

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

**Investigação do possível efeito antipsicótico do HU-910, um agonista  
seletivo de receptores canabinoide do tipo 2 (CB2)**

ISADORA LOPES CORTEZ

**Ribeirão Preto**

**2018**

ISADORA LOPES CORTEZ

**Investigação do possível efeito antipsicótico do HU-910, um agonista seletivo de receptores canabinoide do tipo 2 (CB2)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte das exigências para a conclusão da ênfase em Ciências Básicas da Saúde e para a obtenção do bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Profº Drº Francisco Silveira Guimarães

Coorientadoras: Naielly Rodrigues da Silva e Nicole Rodrigues da Silva

Ribeirão Preto / SP

2018

***Aos meus pais, Sheila e Vanderlei  
e à minha irmã, Carol, por todo  
apoio e carinho dedicados a mim  
durante os anos de graduação.***

***Aos meus tios, Bernadete e  
Carlos, por tornarem esse  
trabalho possível da maneira mais  
nobre.***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Sheila e Vanderlei, por tudo que sempre fizeram por nossa família. Por me darem as oportunidades que precisei para chegar aqui, por me apoiarem, pela paciência e amor puro. Agradeço à minha irmã, Carol, pelos momentos de distração nas visitas de final de semana, por me receber com tanta alegria cada vez que voltava para casa. Eu amo vocês, imensa e verdadeiramente.

Aos meus tios, Bernadete e Carlos, por me receberem em sua casa no ano mais difícil da graduação. Obrigada por cada conversa e orientação sobre essa etapa de minha vida, por cada churrasco de final de semana. Eu sou e sempre serei grata. Vocês são minha inspiração profissional e pessoal.

Aos meus tios e tias, primos e avós, pelo apoio, por compartilharem das minhas pequenas conquistas, por torcerem por mim em tudo que faço. Por me receberem deliciosamente nos retornos à Presidente Prudente. Muito obrigada!

Às minhas amigas Nathália e Rafaela, que mesmo de longe foram me acompanhando nos mais diversos desafios enfrentados nesses quatro anos. Obrigada pelas conversas, fossem elas apenas distrativas ou reflexivas.

À minha amiga e colega de turma, Gabriela, por tornar esses anos de graduação mais leves (quando possível), por todos os vinhos tomados na sacada de casa, pelas palavras de apoio, pelo “empurrão” quando precisei e pelas vezes que me abrigou nos finais de semana em Ribeirão Preto. Te desejo todo sucesso nessa nova fase que iniciamos e que nossos caminhos, tão distintos desde o comecinho da graduação, não nos afaste nunca.

Ao meu namorado, Leonardo, que me deu suporte tão sólido nesse período que tudo pareceu bem mais fácil. Obrigada pelo seu companheirismo, apoio, dedicação, por cada momento que não me deixou desistir. Sempre vou lembrar do que fez por mim!

Às minhas colegas do Laboratório de Psicofarmacologia, Alice, Andreza, Carla, Naielly, Nicole e Sabrina que me receberam de braços abertos, me acolheram, me aconselharam e me ensinaram tanto nesses anos de laboratório. Obrigada por cada Silvão, por cada churrasco. Obrigada especial à Andreza, sem a qual

as imunohistoquímicas deste trabalho não seriam possíveis. Muito obrigada por me ensinar a técnica e pelas discussões científicas. Eu adoro demais cada uma de vocês!

Às minhas coorientadoras, Naielly e Nicole, por me ensinarem tudo que sabiam, pela paciência em explicar, em discutir. Por me acalmarem nos momentos que a ciência parecia difícil demais para continuar. Obrigada por aceitarem me acompanhar em minha iniciação científica e trabalho de conclusão de curso e pela confiança que depositaram em mim durante esse período.

Agradeço ao professor Felipe Villela Gomes, que em pouco tempo de convivência me deu a oportunidade de discutir este trabalho e, assim, contribuiu significativamente para as interpretações destes resultados.

Ao professor Francisco Guimarães, por me aceitar em seu laboratório, por me dar a oportunidade de trabalhar com pessoas incríveis e inspiradoras e com um projeto tão bem construído. Obrigada por cada discussão científica e cultural, contribuindo para minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Obrigada por todas as indicações de filmes, séries e roteiros de viagens. Vou me lembrar desses roteiros quando chegar a hora. Muito obrigada pela confiança em meu trabalho!

À todos os funcionários da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que de alguma forma passaram pelo meu caminho e contribuíram para conclusão desse processo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa realizada também por alunos da graduação.

Meu muito obrigada a todos e todas que, de alguma, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional durante esses anos. Obrigada aos alunos do Laboratório de Neuroplasticidade, da professora Dra Alline Cristina de Campos, pelo convívio dentro e fora do laboratório, pelos momentos de construção científica e de descontração. Eu sou muito grata a todos vocês!

## RESUMO

Os fármacos utilizados para o tratamento da esquizofrenia modulam, principalmente, os sintomas positivos da doença, tem baixa tolerabilidade e altos índices de descontinuação do tratamento. Recentes evidências sugerem que o sistema endocanabinoide pode ser um novo alvo no tratamento deste transtorno. O receptor canabinoide do tipo 2 pode modular a neurotransmissão dopaminérgica, assim como atenuar o efeito de citocinas pró-inflamatórias e ativação de micróglia, alterações observadas em pacientes com esquizofrenia. O composto HU-910, um agonista CB2, mostrou-se eficaz em atenuar citocinas pró-inflamatórias e injúrias/danos teciduais em um modelo de isquemia. A administração aguda e crônica de MK-801 tem sido proposta como modelo para estudar efeitos de novos antipsicóticos sobre sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia. No presente estudo avaliamos a capacidade do composto HU-910 em reverter comportamentos relacionados à esquizofrenia em modelos baseados no tratamento agudo (causando hiperlocomoção) ou repetido (resultando em prejuízos na memória e interação social) com MK-801, bem como a capacidade desse composto em produzir a tétrede canabinoide, um conjunto de alterações comportamentais (analgesia, hipolocomoção, catalepsia e hipotermia) que depende da ativação de receptores CB1. Nos resultados obtidos, o HU-910 preveniu a hiperlocomoção induzida pelo MK-801, mas não pela anfetamina. Além disso, o HU-910 reverteu os prejuízos no teste de reconhecimento de objetos causados pela administração repetida de MK-801. O pré-tratamento com AM630, antagonista de receptores CB2, não bloqueou os efeitos do HU-910 no teste de reconhecimento de objetos, mas bloqueou os efeitos do composto na hiperlocomoção induzida por MK-801. Não foram observadas alterações na expressão da proteína FosB, utilizada como marcador de ativação neuronal após estímulo repetido no córtex pré-frontal medial, no estriado e no núcleo *accumbens*. Na dose efetiva no teste de hiperlocomoção, o HU-910 não promoveu a tétrede canabinoide, sugerindo ausência de atividade agonística CB1 na dose utilizada. Esses resultados corroboram a hipótese de que o HU-910 possui provável atividade antipsicótica, sem induzir os efeitos da tétrede canabinoide.

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

## **ABSTRACT**

Drugs used to treat schizophrenia usually modulate only the positive symptoms of the disorder, have low tolerability and high rates of treatment discontinuation. Recent evidence suggests that the endocannabinoid system may be a new target in the treatment of this disorder. The type 2 cannabinoid receptor modulates dopaminergic neurotransmission and attenuates the effect of proinflammatory cytokines and microglial activation, changes observed in patients with schizophrenia. HU-910, a CB2 agonist, decreases proinflammatory cytokines and injury/tissue damage in a model of ischemia. The acute or chronic administration of MK-801 has been proposed as a model for studying the effects of new antipsychotics on positive, negative, and cognitive symptoms of schizophrenia. Thus, the hypothesis of the present work is that HU-910, by activating CB2 receptors, would be able to revert schizophrenia-related behaviors (hyperlocomotion, memory impairment and social interaction) induced by MK-801. Furthermore, since it is a CB2 agonist, HU-910 would not produce the cannabinoid tetrad, a set of behavioral changes (analgesia, hypolocomotion, catalepsy and hypothermia) that depend on CB1 receptor activation. HU-910 prevented MK-801 but not amphetamine-induced hyperlocomotion. Besides that, it reversed the impairment on the object recognition test caused by repeated MK-801 administration. Pretreatment with AM630, a CB2 receptor antagonist, did not block the effects of HU-910 on the object recognition tests, but attenuated the effect of this compound on the MK-801-induced hyperlocomotion. No change was observed in FosB protein expression, used as a marker of neuronal activation after repeated stimulation on pre-frontal cortex, striatum, and nucleus accumbens. At the effective dose, HU-910 did not promote all the effects of cannabinoid tetrad, suggesting absence of CB1 agonistic activity at that dose. These data corroborate the hypothesis that HU-910 has potential antipsychotic-properties without inducing the cannabinoid tetrad.

**Key-words:** schizophrenia, CB2, HU-910 and cannabinoid

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática do procedimento experimental do teste de hiperlocomoção induzida por MK-801.

**Figura 2.** Representação esquemática do procedimento experimental do teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina.

**Figura 3.** Representação esquemática do procedimento experimental dos tratamentos repetidos com MK-801 e HU-910 mostrando os dias de tratamento e dos testes a serem realizados.

**Figura 4.** Representação esquemática do procedimento experimental do tratamento com MK-801, AM630 e HU-910.

**Figura 5.** Representação esquemática do procedimento experimental da tétrade canabinoide, indicando os testes realizados, o tempo da injeção e o tempo dos testes.

**Figura 6.** Efeito do tratamento agudo com HU-910 no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg) (n = 5-6/grupo).

**Figura 7.** Efeito do tratamento agudo com HU-910 na hiperlocomoção induzida com anfetamina (2,5 mg/kg) (n = 10-12/grupo).

**Figura 8.** Efeito do tratamento repetido com HU-910 e clozapina sobre o prejuízo no teste de interação social pelo pré-tratamento com MK-801 (n = 8-10/grupo).



**Figura 9.** Efeito do tratamento repetido com HU-910 e clozapina sobre o prejuízo no teste de reconhecimento de objetos pelo pré-tratamento com MK-801 (n = 8-10/grupo).

**Figura 10.** Efeito do tratamento repetido com AM630 e HU-910 após o pré-tratamento com MK-801 no teste de interação social (n = 6/grupo).

**Figura 11.** Efeito do tratamento repetido com AM630 e HU-910 sobre prejuízos causados pelo tratamento com MK-801 no teste de reconhecimento de objetos (n = 6/grupo).

**Figura 12.** Efeito do tratamento com AM630 (0,1 e 1 mg/kg) e HU-910 no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (n = 5-7/grupo).

**Figura 13.** Efeitos do tratamento com HU-910 (30 mg/kg) e WIN55,212-2 (5 mg/kg) na tétrade canabinoide (n = 5-6/grupo).

**Figura 14.** Efeito do tratamento repetido com MK-801, HU-910 e clozapina sobre a expressão de proteína FosB/ $\Delta$ FosB no CFPm porções pré-límbica e infra-límbica, e núcleo *accumbens* porção core.

**Figura 15.** Efeito do tratamento repetido com MK-801, HU-910 e clozapina sobre a expressão de proteína FosB/ $\Delta$ FosB no núcleo *accumbens* porção shell e CPu porções medial e lateral.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1 Esquizofrenia .....	11
1.1.1 Aspectos gerais do transtorno .....	11
1.1.2 Neurobiologia da esquizofrenia: a hipótese dopaminérgica e a teoria da hipofunção glutamatérgica .....	13
1.1.3 Modelo animal baseado no antagonismo de receptores NMDA .....	15
1.2 Sistema Endocanabinoide e os receptores CB2 .....	16
1.3 O composto HU-910 .....	19
2. HIPÓTESE .....	19
3. OBJETIVO .....	20
3.1 Objetivos Gerais .....	20
3.2 Objetivos Específicos .....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
4.1 Animais .....	21
4.2 Drogas .....	21
4.3 Procedimentos experimentais comportamentais .....	22
4.3.1 Hiperlocomoção .....	22
4.3.2 Tratamento repetido com HU-910 .....	24
4.3.2.1 Interação Social .....	26
4.3.2.2 Reconhecimento de Objetos .....	26
4.3.2.3 Tétrade Canabinoide .....	27
4.3.2.3.1 Catalepsia .....	28
4.3.2.3.2 Medida da temperatura da causa .....	29
4.3.2.3.3 Atividade locomotora .....	29
4.3.2.3.4 Atividade antinociceptiva .....	29
4.4 Imunohistoquímica para detecção de proteína FosB/ $\Delta$ FosB .....	30
4.5 Avaliação quantitativa de células FosB/ $\Delta$ FosB positivas .....	32
4.6 Análise Estatística .....	32
5. RESULTADOS .....	33
5.1 Experimento 1: Efeito do tratamento com HU-910 no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg) e anfetamina (2,5 mg/kg) .....	33

5.2 Experimento 2: Efeito do tratamento crônico com HU-910 e clozapina sobre os prejuízos nos testes de IS e RO induzidos pelo tratamento crônico com o MK-801 .....	35
5.3 Experimento 3: Efeito do tratamento crônico com AM630 e HU-910 sobre os prejuízos nos testes de IS e RO induzidos pelo tratamento crônico com MK-801 .....	38
5.4 Experimento 4: Efeito do tratamento com AM630 (0,1 e 1 mg/kg) e HU-910 (30 mg/kg) no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg).....	41
5.5 Experimento 5: Efeitos do tratamento com HU-910 (30 mg/kg) e WIN55,212-2 (5 mg/kg) na tétrede canabinoide.....	42
5.6 Avaliação da alteração da expressão de FosB/ $\Delta$ FosB induzidas pelo tratamento crônico com HU-910 e clozapina em estruturas cerebrais específicas .....	43
6. DISCUSSÃO .....	47
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS.....	54

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Esquizofrenia

#### 1.1.1. Aspectos gerais do transtorno

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico complexo e crônico que acomete cerca de 21 milhões de pessoas no mundo todo, se destacando em 2001 como uma das principais causas de incapacidade, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017). O transtorno aumenta de duas a três vezes o risco de mortalidade do indivíduo em comparação à população geral (Mcgrath *et al.*, 2008).

A sintomatologia da esquizofrenia é geralmente organizada em três grupos denominados de sintomas positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas positivos são caracterizados por alucinações, delírios e transtornos de pensamento, eventos mentais ausentes na população geral sadia. Os sintomas negativos são caracterizados pelo embotamento afetivo, perda de motivação, distúrbios de expressão de afeto e interação social (Wong e Van Tol, 2003). Por fim, os sintomas cognitivos estão relacionados a prejuízos na execução de tarefas como memória, atenção e função intelectual do indivíduo acometido (Weickert *et al.*, 2000). Esses sintomas costumam aparecer na adolescência ou início da vida adulta e provocam importantes efeitos sobre a vida do indivíduo e familiares, sobre a sociedade e sobre as relações profissionais, o que culmina em alto custo econômico (Silverstein, *et al.*, 2013).

