

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DA ANANDAMIDA NOS MOVIMENTOS DE
MASCAR NO VAZIO INDUZIDOS POR
HALOPERIDOL EM RATOS: PARTICIPAÇÃO DO
RECEPTOR CB1**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jivago Röpke Rodrigues

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**EFEITO DA ANANDAMIDA NOS MOVIMENTOS DE
MASCAR NO VAZIO INDUZIDOS POR HALOPERIDOL EM
RATOS: PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CB1**

Jivago Röpke Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial
para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roselei Fachinetto

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rodrigues, Jivago Röpke

Efeito da Anandamida nos movimentos de mascar no vazio induzidos por haloperidol em ratos: Participação do receptor CB1. / Jivago Röpke Rodrigues.-2012.

47 p. ; 30cm

Orientador: Roselei Fachinetto

Coorientador: Juliano Ferreira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2012

1. Discinesia Tardia 2. Dopamina 3. Canabinóides 4. Anandamida I. Fachinetto, Roselei II. Ferreira, Juliano III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA ANANDAMIDA NOS MOVIMENTOS DE
MASCAR NO VAZIO INDUZIDOS POR HALOPERIDOL EM
RATOS: PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CB1**

elaborada por
Jivago Röpke Rodrigues

como requisito parcial para a obtenção de grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Roselei Fachinetto
(Presidente/Orientadora)
(UFSM)

Mauro Schneider Oliveira
(UFSM)

Romaiana Picada Pereira
(UFSM)

Santa Maria, 05 de Setembro de 2012.

Agradecimentos

Aos meus pais, Pedro e Norma e minha tia, Conceição, pelo amor e apoio incondicional, pela educação, pelo exemplo de coragem e pelo esforço feito para que eu chegasse até aqui.

A minha irmã, Janaina, pelo carinho, incentivo e exemplo de determinação.

A minha sobrinha e afilhada, Nina que chegou para tornar meus dias mais felizes e me proporcionar grandes ensinamentos sobre a vida e o amor

A minha vó, Eufrásia (*in memoriam*), meu maior exemplo de fé e altruísmo. Obrigado pelo papel tão importante que teve na construção da pessoa que sou hoje.

A minha orientadora, Professora Doutora Roselei Fachineto, pelos ensinamentos, pela dedicação e por ter me proporcionado o primeiro contato com a pesquisa científica.

As amigas, Naiani Marques e Elizete Reis, por estarem sempre ao meu lado em momentos tão importantes em minha vida.

As amigas e colegas de laboratório Caroline Leal e Fernanda Figueira, pelo apoio e dedicação na realização dos experimentos e pelos momentos maravilhosos de descontração, conversas e risadas. Obrigado por estarem ao meu lado.

Aos demais colegas do laboratório da Professora Roselei, especialmente, Alcindo Busanello, pela paciência em me ensinar muitos procedimentos quando eu era um aluno recém-chegado.

Aos Professores, Carlos Mello e Juliano Ferreira, por cederem seus laboratórios para a realização de alguns ensaios, e aos seus alunos, Queli Lenz e Jardel Vilarinho pela assistência na realização dos mesmos.

Ao biotério de experimentação animal e aos animais utilizados para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia.

A CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DA ANANDAMIDA NOS MOVIMENTOS DE MASCAR NO VAZIO INDUZIDOS POR HALOPERIDOL EM RATOS: PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CB1

AUTOR: Jivago Röpke Rodrigues
ORIENTADORA: Roselei Fachinetto
CO-ORIENTADOR: Juliano Ferreira
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 05 de setembro de 2012.

O tratamento com antipsicóticos pode causar discinesia tardia em humanos e discinesia orofacial em roedores. Embora a via dopaminérgica nigroestriatal tem sido implicada nestas alterações motoras, seus mecanismos continuam não completamente esclarecidos. Recentemente, a identificação da alta densidade de receptores canabinóides (CB1) nos gânglios da base tem sugerido que os canabinóides possuem um papel importante no controle das desordens de movimento. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar se os receptores CB1 estão envolvidos na discinesia orofacial induzida por haloperidol em ratos. Ratos machos adultos receberam decanoato de haloperidol (38 mg/kg, i.m., administração única). Após 24 dias os mesmos foram submetidos a cirurgia estereotáxica para a implantação de cânula no ventrículo direito. Após um período de recuperação, o efeito da anandamida (agonista canabinóide) (6 nmol, i.c.v.) e/ou do antagonista do receptor CB1, SR141716A (30 µg, i.c.v.), sobre os MMVs foi analisado. A anandamida reverteu os MMVs induzidos por haloperidol. O SR141716A (30 µg, i.c.v.) por se não alterou os MMVs induzidos por haloperidol, mas preveniu o efeito da anandamida sobre os MMVs em ratos. Em conclusão, nossos resultados mostram que a ativação dos receptores CB1 pode prevenir os MMVs induzidos por haloperidol em ratos, sugerindo a participação da sinalização canabinóide via receptor CB1 na discinesia orofacial.

