

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

RAFAELA APARECIDA PONCIANO DA SILVA DE MORAES

**Efeito do canabigerol em modelo de discinesia tardia induzida por
haloperidol**

Ribeirão Preto

2023

RAFAELA APARECIDA PONCIANO DA SILVA DE MORAES

Efeito do canabigerol em modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol

Versão original

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. 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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moraes, Rafaela Aparecida Ponciano da Silva de

Efeito do canabigerol em modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol. Ribeirão Preto, 2023.

103 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Del Bel, Elaine.

1. Discinesia tardia. 2. Canabigerol. 3. FosB. 4. Microglia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Moraes, Rafaela Aparecida Ponciano da Silva de. Efeito do canabigerol em modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol

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

Aprovada em: _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

Instituição: FORP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: _____

“Toda esta terra tem memória e sangue de nossos avós”
(Exposição Nakoada, Museu de Arte Moderna
do Rio de Janeiro, dezembro de 2022)

Às três pessoas que mais amo nessa vida:

À minha mãe *Vera* e minha tia *Carmem*,
minhas melhores amigas e pessoas que
mais torcem pelo meu sucesso. Essa luta
também é por vocês!

Ao meu pai *Hélio*, que perdi no meio do
mestrado, mas sei que do jeito dele se
orgulharia de mim hoje.

AGRADECIMENTOS

Aqui finalizo uma das etapas mais importantes da minha vida até agora. Foi um caminho longo, cheio de obstáculos, mas percorrido com sucesso. Não poderia deixar de iniciar esta seção dedicando total gratidão à Deus, meu sustento nos momentos difíceis, minha força, meu amigo e minha luz.

À Profa Elaine Del Bel, por ter aberto as portas do laboratório para mim desde a iniciação científica, por todas as oportunidades concedidas, por todo o conhecimento compartilhado, pelas correções feitas, e toda ajuda e compreensão nos meus momentos difíceis. Obrigada por ter lutado comigo pela minha bolsa. A senhora é uma grande inspiração, uma mulher forte e determinada, que lutou e luta pelo seu espaço e incentiva seus alunos a fazerem o mesmo. Quero que saiba que te admiro muito!

À Carol, que embora não esteja mais presente no laboratório, foi parte essencial na construção da minha base científica e me ensinou muito do que sei hoje.

Às minhas parceiras e parceiros de laboratório que se tornaram amigos, que estiveram comigo nos bons e maus momentos, me ajudaram e ensinaram muito e tornaram a jornada mais leve e divertida. Por cada comemoração de aniversário, almoço no bandeirão, confraternizações fora do lab, pelos conselhos, trocas, diálogos e ombro amigo, obrigada! Cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração!

Um muito obrigada especial à Glau e ao Mau, que mesmo no meio de tantas responsabilidades e correria estão sempre dispostos a ajudar os mais inexperientes. Em especial, também agradeço à Célia por todo apoio técnico e por estar sempre pronta a nos socorrer e achar uma solução para os problemas. Te admiro pela sua inteligência!

A todos meus amigos, amigas e familiares que estiveram comigo nesse tempo e de alguma forma me ajudaram. A todos que acreditam em mim mais do que eu mesma, que me ouviram quando precisei desabafar, me animaram quando me senti desanimada e desmotivada, que torceram ou oraram por mim. Vocês são essenciais!

Aos meus ancestrais, aqueles que vieram antes de mim e de alguma forma lutaram, resistiram e contribuíram para que hoje eu estivesse aqui. Graças a esse esforço, hoje sou a primeira da família a ingressar em uma pós-graduação *stricto sensu*.

A todos os pacientes que fazem uso de antipsicóticos típicos e desenvolvem discinesia tardia. Que de alguma forma este projeto possa contribuir para a melhoria de vocês!

À sociedade brasileira, que mesmo desigual, paga impostos que ajudam na manutenção da educação pública e ciência de qualidade neste país. Gratidão pela oportunidade e

privilégio de fazer ciência e receber por isso, enquanto infelizmente milhões de cidadãos brasileiros estão em situação de miséria.

À Universidade de São Paulo pelo apoio à permanência estudantil através da concessão de vaga na moradia que possibilitou a realização da minha graduação e pós-graduação, assim como de muitos outros alunos. Isso é de extrema importância no processo de democratização do ensino superior!

Aos professores e professoras do programa, pelas aulas e ensinamentos que fizeram parte da minha formação.

À Cláudia e ao Igor pelos serviços prestados na secretaria do programa, sempre muito pacientes e extremamente prestativos em ajudar na resolução de dúvidas e problemas.

Aos funcionários que cuidam dos animais no biotério e às “tias da limpeza”, que muitas vezes não são reconhecidos mas que tem papel fundamental na manutenção de tudo que permite o bom andamento do trabalho.

Aos animais sacrificados pelo bem da ciência.

Às agências de fomento, pela concessão da bolsa de mestrado e todo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

MORAES, R. A. P. S. M. **Efeito do canabigerol em modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol.** 2023. 103f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A introdução dos antipsicóticos na década de 1950 permitiu o tratamento de sintomas da esquizofrenia, como os delírios e as alucinações. No entanto, a cronicidade do tratamento com os chamados antipsicóticos típicos induz efeitos motores como a discinesia tardia, caracterizada por movimentos orofaciais involuntários e estereotipados de grande impacto funcional e social. A discinesia tardia é alvo de diversos estudos pela sua potencial irreversibilidade e seu caráter incômodo ao paciente. Uma das hipóteses para explicar a fisiopatologia deste efeito baseia-se na hipersensibilização dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 frente ao seu constante bloqueio por antipsicóticos típicos, como o haloperidol. Haveria também o aumento de processos inflamatórios e de estresse oxidativo. Ainda, sabe-se que o tratamento repetido com haloperidol aumenta a expressão da proteína FosB no estriado dorso-lateral de roedores, o que estaria relacionado com a indução dos movimentos orais involuntários. Estudos do nosso grupo apontam que canabinoides apresentam um perfil de antipsicótico atípico, ou seja, tem efeito terapêutico sobre os sintomas clássicos da esquizofrenia sem levar ao aumento da expressão de FosB no estriado dorso-lateral e à aparição de sintomas motores. Além disso, o canabidiol atenua os movimentos orais involuntários induzidos pelo tratamento crônico com o haloperidol. O canabigerol, outro fitocanabinoide, ainda não foi testado no modelo de discinesia tardia. No entanto, compartilha interações com o canabidiol que lhe conferem efeito antioxidante e anti-inflamatório, o que sugere que este composto também tenha potencial antidiscinético. A partir destas premissas, este estudo teve como objetivos (i) delinear curvas temporais e de dose-resposta do haloperidol e a partir disso estabelecer um modelo de discinesia tardia; (ii) investigar o efeito antidiscinético do canabigerol no modelo pré-clínico estabelecido e, uma vez confirmado este efeito, (iii) investigar se estaria associado à sua ação anti-inflamatória e (iv) caracterizar a expressão de FosB no estriado dos animais frente ao tratamento com canabigerol e relacionar este perfil de expressão com seu efeito no modelo. Os resultados mostraram que o canabigerol não possui efeito discinético *per se* e nas doses de 3 e 10mg/kg atenuou os movimentos orais involuntários nos camundongos sem alterar sua atividade motora. Este efeito não é relacionado à diminuição da expressão de FosB no estriado dorso-lateral induzida pelo haloperidol, e também não foram observadas alterações na morfologia e densidade da microglia. Estudos posteriores são necessários para melhor investigação deste efeito, no entanto este trabalho apresenta contribuições para melhor entendimento do canabigerol, com possíveis implicações clínicas.

Palavras-chave: discinesia tardia, canabigerol, FosB, microglia.

ABSTRACT

MORAES, R. A. P. S. M. **Effect of cannabigerol in haloperidol-induced tardive dyskinesia model.** 2023. 103f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

The introduction of antipsychotics in the 1950s allowed the treatment of symptoms of schizophrenia, such as delusions and hallucinations. However, the chronicity of treatment with the typical antipsychotics induces motor effects such as tardive dyskinesia, characterized by involuntary and stereotyped orofacial movements of great functional and social impact. Tardive dyskinesia is a target of several studies due to its potential irreversibility and its uncomfortable nature for the patient. One of the hypotheses to explain the pathophysiology of this effect is based on the hypersensitivity of D2-type dopaminergic receptors to their constant blockade by typical antipsychotics, such as haloperidol. There would also be an increase in inflammatory processes and oxidative stress. Furthermore, it is known that repeated treatment with haloperidol increases the expression of the FosB protein in the dorsolateral striatum of rodents, which would be related to the induction of involuntary oral movements. Studies by our group point out that cannabinoids have an atypical antipsychotic profile, that is, they have a therapeutic effect on the classic symptoms of schizophrenia without leading to increased FosB expression in the dorsolateral striatum and the appearance of motor symptoms. Furthermore, cannabidiol attenuated the haloperidol-induced involuntary oral movements. Cannabigerol, another phytocannabinoid, has not yet been tested in the tardive dyskinesia model. However, it shares with cannabidiol a profile of interactions that gives it an antioxidant and anti-inflammatory effect, which suggests that this compound also has an antidyskinetic potential. Based on these premises, this study aimed to (i) delineate temporal and dose-response curves for haloperidol and, based on this, establish a model of tardive dyskinesia; (ii) investigate the antidyskinetic effect of cannabigerol in this preclinical model and, once this effect is confirmed, (iii) investigate whether it would be associated with its anti-inflammatory action and (iv) characterize the expression of FosB in the striatum of animals after the treatment with cannabigerol and relate this expression profile with its effect on the model. The results showed that cannabigerol has no dyskinetic effect *per se* and at doses of 3 and 10mg/kg it attenuated involuntary oral movements in mice without altering their motor activity. No reversal effect of cannabigerol was observed in the model. The attenuation effect is not related to the decrease in haloperidol-induced FosB expression in the dorsolateral striatum, and no alterations in microglia morphology and density were observed either. Further studies are needed to better investigate this effect, however this work presents contributions for a better understanding of cannabigerol, with possible clinical applications.

Keywords: tardive dyskinesia, cannabigerol, FosB, microglia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CAT - catalase
Cg - córtex cingulado
CPu - estriado (caudado - putamen)
CBD - canabidiol
CBG - canabigerol
CBDA - ácido canabidiólico
CBCA - ácido canabicromênico
CBGA - ácido canabigerólico
COMT - catecol-orto-metiltransferase
COX-2 - ciclo-oxigenase-2
DA - dopamina
DAB - 3,3 diamino-benzidina
DAT - transportador de dopamina
DL - dorso-lateral
DM - dorso-medial
DOI - densidade óptica integrada
DT - discinesia tardia
FDA - *Food and Drug Administration*
GABA - ácido gama-aminobutírico
GPe - globo pálido externo
GPi - globo pálido interno
GSH - glutationa reduzida
Iba-1 - molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1
IHQ - imunohistoquímica
IL - interleucina
INF- γ - interferon γ
iNOS - óxido nítrico-sintase induzida
LDOPA - levodopa
MAO - monoamina-oxidase
NAcC - *núcleo accumbens core*
NAcSh - *núcleo accumbens shell*
NF- κ B - fator nuclear kappa B

NMDA - N-metil D-Aspartato
NST - núcleo subtalâmico
ROS - espécies reativas de oxigênio
PB - tampão fosfato
PFA - paraformaldeído
PGC-1 α - coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR- γ - receptor ativado por proliferadores de peroxissoma- γ
PPI - inibição pelo pré-pulso
SNC - sistema nervoso central
SNc - substância negra compacta
SNr - substância negra reticulada
SOD - superóxido desmutase
TBS - salina tamponada Tris
TH - tirosina hidroxilase
THC - tetrahydrocannabinol
 Δ 9-THCA - ácido Δ -9-tetrahydrocannabinólico
TNF- α - fator de necrose tumoral- α
VCM - *vacuous chewing movements*, ou movimentos orais involuntários
VMAT - transportador vesicular de monoamina
VTA - área tegmental ventral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da dopamina.....	20
Figura 2: Representação das quatro vias dopaminérgicas.....	21
Figura 3: Síntese e neurotransmissão dopaminérgica.....	22
Figura 4: Componentes motores dos núcleos da base humanos.....	26
Figura 5: Via direta dos núcleos da base.....	28
Figura 6: Via indireta dos núcleos da base.....	29
Figura 7: Via de biossíntese dos canabinóides primários.....	32
Figura 8: Representação do aparato espelhado onde a análise dos VCMs é realizada.....	42
Figura 9: Representação dos movimentos orais involuntários (VCMs) em modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol em camundongos.....	42
Figura 10: Desenho experimental do delineamento das curvas temporais e de dose-resposta do haloperidol (1, 2 e 3mg/kg) e salina.....	43
Figura 11: Desenho experimental para investigação do efeito do CBG (3, 10 ou 30mg/kg) no modelo de discinesia tardia.....	44
Figura 12: Desenho experimental para investigação do efeito de reversão do CBG no modelo de discinesia tardia.....	45
Figura 13: Desenho experimental para investigação da associação CBD+CBG no modelo de discinesia tardia.....	46
Figura 14: Representação ilustrativa dos bregmas das secções para análises imunohistoquímicas.....	48
Figura 15: Exemplo de análise morfológica em microglia.....	50
Figura 16: Curvas temporais da salina e haloperidol no modelo de discinesia tardia.....	52
Figura 17: Curva dose-resposta do haloperidol nas doses de 1, 2 e 3mg/kg.....	54
Figura 18: Investigação do efeito do CBG no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol.....	56
Figura 19: Teste do actímetro no experimento 2B para investigação do efeito do CBG nas doses de 10 e 30mg/kg sobre atividade motora de animais tratados com haloperidol.....	57
Figura 20: Comparação da expressão de FosB no estriado DL e DM a nível rostral, medial e caudal.....	58

Figura 21: Fotomicrografias representativas da expressão de FosB nas regiões do estriado DL e DM a nível medial.....	59
Figura 22: Comparação da expressão de FosB no NAcC e NAcSh.....	60
Figura 23: Fotomicrografias representativas da expressão de FosB no NAcC e NAcSh.....	60
Figura 24: Comparação da expressão de FosB no córtex cingulado a nível rostral, medial e caudal.....	61
Figura 25: Fotomicrografias representativas da expressão de FosB no córtex cingulado a nível medial.....	62
Figura 26: Comparação da mensuração de DOI no estriado DL e DM a nível rostral, medial e caudal.....	63
Figura 27: Comparação da mensuração de DOI no NAcC e NAcSh.....	63
Figura 28: Comparação da mensuração de DOI no córtex cingulado a nível rostral, medial e caudal.....	64
Figura 29: Comparação do número de ramificações de células Iba-1+ entre as regiões DM e DL do estriado rostral, medial e caudal.	65
Figura 30: Comparação do número de ramificações de células Iba-1+ no NAcC e NAcSh.....	65
Figura 31: Comparação do número de ramificações de células Iba-1+ no córtex cingulado a nível rostral, medial e caudal.....	66
Figura 32: Comparação do comprimento das ramificações de células Iba-1+ entre as regiões estriado DM e DL a nível rostral, medial e caudal.....	67
Figura 33: Comparação do comprimento das ramificações de células Iba-1+ entre NAcC e NAcSh.....	67
Figura 34: Comparação do comprimento das ramificações de células Iba-1+ no córtex cingulado rostral, medial e caudal.....	68
Figura 35: Comparação do número de endpoints de células Iba-1+ entre o estriado DM e DL a nível rostral, medial e caudal.....	69
Figura 36: Comparação do número de endpoints de células Iba-1+ entre NAcC e NAcSh.....	69
Figura 37: Comparação do número de endpoints de células Iba-1+ no córtex cingulado rostral, medial e caudal.....	70
Figura 38: Comparação do tamanho do corpo de células Iba-1+ entre o estriado DM e DL a nível medial.....	71

Figura 39: Comparação do tamanho do corpo de células Iba-1+ entre NAcC e NAcSh.....	71
Figura 40: Tamanho do corpo de células Iba-1+ no córtex cingulado a nível medial.....	71
Figura 41: Fotomicrografias representativas de células Iba1+ do estriado DL e DM a nível medial	72
Figura 42: Fotomicrografias representativas de células Iba1+ do NAcC e NAcSh.....	73
Figura 43: Fotomicrografias representativas de células Iba1+ do córtex cingulado rostral...74	
Figura 44: Efeito de reversão do CBG no modelo de discinesia tardia.....	74
Figura 45: Teste do actímetro no experimento para investigação do efeito de reversão do CBG no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol.....	75
Figura 46: Investigação do efeito da associação CBD+CBG no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol.....	76
Figura 47: Teste do actímetro no experimento para investigação do efeito da associação CBD+CBG no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol.....	77
Figura 48: Comparação entre VCMs dos grupos haloperidol do experimento 2A e 2B.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de consumíveis comprados para a realização dos experimentos.....	39
Tabela 2: Lista de aparelhos utilizados no decorrer dos experimentos.....	39
Tabela 3: Lista de soluções e tampões preparados.....	40
Tabela 4: Lista de anticorpos primários usados nas imunohistoquímicas.....	48
Tabela 5: Valores estatísticos de <i>one way</i> ANOVA das curvas temporais do haloperidol (2 e 3mg/kg).....	101
Tabela 6: Valores estatísticos de <i>posthoc</i> Tukey das curvas temporais do haloperidol (2 e 3mg/kg).....	101
Tabela 7: Valores estatísticos de <i>two way</i> ANOVA da avaliação da atividade motora dos animais tratados com CBG e/ou haloperidol.....	102
Tabela 8: Valores estatísticos de <i>one way</i> ANOVA e <i>posthoc</i> Tukey da quantificação de FosB no estriado dorso-lateral rostral, medial e caudal	102
Tabela 9: Valores estatísticos de <i>two way</i> ANOVA e <i>posthoc</i> Sidak da avaliação da atividade motora dos animais (experimento de efeito de reversão do CBG10).....	102
Tabela 10: Valores estatísticos de <i>two way</i> ANOVA da avaliação da atividade motora dos animais tratados com haloperidol e/ou CBD/CBG.....	103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Dopamina.....	20
1.2. Antipsicóticos.....	23
1.3. Discinesia Tardia.....	24
1.3.1. Hipóteses sobre a origem da discinesia tardia.....	25
1.3.1.1. Hipótese da hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos.....	29
1.3.1.2. Hipótese do estresse oxidativo.....	30
1.3.1.3. Hipótese glutamatérgica.....	31
1.3.2. Modelo animal da discinesia tardia.....	31
1.4. Canabinóides.....	31
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo geral.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Materiais utilizados.....	39
3.2. Animais.....	40
3.3. Drogas e regime de administração.....	41
3.4. Metodologia.....	41
3.4.1. Avaliação dos movimentos orais involuntários.....	41
Experimento 1: Delineamento das curvas temporal e de dose-resposta do haloperidol.....	42
Experimento 2: Investigação do efeito de prevenção do CBG em modelo de discinesia tardia.....	43
Experimento 3: Investigação do efeito de reversão do CBG em modelo de discinesia tardia.....	44
Experimento 4: Investigação da associação CBD + CBG em modelo de discinesia tardia.....	45
3.4.2. Análises imunohistoquímicas.....	46
Proteína FosB.....	46
Microglia.....	47
3.4.3. Aquisição de imagens.....	48
3.4.4. Análise de imagens.....	49

Proteína FosB.....	49
Microglia.....	49
4. RESULTADOS.....	51
Experimento 1.....	52
Experimento 2.....	55
Imunohistoquímica para a proteína FosB.....	57
Imunohistoquímica para microglia.....	62
Experimento 3.....	74
Experimento 4.....	76
5. DISCUSSÃO.....	78
5.1. Curvas temporais e de dose-resposta.....	79
5.2. Modelo delineado.....	80
5.3. Efeitos adicionais do haloperidol.....	81
5.4. Efeitos de prevenção e reversão do CBG no modelo.....	82
5.5. Expressão de FosB.....	84
6. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROJETO E DIFICULDADES TÉCNICAS.....	87
6.1. Diferenças entre os dois experimentos para avaliação do efeito do CBG.....	88
6.2. Análise de ROS e Microglia no experimento 2A.....	90
7. CONCLUSÃO.....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dopamina

A dopamina (DA) é um neurotransmissor típico pertencente à família das catecolaminas e classificada como uma monoamina. Sua estrutura química está demonstrada na Figura 1.

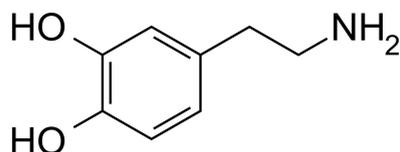


Figura 1: Estrutura química da dopamina. Monoamina: substâncias bioquímicas derivadas de aminoácidos através do processo de descarboxilação. Catecolamina: um composto orgânico que tem um grupo catecol e uma cadeia lateral de amina. Imagem retirada do site InfoEscola.

É conhecido que a DA exerce papel fundamental em vários aspectos do comportamento. Isto é possível devido à sua modulação de vias cerebrais conhecidas como vias dopaminérgicas, que são diferenciadas por estarem diretamente relacionadas ao controle de diferentes aspectos do comportamento. As vias dopaminérgicas são: via mesocortical, cujos neurônios dopaminérgicos presentes na área tegmental ventral (VTA) enviam projeções para o córtex, estando mais relacionada à cognição; a via mesolímbica, cujos neurônios também presentes na VTA enviam projeções para o *núcleo accumbens* (NAc) e amígdala, estando mais ativa na regulação de aspectos límbicos como a motivação; a via tuberoinfundibular, cujos neurônios presentes no núcleo arqueado do hipotálamo enviam projeções para a eminência mediana controlando a liberação de prolactina; a via nigroestriatal, cujos corpos de neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra compacta (SNc) enviam projeções para o estriado, estando mais relacionada ao controle motor (IVERSEN *et al.*, 2010). As vias dopaminérgicas são representadas na Figura 2.

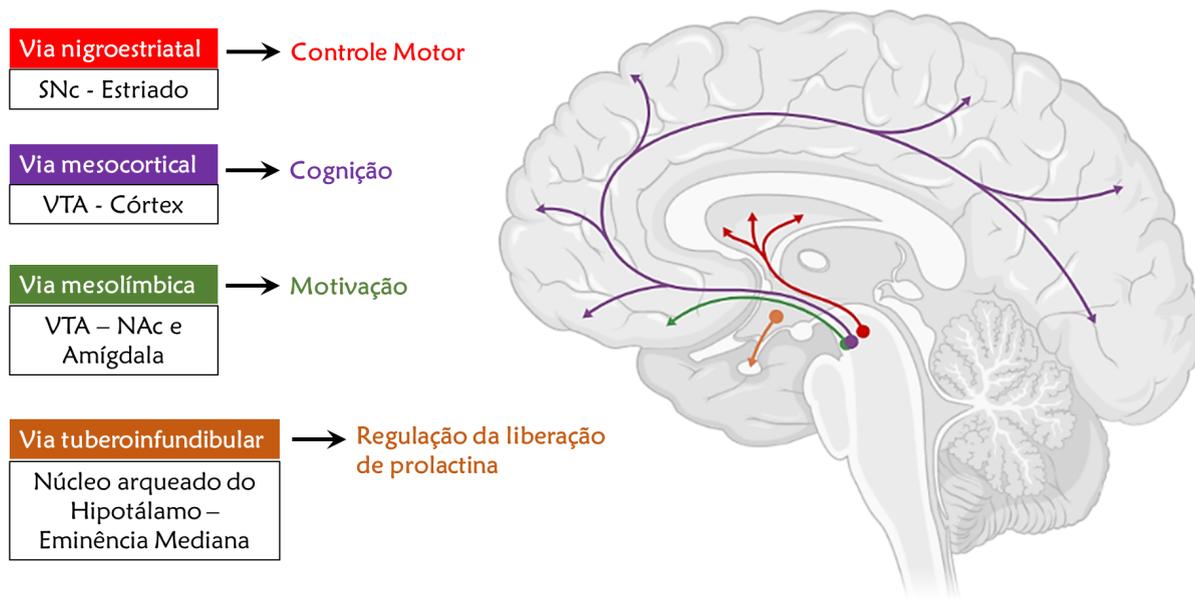


Figura 2: Representação das quatro vias dopaminérgicas. SNc: substância negra compacta; VTA: área tegmental ventral. Imagem criada no BioRender pela própria autora.

A síntese de dopamina (Figura 3) se inicia com a conversão do aminoácido essencial tirosina em levodopa (LDOPA) e esta, posteriormente, em dopamina (DA). A dopamina é armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico para liberação após o estímulo, ocorrendo a neurotransmissão. Após liberação, a dopamina se liga a receptores dopaminérgicos que são acoplados a proteínas G, característica essa que dividirá esses receptores em duas famílias: (i) a do tipo D1, incluindo o subtipo D5, é encontrada em neurônios pós-sinápticos e se liga a proteínas G do tipo excitatórias, responsáveis por induzir produção de adenosina 3',5'- monofosfato cíclico (AMPC), que atua como um dos principais segundos mensageiros na cascata de sinalização mediada pela família do tipo D1; (ii) a família do tipo D2, que inclui os subtipos D3 e D4, presente em neurônios pré e pós-sinápticos e se ligam a proteínas G do tipo inibitórias, que cessam a produção de AMPC (IVERSEN *et al.*, 2007; IVERSEN *et al.*, 2010).

A dopamina presente na fenda sináptica pode ter três destinos: o primeiro consiste na recaptação para dentro do terminal pré-sináptico por meio do transportador de alta afinidade (DAT), e posterior armazenamento em vesículas realizado pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT), processo que permitirá a reutilização da DA. O segundo destino pode ser a metabolização enzimática por meio da monoaminoxidase (MAO), presente na membrana externa das mitocôndrias, ou ainda ser metabolizada na fenda sináptica pela catecol-orto-metiltransferase (COMT) (IVERSEN *et al.*, 2010).

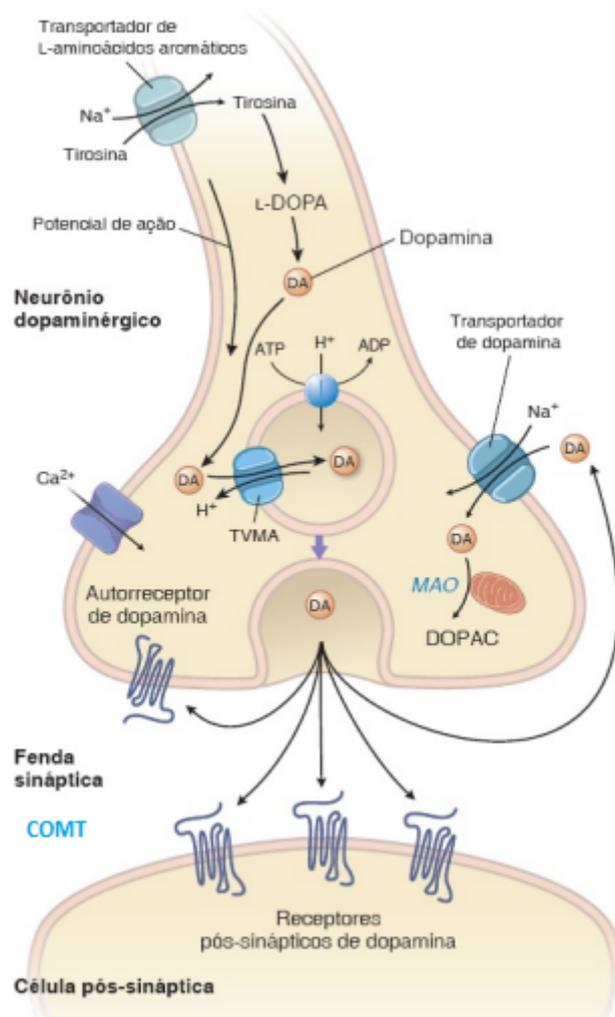


Figura 3: Síntese e neurotransmissão dopaminérgica. A síntese se inicia com a conversão da tirosina, aminoácido precursor, em DOPA pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Essa é a etapa limitante na síntese de dopamina. Posteriormente, a enzima descarboxilase de ácidos aromáticos remove o grupo carboxila do composto, formando a dopamina. Esta é armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico para liberação no momento da sinapse. A ativação de canais de cálcio voltagem dependentes e o aumento do influxo de cálcio no terminal pré-sináptico leva à liberação do neurotransmissor. Após a liberação, a dopamina se liga a receptores dopaminérgicos que são acoplados a proteínas G. Além disso, a dopamina que fica na fenda sináptica pode ser recaptada para dentro do terminal pré-sináptico por meio do transportador de alta afinidade (DAT), e posterior armazenamento em vesículas realizado pelo transportador vesicular de monoaminas (TVMA, ou VMAT) que permitirá a reutilização da DA, ou a metabolização na fenda sináptica pela enzima catecol-orto-metiltransferase (COMT) ou dentro da célula por meio da enzima monoaminoxidase (MAO), processo que gera o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). Esquema modificado de Golan, 3ed.

Uma vez que a dopamina está envolvida na regulação de diversos aspectos do comportamento humano, é hipotetizado que distúrbios na neurotransmissão dopaminérgica participem da etiologia de várias doenças e transtornos mentais, como a esquizofrenia (IVERSEN & IVERSEN, 2007).

A esquizofrenia é um distúrbio mental crônico que afeta 1% da população mundial, normalmente entre o período da adolescência e início da idade adulta, sendo responsável por grande prejuízo nas capacidades sociais e qualidade de vida dos indivíduos afetados (STEFAN *et al.*, 2002). Indivíduos portadores do distúrbio podem apresentar sintomas diversos devido à desorganização crônica da função mental, sendo eles: alucinações, delírios, pensamento desordenado, ideias paranoicas, agitação psicomotora, conhecidos como sintomas positivos; avolição, anedonia, isolamento social, e respostas sociais inapropriadas, que caracterizam os sintomas negativos e déficits de memória e atenção, que são os sintomas cognitivos. O tratamento dos sintomas positivos do distúrbio é possível, porém há menor eficácia dos métodos farmacológicos sobre os sintomas negativos e cognitivos (KAPUR & MAMO, 2003; COOPER *et al.*, 2003).

Diferentes fatores podem ser ligados à etiologia desse distúrbio, como os genéticos, responsáveis por aumentar a predisposição ao desenvolvimento da doença, os fatores ambientais e os neurológicos (desorganização no desenvolvimento cerebral) (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999). O desequilíbrio da neurotransmissão dopaminérgica é a hipótese mais aceita para explicar a fisiopatologia da esquizofrenia, embora existam teorias baseadas na participação de outros neurotransmissores como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA). O aumento da dopamina na via dopaminérgica mesolímbica seria responsável pelo surgimento dos sintomas positivos da doença e os sintomas negativos seriam explicados pela redução da dopamina na via mesocortical (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999). A hipótese dopaminérgica é baseada em duas principais observações: (1) o antagonismo de receptores do tipo D2 é um pré-requisito essencial para a eficácia terapêutica dos antipsicóticos sobre os sintomas positivos da doença e (2) surtos psicóticos podem ser induzidos em indivíduos sadios por drogas que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica (SEEMAN & KAPUR, 2000).

1.2. Antipsicóticos

O advento dos antipsicóticos na década de 1950 foi de suma importância para o processo de desinstitucionalização psiquiátrica, e estudos a respeito dos mecanismos de ação destes fármacos contribuíram para a formulação de novas hipóteses sobre a etiologia da esquizofrenia (LÓPEZ-MUÑOZ & ALAMO, 2009).

Atualmente, existem duas classes de antipsicóticos que diferem entre si quanto à potência, farmacocinética e efeitos adversos. São divididos entre típicos e atípicos, e ambos interferem na neurotransmissão dopaminérgica atuando como antagonistas dos receptores de

dopamina, regulando assim o desbalanço presente nas vias mesolímbica e mesocortical (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999). Ambas as classes apresentam eficácia para o tratamento dos sintomas positivos e os sintomas cognitivos apresentam melhora com o uso dos antipsicóticos atípicos. Além disso, os antipsicóticos atípicos, tomando como exemplo a clozapina, são caracterizados por apresentarem efeito no tratamento dos sintomas negativos e menor risco de indução de efeitos motores colaterais, comumente vistos no tratamento com antipsicóticos típicos (HARVEY, 2001).