Até o século XX os pacientes com esquizofrenia eram internados em hospitais para serem retirados do convívio social. Essa prática não amenizava

os sintomas e, além disso, favorecia a evolução crônica do transtorno. Foi então na década de 1950 que os primeiros antipsicóticos começaram a ser desenvolvidos. O principal mecanismo de ação desses fármacos é o bloqueio de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> com alta afinidade. Essa primeira geração de antipsicóticos, também chamados de típicos ou neurolépticos, incluem a clorpromazina, o haloperidol e tioridazina.

Apesar de efetivos contra os sintomas positivos, os antipsicóticos típicos possuem pouca ou nenhuma ação contra os sintomas negativos e cognitivos, além de provocarem os chamados efeitos extrapiramidais (distonias agudas, Parkinsonismo, acatisia e discinesia tardia). Assim, novos antipsicóticos que não causam efeitos extrapiramidais nas doses efetivas como antipsicóticos foram desenvolvidos e classificados como antipsicóticos atípicos. Eles incluem fármacos como a clozapina e risperidona, por exemplo. Os fármacos dessa classe têm ação sobre diversos receptores, como receptores D<sub>4</sub>, D<sub>2</sub> e de serotonina (5-HT). Estes últimos têm sido associados com a ação contra os sintomas cognitivos e negativos que esses fármacos possuem (Graeff e Guimarães, 2012)

Entretanto, os novos fármacos desenvolvidos, com exceção da clozapina (que provoca agranulocitose grave em cerca de 1% dos pacientes, não sendo, por isso, fármaco de primeira escolha para o tratamento), não tem se demonstrado mais eficazes que os fármacos já disponíveis há 20 anos (Lewis e Lieberman, 2008), e apresentam pouco efeito sobre os sintomas negativos e cognitivos (Elvevag e Goldberg, 2000; Hanson *et al.*, 2010). Além disso, o alto índice de efeitos colaterais, somado à baixa eficácia desses fármacos, resultam em alta taxa de abandono do tratamento (Lieberman *et al.*, 2005). Nesse

contexto, existe a necessidade do desenvolvimento de novas drogas que sejam melhor toleradas e mais eficazes em todos os três grupos de sintomas da esquizofrenia.

#### *1.1.2. Neurobiologia da esquizofrenia: a hipótese dopaminérgica e a teoria da hipofunção glutamatérgica*

Como dito anteriormente, a esquizofrenia é um transtorno complexo, cuja etiologia ainda não é completamente entendida. Exemplo desta complexidade é o fato de ainda não haver consenso no campo científico se a esquizofrenia é um conjunto de diversos transtornos que se apresentam concomitantemente ou um transtorno único. Entretanto, a heterogeneidade etiológica é consenso na literatura, envolvendo fatores genéticos, socioambientais e psicológicos (Lewis e Lieberman, 2000).

A primeira hipótese formulada para explicar a neurobiologia deste transtorno foi a hipótese dopaminérgica. A administração de compostos que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica, como a anfetamina, em pessoas saudáveis induz sintomas semelhantes aos experimentados por pacientes com esquizofrenia. Em paciente com esquizofrenia essa administração exacerba os sintomas do transtorno. Além disso, drogas que depletam a dopamina extracelular, como a reserpina, mostraram-se capazes de atenuar sintomas psicóticos (Seeman e Kapur, 2000). Essas evidências suportam o papel essencial da neurotransmissão dopaminérgica na gênese do transtorno. A teoria dopaminérgica sugere que há uma redução na atividade da dopamina na via mesocortical (o que estaria relacionado aos sintomas negativos) e uma atividade excessiva deste mesmo neurotransmissor na via mesolímbica (o que estaria

relacionada aos sintomas positivos) (Davis *et al.*, 1991). As vias nigroestriatais e tuberoinfundibular não parecem possuir relevância para o transtorno, porém possuem papel importante no que diz respeito aos efeitos colaterais dos antipsicóticos, principalmente os de primeira geração (típicos) (Graeff e Guimarães, 2012)

Embora o papel central da dopamina na neurobiologia do transtorno seja bem aceito, essa teoria não é suficiente para explicar, sozinha, a complexidade do transtorno. Nesse sentido, a hipótese da hipofunção glutamatérgica foi formulada. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e na via mesocortical sua liberação, fisiologicamente, promove aumento da estimulação de neurônios dopaminérgicos, resultando na liberação de dopamina; na via mesolímbica o glutamato estimula interneurônios inibitórios (gabaérgicos) dos neurônios dopaminérgicos, resultando em redução da liberação de dopamina (Stephen, 2007). Nesse sentido, a hipótese glutamatérgica sugere que, em paciente com esquizofrenia, há hipofunção deste neurotransmissor nas vias descritas e, assim, na via mesocortical esta hipofunção promoveria a diminuição do tônus dopaminérgico, descrita pela primeira hipótese, e na via mesolímbica resultaria na diminuição da inibição da liberação de dopamina, o que culminaria no aumento do tônus dopaminérgico nesta via (Jentsch e Roth, 1999; Gonzalez-Burgos e Lewis, 2012).

O glutamato atua através de receptores metabotrópicos (mGLU) e ionotrópicos. Os primeiros possuem sete domínios transmembrana e são divididos em três grupos, de acordo com sua homologia, farmacologia e segundos mensageiros, em: tipo I (mGLU 1 e 5), tipo II (mGLU 2 e 3) e tipo III (mGLU 4, 6, 7 e 8). Os receptores ionotrópicos possuem três subtipos: cainato,

AMPA e NMDA (Dingledine et al., 1999; Kew e Kemp, 2005). Desses receptores, os do tipo NMDA possuem papel mais relevante para o estudo da esquizofrenia. Mohn e colaboradores (1999) mostraram que o *knockdown* da subunidade GluN1 desses receptores provocaram alterações comportamentais do tipo-esquizofrenia em animais, as quais foram atenuadas por antipsicóticos. Além disso, drogas que antagonizam os receptores NMDA, como a ketamina, fenciclidina e o MK-801, são capazes de induzir alterações comportamentais que se assemelham aos sintomas da esquizofrenia em humanos sadios e em animais (Tsai e Coyle, 2002). Esses dados sugerem o envolvimento do glutamato na neurobiologia da esquizofrenia, e de certa forma complementam a hipótese dopaminérgica descrita primeiramente para explicar os sintomas do transtorno.

#### 1.1.3. *Modelo animal baseado no antagonismo de receptores NMDA*

Conforme apresentado anteriormente, drogas que antagonizam receptores NMDA provocam alterações comportamentais que mimetizam os sintomas presentes nos indivíduos com esquizofrenia. Animais tratados com essas drogas apresentam prejuízos no filtro sensorio motor e em funções cognitivas, evidenciadas por testes como reconhecimento de objeto (RO) e inibição do pré-pulso (PPI) (Stefani e Moghaddam, 2005; Feggin *et al.*, 2007), além de prejuízos no teste de interação social (IS), que poderia refletir os sintomas negativos em humanos (Rung *et al.*, 2005).

Apesar dessas alterações serem observadas com o tratamento agudo, tem sido proposto que o tratamento crônico com antagonistas NMDA representa melhor as alterações neuroquímicas, comportamentais e neuroanatômicas



observadas em pacientes (Gomes *et al.*, 2015). Além disso, essas alterações parecem ser duradouras, uma vez que alguns estudos observaram sua persistência até seis semanas após o fim do tratamento (Jentsch e Roth, 1999, Hashimoto *et al.*, 2005, Nagai *et al.*, 2009). Essas alterações foram revertidas pelo tratamento com antipsicóticos atípicos, como a clozapina, mas não com o antipsicótico típico haloperidol.

Adicionalmente, o tratamento com antagonistas de receptores NMDA parece mimetizar os sintomas negativos e cognitivos da doença ao contrário da administração de drogas que atuam diretamente no sistema dopaminérgico, que parece estar mais relacionada a sintomas positivos (Krystal *et al.*, 2005). Sendo assim, o antagonismo de receptores NMDA tem sido amplamente empregado no estudo de substâncias com possível efeito antipsicótico.

## **1.2. Sistema Endocanabinoide e os receptores CB2**

O sistema endocanabinoide é um importante sistema de sinalização lipídica que atua na modulação fisiológica de respostas dos sistemas nervoso central, imune, endócrino, reprodutivo e cardiovascular (Roche e Finn, 2010). É constituído pelos receptores endocanabinoides do tipo I e II (CB1 e CB2, respectivamente), seus agonistas endógenos, denominados endocanabinoides, anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e pelas enzimas responsáveis pela síntese e degradação desses endocanabinoides (Campos *et al.*, 2016). O receptor CB1 está localizado em áreas cerebrais envolvidas com o controle das funções motoras e cognitivas e áreas relacionadas à motivação (Giuffrida *et al.*, 2004). Os efeitos de preparações psicoativas como a maconha e haxixe são usualmente atribuídos ao agonismo CB1 pelo principal

fitocanabinoide, o delta-9-tetra-hidro-cannabinol (THC). Em roedores a administração do THC ou de agonistas CB1 seletivos causa um conjunto de alterações comportamentais denominado de “tétrade canabinoide” (hipolocomoção, catalepsia, diminuição da temperatura corporal e analgesia) (Silva, et al., 2017)

Receptores CB2 são expressos majoritariamente em células dos sistemas hematopoiético e imune e em células da glia, mas também estão presentes em neurônios (Luongo et al., 2014).

Diversos estudos investigaram o papel do sistema endocanabinoide em transtornos psiquiátricos, dentre eles a esquizofrenia. Um estudo clínico mostrou que os níveis de anandamida no líquido cerebrospinal são oito vezes mais elevados em pacientes com esquizofrenia em comparação a indivíduos saudáveis (Giuffrida *et al.*, 2004). Além disso, há uma menor expressão do receptor CB2 em pacientes com esquizofrenia (Roche e Finn, 2010) e, em modelos pré-clínicos utilizando animais *knockout* para o receptor CB2, estes apresentam comportamentos semelhantes a um modelo de esquizofrenia baseado no tratamento com cocaína nos testes de inibição pelo pré-pulso (PPI) e esquiva inibitória, indicando um possível envolvimento do receptor CB2 na neurobiologia da esquizofrenia (Ortega-Alvaro *et al.*, 2011).

Evidências recentes sugerem um envolvimento do receptor CB2 em transtornos psiquiátricos que envolvem o sistema dopaminérgico na sua neurobiologia. Zhang e colaboradores observaram que há expressão de receptores CB2 em neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral, local aonde se iniciam as vias dopaminérgicas associadas à esquizofrenia, e que esses receptores modulam a excitabilidade neuronal e o comportamento

relacionado com a neurotransmissão dopaminérgica (Zhang *et al.*, 2014). Além disso, a ativação de receptores canabinoides pode ter ação inibitória sobre a atividade motora induzida pela dopamina e ligantes do receptor CB2 foram capazes de reverter a hiperlocomoção induzida por MK-801 (Giuffrida *et al.* 2004; Kruk-Slomka *et al.*, 2017). Essa provável modulação da neurotransmissão dopaminérgica pelo receptor CB2 sugere que este poderia ser um possível alvo para o tratamento farmacológico da esquizofrenia.

O receptor CB2 tem chamado a atenção como um importante alvo terapêutico para a modulação de neuroinflamação e atenuação da ativação de microglia e astrócitos na substância nigra e no estriado (Bento *et al.*, 2008; Concannon *et al.*, 2015). A ativação farmacológica deste receptor parece reduzir a ativação de microglia e melhorar prejuízos funcionais em transtornos neurodegenerativos como Alzheimer (Ramírez *et al.*, 2005), Huntington (Palazuelos *et al.*, 2009; Sagredo *et al.*, 2009), esclerose múltipla (Palazuelos *et al.*, 2008), e Parkinson (Price *et al.*, 2009). Além disso, animais *knockout* para o receptor CB2 apresentaram aumento da ativação de microglia e inflamação (Palazuelos *et al.*, 2008; Price *et al.*, 2009). Estas alterações neuroinflamatórias foram associadas a diversos transtornos neuropsiquiátricos. Polimorfismos no gene que codifica o receptor CB2 têm sido descritos em depressão, transtornos alimentares e esquizofrenia (Roche e Finn, 2010). Estes estudos sugerem que compostos que ativam o receptor CB2 poderiam preservar a homeostase neuronal e sobrevivência em doenças com um componente neurodegenerativo e inflamatório, como a esquizofrenia (Fernandez-Ruiz *et al.*, 2007).

### **1.3. O composto HU-910**

O composto HU-910 é um agonista dos receptores CB2 sintetizado pelo grupo do Prof. Raphael Mechoulam, da Hebrew University, Israel. Estudo recente sugere que, entre os agonistas CB2 disponíveis no mercado, ele seja um dos mais seletivos no sentido de ativar a via canônica do receptor CB2, tendo pouco efeito como agonista tendencioso (“bias agonist”) quando comparado, por exemplo, com o HU-308 e JWH-133. Assim como estes compostos, no entanto, ele foi capaz de atenuar a injúria no tecido hepático induzida por isquemia. Este trabalho verificou também que o tratamento com o HU-910 atenua a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas hepáticas induzida por isquemia/reperfusão (Horváth *et al.*, 2012; Soethoudt *et al.*, 2017).

## **2. HIPÓTESE**

Considerando que o receptor CB2 parece ter um importante papel na modulação da liberação de dopamina na área tegmental ventral e pode inibir a ativação de microglia, dois fenômenos associados às manifestações clínicas observadas na esquizofrenia, a hipótese do presente trabalho é a de que o HU-910 teria efeito tipo-antipsicótico em um modelo animal baseado no antagonismo dos receptores NMDA nos testes de hiperlocomção induzida por MK-801, interação social (IS) e reconhecimento de objetos (RO) e este efeito seria dependente da ativação dos receptores CB2. Além disso, o HU-910 não seria capaz de causar a tétrede canabinoide em doses que produziram efeito antipsicótico. Por fim, o HU-910 atenuaria o aumento na expressão neuronal da proteína delta-FosB induzida pelo MK-801.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o tratamento agudo e repetido com HU-910 seria capaz de reverter as alterações comportamentais induzidas pelo MK-801, um antagonista dos receptores NMDA, sem produzir a tétrede canabinoide e se este efeito é dependente da ativação dos receptores CB2.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar se, a semelhança do que acontece com outras drogas ligantes de CB2, o tratamento com o HU-910 é capaz de inibir a hiperlocomoção induzida pelo tratamento com MK-801 ou anfetamina.
- Avaliar se o tratamento repetido com HU-910 é capaz de reverter prejuízos induzidos por MK-801 nos testes de interação social (IS) e reconhecimento de objetos (RO).
- Avaliar se os efeitos do HU-910 sobre os prejuízos induzidos por MK-801 nos testes de IS, RO e hiperlocomoção são dependentes da ativação do receptor CB2.
- Avaliar se o HU-910 é capaz de produzir os efeitos característicos da tétrede canabinoide.
- Avaliar a expressão da proteína FosB em áreas cerebrais específicas associadas à fisiopatologia da esquizofrenia.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com 6 semanas de idade no início do tratamento, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os animais foram alojados no biotério do departamento, em grupos de até 5 animais por caixa (41 x 33 x 17cm), sob ciclo de luz (12 hrs claro/12 hrs escuro, sendo o período claro iniciado as 6:00 h), temperatura de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade controlada, além de livre acesso à água e à comida, excetuando-se o período da realização dos testes comportamentais. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, registrado com o número 127/2017.

