dentre os compostos testados (CBD 15, 30, 60mg/kg e NPS 0,05, 0,5, 1, 2,5mg/kg)

nenhum causou prejuízo no desempenho dos animais no teste de PPI. Em contrapartida, a dose de 15mg/kg de CBD melhorou a resposta dos animais na intensidade de 90 dB. As análises de variância revelaram um efeito significativo da intensidade de pré-pulso [$F_{1,916, 91.97} = 6,967$, $p = 0,0018$] e tratamento [$F_{8, 48} = 2,951$, $p = 0,0091$], mas não uma interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F_{16, 96} = 1,113$, $p = 0,3548$] (teste de Tukey, $p < 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2 – Teste de PPI (%): Efeitos do CBD e NPS

| Tratamento | 80dB | 85dB | 90dB |
|------------------------|-----------|-----------|------------|
| Salina (10ml/kg) | 65 ± 6.02 | 69 ± 4.58 | 69 ± 2.88 |
| CBD15 mg/kg - salina | 72 ± 2.16 | 76 ± 2.00 | 82 ± 1.91* |
| CBD30 mg/kg - salina | 68 ± 2.77 | 71 ± 3.40 | 79 ± 2.61 |
| CBD60 mg/kg - salina | 50 ± 4.62 | 55 ± 4.38 | 55 ± 6.48 |
| NPS0,05 mg/kg - salina | 62 ± 1.83 | 65 ± 6.34 | 74 ± 4.88 |
| NPS0,5 mg/kg - salina | 76 ± 3.24 | 72 ± 4.83 | 73 ± 4.92 |
| NPS1 mg/kg - salina | 50 ± 8.45 | 55 ± 8.85 | 59 ± 8.77 |
| NPS2,5 mg/kg - salina | 67 ± 6.31 | 67 ± 6.78 | 66 ± 6.27 |

Fonte: Própria. Os camundongos foram injetados via i.p. com salina ou CBD (canabidiol; 15, 30 ou 60 mg/kg) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,05, 0,5, 1 ou 2,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina. Os dados são apresentados como média ± SEM, ANOVA de duas vias seguida de *post hoc* Tukey, $p < 0,05$ * comparado com o grupo salina.

Nenhum tratamento alterou a amplitude do reflexo de sobressalto (Startle; $F_{8, 48} = 1,182$, $p = 0,3297$; Tabela 3).

Tabela 3- Efeitos do tratamento medicamentoso no Startle

| Tratamento | Média ± SEM | n |
|------------------------|---------------|---|
| Salina (10ml/kg) | 688 ± 62.40 | 8 |
| CBD15 mg/kg - salina | 649 ± 79.94 | 8 |
| CBD30 mg/kg - salina | 1002 ± 192.60 | 6 |
| CBD60 mg/kg - salina | 552 ± 104.40 | 6 |
| NPS0,05 mg/kg - salina | 728 ± 133.50 | 6 |
| NPS0,5 mg/kg - salina | 781 ± 64.02 | 6 |
| NPS1 mg/kg - salina | 722 ± 270.90 | 6 |
| NPS2,5 mg/kg - salina | 499 ± 74.45 | 6 |

Fonte: Própria. Os valores são médias em unidades arbitrárias (AU); o número de camundongos por grupo está indicado na coluna da direita. Os camundongos foram injetados via i.p. com salina ou CBD

(canabidiol; 15, 30 ou 60 mg/kg) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,05; 0,5; 1 ou 2,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina. Os dados são apresentados como média \pm SEM, ANOVA de uma via seguida de *post hoc* Tukey.

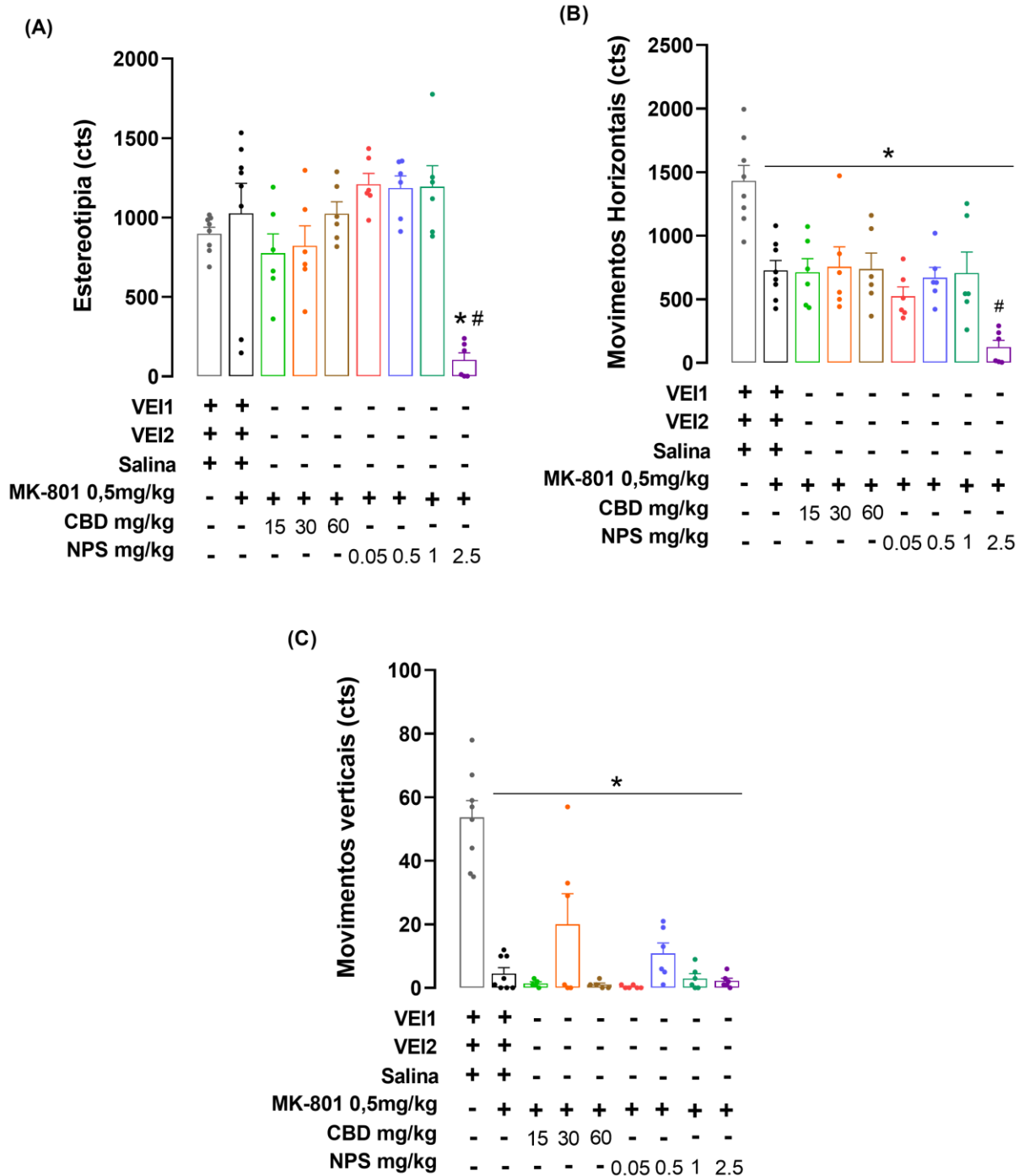
4.2 DETERMINAÇÃO DE DOSES EFETIVAS E SUBEFETIVAS DE CBD E NPS NO PREJUÍZO INDUZIDO POR MK-801 NO PARADIGMA PPI E ACTÍMETRO

Nosso segundo passo foi confirmar os efeitos benéficos do CBD em prevenir o prejuízo induzido por MK-801 no paradigma PPI, verificar se o NPS também previne esse prejuízo e, assim, determinar as possíveis doses subefetivas de CBD e NPS nesse prejuízo. Além disso, avaliamos se o pré-tratamento com esses compostos apresentavam efeito sobre o tratamento com MK-801, no teste de actímetro.

O teste de actímetro revelou que o pré-tratamento com NPS 2,5 mg/kg diminuiu os movimentos estereotipados em relação ao grupo salina e ao grupo MK-801 [$F_{8, 49} = 8,552$, $p < 0,0001$]. O MK-801 (0,5 mg/kg) provocou uma diminuição significativa dos movimentos horizontais em todos os tratamentos, potencializada pelo o pré-tratamento com NPS 2,5 mg/kg [$F_{8, 49} = 9,856$, $p < 0,0001$], e nos movimentos verticais (

Figura 8; teste de Tukey, $p < 0,05$) [$F_{8, 47} = 21,01$, $p < 0,0001$]. Nenhuma das doses testadas de CBD e NPS preveniu o prejuízo induzido pelo MK-801.

Figura 8- Teste de actímetro: Efeito do CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801

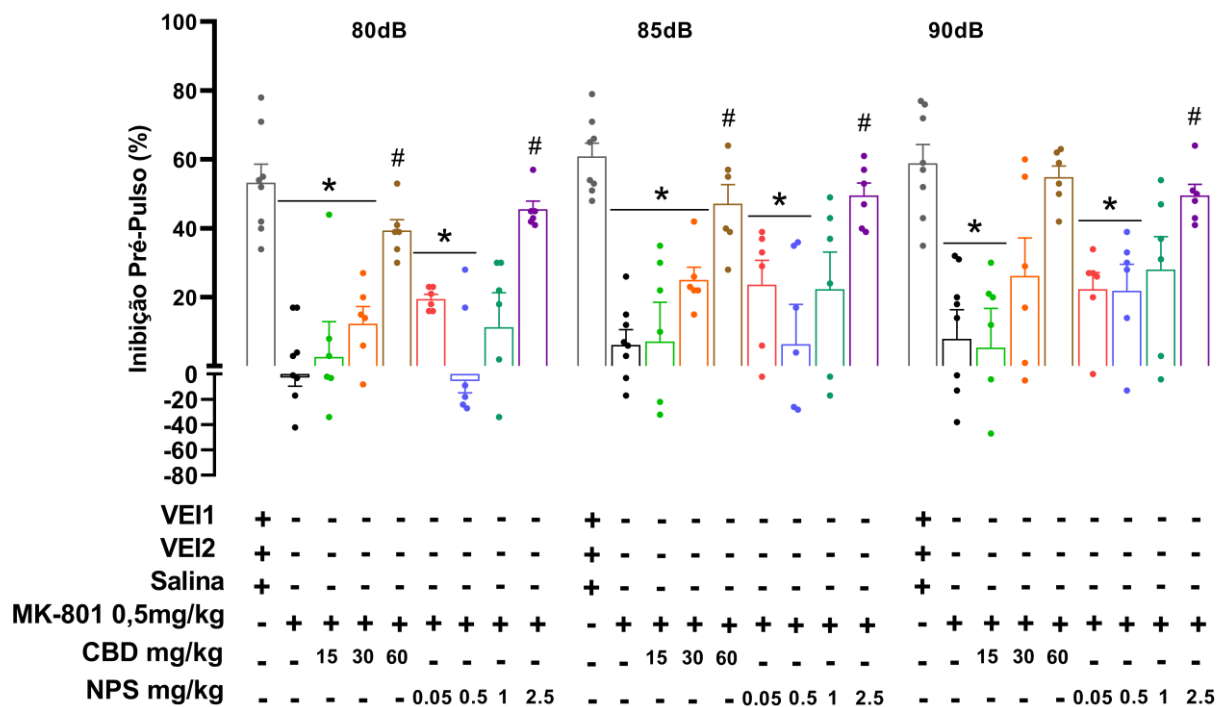


Fonte: Própria. Os camundongos foram injetados via i.p. com VEI1 (veículo 1) ou CBD (canabidiol; 15, 30 ou 60 mg/kg), seguido 10 min depois de VEI2 (veículo 2) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,05, 0,5, 1 ou 2,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina ou MK-801 (0,5mg/kg). *1A-Estereotipia Total*: os animais que receberam NPS 2,5 mg/kg e MK-801 0,5 mg/kg apresentou redução da estereotipia total quando comparado aos grupos salina. *1B-Movimento Horizontal*: O tratamento com MK-801 provocou uma diminuição dos movimentos horizontais. O pré-tratamento com CBD (15, 30 ou 60 mg/kg) ou NPS (0,05; 0,5; 1 ou 2,5 mg/kg) não preveniu o prejuízo induzido pelo MK-801. *1C-Movimento Vertical*: O tratamento com MK-801 reduziu os movimentos verticais, o qual não foi prevenido por nenhum dos fármacos nas doses testadas. As barras são médias \pm SEM, os dados foram analisados usando ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, * $p < 0.05$

comparado com salina, # $p < 0,05$ comparado com MK-801.

O tratamento agudo com MK-801 (0,5 mg/kg) induziu um prejuízo no desempenho dos animais submetidos ao PPI em todas as intensidades de pré-pulso quando comparado com animais que receberam o tratamento salina (teste de Tukey, $p < 0,05$; Figura 9). O CBD na dose de 60 mg/kg e NPS 2,5 mg/kg preveniram esse prejuízo. O pré-tratamento com CBD 15 e 30 mg/kg, bem como com NPS 0,05, 0,5 e 1,0 mg/kg não preveniram esse prejuízo (Figura 9). As análises de variância revelaram um efeito significativo da intensidade de pré-pulso [$F_{1,818, 89,08} = 9,708$, $p = 0,0002$] e tratamento [$F_{8, 49} = 13,34$, $p < 0,0001$], mas não uma interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F_{16, 98} = 0,6031$, $p = 0,8745$]. Teste de Tukey, $p < 0,05$.

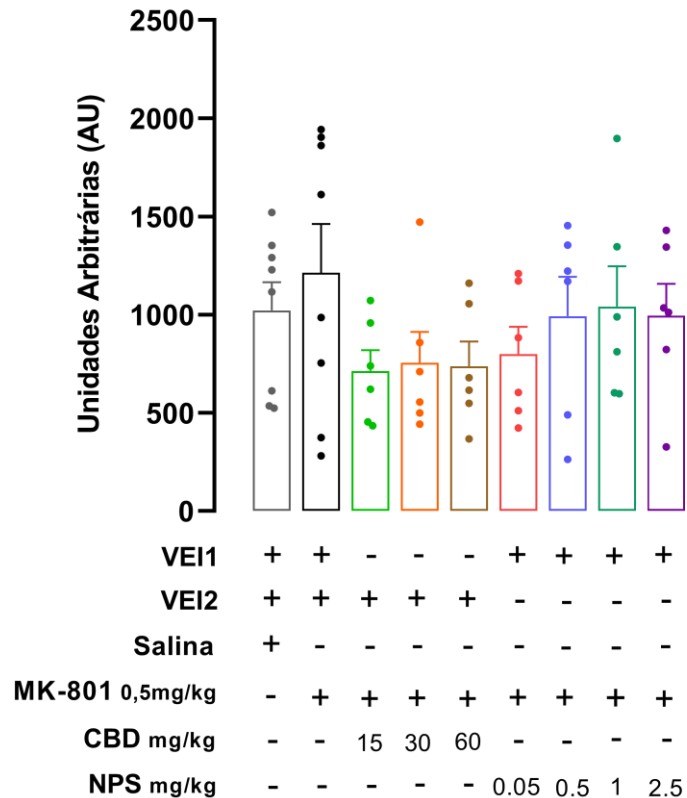
Figura 9- Teste de PPI: Efeito do CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801



Fonte: Própria. Os camundongos foram injetados via i.p. com VEI1 (veículo 1) ou canabidiol (CBD; 15, 30 ou 60 mg/kg), seguido 10 min depois de VEI2 (veículo 2) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,05, 0,5, 1 ou 2,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina ou MK-801 (0,5mg/kg). PPI: Pré-pulsos (PP) de 80, 85 ou 90 dB. O efeito disruptivo do MK-801 no teste de PPI foi revelado em todas as intensidades de pré-pulso ($n = 6-8$ por tratamento). O NPS nas doses de 0,05, 0,5 ou 1,0 mg/kg não neutralizou a interrupção de PPI induzida pelo MK-801, mas houve prevenção desse prejuízo na dose de 2,5 mg/kg em todas as intensidades de PP ($n = 6$ por tratamento). O CBD nas doses de 15 e 30mg/kg não contrariou o efeito disruptivo do MK-801 no PPI ($n = 6$ por tratamento). O tratamento com CBD na dose de 60mg/kg preveniu a interrupção de PPI induzida por MK-801 em todas as intensidades de PP. As barras são médias \pm SEM, os dados foram analisados usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, * $p < 0,05$ comparado com salina, # $p < 0,05$ comparado com MK-801.

Em relação ao reflexo de sobressalto, como podemos observar na Figura 10, nenhum tratamento alterou a amplitude do Startle [$F_{8, 49} = 0,9987$, $p = 0,4491$].

Figura 10- Startle: Efeito do CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801



Fonte: Própria. *Reflexo de sobressalto (Startle)*: Os camundongos foram injetados via i.p. com VEI1 (veículo 1) ou CBD (canabidiol; 15, 30 ou 60 mg/kg), seguido 10 min depois de VEI2 (veículo 2) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,05, 0,5, 1 ou 2,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina ou MK-801 (0,5mg/kg). Os valores são médias em unidades arbitrárias (AU); os dados são apresentados como média \pm SEM, ANOVA de uma via.

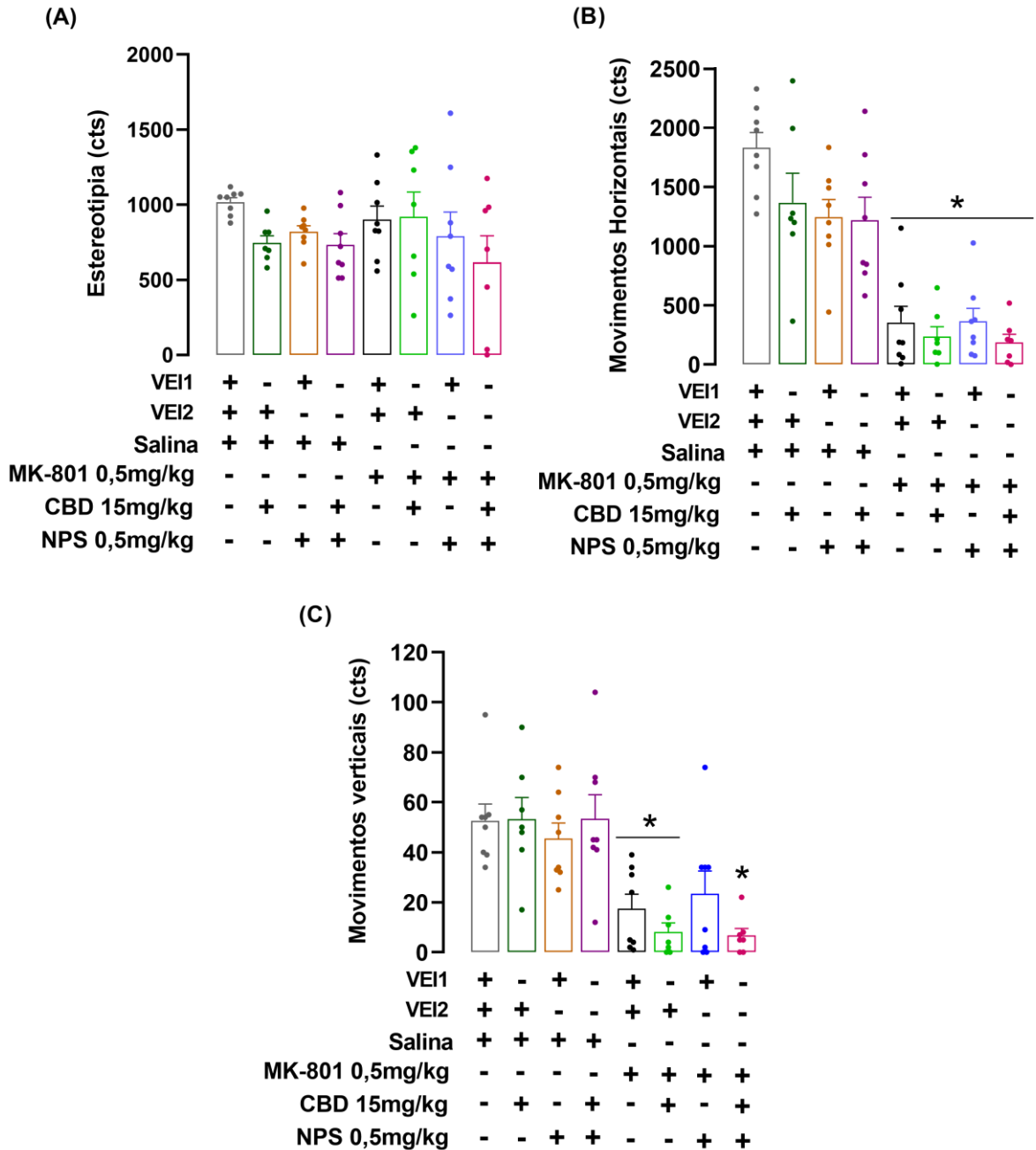
4.3 EFEITO DE DOSES SUBEFETIVAS DE CBD E NPS NO PREJUÍZO INDUZIDO POR MK-801 NO PARADIGMA PPI E ACTÍMETRO

Após determinada as doses subefetivas de CBD e NPS, nosso terceiro passo foi verificar se a associação dessas previnem as alterações comportamentais observadas em modelo experimental de esquizofrenia, utilizando o MK-801, no teste de actímetro e PPI.