Existem muitas hipóteses para tentar explicar o mecanismo de ação dos diversos antipsicóticos atípicos e uma delas é a de que, além de antagonizarem receptores dopaminérgicos D2, também regulam a neurotransmissão dopaminérgica antagonizando receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A} presentes em interneurônios gabaérgicos na SNc. Esse mecanismo levaria a desinibição da neurotransmissão dopaminérgica, aumentando a atividade motora e atingindo eficácia terapêutica com menor risco de efeitos colaterais motores (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999; LOONEN & IVANOVA, 2013; MELTZER, 2013). Apesar disso, estes antipsicóticos apresentam outros efeitos colaterais importantes, como ganho de peso e síndrome metabólica, aumentando o risco de ataques cardíacos, além de sonolência e leucopenia (RAHMAN & MARWAHA, 2022).

Já os antipsicóticos típicos, tomando o haloperidol como exemplo, possuem uma alta afinidade pelos receptores dopaminérgicos, especialmente do tipo D2, que quando bloqueados na via nigroestriatal podem desencadear nos pacientes importantes efeitos motores como o parkinsonismo farmacológico, acatisia e discinesia tardia (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999). São drogas com efeito dose dependente, portanto para que haja benefícios no tratamento, é necessário que 65-70% dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 estejam ocupados. Caso a ocupação chegue a 80%, haverá uma maior chance do surgimento dos efeitos motores (TURRONE, 2003).

1.3. Discinesia Tardia

Descrita pela primeira vez por Schonecker, em 1957, a discinesia tardia é um efeito extrapiramidal caracterizado por movimentos involuntários excessivos principalmente na região orofacial, mas que também pode atingir tronco e membros. Tem sido alvo de diversos estudos porque além de ser um efeito extremamente incômodo ao paciente, é potencialmente irreversível (TURRONE *et al.*, 2002; CORRELL *et al.*, 2017).

Alguns fatores de risco podem aumentar a chance do desenvolvimento da discinesia tardia, sendo eles a idade do paciente (pessoas com mais idade), sexo (mais presente em

mulheres), etnia (caucasianos e africanos) e a existência de outros efeitos extrapiramidais. Há também a contribuição de fatores de risco ambientais, como o uso de álcool, cigarro e cocaína e, como já citado, o tratamento com antipsicóticos típicos é o fator diretamente responsável pelo aparecimento da discinesia. Associados a este último fator estão a dose e o tempo de tratamento. Dados estatísticos apontam um aumento anual da taxa de risco de 5% nos primeiros 5 anos de exposição à droga e uma prevalência da discinesia tardia de 20-40% dos pacientes que são submetidos a um tratamento com antipsicóticos típicos por longo tempo. A retirada do antipsicótico ou diminuição de sua dose frequentemente não mostram melhoras na discinesia podendo, pelo contrário, apresentar uma piora temporária dos sintomas (TURRONE *et al.*, 2003; CORRELL *et al.*, 2017).

Em 2017 foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA os únicos medicamentos para tratamento de discinesia tardia, a valbenazina e a tetrabenzina, inibidoras de VMAT2, subtipo de transportador encontrado principalmente em vesículas de neurônios que sintetizam dopamina, norepinefrina, serotonina e histamina. Embora seja uma opção no tratamento, alguns efeitos colaterais advindos causados por ambos os fármacos têm sido observados, como sonolência, sedação e depressão (CORRELL *et al.*, 2017).

As bases neurofisiológicas da discinesia tardia ainda não foram totalmente elucidadas. Apesar disso, o bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2 por antipsicóticos resulta em distintas alterações que embasam hipóteses que objetivam explicar o surgimento, manutenção e características da discinesia tardia. Tais hipóteses se apoiam em premissas de caráter estrutural, como alterações nos receptores dopaminérgicos, ou funcional, como mecanismos neurodegenerativos. Nesse sentido, podem ser complementares e não excludentes (ANDREASSEN & JØRGENSEN, 2000; LOHR *et al.*, 2003). Somado a isso, pesquisas apontam que processos inflamatórios podem estar envolvidos no desenvolvimento da discinesia tardia, uma vez que a produção de fatores pró-inflamatórios pode ser estimulada pelo estresse oxidativo promovido pelo haloperidol (BISHNOI *et al.*, 2008; PEROZA *et al.*, 2016). Baseados nessas premissas, estudos têm empregado diversas estratégias na busca por outras soluções, tomando como exemplo compostos antioxidantes, anti-inflamatórios, agonistas gabaérgicos e até os próprios antipsicóticos atípicos (MARGOLIUS, 2018; CORRELL *et al.*, 2017)

1.3.1. Hipóteses sobre a origem da discinesia tardia

Como mencionado, as hipóteses que explicam o surgimento da discinesia tardia sugerem a participação de alterações de regiões cerebrais a nível fisiológico e estrutural. Para

melhor entendimento sobre tais hipóteses, primeiramente faz-se necessária uma explicação sobre a participação dos núcleos da base no controle motor.

Os núcleos da base são regiões subcorticais do cérebro que regulam vários aspectos das funções sensório-motora, cognitiva e límbica. Esses núcleos se dividem em duas áreas: a porção dorsal, relacionada principalmente com funções motoras e associativas, é compreendida por parte do caudado, do putâmen, globo pálido (interno- GPi e externo- GPe), núcleo subtalâmico (NST) e substância negra (compacta- SNc e reticulada- SNr). O NAc, porção ventral dos núcleos da base, está essencialmente associado com funções límbicas. Os núcleos caudado e o putâmen, juntos, representam a maior dessas estruturas, conhecida como corpo estriado (CPu) (PURVES *et al.*, 2010). Os núcleos da base estão representados na Figura 4:

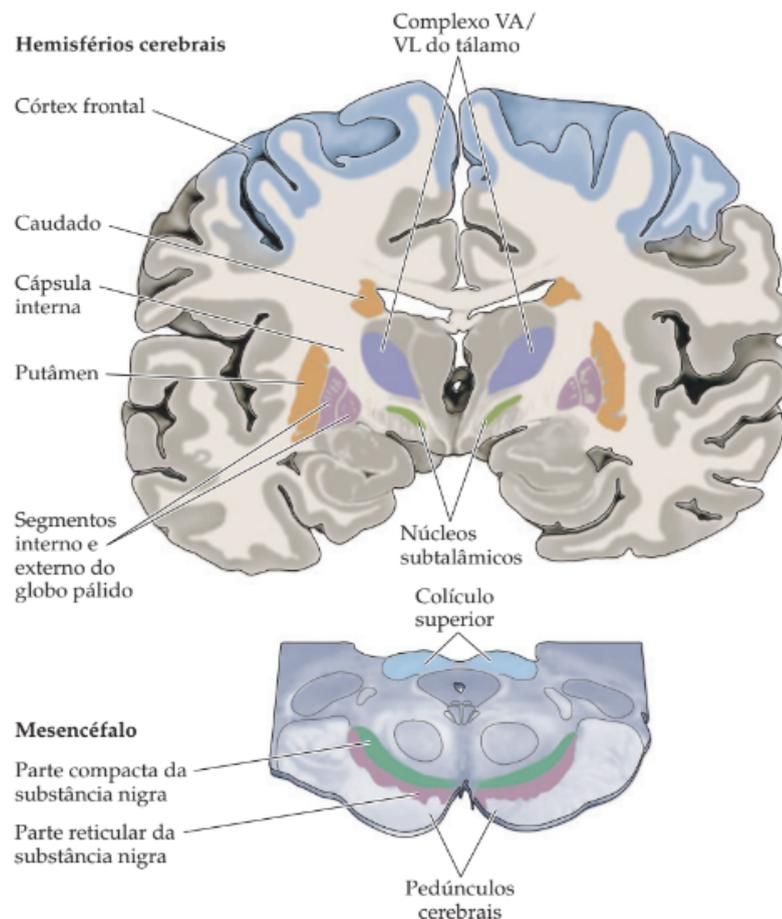


Figura 4: Componentes motores dos núcleos da base humanos. Os núcleos da base compreendem um conjunto de estruturas de substâncias cinzentas. A maioria dessas estruturas está localizada no telencéfalo, mas algumas são encontradas no diencéfalo e no mesencéfalo. Os maiores componentes que recebem e processam os sinais relacionados ao movimento são o corpo estriado (caudado e putâmen) e o pálido (globo pálido e parte reticular da substância negra). Essas estruturas são adjacentes à cápsula interna no prosencéfalo e no mesencéfalo (o pedúnculo cerebral é uma extensão caudal da cápsula interna). A SNc e NST projetam aferências ao corpo estriado e ao globo pálido,

respectivamente. Para o controle dos movimentos dos membros, a eferência dos núcleos da base surge do segmento interno do globo pálido e é enviada aos núcleos ventral anterior e ventral lateral (complexo VAA/L) do tálamo, o qual interage diretamente com os circuitos dos neurônios motores superiores do córtex frontal. Esquema e legenda modificadas de Purves, 4ed.

O estriado é constituído majoritariamente (90-95%) por células denominadas neurônios espinhosos médios, que são neurônios de projeção. Estes neurônios gabaérgicos e seus dendritos recebem aferências corticais, talâmicas e do tronco encefálico (PURVES *et al.*, 2010).

O córtex é a maior fonte de aferências do estriado, que de maneira geral envia projeções de todas as suas áreas (associativa, sensorial e motora). O GP e a SNr recebem aferências inibitórias do corpo estriado, e por isso são conhecidos como os núcleos de saída dos núcleos da base. A via corticoestriatal é composta por circuitos que atuam em paralelo cumprindo diferentes funções, de forma que regiões variadas do córtex fazem conexões com distintas regiões do estriado que, por sua vez, se projetam a diferentes regiões do globo pálido (GPe ou GPi) ou à SNr (PURVES *et al.*, 2010).

A transmissão da informação cortical percorre os núcleos da base e é transmitida ao tálamo, retornando posteriormente a regiões motoras do córtex, alcançando os neurônios motores superiores e fechando o circuito. É sugerido que esse caminho pode se dar por duas vias, a direta e a indireta. As duas vias possuem efeitos antagônicos: a via direta (Figura 5) atua diminuindo a inibição dos núcleos da base sobre o tálamo, que por sua vez estimula os neurônios motores superiores facilitando a iniciação e aumentando a intensidade dos movimentos voluntários. A via indireta (Figura 6) reforça a inibição do tálamo pelos núcleos da base, impedindo a regulação tálamo-cortical, mecanismo que leva à diminuição da magnitude e velocidade da atividade motora. Dessa forma, ambas as vias atuam em sintonia, e não em alternância, permitindo que os movimentos sejam coordenados e gerando um padrão de movimento mais adequado para cada circunstância de acordo com os estímulos que chegam do córtex (PURVES *et al.*, 2010; LOONEN & IVANOVA, 2013; JELLINGER, 2019). Vale ainda citar que uma terceira via, a hiperdireta, participa da regulação dos movimentos. Ela é assim chamada porque as aferências corticais projetam-se direto para NST, que estimula a inibição do GPi e SNr sobre o tálamo, inibindo consequentemente o movimento (PURVES *et al.*, 2010).

A maior fonte de produção de dopamina no cérebro são os neurônios da SNc, que constituem a principal aferência dopaminérgica estriatal (via nigroestriatal). Estas sinapses

ocorrem na base das espinhas dendríticas dos neurônios espinhosos médios, próximas às advindas dos neurônios corticais. Essa disposição permite que as sinapses dopaminérgicas regulem a resposta da estimulação cortical. Como as vias dos núcleos da base resultam em efeitos antagônicos, a modulação dopaminérgica, em ambos os casos, leva a uma liberação da regulação tálamo-cortical. A via direta possui receptores do tipo D1, cuja ativação estimula a via direta. Por outro lado, a via indireta é modulada por receptores dopaminérgicos do tipo D2, que inibem a ativação dessa via. Portanto, a resultante da interação da dopamina no circuito dos núcleos da base será a facilitação do movimento (excitação da via direta e inibição da via indireta) (PURVES, 2010; JELLINGER, 2019).

As vias direta e indireta sob regulação da neurotransmissão dopaminérgica são representadas nas Figuras 5 e 6:

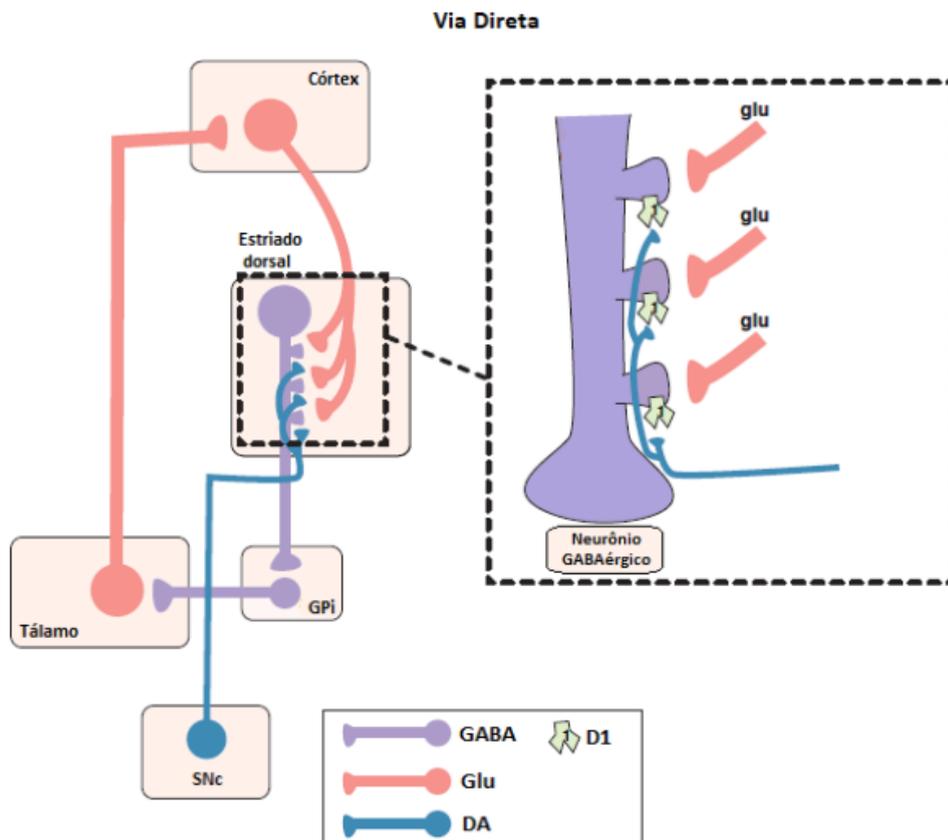


Figura 5: Via direta dos núcleos da base. O estímulo glutamatergico enviado pelo córtex ao estriado dorsal é reforçado pelas aferências dopaminérgicas da SNc através da ligação da dopamina aos receptores D1 presentes nos neurônios espinhosos médios GABAérgicos. Estes, por sua vez, enviam projeções ao GPi e o inibem. Por consequência o tálamo, desinibido, atua sobre os neurônios motores do córtex, facilitando o início dos movimentos desejados. Esquema modificado de Stahl, 2017.

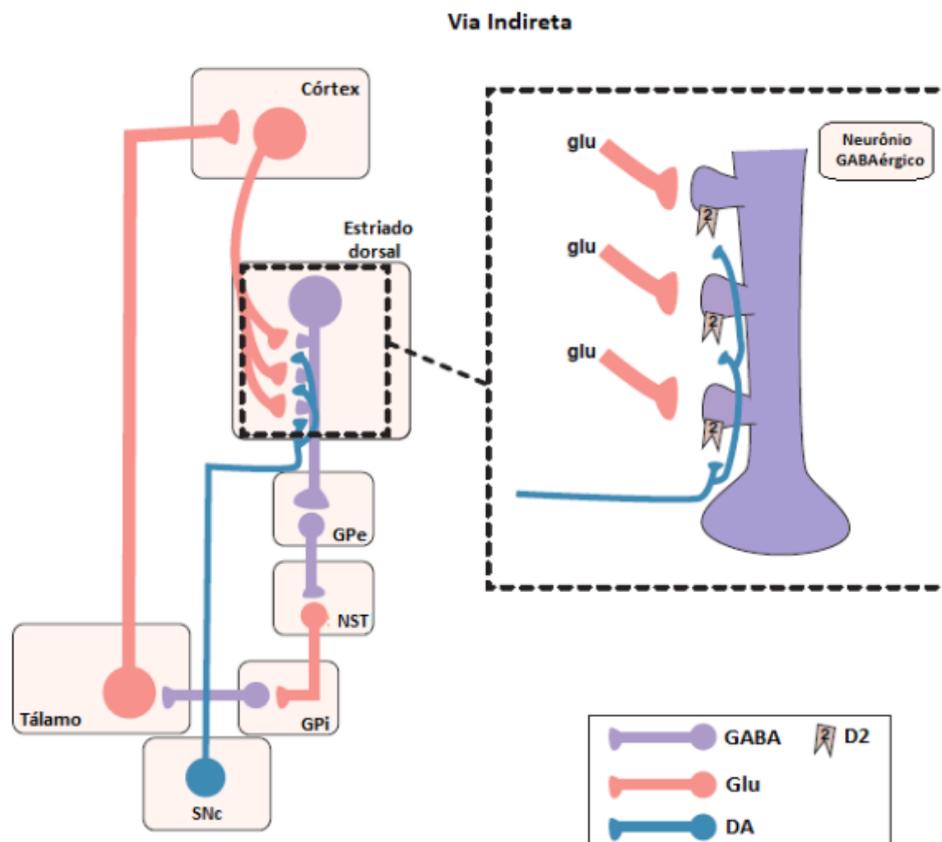


Figura 6: Via indireta dos núcleos da base. O estímulo glutamatérgico enviado ao estriado dorsal pelo córtex é bloqueado pela ligação da dopamina aos receptores D2 nos neurônios espinhosos médios GABAérgicos. Nesta via a informação que sai do estriado alcançará o GPi de forma indireta, passando antes pelo GPe, que inibido, levará à estimulação do NST. Este, por sua vez, enviará projeções glutamatérgicas ao GPi e conseqüentemente haverá inibição do tálamo, impedindo a regulação talamocortical, que resulta na cessação ou diminuição dos movimentos. Esquema modificado de Stahl, 2017.

1.3.1.1. Hipótese da hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos

O constante bloqueio de receptores do tipo D2 pelo haloperidol leva à hipersensibilidade desses receptores, mecanismo ativado pela neuroplasticidade, ou seja, a capacidade do cérebro em se ajustar e mitigar distúrbios. Essa hipersensibilidade possivelmente é ocasionada pelo aumento de espinhas dendríticas e de receptores dopaminérgicos D2 nos neurônios espinhosos médios (STAHL, 2017). O resultado é o aumento da ação inibitória sobre a via indireta e conseqüente estimulação de sinapses glutamatérgicas, que reforçará a regulação tálamo-cortical. Em sinergia com esse desequilíbrio na via indireta, a via direta continua estimulando o tálamo, e essa superestimulação de ambas as vias resulta nos movimentos involuntários hiperkinéticos, característicos da discinesia tardia. Isso explicaria a razão pela qual a retirada do antagonista pode ser ineficaz e até mesmo agravante no tratamento da discinesia tardia uma vez que

poderia ocorrer a potencialização da ação da dopamina se ligando aos receptores hipersensibilizados (SILVESTRI, 2000; STAHL, 2017; FREI, 2018; STAHL, 2018).

1.3.1.2. Hipótese do estresse oxidativo

A dopamina é caracterizada por sua facilidade de auto-oxidação, processo prejudicial ao funcionamento das células devido a formação de superóxidos e quinonas, espécies reativas conhecidas pela sua capacidade de promover estresse oxidativo. Além disso, o catabolismo da MAO-B gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), outra espécie reativa de oxigênio. O estriado é uma região rica em ácidos graxos polinsaturados, oxigênio e íons metálicos como Fe^{2+} (que pode interagir com H_2O_2 formando radical hidroxila), fatores esses que podem agravar o estresse oxidativo. A detenção ou contenção desse processo ocorre através de um sistema antioxidante endógeno, constituído por enzimas antioxidantes presentes nos neurônios, tais como a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase/reductase, glutathione reduzida (GSH) e as vitaminas C e E (para revisão, LOHR *et al.*, 2003; LISTER, *et al.*, 2014).

O bloqueio dos receptores dopaminérgicos pelo haloperidol conduz a um aumento compensatório da síntese e metabolismo desse neurotransmissor, de tal forma que os antioxidantes presentes no estriado permanecem saturados, incapazes de conter todo o dano oxidativo gerado. O desfecho dessa saturação é a peroxidação lipídica e carbonilação proteica, levando, em último estágio, a desestabilização da membrana neuronal, transdução de sinal prejudicada e morte celular (SAGARA, 1998; LISTER *et al.*, 2014; para revisão, LOHR *et al.*, 2003; FREI, 2018).

Somadas a essa cascata de eventos desencadeada pelo haloperidol, evidências apontam anormalidades no sistema antioxidante endógeno de pacientes portadores de esquizofrenia, sendo esse sistema prejudicado anteriormente ao uso de antipsicóticos, tratando-se, portanto, de uma condição inerente ao transtorno. Neste sentido, esse achado pode contribuir para a influência do estresse oxidativo na indução da discinesia de pacientes posteriormente tratados com haloperidol (FLATOW *et al.*, 2013; para revisão, LISTER *et al.*, 2014).

Embora existam divergências, estudos pré-clínicos e clínicos mostram eficácia de antioxidantes como a vitamina E na diminuição e melhoramento dos sintomas da discinesia tardia, evidenciando possibilidades de aplicação desses compostos antioxidantes no tratamento desse efeito extrapiramidal (para revisão, LISTER *et al.*, 2014).

1.3.1.3. Hipótese glutamatérgica

A ligação da dopamina aos receptores D2 inibe a ação excitatória do glutamato liberado pelos neurônios corticais no estriado (KEYSER *et al.*, 1989). O antagonismo dos receptores D2, por outro lado, reduz essa atividade da dopamina, levando a um aumento da neurotransmissão glutamatérgica excitatória (GODUKHIN *et al.*, 1984; SEE & LYNCH, 1995). A presença de glutamato de forma excessiva no estriado e a constante estimulação dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), resulta em excitotoxicidade através de um alto influxo de Ca²⁺ e estresse oxidativo que pode levar à morte celular (KEYSER *et al.*, 1991; para revisão, ANDREASSEN & JØRGENSEN, 2000; SACHDEV, 2000).

1.3.2. Modelo animal da discinesia tardia

A discinesia tardia pode ser reproduzida em roedores ou primatas não humanos através de tratamento crônico com antipsicóticos típicos. O modelo mais comum é obtido através de tratamento com haloperidol em roedores, o que induz os movimentos orais involuntários (*vacuous chewing movements* - VCMs). Este modelo é considerado uma boa ferramenta de estudo, pois atende aos critérios de validação de analogia e predição. Esses critérios baseiam-se no fato de que o haloperidol desencadeia na clínica e no roedor efeitos semelhantes. Em ambos os casos se observa a presença de movimentos involuntários orofaciais estereotipados, usualmente representados por movimentos mastigatórios, tremor mandibular, abertura da boca e protrusão da língua (CASEY, 2000; RASCOL & FABRE, 2000; TURRONE, 2002).

1.4. Canabinóides

A *Cannabis sativa* é uma das plantas mais antigas cultivadas pelo ser humano de que se tem conhecimento. Os registros apontam que ao longo do tempo e em diferentes culturas, essa planta tem sido utilizada para distintos fins. As evidências mais antigas de seu uso datam de 12.000 atrás em Taiwan (BONINI *et al.*, 2018). Na China, achados arqueológicos datados de 4000 a.C. atribuem seu cultivo para o fornecimento de fibras do caule para fabricação de tecidos, cordas e papel. Como medicamento, é retratada na mais antiga farmacopéia chinesa, cujas tradições são atribuídas ao ano de 2700 a.C. Nesta farmacopeia, seu uso era indicado para malária, distúrbios menstruais, constipação intestinal e dores reumáticas. Ela também retrata o primeiro registro até hoje conhecido do uso como agente psicoativo da Cannabis,

provavelmente relacionado ao xamanismo, uma prática religiosa asiática (ZUARDI *et al.* 2008; BONINI *et al.*, 2018).

A Cannabis é constituída por mais de 500 compostos quimicamente ativos, dentre eles terpenoides, flavonoides, alcalóides e os fitocanabinóides, classe mais ativa dos compostos, encontrados na resina produzida pelas glândulas dos pêlos secretores nas flores femininas, principalmente (ZUARDI *et al.* 2008). Na planta, os fitocanabinóides e os terpenos possuem importante papel de proteção contra herbivoria e perda de água, e sua produção é aumentada em situações de estresse ambiental como baixa umidade e alta temperatura (BONINI *et al.*, 2018).

Os canabinóides, uma classe de compostos terpenofenólicos, são sintetizados a partir dos precursores ácido olivetólico e geranyl pirofosfato, que combinados formam o ácido canabigerólico (CBGA). Este, por sua vez, serve como precursor para a maioria dos outros canabinoides, como o ácido canabidiólico (CBDA), ácido canabícromênico (CBCA) e ácido Δ -9-tetrahydrocanabinólico (D9-THCA) (NACHNANI *et al.*, 2021) (Figura 7).

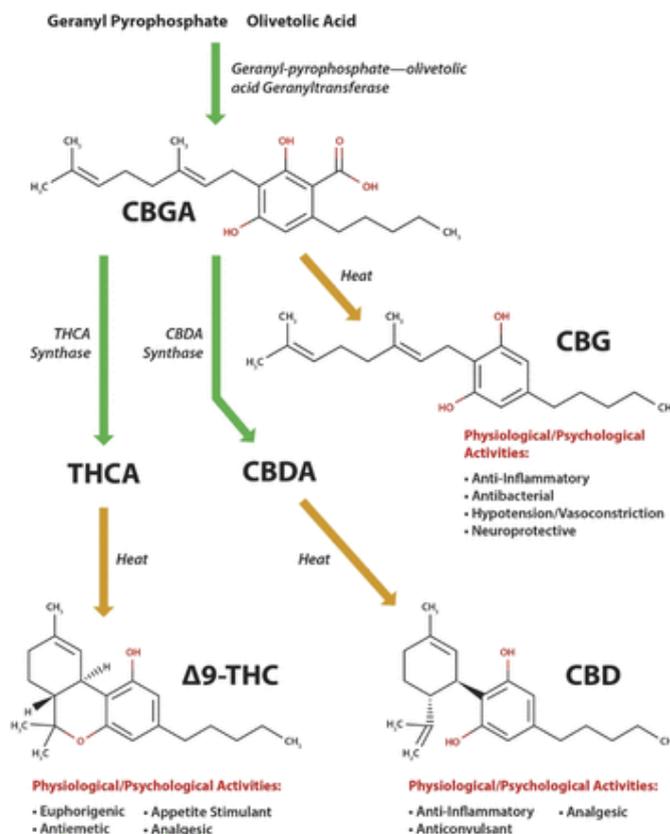


Figura 7: Via de biossíntese dos canabinóides primários. A biossíntese de canabinóides começa com a combinação de geranyl pirofosfato e olivetólico ácido para formar CBGA. O CBGA serve como substrato para a síntese de D9-THCA e CBDA. Descarboxilação de CBGA, D9-THCA e CBDA por calor resulta em CBG, D9-THC e CBD, respectivamente. Como o CBGA serve como substrato para a

síntese dos principais canabinóides, muito pouco é normalmente encontrado em material de *Cannabis* sp. Imagem e legenda retiradas de Nachnani e colaboradores, 2021.

No fim do século XX, e um importante marco científico desta época foi a identificação da estrutura química do Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) por Gaoni e Mechoulam em 1964. Isto levou a um aumento no número de trabalhos científicos com a planta, que a partir de então podia ter seus compostos explorados de forma pura. O interesse científico se intensificou ainda mais nos anos 90, quando houve a descoberta dos receptores canabinóides no sistema nervoso e o isolamento da anandamida, um endocanabinoide (ZUARDI *et al.* 2008).

O canabidiol (CBD) é o principal composto não-psicotomimético da *Cannabis sativa*, correspondendo a até 40% do extrato da planta (ZUARDI *et al.* 2006). É largamente estudado como tratamento de doenças neurodegenerativas devido às suas propriedades neuroprotetoras (para revisão, FERNÁNDEZ- RUIZ *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2016).

Diversos resultados clínicos e pré-clínicos sugerem atividade antipsicótica do CBD. Quando administrado concomitantemente com THC, o CBD inibiu os sintomas tipo-psicóticos induzidos pelo THC em pacientes voluntários (ZUARDI *et al.*, 1982; ZUARDI *et al.*, 2012).

Em ensaios pré-clínicos, diversas ferramentas farmacológicas são empregadas em modelos preditivos de atividade antipsicótica de um fármaco. Camundongos tratados com CBD apresentaram melhora em teste de inibição pelo pré-pulso (PPI - *prepulse inhibition*), usado para avaliar o processamento de informações e que é prejudicado pela administração de MK-801 (GOMES *et al.*, 2014) ou anfetamina (PEDRAZZI *et al.*, 2015). O CBD também levou à melhora de camundongos tratados com MK-801 e submetidos ao teste de reconhecimento de objetos e de interação social, usados em estudos de sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. Todos estes comportamentos são prejudicados pela administração de MK-801, um antagonista de NMDA, que é utilizado pois sugere-se que, para surgimento destes sintomas, haveria participação de uma hipofunção de receptores glutamatérgicos NMDA no córtex pré-frontal. Ainda, o CBD atenuou a morfologia microglial reativa no córtex pré-frontal e no hipocampo (GOMES *et al.*, 2015).

Em outro estudo, o CBD atenuou a estereotipia induzida por apomorfina, agonista de receptores dopaminérgicos, em ratos (ZUARDI *et al.*, 1991), bem como a hiperlocomoção induzida pela anfetamina, inibidora da recaptção dopaminérgica, ou ketamina em camundongos (MOREIRA & GUIMARÃES, 2005).

É importante ressaltar que estes efeitos do CBD não foram acompanhados pelo desenvolvimento de catalepsia nos roedores, um modelo dos efeitos adversos extrapiramidais promovidos pelo uso de antipsicóticos típicos (ZUARDI *et al.*, 1991; MOREIRA & GUIMARÃES, 2005). Além disso, este fitocanabinóide induziu a expressão da proteína c-Fos, um indicador de ativação neuronal, no NAc (região límbica associada à atividade antipsicótica), sem induzir sua expressão no estriado dorsal (região associada aos efeitos adversos motores), um efeito comparável ao induzido pelo antipsicótico atípico clozapina (GUIMARÃES *et al.*, 2004). Assim, estes efeitos sugerem que o CBD apresenta um perfil antipsicótico do tipo atípico (ZUARDI *et al.*, 1995; LEWEKE *et al.*, 2012; MCGUIRE *et al.*, 2018).

O CBD preveniu os movimentos orais involuntários induzidos pelo haloperidol em camundongos, efeito aparentemente dependente da atenuação da neuroinflamação, a qual é mediada, ao menos parcialmente, pela ativação dos receptores PPAR γ (proliferador de peroxissoma do tipo gama) (SONEGO *et al.*, 2018; 2021). Estes estudos demonstraram que o CBD reduz o número de microglia com morfologia reativa no estriado, efeito resultante do tratamento com haloperidol. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e de peroxidação lipídica no estriado também aumentaram como resultado do tratamento com haloperidol e o tratamento concomitante com CBD atenuou o aumento de mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-6 e das enzimas ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), envolvidas com processo inflamatório e estresse oxidativo. Adicionalmente, a combinação entre CBD e haloperidol aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. *In vitro*, a combinação haloperidol e CBD aumentou a expressão de RNAm para o coativador de PPAR γ , o coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α). Para se avaliar a participação dos receptores PPAR γ nos efeitos do CBD *in vitro*, as células foram pré-tratadas com o antagonista de receptores PPAR γ , GW9662, que impediu a ativação microglial mediada por CBD. *In vivo*, o GW9662 impediu os efeitos antidiscinéticos do CBD no modelo de discinesia tardia (SONEGO *et al.*, 2018; 2021).

O canabigerol (CBG), outro fitocanabinoide não psicotomimético, tem sido recentemente investigado em diversos modelos. Da mesma forma que o CBD, exibe muitos potenciais terapêuticos através de seu efeito neuroprotetor, antioxidante e anti-inflamatório. Estudos têm mostrado que o CBG interage com diversos receptores, pertencentes ou não ao sistema endocanabinoide. É um agonista parcial dos receptores CB1 e CB2. Além disso, é um agonista de adrenoceptores α_2 e antagonista de receptores 5HT1A (NAVARRO *et al.*, 2018).

Adicionalmente, o CBG demonstrou exercer a neuroproteção pela ativação dos receptores PPAR- γ por um mecanismo independente dos receptores canabinóides (O'SULLIVAN, 2016).