### **4.2. Drogas**

- AM630 (Tocris, USA); Veículo: 1% DMSO e salina. Dose de 0,1 e 1 mg/kg (baseadas em Rodrigues, N.S. et al., dados não publicados e Silva et al., 2017).
- Anfetamina (Pervitin®, Brasil) Veículo: salina. Dose 2,5 mg/kg (baseado em Rodrigues, N.S. et al., dados não publicados).
- Clozapina (Sigma, EUA); Veículo: salina. Dose de 1 mg/kg (baseada em Gomes et al., 2015).
- HU-910 (Doador pelo Professor Raphael Mechoulam, Universidade Hebraica, Israel); Veículo: 3% DMSO, 2% Tween 80 e salina. Doses de 0,3 a 30 mg/kg (baseada em Horváth et al., 2012).

- MK-801 (Sigma, EUA); Veículo: salina. Doses de 0,25 mg/kg e 0,5mg/kg para os testes de hiperlocomoção e tratamento crônico, respectivamente (baseadas em Rodrigues, N.S. et al., dados não publicados).
- WIN55,212-2 (Tocris, USA); Veículo: 2% Tween 80 e salina. Dose de 5 mg/kg (baseada em Silva et al., 2017).

### **4.3. Procedimentos experimentais comportamentais**

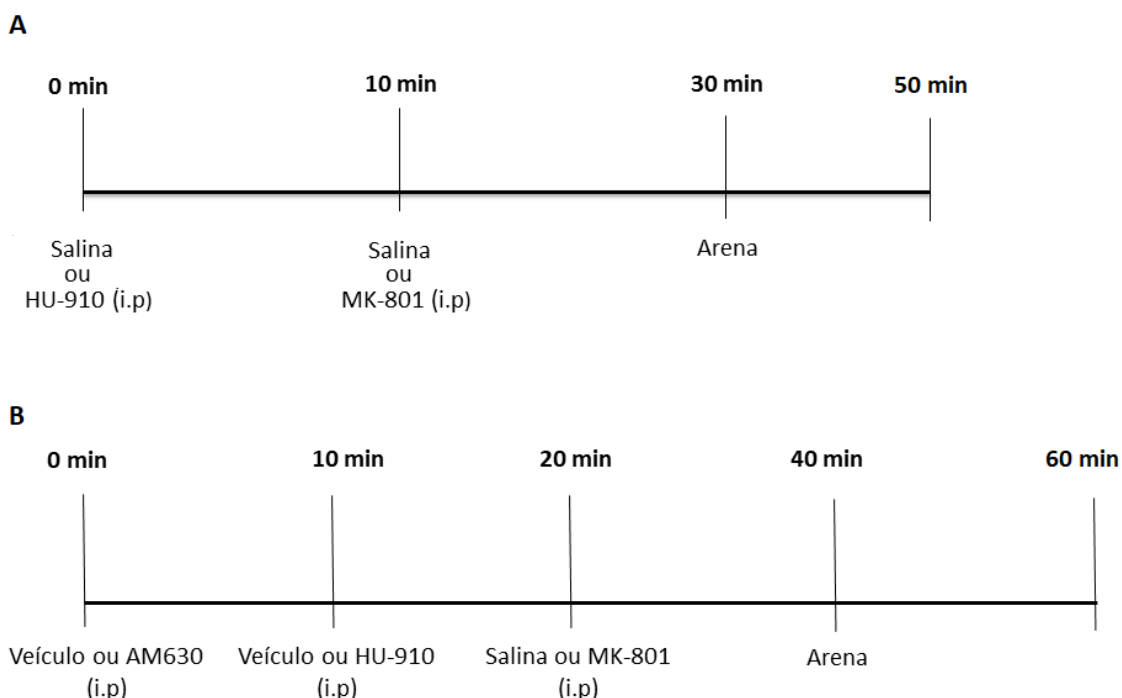
#### *4.3.1. Hiperlocomoção*

A administração aguda de drogas que antagonizam receptores NMDA, como o MK-801, promove o aumento da atividade locomotora de animais devido a alterações na neurotransmissão dopaminérgica, e a reversão desta hiperlocomoção tem sido utilizada como teste preditivo da atividade antipsicótica de drogas testadas (Diana e Sagratella, 1994).

Para verificar o possível efeito dos tratamentos sobre a atividade locomotora os animais receberam uma injeção via intraperitoneal (i.p) de HU-910 (0,3; 1; 3; 10 ou 30 mg/kg; i.p) ou salina. Após 10 minutos da primeira injeção, os animais receberam uma injeção de MK-801 (0,25 mg/kg) ou salina. Decorridos 20 minutos da segunda injeção, os animais foram posicionados no centro de uma arena circular de acrílico (40 cm de diâmetro x 40 cm de altura) onde puderam percorrer livremente toda a arena por um período de 20 minutos. A distância total percorrida pelos animais foi registrada com o auxílio do software Any-Maze (Stoelting, Irlanda).

Para avaliar o envolvimento dos receptores CB2 no efeito do HU-910 sobre a hiperlocomoção induzida por MK-801, os animais receberam injeção

aguda de AM630 (0,1 e 1 mg/kg; i.p), um antagonista de receptores CB2, ou veículo. Após 10 minutos da primeira injeção, os animais receberam uma injeção de HU-910 (30 mg/kg; i.p) ou veículo. Em seguida, 10 minutos após, os animais receberam a terceira injeção, MK-801 (0,25 mg/kg; i.p) ou salina e, após 20 minutos da última injeção, foram posicionados na arena e a atividade locomotora foi avaliada por 20 minutos.

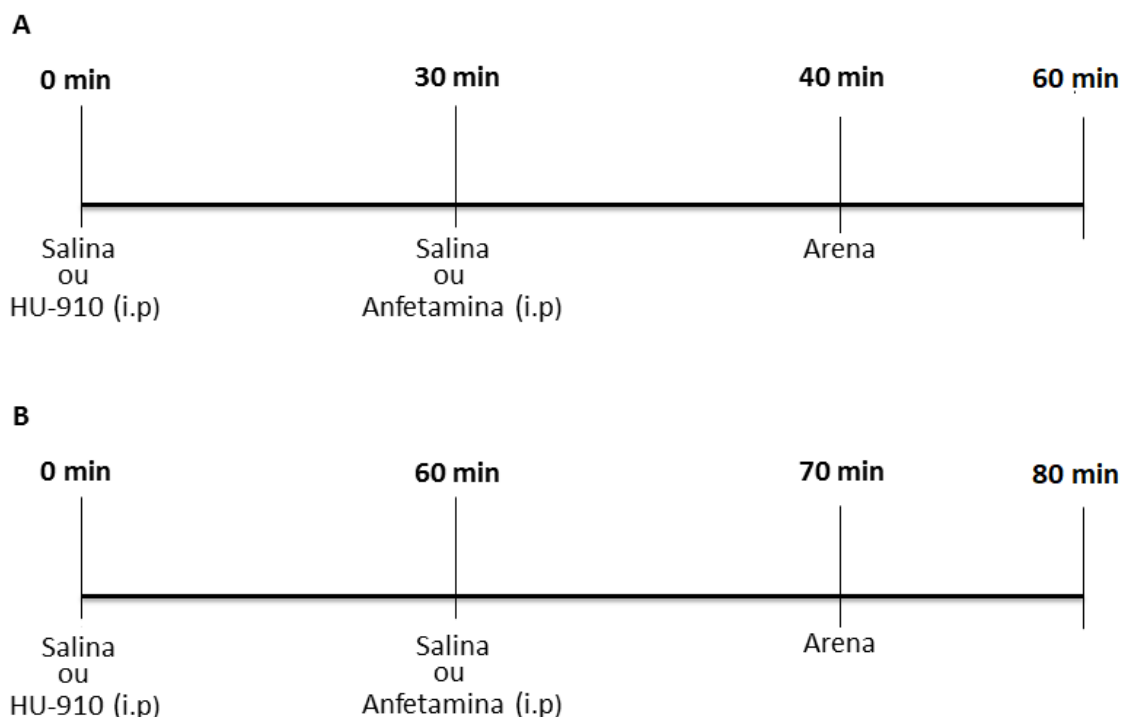


**Figura 1. Representação esquemática do procedimento experimental do teste de hiperlocomoção induzida por MK-801.** Em A, representação esquemática do teste de hiperlocomoção com HU-910 (0,3; 1; 3, 10 e 30 mg/kg). Em B, representação esquemática do teste de hiperlocomoção com HU-910 (30 mg/kg) com o pré-tratamento com AM630 (0,1 e 1 mg/kg).

Para avaliar o efeito do HU-910 sobre a atividade locomotora induzida por anfetamina, os animais receberam injeção aguda de HU-910 (1; 3; 10 e 30 mg/kg; i.p) ou salina e, após 30 ou 60 minutos, uma injeção de anfetamina (2,5



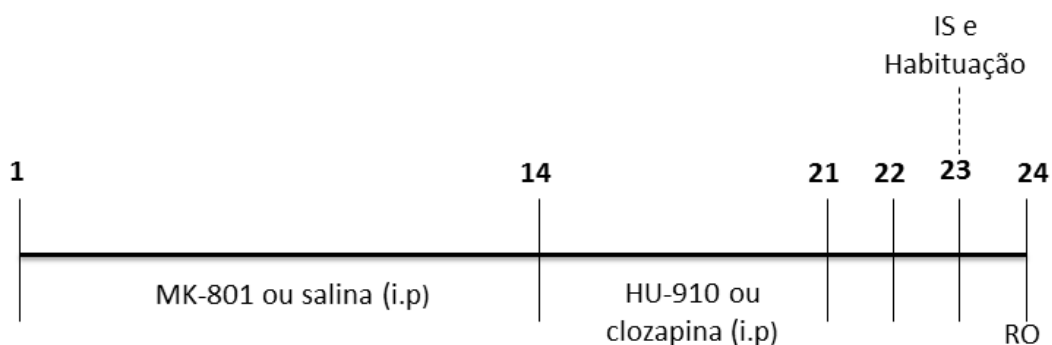
mg/kg; i.p) ou salina. Decorridos 10 minutos da segunda injeção, os animais foram posicionados no centro da arena já descrita. A distância total percorrida foi registrada durante o período de 20 minutos.



**Figura 2. Representação esquemática do procedimento experimental do teste de hiperlocomoção induzida por anfetamina.** A anfetamina foi administrada na dose de 2,5 mg/kg e o HU-910 nas doses de 1; 3, 10 e 30 mg/kg.

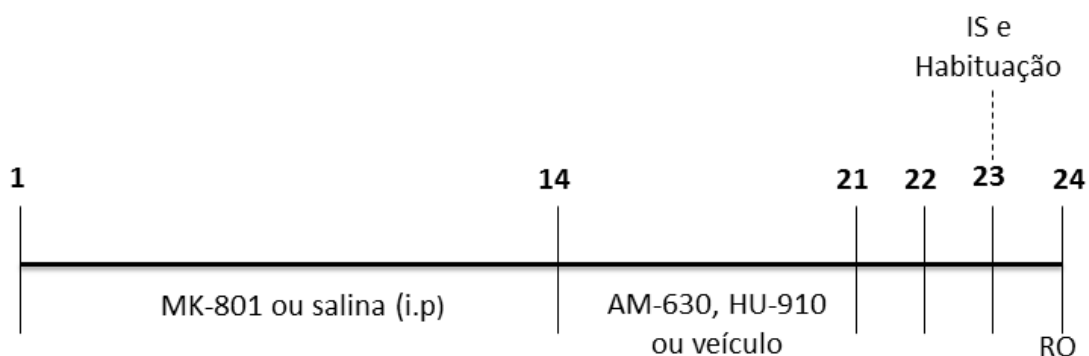
#### *4.3.2. Tratamento repetido com HU-910*

Para avaliar o efeito do tratamento repetido com HU-910, o MK-801 (0,5 mg/kg) foi administrado por 14 dias consecutivos (2 vezes ao dia/ i.p.) e um dia após o fim do tratamento, ou seja, no 15º dia de tratamento, as injeções de HU-910 (3, 10 e 30 mg/kg) ou clozapina (1mg/kg) foram administradas por 7 dias consecutivos (1 vez ao dia/ i.p.). Após 48 horas da última injeção de HU-910, os animais foram submetidos aos testes de IS e habituação a arena e 24 horas depois, ao teste de RO.



**Figura 3. Representação esquemática do procedimento experimental dos tratamentos repetidos com MK-801 e HU-910 mostrando os dias de tratamento e dos testes a serem realizados.** O MK-801 foi administrado na dose de 0,5 mg/kg, o HU-910 nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg e a clozapina na dose de 1mg/kg.

Para avaliar o envolvimento dos receptores CB2 no efeito do HU-910 sobre o prejuízo causado pelo MK-801 nos testes de IS e RO, os animais foram tratados por 14 dias com MK-801 (0,5 mg/kg) ou salina. Nos 7 dias subsequentes, os animais foram tratados com AM-630 (0,1 mg/kg). Após 10 minutos da injeção do antagonista, os animais receberam uma injeção de HU-910 (30 mg/kg). Quarenta e oito horas após os animais foram submetidos à habituação e teste de IS e, no dia seguinte, ao teste de RO.



**Figura 4. Representação esquemática do procedimento experimental do tratamento com MK-801, AM630 e HU-910.** A figura mostra o pré-tratamento com MK-801, seguido pelo tratamento repetido com AM-630 (0,1 mg/kg) e HU-910 (30 mg/kg), apresentando os dias de tratamento e dos testes a serem realizados.

#### 4.3.2.1. *Interação Social*

O teste de IS é um modelo utilizado para o estudo dos sintomas negativos da esquizofrenia (Ellenbroek e Cools, 2000). O teste foi realizado em uma caixa retangular de acrílico (28 x 17 x 13 cm), onde os animais (testado e não familiar) foram colocados em lados opostos para explorar a caixa livremente durante 10 minutos. O tempo total de comportamentos sociais ativos executados pelo camundongo "teste" como cheirar, seguir, fazer *grooming* e subir sobre o camundongo não familiar foi registrado. Os animais não foram previamente expostos uns aos outros e a caixa onde o teste foi realizado.

#### 4.3.2.2. *Reconhecimento de Objetos*

O teste de reconhecimento de objetos é baseado no comportamento natural dos camundongos em aproximarem-se e explorarem por mais tempo um objeto novo em comparação a um objeto familiar, quando expostos a ambos os objetos ao mesmo tempo (Ennaceur, 2010). Sendo assim, este teste é utilizado como modelo para estudo de funções cognitivas, como memória e aprendizagem, as quais são diminuídas em modelos animais de esquizofrenia (Wong *et al.*, 1997; Hashimoto *et al.*, 2005).