Palavras chave: endocanabinóides, anandamida, sistema dopaminérgico, discinesia tardia

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF ANANDAMIDE ON VACUOUS CHEWING MOVEMENTS INDUCED BY HALOPERIDOL IN RATS: PARTICIPATION OF CB1 RECEPTOR

AUTHOR: Jivago Röpke Rodrigues
ADVISOR: Roselei Fachinetto
CO-ADVISOR: Juliano Ferreira
PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 2012

Treatment with antipsychotic drugs may cause tardive dyskinesia in humans and orofacial dyskinesia in rodents. Although the dopaminergic system in basal ganglia has been implicated in these movement disorders, their underlying mechanisms remain unclear. In recent years, the identification of high density of CB1 cannabinoid receptors within the basal ganglia has suggested a potential role for endocannabinoids in the control of basal ganglia-related movement disorders. Thus, the present study aimed to investigate whether CB1 receptors are involved in haloperidol-induced orofacial dyskinesia in rats. Adult male rats were treated with haloperidol decanoate (38 mg/kg, i.m., single administration). After 24 days, the animals were submitted to stereotaxic surgery for insertion of cannulas on right ventricle. After recovery, the effect of anandamide (6 nmol, i.c.v.) and/or the CB1 receptor antagonist SR141716A (30 µg, i.c.v.) on haloperidol-induced VCMs was assessed. Anandamide reversed haloperidol-induced VCMs. SR141716A (30 µg, i.c.v.) did not alter haloperidol-induced VCM per se, but prevented the effect of anandamide on VCM in rats. In conclusion, our results show that activation of CB1 receptor may prevent haloperidol-induced VCMs in rats, implicating cannabinoid signaling via CB1 receptor in orofacial dyskinesia.

Key words: endocannabinoids, anandamide, dopaminergic system, tardive dyskinesia

LISTA DE ABREVIATURAS

DA – dopamina

DT – discinesia tardia

DO – discinesia orofacial

DOPA - diidroxifenilalanina

MAO – enzima monoaminoxidase

MMV – movimentos de mascar no vazio

2AG – 2-araquidonoilglicerol

NADA –N-araquidonoildopamina

FAAH – Hidrolase de amina de ácidos graxos

CB1 –Receptores canabinóides do tipo 1

CB2 – Receptores canabinóides do tipo 2

D – Receptores dopaminérgicos

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Sistema Dopaminérgico.....	7
1.2 Esquizofrenia.....	8
1.3 Antipsicóticos.....	9
1.4 Discinesia Tardia.....	10
1.5 Modelos animais de Discinesia Tardia.....	11
1.6 Sistema endocanabinóide.....	12
1.7 Canabinóides e a função motora.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. RESULTADOS.....	16
3.1 Manuscrito.....	17
4. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	40
5. CONCLUSÃO FINAL.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito o qual está submetido para publicação na revista **BEHAVIORAL BRAIN RESEARCH**, o qual se encontra no item **RESULTADO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representa a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÃO** se encontra no final desta dissertação e apresenta os comentários gerais sobre este trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros fármacos eficazes para o tratamento da esquizofrenia foram descobertos casualmente na década de 1950, sendo a clorpromazina o primeiro fármaco antipsicótico descrito marcando o início de uma nova era no tratamento de pacientes com esquizofrenia (CARLSSON, 1988).

A primeira geração de fármacos antipsicóticos, também denominados típicos, exerce seus efeitos terapêuticos através do bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D2, nas vias dopaminérgicas mesolímbicas. O bloqueio D2 nesta região reduz a hiperatividade responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia. No entanto estes agentes também bloqueiam receptores D2 em outras vias (nigro-estriatal e tuberoinfundibular), resultando em efeitos colaterais como, por exemplo, sintomas extrapiramidais, entre as quais se destaca a discinesia tardia (DT) (KENDRICK, 1999).

A segunda geração de antipsicóticos, também denominados atípicos, inclui os antagonistas dopaminérgicos-serotoninérgicos, os quais apresentam reduzida incidência de sintomas extrapiramidais e melhoram os sintomas negativos em pacientes resistentes aos fármacos de primeira geração (WORREI et al, 2000). Entretanto, os antipsicóticos atípicos, apresentam uma série de outros efeitos colaterais, entre eles a pré-disposição ao diabetes mellitus tipo 2 e agranulocitose (HENDERSON, 2000). Além disso, possuem elevado custo, fazendo com que os típicos ainda sejam largamente empregados. Desta forma, o haloperidol é um dos antipsicóticos típicos mais amplamente utilizados e o seu uso está associado ao desenvolvimento de discinesia tardia em uma parcela significativa dos pacientes (KANE, SMITH, 1982).

A DT é caracterizada por movimentos involuntários repetitivos, envolvendo a face, boca e língua e, por vezes, a musculatura do tronco e dos membros (CASEY, 2000; TSAI, COYLE, 2002). A manifestação mais comum da DT é a síndrome de mastigação-facial, que inclui movimentos laterais da mandíbula ou movimentos da língua dentro da cavidade oral, protrusão, ou torção da língua (GOLDBERG, 2003).