O interesse da comunidade científica sobre os potenciais deste canabinóide vem crescendo de forma significativa, no entanto seu efeito ainda não foi estudado no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol. O que já é conhecido cientificamente sobre estes dois compostos justifica uma investigação mais profunda para identificar áreas potenciais de usos e perigos terapêuticos.

2. OBJETIVOS

A **HIPÓTESE** deste trabalho é que o CBG é capaz de prevenir e/ou reverter movimentos orais involuntários induzidos por haloperidol, e uma vez analisado este potencial, que é relacionado à diminuição da expressão de FosB no estriado dorso-lateral e à indução de morfologia não reativa de microglia.

Esta hipótese é baseada nas seguintes premissas: 1) a discinesia tardia em humanos, ou movimentos orais involuntários em roedores, são efeitos motores induzidos por tratamento repetido com antipsicóticos típicos; 2) as bases neurobiológicas da discinesia tardia provavelmente estão associadas a processos inflamatórios e estresse oxidativo; 3) o aumento da expressão de FosB no estriado dorsolateral é relacionado à indução de efeitos motores após tratamento com antipsicóticos típicos; 4) o canabigerol ainda não foi estudado no modelo de discinesia tardia e possui potencial anti-inflamatório e antioxidante;

Desta forma, este trabalho possui como:

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do CBG sobre movimentos orais involuntários induzidos por haloperidol, bem como a expressão de FosB e morfologia de microglia.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Delimitar curvas temporais e de dose-resposta do haloperidol injetado via subcutânea para estabelecimento de um modelo de discinesia tardia em camundongos suíços;
- 2) Avaliar o efeito de prevenção ou reversão do CBG sobre os movimentos orais involuntários, quando aplicado exclusivamente ou em associação com CBD; o teste do actímetro será utilizado para avaliação da atividade motora;
- 3) Caracterizar a expressão de FosB no estriado dorso-medial e dorso-lateral, NAcC, NAcSh e córtex cingulado após tratamento repetido com CBG, associado ou não ao tratamento com haloperidol no modelo de discinesia tardia;
- 4) Analisar a morfologia e densidade óptica integrada da microglia no estriado dorso-medial e dorso-lateral, NAcC, NAcSh e córtex cingulado após tratamento repetido com CBG, associado ou não ao tratamento com haloperidol em modelo de discinesia tardia;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais utilizados

Consumíveis comprados

Tabela 1: Lista de consumíveis comprados para a realização dos experimentos.

Tipo	Fabricante
Agulha descartável 30G	BD PrecisionGlide
Becker de vidro (2000ml)	Vidrolabor
Lamínula	Knittel Glass
Lâminas	Knittel Glass
Luvas	Supermax
Matriz de seccionamento de encéfalo	World Precision Instruments, Inc.
Pipeta Pasteur	RBR
Placa 6 poços	Costar
Ponteiras 10ul, 200ul, 1000ul, 5ml e 10ml	Axygen
Seringa descartável	BD Plastipak
Tubo eppendorf 2ml	Eppendorf
Tubo Falcon 15ml	Greiner

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Aparelhos

Tabela 2: Lista de aparelhos utilizados no decorrer dos experimentos.

Tipo	Modelo	Fabricante
Actímetro	LE8810 – LE8811	Panlab/Harvard Apparatus
Aparato espelhado	-	Fabricação no próprio laboratório
Câmera para microscópio	DFC450	Leica
Computador	Z440	HP
Criostato	CM1850	Leica
Microscópio	DM6 B	Leica
Shaker Gyromax™	737R	Amex Instruments

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tampões e soluções preparados

Tabela 3: Lista de tampões e soluções preparados no decorrer dos experimentos.

Solução	pH	Concentração (mol/L)	Reagentes	Empresa
Tampão A	7,4	PBS 0,1 M + Triton X-100 0,15%	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O) ₁₂ NaCl Triton X-100	Millipore corporation Sigma Aldrich Horneywell-Fluka Dinâmica
Tampão citrato de sódio	6,0	0,1M	C ₆ H ₈ O ₇ Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Merck Sigma Aldrich
Salina Tamponada Tris (TBS)	7,4	1M	C ₄ H ₁₁ NO ₃ NaCl	Millipore corporation Horneywell-Fluka
PB (<i>Phosphate Buffered</i>)	7,4	0,2M	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O NaHPO ₄	Millipore corporation Cromato
Solução anti-congelante	-	-	PB 0,2M H ₂ O destilada C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ Etilenoglicol	- - LabSynth LabSynth
Solução de montagem	-	-	H ₂ O destilada Gelatina A PB 0,2M Etanol PB 0,1M	- Sigma Aldrich - Sigma Aldrich -
Solução Somogyi	-	-	PB 0,1M Ácido pícrico Glutaraldeído 0,15% Paraformaldeído 4%	- Fluka Chemika Dinâmica Sigma Aldrich
Solução de sacarose	-	30%	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ PB 0,2M	LabSynth -

Fonte: Elaborado pela própria autora. NaH₂PO₄H₂O = fosfato de sódio monobásico monohidratado; Na₂HPO₄ (H₂O)₁₂ = fosfato de sódio dibásico dodecahidratado; NaCl = cloreto de sódio; C₆H₈O₇ = ácido cítrico; Na₃C₆H₅O₇ = citrato de sódio; C₄H₁₁NO₃ = trizma base; NaHPO₄ = fosfato de sódio monobásico; C₁₂H₂₂O₁₁ = sacarose.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos suíços (*Mus musculus*), machos (cerca de 8 semanas; n=257) provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, USP. Os animais foram alojados em grupos de 6-10 por caixa (40 x 33 x 17 cm) e permaneceram em ambiente

com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$), ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentação *ad libitum*. Os grupos experimentais tiveram de 6-12 animais por tratamento. Todos os procedimentos experimentais descritos foram submetidos ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA, protocolo nº 2021.1.320.58.0) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP).

3.3. Drogas e regime de administração

O haloperidol (Haldol Laboratório Teuto brasileiro s/a) nas doses de 1, 2 ou 3 mg/kg foi diluído em salina e administrado via subcutânea no volume de 1ml/kg. O CBG (PurMed™) nas dose de 3, 10 ou 30 mg/kg, foi diluído em DMSO 3%, Tween80 3% e salina e administrado via intraperitoneal. O CBD (BSPG Laboratories, Reino Unido) nas doses de 10 ou 30 foi diluído em DMSO 3%, Tween80 3% e salina e administrado via intraperitoneal. Nos protocolos experimentais, quando somente uma droga foi administrada via intraperitoneal, o volume utilizado foi 10ml/kg. Em caso de associação de duas drogas por esta via, o volume foi reduzido para 5ml/kg para cada droga.

3.4. Metodologia

3.4.1. Avaliação dos Movimentos Oraís Involuntários (VCMs)

Os animais foram colocados dentro de um Becker de vidro (2000 ml) sobre um aparato específico cujas paredes e base são compostas por espelhos para facilitar a visualização, como esquematizado na Figura 8. Após 1 minuto de habituação, o número de aberturas bucais, tremores mandibulares e protrusão lingual foram quantificados durante um período de 5 minutos. Estes movimentos (Figura 9) podem acontecer sozinhos ou concomitantemente, de forma única ou em *bursts*. Não foram quantificados movimentos associados a comportamento de autolimpeza ou direcionados às paredes do recipiente onde o animal foi colocado.

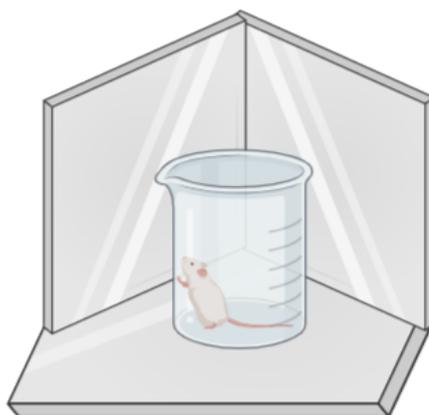


Figura 8: Representação do aparato espelhado onde a análise dos VCMs é realizada. Imagem criada no BioRender pela própria autora.

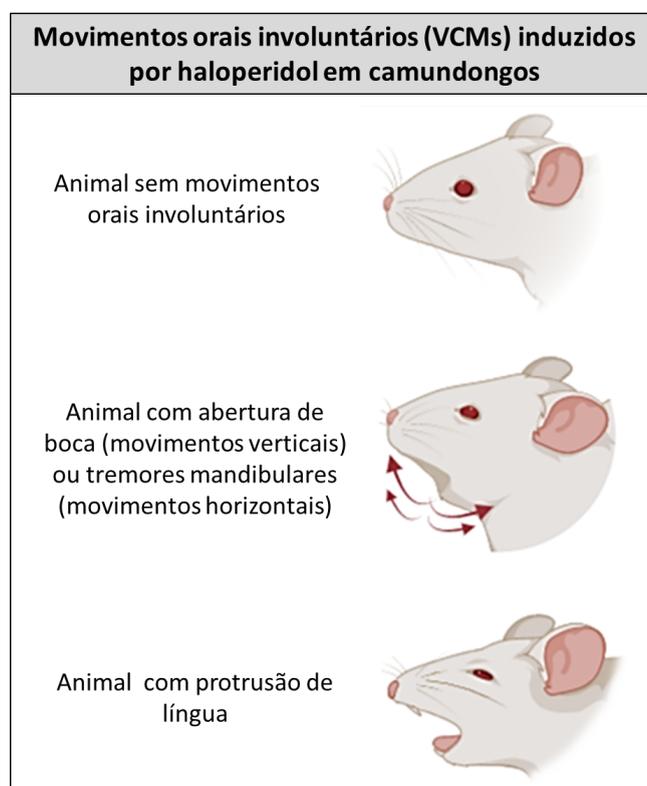


Figura 9: Representação dos movimentos orais involuntários (VCMs) em modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol em camundongos. Imagem criada no BioRender pela própria autora.

- Experimento 1: Delineamento das curvas temporais e de dose-resposta do haloperidol.

Para padronização metodológica e caracterização do efeito do haloperidol, curvas temporais e de dose-resposta foram delineadas. Para este fim, os animais foram tratados por 14 dias com haloperidol 1, 2 ou 3mg/kg; os movimentos foram avaliados 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção nos dias 1, 7 e 14. Adicionalmente, uma nova avaliação foi efetuada no 15º dia, 24 horas após a última injeção de haloperidol. O protocolo é esquematizado na Figura 10.

Os resultados foram analisados por *one way* ANOVA de medidas repetidas, sendo a variável o tempo, seguida de *posthoc* Tukey, $p < 0,05$ no GraphPad Prism 8.

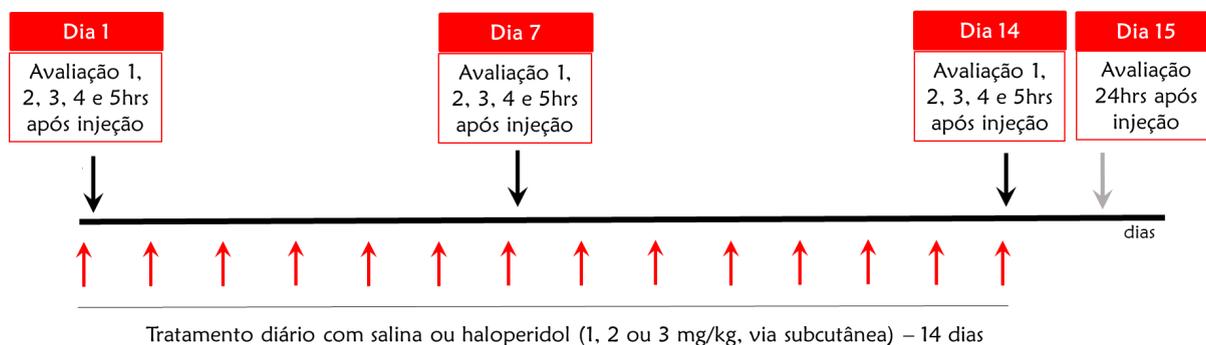


Figura 10: Desenho experimental do delineamento das curvas temporais e de dose-resposta do haloperidol (1, 2 e 3mg/kg) e salina. Seta preta: avaliação dos VCMs 1-5 horas após administração de haloperidol; seta cinza: avaliação dos VCMs 24 horas após administração de haloperidol; seta vermelha: administração de haloperidol (1, 2 ou 3mg/kg, via subcutânea) ou salina.

- Experimento 2: Investigação do efeito de **prevenção** do CBG em modelo de discinesia tardia.

Uma vez que não houve diferença entre as avaliações nas horas 1-5 após tratamento, para os experimentos seguintes foi determinado que as avaliações seriam realizadas no 1º e 14º dias, 2 horas após a última injeção e no 15º dia, 24 horas após a última injeção, conforme esquematizado na Figura 11. Foram realizados dois experimentos: o primeiro (chamado de 2A) objetivou testar as doses de 3 e 10mg/kg, e o segundo (chamado de 2B) objetivou reproduzir os resultados na dose de 10mg/kg e testar a de 30mg/kg. Os animais foram tratados por 14 dias com haloperidol (3mg/kg), precedido em 30 minutos por administração intraperitoneal de CBG (3, 10 ou 30mg/kg). Os dados comportamentais foram analisados no GraphPad Prism 8 por *two way* ANOVA de medidas repetidas, sendo as variáveis tempo e tratamento, seguida de *posthoc* Tukey, $p < 0,05$.

No experimento 2B foi também analisada, imediatamente após a avaliação dos VCMs, a atividade motora dos animais através do actímetro. Eles foram alocados no centro de uma arena quadrada (45 x 45 x 35cm), onde é permitida a livre exploração do aparato durante 5 minutos. De forma automática, o actímetro quantifica os movimentos horizontais, movimentos verticais e estereotipia, sendo estes parâmetros subdivididos em movimentos rápidos e lentos.

Em ambos os experimentos, após avaliação no 15º dia, os animais foram sacrificados e os encéfalos dissecados. No experimento 2A, os encéfalos foram colocados em uma matriz de seccionamento coronal que permitiu cortá-los na região do estriado medial. A porção rostro-medial foi envolvida em *tissuetech* e congelada em nitrogênio líquido para posterior análise das espécies reativas de oxigênio (ROS). A porção medial-caudal do estriado foi colocada em solução fixadora de Somogyi por 48 horas, crioprotetida em solução de sacarose 30%, congelada com isopentano em gelo seco a cerca de -40°C e depois armazenada em freezer -80°C. Para o experimento 2B, o encéfalo inteiro foi fixado com Somogyi e congelado em isopentano, segundo protocolo descrito. Posteriormente, este tecido foi seccionado coronalmente no criostato (30µm) e as secções foram acomodadas em tubos eppendorf com solução anticongelante e armazenadas a -20°C até a execução de imunohistoquímica (IHQ) para marcação da proteína FosB e da microglia.

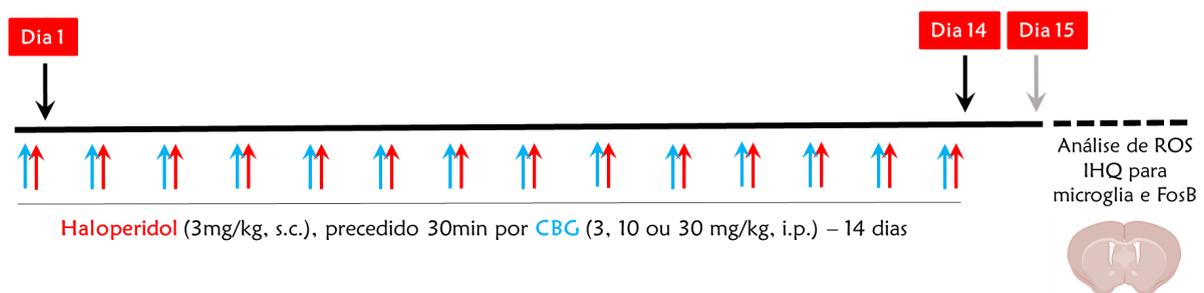


Figura 11: Desenho experimental para investigação do efeito do CBG (3, 10 ou 30mg/kg) no modelo de discinesia tardia. Seta preta: avaliação dos VCMs e da atividade motora 2 horas após administração de haloperidol; seta cinza: avaliação dos VCMs e da atividade motora 24 horas após administração de haloperidol; seta azul: administração de CBG (3, 10 ou 30mg/kg, via intraperitoneal); seta vermelha: administração de haloperidol (3mg/kg, via subcutânea).

- Experimento 3: Investigação do efeito de **reversão** do CBG em modelo de discinesia tardia.

Após avaliar o efeito do CBG administrado concomitantemente ao haloperidol, seu efeito de reversão foi testado. Para isso, os animais foram tratados por 14 dias com haloperidol (3mg/kg, s.c.) e avaliados nos dias 1 e 14, 2 horas após tratamento, e no dia 15, 24 horas após tratamento. Posteriormente a esta avaliação, foi iniciada administração de CBG (10mg/kg, s.c.) e 30 minutos após, de haloperidol, por 5 dias. Uma nova avaliação foi efetuada no 20º dia, 24 horas após o último tratamento com haloperidol. Em todos os dias de avaliação dos VCMs, a atividade motora dos animais também foi medida pelo teste do actímetro. Imediatamente após o teste motor no 20º dia, os animais foram sacrificados, os

encéfalos dissecados e congelados como descrito anteriormente para análise de ROS. O desenho experimental é retratado na Figura 12.

Os dados comportamentais foram analisados no GraphPad Prism 8 por *two way* ANOVA de medidas repetidas, sendo as variáveis tempo e tratamento, seguida de *posthoc* Tukey, $p < 0,05$. Para o teste do actímetro, o *posthoc* empregado foi Sidak, $p < 0,05$.

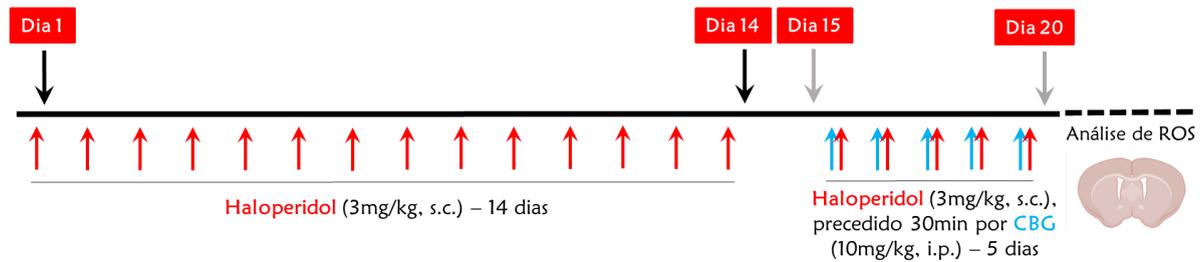


Figura 12: Desenho experimental para investigação do efeito de reversão do CBG no modelo de discinesia tardia. Seta preta: avaliação dos VCMs e atividade motora 2 horas após administração de haloperidol; seta cinza: avaliação dos VCMs e atividade motora 24 horas após administração de haloperidol; seta azul: administração de CBG (10mg/kg, via intraperitoneal); seta vermelha: administração de haloperidol (3mg/kg, via subcutânea).

- **Experimento 4:** Investigação da associação CBD + CBG em modelo de discinesia tardia.

Os animais receberam durante 14 dias CBD (30 ou 10mg/kg, i.p, volume de 5ml/kg), após 30 minutos CBG (15 ou 1mg/kg, volume de 5ml/kg) ou veículo e após outros 30 minutos, haloperidol (3mg/kg, s.c.) ou veículo. Desta forma, as proporções de associação entre os canabinoides investigadas foram 2:1 ou 10:1. As doses de CBG foram escolhidas com base no experimento anterior e as de CBD com base na literatura, objetivando fazer combinações de doses subefetivas dos canabinóides.

As avaliações foram realizadas no 1º e 14º dias, 2 horas após a última injeção, e no 15º dia, 24 horas após a última injeção. Da mesma forma que no experimento anterior, após cada avaliação os animais foram submetidos ao teste do actímetro e após a última análise os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os encéfalos removidos e congelados para análise de ROS. O desenho experimental é esquematizado na Figura 13.

Os dados comportamentais foram analisados no GraphPad Prism 8 por *two way* ANOVA de medidas repetidas, sendo as variáveis tempo e tratamento, seguida de *posthoc* Tukey, $p < 0,05$.

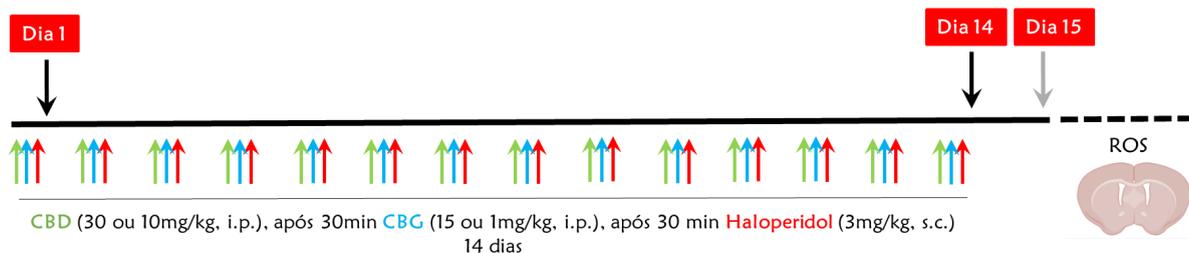


Figura 13: Desenho experimental para investigação da associação CBD+CBG no modelo de discinesia tardia. Seta preta: avaliação dos VCMs e atividade motora 2 horas após administração de haloperidol; seta cinza: avaliação dos VCMs e atividade motora 24 horas após administração de haloperidol; seta verde: administração de CBD (30 ou 10mg/kg) seta azul: administração de CBG (15 ou 1mg/kg, via intraperitoneal); seta vermelha: administração de haloperidol (3mg/kg, via subcutânea).

3.4.2. Análises imunohistoquímicas

- Proteína FosB

As secções passaram por três lavagens de 5 minutos cada com tampão A para remoção de resíduos de solução anticongelante. Depois foram submetidas ao procedimento de recuperação antigênica pelo aquecimento em banho-Maria a 80°C durante 30 minutos em solução de tampão citrato. Após as secções retornarem à temperatura ambiente, a atividade peroxidase endógena foi bloqueada por meio da incubação com H₂O₂ 0,5% em Tampão A durante 30 minutos. Seguiu-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com soro albumina bovina (BSA) 2% em tampão A contendo soro específico do anticorpo secundário a 5% (*normal goat serum*, Vector Laboratories). Logo em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo primário anti-FosB durante 48 horas a 4°C (dados do anticorpo na tabela 4).

Após este período, as secções foram incubadas com anticorpo secundário biotilado, diluído em tampão A na concentração de 1:300 (*goat, anti-rabbit*, Vector) durante 90 minutos. Posteriormente, foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, CA, EUA, 1:300) durante 2 horas. As secções passaram por três lavagens de 5 minutos cada com tampão acetato.

A atividade da enzima peroxidase foi revelada por adição do cromógeno tetrahidroclorato de 3,3 diamino-benzidina 10mg (DAB, Sigma) e Sulfato de Níquel diluídos em tampão acetato, contendo H₂O₂ 30%. Amostras de cada grupo experimental foram processadas ao mesmo tempo. Por fim, as secções passaram por três lavagens de 5 minutos cada com tampão acetato. Todo o processo foi feito sob leve e constante agitação no *shaker* (Shaker Gyromax™), e entre cada etapa foram realizadas três lavagens com Tampão A de 5 minutos cada.

As secções foram montadas com solução de montagem em lâminas gelatinizadas e passaram por diafanização através de banhos em uma série de concentrações crescentes de álcoois e xilol. As lâminas foram cobertas com meio permanente (Entellan™, Merck-Germany) para observação no microscópio.

- Microglia

Para identificação da micróglia foi utilizado o anticorpo contra a molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1 (Iba-1).

As secções passaram por três lavagens de 5 minutos cada com tampão A para remoção de resíduos de solução anticongelante. Depois foram submetidas ao procedimento de recuperação antigênica pelo aquecimento em banho-Maria a 70°C durante 30 minutos em solução de tampão citrato de sódio. Após as secções retornarem à temperatura ambiente, a atividade peroxidase endógena foi bloqueada por meio da incubação com H₂O₂ 1% em tampão A durante 30 minutos. Seguiu-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com soro albumina bovina (BSA) 2% em tampão A contendo soro específico do anticorpo secundário a 5% (*normal goat serum*, Vector Laboratories). Posteriormente, foi realizada a incubação com anticorpo primário anti-Iba-1 durante 48 horas a 4°C (dados do anticorpo na tabela 4).

Após este período, as secções foram incubadas com anticorpo secundário, diluído em tampão A na concentração de 1:300 (*goat, anti-rabbit*, Vector) durante 90 minutos. Seguiu-se a incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, CA, EUA, 1:300) durante 2 horas.

A atividade da enzima peroxidase foi revelada por adição do cromógeno tetrahydrocloroto de 3,3 diamino-benzidina 10mg (DAB, Sigma) e Sulfato de Níquel diluídos em TBS 0,1M, contendo H₂O₂ 30%. Amostras de cada grupo experimental foram processadas ao mesmo tempo. As secções passaram por três lavagens de 5 minutos cada com TBS 0,25M. Todo o processo foi feito sob leve e constante agitação no *shaker* (Shaker Gyromax™), e entre cada etapa foram realizadas três lavagens com Tampão A de 5 minutos cada.

As secções foram montadas com solução de montagem em lâminas gelatinizadas e passaram por diafanização através de banhos em uma série de concentrações crescentes de álcoois e xilol. As lâminas foram cobertas com meio permanente (Entellan™, Merck-Germany) para observação no microscópio.

Tabela 4: Lista de anticorpos primários utilizados nas imunohistoquímicas.

Anticorpo primário	Marca	Hospedeiro	Diluição
Anti-FosB	Cell Signaling	Rabbit	1:2000
Anti-Iba-1	Abcam	Rabbit	1:2000

Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.4.3. Aquisição de imagens

Para execução de ambas as reações imunohistoquímicas, secções do estriado (30 μ m) obtidas por cortes no criostato foram escolhidas de forma a conter cerca de 2-3 secções/poço de cada região de interesse. Para análise, uma secção de cada região de interesse foi escolhida. Sendo os tratamentos dos animais sistêmicos, apenas um hemisfério das secções foi analisado.

Ao longo de sua extensão, o estriado foi dividido em 3 níveis, segundo o atlas neuroanatômico de camundongos (PAXINOS & FRANKLIN, 2008). Foram eles: rostral (Bregma 0,74mm), medial (Bregma 0,14mm) e caudal (Bregma -0,58mm). Em cada um desses níveis, foram analisadas as regiões de interesse: o estriado, subdivido em quadrantes dorso-medial (DM) e dorsolateral (DL); *nucleo accumbens* (NAc), nas suas porções *shell* (NAcSh) e *core* (NAcC) (presentes apenas no nível rostral do estriado); e o córtex cingulado. Essa divisão é representada na Figura 14.

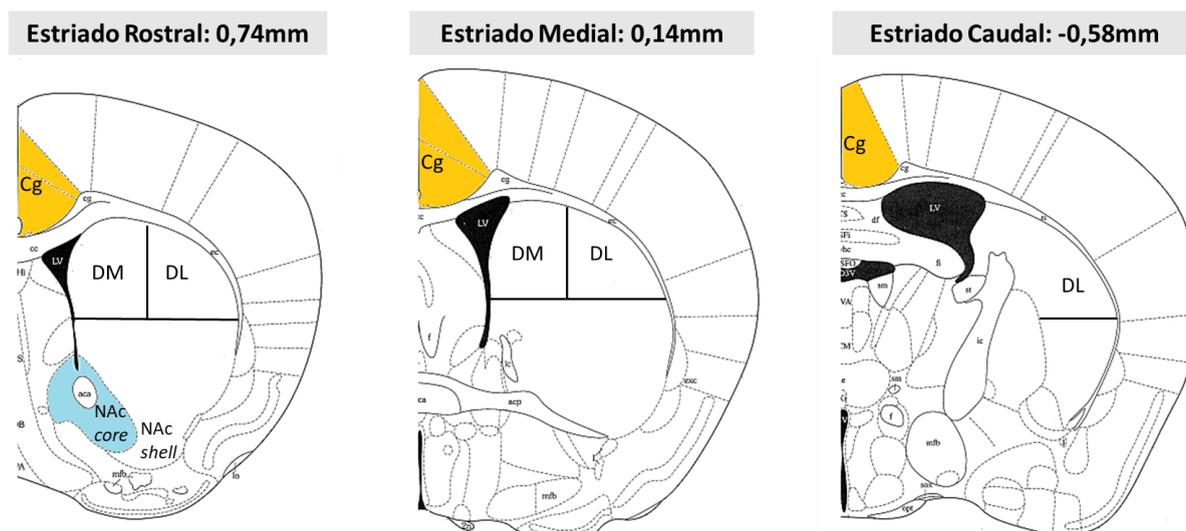


Figura 14: Representação ilustrativa dos bregmas das secções para análises imunohistoquímicas. O estriado foi dividido em rostral, medial e caudal. Dentro de cada uma destas regiões, ainda, o estriado foi subdivido em quadrantes. Nas secções rostrais e mediais foram analisadas as áreas dorso-medial

(DM) e dorso-lateral (DL) e nas secções caudais a DL. Adicionalmente, também foi analisado o NAc, nas porções *core* - em azul- e *shell*, e o córtex cingulado (em laranja). Adaptado de Franklin e Paxinos (2008).

As imagens de ambas as imunohistoquímicas foram obtidas com câmera fotográfica Leica (DFC450) acoplada a um microscópio de luz da mesma procedência e transmitidas a um computador equipado com um programa de análise de imagens (Leica Application Suite, versão 4) para ajustes de luz e cores. Todas as imagens foram adquiridas com a objetiva de 40x. As configurações de câmera e luz foram otimizadas para evitar saturação do sinal e mantidas constantes até o final das análises.

3.4.4. Análise de imagens

- FosB

Para análise da expressão de FosB, através de configurações específicas no *software* ImageJ, foi feita contagem automática do número de neurônios marcados nas regiões de interesse. Foi realizada *one way* ANOVA e diferenças entre os grupos foram apontadas através de *posthoc* Tukey, $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 8.

- Microglia

Para microglia, foram realizadas duas análises: a mensuração da densidade óptica integrada (DOI), a qual corresponde à soma dos valores de pixels de uma imagem e é equivalente ao produto da “Área” selecionada e da “Média da Densidade Óptica”. Também foram analisadas modificações morfológicas nas ramificações e corpo de células Iba1+. O protocolo de análise da morfologia da microglia foi adaptado de Young e Morrisson (2018). De forma resumida, para análise das ramificações, as imagens foram transformadas em escalas de cinza (8-bit), convertidas para binárias e esqueletizadas. Os esqueletos resultantes foram analisados por meio do *plugin Analyze Skeleton (2D/3D)*, do *software* Fiji ImageJ que quantificou os pontos de extremidade (endpoints), número e comprimento das ramificações (μm) por célula (Figura 15). Os resultados foram expressos em números ou comprimento (μm) por $0,5\text{mm}^2$, que é a área da imagem. Foi realizada *one way* ANOVA e diferenças entre os grupos foram apontadas através de *posthoc* Tukey, $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 8.

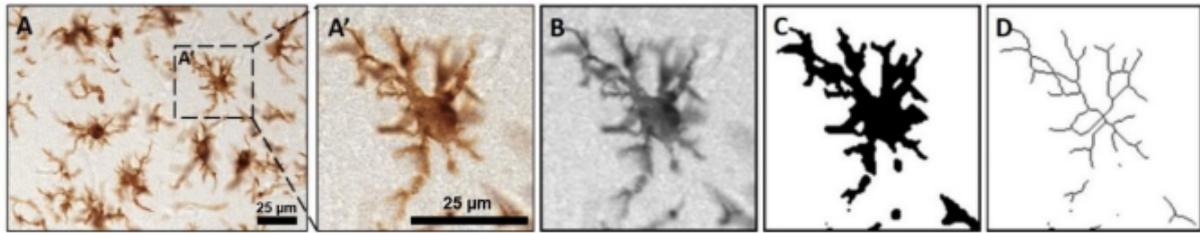


Figura 15: Exemplo de análise morfológica em micróglia. A: Fotomicrografia células Iba-1+ no estriado dorso-lateral medial em aumento de 63x; B: Fotomicrografia célula Iba-1+ em escala de cinza (8-bit); C: Fotomicrografia célula Iba-1+ convertida em binária; D: Fotomicrografia célula Iba-1 + esqueletizada. Imagem retirada de Calaça, 2022.