No dia anterior ao teste, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação a arena, com duração de 15 minutos. No dia do teste, os animais foram posicionados na mesma arena contendo dois objetos idênticos, por um período de 10 min (sessão de aquisição) com liberdade para explorá-los. Após um intervalo de 60 minutos, um dos objetos presentes na sessão de aquisição foi substituído por um objeto novo com tamanho, textura e cor diferentes dos objetos anteriores. Os animais foram, então, novamente colocados na arena

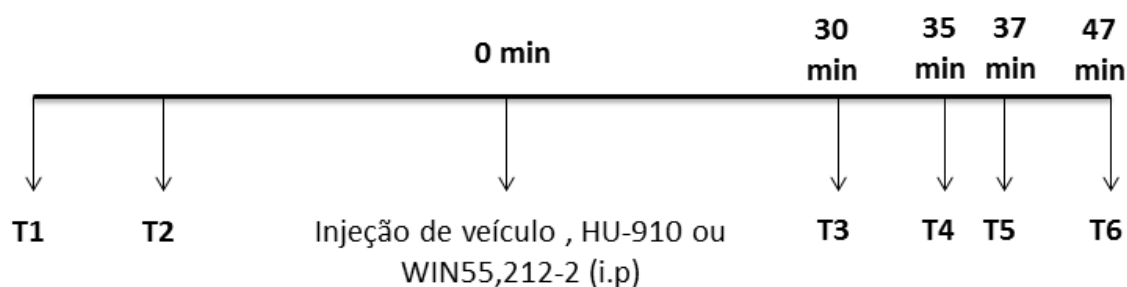
contendo este objeto novo e o objeto familiar por um período de 5 minutos, registrando-se o tempo de interação com cada objeto (sessão de retenção). Todos os objetos possuíam, aproximadamente, 16 cm de altura e peso suficiente para que não fossem deslocados pelos animais durante o experimento. Definiu-se exploração dos objetos como o direcionamento de sua face ao objeto até uma distância de 2 cm enquanto o observa, cheira ou toca.

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

#### 4.3.3. *Tétrade Canabinoide*

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

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



**Figura 5. Representação esquemática do procedimento experimental da tétrede canabinoide, indicando os testes realizados, o tempo da injeção e o tempo dos testes.** T1: Temperatura basal da cauda. T2: medida basal da placa quente. T3: teste da catalepsia. T4: medida da temperatura da cauda. T5: teste da atividade locomotora. T6: teste da placa quente.

#### 4.3.3.1. Catalepsia

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

#### *4.3.3.2. Medida da temperatura da cauda*

Com uma câmera térmica, Termovisor Modelo NV 384 (THERMOCOM®, Nashua, NH 03062, EUA), a temperatura da cauda dos animais foi registrada antes (basal) e 35 minutos após a injeção das drogas ou veículo, posicionando a câmera a uma distância de 50 cm do animal. Foram registradas cinco fotos de cada animal, sendo coletadas as medidas de 5 pontos distintos da cauda de cada imagem. Uma média destes pontos foi calculada e, para o resultado final, foi feita a média de cada imagem após o tratamento menos a basal.

#### *4.3.3.3. Atividade locomotora*

Este teste avalia possíveis efeitos motores das drogas administradas. Após 37 minutos das injeções, os animais foram colocados, individualmente, em uma arena circular (campo aberto; 40 cm de diâmetro; paredes de 40 cm de altura) e a distância total percorrida durante 10 minutos foi registrada e determinada pelo software Any-maze®.

#### *4.3.3.4. Atividade antinociceptiva*

Para analisar a atividade antinociceptiva utilizou-se o teste da placa quente, que consiste em avaliar a nocicepção térmica manifestada pelo reflexo de lambe ou de retirada da pata. Os animais foram posicionados em um cilindro de plexiglas de 10 cm de diâmetro sobre uma placa quente, mantida a aproximadamente 56°C. Foi registrada uma medida basal para os comportamentos de lambe as patas, “sapatear” ou pular, após o que os animais foram imediatamente retirados da placa. Quarenta e cinco minutos após

receberem injeção (i.p) de drogas (HU-910, WIN55,212-2 ou veículo) novas medidas de latência para os mesmos comportamentos foram feitas.

A fim de evitar danos teciduais aos animais, o tempo máximo de permanência sobre a placa quente em cada medida foi de 30 segundos (Kisney *et al.*, 2011). Os resultados são expressos em delta do tempo em segundos, calculado subtraindo o valor após tratamento do valor basal.

#### **4.4. Imunohistoquímica para detecção de proteína FosB/ $\Delta$ FosB**

A proteína  $\Delta$ FosB, um fator de transcrição da família Fos, é produto do gene *fosB* e é rapidamente induzida em regiões específicas no cérebro após estímulos agudos ou crônicos, como a administração repetida de drogas de abusos e tratamento com antidepressivos e antipsicóticos. Animais que não possuem o gene *fosB* apresentam respostas comportamentais e bioquímicas deturpadas ao tratamento com antidepressivos e à administração de drogas de abuso, o que demonstra a relevância desta proteína para a adaptação plástica do cérebro. Por isso, esta proteína é considerada como um marcador de ativação neuronal que reflete alterações moleculares de longo prazo (Nestler, *et al.*, 1999).

Imediatamente após o fim do teste de RO, os animais foram anestesiados com uretana (25%, 40 $\mu$ L por animal, i.p) e perfundidos transcardiacamente com solução fosfato-salina (PBS) 0,01M e paraformaldeído (PFA) 4%. Após a perfusão os cérebros foram removidos e permaneceram em PFA 4% por 24 h, sendo posteriormente crioprotetidos em solução de sacarose 30% tamponada com PBS 0,01M, à 4°C, por 48 h ou até apresentarem saturação. Em seguida, os encéfalos foram congelados com isopentana a -30°C

e armazenados em *freezer* (-80°C) até o processamento. Foram obtidos cortes frontais das regiões de interesse com 30µm de espessura em criostato (Leica, Alemanha) à -20°C e armazenados em solução anticongelamento contendo etilenoglicol, glicerol e PBS 1x, à 20°C. Os cortes de interesse foram aqueles que continham o córtex pré-frontal (CPF), o núcleo *accumbens* (NAc) e estriado.

Para a técnica de marcação por imunohistoquímica os cortes foram inicialmente lavados (3 x 5 min) com PBS 0,1 M + Triton-X 0,15% (pH 7,4; tampão A), seguindo a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6). Após, os cortes foram incubados (30 min) com solução H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5% em tampão A para bloqueio da peroxidase endógena e então lavados novamente com tampão A (3 x 5 min) para serem incubados com soro albumina bovina (BSA) 2%, em tampão A e soro 5% por 60 min, para o bloqueio de sítios de ligação inespecífica. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos, os cortes foram incubados com o anticorpo primário *mouse* (1:2000; Abcam, EUA) *overnight*. Ao período de incubação com o anticorpo primário, seguiu-se lavagem (3 x 5 min, com tampão A) e as secções foram, então, incubadas com anticorpo biotilado anti-*mouse* (1:400; Abcam, EUA), por 90 min. Todos os anticorpos foram diluídos em tampão A e as incubações ocorreram a 21°C com agitação branda e constante. Em seguida, o anticorpo secundário foi recuperado e as secções foram novamente lavadas (3 x 5 min) com tampão A e então incubadas com o complexo AB avidina-biotina-peroxidase. (1:300, diluído em tampão A, Vectastain® ABC System) por 2 hrs. A atividade da peroxidase foi revelada com tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, EUA) diluída em TBS 0,1M com 0,15% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Após as devidas lavagens, as secções foram organizadas em lâminas gelatinizadas, as quais foram diafanizadas em uma série de álcoois e cobertas com lamínula.



As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Olympus BX50 (Olympus, Japão) com câmera acoplada Olympus DP72 (Olympus, Japão), pela qual as imagens foram capturadas e processadas através do software Image Pro-Plus 6.0 (Mediacybernetics, EUA).

#### **4.5. Avaliação quantitativa de células FosB/ $\Delta$ FosB positivas**

A captura das imagens para quantificação das células FosB/ $\Delta$ FosB foi realizada com objetiva de 10x1 e foram analisadas de 3 à 6 secções de tecido por área e animal, utilizada para o cálculo da média final por área e animal. As áreas de interesse foram identificadas com o auxílio do Atlas *The Mouse Brain* (Paxinos e Franklin, 2008). As áreas avaliadas foram: porções pré-límbica (PrL) e infra-límbica (IL) do CPFm, estriado lateral e medial e NAc core e shell.

Foram consideradas células positivas aquelas que apresentavam coloração marrom em tom escuro e as células foram contadas usando o software Image Pro-Plus 6.0 (Mediacybernetics, EUA), o qual considerou apenas os objetos no tom pré-determinado com uma área entre 10 e 80  $\mu\text{m}^2$ . O tamanho das áreas analisadas foram de 0,43  $\text{mm}^2$  para o CPFm (0,21  $\text{mm}^2$  para a porção PrL e 0,22  $\text{mm}^2$  para a porção IL), 0,24  $\text{mm}^2$  para o NAc (0,12  $\text{mm}^2$  para a porção core e 0,12  $\text{mm}^2$  para a porção shell) e 0,32  $\text{mm}^2$  para o estriado (0,16  $\text{mm}^2$  para a porção medial e 0,16  $\text{mm}^2$  para a porção lateral).

#### **4.6. Análise Estatística**

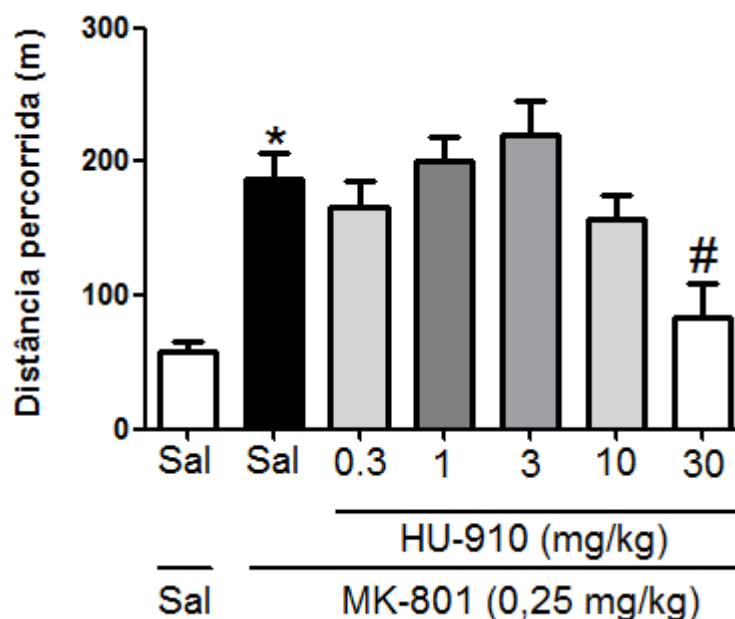
Para os testes realizados, utilizamos ANOVA de uma via, seguido pelos testes de Student-Newman-Keuls (S-N-K) ou Dunnett para análise da hiperlocomção e para a análise do teste de interação social e índice de

discriminação do teste de reconhecimento de objetos. Para avaliar o tempo de exploração nas sessões de aquisição e retenção do teste de reconhecimento de objetos foi utilizado teste *t* de Student. Os grupos experimentais foram de 6-12 animais para todos os testes, em acordo com estudos prévios utilizando os mesmos métodos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

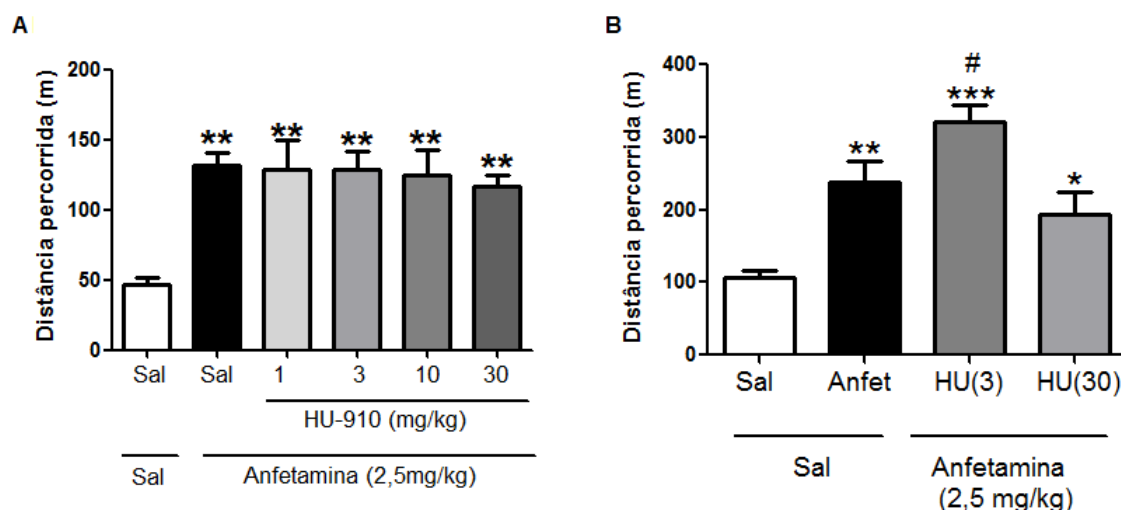
### **5.1. Experimento 1: Efeito do tratamento com HU-910 no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg) e anfetamina (2,5 mg/kg).**

No teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg) houve aumento pronunciado da locomoção nos animais tratados agudamente com MK-801 em relação ao grupo tratado com salina. O pré-tratamento com o HU-910 (30 mg/kg) foi capaz de prevenir a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 ( $F_{(6,31)}=8,897$ ;  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de S-N-K) (Figura 6).



**Figura 6. Efeito do tratamento agudo com HU-910 no teste de hiperlocomção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg) (n = 5-6/grupo).** Os dados estão apresentados como a média e o EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo salina+salina # $p < 0,05$  em relação ao grupo salina+MK-801; ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* S-N-K.

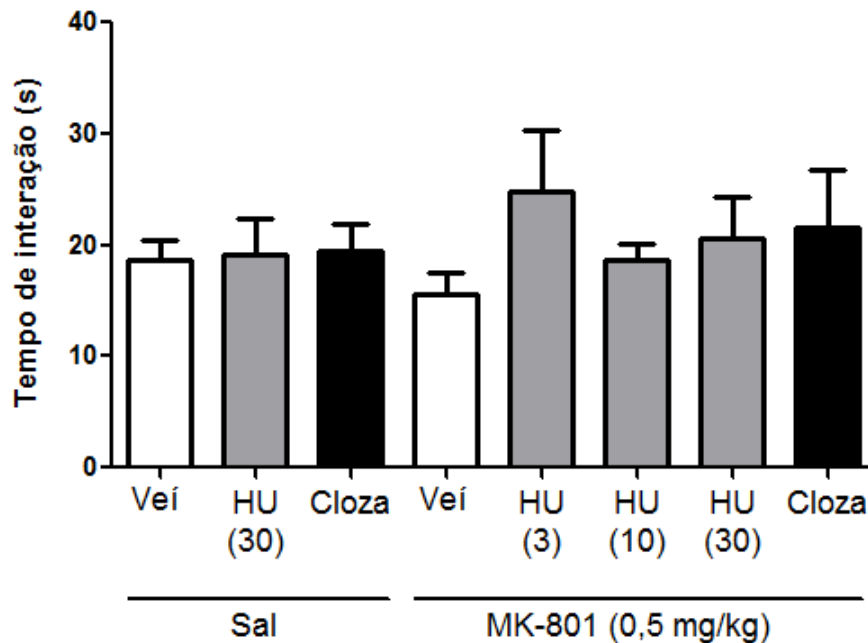
No teste de hiperlocomção induzida por anfetamina (2,5 mg/kg) houve aumento pronunciado da locomoção nos animais tratados agudamente com anfetamina em relação ao grupo tratado com salina. O pré-tratamento com o HU-910 não foi capaz de prevenir a hiperlocomção induzida pela anfetamina em nenhuma das doses testadas 30 minutos ( $F_{(5,51)} = 4,103$ ;  $p = 0,003$ , ANOVA de uma via seguido pelo *post-hoc* de S-N-K) e também 60 minutos antes da injeção de anfetamina ( $F_{(3,19)} = 12,82$ ;  $p < 0,0001$ , ANOVA de uma via seguido pelo *post-hoc* de S-N-K) (Figura 7).