Várias hipóteses neuroquímicas têm sido propostas para explicar o desenvolvimento de DT. Estas incluem supersensibilidade dopaminérgica, o desequilíbrio entre os sistemas

dopaminérgicos e colinérgicos, disfunção de mecanismos gabaérgicos, excitotoxicidade e a formação de radicais livres (CADET ET AL., 1987; KULKARNI 1996; CASEY, 2000).

Estudos recentes têm demonstrado que agonistas canabinóides tem sido efetivos no tratamento de desordens motoras incluindo doença de Parkinson e doença de Huntington (GLASS et al., 2004; VAN DER STELT et al.; 2005; BÉCKER et al., 2005; GARCÍA-ARENBICIA et al., 2007; DOWIE, et al., 2010).

Além disso, evidências experimentais apontam o sistema endocanabinóide (representado basicamente pelos receptores CB1, CB2 e endocanabinóides) como uma nova ferramenta farmacológica no tratamento das discinesias induzidas por levodopa (FERRER et al., 2003; SIERADZAN et al., 2001; VAN DER STELT et al., 2005). Um dos fatores que associam a participação do sistema endocanabinóide na modulação dopaminérgica é a elevação de anandamida dependente de dopamina a qual pode servir como um *feedback* inibitório que controla o comportamento motor mediado por dopamina (GIUFFRIDA et al. 1999; BELTRAMO et al, 2000).

Deste modo, a interação entre dopamina e endocanabinóides parece ter um papel fisiológico importante relacionado principalmente a manutenção e regulação da função motora. O estudo de compostos canabinóides em alterações dopaminérgicas se torna relevante afim de melhor esclarecer mecanismos relacionados à gênese e manutenção de alterações como a DT.

1.1 Sistema Dopaminérgico

A dopamina (3-hidroxitiramina) é um metabólito do aminoácido tirosina, o qual é convertido a diidroxifenilalanina (DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase. A DOPA por sua vez é convertida em dopamina pela L-aminoácido descarboxilase aromática (CARLSSON et al., 1957). Mediante estímulo, a dopamina é liberada na fenda sináptica e interage com receptores localizados a nível pré e pós-sináptico. Esses receptores pertencem à família de receptores acoplados a proteína G e estão divididos em duas classes: D1, a qual compreende os receptores do tipo D1 e D5; e D2, que inclui os receptores D2, D3 e D4 (ANDERSEN et al., 1990).

Os receptores da classe D1 induzem a ativação de proteína G estimulatória (Gs), que conseqüentemente estimula a produção de AMP cíclico pela adenilato ciclase. Já os receptores da classe D2 estão associados a proteína G inibitória (Gi), e assim induzem a inibição da adenilato ciclase (SOKOLOFF et al., 2006).

Uma vez liberada na fenda a dopamina pode também ser recaptada, através do transportador de dopamina. Após a recaptação, é desaminada pela ação da enzima monoamina oxidase (MAO) (COOPER et al., 2003).

A síntese de dopamina é realizada por neurônios cujos corpos celulares localizam-se no tronco cerebral e se projetam por diferentes vias, sendo elas: via mesolímbica (da área tegmentar ventral para o estriado ventral), via mesocortical (da área tegmentar ventral para o córtex pré-frontal) via nigroestriatal (da substância negra para o estriado dorsal) e a via tuberoinfundibular, envolvida no controle da produção de prolactina (ANDEN et al., 1964).

1.2 Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno mental grave que afeta cerca de 1% da população e é uma das principais causas de incapacidade crônica em todo o mundo (*American Psychiatric Association*, 1994). Esta é caracterizada pela desorganização dos processos mentais e se manifesta geralmente ao final da segunda década de vida (CANDRO, LEHMAN, 2000). Os sintomas são classificados em positivos e negativos. Os sintomas positivos compreendem alucinações, delírios e paranóia. Os sintomas negativos envolvem principalmente embotamento afetivo, perda da motivação e isolamento social (STEPHEN et al., 2007). O desenvolvimento de esquizofrenia parece associar influências genéticas e ambientais (LEWIS, LIEBERMAN, 2000).

A dopamina possui um papel central na patofisiologia da esquizofrenia (STEPHEN et al., 2007). A hipótese clássica assumida para a sintomatologia da esquizofrenia é que os sintomas positivos resultariam da hiperatividade dopaminérgica na via mesolímbica. Muitas evidências corroboram essa hipótese, uma vez que o antagonismo de receptores D2 é essencial para a atividade dos antipsicóticos (SEEMAN, LEE, 1975). Além disso, o tratamento com anfetamina, a qual leva ao aumento dos níveis de dopamina, acarreta em sintomas semelhantes aos sintomas positivos da esquizofrenia (ANGRIST, 1974).

Adicionalmente foi proposto que a atividade dopaminérgica reduzida na via mesocortical estaria ligada aos sintomas negativos (CARLSSON, 1988, WEINBERGER, 1987, GUILLIN ET AL., 2005). No entanto atualmente se considera o envolvimento de outros neurotransmissores como GABA e glutamato, uma vez que a dopamina pode atuar controlando a excitabilidade de neuronios GABAérgicos através da modulação da transmissão glutamatérgica. (LARUELLE, et al., 2003; CARLSSON, 2006).