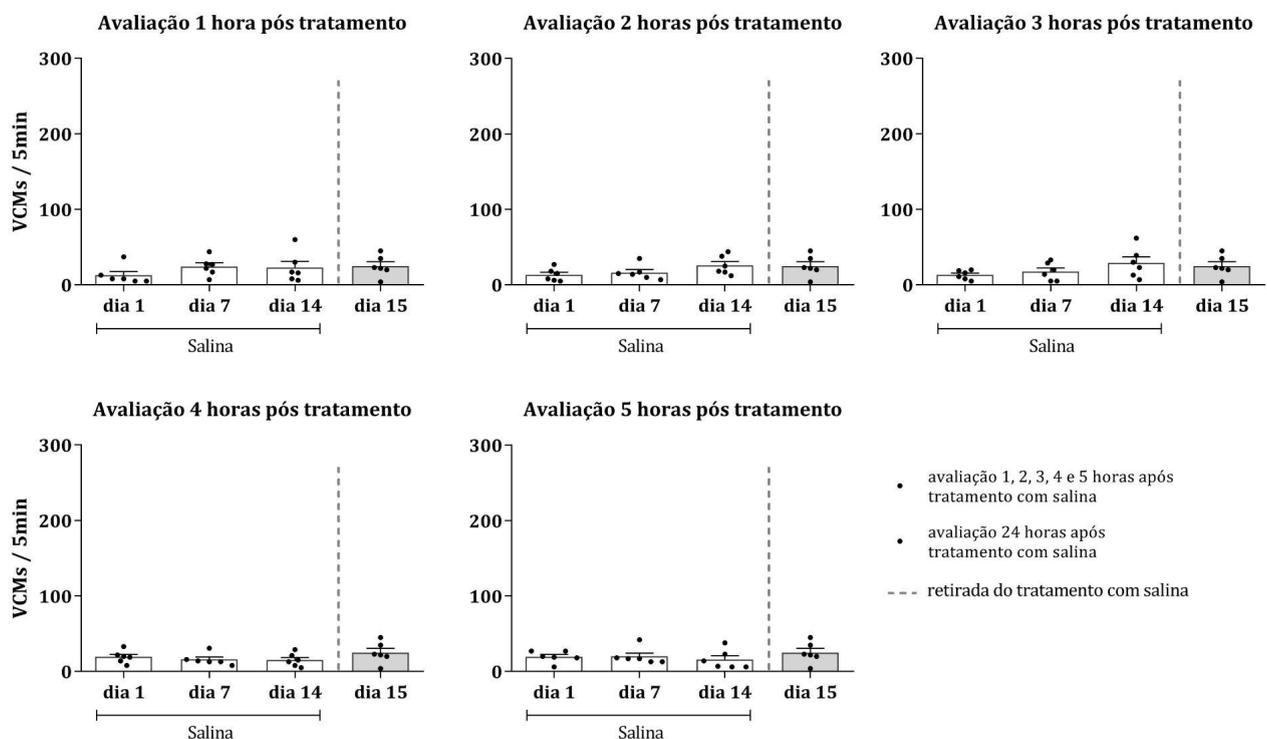
Para análise do corpo celular, o estriado dorso-lateral e dorso-medial e córtex cingulado analisados foram apenas a nível medial. Seis células de cada foto foram escolhidas para que a área fosse medida pelo programa. O critério para escolha das células foi o tamanho, sendo escolhidas as duas maiores, duas de tamanho médio e as duas menores da imagem analisada. Com a ferramenta do programa, foi feito um contorno em cima de cada uma das células escolhidas e o programa calculou a área automaticamente.

4. RESULTADOS

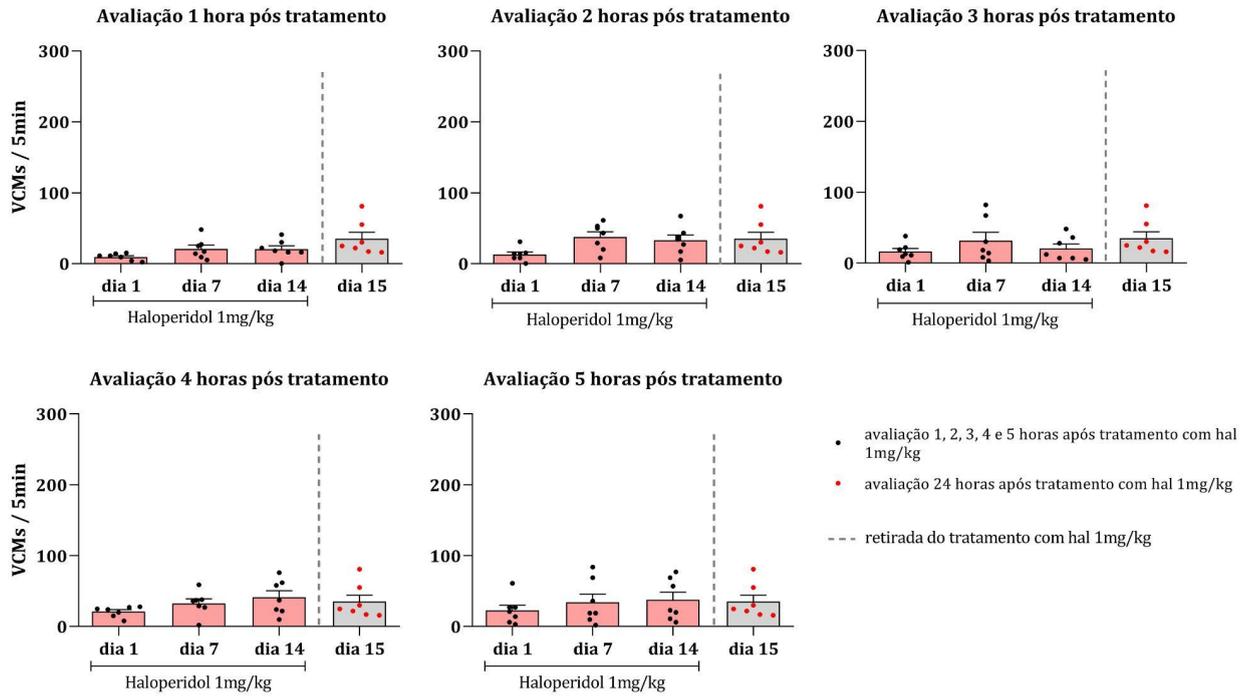
- Experimento 1: Delineamento das curvas temporais e dose-resposta do haloperidol.

O haloperidol na dose de 1mg/kg não induziu VCMs em nenhum dia e hora de avaliação (Figura 16, B). No entanto, este efeito motor induzido por haloperidol nas doses de 2 e 3mg/kg foi observado no 15º dia, 24 horas após a última injeção, avaliação que apresentou diferença em relação a todas as outras medidas em diferentes dias e horas após tratamento ($p < 0,05$, valores estatísticos na Tabela 6, referentes às doses de 2 e 3mg/kg, respectivamente), mostrando efeito do tempo (valores estatísticos na Tabela 5), conforme mostrado na Figura 16, C e D. Como esperado, a salina não induziu os VCMs em nenhum dia ou horário de tratamento (Figura 16, A).

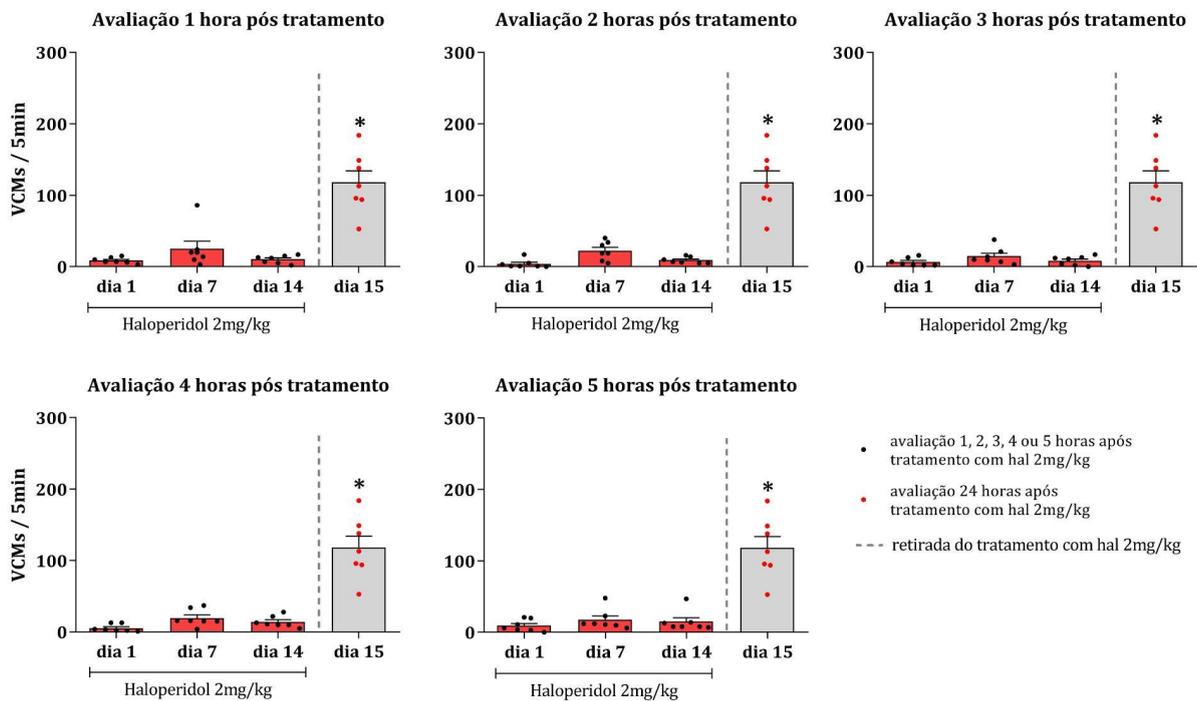
A) Curvas Temporais - Salina



B) Curvas Temporais - Haloperidol 1mg/kg



C) Curvas Temporais - Haloperidol 2mg/kg



D) Curvas Temporais - Haloperidol 3mg/kg

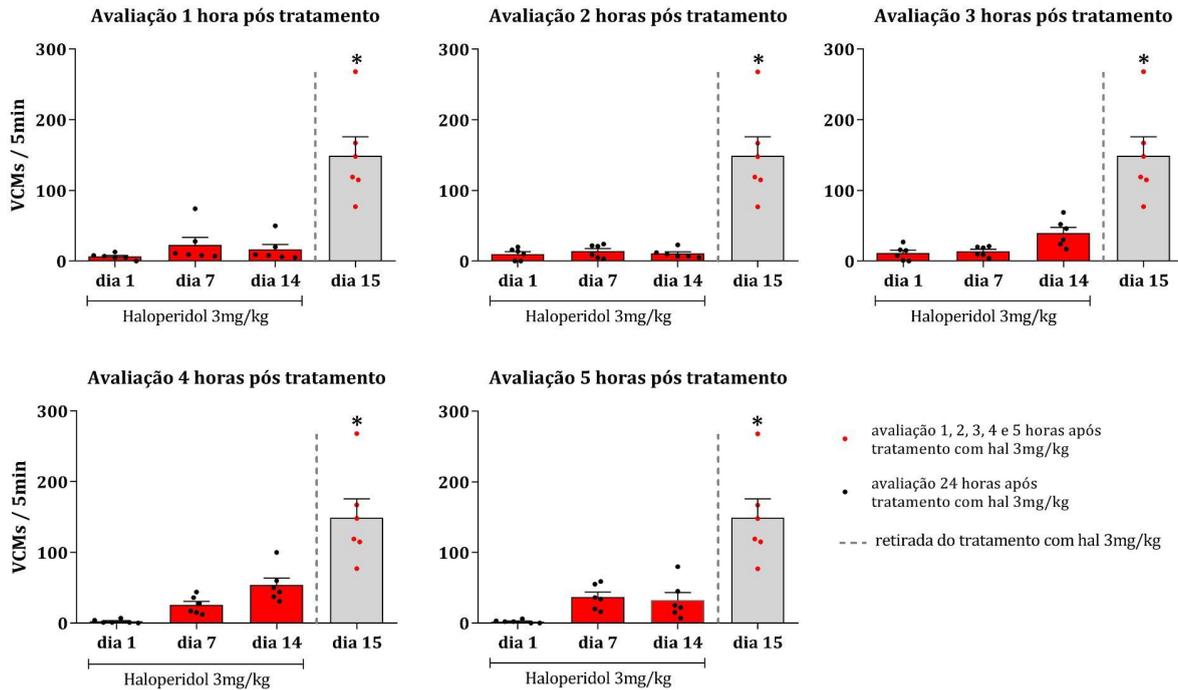


Figura 16: Curvas temporais da salina (A) e haloperidol (1, 2 ou 3mg/kg, B, C e D, respectivamente) no modelo de discinesia tardia. As avaliações foram realizadas no 1º, 7º e 14º dia, 1-5 horas após o tratamento e no 15º dia, 24 horas após o tratamento. * $p < 0,05$ em relação às avaliações nos dias 1, 7 e 14. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Sumarizando os resultados obtidos nas avaliações do 15º dia de todas as doses, análise de *one way* ANOVA com a variável tratamento seguida de *posthoc* Tukey, $p < 0,05$, mostrou efeito do tratamento ($F(2, 17) = 10,81$, $p = 0,0009$) que sugere efeito dose-dependente, sendo a manifestação dos VCMs diretamente proporcional à dose utilizada, como mostrado na Figura 17. As doses de 2mg/kg ($p = 0,0098$) e 3mg/kg ($p = 0,0010$) foram diferentes da dose de 1mg/kg, mas não diferiram entre si.

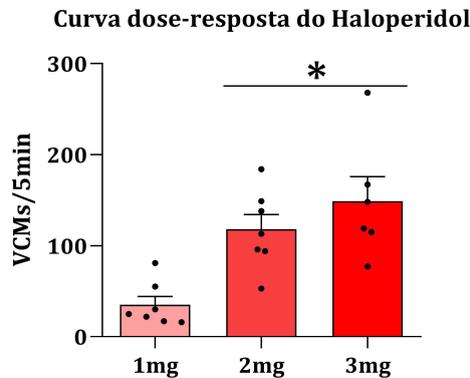


Figura 17: Curva dose-resposta do haloperidol nas doses de 1, 2 e 3mg/kg. Avaliação realizada no 15º dia, 24 horas após a última administração de haloperidol. * $p < 0,05$ em relação à dose de 1mg/kg. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

- Experimento 2: Investigação do efeito de prevenção do CBG em modelo de discinesia tardia.

Como descrito, a análise do efeito do CBG foi avaliada em dois experimentos, sendo que o primeiro (2A) avaliou as doses de 3 e 10mg/kg (Figura 18, A) e o segundo (2B), as doses de 10 e 30mg/kg (Figura 18, B).

O padrão de comportamento do experimento anterior foi reproduzido nestes dois experimentos, de forma que os VCMs só foram observados no 15º dia. No primeiro experimento, houve efeito do tratamento ($F(4, 40) = 6,904$, $p = 0,0003$), do tempo ($F(2, 80) = 65,35$, $p < 0,0001$) e interação entre as variáveis ($F(8, 80) = 7,901$, $p < 0,0001$). O grupo haloperidol foi diferente do grupo veículo ($p < 0,0001$). O CBG atenuou os VCMs nas doses de 3mg/kg ($p = 0,0321$) e 10mg/kg ($p = 0,0006$) e não os induziu *per se* na dose de 10mg/kg (Figura 18, A).

No segundo experimento, também houve efeito do tratamento ($F(5, 40) = 2,712$, $p = 0,0334$), do tempo ($F(2, 80) = 45,51$, $p < 0,0001$) e interação entre as variáveis ($F(10, 80) = 2,921$, $p = 0,0036$). No 15º dia foi observado aumento dos movimentos involuntários no grupo haloperidol em comparação ao grupo veículo ($p = 0,0004$). Houve redução em torno de 30% dos VCMs no grupo CBG10 + haloperidol em relação ao grupo haloperidol, no entanto não houve diferença estatística. O CBG na dose de 30mg/kg não atenuou os VCMs induzidos por haloperidol e nem os induziu *per se* (Figura 18, B).

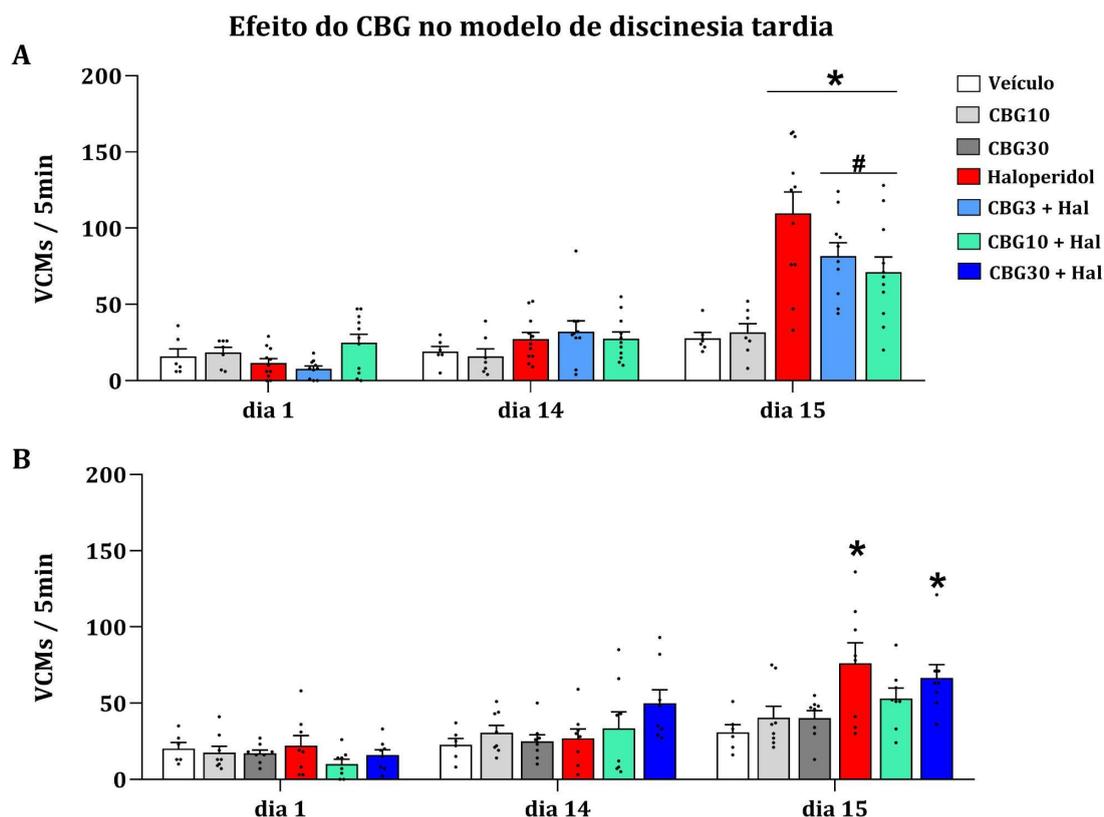


Figura 18: Investigação do efeito do CBG nas doses de 3, 10 e 30mg/kg no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol (3mg/kg). Avaliação realizada no 1º e 14º dias, 2 horas após tratamento com haloperidol e no 15º dia, 24 horas após a última administração de haloperidol. * $p < 0,05$ em relação aos grupos veículo, CBG10 e CBG30 na avaliação do 15º dia; # $p < 0,05$ em relação ao grupo haloperidol na avaliação do 15º dia. A: primeiro experimento para avaliação do efeito do CBG no modelo de discinesia tardia nas doses de 3 e 10mg/kg. B: segundo experimento para avaliação do efeito do CBG no modelo de discinesia tardia nas doses de 10 e 30mg/kg. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Apenas para o experimento 2B, posteriormente à avaliação dos VCMs em cada um dos dias descritos, os animais foram submetidos à avaliação da atividade motora pelo actímetro. Houve efeito do tempo, tratamento e interação entre estas variáveis em cada um dos parâmetros de atividade motora avaliados (dados estatísticos na Tabela 7). No 1º e 14º dias os animais que receberam haloperidol sozinho ou em combinação com CBG, independente da dose, tiveram movimentos horizontais, verticais e estereotipia drasticamente reduzidos em relação aos grupos veículo, CBG10 e CBG30 ($p < 0,05$), conforme mostrado na Figura 19. No 15º dia, no entanto, 24 horas após o tratamento com haloperidol, esta diferença em relação aos grupos controle foi extinta em todos estes parâmetros. Os resultados são mostrados como a somatória dos movimentos lentos e rápidos (Figura 19).

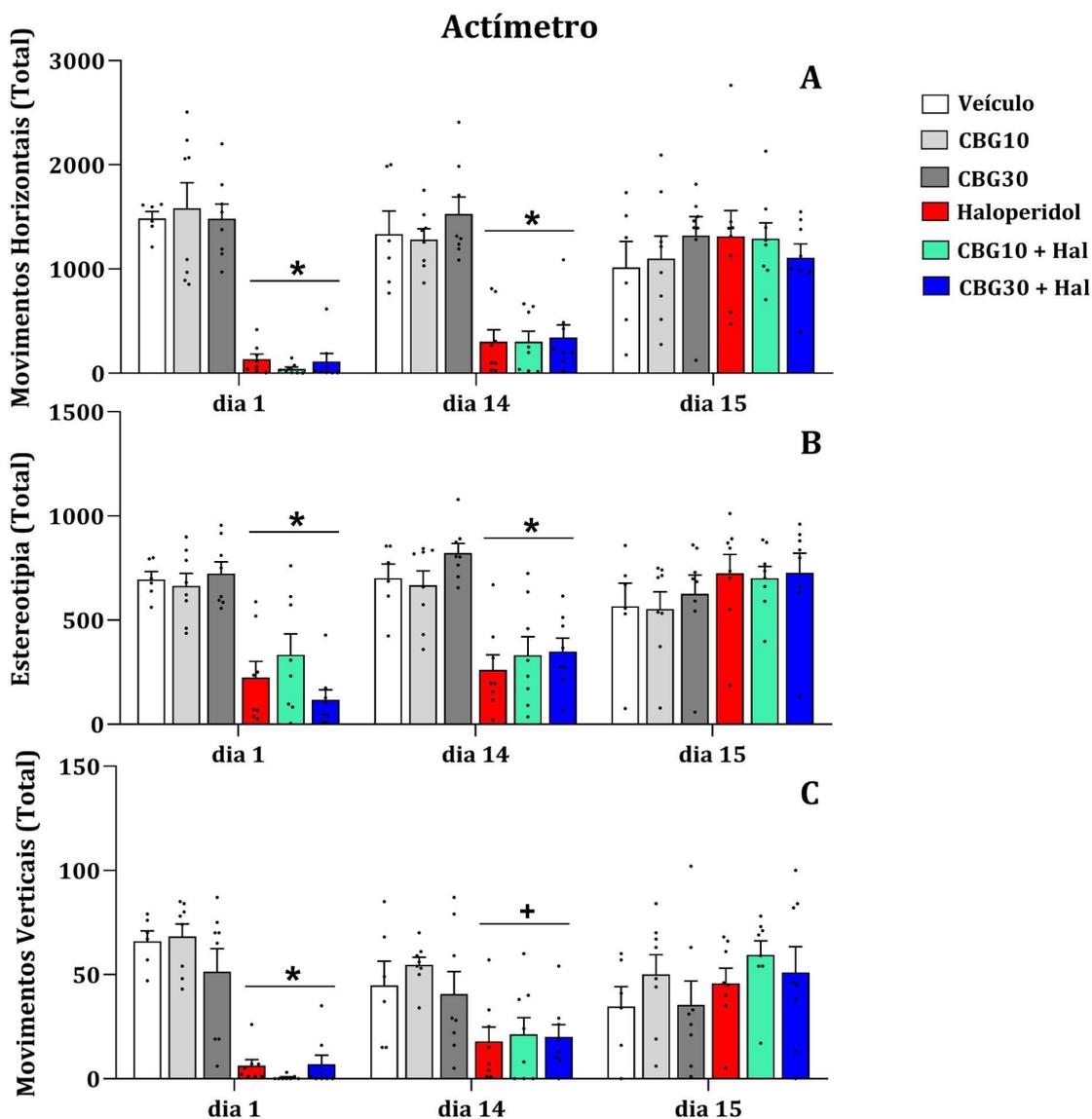


Figura 19: Teste do actímetro no experimento 2B para investigação do efeito do CBG nas doses de 10 e 30mg/kg sobre atividade motora de animais tratados com haloperidol (3mg/kg). A: Somatório dos movimentos horizontais lentos e rápidos; B: Somatório dos movimentos de estereotipia lentos e rápidos; C: Somatório dos movimentos verticais lentos e rápidos. Avaliações realizadas no 1º e 14º dias, 2 horas após tratamento com haloperidol e no 15º dia, 24 horas após a última administração de haloperidol. * $p < 0,05$ em relação aos grupos veículo, CBG10 e CBG30 nos respectivos dias de avaliação; + $p < 0,05$ em relação ao grupo CBG10 no seu respectivo dia de avaliação. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Imunohistoquímica para a proteína FosB:

Em ambos os experimentos, 2A e 2B, após sacrifício, os encéfalos dos animais foram removidos para análise da expressão de FosB no estriado dorso-medial e dorso-lateral, NAcC, NAcSh e córtex cingulado dos animais. Os resultados foram similares em ambos os experimentos, portanto aqui são apresentados apenas os dados do experimento 2B. Adicionalmente, uma vez que o padrão de expressão de FosB foi semelhante entre os níveis

rostral, medial e caudal, em suas diferentes áreas analisadas, as fotomicrografias apresentadas abaixo são referentes apenas ao nível medial (Figuras 21, 23 e 25).

Houve efeito do tratamento na região dorso-lateral do estriado rostral, medial e caudal, levando a um aumento significativo da expressão de FosB nos grupos que foram tratados com haloperidol em relação ao grupo veículo (dados estatísticos apresentados na Tabela 8), conforme mostrado na Figura 20, A. No entanto, o CBG, independente da dose, não reverteu esse aumento de expressão (Figura 20 A, C e E e 21 A, C e E).

Não foi encontrado efeito do tratamento sobre expressão de FosB na região dorso-medial do estriado rostral e medial. Ainda, o CBG *per se* não levou ao aumento da expressão de FosB nesta região (Figura 20B e 21B).

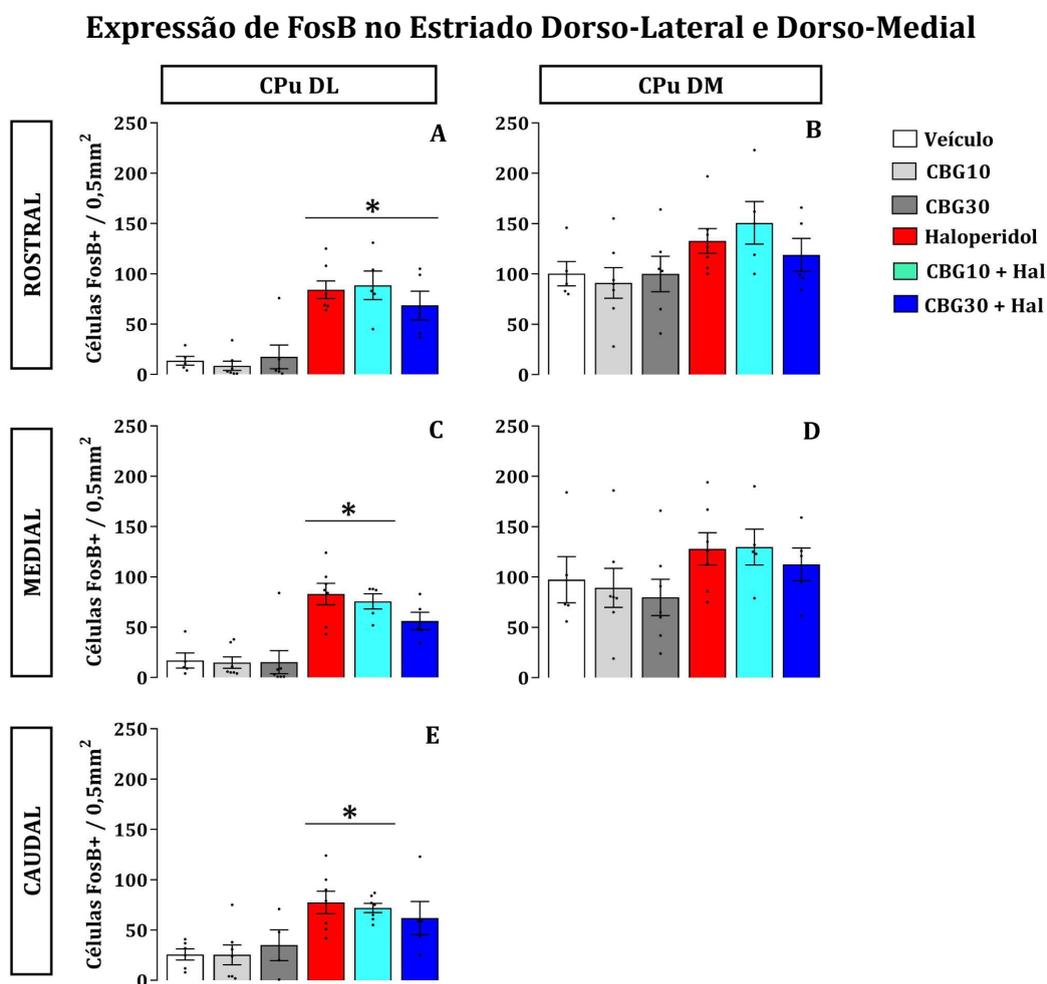


Figura 20: Comparação da expressão de FosB no estriado dorso-lateral e dorso-medial a nível rostral, medial e caudal. CPu: estriado; DL: dorso-lateral; DM: dorso-medial. A: estriado dorso-lateral rostral; B: estriado dorso-medial rostral; C: estriado dorso-lateral medial; D: estriado dorso-medial medial; E: estriado dorso-lateral caudal. * $p < 0,05$ em relação aos grupos veículo, CBG10 e CBG30. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Células FosB+ no Estriado Dorso-Lateral e Dorso-Medial (Medial)

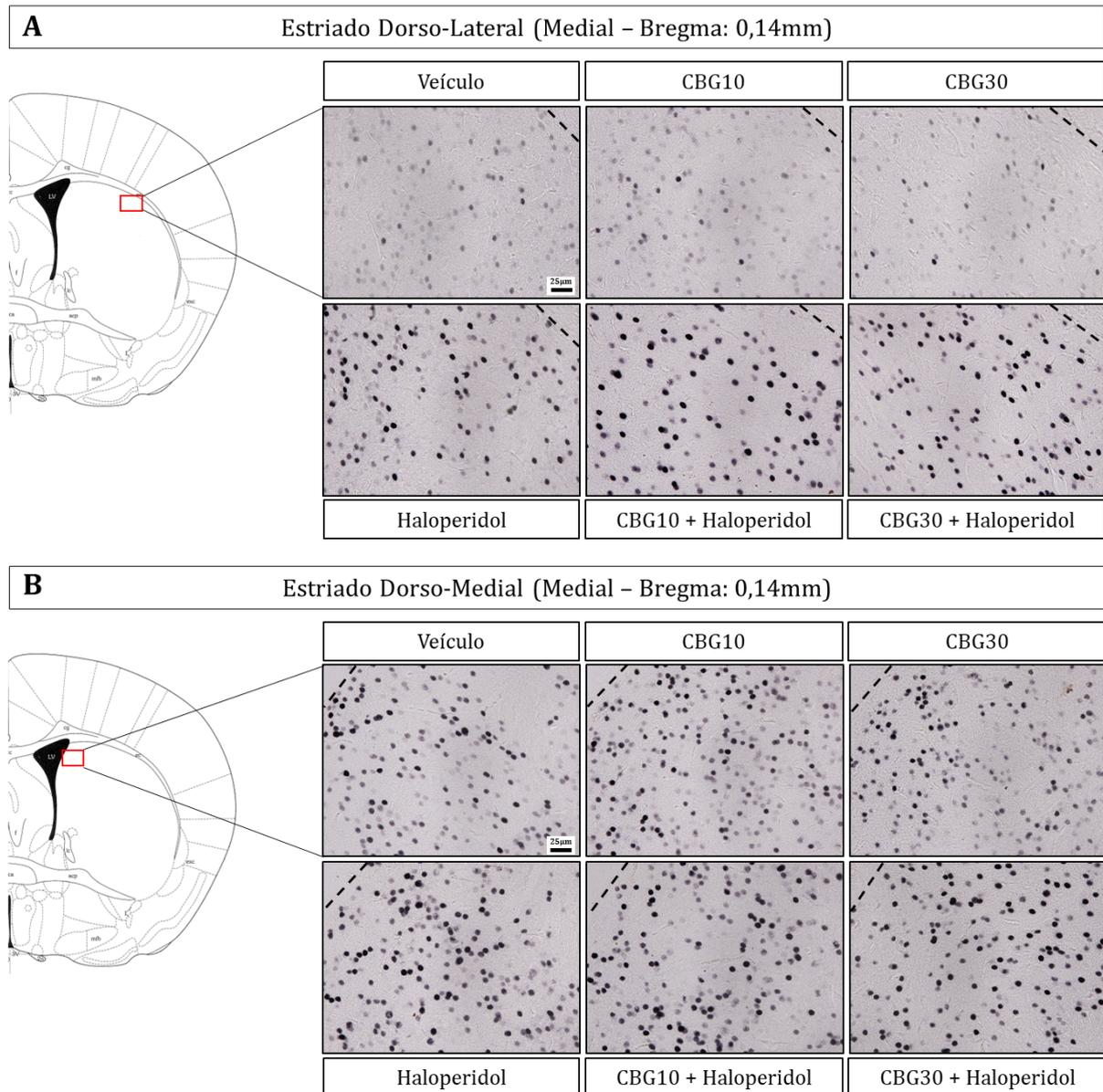


Figura 21: Fotomicrografias representativas da expressão de FosB nas regiões do estriado dorso-lateral (A) e do estriado medial (B) a nível medial (bregma: 0,14mm). Há um aumento da expressão de FosB no estriado dorso-lateral nos grupos Haloperidol, CBG10+Hal e CBG30+Hal em comparação com os grupos controle. No estriado dorso-medial, a expressão é semelhante para todos os grupos. Linha pontilhada nas imagens do estriado dorso-medial mostra divisão com o ventrículo ao lado. Linha pontilhada nas imagens do estriado dorso-lateral mostra divisão com o corpo caloso ao lado. Aumento de 40x. Barra da escala: 25µm.