**Figura 7. Efeito do tratamento agudo com HU-910 na hiperlocomoção induzida com anfetamina (2,5 mg/kg) (n = 10-12/grupo).** Injeção de HU-910 30 (A) e 60 (B) minutos antes da administração de anfetamina. Os dados estão apresentados como média e EPM. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  em relação ao grupo salina+salina; # $p < 0.05$  em relação ao grupo HU-910+anfetamina; ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de S-N-K.

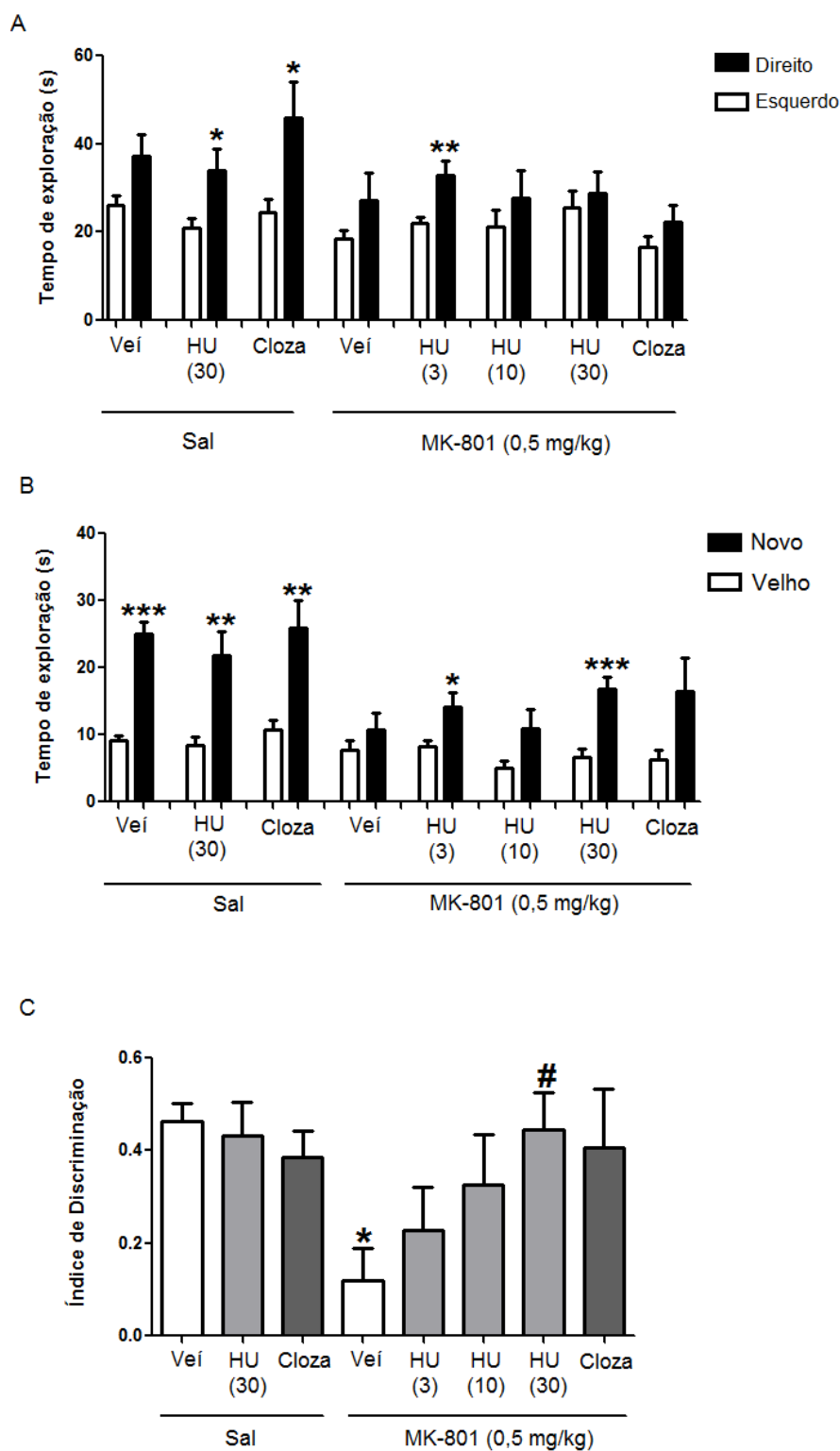
## 5.2. Experimento 2: Efeito do tratamento crônico com HU-910 e clozapina sobre os prejuízos nos testes de IS e RO induzidos pelo tratamento crônico com o MK-801.

*Interação Social:* o tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) não induziu prejuízo no teste de IS ( $F_{(7,50)} = 0,6421$ ,  $p > 0,05$ ; ANOVA de uma via; Figura 8). Rodrigues e colaboradores (dados não publicados, 2017) mostraram que o tratamento repetido com MK-801 por 14 dias diminui o tempo de interação social em até uma semana após o fim do tratamento. Entretanto, neste experimento, não ocorreu redução no tempo de interação entre os grupos salina+veículo e MK-801+veículo, o que inviabiliza que quaisquer conclusões sobre o tratamento com HU-910 após o tratamento com o MK-801 sejam formuladas.



**Figura 8. Efeito do tratamento repetido com HU-910 e clozapina sobre o prejuízo no teste de interação social pelo pré-tratamento com MK-801 (n = 8-10/grupo).** Os dados estão apresentados como a média e o EPM.  $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de S-N-K.

*Reconhecimento de Objetos:* na sessão de aquisição, houve preferência para a exploração do objeto à direita em relação ao objeto à esquerda nos grupos salina+HU-910 (30 mg/kg), salina+clozapina e MK-801+HU-910 (30 mg/kg) ( $p < 0,05$ , teste t de *Student*) (Figura 9A). Na sessão de retenção, o tempo de exploração do objeto novo foi significativamente maior nos grupos salina+veículo, salina+HU-910 (30 mg/kg), salina+clozapina, MK-801+HU-910 (3 mg/kg) e MK-801+HU-910 (30 mg/kg) ( $p < 0,05$ , teste t de *Student*) (Figura 9B). Em relação ao índice de discriminação, os animais que receberam MK-801+veículo tiveram uma preferência menor pelo objeto novo em relação ao familiar, comparado aos animais salina+veículo, alteração não observada nos animais tratados com MK-801+HU-910 (30 mg/kg) ( $F_{(6,43)} = 2,732$ ;  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via, *post hoc* S-N-K) (Figura 9C).

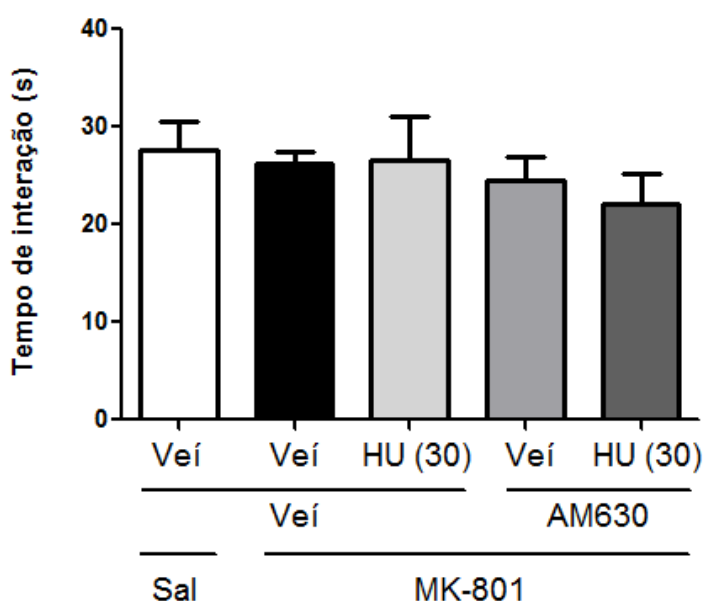


**Figura 9. Efeito do tratamento repetido com HU-910 e clozapina sobre o prejuízo no teste de reconhecimento de objetos pelo pré-tratamento com MK-801 (n = 8-10/grupo). Sessão de aquisição (A) e retenção (B). Dados representados como índice de discriminação (C). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. \*p<0.05 em relação ao objeto à esquerda (A) ou familiar (B) ou em relação ao grupo**

salina+veículo (C); # $p < 0,05$  em relação ao grupo MK-801+salina; (A e B) teste t de Student e (C) ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de S-N-K.

### 5.3. Experimento 3: Efeito do tratamento crônico com AM630 e HU-910 sobre os prejuízos nos testes de IS e RO induzidos pelo tratamento crônico com MK-801.

*Interação social:* O tratamento repetido com MK-801 (0,5 mg/kg) não induziu prejuízo no teste de interação social ( $F_{(4,24)} = 0,463$ ;  $p = 0,761$ , ANOVA de uma via, *post hoc* S-N-K) (Figura 10). Dessa forma, não é possível se concluir qual o efeito do tratamento com HU-910 no teste e se este efeito é bloqueado pelo tratamento prévio com o antagonista CB2, AM630 (1 mg/kg).

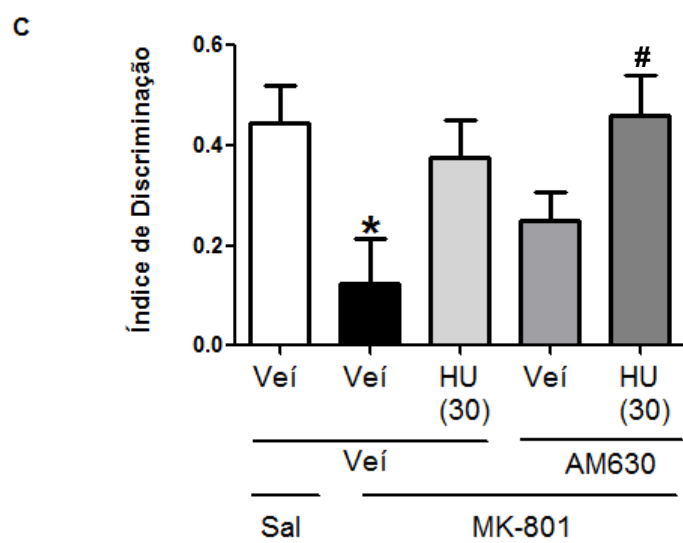
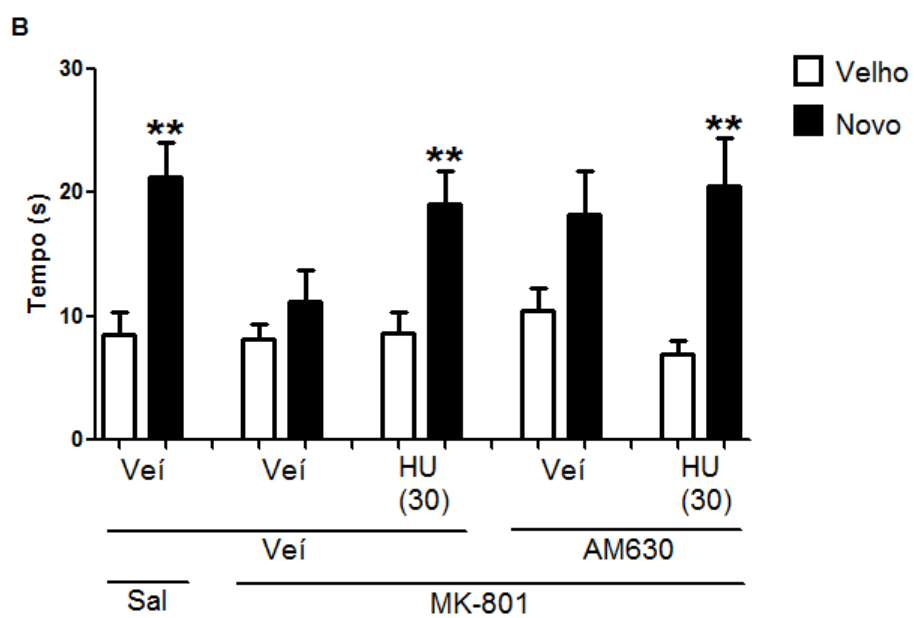
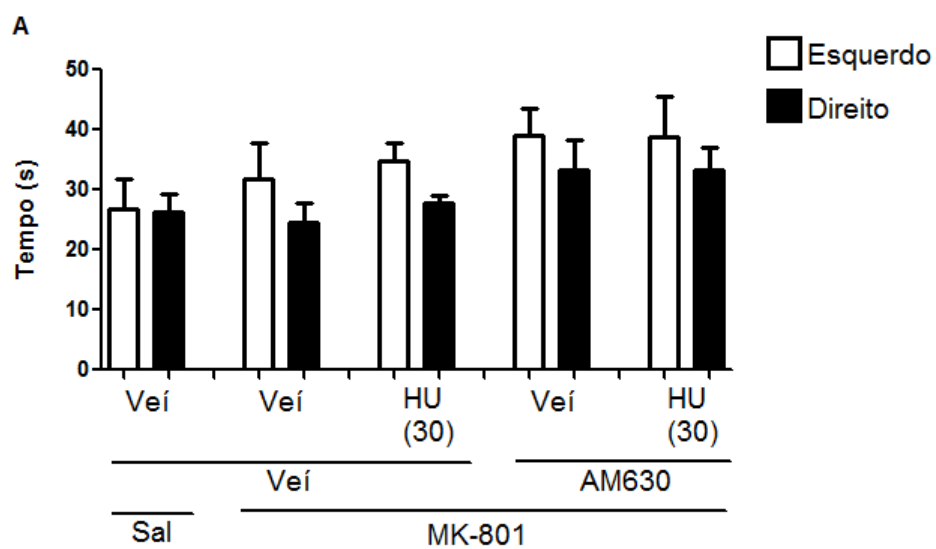


**Figura 10.** Efeito do tratamento repetido com AM630 e HU-910 após o pré-tratamento com MK-801 no teste de interação social ( $n = 6/\text{grupo}$ ). Os dados estão apresentados em média e EPM.  $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de S-N-K.