1.3 Antipsicóticos

A primeira geração de antipsicóticos (típicos) exerce seus efeitos através do bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D2. Esse bloqueio reduz a hiperatividade na via dopaminérgica mesolímbica, que é responsável por causar os sintomas positivos da esquizofrenia (CREESE, 1976).

No entanto estes agentes causam o bloqueio de receptores D2 em outras vias do cérebro, o que resulta no agravamento dos sintomas negativos e a indução de efeitos extrapiramidais e hiperprolactinemia (ELLENBROEK, 1993).

O haloperidol é um antipsicótico típico que pertence à classe das butirofenonas, sendo um dos mais utilizados para o tratamento da esquizofrenia, no entanto, possui eficácia comprometida devido ao desencadeamento de sintomas extrapiramidais agudos e crônicos (NIEMEGEERS, 1983).

O desenvolvimento destes efeitos extrapiramidais induziu a busca por novos fármacos com menor incidência de efeitos colaterais extrapiramidais e sem diminuição na eficácia terapêutica. Assim surgiu a segunda geração de antipsicóticos atípicos, tendo como protótipo a clozapina. Estes fármacos diferem dos típicos por serem antagonistas dopaminérgico-serotoninérgicos (SCHMUTZ, EICHENBERGER, 1982).

Novos antipsicóticos atípicos começaram a ser sintetizados e estes foram ganhando notoriedade, apesar de seu elevado custo quando comparado aos típicos. No entanto, verificou-se que estes fármacos além de não possuírem elevada eficácia nos sintomas positivos da esquizofrenia, levavam ao desenvolvimento de efeitos colaterais metabólicos como resistência a insulina e diabetes mellitus tipo 2 (HENDERSON, 2000). Assim, o

elevado custo, associado aos efeitos colaterais fazem com que o uso dos antipsicóticos típicos ainda seja bastante elevado.

1.4 Discinesia Tardia

A DT consiste em uma síndrome que abrange uma variedade de desordens motoras resultantes da exposição a fármacos antagonistas de receptores dopaminérgicos (antipsicóticos). O termo “discinesia tardia” foi proposto por Faurbye et al. em 1964, onde a palavra “tardia” é usada para descrever o início tardio dos sintomas (geralmente após três meses de exposição a antipsicóticos em pacientes jovens e um mês em pacientes idosos) (AIA et al., 2011). Antes da criação deste termo a síndrome era referida com outras terminações como “discinesia persistente”, “síndrome buco-língua-mastigatória” ou “síndrome da insuficiência extrapiramidal terminal” (KANE, 1995).

A DT é caracterizada por movimentos anormais involuntários, que atingem principalmente a região orofacial, com movimentos de mastigação, protrusão da língua além de movimentos de piscar os olhos. Em alguns casos, pode também atingir o pescoço, os membros superiores e o tronco (GARDOS, COLE, 1983; KANE, 1995).

A DT ocorre em torno de 10 a 20% dos pacientes jovens tratados com antipsicóticos típicos e pode persistir por anos após o término do tratamento e, em muitos casos, ser irreversível. Em geral instala-se lentamente e seu curso é bastante variado, sendo mais grave em pacientes idosos (*American Psychiatric Association*, 1994).

Até o momento não existe uma explicação clara para o desenvolvimento da DT. Muitas hipóteses são sugeridas para entender como a síndrome se estabelece. Estas incluem a supersensibilidade dopaminérgica, disfunção de mecanismos GABAérgicos, excitotoxicidade e formação de radicais livres (CADETE et al, 1987;. KULKARNI 1996; CASEY, 2000).

A supersensibilidade dopaminérgica é a hipótese clássica e segundo ela, a DT ocorreria devido ao aumento compensatório no número de receptores dopaminérgicos em resposta ao seu bloqueio crônico, o que desencadearia um estado hiperdopaminérgico (RUBINSTEIN et al., 1990). No entanto, esta teoria possui algumas contradições, já que a idade é um importante fator de risco para a DT e alguns estudos demonstram que o

envelhecimento leva a redução no número e na sensibilidade de receptores dopaminérgicos (LOHR, JESTE, 1988).

Todavia o sistema dopaminérgico tem um importante envolvimento no estabelecimento da DT, uma vez que estudos anteriores já demonstraram que animais que desenvolveram movimentos de mascar no vazio após tratamento com haloperidol ou flufenazina apresentaram redução na recaptção de dopamina no estriado (FACHINETTO et al., 2007a; FACHINETTO et al., 2007b). Não obstante, um estudo recente demonstrou que em pacientes com DT, ocorre a redução na expressão do transportador de dopamina (RIZOZ, et al., 2010)

Nesse sentido, novas perspectivas a respeito dos mecanismos de interação do sistema dopaminérgico com outros neurotransmissores podem ser a chave para o entendimento da DT.