Com relação ao NAc, não houve diferença significativa da expressão de FosB em nenhuma das regiões, *core* e *shell*, analisadas (Figura 22 e 23).

Expressão de FosB no NAcC e NAcSh

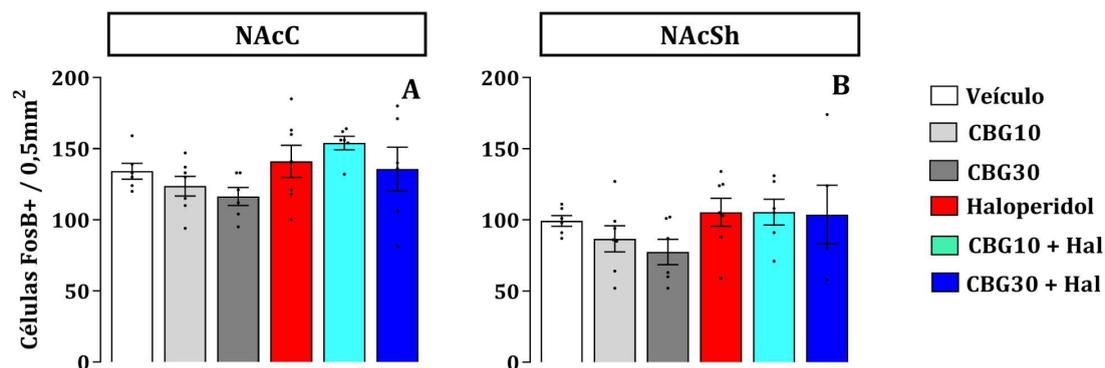


Figura 22: Comparação da expressão de FosB entre o NAcC (A) e NAcSh (B). Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Células FosB+ no Nucleo Accumbens (core e shell)

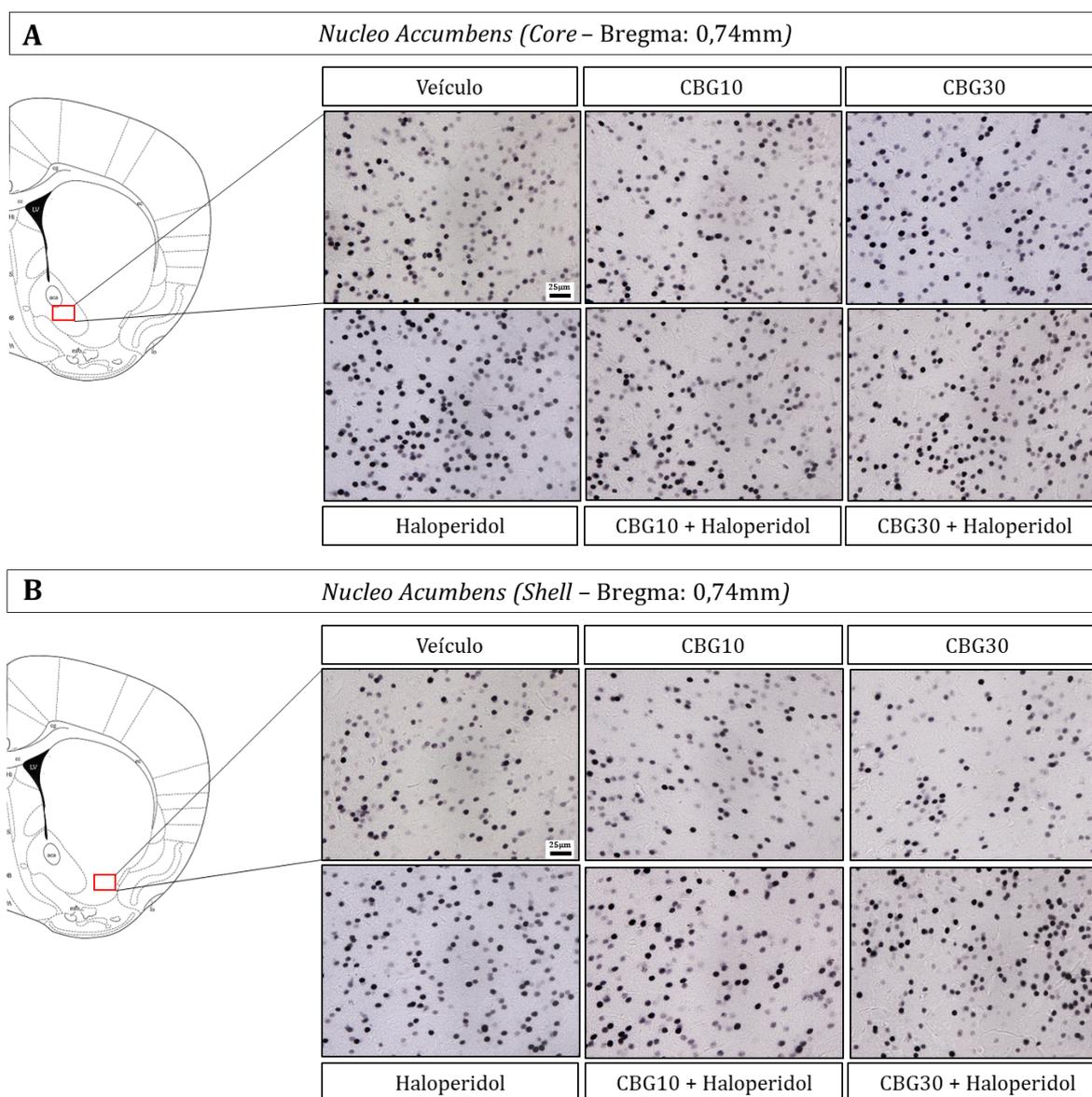


Figura 23: Fotomicrografias representativas da expressão de FosB NAcC (A) e NAcSh (B), bregma: 0,74mm. Há um aumento da expressão de FosB no NAcC do grupo haloperidol em relação ao grupos CBG10. No NAcSh, a expressão é semelhante para todos os grupos. Aumento de 40x. Barra da escala: 25 μ m.

A expressão de FosB no córtex cingulado rostral, medial e caudal não foi alterada por nenhum tratamento em relação ao controle (Figuras 24 e 25).

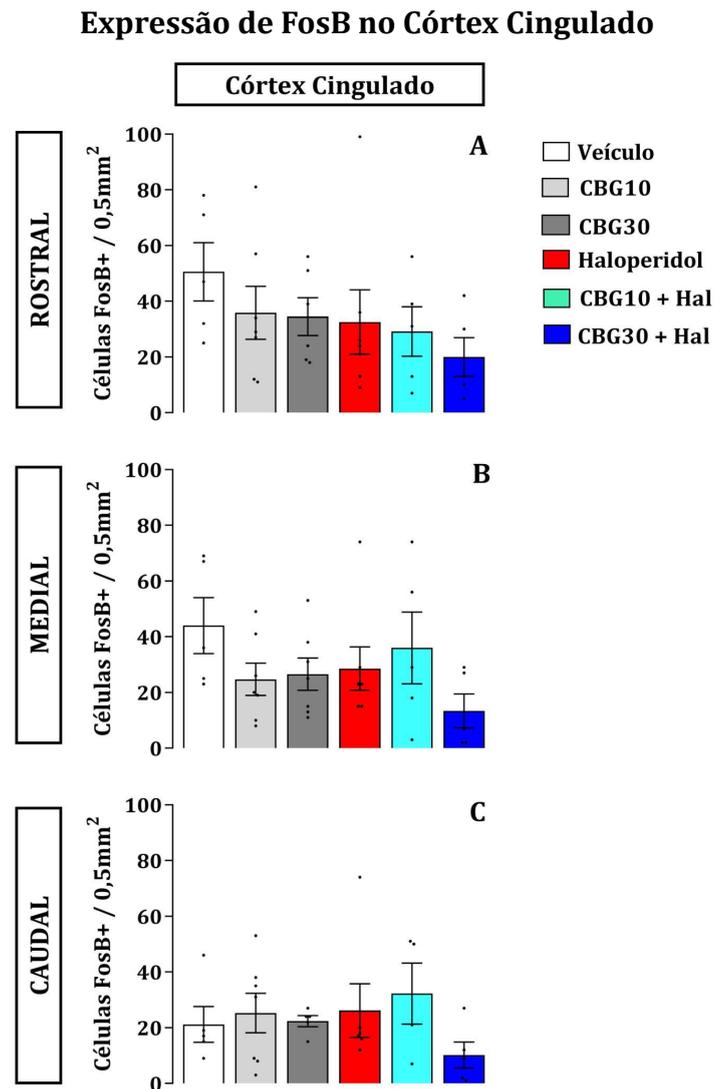


Figura 24: Comparação da expressão de FosB no córtex cingulado a nível rostral (A), medial (B) e caudal (C). Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Células FosB+ no Córtex Cingulado (Medial)

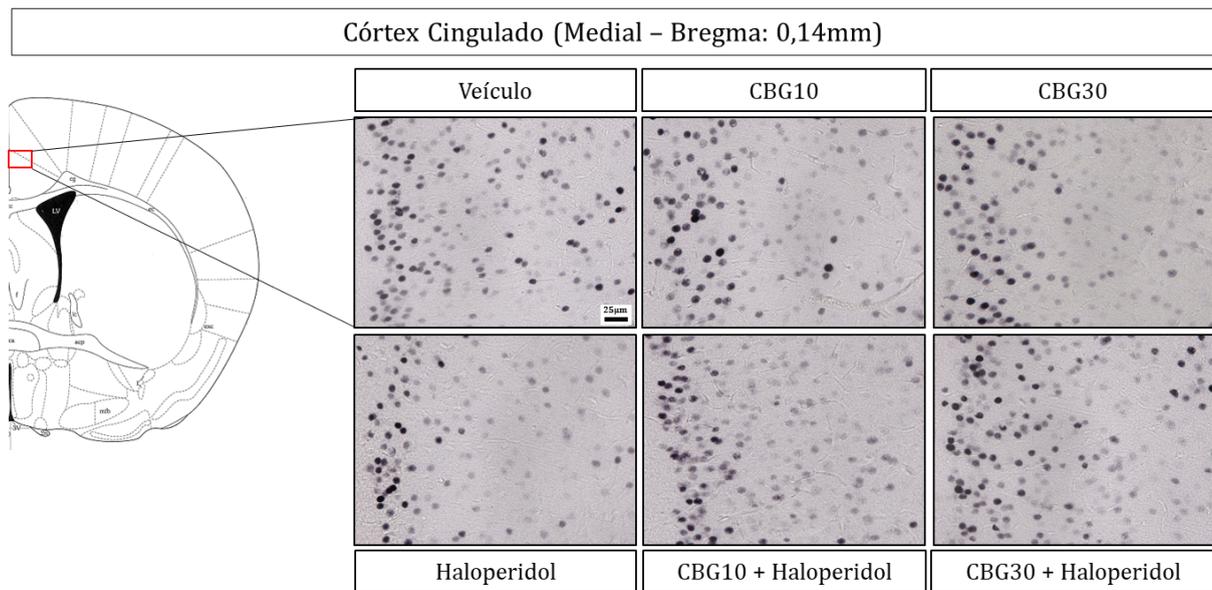


Figura 25: Fotomicrografias representativas da expressão de FosB no córtex cingulado a nível medial (bregma: 0,14mm) (A). A expressão é semelhante para todos os grupos. Aumento de 40x. Barra da escala: 25 μ m.

Imunohistoquímica para microglia:

Da mesma forma que na análise anterior, aqui são mostrados apenas os resultados do experimento 2B.

Com relação à mensuração de Densidade Óptica Integrada (DOI), não houve efeito do tratamento no estriado dorso-lateral e dorso-medial (Figura 26), NAcC e NAcSh (Figura 27) e córtex cingulado (Figura 28) nos níveis rostral, medial e caudal do estriado.

Densidade Óptica Integrada de Microglia no Estriado Dorso-Lateral e Dorso-Medial

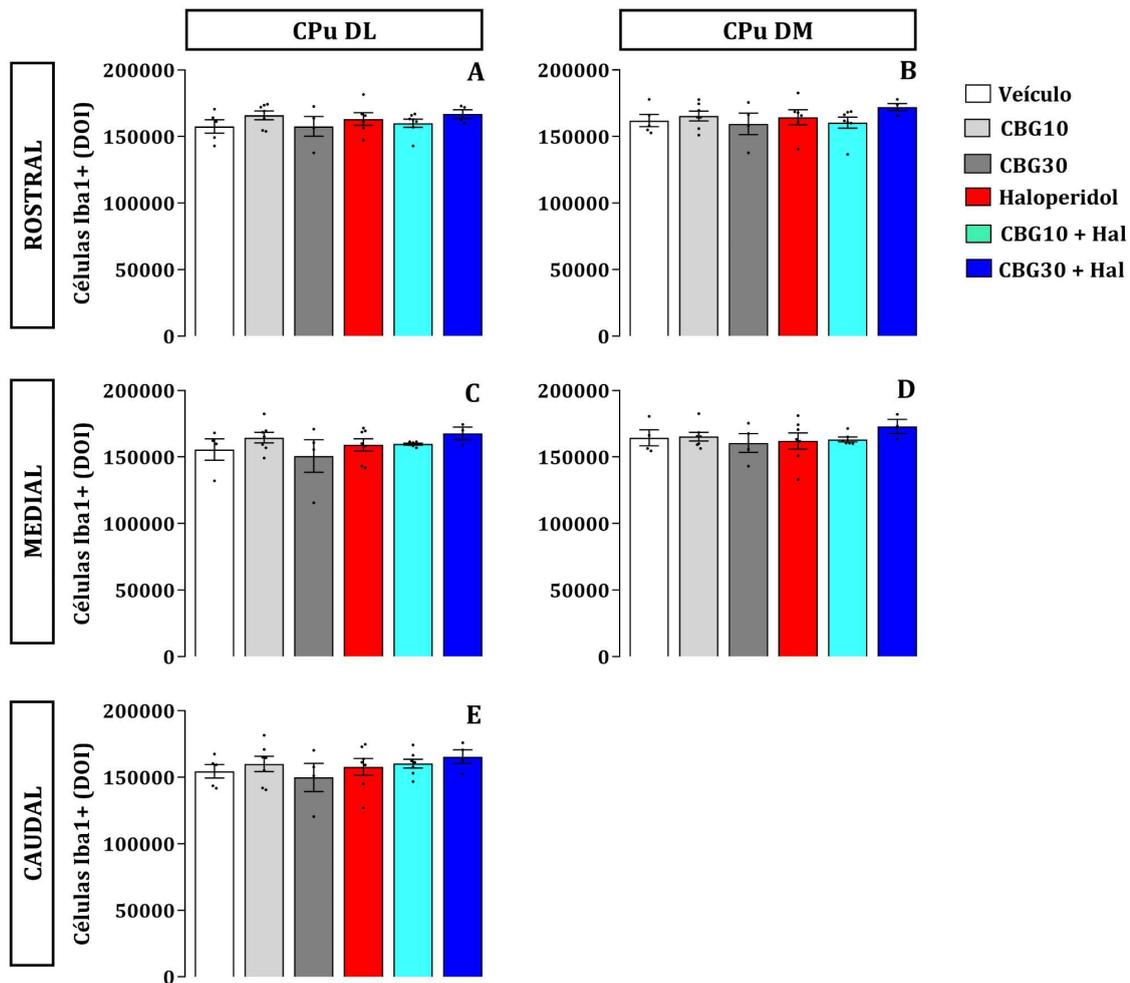


Figura 26: Comparação da mensuração de densidade óptica integrada (DOI) no estriado dorso-lateral e dorso-medial a nível rostral, medial e caudal. CPu: estriado; DL: dorso-lateral; DM: dorso-medial. A: estriado dorso-lateral rostral; B: estriado dorso-medial rostral; C: estriado dorso-lateral medial; D: estriado dorso-medial medial; E: estriado dorso-lateral caudal. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Densidade Óptica Integrada de microglia no NAcC e NAcSh

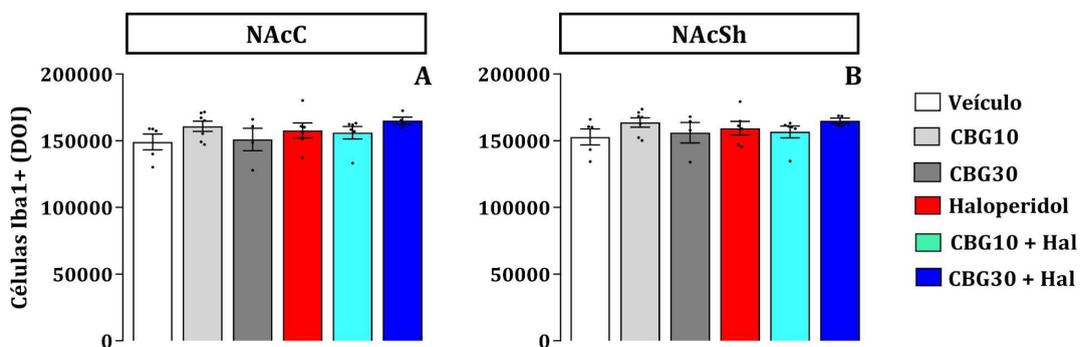


Figura 27: Comparação da mensuração de densidade óptica integrada (DOI) entre NAcC (A) e NAcSh (B). Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Densidade Óptica Integrada de Microglia no Córtex Cingulado

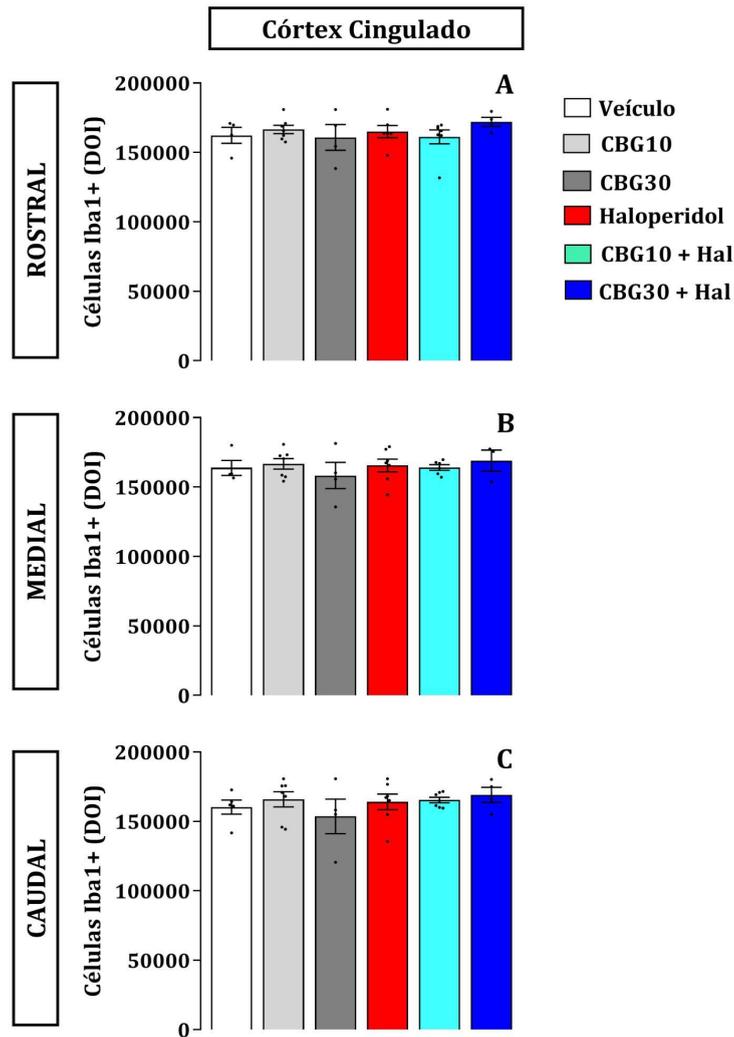


Figura 28: Comparação da mensuração de densidade óptica integrada (DOI) no córtex cingulado a nível rostral (A), medial (B) e caudal (C). Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Para análise de morfologia, os parâmetros escolhidos foram o número e comprimento das ramificações, número de endpoints e área de corpos celulares.

Com relação ao número de ramificações, não houve efeito do tratamento no estriado dorso-lateral e dorso-medial (Figura 29), NAcC, NAcSh (Figura 30) e córtex cingulado (Figura 31) nos níveis rostral, medial e caudal do estriado. As fotomicrografias representativas a nível medial estão nas Figuras 41, 42 e 43.

Número de Ramificações de Células Iba1+ no Estriado Dorso-Lateral e Dorso-Medial

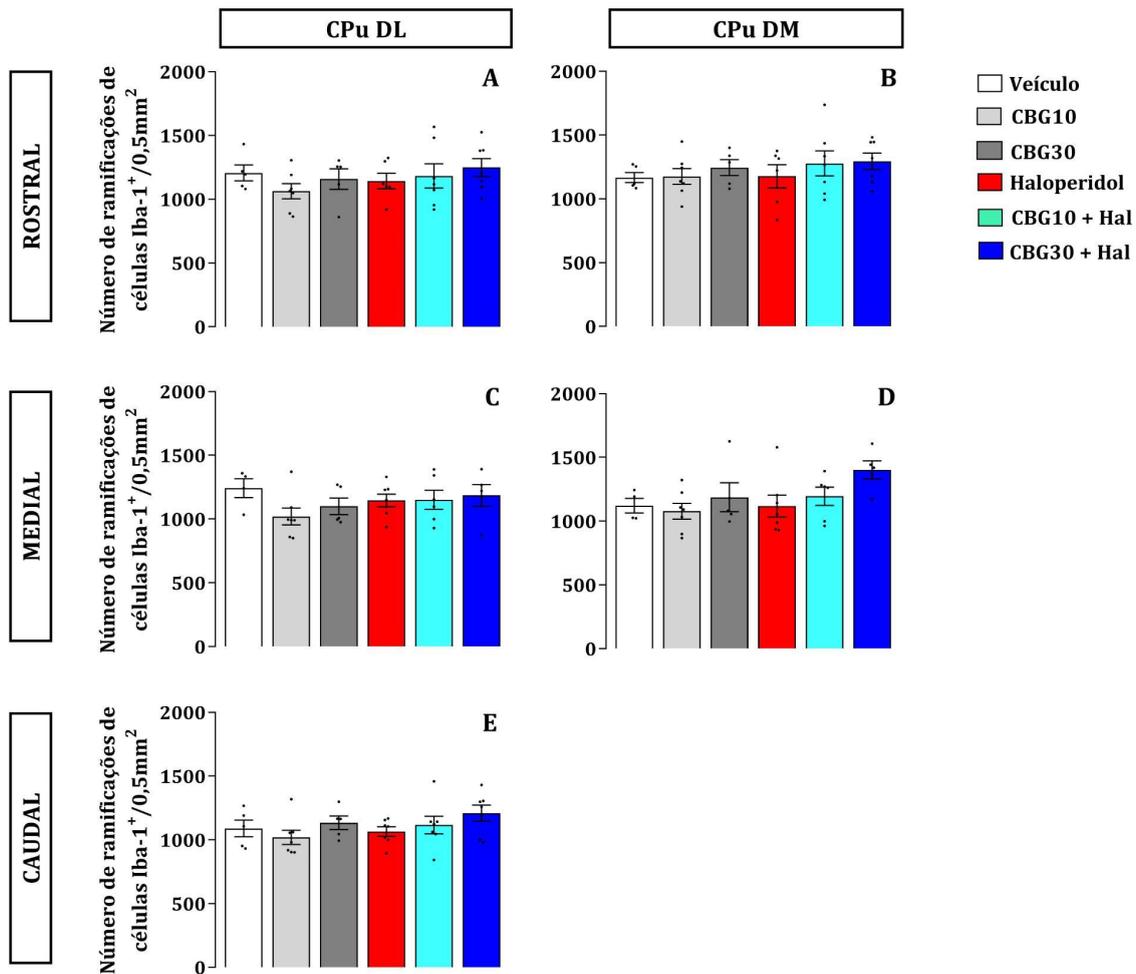


Figura 29: Comparação do número de ramificações de células Iba-1+ por 0,5mm² entre as regiões dorso-medial (DM) e dorso-lateral (DL) do estriado (CPu) rostral, medial e caudal. A: estriado dorso-lateral rostral; B: estriado dorso-medial rostral; C: estriado dorso-lateral medial; D: estriado dorso-medial medial; E: estriado dorso-lateral caudal. Os dados são apresentados como média ± SEM.

Número de Ramificações de Células Iba1+ no NAcC e NAcSh

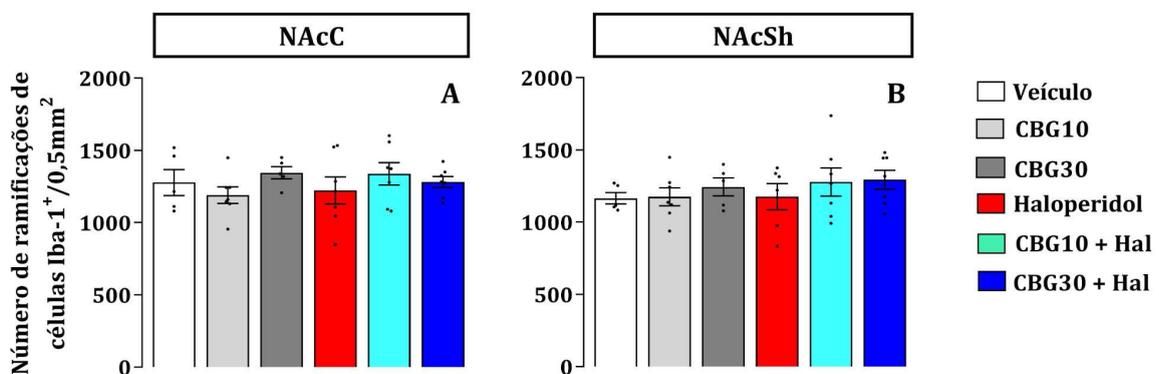


Figura 30: Comparação do número de ramificações de células Iba-1+ por 0,5mm² entre NAcC (A) e NAcSh (B). Os dados são apresentados como média ± SEM.

Número de Ramificações de Células Iba1+ no Córtex Cingulado

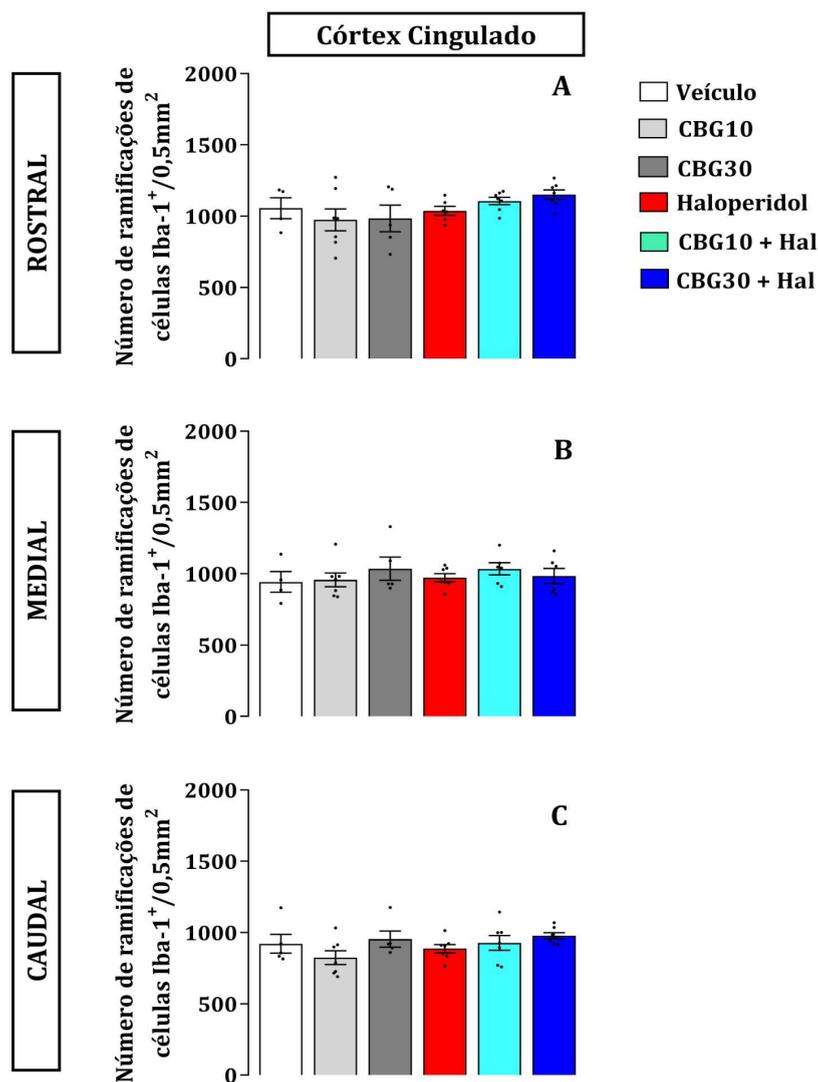


Figura 31: Comparação do número de ramificações de células Iba-1+ por 0,5mm² no córtex cingulado a nível rostral (A), medial (B) e caudal (C). Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Com relação ao comprimento das ramificações, também não foi encontrada diferença significativa em nenhuma região analisada (regiões dorso-medial e dorso-lateral do estriado rostral, medial e caudal, NAcC, NAcSh e córtex cingulado), independente dos tratamentos empregados (Figuras 32, 33 e 34). As fotomicrografias representativas a nível medial estão nas Figuras 41, 42 e 43.