O teste de actímetro revelou que os tratamentos não alteraram o número de movimentos estereotipados (Figura 11A) [$F_{7, 53} = 1,281$, $p = 0,0012$]. Em contrapartida, todos os animais tratados com MK-801 (0,5 mg/kg) tiveram uma diminuição dos movimentos

horizontais (Figura 11) [$F_{7, 53} = 17,78, p < 0,0001$] e verticais (Figura 11C; teste de Tukey, $p < 0,05$) [$F_{7, 53} = 8,334, p < 0,0001$].

Figura 11 – Teste de actímetro: Efeito de doses subfetivas de CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801

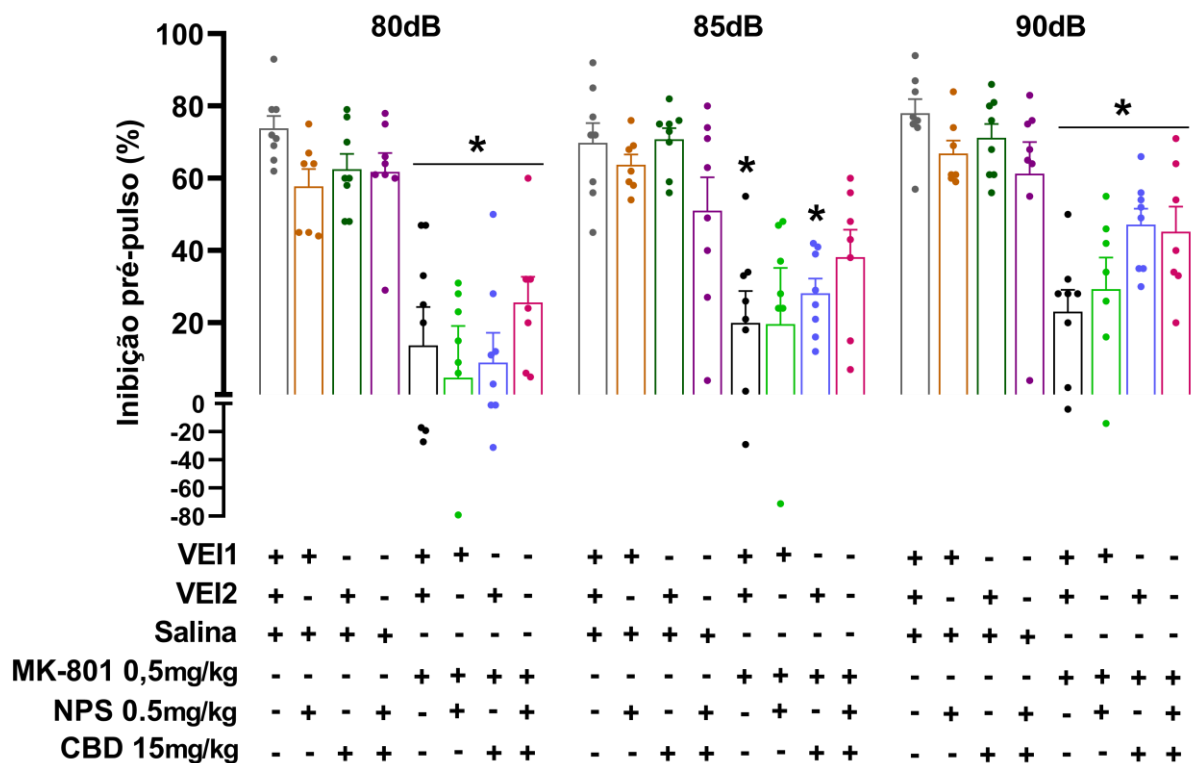


Fonte: Própria. Os camundongos foram injetados via i.p. com VEI1 (veículo 1) ou CBD (canabidiol; 15mg/kg), seguido 10 min depois por VEI2 (veículo 2) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina ou MK-801 (0,5mg/kg; n=6-8 por tratamento). *A-Estereotipia Total*: os animais tratados com MK-801 (0,05 mg/kg) não apresentaram diferença significativa comparados ao grupo salina. *B-Movimento Horizontal Total*: O tratamento com MK-801 (0,05 mg/kg) não houve diferença significativa dos movimentos horizontais totais entre os

tratamentos. *4C-Movimento Vertical Total*: O MK-801 (0,05 mg/kg) reduziu os movimentos verticais totais. O pré-tratamento com CBD (15 mg/kg) ou NPS (0,5 mg/kg), bem como a associação das duas drogas, não preveniram a diminuição dos movimentos induzida pelo MK-801. As barras são médias \pm SEM, os dados foram analisados usando ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey, * $p < 0.05$ comparado com salina.

O tratamento com MK-801 (0,5 mg/kg) prejudicou o desempenho dos animais no teste de PPI, em todas as intensidades de pré-pulso avaliadas, quando comparado com o grupo controle. A associação de NPS (0,5 mg/kg) e CBD (15 mg/kg) não foi efetiva na prevenção do prejuízo dos animais no teste de PPI, induzido pelo MK-801 (teste de Tukey, $p < 0,05$; Figura 12). As análises de variância revelaram um efeito significativo da intensidade de pré-pulso [$F_{1,967, 104.2} = 21,90$, $p < 0,0001$] e tratamento [$F_{7, 53} = 12,49$, $p < 0,0001$], e interação entre a intensidade de pré-pulso e o tratamento [$F_{14, 106} = 2.717$, $p = 0,0019$].

Figura 12 – Teste de PPI: Efeito de doses subefetivas de CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801

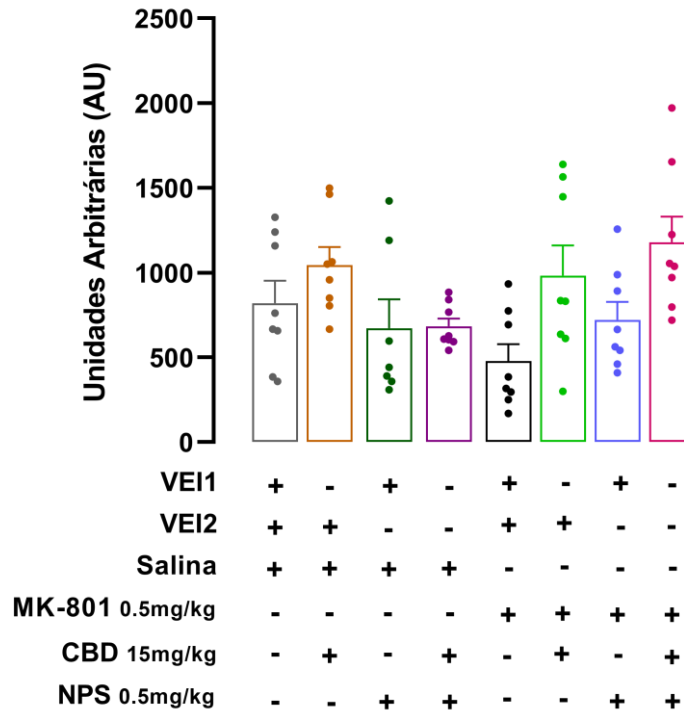


Fonte: Própria. Os camundongos foram injetados via i.p. com VEI1 (veículo 1) ou CBD (canabidiol; 15mg/kg), seguido 10 min depois por VEI2 (veículo 2) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina ou MK-801 (0,5mg/kg; n=6-8 por tratamento). Pré-pulsos (PP) de 80, 85 ou 90 dB. O NPS e o CBD não neutralizaram o prejuízo de PPI induzido pelo MK-801. As barras são médias \pm SEM, os dados foram analisados usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, * $p < 0.05$ comparado com salina.

Nenhum dos tratamentos provocou alteração significativa na amplitude do Startle

(Figura 13) [$F_{4, 25} = 0,4846$, $p = 0,7468$].

Figura 13- Startle: Efeito de doses subefetivas de CBD e NPS no prejuízo induzido por MK-801



Fonte: Própria. *Reflexo de sobresalto (Startle)*: Os camundongos foram injetados via i.p. com VEI1 (veículo 1) ou CBD (canabidiol; 15mg/kg), seguido 10 min depois por VEI2 (veículo 2) ou NPS (nitroprussiato de sódio; 0,5 mg/kg), seguido 10 min depois por solução salina ou MK-801 (0,5mg/kg; n=6-8 por tratamento). Os valores são médias em unidades arbitrárias (AU); os dados são apresentados como média \pm SEM, ANOVA de uma via.

4.3.1 Avaliação da expressão da proteína c-Fos

Imediatamente após o término do teste de PPI, os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram removidos de acordo com o descrito em “Materiais e Métodos”. A expressão da proteína c-Fos foi avaliada no córtex pré-frontal medial PrL e IL, estriado dorsal DL e DM, AcbC e AcbSh, RSC, DG e região CA1 e CA3 do hipocampo dorsal (Figura 4).

4.3.1.1 Córtex pré-frontal medial pré-límbico e infra-límbico

A análise de variância do córtex pré-frontal PrL revelou alteração significativa do número de núcleos neuronais positivamente marcados pela imuno-histoquímica para a proteína c-Fos entre os tratamentos [F7,40 = 4,839, p = 0,0005]. A análise *post hoc* revelou um aumento da expressão de c-Fos no grupo tratado com VE11 e VE2 e MK-801 (0,5mg/kg; Tukey, p = 0,0523;

Figura 14A;

Figura 15A-H). O pré-tratamento com a associação de CBD (15mg/kg) e NPS (0,5mg/kg) impediu esse aumento (Tukey, p<0,05;

Figura 14A). Em relação à porção infra-límbica (representado na

Figura 14B) a administração de MK-801 resultou em um aumento robusto no número de núcleos positivos para c-Fos [F4, 40 = 5,541, p = 0,0002; Tukey, p<0,05]. O pré-tratamento com CBD e NPS resultou em uma atenuação significativa do número de núcleos imunorreativos a c-Fos no IL (Tukey, p<0,05;

Figura 15A'-H').

Figura 14- Avaliação da Expressão de c-Fos

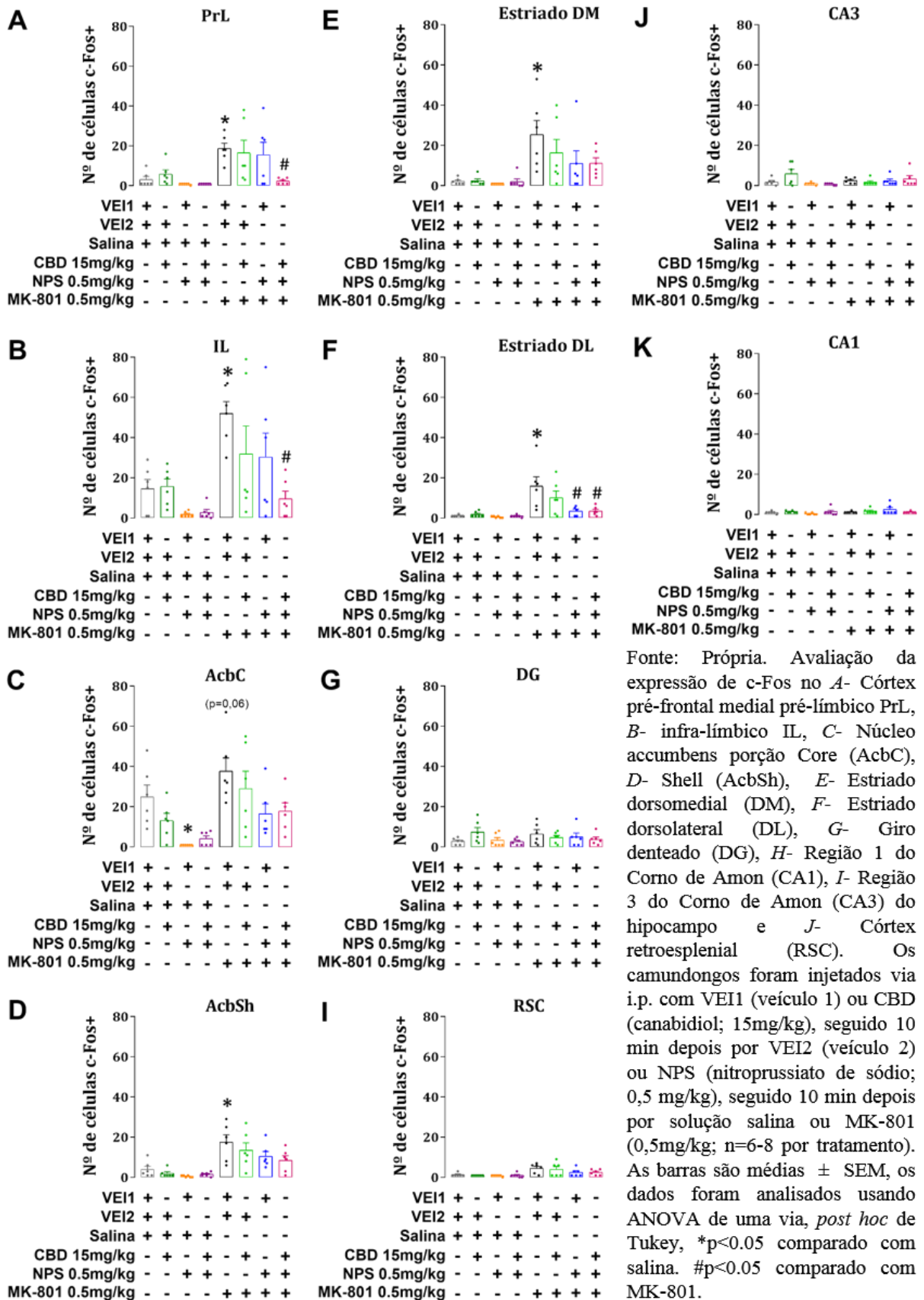
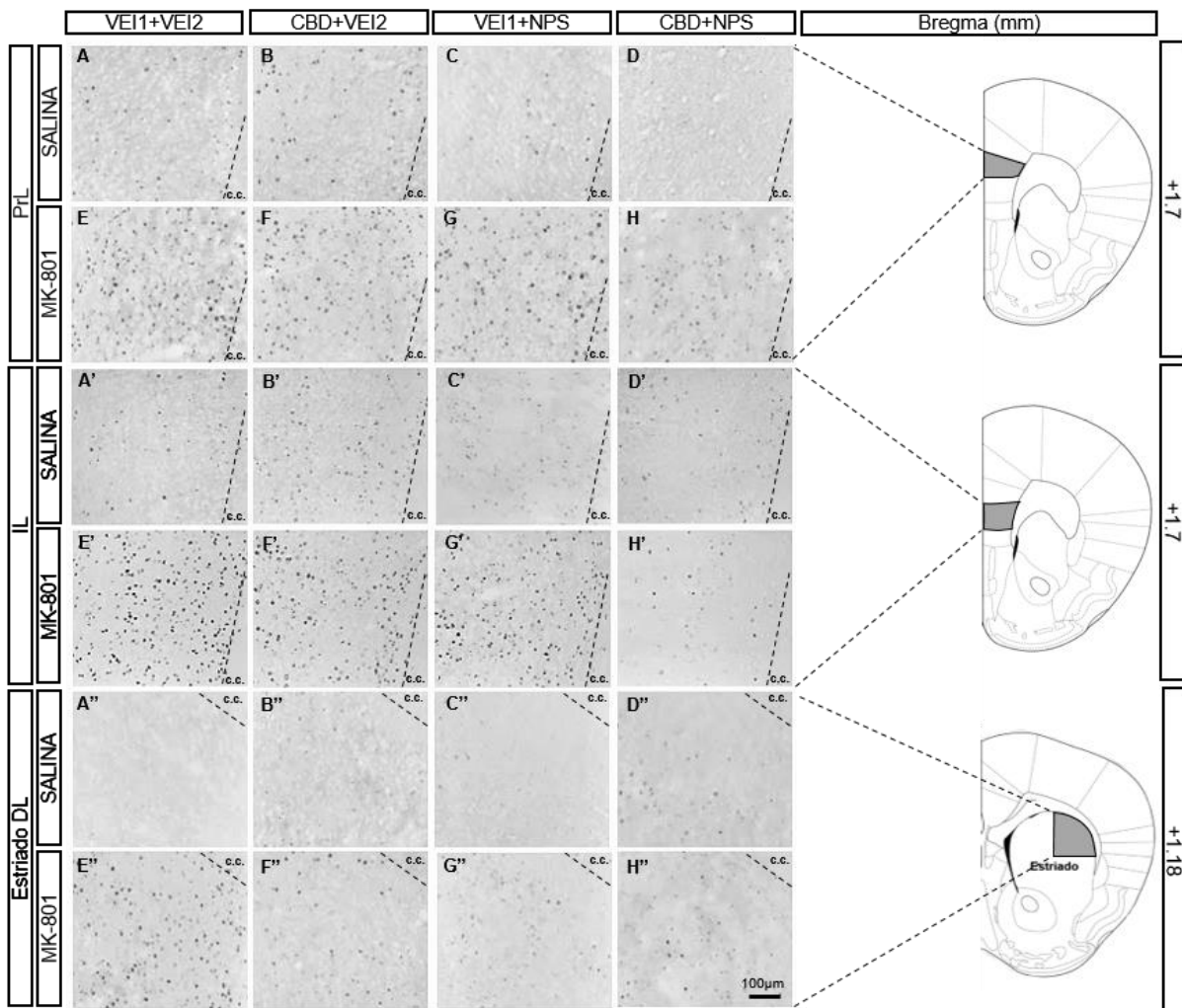


Figura 15- Representação da expressão de c-Fos no Córtex pré-frontal e Estriado DL



Fonte: própria. Fotomicrografias mostrando células c-FOS+ no córtex pré-frontal medial (A-H, A'-H') região PrL (pré-límbica; A-H) e IL (infralímbica; A'-H') e no estriado DL (dorsolateral; A''-H'') de animais tratados via ip com VEI1 (veículo1; 1% DMSO, 2% Tween80 e 97% solução salina), VEI2 (veículo 2; solução salina) e salina, (A, A' e A''); CBD (Cannabidiol; 15mg/kg), VEI2 e salina (B, B' e B''); VEI1, NPS (Nitroprussiato de Sódio; 0,5mg/kg) e salina (C, C' e C''); CBD (15mg/kg), NPS (0,5mg/kg) e salina (D, D' e D''); VEI1, VEI2 e MK-801 (0,5mg/kg; E, E' e E''); CBD (15mg/kg), VEI2 e MK-801 (0,5mg/kg; F e F''); VEI1, NPS (0,5mg/kg) e MK-801 (0,5mg/kg; G, G' e G''); CBD (15mg/kg), NPS (0,5mg/kg) e MK-801 (0,5mg/kg; H, H' e H''). Barra = 100 µm. Ampliação objetiva 20X.

4.3.1.2 AcbC e AcbSh

A anova de variância mostrou alteração significativa do número de núcleos neuronais positivamente marcados para a proteína c-Fos no AcbC [$F_{7,40} = 5,670$, $p = 0,0001$]. A análise

post hoc revelou um efeito marginal nos animais tratados com MK-801 (0,5mg/kg; Tukey, $p = 0,065$;

Figura 14C). Esse aumento marginal não foi prevenido pelo pré-tratamento com CBD (15mg/kg) e NPS (0,5mg/kg) associados. Quanto ao AcbSh, o tratamento com MK-801 aumentou o número de células positivas para c-Fos [$F_{7, 40} = 7,458$, $p < 0,0001$; $p = 0,0036$]. Novamente, o pré-tratamento com a associação de drogas não preveniu esse aumento (Tukey, $p < 0,05$;

Figura 14D).