1.5 Modelos animais de Discinesia Tardia

Modelos animais oferecem uma oportunidade de estudar os mecanismos de desenvolvimento e estabelecimento da DT. Nestes modelos, a DT é chamada de discinesia orofacial (DO). O modelo reproduz a síndrome de maneira muito semelhante como ocorre em humanos, sendo que alguns indivíduos são mais susceptíveis e o aumento da incidência é diretamente proporcional à idade (EGAN et al., 1996; TAMMINGA, et al., 1990).

O modelo mais comumente utilizado é em ratos, com a utilização de antipsicóticos típicos como o haloperidol e a flufenazina (FACHINETTO, 2007a), nos quais o distúrbio se caracteriza por movimentos de mastigar no vazio (MMVs), um tipo de movimento característico, instável, em que ocorre abertura da boca não direcionada a nenhum objeto material. Também pode ocorrer protrusão da língua e tremores na região orofacial (BLANCHET et al., 2012). Assim como na DT, apenas uma parcela dos indivíduos é afetado (em torno de 50-70%), variando de acordo com o fármaco usado, o tempo e a via de administração (FACHINETTO et al., 2007a; FACHINETTO et al., 2007b; TAMMINGA, et al., 1990). Outra similaridade é que o número de MMVs pode sofrer alterações com o tempo, podendo piorar em função do aumento da idade e fatores associados ao estresse (KANEDA et al., 1992).

1.6 Sistema endocanabinóide

O uso de *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, é descrito por volta de 4000 a.C, na China, onde era utilizada para o tratamento de reumatismo, constipação e crises epilépticas, além do uso em rituais religiosos devido aos efeitos psicoativos. Entretanto, sua composição química começou a ser esclarecida somente em 1899 com o isolamento do canabinol (TOUWN, 1981).

Somente em 1964 foi isolado o principal composto psicoativo da maconha, o Δ^9 Tetraidrocanabinol (Δ^9 THC) (GAONI; MECHOULAM, 1964). Posteriormente, o mesmo foi sintetizado e possibilitou o estudo mais específico sobre os efeitos de sua administração sistêmica, embora seu mecanismo de ação permanecesse desconhecido.

Em 1988, Devane et al., caracterizaram em cérebro de ratos, um receptor específico de ligação para canabinóides, o qual foi chamando de receptor canabinóide do tipo 1 (CB1) (DEVANE et al., 1988). Em 1990 o mesmo foi clonado e teve sua estrutura identificada, sendo classificado como pertencente à família dos receptores acoplados a proteína G ou metabotrópicos (MATSUDA et al., 1990).

Uma vez identificado o receptor passou-se a procurar seus ligantes endógenos. A araquidonoiletanolamida (anandamida) foi o primeiro composto endógeno com atividade canabinominética, isolada em 1992 (DEVANE et al., 1992). Em 1993 foi isolado um subtipo periférico de receptor canabinóide, o receptor CB2 (MUNRO et al., 1993) e em 1995 foi descoberto um segundo canabinóide endógeno, o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (MECHOULAM et al., 1995). Até o final do século 20, apenas estes dois canabinóides endógenos (*endocanabinóides*) eram conhecidos, no entanto nos anos seguintes novos compostos foram identificados como agonistas canabinóides, entre eles a N-Araquidonoil-dopamina (NADA), o 2-araquidonoil-glicerol éter (noladina, 2-AGE) e a O-araquidonoil-etanolamina (virodamina) (BISOGNO et al., 2000; HUANG et al., 2002; PORTER et al., 2002).

Até o momento, os mecanismos de recaptação, transporte e degradação da maioria dos endocanabinóides permanecem desconhecidos. No entanto a anandamida e o 2-AG já tiveram parte destes processos elucidados e sabe-se atualmente que ambos compartilham de um mecanismo diferenciado de neurotransmissão. Ao contrário dos demais neurotransmissores, eles não são armazenados em vesículas, sendo sintetizados de acordo

com a demanda mediante o estímulo de neurônios pós-sinápticos (DI MARZO, DEUTSCH, 1998).

A anandamida é sintetizada através da hidrólise da N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NArPE), a qual é encontrada na membrana plasmática, membrana mitocondrial e no retículo endoplasmático. A reação é catalisada pela fosfolipase D, por um mecanismo dependente de Ca^{2+} (OKAMOTO et al., 2004). Mediante estímulo, é liberada do interior das células através de um transportador de membrana e na fenda sináptica atua como neurotransmissor de ação retrógrada, em terminais pré e pós-sinápticos (DI MARZO, 1994).

Ao término de sua ação, a anandamida é recaptada pelas células e transportada através de um transportador específico de anandamida sendo então hidrolisada pela ação da enzima hidrolase de amina de ácidos graxos (FAAH) (PIOMELLI, 2003).

1.7 Canabinóides e a função motora

Os primeiros estudos sobre os efeitos comportamentais do uso de *Cannabis sativa* foram realizados por Walton et al., em 1938, nos quais foram descritos efeitos motores após a exposição a extratos de *Cannabis sativa*, incluindo hipocinesia e catalepsia (WALTON et al., 1938).