Comprimento das Ramificações de Células Iba1+ no Estriado Dorso-Lateral e Dorso-Medial

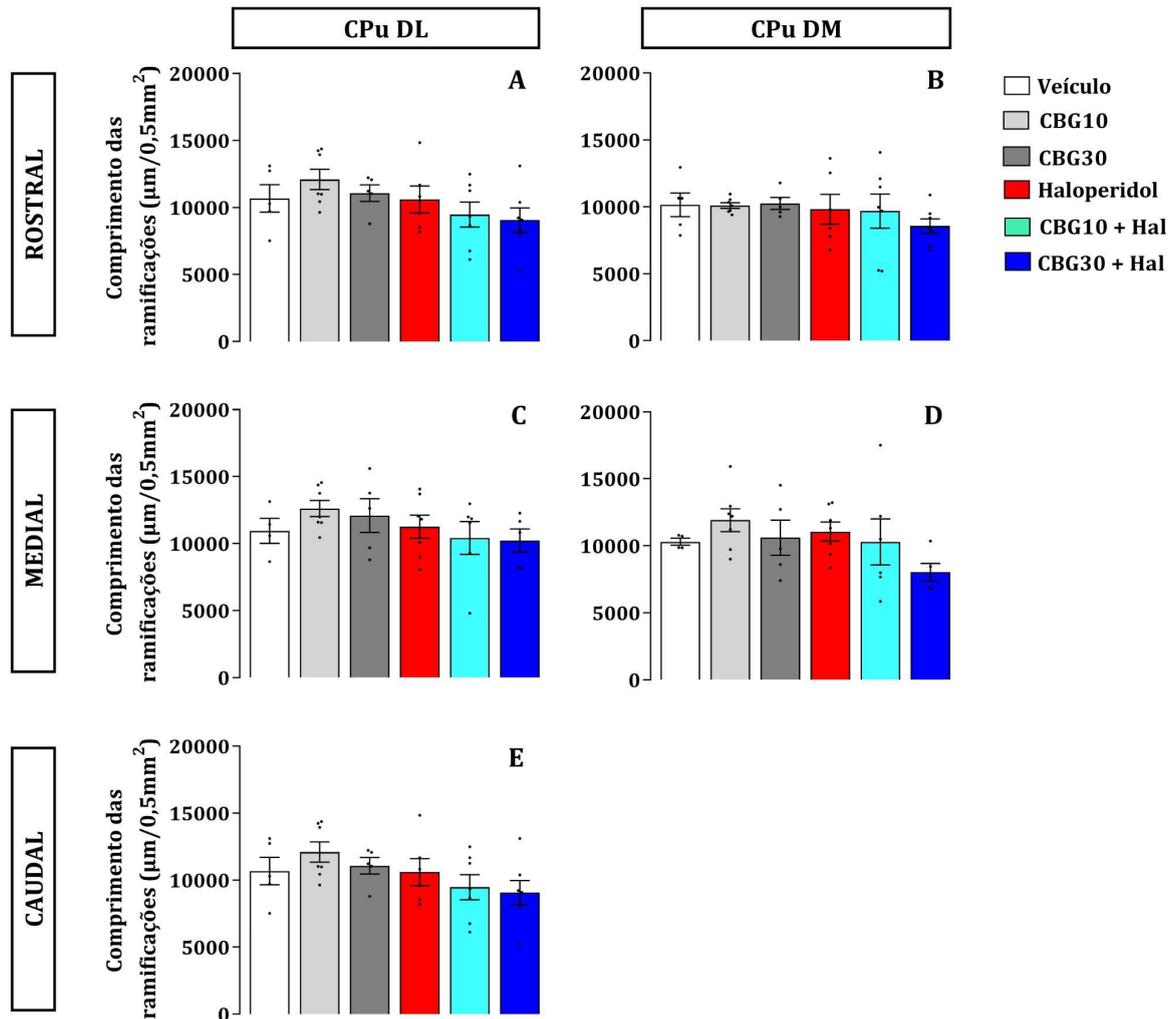


Figura 32: Comparação do comprimento das ramificações de células Iba-1+ por 0,5mm² entre as regiões dorso-medial (DM) e dorso-lateral (DL) do estriado (CPu) rostral, medial e caudal. A: estriado dorso-lateral rostral; B: estriado dorso-medial rostral; C: estriado dorso-lateral medial; D: estriado dorso-medial medial; E: estriado dorso-lateral caudal. Os dados são apresentados como média ± SEM.

Comprimento das Ramificações de Células Iba1+ no NAcC e NAcSh

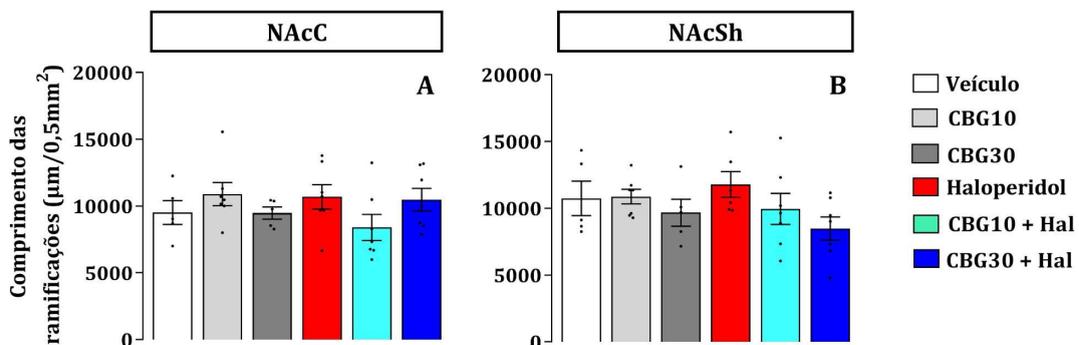


Figura 33: Comparação do comprimento das ramificações de células Iba-1+ por 0,5mm² entre o NAcC (A) e NAcSh (B). Os dados são apresentados como média ± SEM.

Comprimento das Ramificações de Células Iba1+ no Córtex Cingulado

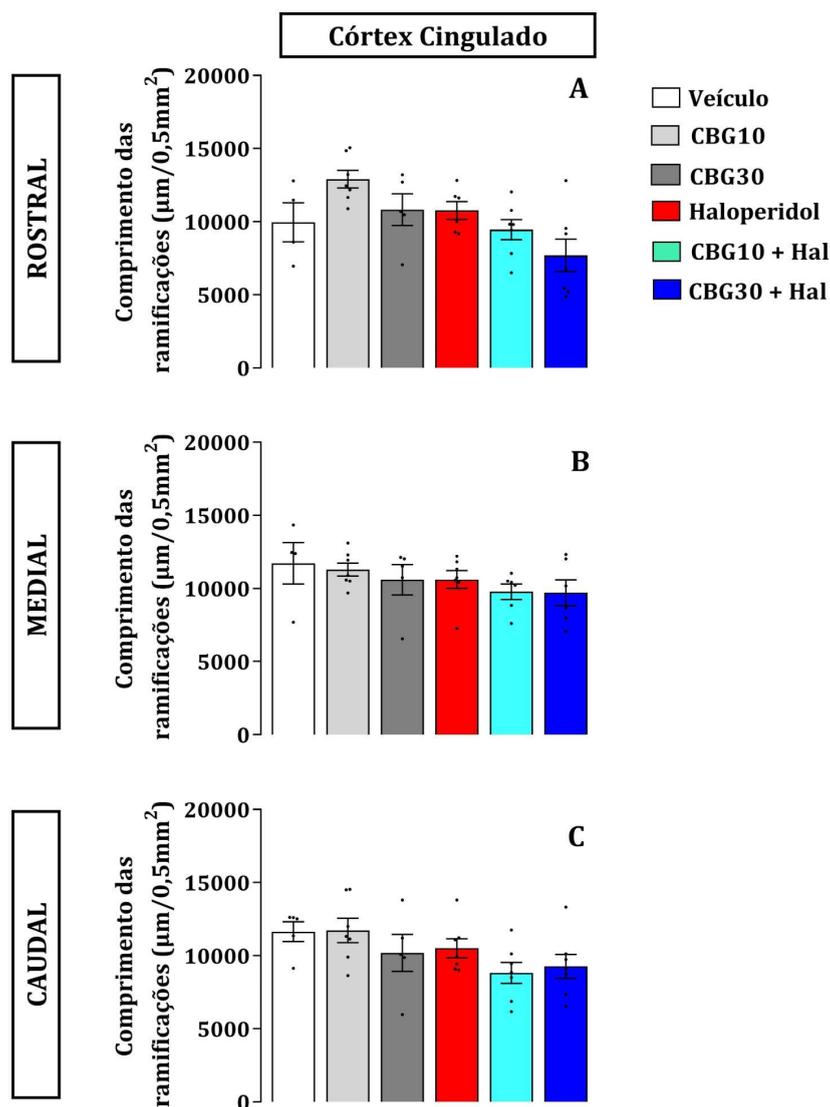


Figura 34: Comparação do comprimento das ramificações de células Iba-1+ por 0,5mm² no córtex cingulado na altura do estriado rostral (A), medial (B) e caudal (C). Os dados são apresentados como média ± SEM.

Com relação ao número de endpoints, também não foi encontrada diferença significativa em nenhuma região analisada (regiões dorso-medial e dorso-lateral do estriado rostral, medial e caudal, NAcC e NAcSh e córtex cingulado), independente dos tratamentos empregados. Os resultados estão representados nas Figuras 35, 36 e 37. As fotomicrografias representativas a nível medial estão nas Figuras 41, 42 e 43.

Número de Endpoints de Células Iba1+ no Estriado Dorso-Lateral e Dorso-Medial

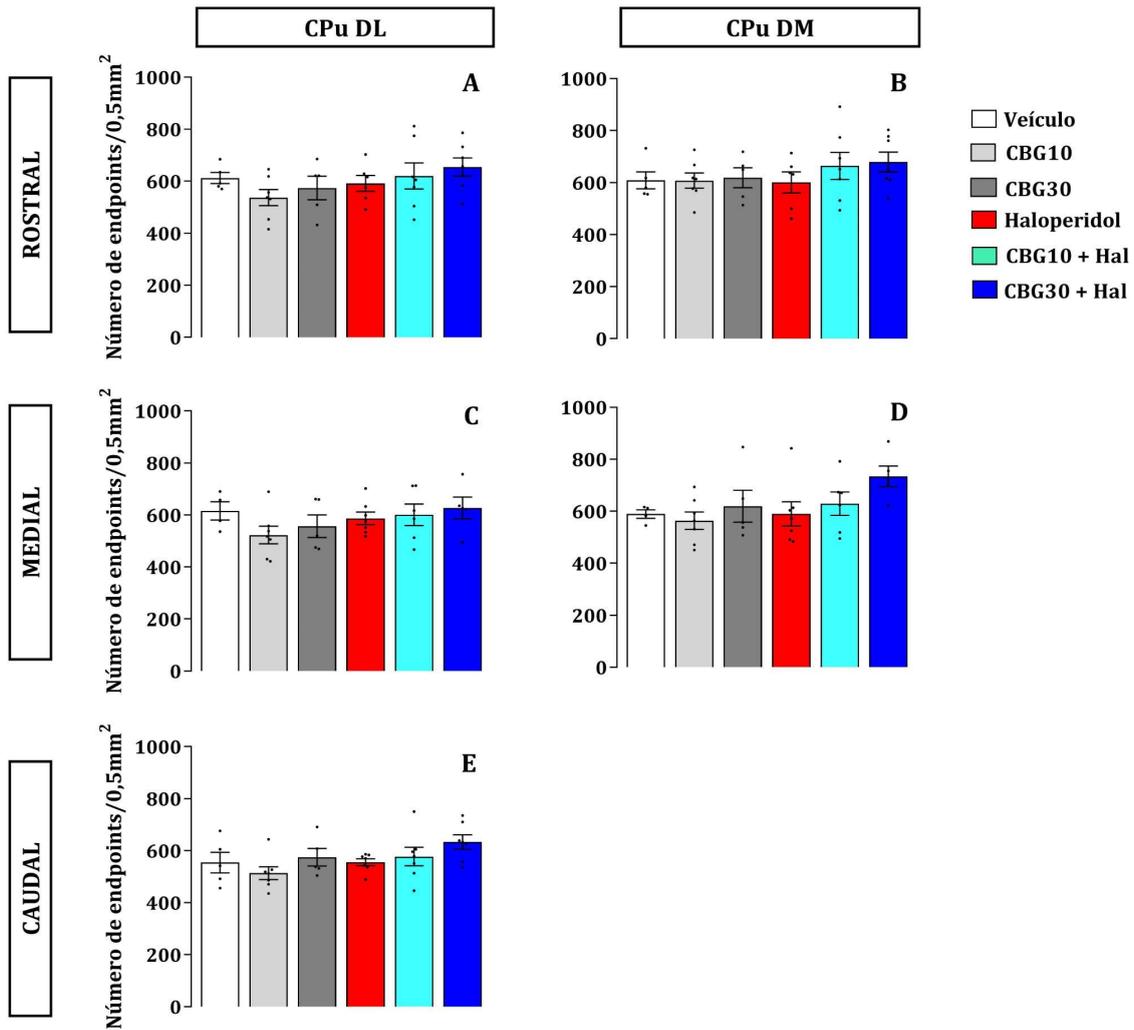


Figura 35: Comparação do número de endpoints de células Iba-1+ por 0,5mm² entre as regiões dorso-medial (DM) e dorso-lateral (DL) do estriado (CPu) rostral, medial e caudal. A: estriado dorso-lateral rostral; B: estriado dorso-medial rostral; C: estriado dorso-lateral medial; D: estriado dorso-medial medial; E: estriado dorso-lateral caudal. Os dados são apresentados como média ± SEM.

Número de Endpoints de Células Iba1+ no NAcC e NAcSh

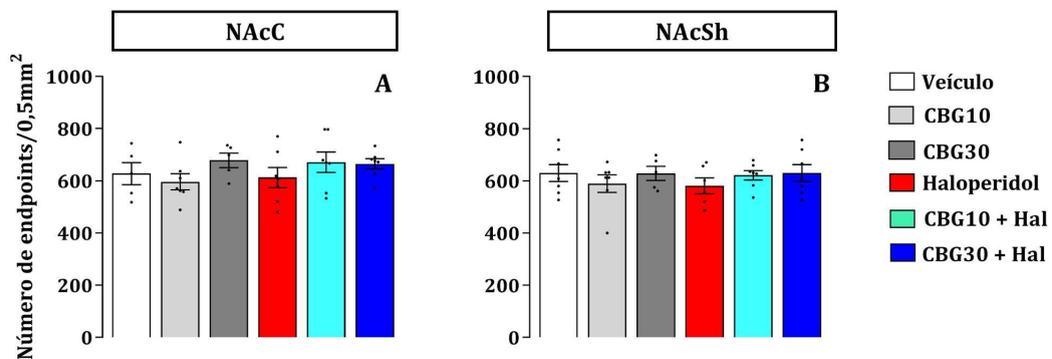


Figura 36: Comparação do número de endpoints de células Iba-1+ por 0,5mm² entre o NAcC (A) e NAcSh (B). Os dados são apresentados como média ± SEM.

Número de Endpoints de Células Iba1+ no Córtex Cingulado

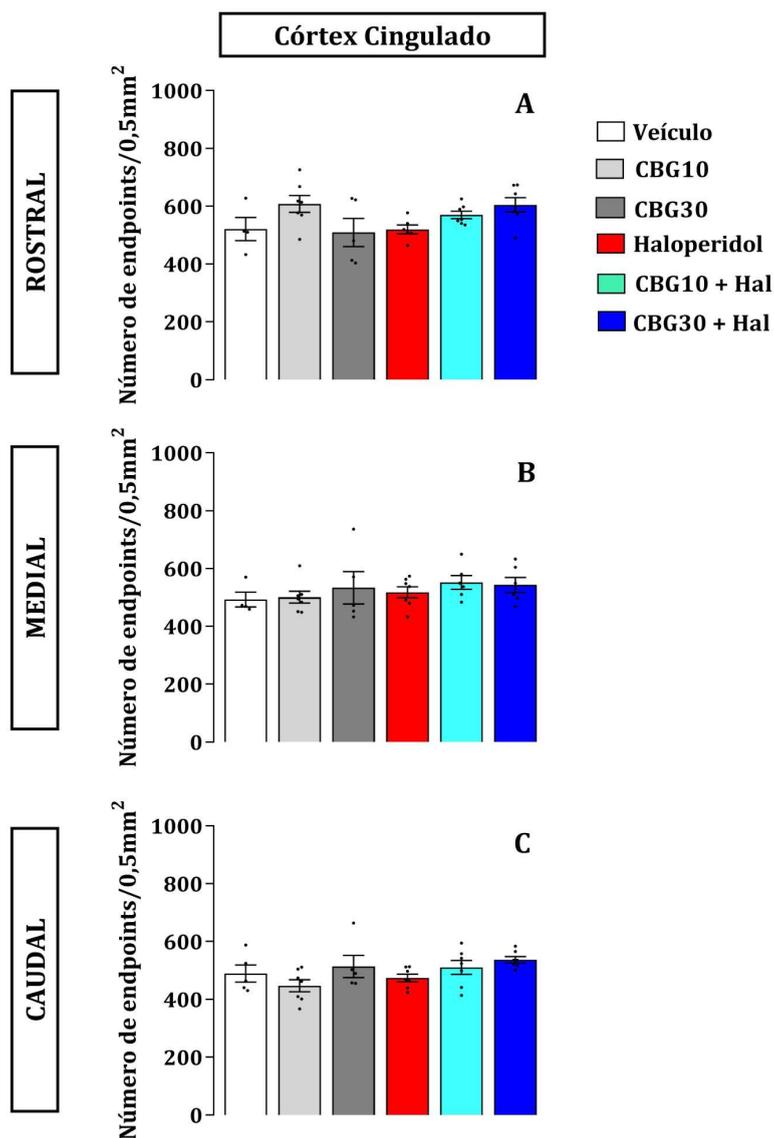


Figura 37: Comparação do número de endpoints de células Iba-1+ por 0,5mm² no córtex cingulado a nível rostral (A), medial (B) e caudal (C). Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Com relação ao tamanho dos corpos celulares, também não foi encontrada diferença significativa em nenhuma região analisada, independente dos tratamentos empregados. Os resultados estão representados nas Figuras 38, 39 e 40. As fotomicrografias representativas a nível medial estão nas Figuras 41, 42 e 43.

Tamanho dos corpos de Célula Iba1+ no Estriado Dorso-Lateral e Dorso-Medial

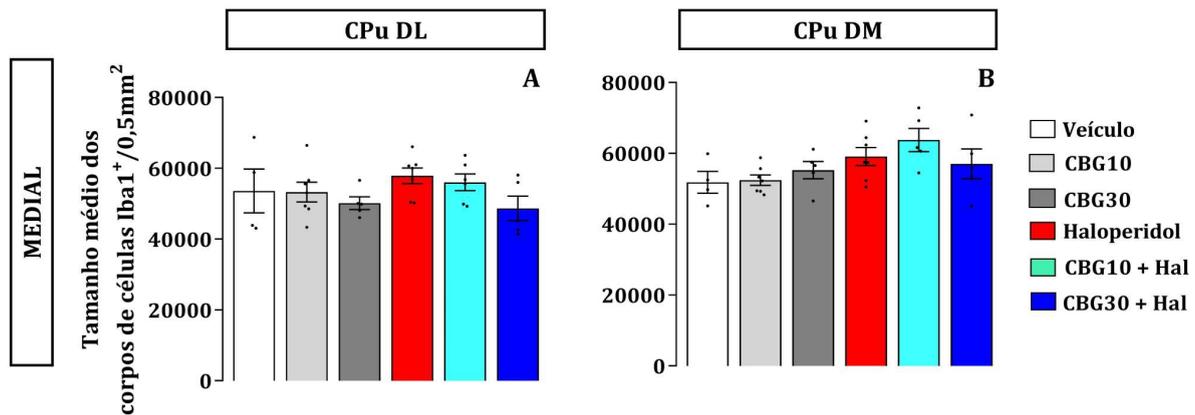


Figura 38: Comparação do tamanho do corpo de células Iba-1+ entre as regiões dorso-medial (DM) e dorso-lateral (DL) do estriado (CPu) medial A: estriado dorso-lateral; B: estriado dorso-medial. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Tamanho dos corpos de Célula Iba1+ no Nucleo Accumbens (core e shell)

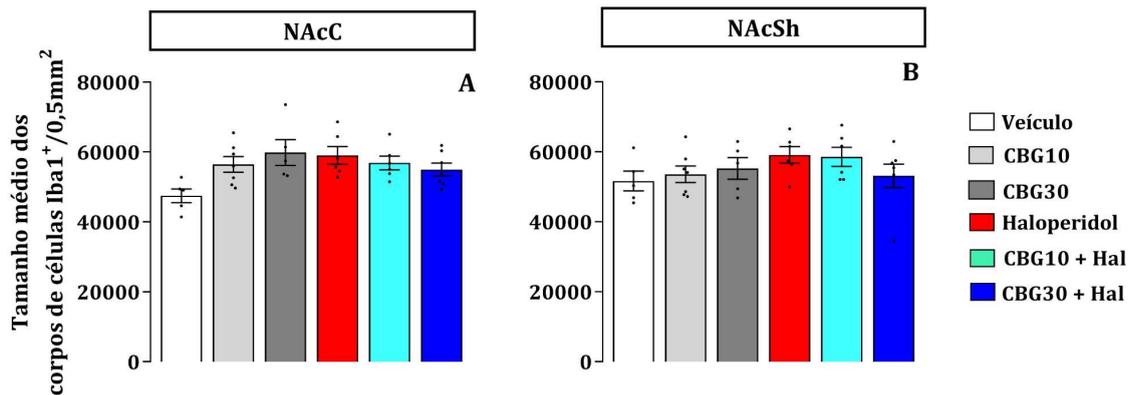


Figura 39: Comparação do tamanho do corpo de células Iba-1+ entre o NAC (A) e NACSh (B). Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Tamanho dos corpos de Célula Iba1+ no Córtex Cingulado

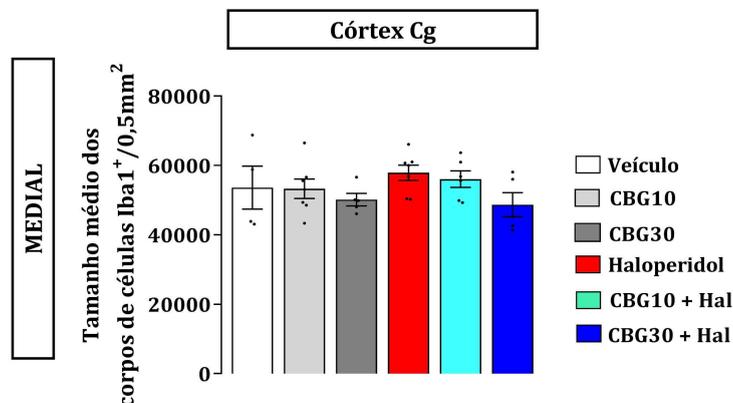


Figura 40: Comparação do tamanho do corpo de células Iba-1+ no córtex cingulado a nível medial. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Células Iba1+ no Estriado Dorso-Medial e Dorso-Lateral (Medial)

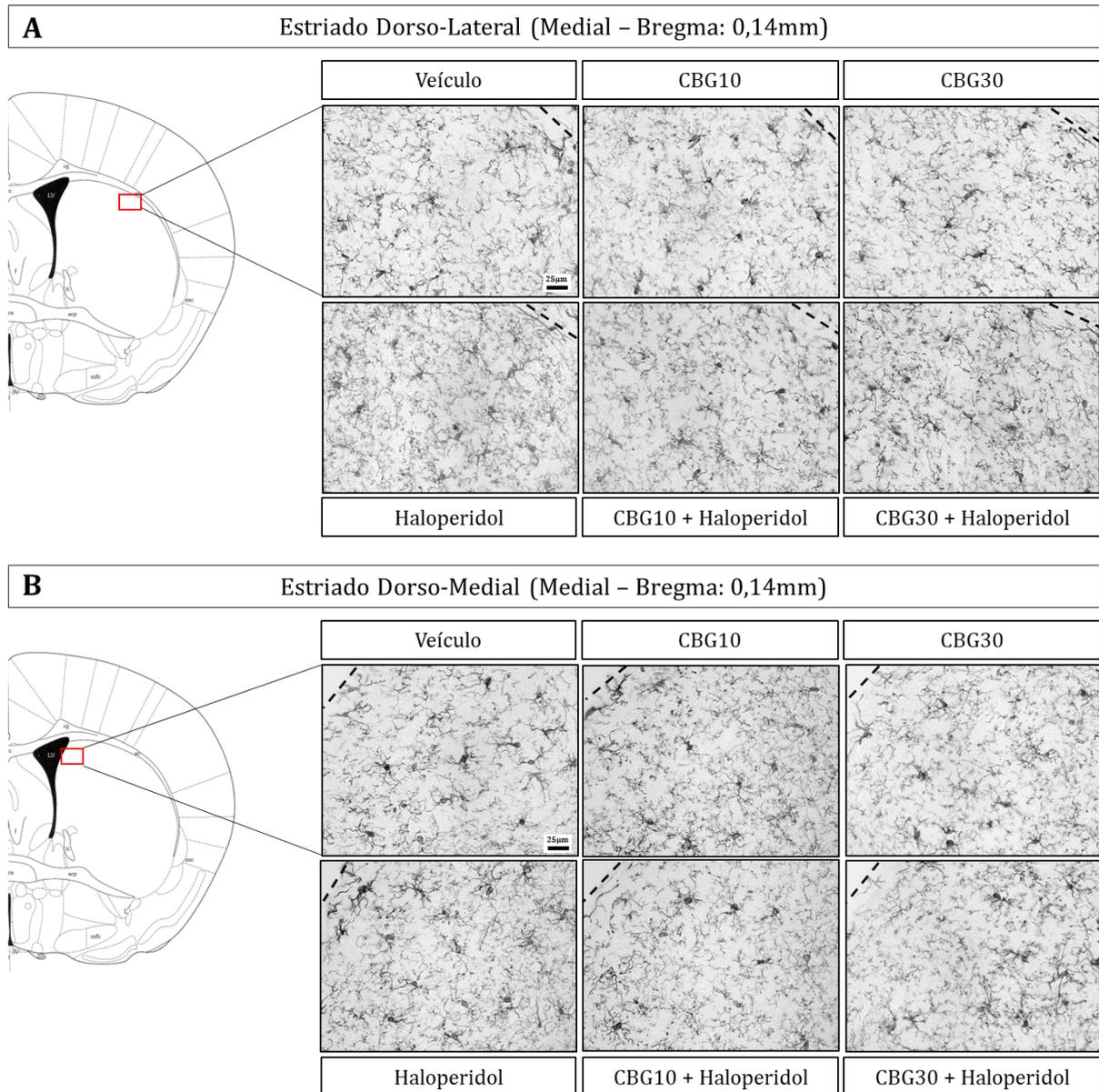


Figura 41: Fotomicrografias representativas de células Iba1+, regiões do estriado dorso-lateral (A) e do estriado dorso-medial (B) a nível medial (bregma: 0,14mm). Não foram observadas diferenças na densidade óptica integrada e nem alterações morfológicas entre os grupos. Linha pontilhada nas imagens do estriado dorso-medial mostra divisão com o ventrículo ao lado. Linha pontilhada nas imagens do estriado dorso-lateral mostra divisão com o corpo caloso ao lado. Aumento de 40x. Barra da escala: 25µm.

Células Iba1+ no Nucleo Accumbens (core e shell)

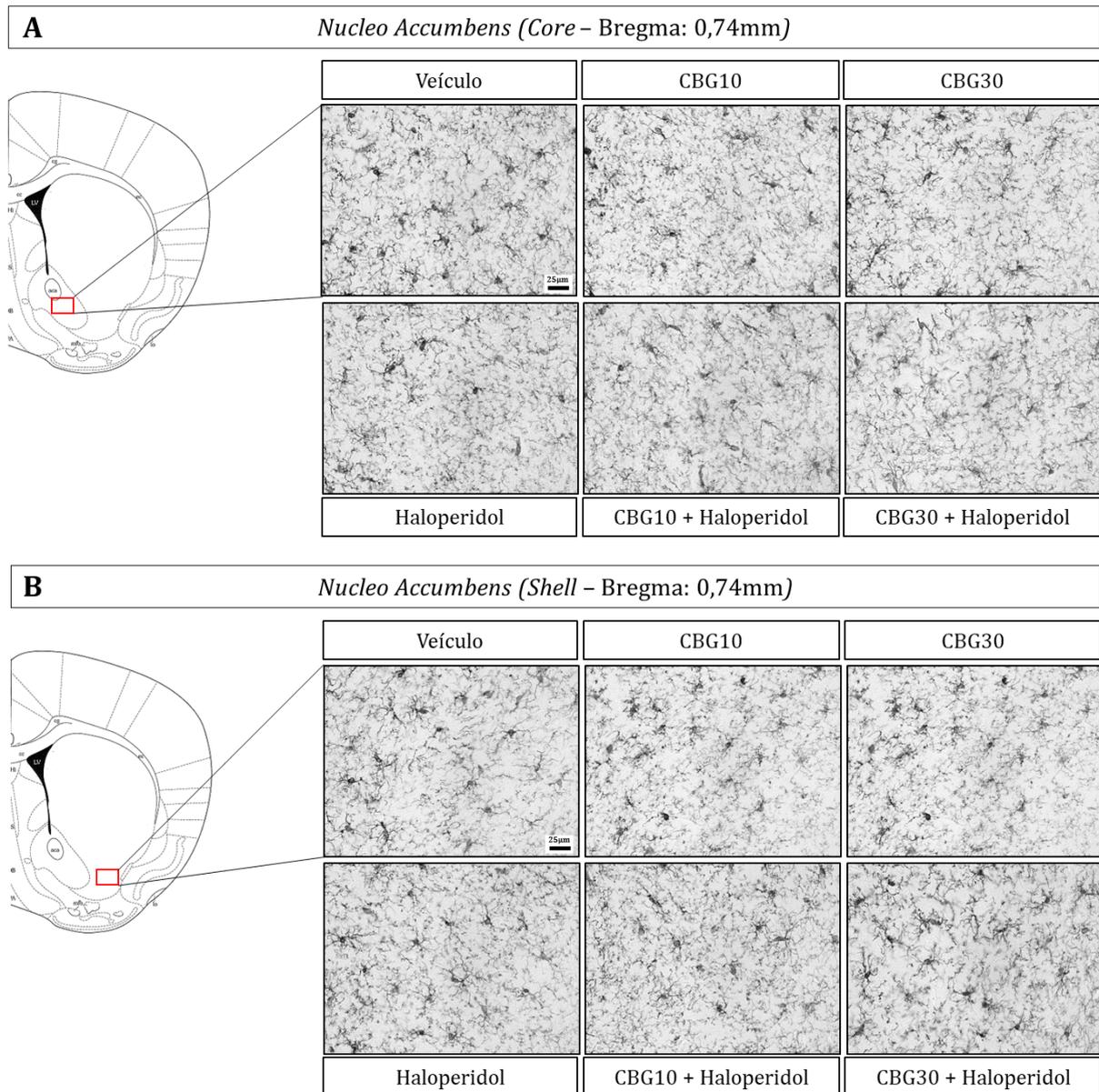


Figura 42: Fotomicrografias representativas de células Iba1+, NAcC (A) e NAcSh (B), bregma: 0,74mm. Não foram observadas diferenças na densidade óptica integrada e nem alterações morfológicas entre os grupos. Aumento de 40x. Barra da escala: 25µm.

Células Iba1+ no Córtex Cingulado (Medial)

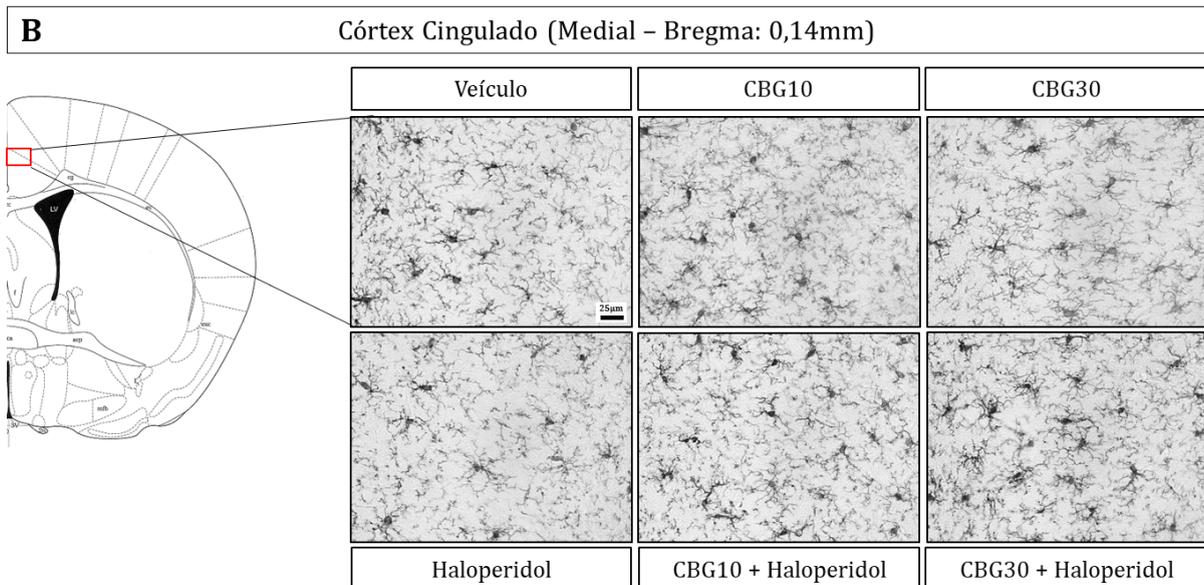


Figura 43: Fotomicrografias representativas de células Iba1+, região do córtex cingulado a nível medial, bregma: 0,14mm. Não foram observadas diferenças na densidade óptica integrada e nem alterações morfológicas entre os grupos. Aumento de 40x. Barra da escala: 25µm.