4.3.1.3 Estriado DM e DL

A análise de variância revelou alteração significativa da expressão de c-Fos entre os tratamentos no estriado DM [$F_{7,40} = 4, 137$, $p = 0,0017$] e DL [$F_{7, 39} = 6,509$, $p < 0,0001$]. O MK-801 (0,5mg/kg) levou a um aumento no número de núcleos imunorreativos para c-Fos tanto na porção DM (Tukey, $p = 0,0097$;

Figura 14E) e DL (Tukey, $p = 0,0005$;

Figura 14F). O pré-tratamento com CBD (15mg/kg) e NPS (0,5mg/kg) não produziu uma atenuação significativa de c-Fos induzido por MK-801 no estriado DM (Tukey, $p < 0,05$). Em contrapartida, esse aumento foi prevenido pelo pré-tratamento com NPS (0,5mg/kg) e pela associação de CBD (15mg/kg) e NPS (0,5mg/kg) no DL (Tukey, $p < 0,05$;

Figura 15A''-H'').

4.3.1.4 DG

A análise de variância não revelou alteração significativa da expressão da proteína c-Fos entre os tratamentos [$F_{7, 40} = 1,316$, $p = 0,2682$] (

Figura 14G).

4.3.1.5 CA1 e CA3 do hipocampo dorsal

A análise de variância não revelou alteração significativa do número de núcleos neuronais marcados pela imuno-histoquímica para a proteína c-Fos na região CA1 [$F_{7, 40} = 1,446$, $p = 0,2146$] (

Figura 14H) e CA3 [$F_{7, 40} = 2,125$, $p = 0,0629$] (

Figura 14I) do hipocampo dorsal.

4.3.1.6 RSC

A análise de variância revelou alteração significativa do número de núcleos neuronais marcados pela imuno-histoquímica para a proteína c-Fos [$F_{7, 40} = 3,786$, $p = 0,0031$], entretanto, o post hoc não tenha detectado diferença significativa entre os animais que receberam VEH1, VEI2 e MK-801 (0,5mg/kg) quando comparados aos animais VEH1, VEI2 e salina (

Figura 14J).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar se o CBD e NPS associados previnem as alterações promovidas pelo MK-801 nos testes de PPI e actímetro assim como na expressão induzida da proteína c-Fos em regiões límbicas do tecido nervoso central. O MK-801 causou prejuízo no teste de PPI e aumento de células positivas para c-Fos no córtex pré-frontal medial, no estriado e no núcleo *accumbens*. O CBD e o NPS isoladamente ou em associação não alteraram o desempenho dos animais no teste de PPI e na resposta de sobressalto ao pulso. A associação de doses não terapêuticas de CBD e NPS não preveniu as alterações comportamentais induzidas pelo MK-801 no ensaio de PPI e actímetro. Em contrapartida, essa associação impediu o aumento na expressão de c-Fos no córtex pré-frontal medial e no estriado dorsolateral.

5.1 MODELO DO DESENHO EXPERIMENTAL

É sabido na literatura que roedores expostos a antagonistas glutamatérgicos, como o MK-801, apresentam uma série de alterações comportamentais que mimetizam os sintomas da esquizofrenia em humanos (ADLER *et al.*, 1999; KRYSTAL *et al.*, 1994; LAHTI *et al.*, 1995; MALHOTRA *et al.*, 1997). Estas são decorrentes da hipofunção do receptor NMDA, proposta para desempenhar um papel importante na fisiopatologia desse transtorno e alvo de novas estratégias para seu tratamento (NAKAZAWA; SAPKOTA, 2020; WU; HUANG; WU, 2021). A ação de antagonistas de receptores NMDA em modelos animais dão robustez a hipótese glutamatérgica da esquizofrenia, já que induzem manifestações comportamentais como alteração na atividade locomotora (CHEN *et al.*, 2022), estereotípias (PENG *et al.*, 2022), deficiências no processamento de informações, prejuízos cognitivos (KOSTYALIK *et al.*, 2022) e na interação social (SALMANI *et al.*, 2022), conferindo validade a esse modelo farmacológico para o estudo da neurobiologia da esquizofrenia na área básica.

Nesse sentido, conforme mencionado, o MK-801, foi o fármaco escolhido para a condução dos ensaios deste estudo, já que mimetiza uma série de alterações comportamentais relacionados a sintomatologia da esquizofrenia. Como resultados, observamos que a aplicação aguda de MK-801 prejudicou o desempenho dos camundongos submetidos ao teste de PPI,

sem qualquer modificação da amplitude de sobressalto. Estes resultados são consistentes com outros estudos que indicam alteração no teste de PPI, mas não no reflexo de sobressalto, após o tratamento agudo com MK-801 (CORTEZ *et al.*, 2022; ISSY *et al.*, 2020; PEDRAZZI *et al.*, 2021b) e crônico intermitente (GOMES *et al.*, 2015a, 2015b). O PPI é uma ferramenta útil para avaliar os mecanismos envolvidos no processamento de informações, deficiente em pacientes com esquizofrenia, e é frequentemente utilizado como uma ferramenta robusta para a investigação de fármacos com perfil antipsicótico (CORTEZ *et al.*, 2022; FREE *et al.*, 2022). Assim, o PPI apresenta validade preditiva, ao passo que seu comprometimento pode ser prevenido por fármacos antipsicóticos típicos e atípicos, tanto em humanos portadores do transtorno, quanto em modelos farmacológicos conduzidos em roedores (KAYGISIZ *et al.*, 2022). A inibição do reflexo de sobressalto mediante a um estímulo de menor intensidade que precede o pulso de maior intensidade é regulada por circuitos do prosencéfalo, como hipocampo, amígdala, núcleo *accumbens* e córtex pré-frontal medial (FENDT; LI; YEOMANS, 2001; KOCH; SCHNITZLER, 1997).

Já o teste de actímetro permite uma avaliação de diversos parâmetros do comportamento motor dos roedores, que abrange a locomoção, movimentos horizontais, movimentos verticais e comportamentos estereotipados (andar em círculos, cheirar, lambe, morder, roer e *grooming*; MAO *et al.*, 2021). Em nosso estudo foi observada uma diminuição da atividade locomotora no teste do actímetro, condizente com estudos que mostram que as alterações comportamentais induzidas pelo tratamento agudo com MK-801 estão relacionadas à atividade locomotora (CHEN *et al.*, 2022). Tais comportamentais dos animais são selecionados para avaliar sintomas do tipo positivo da esquizofrenia (BOUET *et al.*, 2021).

Dados da literatura mostram um efeito bifásico a respeito das alterações na locomoção induzidas pelo MK-801, enquanto em parte dos estudos é observado indução de hiperlocomoção (ANDRADE *et al.*, 2021; CORTEZ *et al.*, 2022; MAO *et al.*, 2021), em outros é mencionado uma hipolocomoção (ZHAO *et al.*, 2022) após o tratamento com este fármaco. Estudos pioneiros de Starr e colaboradores (1994) mostraram que camundongos tratados agudamente com MK-801 apresentaram hiperlocomoção em doses baixas (0,2-0,4 mg/kg) e hipolocomoção e ataxia em altas doses (1,6 mg/kg), enquanto o CGP 40116, antagonista competitivo do receptor NMDA, suprimiu o comportamento motor dependente da dose (STARR; STARR, 1994). Mao e seu grupo (2021) observaram que a aplicação de MK-801 em camundongos promoveu hiperlocomoção, bem como dos comportamentos estereotipados, os quais foram atenuados pela administração do antipsicótico atípico clozapina e guanosina. Em estudo recente de Zhao e seu grupo (2022), camundongos foram submetidos ao

tratamento crônico com MK-801, na mesma dose utilizada em nosso estudo (0,5 mg/ kg), por 5 dias. O MK-801 além de induzir hipolocomoção, induziu déficits sociais e alterações moleculares (ZHAO *et al.*, 2022). Todas essas alterações induzidas pelo MK-801 foram atenuadas pela administração de sevoflurano, um fármaco volátil comumente utilizado para anestesia geral inalatória (ZHAO *et al.*, 2022). Estes estudos sugerem que o MK-801 apresenta efeito bifásico, que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela concentração utilizada e o tempo entre a administração e o ensaio.

5.2 EFEITOS DO CBD

Long e colaboradores (2006) observou em seu estudo que o MK-801 (0,3–1 mg/kg ip) interrompeu o PPI de forma dose dependente enquanto o CBD (5 mg/kg i.p.) reverteu com sucesso o prejuízo induzido pelo MK-801 (1 mg/kg i.p.), assim como o antipsicótico atípico clozapina (4 mg/kg ip), no qual foi utilizado como controle positivo. Esse foi o primeiro relato de que o CBD poderia restaurar os déficits no processamento de informações induzidos por um fármaco psicotomimético, como é o caso do MK-801 (LONG; MALONE; TAYLOR, 2006). Entretanto, o perfil antipsicótico do CBD já havia sido descrito em outras abordagens, sobretudo em manipulações farmacológicas que investigaram os efeitos do aumento da neurotransmissão dopaminérgica em distintos comportamentos associados sobretudo aos sintomas positivos da esquizofrenia. Como exemplo, o CBD foi capaz de prevenir a estereotipia, secreção de prolactina e ptose da pálpebra, induzidos por apomorfina em ratos, assim como a hiperlocomoção induzida por anfetamina em camundongos submetidos ao campo aberto (ZUARDI; ANTUNES RODRIGUES; CUNHA, 1991; MOREIRA E GUIMARÃES, 2005). O CBD é o principal e mais abundante constituinte não psicotomimético da planta *Cannabis sativa*, capaz de reverter, em humanos saudáveis, os efeitos do THC, o principal psicotomimético desta planta (BHATTACHARYYA *et al.*, 2010; KARNIOL *et al.*, 1974; ZUARDI *et al.*, 1982). Gomes e colaboradores (2015) descreveram a capacidade do tratamento crônico de 28 dias com CBD (30 e 60 mg/kg) em prevenir o prejuízo no teste de PPI, atenuar a expressão de FosB/ Δ FosB no CPFm (GOMES *et al.*, 2015a) e alterações gliais (GOMES *et al.*, 2015b) induzidas pelo tratamento crônico com MK-801 (0,5 mg/kg) em camundongos. Uma visão geral da aplicação de CBD e suas concentrações no teste de PPI é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4- Uma Visão Geral da aplicação de CBD e as concentrações usadas no teste de PPI

| Animal | Dose de CBD (mg/kg) | Aplicação | Efeito motor do CBD | Resposta no teste de PPI | | | Intensidade (dB) | Intervalo tratamento e teste | Autores |
|---------------------|---------------------|-----------|---------------------|--------------------------|-----------|-----------------------------|------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | | | | Tratamento (mg/kg) | Efeito | Pré-tratamento (CBD; mg/kg) | | | |
| Camundongo Suíço | 5 ip | Agudo | (-) | MK-801 1 mg/kg | Prejuízo | Atenuou | 3, 6 e 12 | 20 min | Long <i>et al.</i> , 2006 |
| Camundongo Suíço | 30 e 60 ip | Agudo | (-) | Anfetamina 10 mg/kg | Prejuízo | Atenuou | 80, 85 e 90 | 30 min | Pedrazzi <i>et al.</i> , 2015 |
| Camundongo Suíço | 30 e 60 ip | Agudo | (-) | Anfetamina 5 mg/kg | Prejuízo | Atenuou | 80, 85 e 90 | 24 horas | Pedrazzi <i>et al.</i> , 2021 |
| Camundongo Suíço | 30 e 60 ip | Agudo | (-) | MK-801 0,5 mg/kg | Prejuízo | Atenuou | 80, 85 e 90 | 24 horas | |
| Camundongo C57BL/6J | 1, 5 e 50 ip | Agudo | (-) | - | - | Aumentou | 4, 82 e 86 | 20 min | Long <i>et al.</i> , 2010 |
| Camundongo C57BL/6J | 30 e 60 ip | Crônico | (-) | MK-801 1 mg/kg | Prejuízo | Atenuou | 80, 85 ou 90 | 24 horas | Gomes <i>et al.</i> , 2015 |
| Camundongo C57BL/6J | 20 ip | Crônico | (-) | - | - | Prejuízo | 70, 75 e 80 | - | Schleicher <i>et al.</i> , 2019 |
| Camundongo C57BL/6J | 1 ip | Crônico | (-) | - | - | Aumentou | 4, 82 e 86 | 20 min | Long <i>et al.</i> , 2010 |
| Rato HIVtg | 1, 10 e 30 ip | Agudo | (-) | - | Prejuízo | Sem alterações | 68, 71 e 77 | 30 min | Roberts <i>et al.</i> , 2021 |
| Ratos SHR | 30 ip | Agudo | (-) | - | Prejuízo | Atenuou | 70, 75 e 80 | 30 min | Levin <i>et al.</i> , 2014 |
| Ratos SHR | 0,5 ip | Crônico | (-) | - | Prejuízo | Atenuou | 70, 75 e 80 | 30 dias | Peres <i>et al.</i> , 2018 |
| Rato Sprague-Dawley | 3, 10 e 30 ip | Agudo | (+) | MK-801 0,3 e 0,6 mg/kg | Prejuízo | Sem alterações | 3, 6 e 12 | 20 min | Gururajan <i>et al.</i> , 2011 |
| Rato Wistar | 10 sc | Agudo | (-) | - | - | Prejuízo | 83 e 91 | 60 min | |
| Rato Wistar | 10 pulm. | Agudo | (+) | - | - | Prejuízo | 83 e 91 | 5 min | Hložek <i>et al.</i> , 2017 |
| Ratos Wistar | 10 oral | Agudo | (+) | - | - | Sem alterações | 83 e 91 | 120 min | |
| Macaco-prego | 60 ip | Crônico | (-) | MK-801 0,02 mg/kg | Prejuízo* | Atenuou | 80 | 20 min | Saletti <i>et al.</i> , 2017 |

CBD, canabidiol; PPI, inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto; SH, espontaneamente hipertensos; HIVtg, transgênico HIV; ip, intraperitoneal; sc, subcutâneo; pulm, pulmonar; (-), ausente; (+), presente. Prejuízo, diminuição da resposta no teste de PPI. Prejuízo*, aumento da resposta no teste de PPI em primatas.

Nossos resultados estão de acordo com estes estudos. O prejuízo induzido pelo MK-801 no teste de PPI não foi observado nos animais que receberam a associação de CBD 60 mg/kg + MK-801 0,5mg/kg. Por tanto, conseguimos replicar essa propriedade do CBD em prevenir as alterações causadas pelo MK-801 nesse contexto. A inibição de pré-pulso refere-se à inibição dos reflexos de sobressalto por um estímulo fraco (pré-pulso) que precede um estímulo de sobressalto forte (pulso; GÓMEZ-NIETO; HORMIGO; LÓPEZ, 2020). Embora o comprometimento do desempenho dos animais no teste de PPI induzido pelo MK-801 ocorreu em todas as intensidades de pré-pulso (aqui avaliadas 80, 85 e 90dB), o efeito do CBD na atenuação desse prejuízo foi observado com os pré-pulsos nas intensidades de 80 e 85 dB, mas não na de 90 dB. Este não é um resultado incomum para esse tipo de teste, e os efeitos de cada droga podem variar de acordo com as intensidades de pré-pulso (para revisões consultar, GÓMEZ-NIETO; HORMIGO; LÓPEZ, 2020; NISHIYAMA; ISOY, 2016). No estudo de Gomes e colaboradores (2015) apesar dos prejuízos induzidos pelo MK-801 ocorrerem em intensidades de pré-pulso de 80 e 85 dB, os efeitos antipsicóticos da clozapina e do CBD foram observados apenas na intensidade de 80 dB. Entretanto, o significado biológico desses efeitos relacionados ao som não é claro, mas a novidade ou o contexto associado ao sinal (pré-pulso) parece ser um fator chave (NISHIYAMA; ISOY, 2016; POJE; FILION, 2021).

Estudos do nosso grupo mostraram que o CBD tem um perfil farmacológico semelhante ao dos antipsicóticos atípicos, reduzindo os sintomas psicóticos em doses que não induzem a catalepsia, um efeito motor extrapiramidal, relacionado à discinesia tardia, comum após a administração de antipsicóticos típicos em pacientes com esquizofrenia (GOMES *et al.*, 2015a; MOREIRA; GUIMARÃES, 2005; ZUARDI; ANTUNES RODRIGUES; CUNHA, 1991) e reduz a catalepsia induzida pelo haloperidol (GOMES; DEL BEL; GUIMARÃES, 2013; SONEGO *et al.*, 2016). O CBD diminuiu episódios psicóticos induzidos pela Levodopa em pacientes acometidos pela doença de Parkinson (ZUARDI *et al.*, 2008) e deficiências motoras e cognitivas induzidas pela reserpina em ratos (PERES *et al.*, 2016). Um ensaio clínico conduzido por Leweke *et al.* (2012) mostrou que o CBD foi eficaz na redução dos sintomas psicóticos em pacientes com esquizofrenia sem causar efeitos colaterais motores e isso foi associado a um aumento nos níveis plasmáticos de AEA (LEWEKE *et al.*, 2012).

Estudos de GUIMARÃES *et al.*, (2004) mostraram que a aplicação aguda de CBD, de forma semelhante à clozapina, aumenta a expressão da proteína Fos no núcleo *accumbens*, mas não no corpo estriado, indicando que o CBD produz ativação neuronal em áreas

mesolímbicas, mas não em áreas de controle motor. Esta característica reforça o potencial do CBD para produzir poucos efeitos motores indesejados. Em concordância com estes estudos é importante ressaltar que os tratamentos com CBD (15, 30 e 60 mg/kg) no presente estudo não alterou a resposta de sobressalto ao pulso, assim como relatado em outros estudos (GOMES *et al.*, 2015a; LONG; MALONE; TAYLOR, 2006; PEDRAZZI *et al.*, 2021). A ausência de alteração na resposta de sobressalto ao pulso se relaciona com a ausência de alterações motoras, relacionadas à ansiedade (QIU *et al.*, 2017), estresse e atenção (DE LA CASA; MENA; RUIZ-SALAS, 2016).

Embora o presente trabalho não tenha explorado os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos do CBD, sabe-se que ele não é um agonista direto dos receptores canabinoides (LAPRAIRIE *et al.*, 2015b; THOMAS *et al.*, 2007), é sintetizado sob demanda a partir de fosfolipídios de membrana, nos neurônios pós-sinápticos, se comporta ativando terminais pré-sinápticos e regulando negativamente a liberação de neurotransmissores, no caso GABA e glutamato (para revisão, PREMOLI *et al.*, 2019). Estudos anteriores indicaram que seus efeitos do tipo antipsicótico CBD poderiam ser mediados pelo aumento dos níveis de AEA em roedores inibindo a atividade enzimática da FAAH (LEWEKE *et al.*, 2012). Em humanos, o CBD não inibe enzimaticamente a FAAH, mas inibe a degradação de AEA pela FAAH indiretamente, impedindo o transporte de AEA da membrana pós-sináptica para a FAAH (ELMES *et al.*, 2015). A melhora clínica visualizada em pacientes com esquizofrenia, que utilizaram CBD, foi relacionada a altos níveis de AEA no líquido (KOETHE *et al.*, 2009). Pacientes em estados prodrômicos de psicose possuíam maiores níveis de AEA no líquido do que pessoas saudáveis, os quais estariam associados a um atraso no desenvolvimento de psicose franca (MINICHINO *et al.*, 2019). A liberação de AEA no cérebro pode fornecer inibição retrógrada do estado hiperdopaminérgico mesolímbico, resultando em sintomas positivos reduzidos (MINICHINO *et al.*, 2019).

Outras ações do CBD ainda poderiam estar relacionadas com um aumento da neurogênese em ratos adultos (FOGAÇA *et al.*, 2018; SCHIAVON *et al.*, 2016), com melhora da neuroplasticidade cerebral em humanos (CRIPPA *et al.*, 2018; SAGREDO *et al.*, 2018), o que poderia estar relacionado com seu efeito benéfico do CBD sobre a atenuação dos déficits cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia. Também foi observado que a ativação de receptores PPAR γ pelo CBD estimulou a neurogênese hipocampal, bem como inibiu a astrogliose em um modelo animal de doença de Alzheimer (ESPOSITO *et al.*, 2011) e preveniu a discinesia orofacial induzida por haloperidol. Possui propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras (DOS-SANTOS-PEREIRA *et al.*, 2020; GIULIANO *et al.*,

2021; PEREZ *et al.*, 2021; SONEGO *et al.*, 2018). Além disso, facilita a neurotransmissão mediada pelos receptores 5-HT_{1A} (FOGAÇA; CAMPOS; GUIMARÃES, 2016), inibe a captação de adenosina (LIOU *et al.*, 2008; NICHOL *et al.*, 2019) e modula alostericamente a atividade dos receptores 5-HT₃ (AL KURY *et al.*, 2018; TAVARES *et al.*, 2022) e μ - e δ -opioides (KATHMANN *et al.*, 2006; LIVINGSTON; TRAYNOR, 2018) e interage com receptores TRPV1 (LOUIS-GRAY; TUPAL; PREMKUMAR, 2022; MADASU; ROCHE; FINN, 2015).