Somente na década de 1990, após o mapeamento da distribuição dos receptores CB1 no cérebro tornou-se possível entender melhor os efeitos comportamentais dos canabinóides (GLASS et al., 1997).

Os efeitos motores como ataxia e catalepsia observados após administração aguda de agonistas canabinóides podem ser explicados após a observação de intensa expressão de receptores CB1 nos núcleos da base e cerebelo (HERKENHAM et al., 1991).

Os núcleos da base são um conjunto de núcleos cerebrais interligados, os quais são formados pelo estriado, globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra (pars compacta e pars reticulata). O complexo estriatal é o principal componente dos núcleos da base e inclui estruturas subcorticais distintas anatomicamente e invadidas por fibras dopaminérgicas oriundas da substância negra pars compacta e area tegmental ventral. Este

complexo é dividido em estriado ventral (núcleo acumbens) e dorsal (nucleo caudado e putâmen), sendo o último, envolvido na função motora (BORGKVIST, FISONE, 2007).

A grande maioria dos neurônios do estriado consiste em neurônios GABAérgicos espinhosos de tamanho médio (MSNs) os quais, além de aferentes dopaminérgicos recebem aferentes glutamatérgicos. A dopamina controla o estado de excitabilidade dos MSNs por modulação da transmissão glutamatérgica (MISSALE et al., 1998).

MSNs do estriado dorsal expressam elevado número de receptores CB1, e estes se encontram co-localizados com receptores dopaminérgicos (D1 e D2) (HERKENHAM et al., 1991).

Em 1999, Giufridda et al., demonstraram que em ratos, durante sua movimentação livre, a liberação de dopamina era acompanhada pela liberação de anandamida no estriado dorsal, a qual pode atuar controlando a estimulação motora mediada por dopamina. (GIUFRIDDA, 1999).

Nos anos seguintes, diversos estudos corroboraram esses efeitos relacionados à função motora através da administração de agonistas, antagonistas e antagonistas de receptores canabinóides em modelos de doença de Parkinson, doença de Huntington e discinesia induzidas por levodopa (BELTRAMO et al., 2000, GERDEMAN et al., 2002; SEGOVIA et al., 2003; GLASS et al., 2004; VAN DER STELT et al.; 2005; BÉCKER et al., 2005; KOFALVI et al., 2005; GARCÍA-ARENBICIA et al., 2007; DOWIE, et al., 2010).

No entanto, não existem dados na literatura investigando a possível participação dos receptores CB1 na discinesia orofacial induzida por antipsicóticos. Desta forma torna-se interessante elucidar possíveis mecanismos associados ao desenvolvimento de efeitos colaterais decorrentes do uso destes fármacos, como a discinesia tardia/orofacial, podendo assim futuramente direcionar o desenvolvimento de compostos com maior eficácia e reduzidos efeitos indesejados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a participação do receptor CB1 nos movimentos de mascar no vazio induzidos por haloperidol em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes doses de anandamida sobre atividade locomotora de ratos;
- Verificar o efeito da anandamida sobre os movimentos de mascar no vazio induzidos por haloperidol em ratos;
- Investigar se o SR 141716A reverte os efeitos da anandamida sobre os movimentos de mascar no vazio em ratos.

3- RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontra-se no próprio manuscrito. O **manuscrito** está disposto na forma em que foi submetido para publicação na revista Behavioral Brain Research.

3.1 – MANUSCRITO:**EFFECT OF ANADAMIDE ON VACUOUS CHEWING MOVEMENTS INDUCED
BY HALOPERIDOL IN RATS**

Jivago Röpke Rodrigues, Alcindo Busanello, Caroline Queiroz Leal, Elizete de Moraes Reis, Catiúscia Molz de Freitas, Jardel Gomes Villarinho, Fernanda Hernandes Figueira, Carlos Fernando Mello, Juliano Ferreira, Roselei Fachinetto

SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

**EFFECT OF ANADAMIDE ON VACUOUS CHEWING MOVEMENTS INDUCED
BY HALOPERIDOL IN RATS**

^aJivago Röpke Rodrigues, ^aAlcindo Busanello, ^cCaroline Queiroz Leal, ^aElizete de Moraes Reis, ^cCatiuscia Molz de Freitas, ^aJardel Gomes Villarinho, ^bFernanda Hernandes Figueira, ^aCarlos Fernando Mello, ^{a,b}Juliano Ferreira, ^{a, b}Roselei Fachinetto

^aPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

^cCurso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

Corresponding author:

Dr^a. Roselei Fachinetto

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: x21-55-220-8096

Fax: x21-55-220-8241

e-mail: roseleifachinetto@yahoo.com.br

ABSTRACT

Treatment with antipsychotic drugs may cause tardive dyskinesia in humans and orofacial dyskinesia in rodents. Although the dopaminergic system in basal ganglia has been implicated in these movement disorders, their underlying mechanisms remain unclear. In recent years, the identification of high density of CB1 cannabinoid receptors within the basal ganglia has suggested a potential role for endocannabinoids in the control of basal ganglia-related movement disorders. Thus, the present study aimed to investigate whether CB1 receptors are involved in haloperidol-induced orofacial dyskinesia in rats. Adult male rats were treated during 4 weeks with haloperidol decanoate (38 mg/kg, i.m.). The effect of anandamide (6 nmol, i.c.v.) and/or the CB1 receptor antagonist SR141716A (30 µg, i.c.v.) on haloperidol-induced vacuous chewing movements (VCMs) was assessed. Anandamide reversed haloperidol-induced VCMs. SR141716A (30 µg, i.c.v.) did not alter haloperidol-induced VCM per se, but prevented the effect of anandamide on VCM in rats. In conclusion, our results show that activation of CB1 receptor may prevent haloperidol-induced VCMs in rats, implicating cannabinoid signaling via CB1 receptor in orofacial dyskinesia.

Key words: endocannabinoids, anandamide, dopaminergic system, open field

Introduction

Antipsychotics are a class of drugs used for treatment of psychiatric disorders. Current pharmacologic evidence suggests that dopamine D2 receptor antagonism on the mesolimbic pathway is a major determinant of antipsychotic action [1]. However, antipsychotics also antagonize striatal dopamine D2 receptors at the nigrostriatal dopaminergic pathway [2, 3] which have been implicated in the development of acute and chronic involuntary motor effects, being tardive dyskinesia (TD) the most severe [4, 5]. TD is a syndrome characterized by involuntary orofacial movements, which can also affect trunk and members musculature [6]. This syndrome has clinical relevance due to its high prevalence in humans taking antipsychotic treatment and also, its persistence and irreversibility even after treatment withdrawal [7, 8, 9]. Despite of large number of studies concerning about TD, its mechanisms remain unclear, what hinders the discovery of an effective treatment. Several hypotheses have been proposed to explain the development of TD [10]. The classical hypothesis to explain TD is the development of dopaminergic supersensitivity caused by chronic use of antipsychotics [5]. According with this hypothesis, the chronic blockage of dopamine receptors by D2 antagonists can produce a compensatory increase in the number of receptors and in the sensitivity of dopaminergic receptors, culminating with a hyperdopaminergic state, which could be responsible for TD [11,13]. Besides some inconsistencies in this hypothesis, other alterations in dopaminergic system have been reported. In line with this view, it has been demonstrated that OD, a syndrome caused by antipsychotic in rodents to study mechanisms similar to TD in humans, is related to a decrease in dopamine uptake in the striatum of rats treated with haloperidol or fluphenazine [11, 12]. Accordingly, a decrease in the density of dopamine transporters in patients with TD has been recently reported [13]. Thus, it is important to investigate other neuronal alterations that could be involved in the regulation of striatal dopaminergic system.

There are evidences supporting a role for the endocannabinoid system as a modulator of the dopaminergic activity in the basal ganglia and its modulation may constitute an important component in new therapeutic approaches to the treatment of motor disturbances as Parkinson disease [14, 15, 16, 17, 18, 19]. Endocannabinoid system consists of signaling lipids and their target receptors. In this context, anandamide (N-

arachidonylethanolamine), which belongs to a class of molecules called eicosanoids, has gained attention in the literature as a neurotransmitter candidate of this system [20]. Two types of cannabinoid receptor have so far been identified. These are the CB1 receptor, cloned in 1990, and the CB2 receptor, cloned in 1993, both of which are members of the superfamily of G-protein-coupled receptors [21, 22, 59, 60]. CB1 receptor is expressed throughout the brain, and it is most prevalent in the hippocampus, striatum, cerebellum and cortex, structures that regulate learning, movement and cognition, among other behaviors [23]. The majority of the striatal CB1 receptors are located presynaptically on inhibitory GABAergic terminals, in a position to modulate neurotransmitter release and influence the activity of dopaminergic neurons in the substantia nigra [24]. Neuroanatomical studies have showed that CB1 receptors are not present on dopaminergic neurons [24, 25]. However, since CB1 and dopamine receptors are co-expressed in striatal neurons, the activation of the postsynaptic dopamine receptors by the neurotransmitter dopamine may influence, by different signaling pathways, the functionality and/or expression of CB1 receptors in striatal neurons. Giufridda and colleagues have elegantly shown that D2 receptor activation stimulates anandamide release and this response was prevented by the D2-like receptor antagonist [14]. More recently, cannabinoid agents have been proposed as promising tools for treating parkinsonism in rats [27, 28, 29] through CB1-dependent activation. Of particular importance to our study, it has been shown that deletion of CB1 receptors prevented the development of severe dyskinetic movements in mice [30].

Considering that activation or blockage of D2 receptors may alter the production of anandamide, our study aimed to investigate whether CB1 receptors modulate haloperidol-induced vacuous chewing movements, a parameter of OD, in rats.

Material and methods

Animals

Adult male Wistar rats weighing 220–270 g from our own breeding colony were kept in cages with 4 or 5 animals each, with continuous access to food and water, in a room with controlled temperature (22 ± 2 °C) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 am. The experimental procedure was previously approved by Ethical Commission of Animal Use from Federal University of Santa Maria.