- Experimento 3: Investigação do efeito de reversão do CBG em modelo de discinesia tardia.

Houve efeito do tratamento ($F(1, 7) = 14.43, p=0,0067$), do tempo ($F(3, 21) = 8.347, p=0,0008$), e interação entre estas variáveis ($F(3, 21) = 3.071, p=0,0501$). Diferente do antes observado, neste experimento foi observada uma manifestação significativa dos VCMs já no 14º dia ($p=0,0300$), 2 horas após aplicação de haloperidol, e se manteve na avaliação do 15º dia, 24 horas após o tratamento com haloperidol, como nos outros experimentos. No entanto, a administração de CBG na dose de 10mg/kg durante 5 dias não reverteu os VCMs induzidos por tratamento com haloperidol por 14 dias (Figura 44).

Efeito de reversão do CBG em modelo de DT

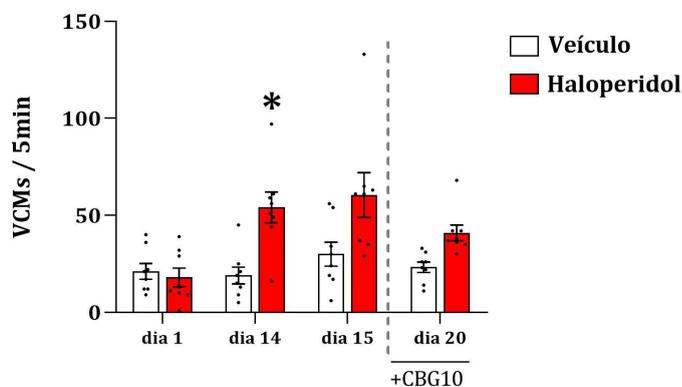


Figura 44: Efeito de reversão do CBG no modelo de discinesia tardia. Avaliações realizadas no 1º e 14º dias, 2 horas após tratamento com haloperidol e no 15º e 20º dias, 24 horas após a última

administração de haloperidol. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Com relação ao teste do actímetro, como nos outros experimentos, houve efeito do tratamento, tempo e interação entre estas variáveis. Os animais que receberam haloperidol tem todos os parâmetros de atividade motora reduzidos no 1º e 14º dia, 2 horas após tratamento (dados estatísticos na Tabela 9), mas esta atividade se reestabelece aos níveis normais quando avaliada 24 horas após tratamento, tanto no 15º quanto no 20º dia (Figura 45).

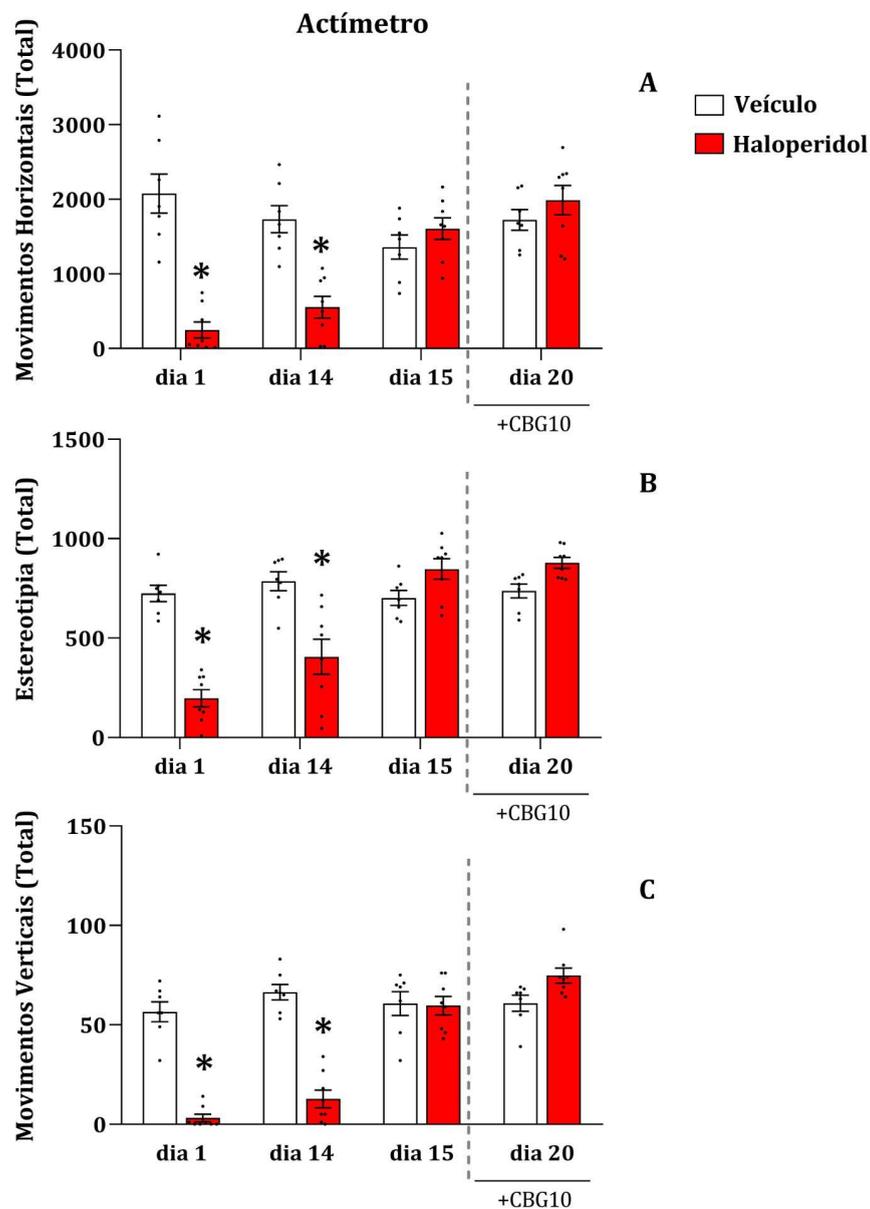


Figura 45: Teste do actímetro no experimento para investigação do efeito de reversão do CBG (10mg/kg) no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol (3mg/kg). Avaliações realizadas no 1º e 14º dias, 2 horas após tratamento com haloperidol e no 15º e 20º dias, 24 horas após a última

administração de haloperidol. A: Somatório dos movimentos horizontais lentos e rápidos; B: Somatório dos movimentos de estereotipia lentos e rápidos; C: Somatório dos movimentos verticais lentos e rápidos. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos veículo. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Experimento 4: Investigação da associação CBD + CBG em modelo de discinesia tardia.

O CBD e CBG, administrados sozinhos ou em associação, em nenhuma dose testada preveniram a indução dos VCMs por tratamento com haloperidol. Em associação, os canabinoides, como esperado, também não induzem os VCMs (Figura 46).

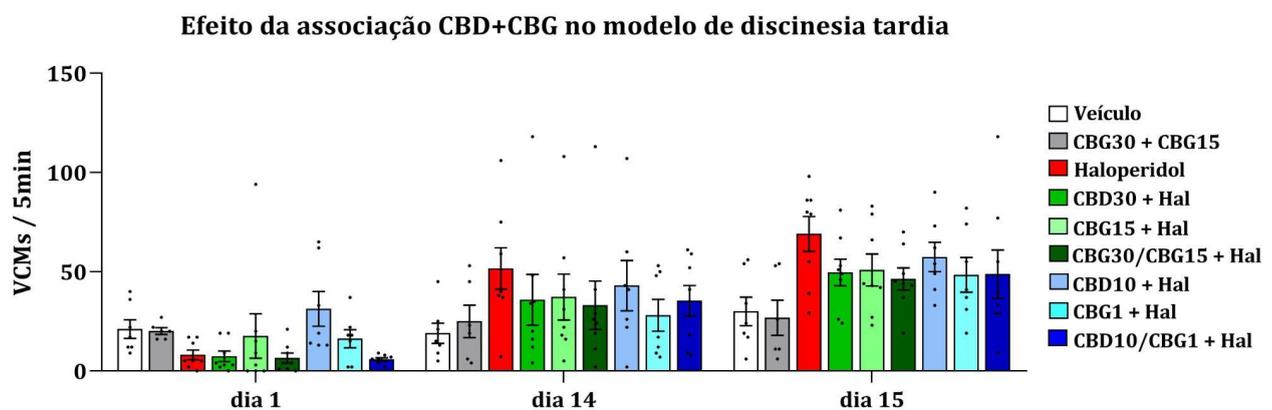


Figura 46: Investigação do efeito da associação CBD+CBG no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol. Avaliação realizada no 1º e 14º dias, 2 horas após tratamento com haloperidol e no 15º dia, 24 horas após a última administração de haloperidol. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

Com relação ao teste do actímetro, novamente, houve efeito do tratamento, tempo e interação entre estas variáveis (dados estatísticos apresentados na Tabela 10). Os animais que receberam haloperidol tem todos os parâmetros de atividade motora reduzidos no 1º e 14º dia, 2 horas após tratamento ($p < 0,05$), mas esta atividade se reestabelece aos níveis normais quando avaliada 24 horas após tratamento (Figura 47).

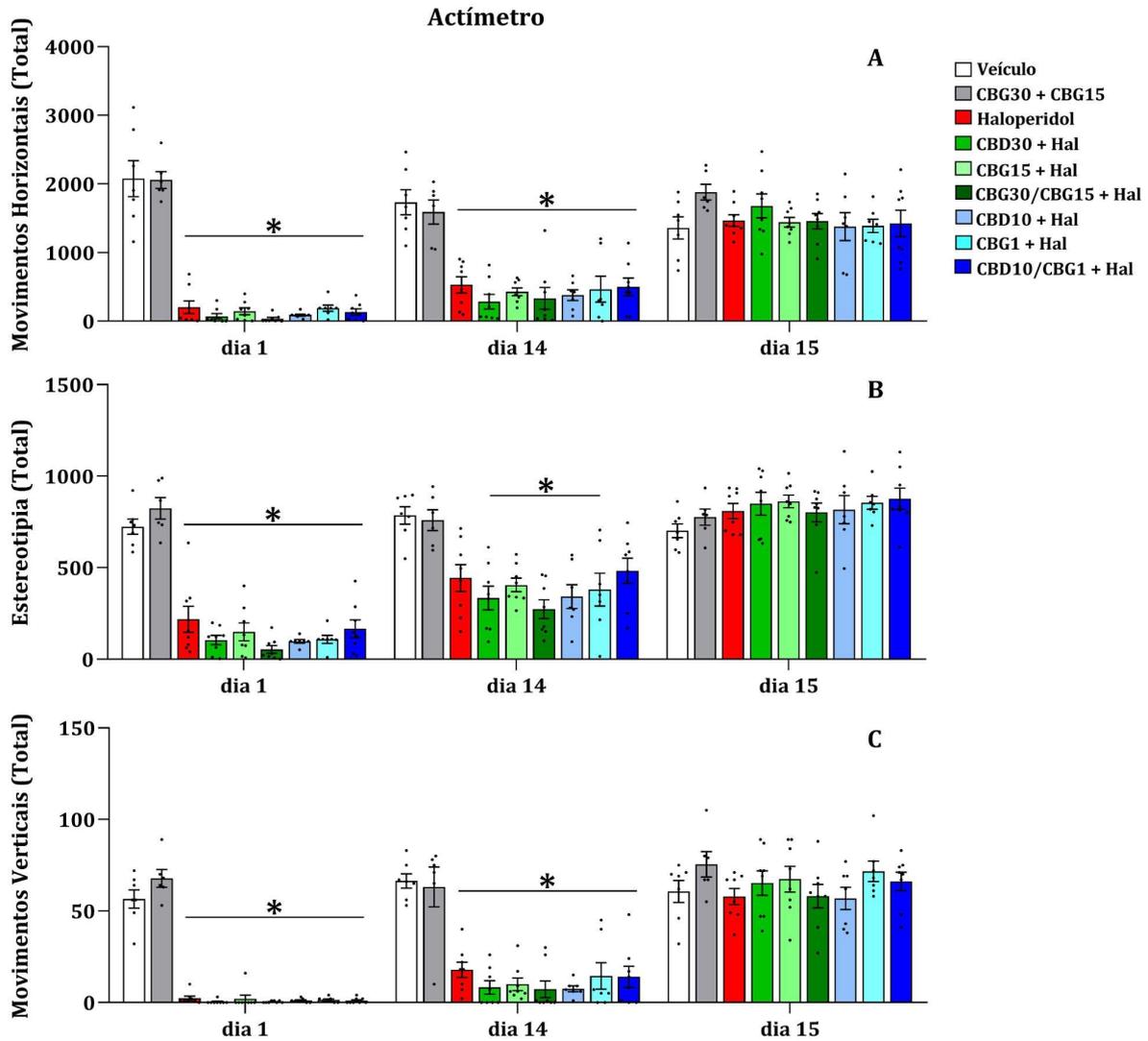


Figura 47: Teste do actímetro no experimento para investigação do efeito da associação CBD+CBG no modelo de discinesia tardia induzida por haloperidol. Avaliações realizadas no 1º e 14º dias, 2 horas após tratamento com haloperidol e no 15º dia, 24 horas após a última administração de haloperidol. * $p < 0,05$ em relação aos grupos veículo e CBD30/CBG15 nos respectivos dias de avaliação. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

5. DISCUSSÃO

Em suma, os resultados revelaram que existe uma relação dose-dependente na indução dos VCMs por tratamento repetido com haloperidol. Ainda, se a avaliação for realizada de 1-5 horas após o tratamento, não há manifestação significativa dos VCMs, ao contrário do que se observa quando a análise se dá 24 horas depois. O mesmo acontece com a atividade motora dos animais que recebem somente haloperidol ou em associação com canabinóides: é reduzida se avaliada de 1-5 horas após tratamento, mas retorna ao normal se avaliada após 24 horas. Assim, o modelo escolhido para investigação do efeito dos canabinóides foi tratamento por 14 dias com haloperidol na dose de 3mg/kg, via subcutânea. As avaliações foram realizadas nos dias 1 e 14, 2 horas após administração, e no 15º dia, 24 horas após administração.

Quando administrado concomitantemente com haloperidol, o CBG atenuou os VCMs nas doses de 3 e 10mg/kg, mas não na dose de 30mg/kg. No entanto, não foi revelado potencial de reversão deste canabinoide. Também não foi observado efeito antidiscinético da associação CBD+CBG nas proporções 10:1 e 2:1 aqui testadas. O efeito benéficos do CBG no modelo não têm relação com redução da expressão de FosB no estriado dorsolateral e nem com alteração da morfologia da microglia, como sugeria nossa hipótese.

5.1. Curvas temporais e de dose-resposta

O delineamento das curvas temporais e de dose-resposta neste projeto foi planejado para se construir um modelo de discinesia tardia que oferecesse menor variabilidade nos grupos tratados com haloperidol do que alguns antes observados em experimentos anteriores não retratados aqui.

A primeira alteração testada foi a da via de administração, que antes era intraperitoneal. A opção foi testar a via subcutânea, que se caracteriza como uma via de absorção lenta quando comparada a outras vias parenterais, levando a um efeito sustentado do fármaco (MACHHOLZ *et al.*, 2012). Assim, esta via poderia se apresentar como uma alternativa eficaz na busca pela diminuição da variabilidade e efeito desejado das drogas em estudo para delineamento do modelo.

Com relação às doses, foram testadas as de 1, 2 e 3mg/kg. A dose de 1mg/kg não foi eficaz na indução dos movimentos orofaciais, independente do dia de avaliação. Kapur e colaboradores (2000) mostraram que grande parte dos trabalhos pré-clínicos com haloperidol utilizam a dose de 1mg/kg, e discutem que muitas vezes a dosagem nestes estudos é muito alta para tratamentos agudos e muito baixa para tratamentos crônicos quando comparado ao que se observa na clínica. Adicionalmente, sabe-se que para que haja um efeito antipsicótico

do haloperidol, é necessário que cerca de 65-70% dos receptores D2 estejam ocupados, mas se este limiar ultrapassar 80%, existe um maior risco de indução dos sintomas motores como a discinesia tardia (TURRONE, 2003). Assim, é possível que haja relação entre estes fatores e a ausência de VCMs no grupo tratado com haloperidol 1mg/kg.

O efeito motor esperado só foi observado nas doses de 2 e 3mg/kg, sugerindo que em tais doses, o limiar de ocupação dos receptores tenha sido atingido, levando à indução significativa de VCMs em roedores. No entanto, ressalta-se que testes que avaliam a porcentagem de ocupação dos receptores nestas doses devem ser realizados para que esta hipótese seja confirmada. Ainda, entre as duas doses maiores não houve diferença estatística. Neste caso, o ideal seria a escolha da menor dose eficaz, a de 2mg/kg, para evitar outros efeitos indesejados, no entanto a dose de 3mg/kg foi a escolhida, na tentativa de diminuir variabilidades antes observadas em experimentos passados.

5.2. Modelo delineado

O modelo de discinesia tardia em roedores é usualmente dividido de acordo com o tempo de tratamento para indução dos movimentos, sendo os “*early-onset VCMs*”, quando o tratamento ocorre até 21 dias e “*late-onset VCMs*” quando o tratamento dura mais de três meses (TURRONE *et al.*, 2002). Embora os dois modelos se caracterizem pela indução dos movimentos orais involuntários de forma semelhante, sabe-se que as alterações neuroquímicas entre ambos os tratamentos são diferentes. Assim, os “*early-onset VCMs*” se assemelham aos efeitos motores agudos provenientes do tratamento com antipsicóticos, enquanto os “*late-onset VCMs*” se correlacionam com a discinesia tardia observada em humanos (TURRONE *et al.*, 2002; BLANCHET *et al.*, 2012).

Com base nesta classificação, considera-se que o modelo aqui proposto, caracterizado por 14 dias de tratamento com haloperidol, induziu os “*early-onset VCMs*”. Trata-se de um modelo vantajoso uma vez que permite o estudo do efeito motor do antipsicótico e do tratamento proposto, o CBG e sua associação com CBD, em um período de tempo relativamente curto para o experimentador. Outra vantagem é que, em comparação com modelos clássicos que contam com 21 dias de tratamento, há uma diminuição do desconforto dos animais pela administração diária das drogas. Estudos posteriores podem ser realizados objetivando investigar quais alterações esse período de tratamento com a dose e via de administração empregadas poderiam causar no encéfalo dos animais em comparação com outros modelos, como a indução dos VCMs por decanoato de haloperidol, composto de liberação lenta.

5.3. Efeitos adicionais do haloperidol

De forma inicialmente controversa, o tratamento com haloperidol causa efeito hipocinético por determinado tempo, no entanto 24 horas após a administração do antipsicótico, observa-se o efeito hipercinético, os VCMs. Para discutir este resultado, algumas hipóteses foram levantadas.

Sabe-se que o antagonismo prolongado de receptores D2 pode estar envolvido com a indução da discinesia tardia, possivelmente pela hipersensibilização destes receptores. Isto foi mostrado por Burt e colaboradores (1977), que trataram ratos com haloperidol (5mg/kg) por uma semana e após 5 dias de suspensão da droga, observaram que houve aumento de cerca de 27% de ligação de [3H]Haloperidol nos receptores. Além disso, embora haja resultados contraditórios na literatura, já foi reportado que o tratamento repetido (21 dias) com haloperidol (1mg/kg) leva a um aumento compensatório na síntese de dopamina (ZHANG *et al.*, 1989). Salvo as diferenças de protocolo, presume-se que, como nestes trabalhos citados, no nosso modelo tais processos de hipersensibilização dos receptores e aumento de dopamina possam ter contribuído para a observação dos VCMs apenas 24 horas após a última injeção de haloperidol.

Com relação à atividade motora, como observado nos gráficos referentes ao actímetro, os grupos tratados com haloperidol, sozinho ou em combinação com CBG, mostram uma atividade motora reduzida quando esta é avaliada 2 horas após tratamento, e este efeito hipolocomotor não é mais observado 24 horas após administração de haloperidol. É conhecido que o haloperidol possui vários efeitos motores para além da discinesia tardia, e um deles é o parkinsonismo, caracterizado por tremor, rigidez muscular, catalepsia e acinesia (MUENCH & HAMER, 2010).

Como já mencionado, na circuitaria dos núcleos da base, a resultante da ação da dopamina é o estímulo do movimento. O antagonismo de receptores dopaminérgicos D2 pelo haloperidol é semelhante à ausência de dopamina na via indireta, levando a um aumento da atividade desta via que exerce tônus inibitório sobre o córtex motor, inibindo o movimento. Assim, o efeito do haloperidol nesta via pode estar associado à baixa atividade motora dos animais.

Adicionalmente, em estudo a respeito do efeito do haloperidol sobre a inervação muscular, Langer e colaboradores (1979) mostraram que o haloperidol inibe a ativação reflexa dos motoneurônios alfa flexores e, em doses maiores, também dos extensores. Com base nestes resultados, os autores sugerem que este pode ser um dos meios pelos quais o haloperidol leva à acinesia, como observado nos resultados do actímetro. Além disso,

também é reconhecido que o haloperidol pode levar à sedação. Sabe-se que o tempo de meia-vida do haloperidol em roedores é de cerca de 2,5 horas (KAPUR *et al.*, 2000), estando possivelmente em altas concentrações no plasma no período que o teste motor foi realizado, 2 horas após o tratamento. Desta forma, presume-se que a acinesia e sedação causadas pelo haloperidol possivelmente tenham contribuído para a diminuta atividade motora nos animais, o que pode ter impossibilitado a observação dos movimentos orais involuntários nos dias 1 e 14.

De forma resumida, sugere-se que os efeitos antagônicos aqui observados sejam, portanto, ligados a fatores distintos: a hipolocomoção depende diretamente da presença de haloperidol modulando a circuitaria dos núcleos da base e motoneurônios, enquanto que os movimentos orais involuntários resultam de alterações plásticas induzidas pelo antagonismo prolongado de receptores D2 pelo haloperidol, no entanto só se manifestam quando o antipsicótico não está mais no sistema.

Vale ressaltar que, uma vez que a hipolocomoção não foi revertida nos animais que receberam CBG concomitantemente ao haloperidol, sugere-se também que o CBG não possua interações com os mecanismos citados pelos quais o haloperidol promove acinesia e sedação nos animais.

5.4. Efeitos de prevenção e reversão do CBG no modelo

O CBG é um fitocanabinoide que tem sido investigado de forma recente em vários modelos, assim pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação e efeitos no sistema nervoso central (SNC). Esta é a primeira investigação do efeito desta droga no modelo de discinesia tardia, logo, é de grande importância constatar que o CBG, *per se*, não apresenta potencial discinético.

Nossa hipótese era de que, se confirmado o potencial antidiscinético do CBG, este se daria por um mecanismo de ação que resultasse na diminuição da expressão de FosB no estriado dorso-lateral, ocasionada pelo tratamento repetido com haloperidol, ou por alteração da morfologia da microglia. No entanto, segundo os resultados obtidos, essa diferença não foi encontrada em nenhuma das análises. Isto sugere que a atenuação dos VCMs mediada pelo CBG envolve mecanismos de ação não relacionados a estes aqui sugeridos.

Dentre as hipóteses aceitas para explicar a biologia da discinesia tardia, existe a sugestão de um desequilíbrio na neurotransmissão dopaminérgica e de outros neurotransmissores como GABA e glutamato. Além disso, são propostas outras alterações fisiológicas como estresse oxidativo e processo neuroinflamatório (LISTER *et al.*, 2014),

bem como fatores genéticos (ZAI *et al.*, 2018). Com base nestas sugestões e no que é conhecido a respeito das interações do CBG, várias são as possibilidades pelas quais este canabinóide poderia atenuar os VCMs no modelo proposto, sendo necessários estudos futuros que auxiliem na elucidação deste efeito.

Olhando para a alta afinidade que o CBG possui por receptores PPAR γ como seu agonista (1270nM em comparação com 2010nM do CBD) (NACHNANI, *et al.*, 2021), é possível que esta interação que culmina em um efeito anti-inflamatório pode participar do efeito antidiscinético do CBG. A investigação através de ferramentas farmacológicas do papel do receptor PPAR γ no efeito antidiscinético do CBG estava inicialmente prevista neste projeto, no entanto por uma questão de viabilidade de tempo não foi possível sua execução.

Ainda sobre o potencial anti-inflamatório do CBG, nenhuma alteração morfológica ou de densidade das células da microglia ter sido observada nas áreas analisadas. A proteína Iba1 (*ionised calcium binding adaptor molecule 1*) é expressa especificamente pela microglia e é largamente usada como antígeno para marcação desta célula em reações imunohistoquímicas, o que permite analisar sua morfologia celular. O nível de reatividade da microglia pode variar de um estado de repouso, no qual a célula apresenta soma menor com ramificações arborizadas, para um estado de maior reatividade, caracterizado por um soma maior e ramificações mais curtas, levando formato amebóide (KETTENMANN *et al.*, 2011). As células analisadas neste estudo não apresentaram diferença na área do corpo celular e nem no tamanho e número de ramificações e número de endpoints. Ainda, as imagens mostram, em todas as regiões analisadas, uma microglia caracteristicamente em repouso. Apesar disso, não se pode descartar a possibilidade de que os níveis de citocinas pró ou anti-inflamatórias possam ter sido modificados. Estudos mostraram esse efeito do CBG, que diminuiu a citocina pró-inflamatória IL-6 *in vitro* (STONE *et al.*, 2021) e em modelo animal de doença de Huntington levou à diminuição da expressão de genes das citocinas IL-6, TNF α e das enzimas iNOS e COX-2 (VALDEOLIVAS *et al.*, 2015).

Outro mecanismo de ação sugerido como participante do efeito antidiscinético do CBG é sua ação antioxidante. Como descrito anteriormente, parte do encéfalo foi destinada para análise de ROS, mas imprevistos técnicos impossibilitaram que esta análise fosse realizada (melhor descrito no tópico “Considerações Sobre o Projeto e Dificuldades Técnicas”). Estudos recentes *in vitro* (GIACOMO *et al.*, 2020; ECHEVERRY *et al.*, 2021) com neurônios e células gliais mostraram o potencial antioxidante do CBG, e sugeriram ser uma atividade intrínseca do canabinóide ou resultante de sua interação com receptores serotoninérgicos (ECHEVERRY *et al.*, 2021). Além disso, também já foi observado aumento

da atividade de enzimas antioxidantes como superóxido desmutase (SOD) e catalase em modelo de doença de Huntington (VALDEOLIVAS *et al.*, 2015). Desta forma, analisar marcadores de estresse oxidativo bem como a modulação de enzimas antioxidantes no modelo de discinesia tardia é uma outra possibilidade para melhor entendimento do efeito antidiscinético e interações do CBG no sistema nervoso.

Com relação ao potencial de reversão do CBG, não foi observada diminuição significativa dos VCMs após 5 dias de tratamento. Apenas uma dose foi testada, assim como apenas um período curto de tempo de tratamento. Processos de prevenção e reversão podem ser biologicamente diferentes e se dar através de mecanismos de ação distintos. Enquanto a prevenção impede que um determinado processo de alteração fisiológica ocorra, a reversão se baseia na mitigação desta alteração posteriormente à sua instalação. Assim, é possível que doses não efetivas no desenho experimental de prevenção fossem efetivas na reversão.

A associação CBG+CBD foi testada nas proporções de 2:1 e 10:1, em doses subefetivas, e em nenhuma delas houve efeito benéfico. Vale observar que neste experimento, embora o haloperidol tenha apresentado média de movimentos orais involuntários superior ao grupo veículo, não houve diferença estatística. Assim, para que esta ausência de efeito antidiscinético da combinação de canabinóides seja confirmada, é necessária a repetição do experimento.

5.5. Expressão de FosB

Os resultados mostraram que existe um padrão heterogêneo de expressão basal de FosB ao longo do estriado, sendo notavelmente maior no estriado dorso-medial do que no estriado dorso-lateral.

Reproduzindo dados já conhecidos da literatura, a região estriatal ligada ao controle motor, a dorso-lateral, teve maior expressão de FosB em grupos que receberam haloperidol, e o CBG não interferiu neste aumento. O FosB é um fator de transcrição cuja imunomarcagem é largamente utilizada como indicador de atividade neuronal. Como sua expressão é aumentada no estriado dorso-lateral pelo haloperidol, isto sugere não apenas que o haloperidol está ativando esta área, como também que o aumento da expressão de FosB neste local pode estar relacionado ao surgimento da discinesia tardia. Ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual se estabelece esta relação entre FosB e discinesia tardia. No entanto, sabe-se que a regulação da transcrição de genes é um fator importante na mediação de respostas a longo prazo para distúrbios crônicos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001), como é o caso do tratamento repetido com haloperidol. Neste sentido, destaca-se a importância de investigar não somente os

mecanismos que levam ao aumento da expressão de FosB após tratamento com antipsicóticos típicos, como também cascatas de sinalização e genes que estarão com expressão modificada após o aumento deste fator de transcrição no estriado dorso-lateral.

O estriado dorso-medial, aqui também analisado, é uma região ligada a funções associativas (para revisão, CHUHMA, et al., 2016). Embora tenha sido observado um aumento na expressão de FosB nesta região, não foi estatisticamente significativa. A literatura retrata resultados opostos: assim como no nosso trabalho, Rodríguez e colaboradores (2001) não observaram esta diferença após tratamento por 6 meses com decanoato de haloperidol. Já no trabalho de Grande e colaboradores (2004), o aumento significativo da expressão de FosB induzida por haloperidol foi encontrado após tratamento por 25 dias. No entanto, divergências de protocolo importantes devem ser destacadas: no nosso trabalho, assim como no trabalho de Rodríguez e colaboradores, os animais não foram sacrificados no mesmo dia da última injeção, ao contrário do trabalho de Grande e colaboradores, cujo sacrifício foi realizado 2 horas após o último tratamento. Esta diferença leva à hipótese de que o sacrifício dos animais 24 horas após tratamento com haloperidol leva à diminuição da expressão de FosB no estriado dorso-medial, não sendo observada diferença com relação ao grupo controle. Esta diferença, no entanto, se manteria no estriado dorso-lateral porque, como mencionado, a expressão basal de FosB nesta região é menor, logo, o aumento gerado pelo tratamento com haloperidol, mesmo sacrificando os animais 24 horas após o tratamento, ainda é significativo. Para testar esta hipótese, um experimento comparando a expressão de FosB no estriado deveria ser feito com grupos sacrificados 2 ou 24 horas após a última injeção do antipsicótico.

Com relação ao NAc, foi visto que no NAcSh existe uma expressão de FosB moderadamente menor do que no NAcC. Vale ressaltar que estas áreas são mais relacionadas ao controle límbico e de cognição. Como a expressão de FosB pode ser regulada por diversos estímulos, que vão desde aferências corticais ou de outras regiões cerebrais até fatores ambientais como exposição à luz e o manuseio diário dos animais, todos estes estímulos em conjunto podem ser responsáveis pela configuração do padrão observado. Desta forma, especialmente em relação às áreas não motoras investigadas, é possível que sejam mais suscetíveis à modulação ambiental da expressão de FosB do que o estriado dorso-lateral.

Nossos resultados mostraram que o CBG, nas doses de 10 e 30mg/kg, não aumenta a expressão de FosB no NAcC e NAcSh, em comparação com o veículo. Diferente do visto na literatura (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001 e GRANDE *et al.*, 2004), o haloperidol também não levou a um aumento significativo da expressão de FosB no NAc quando comparado ao grupo

veículo. Vale ressaltar que além das diferenças de protocolo experimental observadas, há também uma diferença na escolha dos bregmas. Nossas análises foram realizadas em torno de 0,74mm, bregma posterior aos analisados nos trabalhos mencionados (em torno de 1.60mm). Assim, é possível que a ausência de diferença de expressão de FosB induzida por haloperidol no nosso trabalho em comparação com outros da literatura se deva também a essa diferença de regiões.