Long e pesquisadores (2006) observaram que o pré-tratamento agudo com capsazepina (20 mg/kg ip) impediu a reversão do prejuízo no teste de PPI, induzido por MK-801, pelo CBD (5 mg/kg i.p.), fornecendo evidências preliminares de que os receptores TRPV1 estão envolvidos no perfil antipsicótico do CBD. Da Silva e colaboradores (2020) observaram que a injeção diária de 60 mg/kg de CBD (mesma dose utilizada em nosso estudo) por sete dias, iniciada após o término do tratamento repetido com MK-801 (0.5 mg/kg) por 14 dias, reverteu os déficits induzidos por esse composto nos testes de interação social e reconhecimento de objetos, que respectivamente, têm sido usados para investigar os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, respectivamente. Esses efeitos do CBD foram bloqueados pelo WAY100635 (1 mg/kg), mas não pelo AM251 ou AM630 (ambos 1 mg/kg; RODRIGUES DA SILVA *et al.*, 2020). Isso sugere que o CBD induz efeitos do tipo antipsicótico ativando os receptores 5-HT_{1A} e não CB₁ e CB₂. Em nosso laboratório, investigamos em camundongos os possíveis mecanismos farmacológicos de ação envolvidos com o perfil antipsicótico do CBD no teste de PPI em um modelo do tipo dopaminérgico da esquizofrenia (dados ainda não publicados). Observamos que o pré-tratamento com AM251 (1 mg/kg) bem como com AM630 (1 mg/kg) não bloquearam o efeito preventivo do CBD (30 e 60 mg/kg) ao dano induzido pela anfetamina (5 mg/kg) nesse teste. Em contrapartida, o pré-tratamento com capsazepina (1 mg/kg) e WAY100635 (1 mg/kg) impediram esse efeito benéfico do CBD. Esses estudos sugerem que os mecanismos pelo quais o CBD apresenta efeito antipsicótico podem envolver a ativação dos receptores TRPV1 e 5HT_{1A}.

5.3 EFEITOS DO NPS

Dado que a hipofunção do receptor NMDA é tida como uma das hipóteses da esquizofrenia, drogas que modulam a atividade desse receptor são candidatas ao tratamento

desse transtorno (WU; HUANG; WU, 2021). Muitos efeitos da estimulação do receptor NMDA são mediados pela formação intracelular do relativamente novo segundo mensageiro, o NO, molécula a qual a subprodução está ligada a esse transtorno (DAS *et al.*, 1996, 1998; NAKANO *et al.*, 2010; RAMIREZ *et al.*, 2004). Com base no exposto, drogas que aumentam a atividade nitrérgica pode ser benéfico na esquizofrenia (NASYROVA *et al.*, 2015; PITSIKAS, 2015).

Hallak e colaboradores (2013) sugeriram que o tratamento com NPS, doador de NO, poderia ser eficaz no tratamento da esquizofrenia por meio de sua eventual ação moduladora de receptores NMDA. Uma única aplicação desse fármaco exerceu um efeito protetor ou preventivo em sintomas do transtorno e seus efeitos benéficos apresentaram efeito sustentado, por trinta dias após sua aplicação, apesar de possuir uma meia vida de eliminação curta (quatro horas; HALLAK *et al.*, 2013). Estudos subsequentes desse grupo mostraram que o NPS atuou como agente potencializador do antipsicótico clozapina em pacientes com esquizofrenia (MAIA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2015) melhorando as funções executivas em indivíduos que foram testados através dos testes mnemônicos de *Stroop Color Word Test* (um teste para avaliar a atenção seletiva) e *N-back* (um teste para avaliar a memória de trabalho; (MAIA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2014). Por outro lado, em alguns estudos clínicos posteriores, o NPS não melhorou os sintomas desse transtorno, nem potencializou o efeito de fármacos antipsicóticos (STONE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018, 2019).

Em estudos realizados em modelos animais do tipo esquizofrenia utilizando roedores, o NPS atenuou os déficits de memória e de interação social (TREVLOPOULOU; TOUZLATZI; PITSIKAS, 2016) e de reconhecimento de objetos (BARBOSA; PRADO, 2020), induzidos pela ketamina e preveniu o desenvolvimento de hiperlocomoção, diminuição da interação social e prejuízos no medo condicionado ao contexto apresentados pela linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (um modelo animal utilizado para estudo de sintomas do tipo esquizofrenia; DIANA *et al.*, 2018).

Como altas doses de vasodilatadores, particularmente o NPS, podem causar efeitos sedativos/motores marcantes, analisamos o comportamento motor e exploratório de camundongos controles tratados com NPS no teste de actímetro. Nessa abordagem, a maior dose de NPS (2,5 mg/kg) reduziu a estereotipia e os movimentos horizontais e a menor dose de NPS (0,5 mg/kg) reduziu os movimentos verticais. Para tal, avaliamos se o efeito motor alteraria por si só a amplitude de sobressalto no teste de PPI e observamos que os tratamentos não causaram qualquer alteração nessa resposta. No geral, esses resultados sugerem que, mesmo que o tratamento agudo com NPS possa produzir efeitos motores, isso

não ocorre em seus efeitos sensório-motores.

Resultados do nosso grupo demonstraram que tanto os doadores (SIN-1 e NPS) quanto o inibidor de NO, 7-nitroindazol, de forma dose-depende revertem a ruptura de PPI causada pela anfetamina (ISSY *et al.*, 2018b; ISSY; DEL BEL, 2014b). Issy e colaboradores (2014) observaram em seu estudo que o tratamento agudo com metilfenidato causou prejuízo no teste de PPI, além de induzir um aumento robusto na expressão de c-Fos no córtex cingulado e motor, estriado dorsal, dorsolateral e ventrolateral, núcleo *accumbens* e amígdala basolateral. Além disso, tanto o prejuízo no PPI, quanto o aumento de c-Fos induzido pelo metilfenidato, foi prevenido pelo tratamento com 7-NI (ISSY; DEL BEL, 2014b).

A capacidade dos inibidores da NOS, N^G-nitro - L -arginina metil éster e N(omega)-propil-L-arginina, de bloquear o efeito disruptivo da fenciclidina no teste de PPI também foi demonstrada (KLAMER *et al.*, 2005; KLAMER; ENGEL; SVENSSON, 2004, 2005). Corroborando com esses resultados, observamos que o pré-tratamento com a maior dose de NPS melhorou o desempenho dos animais no teste de PPI quando comparados com os animais que não receberam MK-801. Até onde sabemos, esse é um dado inédito. Ainda assim, é difícil, portanto, excluir se a hipotensão pode ou não ter confundido os efeitos do NPS no teste de PPI.

Em contrapartida, em um estudo de Wang (2019) o NPS (2,5 mg/kg) falhou em melhorar o prejuízo induzido pelo MK-801 nos testes de PPI e labirinto em Y em ratos. No entanto, eles utilizaram ratos Sprague-Dawley e em nosso estudo utilizamos camundongos suíços. Issy e colegas (2018) observaram que o NPS individualmente (2,5, 3,5 ou 4 mg/kg) não impediu o déficit no desempenho dos animais no teste de PPI induzido pelo MK-801 sozinho e também não observou uma interação sinérgica entre doses subeficazes de NPS (1 mg/kg) ou 7NI (1 mg/kg) combinado com clozapina, nessa interrupção. Entretanto, as intensidades de PPI do nosso estudo foram distintas ao do trabalho supracitado (73, 77 e 81 dB). Uma visão geral da aplicação de NPS e suas concentrações em diferentes modelos animais é mostrada na Tabela 5. Novas abordagens são necessárias para melhor elucidar nossa compreensão dos efeitos do NPS em modelos de sintomas do tipo esquizofrenia induzidos por compostos psicotomiméticos.

Tabela 5 – Uma Visão Geral da aplicação de NPS e as concentrações utilizadas no teste de PPI

| Animal | Dose de NPS (mg/kg) | Aplicação | Efeito motor do NPS | Resposta no teste de PPI | | | Intensidade (dB) | Intervalo tratamento e teste | Autores |
|----------------------|---------------------|-----------|---------------------|--------------------------|----------|-----------------------------|------------------|------------------------------|----------------------------|
| | | | | Tratamento (mg/kg) | Efeito | Pré-tratamento (NPS; mg/kg) | | | |
| Camundongo Suíço | 2,5, 3,5 e 4 ip | Agudo | (-) | MK-801 0,5 mg/kg | Prejuízo | Sem alterações | 73, 77 e 81 | 10 min | Issy <i>et al.</i> , 2018 |
| Camundongo Suíço | 2,5 ip | Agudo | (-) | Anfetamina 5 mg/kg | Prejuízo | Atenuou | 73, 77 e 81 | 10 min | |
| Camundongo Suíço | 2,5 ip | Agudo | (-) | Anfetamina 10 mg/kg | Prejuízo | Atenuou | 80, 85 e 90 | 15 min | Issy <i>et al.</i> , 2014 |
| Ratos Sprague-Dawley | 0,3, 1 e 3 ip | Agudo | (-) | - | - | Sem alterações | 85 | 30 min | Wiley <i>et al.</i> , 1997 |
| Ratos Sprague-Dawley | 2,5 ip | Agudo | (-) | MK-801 0,4 mg/kg | Prejuízo | Sem alterações | 75, 80 e 85 | 10 min | Wang <i>et al.</i> , 2019 |

NPS, nitroprussiato de sódio; PPI, inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto; ip, intraperitoneal; (-), ausente. Prejuízo, diminuição da resposta no teste de PPI.

O mecanismo pelo qual o NPS pode reduzir os sintomas psicóticos ainda não está totalmente elucidado. O NPS é um agente vasodilatador de ação rápida e curta e parece estimular a perfusão cerebral e, conseqüentemente, pode aliviar a hipoperfusão cerebral (LEE *et al.*, 2022b; OLESEN; FISCHER; SECHER, 2018), uma característica comum dos pacientes com esquizofrenia (CASAS *et al.*, 2018; ŠIŠKO MARKOŠ *et al.*, 2022; WAKE *et al.*, 2016). Além disso, o NPS parece exercer um efeito tônico na via NMDA-nNOS-cGMP, cuja funcionalidade é comprometida nesse transtorno (HALLAK *et al.*, 2013). Assim, a ativação da enzima sGC, aumento dos níveis de GMPc com facilitação a liberação de glutamato, é o principal mecanismo proposto responsável pelos efeitos biológicos do NO, visto que pacientes portadores de esquizofrenia apresentam diminuição nos metabólitos do NO (CHEN *et al.*, 2020; DJORGEVIČ *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018) e de GMPc (GATTAZ; CRAMER; BECKMANN, 1983b; SHIM; SHUMAN; DUNCAN, 2016), quando comparados com controles saudáveis. Portanto, a prevenção do prejuízo induzido pelo MK-801 nos animais no teste de PPI ocasionada pelo NPS no presente estudo parece envolver o aumento da perfusão cerebral e provocar algum tipo de modulação nos receptores NMDA e na neurotransmissão dopaminérgica ainda a ser desvendada, com aumento dos níveis de NO e seus metabólitos no cérebro.

5.4 EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE CBD E NPS

Visto que tanto o CBD quanto o NPS são fármacos candidatos ao tratamento dos sintomas da esquizofrenia, nós hipotetizamos que a associação de doses subefetivas desses compostos poderia apresentar efeitos promissores em relação. Interações entre os sistemas nitrérgico e canabinóide foram sugeridas em estudos relacionados à ansiedade (LISBOA *et al.*, 2013a; ROOHBAKHSH *et al.*, 2007), indicando que o NO pode estar envolvido nos possíveis efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos dos canabinoides; de catalepsia (RAWLS *et al.*, 2003; SPINA *et al.*, 1998) e hipotermia (RAWLS *et al.*, 2003). Ainda, Azad e colaboradores (2001) demonstraram que os fitocannabinoides requerem produção de NO para produzir hipotermia, enquanto Rawls e colaboradores (2003) observaram hipotermia sinérgica após a injeção com combinações de bloqueadores de NOS e o agonista de CB1, WIN 55212-2 [4,5-dihidro- 2- metil- 4 (4- morfolinilmetil)- 1- (1- naftalenilcarbonil)- 6H- pirrolo [3,2,1ij] quinolin- 6- ona]. Vários estudos também indicaram que o NO e os canabinoides podem estar

envolvidos na aprendizagem e memória dependentes do hipocampo (NASEHI *et al.*, 2010). Além disso, estudos prévios mostraram um efeito associado de doses subefetivas de NPS e CBD em antagonizar os efeitos disruptivos da anfetamina, no teste de PPI, sugerindo que estes sistemas estão envolvidos no efeito comportamental observado (JOÃO FRANCISCO PEDRAZZI CORDEIRO, 2018).

Crippa *et al.* (2015), impulsionaram a ideia do desenho experimental do presente estudo, fornecendo evidências adicionais para que, eventualmente, o uso concomitante de CBD e NPS poderia atenuar ou até mesmo evitar o aparecimento de esquizofrenia. Assim, a última sequência de testes comportamentais na tarefa de actímetro e PPI realizada no presente estudo, utilizou a aplicação de injeções ip da associação entre o NPS e o CBD. Dados na literatura mostraram que a associação de CBD e NPS preveniu o aumento da hiperlocomoção induzida pela ketamina em ratos submetidos ao teste de campo aberto (BARBOSA; PRADO, 2020). Em nosso estudo, essas drogas isoladamente ou em associação não alteraram o reflexo de sobressalto ao pulso. Surpreendentemente, os resultados obtidos no ensaio com MK-801, mostraram que as doses associadas de CBD e NPS não preveniram o prejuízo por essa droga psicotomimética no teste de actímetro e de PPI.

5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-FOS EM REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Além das alterações comportamentais, no presente estudo o MK-801 também provocou alterações na expressão da proteína c-Fos no Córtex Pré-Frontal medial (PrL e IL), Estriado (DM e DL) e Núcleo *accumbens* (AcbC e AcbSh). O gene c-Fos é um gene de expressão primária induzido rapidamente em regiões específicas do SNC frente a estímulos fisiológicos, elétricos, cirúrgicos e farmacológicos (GALLO *et al.*, 2018). Sua expressão está correlacionada com a intensidade do aumento da atividade neuronal, sendo estudado em distúrbios neuropsiquiátricos (GALLO *et al.*, 2018; ISSY *et al.*, 2020; ISSY; DEL BEL, 2014). Assim, a imunohistoquímica para proteína c-Fos é uma ferramenta útil para traçar distinções entre a atividade das classes de antipsicóticos e suas ações na expressão dessa proteína no SNC. Além disso, podem ser utilizados paralelamente para avaliar a ativação cerebral causada pelos antipsicóticos e identificar os possíveis circuitos cerebrais envolvidos em sua ação, bem como sua propensão a causar efeitos colaterais motores (para revisão,

KISS; OSACKA, 2021).

Os mecanismos envolvidos no aumento da expressão de c-Fos no córtex pré-frontal medial e no núcleo *accumbens* induzido pelo MK-801 não são completamente conhecidos. O núcleo *accumbens* constitui a parte límbica dos núcleos da base é uma região envolvida na hiperlocomoção induzida por psicoestimulantes, além de ser um sítio importante para a ação de antipsicóticos (ISSY *et al.*, 2018b; RENARD *et al.*, 2016; VALJENT *et al.*, 2006). Há uma importante conexão entre o núcleo *accumbens* e várias estruturas corticolímbicas, como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (HOLLOWAY *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2022). Corroborando nossos resultados, Andrabi e colegas (2020) observaram um aumento da expressão de c-Fos no córtex pré-frontal após o tratamento com MK-801 (0.2 mg/kg), acompanhado de alteração na força de preensão e na coordenação motora.

Na literatura, já se tem descrito o aumento dos níveis de glutamato após a administração de antagonistas de receptores NMDA tanto em animais (CHOWDHURY *et al.*, 2012; JODO *et al.*, 2005; MOGHADDAM *et al.*, 1997) quanto em humanos (ABDALLAH *et al.*, 2018; STONE *et al.*, 2012). Além disso, um autoanticorpo purificado de pacientes com encefalite NMDA aumentou os níveis de glutamato extracelular no cérebro de roedores (MANTO *et al.*, 2010). Isto sugere ser uma resposta à redução do controle inibitório tônico exercido por interneurônios GABAérgicos positivos para parvalbumina sobre neurônios glutamatérgicos piramidais no córtex pré-frontal medial (DE JONGE *et al.*, 2017; TANG; JAENISCH; SUR, 2021; ZHANG *et al.*, 2021), o que leva à desinibição da atividade desses neurônios glutamatérgicos (GERHARD *et al.*, 2020; PHAM; GARDIER, 2019). Ou seja, o bloqueio dos receptores NMDA pelo MK-801 poderia causar excitação cortical ao interferir neste controle de caráter inibitório dos neurônios glutamatérgicos (ABDALLAH *et al.*, 2018; GERHARD *et al.*, 2020; NAKAZAWA; JEEVAKUMAR; NAKAO, 2017). Por conseguinte, pode contribuir para o aumento da atividade neuronal no córtex pré-frontal medial e no núcleo *accumbens*, refletido no presente estudo pelo aumento da expressão de c-Fos nestas estruturas. Corroborando essa hipótese, estudos de neuroimagem mostraram que a indução de sintomas semelhantes à esquizofrenia por antagonistas de receptores NMDA em indivíduos saudáveis está associada ao aumento da atividade cortical (ANTICEVIC *et al.*, 2015; KNOTT *et al.*, 2015; POLLAK *et al.*, 2015).

A administração de MK-801 também provocou um aumento na expressão da proteína c-Fos no estriado. Em linha com esses resultados, Gomes e colaboradores (2015) observaram um aumento de células positivas para FosB no estriado de camundongos após a administração crônica de MK-801 (0,5 mg/kg). O estriado é uma estrutura subcortical que pertence a um

conjunto de núcleos interconectados denominados núcleos da base (FLORIO *et al.*, 2018). Tanto o estriado dorsolateral quanto o dorsomedial atuam como reguladores críticos dos processos transcricionais subjacentes à formação do hábito (MALVAEZ; WASSUM, 2018), cuja interrupção contribui para os sintomas subjacentes a muitas doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia (GRIFFITHS; MORRIS; BALLEINE, 2014; MORRIS *et al.*, 2015). Ademais, a porção dorsal do estriado está intimamente associada à função sensorio-motora (MCCUTCHEON; ABI-DARGHAM; HOWES, 2019; MESO *et al.*, 2020). A influência do corpo estriado no controle motor depende de duas vias funcionalmente opostas. Enquanto a via direta promove uma desinibição das estruturas-alvo e facilita o movimento, a via indireta leva à inibição do tálamo e do córtex para suprimir o movimento. Os distúrbios motores são frequentemente associados a um desequilíbrio entre essas duas vias (BEVAN, 2021; SILBERBERG; BOLAM, 2015). Essas atividades de transmissão excitatória e inibitória combinadas no SNC são essenciais para o processamento da informação sensorial e da função cognitiva, as quais estão alteradas na esquizofrenia (HAMILTON *et al.*, 2018; MCCUTCHEON; ABI-DARGHAM; HOWES, 2019). A alteração da neurotransmissão glutamatérgica no estriado dorsal pelo bloqueio dos receptores NMDA pode ter um papel importante no comportamento motor. Isso corrobora com os nossos resultados, onde observamos alteração na atividade locomotora nos animais. A oscilação gama aberrante em todo o cérebro do camundongo, incluindo o corpo estriado dorsal, é observada com a administração de MK-801 (HUDSON *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2017). A hiperatividade em camundongos com deficiência da subunidade NR1 específica do estriado está correlacionada com uma redução da oscilação gama do estriado e, curiosamente, a hiperatividade pode ser reduzida pela aplicação de agonistas do receptor D1 ou D2 (OHTSUKA *et al.*, 2008). Logo, a alteração na atividade locomotora e o aumento da expressão de c-Fos observada em nossos animais por hipofunção de receptor NMDA, pode estar associada à alteração do número de receptores de dopamina funcionais, entretanto, examinar as consequências da hipofunção de receptor NMDA específica do tipo de célula no corpo estriado dorsal pode ser necessário para explicar essa alteração da atividade locomotora.

Embora nenhuma alteração na expressão de c-Fos tenha sido observada no hipocampo (regiões CA1, CA3 e DG) e RSC de animais tratados com MK-801, mudanças na expressão molecular dessa família de proteínas foram observadas nessas áreas em animais expostos de forma aguda (GOMES *et al.*, 2015a; ZUO *et al.*, 2009) e repetida à essa droga (GOMES *et al.*, 2015a; ZUO *et al.*, 2009).