*Reconhecimento de Objetos:* não houve preferência de nenhum dos grupos por algum dos objetos iguais na sessão de aquisição ( $p > 0,05$ , teste t de

Student; Figura 11A). Entretanto, na sessão de retenção o tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto velho foi significativamente maior nos grupos salina+veículo+veículo, MK-801+veículo+HU+910 e MK-801+AM630+HU-910 ( $p < 0,05$ , teste t de Student; Figura 11B). Em relação ao índice de discriminação, houve diminuição do índice nos animais tratados com MK-801+veículo+veículo em relação aos animais tratados com salina+veículo+veículo e essa diminuição foi atenuada pelo tratamento com HU-910 e revertida pelo tratamento com AM630+HU-910 ( $F_{(4,25)} = 3,525$ ;  $p > 0,05$  ANOVA de uma via, post-hoc S-N-K).

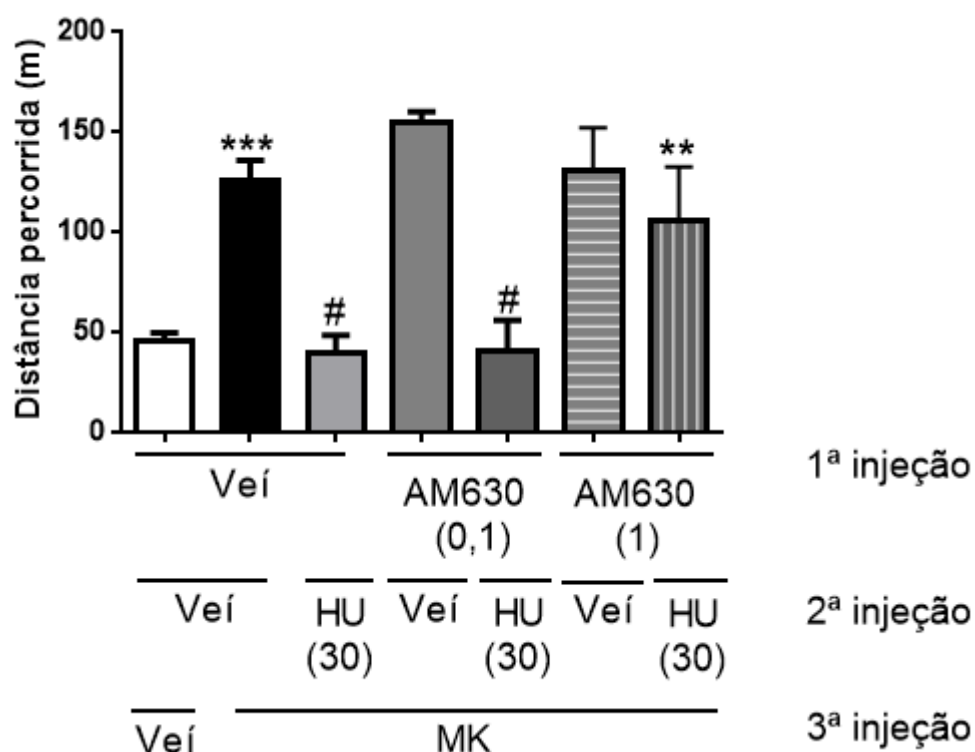




**Figura 11. Efeito do tratamento repetido com AM630 e HU-910 sobre prejuízo causado pelo tratamento com MK-801 no teste de reconhecimento de objetos (n = 6/grupo).** Sessão de aquisição (A) e retenção (B). Dados representados como índice de discriminação (C). Os dados estão apresentados como a média e o EPM. \* $p < 0.05$  em relação ao objeto familiar (B) ou em relação ao grupo salina+veículo+veículo (C). # $p < 0,05$  em relação ao grupo MK-801+veículo+veículo; (A e B) teste t de *Student* e (C) ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de S-N-K.

#### 5.4. Experimento 4: Efeito do tratamento com AM630 (0,1 e 1 mg/kg) e HU-910 (30 mg/kg) no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (0,25 mg/kg).

O pré-tratamento com AM630 (1 mg/kg) bloqueou o efeito do HU-910 (30 mg/kg) em prevenir a hiperlocomoção induzida por MK-801 ( $F_{(6,32)} = 10,92$  e  $p < 0,0001$ , ANOVA de uma via seguida por S-N-K) (Figura 12).

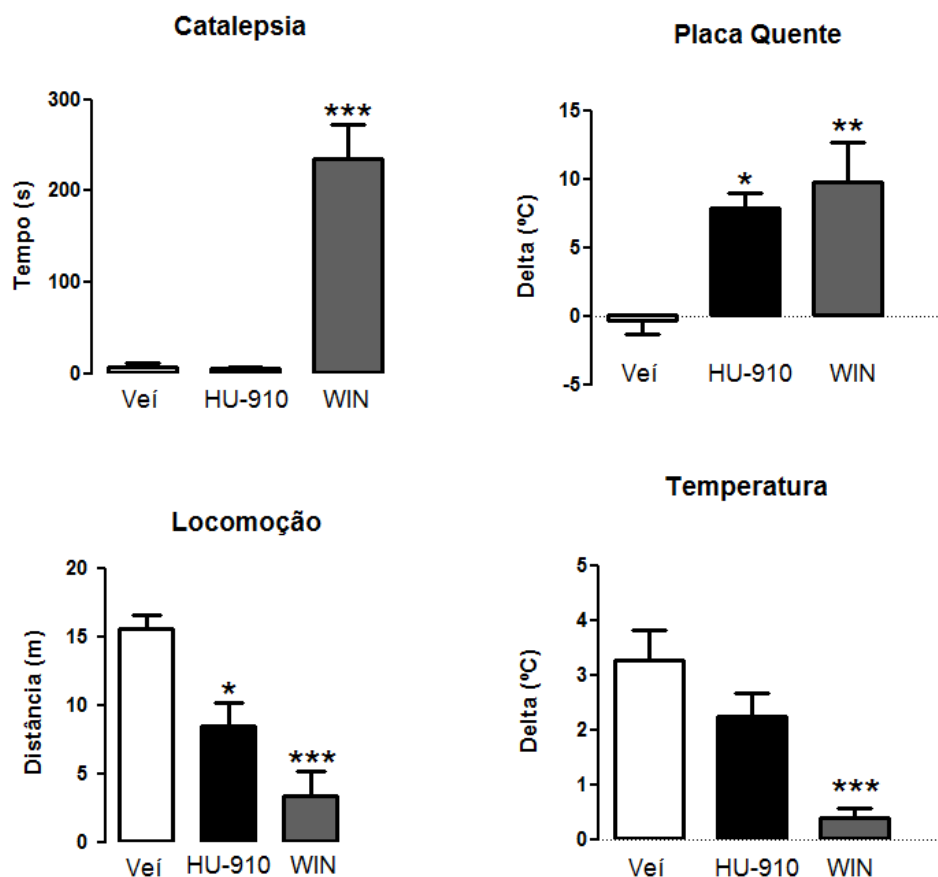


**Figura 12. Efeito do tratamento com AM630 (0,1 e 1 mg/kg) e HU-910 no teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (n = 5-7/grupo).** Os dados estão apresentados como a média e o EPM. \*\*  $p = 0,01$  e \*\*\* $p = 0,0001$  em relação ao grupo

veículo+veículo+veículo,  $^{\#}p<0,05$  em relação ao grupo veículo+veículo+MK-801; ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* S-N-K.

#### **5.5.Experimento 5: Efeitos do tratamento com HU-910 (30 mg/kg) e WIN55,212-2 (5 mg/kg) na tétrade canabinoide.**

O tratamento com WIN55,212-5 induziu as quatro alterações comportamentais características da tétrade canabinoide, causando a catalepsia, antinocicepção, hipolocomoção e hipotermia (Figura 13). Não foram observados após o tratamento com HU-910 (30 mg/kg) os efeitos de catalepsia e hipotermia quando comparado ao grupo veículo ( $F_{(2,14)}=46,23$ ;  $F_{(2,14)}=10,32$  e  $p<0,05$ , ANOVA de uma via seguido de Dunnett). Entretanto, foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo veículo nos testes de placa quente e hipolocomoção, sugerindo efeito antinociceptivo e locomotor do HU-910 ( $F_{(2,14)}=9,057$ ;  $F_{(2,14)}=16,09$ ; e  $p<0,05$ , ANOVA de um via seguido de Dunnett) (Figura 13).



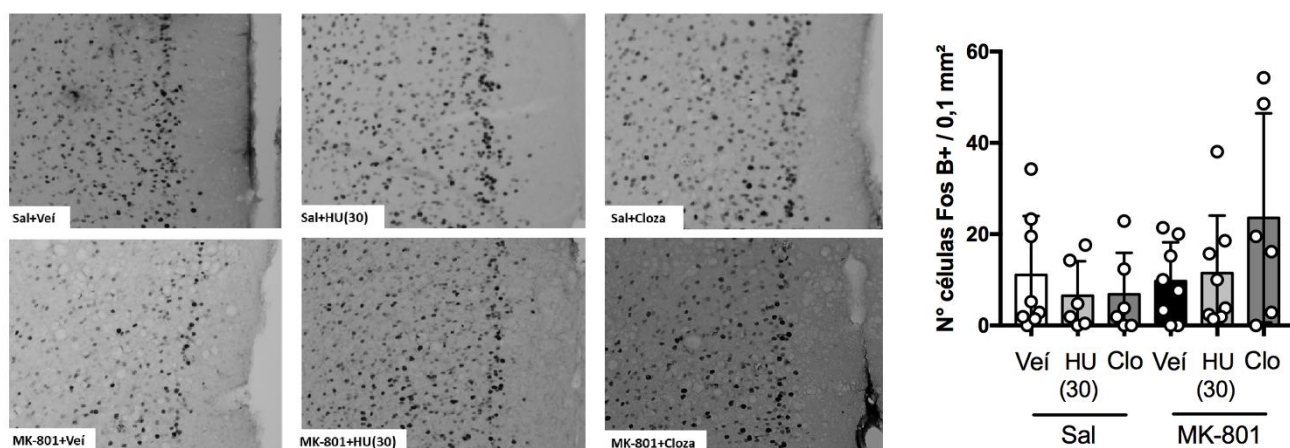
**Figura 13. Efeitos do tratamento com HU-910 (30 mg/kg) e WIN55,212-2 (5 mg/kg) na tétrede canabinoide (n = 5-6/grupo).** Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo; \*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo veículo \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Dunnett.

#### 5.6. Avaliação da alteração da expressão de FosB/ $\Delta$ FosB induzidas pelo tratamento crônico com HU-910 e clozapina em estruturas cerebrais específicas.

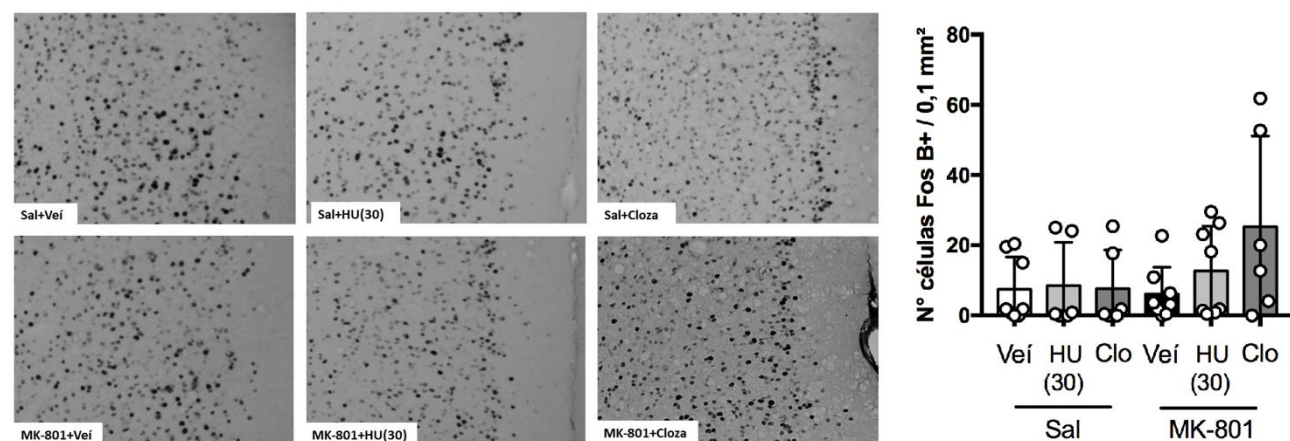
Não houve alteração na expressão da proteína em nenhuma das regiões avaliadas para nenhum dos grupos ( $p > 0,05$ , ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de S-N-K). Entretanto, a análise estatística demonstrou interação entre a expressão de FosB e o experimento, indicando que a expressão de fosB entre os grupos de mesmo tratamento diferem significativamente de acordo com o experimento realizado.

Houve correlação negativa entre os níveis de FosB e o Índice de Discriminação no teste de RO na porção IL do CPFm ( $r = -0,32$ ,  $p = 0,036$ ), nas porções core e shell do NAc ( $r = -0,44$ ,  $p = 0,0035$ ;  $r = -0,45$ ,  $p = 0,0023$ ) e nas divisões medial e lateral do estriado ( $r = -0,038$ ,  $p = 0,012$ ;  $r = -0,37$ ,  $p = 0,014$ ).