Apesar de não ser ligado ao controle motor, o NAc também recebe aferências dopaminérgicas da substância negra, o que implica em alterações na neurotransmissão dopaminérgica desta região em pacientes portadores de esquizofrenia. Embora este distúrbio e a investigação do potencial antipsicótico do CBG não sejam o foco principal deste estudo, e sim a discinesia tardia e o potencial antidiscinético do canabinoide, o perfil de expressão de FosB no NAc e córtex cingulado foi investigado para fins de comparação teórica com outro canabinoide, o CBD, e outros antipsicóticos atípicos como a clozapina. Neste sentido, vale mencionar também que a administração crônica de CBG não induz aumento de expressão de FosB no estriado dorso-lateral, ao contrário dos antipsicóticos típicos discinéticos. Dados não publicados do grupo mostram efeitos positivos do CBG em teste de PPI, largamente empregado em estudos translacionais como teste preditivo para o uso de drogas com efeito antipsicótico. O CBG também foi benéfico para hiperlocomoção no campo aberto após administração de anfetamina, modelo de sintomas positivos da esquizofrenia. Este conjunto de dados sugere que o CBG configura-se como um possível antipsicótico atípico e fármaco antidiscinético.

6. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROJETO E DIFICULDADES TÉCNICAS

6.1. Diferenças entre os dois desenhos experimentais para avaliação do efeito do CBG.

Para investigação do efeito antidiscinético do CBG, dois experimentos (2A e 2B) foram realizados. No primeiro houve redução significativa dos VCMs com tratamento com CBG nas doses de 3 e 10mg/kg. O segundo experimento foi realizado para confirmar o resultado da dose de 10mg/kg e investigar o efeito da dose de 30mg/kg. Neste segundo experimento, nenhuma das doses reduziram de forma estatisticamente significativa os VCMs.

A respeito de ambos os experimentos, algumas considerações devem ser feitas. Primeiro, é importante destacar que a média de movimentos orais involuntários dos grupos tratados com haloperidol nos dois experimentos foi diferente: como mostrado na Figura 45, a média de VCMs no primeiro experimento foi em torno de 110, e comparado com a média de 76 VCMs no segundo experimento, houve redução de cerca de 31%.

**Comparação grupos haloperidol
(experimentos 2A e 2B)**

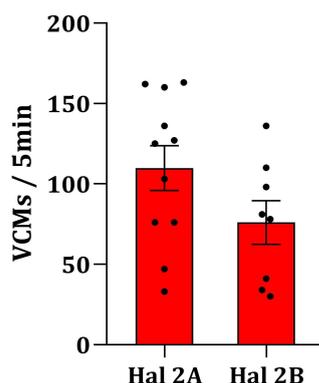


Figura 48: Comparação entre VCMs dos grupos haloperidol do experimento 2A e 2B. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

. Um olhar para os dados estatísticos leva, à primeira vista, à ideia de que o resultado de atenuação dos VCMs pelo CBG na dose de 10mg/kg não se reproduziu entre os experimentos. No entanto, a segunda observação é de que o grupo CBG10 + Haloperidol também não tem diferença estatística do grupo veículo. Além disso, a diminuição dos VCMs pelo CBG no segundo experimento foi de cerca de 30%, equivalente à redução no primeiro, que foi de 35%. Assim, mesmo que estatisticamente não tenha sido encontrada uma diferença, presume-se que o efeito biológico foi reproduzido entre os experimentos.

Cabe ressaltar que em todos os experimentos, as condições de tratamento e avaliação foram as mesmas. No entanto, em relação à diferença encontrada entre os grupos haloperidol

dos dois experimentos de investigação do efeito do CBG, por ocorrência de imprevisto de ordem pessoal da mestrandia, o primeiro experimento foi interrompido e depois retomado. Parte dos animais já havia sido tratada por 8 dias e outra parte por 3 dias, já que os grupos eram divididos ao meio devido ao grande número de animais para se avaliar em um único dia. O experimento foi recomeçado 24 dias depois. Assim, os animais deste experimento eram mais velhos que os animais utilizados nos outros experimentos.

A literatura retrata que, na clínica, a pré-exposição a antipsicóticos, bem como a idade avançada e alterações neurológicas relacionadas ao envelhecimento são fatores de risco para desenvolvimento da discinesia tardia. Em revisão, Citrome e colaboradores (2021) mostram que, em estudo com 404 pessoas acima de 55 anos, a incidência de discinesia tardia foi de 26, 30 e 60% após primeiro, segundo e terceiro ano de tratamento com antipsicóticos típicos, respectivamente (WOERNER *et al.*, 1998). Esse cenário é diferente quando comparado a pessoas mais jovens, cuja meta-análise de 32 estudos mostrou uma incidência anual de discinesia de 6,5% após uso de antipsicóticos típicos (CARBON *et al.*, 2017). Embora os antipsicóticos atípicos tenham como característica a baixa potência de induzir efeitos motores, estudos também apontam que pessoas mais velhas têm incidência de 6 e 7% após primeiro e segundo ano de uso de antipsicóticos atípicos, números que caem para menos que 3% em pessoas mais jovens (WOERNER *et al.*, 2011; para revisão, CITROME *et al.*, 2021). Em estudos pré-clínicos, também foi mostrado que a média de VCMs induzidos por haloperidol em ratos aumenta de forma significativa em animais mais velhos (HARVEY & NEL, 2003).

Os experimentos que analisam o fator idade na indução dos VCMs usam animais com diferença de idade da ordem de meses. Apesar da discrepância de idade com o cenário aqui discutido, nas palavras de Torrone e colaboradores (2002), “vale lembrar que duas semanas é um tempo relativamente longo no tempo médio de vida de um rato”, ou neste caso, um camundongo. Assim, com base nos estudos citados, é possível que a idade mais avançada dos animais (24 dias), assim como a pré-exposição ao antipsicótico que foi interrompida e depois retomada, possa ter influenciado na indução dos VCMs de forma mais acentuada no grupo haloperidol do primeiro experimento. Para que esta hipótese seja corroborada, experimentos adicionais podem ser realizados objetivando comparar esta diferença de tempo entre grupos tratados com haloperidol na indução dos VCMs.

6.2. Análise de ROS e de Microglia do experimento 2A

Foi proposta a análise de ROS em alguns dos experimentos descritos, no entanto, estas análises não foram executadas. No primeiro experimento, embora tenha sido observado efeito benéfico do CBG no modelo, a porção rostro-medial do encéfalo destinada a esta análise foi congelada no nitrogênio líquido, pela falta de gelo seco no período de execução do experimento. No entanto, este método não é o usualmente empregado, e isto impossibilitou o posterior uso do tecido para fazer a técnica. Pressupõe-se que o congelamento no nitrogênio líquido foi muito rápido e o tecido foi destruído, o que inviabilizou o corte no criostato. Já nos experimentos de reversão dos VCMs pelo CBG e de investigação do efeito da associação CBD+CBG, o tecido foi congelado no gelo seco, como no protocolo estabelecido, mas devido à ausência de resultados positivos nos testes comportamentais, a análise molecular ainda não foi realizada.

Outras análise comprometida foi a de morfologia da microglia nos tecidos do experimento 2A (efeito do CBG as doses de 3 e 10mg/kg), pois na execução desta imunohistoquímica, uma menor quantidade de peróxido de hidrogênio foi utilizada para ativação da DAB no processo de revelação, resultando em uma marcação mais fraca.

Em relação à análise de densidade óptica integrada da microglia, sabe-se que usualmente é realizada com imagens no aumento de 20x. Para esta análise, aqui foram usadas imagens com aumento de 40x, mas esta investigação será posteriormente refeita com as imagens no aumento correto para futura publicação do paper.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que tratamento por 14 dias com haloperidol na dose de 3mg/kg aplicado via subcutânea constitui um modelo de discinesia tardia. A dose de 2mg/kg também é efetiva, ao contrário da dose de 1mg/kg, o que indica um efeito dose-resposta.

A construção do modelo mostrou que para observação dos movimentos orais involuntários, é necessário que a análise seja efetuada 24 horas após a última injeção, pois este efeito não é observado no período de 1-5 horas após o tratamento. Neste sentido, é sugerido que alterações plásticas geradas pelo antagonismo prolongado de receptores D2 pelo haloperidol participem da indução dos movimentos involuntários, mas a retirada do fármaco é necessária para que haja esta observação. Além disso, o haloperidol aumenta a expressão de FosB no estriado dorso-lateral, o que provavelmente está relacionado ao surgimento da discinesia tardia.

Dentro do período de 1-5 horas após administração de haloperidol a atividade motora dos animais é reduzida, mas retorna aos níveis normais quando avaliada 24 horas depois. Isto sugere que a presença do haloperidol no organismo seja necessária para que haja hipolocomoção ou acinesia, que provavelmente também interfere na observação dos movimentos orais involuntários.

O CBG não induz movimentos orais involuntários *per se* e, nas doses de 3 e 10mg/kg, atenua os movimentos induzidos por haloperidol, sem alterar a atividade locomotora dos animais. Quando associado ao haloperidol, o CBG não leva à diminuição da expressão de FosB no estriado dorso-lateral ou à modificação da morfologia da microglia, sugerindo que o efeito antidiscinético aqui observado ocorra por outros mecanismos que não envolvam estes aqui investigados.

Nas condições testadas, não foi observado efeito de reversão do CBG na indução dos movimentos orais involuntários. Também não foram observados benefícios da associação CBD+CBG (proporções 2:1 e 10:1) no modelo delineado. Vale ressaltar que neste experimento, embora o grupo haloperidol tenha apresentado uma média de VCMs superior ao veículo, não foi observada diferença estatística, o que leva à necessidade de repetição para confirmação deste resultado.

Experimentos futuros são necessários para melhor investigação dos mecanismos de ação antidiscinética do CBG, e as avaliações da expressão de FosB em áreas límbicas do cérebro realizadas neste trabalho podem contribuir com outros estudos em andamento, inclusive de atividade antipsicótica do CBG, para melhor compreensão dos efeitos deste canabinóide no SNC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, H. M.; TAN, Y. L.; SHI, J.; WANG, Z. R. *et al.* Altered IL-2, IL-6 and IL-8 serum levels in schizophrenia patients with tardive dyskinesia. **Schizophr Res**, 162, n. 1-3, p. 261-268, Mar 2015.

ANDREASSEN, O. A.; JØRGENSEN, H. A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? **Prog Neurobiol**, 61, n. 5, p. 525-541, Aug 2000.

BISHNOI, M.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S. K. Activation of striatal inflammatory mediators and caspase-3 is central to haloperidol-induced orofacial dyskinesia. **Eur J Pharmacol**, 590, n. 1-3, p. 241-245, Aug 2008a.

BISHNOI, M.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S. K. Differential striatal levels of TNF-alpha, NFkappaB p65 subunit and dopamine with chronic typical and atypical neuroleptic treatment: role in orofacial dyskinesia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 32, n. 6, p. 1473-1478, Aug 2008b.

BLANCHET, P. J.; PARENT, M. T.; ROMPRÉ, P. H.; LÉVESQUE, D. Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. **Behav Brain Funct**, 8, p. 12, Mar 09 2012.

BONINI, S. A.; PREMOLI, M.; TAMBARO, S.; KUMAR, A. *et al.* Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **J Ethnopharmacol**, 227, p. 300-315, Dec 05 2018.

BURT, D. R.; CREESE, I.; SNYDER, S. H. Antischizophrenic drugs: chronic treatment elevates dopamine receptor binding in brain. **Science**, 196, n. 4287, p. 326-328, Apr 15 1977.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; SONEGO, A. B.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. **Pharmacol Res**, 112, p. 119-127, Oct 2016.

CARBON, M.; HSIEH, C. H.; KANE, J. M.; CORRELL, C. U. Tardive Dyskinesia Prevalence in the Period of Second-Generation Antipsychotic Use: A Meta-Analysis. **J Clin Psychiatry**, 78, n. 3, p. e264-e278, Mar 2017.

CASEY, D. E. Tardive dyskinesia: pathophysiology and animal models. **J Clin Psychiatry**, 61 Suppl 4, p. 5-9, 2000.

CHUHMA, N.; MINGOTE, S.; KALMBACH, A.; YETNIKOFF, L. *et al.* Heterogeneity in Dopamine Neuron Synaptic Actions Across the Striatum and Its Relevance for Schizophrenia. **Biol Psychiatry**, 81, n. 1, p. 43-51, Jan 01 2017.

CITROME, L.; ISAACSON, S. H.; LARSON, D.; KREMENS, D. Tardive Dyskinesia in Older Persons Taking Antipsychotics. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 17, p. 3127-3134, 2021.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E. **The biochemical basis of neuropharmacology**. 8th ed ed. New York: Oxford University Press, 2003

CORRELL, C. U.; KANE, J. M.; CITROME, L. L. Epidemiology, Prevention, and Assessment of Tardive Dyskinesia and Advances in Treatment. **J Clin Psychiatry**, 78, n. 8, p. 1136-1147, 2017 Sep/Oct 2017.

DE KEYSER, J. Excitotoxic mechanisms may be involved in the pathophysiology of tardive dyskinesia. **Clin Neuropharmacol**, 14, n. 6, p. 562-565, Dec 1991.

DE KEYSER, J.; WALRAEVENS, H.; DE BACKER, J. P.; EBINGER, G. *et al.* D2 dopamine receptors in the human brain: heterogeneity based on differences in guanine nucleotide effect on agonist binding, and their presence on corticostriatal nerve terminals. **Brain Res**, 484, n. 1-2, p. 36-42, Apr 10 1989.

DI GIACOMO, V.; CHIAVAROLI, A.; RECINELLA, L.; ORLANDO, G. *et al.* Antioxidant and Neuroprotective Effects Induced by Cannabidiol and Cannabigerol in Rat CTX-TNA2 Astrocytes and Isolated Cortexes. **Int J Mol Sci**, 21, n. 10, May 18 2020.

ECHEVERRY, C.; PRUNELL, G.; NARBONDO, C.; DE MEDINA, V. S. *et al.* A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT. **Neurotox Res**, 39, n. 2, p. 335-348, Apr 2021.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; SAGREDO, O.; PAZOS, M. R.; GARCÍA, C. *et al.* Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? **Br J Clin Pharmacol**, 75, n. 2, p. 323-333, Feb 2013.

FLATOW, J.; BUCKLEY, P.; MILLER, B. J. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. **Biol Psychiatry**, 74, n. 6, p. 400-409, Sep 2013.

FREI, K. Tardive dyskinesia: Who gets it and why. **Parkinsonism Relat Disord**, Nov 2018.

GODUKHIN, O. V.; ZHARIKOVA, A. D.; BUDANTSEV AYU. Role of presynaptic dopamine receptors in regulation of the glutamatergic neurotransmission in rat neostriatum. **Neuroscience**, 12, n. 2, p. 377-383, Jun 1984.

GOMES, F. V.; ISSY, A. C.; FERREIRA, F. R.; VIVEROS, M. P. *et al.* Cannabidiol attenuates sensorimotor gating disruption and molecular changes induced by chronic antagonism of NMDA receptors in mice. **Int J Neuropsychopharmacol**, 18, n. 5, Oct 31 2014.

GOMES, F. V.; LLORENTE, R.; DEL BEL, E. A.; VIVEROS, M. P. *et al.* Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. **Schizophr Res**, 164, n. 1-3, p. 155-163, May 2015.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 5, p. 69-91.

GRANDE, C.; ZHU, H.; MARTIN, A. B.; LEE, M. *et al.* Chronic treatment with atypical neuroleptics induces striosomal FosB/DeltaFosB expression in rats. **Biol Psychiatry**, 55, n. 5, p. 457-463, Mar 01 2004.

GUIMARÃES, V. M.; ZUARDI, A. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol increases Fos expression in the nucleus accumbens but not in the dorsal striatum. **Life Sci**, 75, n. 5, p. 633-638, Jun 2004.

HARVEY, B. H.; NEL, A. Role of aging and striatal nitric oxide synthase activity in an animal model of tardive dyskinesia. **Brain Res Bull**, 61, n. 4, p. 407-416, Aug 30 2003.

HARVEY, P. D.; KEEFE, R. S. Studies of cognitive change in patients with schizophrenia following novel antipsychotic treatment. **Am J Psychiatry**, 158, n. 2, p. 176-184, Feb 2001.

IVERSEN, S. D.; IVERSEN, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends Neurosci**, 30, n. 5, p. 188-193, May 2007.

IVERSEN, D.; IVERSEN, B. Dopamine Handbook. 1. ed. New York: Oxford University Press, 2010.

JELLINGER, K. A. Neuropathology and pathogenesis of extrapyramidal movement disorders: a critical update-I. Hypokinetic-rigid movement disorders. **J Neural Transm (Vienna)**, 126, n. 8, p. 933-995, Aug 2019.

KAPUR, S.; MAMO, D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 27, n. 7, p. 1081-1090, Oct 2003.

KAPUR, S.; WADENBERG, M. L.; REMINGTON, G. Are animal studies of antipsychotics appropriately dosed? Lessons from the bedside to the bench. **Can J Psychiatry**, 45, n. 3, p. 241-246, Apr 2000.

KETTENMANN, H.; HANISCH, U. K.; NODA, M.; VERKHRATSKY, A. Physiology of microglia. **Physiol Rev**, 91, n. 2, p. 461-553, Apr 2011.

LANGER, J.; SEEBER, U.; KUSCHINSKY, K.; SONTAG, K. H. Effect of haloperidol on reflex activation of rat alpha-motoneurons. A possible explanation for akinesia and catalepsy? **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 308, n. 2, p. 149-154, Aug 1979.

LEWEKE, F. M.; PIOMELLI, D.; PAHLISCH, F.; MUHL, D. *et al.* Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Transl Psychiatry**, 2, p. e94, Mar 20 2012.

LISTER, J.; NOBREGA, J. N.; FLETCHER, P. J.; REMINGTON, G. Oxidative stress and the antipsychotic-induced vacuous chewing movement model of tardive dyskinesia: evidence for antioxidant-based prevention strategies. **Psychopharmacology (Berl)**, 231, n. 11, p. 2237-2249, Jun 2014.

LOHR, J. B.; KUCZENSKI, R.; NICULESCU, A. B. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. **CNS Drugs**, 17, n. 1, p. 47-62, 2003.

LOONEN, A. J.; IVANOVA, S. A. New insights into the mechanism of drug-induced dyskinesia. **CNS Spectr**, 18, n. 1, p. 15-20, Feb 2013.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. The consolidation of neuroleptic therapy: Janssen, the discovery of haloperidol and its introduction into clinical practice. **Brain Res Bull**, 79, n. 2, p. 130-141, Apr 29 2009.

MACHHOLZ, E.; MULDER, G.; RUIZ, C.; CORNING, B. F. *et al.* Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. **J Vis Exp**, n. 67, Sep 26 2012.

- MARGOLIUS, A.; FERNANDEZ, H. H. Current treatment of tardive dyskinesia. **Parkinsonism Relat Disord**, 59, p. 155-160, Feb 2019.
- MCGUIRE, P.; ROBSON, P.; CUBALA, W. J.; VASILE, D. *et al.* Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. **Am J Psychiatry**, 175, n. 3, p. 225-231, 03 01 2018.
- MELTZER, H. Y. Update on typical and atypical antipsychotic drugs. **Annu Rev Med**, 64, p. 393-406, 2013.
- MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **Eur J Pharmacol**, 512, n. 2-3, p. 199-205, Apr 2005.
- MUENCH, J.; HAMER, A. M. Adverse effects of antipsychotic medications. **Am Fam Physician**, 81, n. 5, p. 617-622, Mar 01 2010.
- NACHNANI, R.; RAUP-KONSAVAGE, W. M.; VRANA, K. E. The Pharmacological Case for Cannabigerol. **J Pharmacol Exp Ther**, 376, n. 2, p. 204-212, 02 2021.
- NAVARRO, G.; VARANI, K.; REYES-RESINA, I.; SÁNCHEZ DE MEDINA, V. *et al.* Cannabigerol Action at Cannabinoid CB. **Front Pharmacol**, 9, p. 632, 2018.
- O'SULLIVAN, S. E. An update on PPAR activation by cannabinoids. **Br J Pharmacol**, 173, n. 12, p. 1899-1910, 06 2016.
- PAXINOS, G; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2. ed. Sydney: Elsevier, 2010.
- PEDRAZZI, J. F.; ISSY, A. C.; GOMES, F. V.; GUIMARÃES, F. S. *et al.* Cannabidiol effects in the prepulse inhibition disruption induced by amphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**, 232, n. 16, p. 3057-3065, Aug 2015.
- PEROZA, L. R.; SCHAFFER, L. F.; DE FREITAS, C. M.; LEAL, C. Q. *et al.* Alteration of Cytokines Levels in the Striatum of Rats: Possible Participation in Vacuous Chewing Movements Induced by Antipsychotics. **Neurochem Res**, 41, n. 9, p. 2481-2489, Sep 2016.
- PURVES, Dale *et al.* **Neurociências**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- RAHMAN S, MARWAHA R. Haloperidol. 2022 Jul 4. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 32809727.
- RASCOL, O.; FABRE, N. Dyskinesia: L-dopa-induced and tardive dyskinesia. **Clin Neuropharmacol**, 24, n. 6, p. 313-323, 2001 Nov-Dec 2001.
- RODRÍGUEZ, J. J.; GARCIA, D. R.; NAKABEPPU, Y.; PICKEL, V. M. FosB in rat striatum: normal regional distribution and enhanced expression after 6-month haloperidol administration. **Synapse**, 39, n. 2, p. 122-132, Feb 2001.
- SACHDEV, P. S. The current status of tardive dyskinesia. **Aust N Z J Psychiatry**, 34, n. 3, p. 355-369, Jun 2000.

SAGARA, Y. Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. **J Neurochem**, 71, n. 3, p. 1002-1012, Sep 1998.

SEE, R. E.; LYNCH, A. M. Chronic haloperidol potentiates stimulated glutamate release in caudate putamen, but not prefrontal cortex. **Neuroreport**, 6, n. 13, p. 1795-1798, Sep 11 1995.

SEEMAN, P.; KAPUR, S. Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 14, p. 7673-7675, Jul 2000.

SILVESTRI, S.; SEEMAN, M. V.; NEGRETE, J. C.; HOULE, S. *et al.* Increased dopamine D2 receptor binding after long-term treatment with antipsychotics in humans: a clinical PET study. **Psychopharmacology (Berl)**, 152, n. 2, p. 174-180, Oct 2000.

SONEGO, A. B.; PRADO, D. D. 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. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 111, p. 110367, Dec 20 2021.

SONEGO, A. B.; PRADO, D. S.; VALE, G. T.; SEPULVEDA-DIAZ, J. E. *et al.* Cannabidiol prevents haloperidol-induced vacuos chewing movements and inflammatory changes in mice via PPAR γ receptors. **Brain Behav Immun**, 74, p. 241-251, 11 2018.

STAHL, S. M. Neuronal traffic signals in tardive dyskinesia: not enough "stop" in the motor striatum. **CNS Spectr**, 22, n. 6, p. 427-434, 12 2017.

STAHL, S. M. Mechanism of action of vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) inhibitors in tardive dyskinesia: reducing dopamine leads to less "go" and more "stop" from the motor striatum for robust therapeutic effects. **CNS Spectr**, 23, n. 1, p. 1-6, 02 2018.

STEFAN, M.; TRAVIS, M.; MURRAY, R. **An atlas of schizophrenia**. New York: Parthenon Pub. Group, 2002.

STONE, N. L.; ENGLAND, T. J.; O'SULLIVAN, S. E. Protective Effects of Cannabidivarin and Cannabigerol on Cells of the Blood-Brain Barrier Under Ischemic Conditions. **Cannabis Cannabinoid Res**, 6, n. 4, p. 315-326, Aug 2021.

TURNER, P. V.; BRABB, T.; PEKOW, C.; VASBINDER, M. A. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, 50, n. 5, p. 600-613, Sep 2011.

TURRONE, P.; REMINGTON, G.; KAPUR, S.; NOBREGA, J. N. The relationship between dopamine D2 receptor occupancy and the vacuous chewing movement syndrome in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 165, n. 2, p. 166-171, Jan 2003.

TURRONE, P.; REMINGTON, G.; NOBREGA, J. N. The vacuous chewing movement (VCM) model of tardive dyskinesia revisited: is there a relationship to dopamine D(2) receptor occupancy? **Neurosci Biobehav Rev**, 26, n. 3, p. 361-380, May 2002.

VALDEOLIVAS, S.; NAVARRETE, C.; CANTARERO, I.; BELLIDO, M. L. *et al.* Neuroprotective properties of cannabigerol in Huntington's disease: studies in R6/2 mice and 3-nitropropionate-lesioned mice. **Neurotherapeutics**, 12, n. 1, p. 185-199, Jan 2015.

WOERNER, M. G.; ALVIR, J. M.; SALTZ, B. L.; LIEBERMAN, J. A. *et al.* Prospective study of tardive dyskinesia in the elderly: rates and risk factors. **Am J Psychiatry**, 155, n. 11, p. 1521-1528, Nov 1998.

WOERNER, M. G.; CORRELL, C. U.; ALVIR, J. M.; GREENWALD, B. *et al.* Incidence of tardive dyskinesia with risperidone or olanzapine in the elderly: results from a 2-year, prospective study in antipsychotic-naïve patients. **Neuropsychopharmacology**, 36, n. 8, p. 1738-1746, Jul 2011.

YOUNG, K.; MORRISON, H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. **J Vis Exp**, n. 136, Jun 05 2018.

ZAI, C. C.; MAES, M. S.; TIWARI, A. K.; ZAI, G. C. *et al.* Genetics of tardive dyskinesia: Promising leads and ways forward. **J Neurol Sci**, 389, p. 28-34, Jun 15 2018.

ZHANG, W.; TILSON, H.; STACHOWIAK, M. K.; HONG, J. S. Repeated haloperidol administration changes basal release of striatal dopamine and subsequent response to haloperidol challenge. **Brain Res**, 484, n. 1-2, p. 389-392, Apr 10 1989.

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; BHATTACHARYYA, S. *et al.* A critical review of the antipsychotic effects of cannabidiol: 30 years of a translational investigation. **Curr Pharm Des**, 18, n. 32, p. 5131-5140, 2012.

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; MOREIRA, F. A. *et al.* Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. **Braz J Med Biol Res**, 39, n. 4, p. 421-429, Apr 2006.

ZUARDI, A. W.; MORAIS, S. L.; GUIMARÃES, F. S.; MECHOULAM, R. Antipsychotic effect of cannabidiol. **J Clin Psychiatry**, 56, n. 10, p. 485-486, Oct 1995.

ZUARDI, A. W.; RODRIGUES, J. A.; CUNHA, J. M. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. **Psychopharmacology (Berl)**, 104, n. 2, p. 260-264, 1991.

ZUARDI, A. W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARB, E.; KARNIOL, I. G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology (Berl)**, 76, n. 3, p. 245-250, 1982.

ZUARDI, A. W.. History of cannabis as a medicine: a review. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 28, n. Braz. J. Psychiatry, 2006 28(2), jun. 2006.

ANEXO

Tabelas com valores estatísticos:

Tabela 5: Valores estatísticos de *one way* ANOVA das curvas temporais do haloperidol (2 e 3mg/kg).

Comparação entre dias 1, 7, 14 e 15	DOSES	
	2mg/kg	3mg/kg
1 hora pós tratamento	F (1.209, 7.254) = 23.22, p=0,0014	F (1.297, 6.486) = 17.88, p=0,0035
2 horas pós tratamento	F (1.112, 6.672) = 35.40, p=0,0006	F (1.076, 5.381) = 28.13, p=0,0024
3 horas pós tratamento	F (1.164, 6.983) = 35.01, p=0,0005	F (1.254, 6.271) = 23.42, p=0,0020
4 horas pós tratamento	F (1.149, 6.895) = 34.56, p=0,0005	F (1.297, 6.487) = 20.75, p=0,0024
5 horas pós tratamento	F (1.311, 7.865) = 27.75, p=0,0005	F (1.505, 7.527) = 19.49, p=0,0015

Fonte: GraphPad Prism8.

Tabela 6: Valores estatísticos de *posthoc* Tukey das curvas temporais do haloperidol (2 e 3mg/kg).

	Dose	Dia 15 x Dia 1	Dia 15 x Dia 7	Dia 15 x Dia 14
1 hora pós tratamento	2mg/kg	p=0,0031	p=0,0347	p=0,0031
	3mg/kg	p=0,0094	p=0,0478	p=0,0225
2 horas pós tratamento	2mg/kg	p=0,0022	p=0,0094	p=0,0024
	3mg/kg	p=0,0084	p=0,0107	p=0,0142
3 horas pós tratamento	2mg/kg	p=0,0026	p=0,0067	p=0,0024
	3mg/kg	p=0,0094	p=0,0146	p=0,0285
4 horas pós tratamento	2mg/kg	p=0,0029	p=0,0079	p=0,0019
	3mg/kg	p=0,0091	p=0,0298	p=0,0390
5 horas pós tratamento	2mg/kg	p=0,0042	p=0,0106	p=0,0030
	3mg/kg	p=0,0096	p=0,0246	p=0,0340

Fonte: GraphPad Prism8.

Tabela 7: Valores estatísticos de *two way* ANOVA da avaliação da atividade motora dos animais tratados com CBG e/ou haloperidol.

	Tratamento	Tempo	Interação
Movimentos Horizontais (Total)	F (5, 40) = 15.17, p<0,0001	F (2, 80) = 15.21, p<0,0001	F (10, 80) = 11.03, p<0,0001
Estereotipia	F (5, 40) = 9.655, p<0,0001	F (2, 80) = 10.30, p=0,0001	F (10, 80) = 6.675, p<0,0001
Movimentos Verticais (Total)	F (5, 40) = 7.298, p<0,0001	F (2, 80) = 5.724, p=0,0047	F (10, 80) = 6.487, p<0,0001

Fonte: GraphPad Prism8.

Tabela 8: Valores estatísticos de *one way* ANOVA e *posthoc* Tukey da quantificação de FosB no estriado dorso-lateral rostral, medial e caudal dos animais tratados com haloperidol.

	<i>one way</i> ANOVA	Tratamento	<i>posthoc</i> Tukey
CPu DL (Rostral)	F (5, 29) = 14.40, p<0,0001	Haloperidol CBG10+Hal CBG30+Hal	p= 0,0003 p=0,0004 p=0,0131
CPu DL (Medial)	F (5, 30) = 12.34, p<0,0001	Haloperidol CBG10+Hal	p= 0,0003 p=0,0036
CPu DL (Caudal)	F (5, 26) = 4.598, p=0,0039	Haloperidol CBG10+Hal	p=0,0205 p=0,0297

Fonte: GraphPad Prism8.

Tabela 9: Valores estatísticos de *two way* ANOVA e *posthoc* Sidak da avaliação da atividade motora dos animais (experimento de efeito de reversão do CBG10).

	ANOVA			<i>posthoc</i> Sidak	
	Tratamento	Tempo	Interação	Dia 1	Dia 14
Movimentos Horizontais (Total)	F (1, 13) = 14.24, p=0,0023	F (2.064, 26.84) = 10.90, p=0,0003	F (3, 39) = 26.71, p<0,0001	p=0,0008	p=0,0011
Estereotipia	F (1, 13) = 9.609, p=0,0085	F (2.382, 27.48) = 29.04, p<0,0001	F (3, 39) = 33.81, p<0,0001	p<0,0001	0,0129
Movimentos Verticais (Total)	F (1, 13) = 24.19, p=0,0003	F (2.114, 30.97) = 66.04, p<0,0001	F (3, 39) = 65.60, p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001

Fonte: GraphPad Prism8.

Tabela 10: Valores estatísticos de *two way* ANOVA da avaliação da atividade motora dos animais tratados com haloperidol e/ou CBD/CBG.

	Tratamento	Tempo	Interação
Movimentos Horizontais (Total)	F (8, 58) = 30.33, p<0,0001	F (1.971, 114.3) = 169, p<0,0001	F (16, 116) = 11.73, p<0,0001
Estereotipia	F (8, 58) = 13.07, p<0,0001	F (1.953, 113.3) = 320.8, p<0,0001	F (16, 116) = 12.52, p<0,0001
Movimentos Verticais (Total)	F (8, 58) = 24.07, p<0,0001	F (1.864, 108.1) = 367.2, p<0,0001	F (16, 116) = 10.61, p<0,0001

Fonte: GraphPad Prism8.