Ao contrário dos resultados observados na avaliação comportamental, a associação de

CBD e NPS de forma interessante preveniu o aumento da expressão de c-Fos induzida por MK-801 no córtex pré-frontal PrL e IL e estriado dorsolateral. Esses resultados mostram que esses dois tratamentos têm algum efeito aditivo, ou interação entre os sistemas endocanabinoide e nitrérgico, embora não seja possível, ao momento, explicar plenamente esses resultados. Interações entre esses dois sistemas também foram sugeridas em outras áreas do cérebro como na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e no hipocampo dorsal (LISBOA *et al.*, 2013b; MAKARA *et al.*, 2007; NASEHI *et al.*, 2010; ROOHBAKHSH *et al.*, 2007).

Nos animais que recebem o pré-tratamento com a associação de doses subefetivas de CBD e NPS houve uma diminuição de 77,9% da expressão da proteína c-Fos no estriado dorsolateral comparado com os animais que receberam somente MK-801. Esse efeito não foi observado no estriado dorsomedial. Essas diferenças de Fos entre as sub-regiões do estriado podem também refletir a disparidade funcional, uma vez que a visão de vários subsistemas na função do estriado dorsal já foi proposta (DIVAC; DIEMER, 1980). O corpo estriado do roedor é uma estrutura anatomicamente muito heterogênea e possui múltiplos níveis de organização estrutural relacionados à citoarquitetura, terminação corticais em territórios estriatais específicos e compartimentos neuroquímicos (CHRONISTER *et al.*, 1976). De acordo com Chuhma e colaboradores (2017), o estriado dorso medial estaria principalmente envolvido em regiões associativas, enquanto o estriado dorso lateral em regiões sensório-motora. Ainda, sabe-se que as diferenças na expressão de Fos entre as sub-regiões do estriado dorsal do camundongo podem ser promovidas não apenas por diferentes tipos de fármacos com propriedade antipsicótica, mas também com diferentes doses da mesma droga (ROBERTSON; FIBIGER, 1996; SUZUKI *et al.*, 1998). Entretanto, não é possível explicar, no momento, porque não essa prevenção do aumento da expressão de c-Fos no estriado dorso lateral não foi refletida no comportamento dos animais.

No PrL, IL a associação das drogas causou uma diminuição da expressão de c-Fos em 87,5%, 81,5%, respectivamente, em relação aos animais que receberam somente MK-801. O córtex pré-frontal está implicado em funções relacionadas à execução de tarefas e memória estando envolvido nos sintomas cognitivos e negativos da esquizofrenia. Ensaio comportamentais como o reconhecimento de objetos novos e interação social poderiam melhor ser pareados com os nossos dados moleculares, é de nosso interesse conduzir esses ensaios para melhor elucidar essa questão (BRADY *et al.*, 2019; MAAS; VALLÈS; MARTENS, 2017). Esses testes têm sido amplamente utilizados para estudar alterações relacionadas a sintomas negativos e déficits cognitivos da esquizofrenia (GOMES *et al.*,

2015b). Gomes e colaboradores (2015b) observaram que a administração repetida de MK-801 prejudicou o desempenho nos testes de interação social e reconhecimento de objetos novos e também aumentou o número de astrócitos GFAP-positivos no córtex pré-frontal medial e a porcentagem de células da microglia Iba-1-positivas com um fenótipo reativo no córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal. Tanto o prejuízo comportamental quanto às mudanças na expressão de marcadores gliais induzidas pelo tratamento com MK-801 foram atenuadas pelo tratamento repetido com CBD ou clozapina.

Ainda não está claro na literatura como ocorre a interação entre os sistemas endocanabinoide e nitrérgico e receptores NMDA. Sabe-se que a ativação de receptores NMDA facilita a liberação de endocanabinoides (OHNO-SHOSAKU *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ-MUÑOZ *et al.*, 2016) e aumenta a produção de NO (GLADULICH *et al.*, 2020; OSTADHADI *et al.*, 2016). Os endocanabinoides são liberados dos neurônios de maneira dependente da atividade, agem retrogradamente nos receptores CB1 pré-sinápticos e induzem a supressão da liberação do neurotransmissor a curto ou longo prazo (para revisão, ARAQUE *et al.*, 2017). A liberação de endocanabinóides que ativam receptores CB1 é desencadeada pela ativação pós-sináptica de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem e/ou receptores acoplados a Gq, como os receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I (I-mGluRs; KUSHMERICK *et al.*, 2004; OHNO-SHOSAKU *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2002) e os receptores muscarínicos M1 ou M3 (COLANGELI *et al.*, 2022; FUKUDOME *et al.*, 2004). Esses dados indicam que a ativação dos receptores NMDA facilita a liberação de endocanabinoides isoladamente ou em conjunto com os receptores acoplados a Gq (OHNO-SHOSAKU *et al.*, 2007).

O sistema endocanabinoide está amplamente difundido ao longo do SNC e seus receptores CB1 possuem um papel crucial na prevenção da neurotoxicidade causada pela ativação dos receptores NMDA (PATRICIO-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Portanto, o grande papel fisiológico desse sistema seria de manter as atividades dos receptores NMDA dentro de limites seguros, protegendo as células neurais da excitotoxicidade. Na verdade, seria a própria atividade dos receptores NMDA que forneceria as demandas necessárias dos endocanabinoides para controlar seus canais de cálcio (TADIJAN *et al.*, 2022). Interessantemente, a AEA, além de CB1, também pode ativar receptores TRPV1 que poderiam aumentar a liberação de glutamato na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (BACK; CAROBREZ, 2018; ULIANA *et al.*, 2016). Este efeito pode envolver a formação de NO (ZSCHENDERLEIN *et al.*, 2011). Zschenderlein *et al.* (2011) mostraram que na amígdala lateral de camundongos, após estimulação de alta frequência, a ativação dos

receptores TRPV1 pós-sinápticos, facilitou a entrada de Ca^{2+} ativou a nNOS com consequente aumento da produção de NO, resultando em liberação pré-sináptica de glutamato e aumento da potenciação de longo prazo (LTP). De acordo com esse dado, a microinjeção de um antagonista de TRPV1 (capsazepina, 30 nmol) na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos impediu a potencialização dos efeitos pró-aversivos de um doador de NO por uma dose alta (200 pmol) de AEA (LISBOA; GUIMARÃES, 2012). Assim, doses mais altas de AEA poderiam induzir a liberação de glutamato e formação de NO pela ativação de receptores TRPV1.

Por conseguinte, além de aumentar a produção de NO, a ativação de receptores NMDA também pode facilitar a liberação de 2-AG do neurônio pós-sináptico (OHNO-SHOSAKU *et al.*, 2007). No entanto, enquanto o NO aumenta a liberação de glutamato, a AEA pode exercer uma modulação bifásica, com ativação dos receptores CB1 ou TRPV1 levando à redução ou facilitação da liberação de glutamato, respectivamente (RODRÍGUEZ-MUÑOZ *et al.*, 2016). Juntas, essas observações sugerem que as interações entre os sistemas nitrérgico e canabinoide pode ter um efeito aditivo na liberação de glutamato, o que neutralizaria a hipofunção dos receptores NMDA. Entretanto, estudos adicionais são claramente necessários para melhor elucidar esta hipótese.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esquizofrenia é um distúrbio multifacetado e é improvável que um único fármaco trate adequadamente todas as suas manifestações. Até o momento, os tratamentos medicamentosos disponíveis se concentraram na tentativa de restaurar o estado hiperdopaminérgico que ocorre nesse transtorno. Essa abordagem é claramente insuficiente na maioria dos pacientes e provavelmente reflete a fisiopatologia multifatorial dessa condição. Uma abordagem complementar seria atuar em vários alvos envolvidos em distúrbios complexos (LEUCHT *et al.*, 2013).

Embora os estudos farmacológicos com animais não reflitam necessariamente a fisiopatologia e efeitos de drogas no cérebro humano, esses resultados sugerem que o MK-801 e o teste de PPI representa uma ferramenta apropriada para investigar novos compostos com potencial atividade antipsicótica.

O CBD e o NPS mostraram ser efetivos na prevenção do prejuízo induzido pelo MK-801 no teste de PPI. Esses dados reforçam a proposta de que o CBD, bem como o NPS, pode induzir efeitos semelhantes aos antipsicóticos. O número de estudos que investigaram diretamente uma possível interação entre esses dois sistemas é escasso, especialmente na área comportamental. Embora a associação desses fármacos não atenuou a deficiência causada pelo MK-801 nos testes comportamentais, preveniu alterações a nível molecular. Nossos resultados sugerem que essa interação é complexa, cujos os mecanismos envolvidos não são completamente claros, mas podem depender da interferência na neurotransmissão mediada por glutamato. Portanto, mais estudos farmacológicos são com uma ampla faixa de concentração de drogas que interferem com os sistemas canabinoides e nitrérgicos são necessários para entender melhor a interação desses sistemas. Estes resultados são relevantes para a compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na esquizofrenia, ampliando o conhecimento sobre a participação desses sistemas nessa condição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABDALLAH, C. G. *et al.* The effects of ketamine on prefrontal glutamate neurotransmission in healthy and depressed subjects. **Neuropsychopharmacology** **2018** **43:10**, v. 43, n. 10, p. 2154–2160, 2018.
- ADELINO, M. P. M. *et al.* Treatment-resistant schizophrenia – A RCT on the effectiveness of repeated-dose sodium nitroprusside. **Schizophrenia Research**, v. 231, p. 70–72, 2021.
- ADLER, C. M. *et al.* Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 10, p. 1646–1649, 1999.
- ALBAYRAM, Ö.; PASSLICK, S.; BILKEI-GORZO, A.; ZIMMER, A.; STEINHÄUSER, C. Physiological impact of CB1 receptor expression by hippocampal GABAergic interneurons. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 468, n. 4, p. 727–737, 2016.
- AL KURY, L. T.; MAHGOUB, M.; HOWARTH, F. C.; OZ, M. Natural Negative Allosteric Modulators of 5-HT₃ Receptors. **Molecules** **2018**, Vol. **23**, Page **3186**, v. 23, n. 12, p. 3186, 2018.
- ANDRABI, S. S. *et al.* Clozapine Improves Behavioral and Biochemical Outcomes in a MK-801-Induced Mouse Model of Schizophrenia. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 39, n. 1, p. 1–12, 2020.
- ANDRADE, Y. C. P. *et al.* Effects of JL13, a pyridobenzoxazepine compound, in dopaminergic and glutamatergic models of antipsychotic activity. **Behavioural pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 2–8, 2021.
- ANTICEVIC, A. *et al.* N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Effects on Prefrontal Cortical Connectivity Better Model Early Than Chronic Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 6, p. 569–580, 2015.
- ANTONAZZO, M.; GOMEZ-URQUIJO, S. M.; UGEDO, L.; MORERA-HERRERAS, T. Dopaminergic denervation impairs cortical motor and associative/limbic information processing through the basal ganglia and its modulation by the CB1 receptor. **Neurobiology of Disease**, v. 148, 2021.
- ARAQUE, A.; CASTILLO, P. E.; MANZONI, O. J.; TONINI, R. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 13–24, 2017.
- ASO, E. *et al.* Adenosine A_{2A}-Cannabinoid CB₁ Receptor Heteromers in the Hippocampus: Cannabidiol Blunts Δ 9-Tetrahydrocannabinol-Induced Cognitive Impairment. 2019.
- AZAD, S. C. *et al.* Differential role of the nitric oxide pathway on Δ 9-THC-induced central nervous system effects in the mouse. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 561–568, 2001.
- BACK, F. P.; CAROBREZ, A. P. Periaqueductal gray glutamatergic, cannabinoid and vanilloid receptor interplay in defensive behavior and aversive memory formation. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 399–411, 2018.
- BALU, D. T. The NMDA Receptor and Schizophrenia. From Pathophysiology to Treatment. **Advances in Pharmacology**, v. 76, p. 351–382, 2016.
- BANSAL, V.; CHATTERJEE, I. Role of neurotransmitters in schizophrenia: a comprehensive study.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Kuwait Journal of Science, v. 48, n. 2, p. 1–27, 2021.

BARBOSA, D.; PRADO, D. A. Efeitos de doses repetidas do nitroprussiato de sódio ou do canabidiol no período de maturação cerebral em um modelo animal de esquizofrenia. 2020.

BEVAN, M. D. Motor Control: A Basal Ganglia Feedback Circuit for Action Suppression. **Current Biology**, v. 31, n. 4, p. R191–R193, 2021.

BHATTACHARYYA, S. *et al.* Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 764–774, 2010.

BIALOŃ, M. *et al.* 1MeTIQ and olanzapine, despite their neurochemical impact, did not ameliorate performance in fear conditioning and social interaction tests in an MK-801 rat model of schizophrenia. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 2, p. 490–505, 2021.

BIANCHI, M. *et al.* Electron-Microscopy-Based Epitope Mapping Defines Specificities of Polyclonal Antibodies Elicited during HIV-1 BG505 Envelope Trimer Immunization. **Immunity**, v. 49, n. 2, p. 288–300.e8, 2018.

BIOQUE, M. *et al.* Clozapine and paliperidone palmitate antipsychotic combination in treatment-resistant schizophrenia and other psychotic disorders: A retrospective 6-month mirror-image study. **European Psychiatry**, v. 63, n. 1, p. e71, 2020.

BLOKHIN, I. O.; KHORKOVA, O.; SAVEANU, R. v.; WAHLESTEDT, C. Molecular mechanisms of psychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 146, 2020.

BORGWARDT, S. J. *et al.* Neural Basis of Δ -9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol: Effects During Response Inhibition. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 11, p. 966–973, 2008.

BOUET, V. *et al.* A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors. **Schizophrenia Research**, v. 228, p. 519–528, 2021.

BRADY, R. O. *et al.* Cerebellar-Prefrontal Network Connectivity and Negative Symptoms in Schizophrenia. **The American journal of psychiatry**, v. 176, n. 7, p. 512–520, 2019.

BRANDÃO-TELES, C.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; GUEST, P. C.; CASSOLI, J. S. MK-801-Treated Oligodendrocytes as a Cellular Model to Study Schizophrenia. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 974, p. 269–277, 2017.

BROWN, H. E. *et al.* Efficacy and Tolerability of Adjunctive Intravenous Sodium Nitroprusside Treatment for Outpatients With Schizophrenia: A Randomized Clinical Trial. **JAMA psychiatry**, v. 76, n. 7, p. 691–699, 2019.

BUJAS-BOBANOVIC, M.; BIRD, D. C.; ROBERTSON, H. A.; DURSUN, S. M. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 5, p. 1005, 2000.

BURSTEIN, E. S. Relevance of 5-HT_{2A} Receptor Modulation of Pyramidal Cell Excitability for Dementia-Related Psychosis: Implications for Pharmacotherapy. **CNS Drugs** 2021 **35:7**, v. 35, n. 7, p. 727–741, 2021.

BUTLER, J. L.; BARHAM, B. J.; HEIDENREICH, B. A. Comparison of indirect peroxidase and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemical staining procedures for c-fos in rat brain. **Journal of Anatomy**, v. 234, n. 6, p. 936–942, 2019.

CAMPOS, A. C. *et al.* Plastic and neuroprotective mechanisms involved in the therapeutic effects of cannabidiol in psychiatric disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 269, 2017.

- CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 2, p. 223–230, 2008. em: 1 dez. 2022.
- CARACI, F. *et al.* New antipsychotic drugs for the treatment of agitation and psychosis in Alzheimer's disease: focus on brexpiprazole and pimavanserin. **F1000Research**, v. 9, 2020.
- CASAS, B. S. *et al.* hiPSC-derived neural stem cells from patients with schizophrenia induce an impaired angiogenesis. **Translational Psychiatry**, v. 8, p. 48, 2018.
- CHEN, D. J.; GAO, M.; GAO, F. F.; SU, Q. X.; WU, J. **Brain cannabinoid receptor 2: Expression, function and modulation** *Acta Pharmacologica Sinica* Nature Publishing Group, 2017.
- CHENG, C. H.; CHAN, P. Y. S.; HSU, S. C.; LIU, C. Y. Meta-analysis of sensorimotor gating in patients with autism spectrum disorders. **Psychiatry Research**, v. 262, p. 413–419, 2018.
- CHEN, J.; ZHANG, M.; ZHOU, C.; DING, Y.; FAN, N.; HE, H. Association Analysis of Neuronal Nitric Oxide Synthase 1 Gene Polymorphism With Psychopathological Symptoms in Chronic Ketamine Users. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, p. 1457, 2020.
- CHEN, P. A.; WANG, H. Y.; SUN, C. L.; CHEN, M. L.; CHEN, Y. C. Neurobehavioral Differences of Valproate and Risperidone on MK-801 Inducing Acute Hyperlocomotion in Mice. **Behavioural Neurology**, v. 2022, 2022.
- CHONG, H. Y. *et al.* Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 12, p. 357, 2016.
- CHOUINARD, G. *et al.* Antipsychotic-Induced Dopamine Supersensitivity Psychosis: Pharmacology, Criteria, and Therapy. **Psychotherapy and Psychosomatics**, v. 86, n. 4, p. 189–219, 2017.
- CHOWDHURY, G. M. *et al.* Spectroscopy Measures of Ketamine's Effect on Amino Acid Neurotransmitter Metabolism. **Biol Psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 1022–1025, 2012.
- CHRONISTER, R. B.; FARNELL, K. E.; MARCO, L. A.; WHITE, L. E. The rodent neostriatum: A golgi analysis. **Brain Research**, v. 108, n. 1, p. 37–46, 1976.
- CHUNG, L. A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal. **Development & Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 61, 2015.
- CIEŚLIK, P. *et al.* Nitric Oxide-Dependent Mechanisms Underlying MK-801- or Scopolamine-Induced Memory Dysfunction in Animals: Mechanistic Studies. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, 2021.
- COLANGELI, R. *et al.* 2-AG-mediated Control of GABAergic Signaling is Impaired in a Model of Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, p. JN-RM-0541-22, 2022.
- CONNORS, M. H.; AMES, D.; WOODWARD, M.; BRODATY, H. Psychosis and Clinical Outcomes in Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 304–313, 2018.
- CORREA, A. M. B.; GUIMARÃES, J. D. S.; DOS SANTOS E ALHADAS, E.; KUSHMERICK, C. Control of neuronal excitability by Group I metabotropic glutamate receptors. **Biophysical Reviews** 2017 9:5, v. 9, n. 5, p. 835–845, 2017.
- CORTEZ, I. L. *et al.* HU-910, a CB2 receptor agonist, reverses behavioral changes in pharmacological rodent models for schizophrenia. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 117, 2022.

- CRIPPA, J. A.; GUIMARÃES, F. S.; CAMPOS, A. C.; ZUARDI, A. W. Translational investigation of the therapeutic potential of cannabidiol (CBD): Toward a new age. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2009, 2018.
- CRIPPA, J.; HALLAK, J.; ABILIO, V.; DE LACERDA, A.; ZUARDI, A. Cannabidiol and Sodium Nitroprusside: Two Novel Neuromodulatory Pharmacological Interventions to Treat and Prevent Psychosis. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 8, p. 970–978, 2015.
- CRUNFLI, F. *et al.* What Can We Learn from Animal Models to Study Schizophrenia? **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1400, p. 15–33, 2022.
- CSORDAS, A.; BERNHARD, D. The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke. **Nature reviews. Cardiology**, v. 10, n. 4, p. 219–230, 2013.
- CUMMINGS, J. *et al.* Pimavanserin: Potential Treatment For Dementia-Related Psychosis. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, v. 5, n. 4, p. 253–258, 2018.
- DAS, I.; KHAN, N. S.; PURI, B. K.; HIRSCH, S. R. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. **Neuroscience Letters**, v. 215, n. 3, p. 209–211, 1996.
- DAS, I.; RAMCHAND, C. N.; GLIDDON, A.; HIRSCH, S. R. Nitric Oxide, Free Radicals and Polyamines May Have a Role in the Membrane Pathology of Schizophrenia. **Neuropsychobiology**, v. 37, n. 2, p. 65–67, 1998.
- DAVIS, M.; GENDELMAN, D. S.; TISCHLER, M. D.; GENDELMAN, P. M. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. **Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 791–805, 1982.
- DEAN, L. Schizophrenia. **Medical Genetics Summaries**, 1173–1184, 2017.
- DEFELIPE, J. *et al.* New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 202–216, 2013.
- DE JONGE, J. C.; VINKERS, C. H.; HULSHOFF POL, H. E.; MARSMAN, A. GABAergic mechanisms in schizophrenia: Linking postmortem and In vivo studies. **Frontiers in Psychiatry**, v. 8, p. 118, 2017.
- DE LA CASA, L. G.; MENA, A.; RUIZ-SALAS, J. C. Effect of stress and attention on startle response and prepulse inhibition. **Physiology & Behavior**, v. 165, p. 179–186, 2016.
- DELAHAUT, P. Immunisation – Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. **Methods**, v. 116, p. 4–11, 2017.
- DE OLIVEIRA, J. P. M. *et al.* Targeting the NMDA receptor-nitric oxide-cyclic GMP pathway to develop non-dopaminergic antipsychotic medications for schizophrenia. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 223–224, 2011.
- DE OLIVEIRA, R. P.; NAGAISHI, K. Y.; BARBOSA SILVA, R. C. Atypical antipsychotic clozapine reversed deficit on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex produced by microinjection of DOI into the inferior colliculus in rats. **Behavioural brain research**, v. 325, n. Pt A, p. 72–78, 2017.
- DE PETROCELLIS, L. *et al.* Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1479–1494, 2011.
- DE SOUZA CRIPPA, J. A. *et al.* Effects of Cannabidiol (CBD) on Regional Cerebral Blood Flow. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 417–426, 2004.