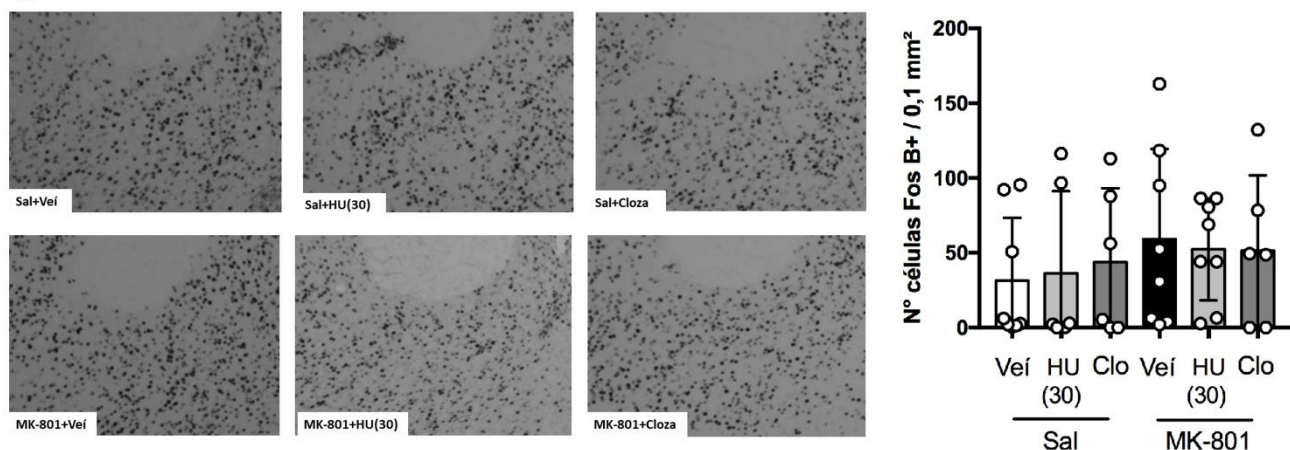
A



B



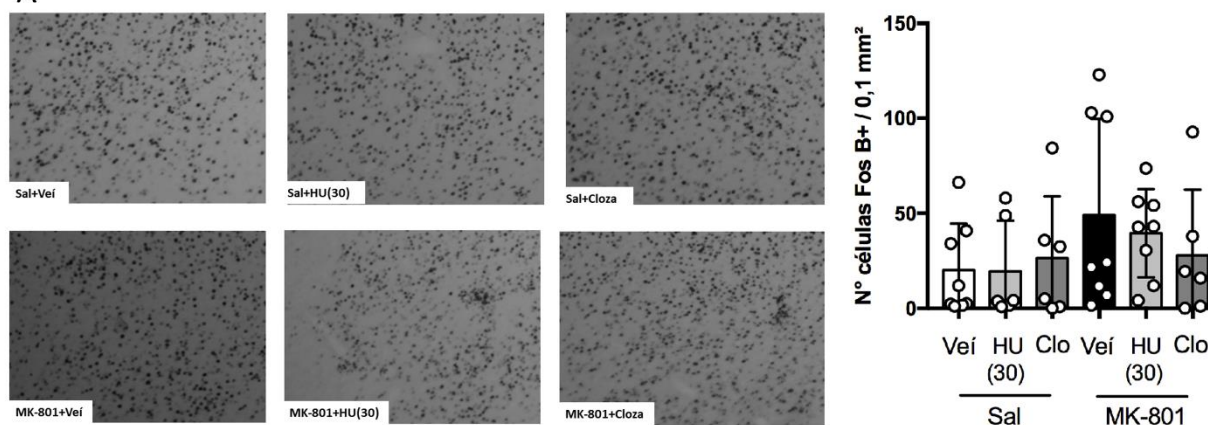
C



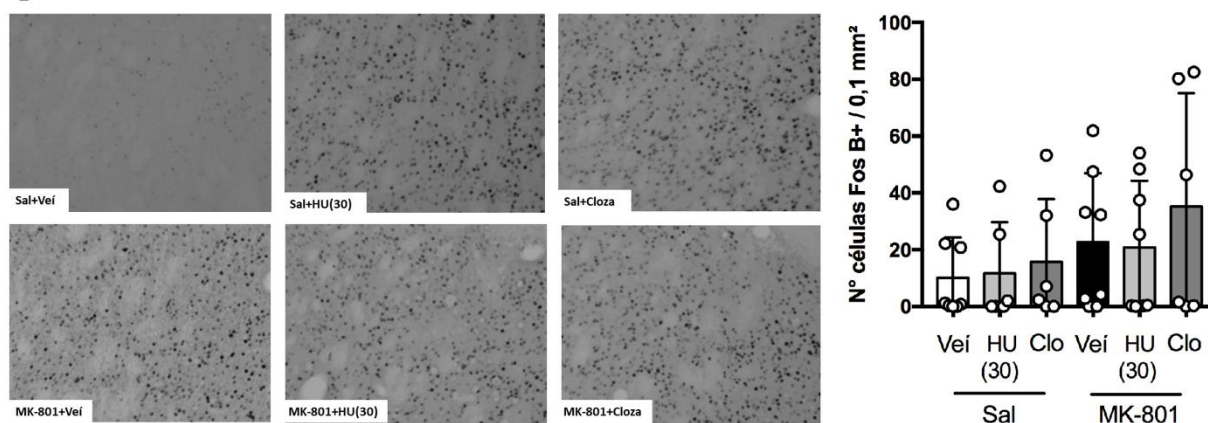
**Figura 14. Efeito do tratamento repetido com MK-801, HU-910 e clozapina sobre a expressão de proteína FosB/ $\Delta$ FosB no CFPm porções pré-límbica e infra-límbica, e núcleo *accumbens* porção core. Não houve alteração da expressão de FosB/ $\Delta$ FosB**

em nenhuma das regiões avaliadas e em nenhum dos grupos.  $P>0,05$ , ANOVA de uma via seguida pelo S-N-K.

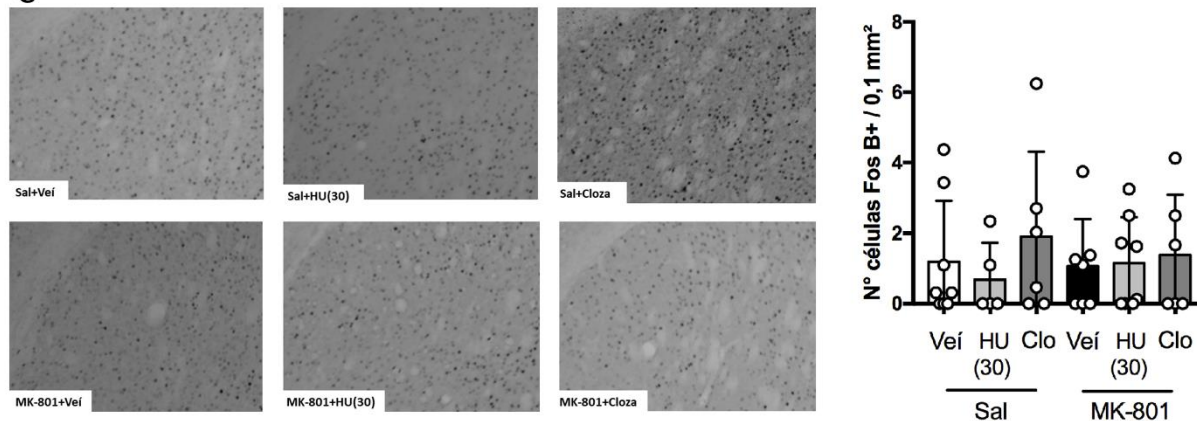
A



B



C



**Figura 15. Efeito do tratamento repetido com MK-801, HU-910 e clozapina sobre a expressão de proteína FosB/ $\Delta$ FosB no núcleo *accumbens* porção shell e CPu porções medial e lateral.** Não houve alteração da expressão de FosB/ $\Delta$ FosB em nenhuma das regiões avaliadas e em nenhum dos grupos.  $P>0,05$ , ANOVA de uma via seguida pelo S-N-K.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que o tratamento com HU-910 na dose de 30 mg/kg preveniu o aumento da atividade locomotora induzida pelo tratamento com o MK-801 mas não teve efeito sobre a hiperlocomoção induzida pela anfetamina. A administração aguda e crônica de antagonistas de receptores NMDA como o MK-801 tem sido utilizada como modelo para o estudo de compostos com possível atividade antipsicótico. O canabidiol (CBD), um fitocanabinoide não psicotomimético, previne a hiperlocomoção induzida pela D-anfetamina (agonista indireto dopaminérgico) e pela ketamina (antagonista de receptores NMDA) (Moreira e Guimarães, 2005). Além disso, o efeito do CBD inibindo a hiperlocomoção induzida por anfetamina foi bloqueado pelo pré-tratamento com AM630 (Rodrigues, N.S *et al*, dados não publicados), sugerindo que os receptores CB2 são relevantes para este efeito do CBD. Embora o mecanismo do CBD não seja completamente elucidado, por ser um inibidor da enzima FAAH poderia gerar um aumento de endocanabinoides levando a ativação indireta de receptores CB2 (Zuardi, *et al.*, 2012). Esta possibilidade é corroborada pelo bloqueio da hiperlocomoção induzida por MK-801 pelo HU-910.

Os efeitos locomotores do MK-801 e da anfetamina são resultados de mecanismos distintos de ação. O MK-801 induz aumento da atividade locomotora através facilitação da neurotransmissão dopaminérgica, em consequência do bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica, em áreas como NAc e CPu (Liljequist *et al.*, 1991). A anfetamina, por sua vez, induz aumento de locomoção através da facilitação da neurotransmissão dopaminérgica, impedindo a receptação da dopamina e facilitando sua liberação ao atuar sobre



os transportadores presentes na membrana de neurônios dopaminérgicos (Carr e White, 1987). Nesse contexto, nosso achado sugere que os efeitos do HU-910 se relacionem mais a neurotransmissão glutamatérgica, em detrimento da dopaminérgica. Além disso, a diferença no efeito do HU-910 no teste de hiperlocomoção com indutores distintos sugere que, apesar de o HU-910 induzir a hipolocomoção no teste da tétrade canabinoide (Figura 13), o efeito atenuador da hiperlocomoção induzida por MK-801 observado neste trabalho não é exclusivamente dependente da propriedade hipolocomotora do HU-910, pois caso a prevenção da hiperlocomoção observada dependesse exclusivamente da hipolocomoção causada pelo composto, efeito similar deveria ser observado para a hiperlocomoção com anfetamina e outras drogas psicoestimulantes. Adicionalmente, o bloqueio do efeito atenuador do HU-910 pelo pré-tratamento com AM630 demonstra a relevância dos receptores CB2 para o efeito observado no teste de hiperlocomoção.

A administração crônica de MK-801 tem sido muito utilizada no estudo das alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroanatômicas da esquizofrenia, sendo a redução do tempo de interação social representativo dos sintomas negativos e prejuízos no teste de reconhecimento de objetos, relacionados dos sintomas cognitivos (Gomes, *et al.*, 2015). Gomes e colaboradores mostraram que a administração crônica de MK-801 por 28 dias causa alterações comportamentais e comprometimento cognitivo em animais nos testes de interação social, reconhecimento de objetos e inibição do pré-pulso, sendo essas alterações atenuadas pelo tratamento crônico com clozapina, um antipsicótico atípico, e com CBD. No teste de reconhecimento de objetos, o HU-910 foi capaz de reverter os prejuízos induzidos pelo MK-801.

Sendo este um teste relacionado com comprometimentos cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia o composto HU-910 poderia ser uma alternativa terapêutica importante visto que este perfil de drogas antipsicóticas é necessário na clínica (Elvevag e Goldberg, 2000; Hanson *et al.*, 2010).

No teste de interação social os dados onde o mesmo protocolo de tratamento com MK-801 induziu prejuízo não foram reproduzidos no presente trabalho (Rodrigues, *et al.*, dados não publicados). O comportamento social de roedores é diretamente influenciado por eventos estressantes ao longo da vida do animal, e em alguns casos o comportamento social está reduzido após o evento estressor (Beery & Kaufer, 2014). Considerando uma análise mais detalhada dos dados, podemos observar que o tempo de interação social dos animais controle (salina+salina) foi muito menor que o tempo de interação dos animais dos trabalhos obtidos como referência para este projeto (Figura 8). Com o tempo de interação dos controles abaixo do normal, o efeito do MK-801 em diminuir o tempo de interação social não pôde ser observado. Apesar de não ter ocorrido de maneira proposital nenhum tipo de evento estressante, diversos fatores podem ter ocasionado o estresse dos animais e assim, interferido no teste de IS, como mudanças estruturais no biotério onde os animais foram alojados, background dos animais, entre outros, os quais não puderam ser controlados. Além disso, diferentemente do teste de RO, onde os animais são previamente habituados à arena, no teste de interação social os animais não são habituados à caixa. Assim, a caixa seria uma novidade para os animais, os quais poderiam dispende grande parte do tempo de análise (10 minutos) explorando o ambiente, prejudicando a interação com o animal não familiar. Dessa forma, um novo teste

poderia ser feito habituando-se previamente os animais à caixa onde o teste será realizado.

Nossos dados mostram que o antagonismo de receptores CB2 não bloqueou o efeito do HU-910 no teste de reconhecimento de objetos. No entanto, apenas uma dose foi utilizada, e é possível que doses maiores fossem necessárias para reduzir o efeito do HU-910 com o uso prolongado. Outra possibilidade seria a de que ativação de receptores CB2 não seja essencial para o efeito do composto neste protocolo experimental. Sabe-se que alguns ligantes possuem maior afinidade por um determinado receptor, ou seja, são seletivas a ele. Entretanto, essa seletividade é prejudicada pela concentração ou dose na qual o ligante se encontra, podendo, desta forma, se ligar a outros receptores, de maneira inespecífica (Rang & Dale, 7ª Ed, 2012). Sendo assim, o efeito observado do HU-910 no teste de RO poderia estar relacionado à ativação de outros receptores, que devem ser, posteriormente, investigados. Diversos trabalhos que utilizam o modelo de psicose baseado no antagonismo de receptores NMDA têm mostrado que a ativação de receptores serotoninérgicos é importante para atenuar a hiperlocomoção induzida por esses antagonistas bem como para reverter os prejuízos no teste de RO causados pelo tratamento repetido com MK-801 (Meltzer *et al.*, 2011). Além disso, alguns antipsicóticos atípicos, como a clozapina e aripiprazol, possuem atividade sobre receptores serotoninérgicos 5-HT, característica que estaria relacionada aos efeitos desses fármacos sobre os sintomas negativos e cognitivos (Meltzer *et al.*, 2011). Adicionalmente, o pré-tratamento com o antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> WAY100635 bloqueou os efeitos benéficos do CBD nos testes de IS e RO (Rodrigues, *et al.*, dados não publicados), corroborando com a hipótese de que a ativação desses receptores

seja necessária para o efeito antipsicótico. Dessa forma, esse receptor poderia também ser um importante alvo na investigação do mecanismo pelo qual o HU-910 apresenta efeito sobre sintomas cognitivos em modelo animal.

O HU-910 apresentou efeito hipolocomotor no teste da tétrade canabinoide (Figura 13) e efeito similar a este é observado com o tratamento com haloperidol, antipsicótico típico utilizado na clínica para tratamento da esquizofrenia, o qual promove redução da atividade locomotora de ratos e previne a hiperlocomoção induzida por anfetamina (Moreira e Guimarães, 2005). Diferente deste antipsicótico típico, no entanto, o HU-910 não causou catalepsia. Como discutido anteriormente, a interferência na locomoção observada com o HU-910 na tétrade canabinóide (Figura 13), no entanto, não parece ter interferido no efeito observado após a administração aguda do MK-801, uma vez que o mesmo efeito não foi observado após administração aguda de anfetamina (Figuras 6 e 7).

Como o HU-910 não produziu as quatro alterações descritas na tétrade canabinoide, é improvável que o composto, nas doses utilizadas, ative receptores CB1. Drogas que ativam estes receptores produzem efeitos semelhantes ao do delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), o que limita seu emprego na clínica. Quanto ao efeito tipo antinociceptivo do HU-910, observado no teste de placa quente da tétrade canabinoide, diversos trabalhos vêm demonstrando o potencial analgésico dos canabinoides, especialmente de agonistas de receptores CB2, em modelos de dor neuropática, dor aguda e dor crônica. Malan e colaboradores demonstraram que o AM1241, agonista seletivo do receptor CB2, aumenta a latência de retirada da pata na placa quente, resultado similar ao observado para o HU-910 (Figura 13). Além disso, no mesmo estudo foi

observado que tal efeito era bloqueado pela administração prévia de antagonista de receptores CB2, o AM630, mas não pelo antagonismo de receptores CB1 com AM251, indicando que esse efeito é possivelmente mediado por CB2 (Malan *et al.*, 2001). O composto HUF-101, um derivado fluorado da molécula do CBD, também apresentou efeito antinociceptivo na placa quente em modelo de hiperalgesia induzida por carragenina. Esse efeito foi atenuado pela administração de antagonistas de receptores CB1 (AM251) e CB2 (AM630), sugerindo que a ativação desses receptores está envolvida no potencial analgésico do composto (Silva *et al.*, 2017). Embora os mecanismos pelos quais os receptores canabinoides medeiam o efeito antinociceptivo ainda não sejam completamente elucidados, a administração local de agonista CB2 também é capaz de reduzir a hipersensibilidade térmica induzida por carragenina e esse efeito também é bloqueado por antagonista seletivo CB2, AM630 (Quartilho *et al.*, 2003). Nesse sentido, o efeito antinociceptivo induzido pelo HU-910 observado na tétrede canabinoide aqui apresentada corrobora com dados da literatura que demonstram o potencial analgésico de agonistas CB1 e CB2.