DIANA, M. C. *et al.* Sodium nitroprusside is effective in preventing and/or reversing the development of schizophrenia-related behaviors in an animal model: The SHR strain. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 24, n. 7, p. 624–632, 2018.

DIVAC, I.; DIEMER, N. H. Prefrontal system in the rat visualized by means of labeled deoxyglucose—further evidence for functional heterogeneity of the neostriatum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 190, n. 1, p. 1–13, 1980.

DJORGEVIČ, V. *et al.* Diagnostic Accuracy of Brain-derived Neurotrophic Factor and Nitric Oxide in Patients with Schizophrenia: A pilot study. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 7, 2016.

DOS-SANTOS-PEREIRA, M.; GUIMARÃES, F. S.; DEL-BEL, E.; RAISMAN-VOZARI, R.; MICHEL, P. P. Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF- κ B-dependent signaling and glucose consumption. **Glia**, v. 68, n. 3, p. 561–573, 2020.

DUBEY, H.; GULATI, K.; RAY, A. Amelioration by nitric oxide (NO) mimetics on neurobehavioral and biochemical changes in experimental model of Alzheimer's disease in rats. **NeuroToxicology**, v. 66, p. 58–65, 2018.

EBSTEIN, R. P.; BIEDERMAN, J.; RIMON, R.; ZOHAR, J.; BELMAKER, R. H. Cyclic GMP in the CSF of patients with schizophrenia before and after neuroleptic treatment. **Psychopharmacology**, v. 51, n. 1, p. 71–74, 1976.

ELMES, M. W. *et al.* Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 14, p. 8711–8721, 2015.

ENWRIGHT, J. F.; HUO, Z.; ARION, D.; CORRADI, J. P.; TSENG, G.; LEWIS, D. A. Transcriptome alterations of prefrontal cortical parvalbumin neurons in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 7, p. 1606–1613, 2018.

ESPOSITO, G. *et al.* Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. **PLoS one**, v. 6, n. 12, 2011.

Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications - Stephen M. Stahl - Google Livros. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=HkA0Q31YDhAC&oi=fnd&pg=PR7&ots=dXyn06DEQk&sig=9eFITXtkR4mxe4_z7F280omptyU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 2 nov. 2022.

FAKHOURY, M. Role of the Endocannabinoid System in the Pathophysiology of Schizophrenia. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 768-778, 2017.

FENDT, M.; LI, L.; YEOMANS, J. S. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. **Psychopharmacology** 2001 156:2, v. 156, n. 2, p. 216–224, 2001.

FERNANDEZ, A. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Leads to Cortical Under-Connectivity and Cognitive Impairment. **Neuron**, v. 102, n. 6, p. 1127- 1142.e3, 2019.

FITZGERALD, M. L.; MACKIE, K.; PICKEL, V. M. Ultrastructural localization of cannabinoid CB1 and mGluR5 receptors in the prefrontal cortex and amygdala. **Journal of Comparative Neurology**, v. 527, n. 16, p. 2730–2741, 2019.

FLEISCHHACKER, W. W.; UCHIDA, H. Critical review of antipsychotic polypharmacy in the treatment of schizophrenia. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 7, p. 1083–1093, 2014.

FLORIO, T. M. *et al.* The Basal Ganglia: More than just a switching device. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 24, n. 8, p. 677–684, 2018.

- FOGAÇA, M. v.; CAMPOS, A. C.; COELHO, L. D.; DUMAN, R. S.; GUIMARÃES, F. S. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 22–33, 2018.
- FOGAÇA, M. v.; CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol and 5-HT1A Receptors. **Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse Volume 1: Foundations of Understanding, Tobacco, Alcohol, Cannabinoids and Opioids**, p. 749–759, 2016.
- FOGAÇA, M. v.; REIS, F. M. C. V.; CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 3, p. 410–419, 2014.
- FREYBERG, Z. *et al.* Mechanisms of amphetamine action illuminated through optical monitoring of dopamine synaptic vesicles in Drosophila brain. **Nature Communications** **2016 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2016.
- FUKUDOME, Y. *et al.* Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 2682–2692, 2004.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, 1980.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* Modulation of effective connectivity during emotional processing by Delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 4, p. 421–432, maio 2010.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* Distinct Effects of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Neural Activation During Emotional Processing. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 1, p. 95–105, 2009.
- GALDERISI, S.; MUCCI, A.; BUCHANAN, R. W.; ARANGO, C. Negative symptoms of schizophrenia: new developments and unanswered research questions. **The Lancet Psychiatry**, v. 5, n. 8, p. 664–677, 2018.
- GALLING, B. *et al.* Antipsychotic augmentation vs. monotherapy in schizophrenia: systematic review, meta-analysis and meta-regression analysis. **World Psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 77–89, 2017.
- GALLO, F. T.; KATCHE, C.; MORICI, J. F.; MEDINA, J. H.; WEISSTAUB, N. v. Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 79, 2018.
- GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964.
- GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. *et al.* Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. **Biomolecules**, v. 10, n. 11, p. 1–34, 2020.
- GARGOLOFF, P. D. *et al.* Polifarmacia antipsicótica y patrones prescriptivos de psicofármacos en internación psiquiátrica de larga estancia: comparación 1995-2009. **Revista de Neuro-Psiquiatría**, v. 85, n. 1, p. 3–11, 2022.
- GARTHWAITE, J. From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 1, p. 9–18, 2016.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**,

v. 336, n. 6197, p. 385–388, 1988.

GATTAZ, F.; ROBERTS, E.; BECKMANN, H. Cerebrospinal Fluid Concentrations of Free GABA in Schizophrenia: No Changes After Haloperidol Treatment. **Biol Psychiatry**, 1986.

GATTAZ, W. F.; CRAMER, H.; BECKMANN, H. Low CSF concentrations of cyclic GMP in schizophrenia. **British Journal of Psychiatry**, v. 142, n. 3, p. 288–291, 1983a.

GAVIRIA, A. M.; FRANCO 1, J. G.; AGUADO, V.; RICO, G.; LABAD, J.; DE PABLO, J.; VILELLA, E. A Non-Interventional Naturalistic Study of the Prescription Patterns of Antipsychotics in Patients with Schizophrenia from the Spanish Province of Tarragona. *PloS one*, v. 10, n. 10, p. e0139403, 2015.

GERHARD, D. M. *et al.* Interneurons are the cellular trigger for ketamine's rapid antidepressant actions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1336–1349, 2020.

GERZANICH, V.; ZHANG, F.; WEST, G. A.; SIMARD, J. M. Chronic Nicotine Alters NO Signaling of Ca²⁺ Channels in Cerebral Arterioles. *Circulation research*, v. 88, n. 3, p. 359–365, 2001.

GHIMIRE, K.; ALTMANN, H. M.; STRAUB, A. C.; ISENBERG, J. S. Nitric oxide: What's new to NO? **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 312, n. 3, p. C254–C262, 2017.

GIULIANO, C. *et al.* Neuroprotective and Symptomatic Effects of Cannabidiol in an Animal Model of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 8920, v. 22, n. 16, p. 8920, 2021.

GLADULICH, L. F. H. *et al.* NMDA-induced nitric oxide generation and CREB activation in central nervous system is dependent on eukaryotic elongation factor 2 kinase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 10, p. 118783, 2020.

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

GOMES, F. *et al.* Cannabidiol attenuates sensorimotor gating disruption and molecular changes induced by chronic antagonism of NMDA receptors in Mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 5, p. 1–10, 2015a.

GOMES, F. v.; LLORENTE, R.; DEL BEL, E. A.; VIVEROS, M. P.; LÓPEZ-GALLARDO, M.; GUIMARÃES, F. S. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. **Schizophrenia Research**, v. 164, n. 1–3, p. 155–163, 1 maio 2015b.

GÓMEZ-NIETO, R.; HORMIGO, S.; LÓPEZ, D. E. Prepulse Inhibition of the Auditory Startle Reflex Assessment as a Hallmark of Brainstem Sensorimotor Gating Mechanisms. **Brain sciences**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2020.

GONZALEZ-BURGOS, G.; CHO, R. Y.; LEWIS, D. A. Alterations in Cortical Network Oscillations and Parvalbumin Neurons in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 12, p. 1031–1040, 2015.

GRACE, A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 524–532, 2016.

GRAHAM, F. K. The More or Less Startling Effects of Weak Prestimulation. **Psychophysiology**, v. 12, n. 3, p. 238–248, 1975.

GREENWOOD, Tiffany A. *et al.* Gating deficit heritability and correlation with increased clinical severity in schizophrenia patients with positive family history. **American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 4, p. 385–391, 2016.

GRIFFITHS, K. R.; MORRIS, R. W.; BALLEINE, B. W. Translational studies of goal-directed action as a framework for classifying deficits across psychiatric disorders. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 8, n. MAY, p. 101, 2014.

GUINART, D.; CORRELL, C. U. Antipsychotic Polypharmacy in Schizophrenia: Why Not? **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 81, n. 3, p. 1101, 2020.

GÜNERI, S.; SCHEEL-KRÜGER, J.; LUO, F. Evaluation of acute and chronic nociception in subchronically administered MK-801-induced rat model of schizophrenia. **Behavioural Pharmacology**, p. 571–580, 2021.

HALLAK, J. E. C. *et al.* Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 7, p. 668–676, 2013.

HAMILTON, H. K. *et al.* Clinical and cognitive significance of auditory sensory processing deficits in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 175, n. 3, p. 275–283, 2018.

HARRO, J. Neuropsychiatric Adverse Effects of Amphetamine and Methamphetamine. **International review of neurobiology**, v. 120, p. 179–204, 2015.

HEALD, A. *et al.* Lifestyle factors and the metabolic syndrome in Schizophrenia: A cross-sectional study. **Annals of General Psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2017.

HENDERSON, D. C.; VINCENZI, B.; ANDREA, N. v.; ULLOA, M.; COPELAND, P. M. Pathophysiological mechanisms of increased cardiometabolic risk in people with schizophrenia and other severe mental illnesses. **The Lancet Psychiatry**, v. 2, n. 5, p. 452–464, 2015.

HINDLEY, S. *et al.* Nitric Oxide Donors Enhance Neurotrophin-Induced Neurite Outgrowth Through a cGMP-Dependent Mechanism. **J. Neurosci. Res**, v. 47, p. 427–439, 1997.

HJORTHØJ, C.; STÜRUP, A. E.; MCGRATH, J. J.; NORDENTOFT, M. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Psychiatry**, v. 4, n. 4, p. 295–301, 2017.

HNASKO, R. M.; STANKER, L. H. Hybridoma Technology. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1318, p. 15–28, 2015.

HOLLOWAY, Z. R. *et al.* Comparing phasic dopamine dynamics in the striatum, nucleus accumbens, amygdala, and medial prefrontal cortex. **Synapse**, v. 73, n. 2, p. e22074, 2019.

HORTON, A.; SCHIEFER, I. T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nitric oxide mimetic agents. **Nitric Oxide**, v. 84, p. 69–78, 2019.

HUDSON, M. R.; RIND, G.; O'BRIEN, T. J.; JONES, N. C. Reversal of evoked gamma oscillation deficits is predictive of antipsychotic activity with a unique profile for clozapine. **Translational Psychiatry** **2016 6:4**, v. 6, n. 4, p. e784–e784, 2016.

HUDSON, M. R.; SOKOLENKO, E.; O'BRIEN, T. J.; JONES, N. C. NMDA receptors on parvalbumin-positive interneurons and pyramidal neurons both contribute to MK-801 induced gamma oscillatory disturbances: Complex relationships with behaviour. **Neurobiology of Disease**, v. 134, p. 104625, 2020.

HUESTIS, M. A. Human cannabinoid pharmacokinetics. **Chemistry & biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1770–1804, 2007.

HUNG, C. C.; LIN, C. H.; LANE, H. Y. Cystine/Glutamate Antiporter in Schizophrenia: From Molecular Mechanism to Novel Biomarker and Treatment. **International journal of molecular**

sciences, v. 22, n. 18, 2021.

HYTÖNEN, V. P. (Strept)avidin as a template for ligands other than biotin: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 633, p. 21–28, 2020.

IFFLAND, K.; GROTENHERMEN, F. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. **Cannabis and cannabinoid research**, v. 2, n. 1, p. 139–154, 2017.

ISAACS, D.; RIORDAN, H. Sensory hypersensitivity in Tourette syndrome: A review. **Brain and Development**, v. 42, n. 9, p. 627–638, 2020.

ISSY, A. C.; SALUM, C.; DEL BEL, E. A. Nitric oxide modulation of methylphenidate-induced disruption of prepulse inhibition in Swiss mice. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 2, p. 475–481, 2009.

ISSY, A. C.; DEL BEL, E. A. 7-Nitroindazole blocks the prepulse inhibition disruption and c-Fos increase induced by methylphenidate. **Behavioural brain research**, v. 262, p. 74–83, 2014.

ISSY, A. C.; PEDRAZZI, J. F. C.; YONEYAMA, B. H.; DEL-BEL, E. A. Critical role of nitric oxide in the modulation of prepulse inhibition in Swiss mice. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 4, p. 663–672, 2014.

ISSY, A. C.; DOS-SANTOS-PEREIRA, M.; PEDRAZZI, J. F. C.; KUBRUSLY, R. C. C.; DEL-BEL, E. The role of striatum and prefrontal cortex in the prevention of amphetamine-induced schizophrenia-like effects mediated by nitric oxide compounds. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, p. 353–362, 2018.

ISSY, A. C. *et al.* Effects of Doxycycline in Swiss Mice Predictive Models of Schizophrenia. **Neurotoxicity Research**, v. 38, n. 4, p. 1049–1060, 2020.

IVERSEN, T. S. J. *et al.* Side effect burden of antipsychotic drugs in real life – Impact of gender and polypharmacy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 82, p. 263–271, 2018.

JAFARI, Z.; KOLB, B. E.; MOHAJERANI, M. H. Prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and P50 gating in aging and alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 59, p. 101028, 2020.

JAIN, A.; CHENG, K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 245, p. 27–40, 2017.

JODO, E. *et al.* Activation of Medial Prefrontal Cortex by Phencyclidine is Mediated via a Hippocampo-prefrontal Pathway. **Cerebral Cortex**, v. 15, n. 5, p. 663–669, 2005.

KAAR, S. J.; ANGELESCU, I.; MARQUES, T. R.; HOWES, O. D. Pre-frontal parvalbumin interneurons in schizophrenia: a meta-analysis of post-mortem studies. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 12, p. 1637–1651, 2019.

KALYUZHNY, A. E. Primary Antibodies. **Immunohistochemistry: Essential Elements and Beyond**, p. 3-9, 2016.

KANAGASUNDARAM, P. *et al.* Pharmacological Interventions to Treat Antipsychotic-Induced Dyslipidemia in Schizophrenia Patients: A Systematic Review and Meta Analysis. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, p. 271, 2021.

KARNIOL, I. G.; SHIRAKAWA, I.; KASINSKI, N.; PFEFERMAN, A.; CARLINI, E. A. Cannabidiol interferes with the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in man. **European Journal of**

Pharmacology, v. 28, n. 1, p. 172–177, 1974.

KATHMANN, M.; FLAU, K.; REDMER, A.; TRÄNKLE, C.; SCHLICKER, E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 372, n. 5, p. 354–361, 2006.

KAYGISIZ, B.; AYDIN, S.; YILDIRIM, E.; MUSMUL, A.; EROL, K.; KILIC, F. S. The effects of galangin in prepulse inhibition test and experimental schizophrenia models. **Acta neuropsychiatrica**, v. 34, n. 1, p. 37–46, 2022.

KELLENDONK, C. *et al.* Transient and selective overexpression of dopamine D2 receptors in the striatum causes persistent abnormalities in prefrontal cortex functioning. **Neuron**, v. 49, n. 4, p. 603–615, 2006.

KHAN, A.; POWELL, S. B. Sensorimotor gating deficits in “two-hit” models of schizophrenia risk factors. **Schizophrenia Research**, v. 198, p. 68–83, 2018.

KIM, J. H.; MARTON, J.; AMETAMEY, S. M.; CUMMING, P. A Review of Molecular Imaging of Glutamate Receptors. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, 2020.

KISS, A.; OSACKA, J. Extra-forebrain impact of antipsychotics indicated by c-Fos or FosB/ Δ FosB expression: A minireview. **Endocrine Regulations**, v. 55, n. 2, p. 120–130, 2021.

KISS, J. P.; ZSILLA, G.; VIZI, E. S. Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: Interneuronal communication without receptors. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 4, p. 485–489, 2004.

KLAMER, D.; ENGEL, J. A.; SVENSSON, L. The neuronal selective nitric oxide synthase inhibitor, Nomega-propyl-L-arginine, blocks the effects of phencyclidine on prepulse inhibition and locomotor activity in mice. **European journal of pharmacology**, v. 503, n. 1–3, p. 103–107, 2004.

KLAMER, D.; ENGEL, J. A.; SVENSSON, L. Effects of phencyclidine on acoustic startle and prepulse inhibition in neuronal nitric oxide synthase deficient mice. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 587–590, 2005.

KLAMER, D.; ZHANG, J.; ENGEL, J. A.; SVENSSON, L. Selective interaction of nitric oxide synthase inhibition with phencyclidine: behavioural and NMDA receptor binding studies in the rat. **Behavioural brain research**, v. 159, n. 1, p. 95–103, 2005.

KLEIN, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. v. 39, p. 31–59, 2019.

KNOTT, V. *et al.* Alterations in resting state electrocortical network oscillations, schizophrenia-like symptoms and their relationships induced with the administration of the NMDA receptor antagonist ketamine in human volunteers. **Bulletin of Clinical Psychopharmacology**, v. 25, p. 146–153, 2015.

KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. The acoustic startle response in rats—circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. **Behavioural Brain Research**, v. 89, n. 1–2, p. 35–49, 1997.

KOETHE, D. *et al.* Anandamide elevation in cerebrospinal fluid in initial prodromal states of psychosis. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 194, n. 4, p. 371–372, 2009.

KOMOROWSKA-MÜLLER, J. A.; SCHMÖLE, A. C. CB2 Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 19**, v. 22, n. 1, p. 19, 2020.

KOSTYALIK, D.; KELEMEN, K.; LENDVAI, B.; HERNÁDI, I.; ROMÁN, V.; LÉVAY, G. Response-related sensorimotor rhythms under scopolamine and MK-801 exposures in the touchscreen visual discrimination test in rats. **Scientific Reports** **2022** **12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022.

KRAEUTER, A.-K.; MASHAVAVE, T.; SUVARNA, A.; VAN DEN BUUSE, M.; SARNYAI, Z. Effects of beta-hydroxybutyrate administration on MK-801-induced schizophrenia-like behaviour in mice. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 5, p. 1397–1405, 2020.

KRUNIĆ, M. *et al.* Graphene quantum dot antioxidant and proautophagic actions protect SH-SY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress-mediated apoptotic death. **Free radical biology & medicine**, v. 177, p. 167–180, 2021.

KRYSTAL, J. H. *et al.* Subanesthetic Effects of the Noncompetitive NMDA Antagonist, Ketamine, in Humans: Psychotomimetic, Perceptual, Cognitive, and Neuroendocrine Responses. **Archives of General Psychiatry**, v. 51, n. 3, p. 199–214, 1994.

KURODA, K. *et al.* Investigation of Mechanisms for MK-801-Induced Neurotoxicity Utilizing Metabolomic Approach. **Toxicological Sciences**, v. 146, n. 2, p. 344–353, 2015.

KUSHMERICK, C. *et al.* Retroinhibition of Presynaptic Ca²⁺ Currents by Endocannabinoids Released via Postsynaptic mGluR Activation at a Calyx Synapse. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 26, p. 5955–5965, 2004.

LAHTI, A. C.; KOFFEL, B.; LAPORTE, D.; TAMMINGA, C. A. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 9–19, 1995.

LAPRAIRIE, R. B.; BAGHER, A. M.; KELLY, M. E. M.; DENOVAN-WRIGHT, E. M. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 20, p. 4790, 2015.

LAUDER BRUNTON, T. ON THE USE OF NITRITE OF AMYL IN ANGINA PECTORIS. **The Lancet**, v. 90, n. 2291, p. 97–98, 1867.

LEE, A. Y.; CHOI, J. W.; YOKOZAWA, T.; CHO, E. J. Preventive effect of oligonol on nitric oxide and reactive oxygen species production through regulation of nuclear factor kappa B signaling pathway in RAW 264.7 macrophage cells against sodium nitroprusside. **RSC Advances**, v. 9, n. 7, p. 3987–3993, 2019.

LEE, H. Y. *et al.* Effects of Sodium Nitroprusside Administered Via a Subdural Intracranial Catheter on the Microcirculation, Oxygenation, and Electrocortical Activity of the Cerebral Cortex in a Pig Cardiac Arrest Model. **Journal of the American Heart Association**, v. 11, n. 11, 2022.

LEE, J.; HUDSON, M. R.; O'BRIEN, T. J.; NITHIANANTHARAJAH, J.; JONES, N. C. Local NMDA receptor hypofunction evokes generalized effects on gamma and high-frequency oscillations and behavior. **Neuroscience**, v. 358, p. 124–136, 2017.

LEE, Y.; LÓPEZ, D. E.; MELONI, E. G.; DAVIS, M. A Primary Acoustic Startle Pathway: Obligatory Role of Cochlear Root Neurons and the Nucleus Reticularis Pontis Caudalis. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 3775–3789, 1996.

LEGARE, C. A.; RAUP-KONSAVAGE, W. M.; VRANA, K. E. Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. **Pharmacology**, v. 107, n. 3–4, p. 131–149, 2022.

LEUCHT, S. *et al.* Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. **Lancet (London, England)**, v. 382, n. 9896, p. 951–962, 2013.

LEWEKE, F. M.; MUELLER, J. K.; LANGE, B.; FRITZE, S.; TOPOR, C. E.; KOETHE, · Dagmar; ROHLEDER, C. Role of the Endocannabinoid System in the Pathophysiology of Schizophrenia: Implications for Pharmacological Intervention. **CNS Drugs**, v. 32, p. 605-619, 2018.

LEWEKE, F. M. *et al.* Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Translational Psychiatry** 2012 2:3, v. 2, n. 3, p. e94–e94, 2012.

LIGRESTI, A.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. **Physiological reviews**, v. 96, n. 4, p. 1593–1659, 2016.

LIM, J.; LEE, S.-A.; LAM, M.; RAPISARDA, A.; KRAUS, M.; KEEFE, R. S. E.; LEE, J. The relationship between negative symptom subdomains and cognition. **Psychological Medicine**, v. 46, n. 10, p. 2169-2177, 2016.

LI, M.; WANG, W.; SUN, L.; DU, W.; ZHOU, H.; SHAO, F. Chronic clozapine treatment improves the alterations of prepulse inhibition and BDNF mRNA expression in the medial prefrontal cortex that are induced by adolescent social isolation. **Behavioural Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 311–319, 2019.

LIN, C. H.; WANG, F. C.; LIN, S. C.; HUANG, Y. H.; CHEN, C. C.; LANE, H. Y. Antipsychotic combination using low-dose antipsychotics is as efficacious and safe as, but cheaper, than optimal-dose monotherapy in the treatment of schizophrenia: A randomized, double-blind study. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 267–274, 2013.

LIND, M.; HAYES, A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 370–375, 2017.

LIU, G. I. *et al.* Mediation of Cannabidiol Anti-inflammation in the Retina by Equilibrative Nucleoside Transporter and A2A Adenosine Receptor. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 12, p. 5526–5531, 2008.

LISBOA, S. F.; GUIMARÃES, F. S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 8, p. 2455–2462, 2012.

LISBOA, S. F.; MAGESTO, A. C.; AGUIAR, J. C.; RESSTEL, L. B. M.; GUIMARÃES, F. S. Complex interaction between anandamide and the nitrenergic system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 86–94, 2013.

LIU, F.; ZHANG. *et al.* Changes in plasma levels of nitric oxide metabolites and negative symptoms after 16-week minocycline treatment in patients with schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 199, p. 390–394, 2018.

LIVINGSTON, K. E.; TRAYNOR, J. R. Allosterism at opioid receptors: modulation with small molecule ligands. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 14, p. 2846–2856, 2018.

LI, W.; MAO, Z.; BO, Q.; SUN, Y.; WANG, Z.; WANG, C. Pre-pulse inhibition deficits in individuals at clinical high-risk for psychosis: A systematic review and meta-analysis. **Early intervention in psychiatry**, v. 15, n. 4, p. 794–806, 2021.

LONG, L. E.; MALONE, D. T.; TAYLOR, D. A. Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 4, p. 795–803, 2006.

LOUIS-GRAY, K.; TUPAL, S.; PREMKUMAR, L. S. TRPV1: A Common Denominator Mediating Antinociceptive and Antiemetic Effects of Cannabinoids. **International Journal of Molecular Sciences** 2022, Vol. 23, Page 10016, v. 23, n. 17, p. 10016, 2022.

- LU, H. C.; MACKIE, K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 516-525, 2016.
- LU, H. C.; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607–615, 2021.
- MAAS, D. A.; VALLÈS, A.; MARTENS, G. J. M. Oxidative stress, prefrontal cortex hypomyelination and cognitive symptoms in schizophrenia. **Translational psychiatry**, v. 7, n. 7, 2017.
- MACHADO BERGAMASCHI, M. *et al.* Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. **Current drug safety**, v. 6, n. 4, p. 237–249, 2011.
- MADASU, M. K.; ROCHE, M.; FINN, D. P. Supraspinal Transient Receptor Potential Subfamily V Member 1 (TRPV1) in Pain and Psychiatric Disorders. **Modern Trends in Pharmacopsychiatry**, v. 30, p. 80–93, 2015.
- MAGAKI, S.; HOJAT, S. A.; WEI, B.; SO, A.; YONG, W. H. An introduction to the performance of immunohistochemistry. **Métodos Mol Biol.**, p. 289-298, 2019.
- MAHMOOD, D. *et al.* New Paradigms of Old Psychedelics in Schizophrenia. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, 2022.
- MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P. *et al.* The effects of sodium nitroprusside treatment on cognitive deficits in schizophrenia a pilot study. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 83–85, 2015.
- MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P. *et al.* Sodium nitroprusside treatment of clozapine-refractory schizophrenia. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 761–763, 2014.
- MAIA DE OLIVEIRA, J. P. *et al.* Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 34, n. SUPPL2, p. s149–s155, 2012.
- MAIA, T. v.; FRANK, M. J. An Integrative Perspective on the Role of Dopamine in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 1, p. 52–66, 2017.
- MAJERCIKOVA, Z. *et al.* Effect of acute asenapine treatment on Fos expression in the forebrain structures under normal conditions and mild stress preconditioning in the rat. **Brain research bulletin**, v. 108, p. 60–66, 2014.
- MAKARA, J. K. *et al.* Involvement of Nitric Oxide in Depolarization-Induced Suppression of Inhibition in Hippocampal Pyramidal Cells during Activation of Cholinergic Receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 38, p. 10211–10222, 2007.
- MALHOTRA, A. K. *et al.* Ketamine-Induced Exacerbation of Psychotic Symptoms and Cognitive Impairment in Neuroleptic-Free Schizophrenics. v. 17, n. 3, 1997.
- MALVAEZ, M.; WASSUM, K. M. Regulation of habit formation in the dorsal striatum. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 20, p. 67–74, 2018.
- MANNING, E. E.; WANG, A. Y.; SAIKALI, L. M.; WINNER, A. S.; AHMARI, S. E. Disruption of prepulse inhibition is associated with compulsive behavior severity and nucleus accumbens dopamine receptor changes in Sapap3 knockout mice. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.
- MANTO, M.; DALMAU, J.; DIDELOT, A.; ROGEMOND, V.; HONNORAT, J. In vivo effects of antibodies from patients with anti-NMDA receptor encephalitis: Further evidence of synaptic glutamatergic dysfunction. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2010.

MAO, Y.; XING, Y.; LI, J.; DONG, D.; ZHANG, S.; ZHAO, Z.; XIE, J.; WANG, R.; LI, H. Guanosine ameliorates positive symptoms of schizophrenia via modulating 5-HT 1A and 5-HT 2A receptors. **Am J Transl Res**, v. 13, n. 5, p. 4040–4054, 2021.

MARCAGGI, P. Cerebellar Endocannabinoids: Retrograde Signaling from Purkinje Cells. **Cerebellum**, v. 14, n. 3, p. 341–353, 2015.

MARQUES, T. R. *et al.* GABA-A receptor differences in schizophrenia: a positron emission tomography study using [11C]Ro154513. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 6, p. 2616–2625, 2020.

MARTIN-SANTOS, R. *et al.* Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 32, p. 4966–4979, 2012.

MATOS, M. *et al.* Deletion of Adenosine A 2A Receptors From Astrocytes Disrupts Glutamate Homeostasis Leading to Psychomotor and Cognitive Impairment: Relevance to Schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 78, n. 11, p. 763-774, 2015.

MAYO, D.; BOLDEN, K. A.; SIMON, T. J.; NIENDAM, T. A. Bullying and psychosis: The impact of chronic traumatic stress on psychosis risk in 22q11.2 deletion syndrome - a uniquely vulnerable population. **Journal of Psychiatric Research**, v. 114, p. 99–104, 2019.

MCCUTCHEON, R. A.; ABI-DARGHAM, A.; HOWES, O. D. Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. **Trends in Neurosciences**, v. 42, n. 3, p. 205–220, 2019.

MCCUTCHEON, R. A.; KRYSTAL, J. H.; HOWES, O. D. Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. **World Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 15–33, 2020.

MCCUTCHEON, R. A.; REIS MARQUES, T.; HOWES, O. D. Schizophrenia-An Overview. **JAMA psychiatry**, v. 77, n. 2, p. 201–210, 2020.

MECHOULAM, R. The Pharmacohistory of Cannabis Sativa. **Cannabinoids as Therapeutic Agents**, p. 1–20, 2019.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A.; GALLILY, R. Cannabidiol: An Overview of Some Pharmacological Aspects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 11S-19S, 2002.

MENA, A. *et al.* Reduced prepulse inhibition as a biomarker of schizophrenia. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, p. 202, 2016.

MESO, A. I.; DE VAI, R. L.; MAHABEER, A.; HILLS, P. J. Evidence of inverted gravity-driven variation in predictive sensorimotor function. **European Journal of Neuroscience**, v. 52, n. 12, p. 4803–4823, 2020.

MILLAR, S. A.; STONE, N. L.; AS, Y.; SULLIVAN, O. A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. **A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. Front. Pharmacol**, v. 9, p. 1365, 2018.

MINATOHARA, K.; AKIYOSHI, M.; OKUNO, H. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, p. 78, 2016.

MINICHINO, A. *et al.* Measuring Disturbance of the Endocannabinoid System in Psychosis: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Psychiatry**, v. 76, n. 9, p. 914, 2019.

MISHRA, A.; SINGH, S.; SHUKLA, S. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 12, 2018.

- MOGHADDAM, B.; ADAMS, B.; VERMA, A.; DALY, D. Activation of Glutamatergic Neurotransmission by Ketamine: A Novel Step in the Pathway from NMDA Receptor Blockade to Dopaminergic and Cognitive Disruptions Associated with the Prefrontal Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 2921-2927, 1997.
- MORALES, M.; MARGOLIS, E. B. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. **Nature Reviews Neuroscience** 2017 **18:2**, v. 18, n. 2, p. 73–85, 2017.
- MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, n. 2–3, p. 199–205, 2005.
- MORELLI, M. B. *et al.* The effects of cannabidiol and its synergism with bortezomib in multiple myeloma cell lines. A role for transient receptor potential vanilloid type-2. **International journal of cancer**, v. 134, n. 11, p. 2534–2546, 2014.
- MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. **Trends in neurosciences**, v. 12, n. 11, p. 459–462, 1989.
- MORRIS, R. W.; QUAIL, S.; GRIFFITHS, K. R.; GREEN, M. J.; BALLEINE, B. W. Corticostriatal Control of Goal-Directed Action Is Impaired in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 2, p. 187–195, 2015.
- MÜLLER, N. THEMED ISSUE Inflammation in Schizophrenia: Pathogenetic Aspects and Therapeutic Considerations. **Schizophrenia Bulletin**, v. 44, n. 5, p. 973–982, 2018.
- MÜLLER, N.; SCHWARZ, M. J. The immunological basis of glutamatergic disturbance in schizophrenia: Towards an integrated view. **Journal of Neural Transmission, Supplementa**, n. 72, p. 269–280, 2007.
- NACHSHONI, T.; LEVY, A.; LEVIN, Y.; NEUMANN, M. Negative symptoms in schizophrenia. **Industrial Psychiatry Journal**, v. 25, n. 2, p. 135, 2016.
- NAKANO, Y. *et al.* Association between plasma nitric oxide metabolites levels and negative symptoms of schizophrenia: a pilot study. **Human psychopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 139–144, 2010.
- NAKAZAWA, K.; JEEVAKUMAR, V.; NAKAO, K. Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia. **npj Schizophrenia**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2017.
- NAKAZAWA, K.; SAPKOTA, K. The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 205, p. 107426, 2020.
- NASEHI, M.; PIRI, M.; JAMALI-RAEUFY, N.; ZARRINDAST, M. R. Influence of intracerebral administration of NO agents in dorsal hippocampus (CA1) on cannabinoid state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. **Physiology and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 297–304, 2010.
- NASYROVA, R. F.; IVASHCHENKO, D. v.; IVANOV, M. v.; NEZNANOV, N. G. Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: Biochemical, genetic and clinical aspects. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 139, 2015.
- NICHOL, K.; STOTT, C.; JONES, N.; GRAY, R. A.; BAZELOT, M.; WHALLEY, B. J. The proposed multimodal mechanism of action of cannabidiol (CBD) in epilepsy: modulation of intracellular calcium and adenosine-mediated signaling (P5.5-007). **Neurology**, v. 92, n. 15, 2019.
- NISHIYAMA, R.; ISOY, H. Reflexes inhibited by a prepulse: Intensity of startle stimulus and prepulse across onset intervals. **Perceptual and Motor Skills**, v. 123, n. 1, p. 153–161, 2016.

OHNO-SHOSAKU, T.; HASHIMOTODANI, Y.; ANO, M.; TAKEDA, S.; TSUBOKAWA, H.; KANO, M. Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. **Journal of Physiology**, v. 584, p. 407–418, 2007.

OHNO-SHOSAKU, T.; SHOSAKU, J.; TSUBOKAWA, H.; KANO, M. Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 953–961, 2002.

OHTSUKA, N.; TANSKY, M. F.; KUANG, H.; KOURRICH, S.; THOMAS, M. J.; RUBENSTEIN, J. L. R.; EKKER, M.; LEEMAN, S. E.; TSIEN, J. Z. Functional disturbances in the striatum by region-specific ablation of NMDA receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 35, p. 12961–12966, 2008.

OLESEN, N. D.; FISCHER, M.; SECHER, N. H. Sodium nitroprusside dilates cerebral vessels and enhances internal carotid artery flow in young men. **The Journal of physiology**, v. 596, n. 17, p. 3967–3976, 2018.

OLIVETTI, P. R.; BALSAM, P. D.; SIMPSON, E. H.; KELLENDONK, C. Emerging roles of striatal dopamine D2 receptors in motivated behaviour: Implications for psychiatric disorders. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 126, n. 6, p. 47–55, 2020.

OMS. **Schizophrenia**. 2022.

OSTADHADI, S.; IMRAN KHAN, M.; NOROUZI-JAVIDAN, A.; DEHPOUR, A. R. Antidepressant effect of pramipexole in mice forced swimming test: A cross talk between dopamine receptor and NMDA/nitric oxide/cGMP pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 295–304, 2016.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** **1987** **327**:6122, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PATRICIO-MARTÍNEZ, A. *et al.* The Acute Activation of the CB1 Receptor in the Hippocampus Decreases Neurotoxicity and Prevents Spatial Memory Impairment in Rats Lesioned with β -Amyloid 25–35. **Neuroscience**, v. 416, p. 239–254, 2019.

PAUL, S. M.; YOHN, S. E.; POPIOLEK, M.; MILLER, A. C.; FELDER, C. C. Muscarinic Acetylcholine Receptor Agonists as Novel Treatments for Schizophrenia. **The American journal of psychiatry**, v. 179, n. 9, p. 611–627, 2022.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, 2001.

PEDRAZZI J F C. **Mecanismos envolvidos no perfil antipsicótico do canabidiol**. 2018. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Ribeirão Preto, 2018.

PEDRAZZI, J. F. C. *et al.* Cannabidiol prevents disruptions in sensorimotor gating induced by psychotomimetic drugs that last for 24-h with probable involvement of epigenetic changes in the ventral striatum. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 111, 2021.

PELEG-RAIBSTEIN, D.; PHILIPP, S.; FELDON, J.; YEE, B. K. Individual difference in prepulse inhibition does not predict spatial learning and memory performance in C57BL/6 mice. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 878–888, 2015.

PENGLLEE, R.; GAO, L.; HUANG, Y.; LIU, L.; NIMITKUL, S.; BAO, B. The role of nitric oxide and neuronal nitric oxide synthase in zebrafish (*Danio rerio*) shoaling. **Aquaculture and Fisheries**, v. 6, n. 6, p. 565–573, 2021.

PENG, Y.; XU, D.; DING, Y.; ZHOU, X. Supplementation of PQQ from pregnancy prevents MK-

801-induced schizophrenia-like behaviors in mice. **Psychopharmacology**, v. 239, n. 7, p. 2263–2275, 2022.

PERDIKARIS, P.; DERMON, C. R. Behavioral and neurochemical profile of MK-801 adult zebrafish model: Forebrain β 2-adrenoceptors contribute to social withdrawal and anxiety-like behavior. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 115, p. 110494, 2022.

PERES, F. F. *et al.* Cannabidiol Prevents Motor and Cognitive Impairments Induced by Reserpine in Rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, 2016.

PEREZ, M.; CARTAROZZI, L. P.; CHIAROTTO, G. B.; GUIMARÃES, F. S.; OLIVEIRA, A. L. R. de. Short and long-term neuroprotective effects of cannabidiol after neonatal peripheral nerve axotomy. **Neuropharmacology**, v. 197, 2021.

PEREZ-RANDO, M.; CASTILLO-GÓMEZ, E.; GUIRADO, R.; BLASCO-IBAÑEZ, J. M.; CRESPO, C.; VAREA, E.; NACHER, J. NMDA receptors regulate the structural plasticity of spines and axonal boutons in hippocampal interneurons. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 166, 2017.

PHAM, T. H.; GARDIER, A. M. Fast-acting antidepressant activity of ketamine: highlights on brain serotonin, glutamate, and GABA neurotransmission in preclinical studies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 199, p. 58–90, 2019.

PICÓN-PAGÈS, P.; GARCIA-BUENDIA, J.; MUÑOZ, F. J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 8, p. 1949–1967, 2019.

PILLINGER, T. *et al.* Comparative effects of 18 antipsychotics on metabolic function in patients with schizophrenia, predictors of metabolic dysregulation, and association with psychopathology: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet. Psychiatry**, v. 7, n. 1, p. 64, 2020.

PINELES, S. L. *et al.* Prepulse inhibition deficits in women with PTSD. **Psychophysiology**, v. 53, n. 9, p. 1377–1385, 2016.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide donors in schizophrenia: Basic studies and clinical applications. **European Journal of Pharmacology**, v. 766, p. 106–113, 2015.

POJE, A. B.; FILION, D. L. Effects of prepulse format and lead interval on the assessment of automatic and attention-modulated prepulse inhibition. **Cognitive Processing**, v. 22, n. 3, p. 559–567, 2021.

POLLAK, T. A.; DE SIMONI, S.; BARIMANI, B.; ZELAYA, F. O.; STONE, J. M.; MEHTA, M. A. Phenomenologically distinct psychotomimetic effects of ketamine are associated with cerebral blood flow changes in functionally relevant cerebral foci: A continuous arterial spin labelling study. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 24, p. 4515–4524, 2015.

PREMOLI, M. *et al.* Cannabidiol: Recent advances and new insights for neuropsychiatric disorders treatment. **Life Sciences**, v. 224, p. 120–127, 2019.

QIU, X. *et al.* Short-term and persistent impacts on behaviors related to locomotion, anxiety, and startle responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) induced by acute, sublethal exposure to chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 192, p. 148–154, 2017.