Gomes e colaboradores mostraram que ocorre aumento da expressão de FosB/ $\Delta$ FosB no CPFm de animais tratados com MK-801 e no NAc core de animais tratados com clozapina, MK-801 e CBD (Gomes *et al.*, 2015). Nossa quantificação da proteína FosB/ $\Delta$ FosB, entretanto, não mostrou alteração de expressão em nenhuma das regiões observadas para nenhum dos tratamentos realizados (Figuras 14 e 15). Porém, a análise da distribuição dos valores individuais dos animais (representado pelos círculos) evidencia uma variabilidade acentuada dentro de cada grupo de tratamento. Uma vez que os testes comportamentais de IS e RO são extensos, é preciso ser feito em

duplicata para se atingir um tamanho amostral satisfatório, além de garantir a reprodutibilidade dos dados. Dessa forma, os encéfalos tiveram tempo de armazenamento distintos no *freezer* à -80°C. Essa diferença no tempo de armazenamento das amostras pode ter acarretado em degradação tecidual, prejudicando a detecção da proteína de interesse e, assim, justificar a diferença acentuada de expressão entre os animais do mesmo grupo, porém de experimentos diferentes. Outro fator que pode ter implicado na diferença entre as amostras foi o fato de o *freezer* no qual se armazenaram as primeiras amostras ter sofrido um problema no motor de refrigeração, provocando o descongelamento das amostras, contribuindo para sua degradação e redução de sua viabilidade.

Além disso, o protocolo de injeção utilizado neste trabalho difere do protocolo utilizado no trabalho citado acima, uma vez que as injeções de MK-801(1 mg/kg) e CBD foram administrada concomitantemente, com intervalo de 30 minutos entre as injeções, durante 28 dias no trabalho de referência. Assim, o período de recuperação das injeções de MK-801 em nosso trabalho é significativamente maior. Isso pode justificar porque não foi observado aumento da expressão de FosB/ $\Delta$ FosB no CPFm no grupo MK-801+veículo, não reproduzindo os dados de Gomes e colaboradores (2015).

## **7. CONCLUSÃO**

Os dados obtidos permitem sugerir que o composto HU-910 possui uma possível atividade antipsicótica em modelo animal de esquizofrenia baseado no antagonismo de receptores NMDA e não induz todos os efeitos da tétrede canabinoide. Além disso, como não foi observado bloqueio do efeito do HU-910

pelo pré-tratamento com AM630 no teste de reconhecimento de objetos, os receptores CB2 parecem não serem essenciais para o efeito do composto neste teste, mas sim no teste de hiperlocomoção, onde foi observado bloqueio do efeito com o pré-tratamento com AM630.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENTO, A. F.; LEITE, D. F., CLAUDINO, R. F., HARA, D. B., LEAL, P. C., and CALIXTO, J. B. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. **J. Leukoc. Biol.** 84, 1213–1221, 2008.

BEERY AK, KAUFER D. Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. **Neurobiology of Stress**.1:116-127, 2014.

CAMPOS, A.C.; MOREIRA, F.A.; GOMES, F.V.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v.5367, n.1607, p.3364-78, 2012.

CARR, G.D., WHITE, N.M. Effects of systemic and intracranial amphetamine injections on behavior in the open field: a detailed analysis. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 27, 113–122, 1987.

CONCANNON, R. M., OKINE, B. N., FINN, D. P., and DOWD, E. Differential upregulation of the cannabinoid CB2 receptor in neurotoxic and inflammationdriven rat models of Parkinson's disease. **Exp. Neurol.** 269, 133–141, 2015.

DAVIS, K. L.; KAHN, R. S.; KO, G.; DAVIDSON, M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. **Am J Psychiatry**, v. 148, n. 11, p. 1474-86, 1991.

DIANA, G.; SAGRATELLA, S. Different capability of N-methyl-d-aspartate antagonists to affect locomotor/exploratory activity of mice in a computerized on-line open field test. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.48, p. 291–295, 1994.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 1, p. 7-61, 1999.

ELLENBROEK, B. A.; COOLS, A. R. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. **Behav Pharmacol**, v. 11, n. 3-4, p. 223-33, 2000.

ELVEVAG, B.; GOLDBERG, T. E. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. **Crit Rev Neurobiol**, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2000.

ENNACEUR, A.; One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behav Brain Research** v.215 p.244–254, 2010.

FEJGIN, K.; SAFONOV, S.; PÅLSSON, E.; WASS, C.; ENGEL, J. A.; SVENSSON, L.; KLAMER, D.; The atypical antipsychotic, aripiprazole, blocks phencyclidineinduced disruption of prepulse inhibition in mice. **Psychopharmacology (Berl)**,v.191, n.2, p.377-85, 2007.

FERNANDEZ-RUIZ, J., ROMERO, J., VELASCO, G., TOLON, R. M., RAMOS, J. A., and GUZMAN, M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? **Trends Pharmacol. Sci.** 28, 39–45,2007.

GIUFFRIDA, A., LEWEKE, F.M., GERTH, C.W., SCHREIBER, D., KOETHE, D., FAULHABER, J., KLOSTERKÖTTER, J., PIOMELLI, D. Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely



correlated with psychotic symptoms. **Neuropsychopharmacology**. 29(11):2108-14, 2004.

GOBIRA, P.H. et al. Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 35, supl. 2, p. S132-S139, 2013.

GOMES, F. V.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol attenuates catalepsy induced by distinct pharmacological mechanisms via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 43–47, 2013.

GOMES F.V., LLORENTE R., DEL BEL E.A., VIVEROS M.P., LÓPEZ-GALLARDO M., GUIMARÃES F.S. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. **Schizophr. Res.**, 164:155–163, 2015.

GONZALEZ-BBURGOS, G., LEWIS, D.A. NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. **Schizophr Bull**, v. 38, n. 5, p.950-7, 2012.

GUIMARÃES, F.G; MOREIRA, F.A; ZUARDI, A.W. Medicamentos antipsicóticos. GRAEFF F.G, GUIMARÃES F.F. Fundamentos de Psicofarmacologia. 2ª Edição. Editora Atheneu: São Paulo, p 93-120, 2012.

HASHIMOTO, K.; FUJITA, Y.; SHIMIZU, E.; IYO, M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol. *Eur J Pharmacol*, v. 519, n. 1-2, p. 114-7, 2005.

HANSON, E.; HEALEY, K.; WOLF, D.; KOHLER, C. Assessment of pharmacotherapy for negative symptoms schizophrenia. **Curr Psychiatry Rep**, v. 12, n. 6, p.563-71, 2010.

HORVÁTH, B. *et al.* A new cannabinoid CB2receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.** 165, 2462–2478 (2012).

JENTSCH, J. D.; ROTH, R. H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 201-25, 1999.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 4-29, 2005.

KRUK-SLOMKA, M.; BANASZKIEWICZ, I.; BIALA, G. The Impact of CB2 Receptor Ligands on the MK-801-Induced Hyperactivity in Mice; **Neurotox Res.** Apr;31(3):410-420, 2017.

KRYSTAL, J. H.; PERRY, E. B., JR.; GUEORGUEVA, R.; BELGER, A.; MADONICK, S. H.; ABI-DARGHAM, A.; *et al.* Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 9, p. 985-94, 2005.

LEWIS, D. A.; LIEBERMAN, J. A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. **Neuron**, v.28, n.2, p.325-34, 2000.

LEWIS, S.; LIEBERMAN, J. CATIE and CUTLASS: can we handle the truth? **Br J Psychiatry**, v. 192, n. 3, p. 161-3, 2008

LIEBERMAN, J. A.; STROUP, T. S.; MCEVOY, J. P.; SWARTZ, M. S.; ROSENHECK, R. A.; PERKINS, D. O.; *et al.* Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. **N Engl J Med**, v. 353, n. 12, p. 1209-23, 2005.

LILJEQUIST S, OSSOWSKA K, GRABOWSKA-ANDÉN M, ANDÉN NE. Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on locomotor activity and on the metabolism of dopamine in various brain areas of mice. **Eur J Pharmacol** 195:55–61,1991.

LUONGO, L.; MAIONE, S.; DI MARZO, V. Endocannabinoids and neuropathic pain: focus on neuron-glia and endocannabinoid-neurotrophin interactions. **Eur J Neurosci**, v. 39, n. 3, p. 401–408, 2014.

MALAN, T.P JR., IBRAHIM, M.M., DENG, H., LIU, Q., MATA, H.P., VANDERAH, T., PORRECA, F., MAKRIYANNIS, A; CB2 cannabinoid receptor mediated peripheral antinociception. **Pain** 93:239–245, 2001.

MCGRATH, J.; SAHA, S., CHANT, D., WELHAM, J. Schizophrenia: A Concise Overview of Incidence, Prevalence, and Mortality. **Epidemiol Rev**; 30 (1): 67-76, 2008.

MELTZER, H.Y.; HORIGUCHI, M.; MASSEY, B.W. The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. **Psychopharmacology (Berl)**. 213(2-3):289-350, 2011.

MOHN, A. R.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G.; KOLLER, B. H. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. **Cell**, v. 98, n. 4, p. 427-36, 1999.

MOREIRA F. A., GUIMARÃES F. S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 512 199–205, 2005.

NAGAI, T.; MURAI, R.; MATSUI, K.; KAMEI, H.; NODA, Y.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors. **Psychopharmacology**, v.202, p.315–328, 2009.

NESTLER, E.J.; KELZ, M.B.; CHEN, J. Delta-fosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain Res.** V.835, n. 1, p. 10-7, 1999.

ORTEGA-ALVARO A.; ARACIL-FERNÁNDEZ A.; GARCÍA-GUTIÉRREZ M.S.; NAVARRETE F.; MANZANARES J. Deletion of CB2 Cannabinoid Receptor Induces Schizophrenia-Related Behaviors in Mice. **Neuropsychopharmacology**. 2011;36(7):1489-1504. 2011

PALAZUELOS, J., AGUADO, T., PAZOS, M. R., JULIEN, B., CARRASCO, C., RESEL, E., et al. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. **Brain** 132(Pt 11), 3152–3164, 2009

PALAZUELOS, J., DAVOUST, N., JULIEN, B., HATTERER, E., AGUADO, T., MECHOULAM, R., et al. The CB2 cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. **J. Biol. Chem.** 283, 13320–13329, 2008.

PAXINOS, G; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates: 3th Ed. **New York. Academic Press**, 360p, 2008.

PRICE, D. A., MARTINEZ, A. A., SEILLIER, A., KOEK, W., ACOSTA, Y., FERNANDEZ, E., et al. WIN55, 212–2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Eur. J. Neurosci.** 29, 2177–2186, 2009.

QUARTILHO, A.; MATA, H.P.; IBRAHIM, M.M.; VANDERAH, T.W.; PORRECA, F., MAKRIYANNIS, A., MALAN T.P JR. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. **Anesthesiology** 99:955–960, 2003.

RAMÍREZ, B. G., BLÁZQUEZ, C., GÓMEZ DEL PULGAR, T., GUZMÁN, M., and CEBALLOS, M. L. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. **J. Neurosci.** 25, 1904–1913, 2005.

RANG & DALE [recurso eletrônico] : Farmacologia, 7ª Ed / H.P. Rang et al; [tradução de Tatiana Ferreira Robaina et al.], - Rio de Janeiro: Elseiver, 2012.

ROCHE, M.; FINN, D.P. Brain CB2 Receptors: Implications for Neuropsychiatric Disorders, **Pharmaceuticals**, 3, 2517-2553, 2010.

RUNG, J. P.; CARLSSON, A.; RYDEN MARKINHUHTA, K.; CARLSSON, M. L. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 827-32, 2005.

SAGREDO, O., GONZÁLEZ, S., AROYO, I., PAZOS, M. R., BENEDITO, C., LASTRES-BECKER, I., et al. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. **Glia** 57, 1154–1167, 2009.

SANBERG, P. R. et al. The catalepsy test: its ups and downs. **Behav Neurosci**, v. 102, n. 5, p. 748-759, 1988.

SEEMAN, P.; KAPUR, S. Schizophrenia: more dopamine, more D<sub>2</sub> receptors **PNAS**, 97 (14) 7673-7675; July 5, 2000.

SILVA, N.R., GOMES, F.V., FONSECA, M.D., MECHOULAM, R., BREUER, A., CUNHA, T.M., GUIMARÃES, F.S (2017) Antinociceptive effects of HUF-101, a fluorinated cannabidiol derivative. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** v. 79, p. 369–377.

SILVERSTEIN, S.M.; MOGHADDAM, B.; WYKES, T. Schizophrenia: evolution and synthesis. The MIT Press, 2013. 390p.

SOETHOUDT, Marjolein et al. Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

STEFANI, M. R.; MOGHADDAM, B. Transient N-methyl-D-aspartate receptor blockade in early development causes lasting cognitive deficits relevant to schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 4, p. 433-6, 2005.

STEPHEN, S. M. Beyond the Dopamine Hypothesis to the NMDA Glutamate Receptor Hypofunction Hypothesis of Schizophrenia. **Journal Spectrum CNS**. 12 (4): 265-268, 2007.

TSAI, G.; COYLE, J.T. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. V.42, p.165-79, 2002.

WEICKERT T.W.; GOLDBERG, T.E.; GOLD, J.M.; BIGELOW, L.B.; EGAB, M.F. WEINBERGER, D.R. Cognitive impairments in patients with schizophrenia displaying preserved and compromised intellect. **Arch Gen Psychiatry**, 57(9):907–13, 2000.

WHO. Schizophrenia Fact sheet, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs397/en/> Acesso em: 07 de novembro de 2017.

WONG, A. H.; VAN TOL, H. H. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 3, p. 269-306, 2003.

WONG, A. H.; VORUGANTI, L. N.; HESLEGRAVE, R. J.; AWAD, A. G. Neurocognitive deficits and neurological signs in schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 23, n. 2, p. 139-46, 1997.

ZHANG, H.Y.; GAO, M.; LIU, Q.R.; BI, G.H.; LI, X.; YANG, H.J.; GARDNER, E.L.; WU, J.; XI, Z.X Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 111:E5007–E5015. 10.1073/pnas.1413210111, 2014.

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; BHATTACHARYYA, S.; ATAKAN, Z.; MARTIN-SANTOS, R.; et al. A critical review of the antipsychotic effects of cannabidiol: 30 years of a translational investigation. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 32, p. 5131-40, 2012.