RAMIREZ, J.; GARNICA, R.; BOLL, M. C.; MONTES, S.; RIOS, C. Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: A pilot study. **Schizophrenia Research**, v. 68, n. 2–3, p. 357–361, 2004.

RAMOS-VARA, J. A. Principles and methods of immunohistochemistry. **Methods in Molecular**

Biology, v. 1641, p. 115–128, 2017.

RANA, R. R.; RAJASEKARAN, K.; KNAPPERTZ, V.; GRAY, R. A. Pharmacodynamic synergism contributes to the antiseizure action of cannabidiol and clobazam. **Experimental neurology**, p. 114286, 2022.

RASMUSSEN, H.; KOJIMA, I.; KOJIMA, K.; ZAWALICH, W.; APFELDORF, W. Calcium as intracellular messenger: sensitivity modulation, C-kinase pathway, and sustained cellular response. **Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research**, v. 18, p. 159–193, 1984.

RAWLS, S. M.; TALLARIDA, R. J.; GRAY, A. M.; GELLER, E. B.; ADLER, M. W. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, and WIN 55212-2, a cannabinoid agonist, interact to evoke synergistic hypothermia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 2, p. 780–786, 2003.

REITH, M. E. A.; GNEGY, M. E. Molecular mechanisms of amphetamines. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 258, p. 265–297, 2020.

REMYINGTON, G.; ADDINGTON, D.; HONER, W.; ISMAIL, Z.; RAEDLER, T.; TEEHAN, M. Guidelines for the Pharmacotherapy of Schizophrenia in Adults. <https://doi.org/10.1177/0706743717720448>, v. 62, n. 9, p. 604–616, 2017.

RENARD, J. *et al.* Cannabidiol Counteracts Amphetamine-Induced Neuronal and Behavioral Sensitization of the Mesolimbic Dopamine Pathway through a Novel mTOR/p70S6 Kinase Signaling Pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 18, p. 5160–5169, 2016.

RIBEIRO, M. A. *et al.* Spontaneous Activity of CB2 Receptors Attenuates Stress-Induced Behavioral and Neuroplastic Deficits in Male Mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, 2022.

ROBERTSON, G. S.; FIBIGER, H. C. Effects of olanzapine on regional c-fos expression in rat forebrain. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 105–110, 1996.

ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Research Reviews**, v. 11, n. 2, p. 157–198, 1986.

RODRIGUES DA SILVA, N.; GOMES, F. V.; SONEGO, A. B.; SILVA, N. R. da; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol attenuates behavioral changes in a rodent model of schizophrenia through 5-HT_{1A}, but not CB1 and CB2 receptors. **Pharmacological research**, v. 156, 2020.

RODRÍGUEZ-MUÑOZ, M.; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.; MERLOS, M.; GARZÓN-NIÑO, J. Endocannabinoid control of glutamate NMDA receptors: the therapeutic potential and consequences of dysfunction. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55840, 8 ago. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5342457/>. Acesso em: 26 dez. 2022.

ROOHBAKHSH, A.; MOGHADDAM, A. H.; MASSOUDI, R.; ZARRINDAST, M.-R. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 223–229, 2007.

SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4857, p. 1328–1331, 1988.

SAGREDO, O. *et al.* Cannabinoid signalling in the immature brain: Encephalopathies and neurodevelopmental disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 157, p. 85–96, 2018.

SALMANI, N. *et al.* Nicotine-conditioned place preference, reversal learning and social interaction in MK-801-induced schizophrenia model: Effects of post-weaning enriched environment. **Clinical and**

Experimental Pharmacology and Physiology, v. 49, n. 8, p. 871–880, 2022.

SALUM, C.; ISSY, A. C.; BRANDÃO, M. L.; GUIMARÃES, F. S.; BEL, E. del. Nitric oxide modulates dopaminergic regulation of prepulse inhibition in the basolateral amygdala. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 12, p. 1639–1648, 2011.

SAN-MARTIN, R. *et al.* Early Schizophrenia and Bipolar Disorder Patients Display Reduced Neural Prepulse Inhibition. **Brain sciences**, v. 12, n. 1, 2022.

SANTILLÁN-URQUIZA, M. A. *et al.* Galphimia glauca and Natural Galphimines Block Schizophrenia-Like Symptoms Induced with Apomorphine and MK-801 in Mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

SAPSUTTHIPAS, S.; LEONG, P. K.; AKESOWAN, S.; PRATANAPHON, R.; TAN, N. H.; RATANABANANGKON, K. Effective Equine Immunization Protocol for Production of Potent Poly-specific Antisera against *Calloselasma rhodostoma*, *Cryptelytrops albolabris* and *Daboia siamensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003609, 2015.

SAWAHATA, M. *et al.* Microinjection of Reelin into the mPFC prevents MK-801-induced recognition memory impairment in mice. **Pharmacological Research**, v. 173, p. 105832, 2021.

SCHIAVON, A. P.; BONATO, J. M.; MILANI, H.; GUIMARÃES, F. S.; WEFFORT DE OLIVEIRA, R. M. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 27–34, 2016.

SHIELD, P. W.; CROUCH, S. J.; PAPADIMOS, D. J.; WALSH, M. D. Identification of metastatic papillary thyroid carcinoma in FNA specimens using thyroid peroxidase immunohistochemistry. **Cytopathology**, v. 29, n. 3, p. 227–232, 2018.

SHIM, S.; SHUMAN, M.; DUNCAN, E. An emerging role of cGMP in the treatment of schizophrenia: A review. **Schizophrenia research**, v. 170, n. 1, p. 226–231, 2016.

SILBERBERG, G.; BOLAM, J. P. Local and afferent synaptic pathways in the striatal microcircuitry. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 33, p. 182–187, 2015.

ŠIŠKO MARKOŠ, I. *et al.* Psychiatric Illness or Immune Dysfunction-Brain Perfusion Imaging Providing the Answer in a Case of Anti-NMDAR Encephalitis. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 10, 2022.

SONEGO, A. B.; GOMES, F. v.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol attenuates haloperidol-induced catalepsy and c-Fos protein expression in the dorsolateral striatum via 5-HT1A receptors in mice. **Behavioural brain research**, v. 309, p. 22–28, 2016.

SONEGO, A. B.; PRADO, D. da S.; GUIMARÃES, F. S. PPAR γ receptors are involved in the effects of cannabidiol on orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction induced by typical antipsychotic in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 111, p. 110367, 2021.

SONEGO, A. B. *et al.* Cannabidiol prevents haloperidol-induced vacuos chewing movements and inflammatory changes in mice via PPAR γ receptors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 74, p. 241–251, 2018.

SPINA, E.; TROVATI, A.; PAROLARO, D.; GIAGNONI, G. A role of nitric oxide in WIN 55,212-2 tolerance in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 343, n. 2–3, p. 157–163, 1998.

STAHL, S. M. Parkinson's disease psychosis as a serotonin-dopamine imbalance syndrome. **CNS spectrums**, v. 21, n. 5, p. 355–359, 2016.

- STARR, M. S.; STARR, B. S. The new competitive NMDA receptor antagonist CGP 40116 inhibits pilocarpine-induced limbic motor seizures and unconditioned motor behaviour in the mouse. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 47, n. 1, p. 127–131, 1994.
- STEEDS, H.; CARHART-HARRIS, R. L.; STONE, J. M. Drug models of schizophrenia. **Therapeutic advances in psychopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 43–58, 2015.
- STEGMAYER, K. *et al.* Specific cerebral perfusion patterns in three schizophrenia symptom dimensions. **Schizophrenia Research**, v. 190, p. 96–101, 2017.
- STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.4/tsteimer>, v. 13, n. 4, p. 495–506, 2022.
- STONE, J. M. *et al.* Ketamine effects on brain GABA and glutamate levels with 1H-MRS: relationship to ketamine-induced psychopathology. **Molecular Psychiatry** 2012 17:7, v. 17, n. 7, p. 664–665, 2012.
- STONE, J. M. *et al.* The effect of sodium nitroprusside on psychotic symptoms and spatial working memory in patients with schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychological Medicine**, v. 46, n. 16, p. 3443–3450, 2016.
- STORCHAK, H.; EHLIS, A. C.; FALLGATTER, A. J. Action-Monitoring Alterations as Indicators of Predictive Deficits in Schizophrenia. **Topics in Cognitive Science**, v. 13, n. 1, p. 142–163, 2021.
- STRASSNIG, M.; ROSENFELD, A.; HARVEY, P. D. Tardive dyskinesia: motor system impairments, cognition and everyday functioning. **CNS spectrums**, v. 26, n. 6, p. 370–377, 2017.
- SULTAN, M. A. R. *et al.* Studying medication adherence in patients with schizophrenia: focus on antipsychotic-related factors. **Middle East Current Psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 27–34, 2016.
- SUSHMA, H. K. *et al.* Prescribing pattern of antipsychotic medications in patients with schizophrenia in a tertiary care hospital. 2015. Disponível em: <<http://imsear.searo.who.int/handle/123456789/165005>>. Acesso em: 7 dez. 2022.
- SUZUKI, M.; SUN, Y. J.; MURATA, M.; KURACHI, M. Widespread expression of Fos protein induced by acute haloperidol administration in the rat brain. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 52, n. 3, p. 353–359, 1998.
- TADIJAN, A. *et al.* Intracellular Molecular Targets and Signaling Pathways Involved in Antioxidative and Neuroprotective Effects of Cannabinoids in Neurodegenerative Conditions. **Antioxidants** 2022, Vol. 11, Page 2049, v. 11, n. 10, p. 2049, 2022.
- TANG, X.; JAENISCH, R.; SUR, M. The role of GABAergic signalling in neurodevelopmental disorders. **Nature Reviews Neuroscience** 2021 22:5, v. 22, n. 5, p. 290–307, 2021.
- TAVARES, L. R. R. *et al.* The Reversal of Empathy-Induced Hypernociception in Male Mice by Intra-Amygdala Administration of Midazolam and Cannabidiol Depends on 5-HT₃ Receptors. **Cannabis and cannabinoid research**, 2022.
- TAYLOR, C. R. **Milestones in Immunohistochemistry and Molecular Morphology**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.appliedimmunohist.com>.
- TAY-TEO, K.; PEZZULLO, L.; VIOLIN, B. B.; DIAS, T.; PITITTO, L.; GUARNIERO, F. O custo da recaída no tratamento da esquizofrenia no Brasil The cost of relapse in the treatment of schizophrenia in Brazil. **J Bras Econ Saúde**, v. 6, n. 2, p. 102–105, 2014.
- TERRADILLOS, I. *et al.* Altered glial expression of the cannabinoid 1 receptor in the subiculum of a mouse model of Alzheimer’s disease. **Glia**, 2022.

MELTZER, Herbert Y.; STAHL, Stephen M. **The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. Schizophrenia bulletin**, v. 2, n. 1, p. 19, 1976.

THOMAS, A. *et al.* Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 613–623, 2007.

THOMAS, M. A.; LEMMER, B. HistoGreen: a new alternative to 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate (DAB) as a peroxidase substrate in immunohistochemistry? **Brain Research Protocols**, v. 14, n. 2, p. 107–118, 2005.

TITULAER, J.; MALMERFELT, A.; MARCUS, M. M.; SVENSSON, T. H. Enhancement of the antipsychotic effect of risperidone by sodium nitroprusside in rats. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 11, p. 1282–1287, 2019.

TITULAER, J. *et al.* Sodium nitroprusside enhances the antipsychotic-like effect of olanzapine but not clozapine in the conditioned avoidance response test in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 60, p. 48–54, 2022.

TREVLOPOULOU, A.; TOUZLATZI, N.; PITSIKAS, N. The nitric oxide donor sodium nitroprusside attenuates recognition memory deficits and social withdrawal produced by the NMDA receptor antagonist ketamine and induces anxiolytic-like behaviour in rats. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 6, p. 1045–1054, 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-015-4181-x>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

TRIPATHI, M. K.; KARTAWY, M.; AMAL, H. The role of nitric oxide in brain disorders: Autism spectrum disorder and other psychiatric, neurological, and neurodegenerative disorders. **Redox biology**, v. 34, 2020.

TRUBETSKOY, V. *et al.* Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. **Nature**, v. 604, n. 7906, p. 502–508, 2022.

TYSSOWSKI, K. M. *et al.* Different Neuronal Activity Patterns Induce Different Gene Expression Programs. **Neuron**, v. 98, n. 3, p. 530–546.e11, 2018.

ULIANA, D. L.; HOTT, S. C.; LISBOA, S. F.; RESSTEL, L. B. M. Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. **Neuropharmacology**, v. 103, p. 257–269, 2016.

URS, N. M.; PETERSON, S. M.; CARON, M. G. New Concepts in Dopamine D2 Receptor Biased Signaling and Implications for Schizophrenia Therapy. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 1, p. 78–85, 2017.

VALJENT, E.; CORVOL, J.-C.; TRZASKOS, J. M.; GIRAULT, J.-A.; HERVÉ, D. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. **BMC neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2006.

VALLÉE, A.; LECARPENTIER, Y.; GUILLEVIN, R.; VALLÉE, J. N. Effects of cannabidiol interactions with Wnt/ β -catenin pathway and PPAR γ on oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 10, p. 853–866, 2017.

VARGA, J.; BÁTOR, J.; NÁDASDI, G.; ÁRVAI, Z.; SCHIPP, R.; SZEBERÉNYI, J. Partial Protection of PC12 Cells from Cellular Stress by Low-Dose Sodium Nitroprusside Pre-treatment. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 36, n. 7, p. 1161–1168, 2016.

VEKSHINA, N. L.; ANOKHIN, P. K.; VERETINSKAYA, A. G.; SHAMAKINA, Y. Heterodimeric D1-D2 dopamine receptors: A review. **Biomeditsinskaya. Khimiya. Russian Academy of Medical Sciences**, 2017, v. 63, n. 1, p. 5–12, 2017.

- VELÁSQUEZVELÁSQUEZ, E. *et al.* Quantitative subcellular proteomics of the orbitofrontal cortex of schizophrenia patients. *Journal of proteome research*, v. 18, n. 12, p. 4240-4253, 2019.
- WAGNER, L.; KENREIGH, C. Sodium Nitroprusside. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1–5, 24, 2007.
- WAKE, R. *et al.* Regional cerebral blood flow in late-onset schizophrenia: a SPECT study using 99mTc-ECD. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 266, n. 1, p. 3–12, 2016.
- WALLACH, J. *et al.* Pharmacological Investigations of the Dissociative ‘Legal Highs’ Diphenidine, Methoxphenidine and Analogues. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157021, 2016.
- WANG, F.; LI, M.; LIN, C.; JIN, S.; LI, H.; LU, Y.; WANG, H.; WANG, H.; WANG, X. Cannabidiol-dihydroartemisinin conjugates for ameliorating neuroinflammation with reduced cytotoxicity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 39, 2021.
- WANG, J.; LI, M.; ZHANG, J.; GAO, Q.; DING, Z.; SUN, J. Paliperidone alleviates MK-801-induced damage to prefrontal cortical neurons via the PP2A/PTEN pathway. **Journal of Affective Disorders**, v. 317, p. 265–277, 2022.
- WANG, X. *et al.* Effects of sodium nitroprusside in the acute dizocilpine (MK-801) animal model of schizophrenia. **Brain Research Bulletin**, v. 147, p. 140–147, 2019.
- WANG, X. *et al.* Sodium nitroprusside treatment for psychotic symptoms and cognitive deficits of schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychiatry research**, v. 269, p. 271–277, 2018.
- WETMORE, J. B. *et al.* Association of Dementia-Related Psychosis With Long-term Care Use and Death. **Neurology**, v. 96, n. 12, p. e1620–e1631, 2021.
- WIJESINGHE, R. A review of pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions with antipsychotics. **Mental Health Clinician**, v. 6, n. 1, p. 21–27, 2016.
- WILCOX, R. A.; ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring enhancement in amphetamine-stimulated striatal dopamine release in vitro produced by prior exposure to amphetamine or stress in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 124, n. 3, p. 375–376, 1986.
- WINSHIP, Ian R. *et al.* An overview of animal models related to schizophrenia. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 64, n. 1, p. 5-17, 2018.
- WODARCZYK, A.; SZARMACH, J.; CUBAA, J.; STANISAW WIGLUSZ, M. Benzodiazepines in combination with antipsychotic drugs for schizophrenia: gaba-ergic targeted therapy. **Psychiatria Danubina**, v. 29, p. 345–348, 2017.
- WU, Q.; HUANG, J.; WU, R. Drugs Based on NMDAR Hypofunction Hypothesis in Schizophrenia. **Frontiers in neuroscience**, v. 15, 2021.
- XIAO, X.; XU, X.; LI, F.; XIE, G.; ZHANG, T. Anti-inflammatory treatment with β -asarone improves impairments in social interaction and cognition in MK-801 treated mice. **Brain Research Bulletin**, v. 150, p. 150–159, 2019.
- XI, Z.-X. *et al.* Brain cannabinoid CB 2 receptors modulate cocaine’s actions in mice. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 9, 2011.
- YAN, H. *et al.* Nucleus accumbens: a systematic review of neural circuitry and clinical studies in healthy and pathological states. **Journal of Neurosurgery**, v. 1, p. 1–10, 2022.

- YILDIRIM, A. B.; KILINÇ, A. Y. [Polypharmacy and drug interactions in elderly patients]. **Türk Kardiyoloji Dernegi arsivi : Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir**, v. 45, n. Suppl 5, p. 17–21, 2017.
- YOSHIDA, T.; HASHIMOTO, K.; ZIMMER, A.; MAEJIMA, T.; ARAISHI, K.; KANO, M. The Cannabinoid CB1 Receptor Mediates Retrograde Signals for Depolarization-Induced Suppression of Inhibition in Cerebellar Purkinje Cells. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 1690–1697, 2002.
- YU, W.; FANG, H.; ZHANG, L.; HU, M.; HE, S.; LI, H.; ZHU, H. Reversible Changes in BDNF Expression in MK-801-Induced Hippocampal Astrocytes Through NMDAR/PI3K/ERK Signaling. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 172, 2021.
- YU, W.; ZHU, H.; WANG, Y.; LI, G.; WANG, L.; LI, H. Reactive Transformation and Increased BDNF Signaling by Hippocampal Astrocytes in Response to MK-801. **PloS one**, v. 10, n. 12, 2015.
- ZGAIR, A. *et al.* Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally administered cannabis and cannabis-based medicines. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 8, p. 3448–3459, 2016.
- ZHANG, W. *et al.* The Role of the GABAergic System in Diseases of the Central Nervous System. **Neuroscience**, v. 470, p. 88–99, 2021.
- ZHANG, Y.; WANG, X. P.; PERNER, S.; BANKFALVI, A.; SCHLÜCKER, S. Effect of Antigen Retrieval Methods on Nonspecific Binding of Antibody-Metal Nanoparticle Conjugates on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 760–768, 2018.
- ZHAN, J. Q. *et al.* Flavonoid fisetin reverses impaired hippocampal synaptic plasticity and cognitive function by regulating the function of AMPARs in a male rat model of schizophrenia. **Journal of Neurochemistry**, v. 158, n. 2, p. 413–428, 2021.
- ZHAO, T. *et al.* Sevoflurane Ameliorates Schizophrenia in a Mouse Model and Patients: A Pre-Clinical and Clinical Feasibility Study. **Current Neuropharmacology**, v. 20, n. 12, p. 2369–2380, 2022.
- ZHENG, W. *et al.* Artemisinin conferred ERK mediated neuroprotection to PC12 cells and cortical neurons exposed to sodium nitroprusside-induced oxidative insult. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 97, p. 158–167, 2016.
- ZOUPA, E.; PITSIKAS, N. The nitric oxide (No) donor sodium nitroprusside (snp) and its potential for the schizophrenia therapy: Lights and shadows. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3196, 2021.
- ZSCHENDERLEIN, C. *et al.* Capsaicin-Induced Changes in LTP in the Lateral Amygdala Are Mediated by TRPV1. **PLOS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16116, 2011.
- ZUARDI, A. W.; ANTUNES RODRIGUES, J.; CUNHA, J. M. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. **Psychopharmacology**, v. 104, n. 2, p. 260–264, 1991.
- ZUARDI, A. W. *et al.* Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 8, p. 979–983, 2008.
- ZUARDI, A. W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARB, E.; KARNIOL, I. G. Psycho pharmacology Action of Cannabidiol on the Anxiety and Other Effects Produced by A 9-THC in Normal Subjects. **Psychopharmacology**, v. 76, p. 245–250, 1982.
- ZUO, D. Y.; CAO, Y.; ZHANG, L.; WANG, H. F.; WU, Y. L. Effects of acute and chronic administration of MK-801 on c-Fos protein expression in mice brain regions implicated in schizophrenia with or without clozapine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 290–295, 2009.