Drugs

Haloperidol decanoate (Haldol[®]) was bought from Cristália (São Paulo, Brazil). Anandamide (N-arachidonylethanolamine), SR141617A and all other drugs were acquired from Sigma (St. Louis, MO).

Experimental design

Dose-response curve of anandamide on spontaneous locomotion in open field

Firstly, we chose a dose of anandamide to use in our experiments by performing a dose-response curve of anandamide on spontaneous locomotion of rats in open field test. To this experiment, control animals were submitted to stereotaxic surgery to insert a cannula into ventricle as described below. Three days after surgery recovery, rats were intracerebroventricular (i.c.v.) administered with anandamide or its vehicle (2% ethanol dissolved in 100 mM PBS buffer, pH= 7,4). Each animal received a volume of 2.5 μ L/site of vehicle or anandamide at one of these doses: 1 nmol; 3 nmol; 6 nmol; 9 nmol; 27 nmol. The number of animals was 3 per experimental group. Thirty seconds after injection, the animals were placed in an open field apparatus and the number of crossings was evaluated by a period of five minutes as previously described by [31]. To continuous our investigations we used the maximal dose that did not cause any significant effect on spontaneous locomotor activity.

Haloperidol-induced vacuous chewing movements

Initially, the animals were divided into two groups, haloperidol group received a single intramuscular (i.m.) administration of vehicle (soy oil, i.m.) or haloperidol decanoate (Haldol[®]), a slow-releasing preparation of haloperidol at a dose of 38 mg/Kg, i.m., which is equivalent to 1 mg/kg/day of unconjugated haloperidol [11]. 24 days after, the animals were submitted to stereotaxic surgery to insert a cannula into ventricle as described. Three days after surgery, the animals were placed rats were placed individually in cages (20×20×19 cm) and hand operated counters were employed to quantify VCMs frequency as previously published [11, 32, 33]. VCMs are defined as single mouth openings in the vertical plane not directed towards physical material. The behavioral parameter of OD was measured continuously for 6 min after a period of 6 min adaptation. During the observation sessions, mirrors were placed under the floor of the experimental cage to permit observation when the animal was faced away from the observer. Experimenters were always blind to treatments.

According with previously reported data, the treatment with antipsychotic drugs does not result in the development of VCMs in all treated rats [11, 34, 35]. Then, in this evaluation we excluded the animals treated with haloperidol that did not develop at least 30 VCMs and also, vehicle-treated animals with more than 30 VCMs.

Effects of anandamide on haloperidol-induced VCMs

To verify if anandamide could alter haloperidol-induced VCM in rats, on day 28th (1 day after evaluation of haloperidol-induced VCMs), animals from control and haloperidol groups were randomly subdivided in 2 experimental groups totalizing four groups: control, anadamide, haloperidol and haloperidol+anadamide groups. The number of animals was 3 to control group and 5-6 to other experimental groups. The animals received anandamide (6 nmol, i.c.v.) or its vehicle (2% ethanol dissolved in 100 mM PBS buffer, pH= 7.4, i.c.v.) and after, they were placed in cages to quantify VCMs.

I.c.v. administration of CB1 antagonist (SR141716A) in rats

To verify if CB1 receptor was involved in the effects of anandamide on haloperidol-induced VCM in rats, we conducted another set of experiments using a CB1 receptor

antagonist, SR141617A, 30 µg/2,5 µL [36] . To this, after the development of VCMs with haloperidol, control and haloperidol groups were subdivided into 4 experimental groups totalizing 8 groups: control, SR1716A, anandamide, anandamide + SR1716A, haloperidol, haloperidol + SR1716A, haloperidol + anandamide and haloperidol + SR1716A + anandamide groups. The number of animals was 3 to control group and 5-6 to other experimental groups. The animals received SR141617A (30µg, i.c.v.) or its vehicle (100 mM PBS buffer, pH= 7.4, i.c.v.) 5 min before anandamide (6 nmol, i.c.v.) or its vehicle (2% ethanol dissolved in PBS buffer, pH= 7.4, i.c.v.). After, rats were placed in cages to quantify VCMs.

Surgery

Rats were anaesthetized with a combination of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (13 mg/kg) i.p., and placed in a stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula was inserted into the right lateral ventricle (coordinates relative to bregma: AP 0 mm, ML 1.5 mm, V 2.5 mm) [37]. Ceftriaxone (500 mg/kg, i.p.) was administered immediately after the surgical procedure.

Statistical analyses

The data were analyzed by unpaired test t or one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Data were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Dose-response curve of anandamide on spontaneous locomotor activity in rats

Figure 1 shows anandamide administered i.c.v. to rats caused a significant increase ($p < 0.05$) in the number of crossings in the open field test at a doses of 9 and 27 nmol/site. However, the i.c.v. administration of anandamide at a doses of 1, 3 and 6 nmol/site did not cause significant effects on number of crossings in open field test in rats. Then, we chose the dose of 6 nmol/site to continue the experiments, since it was the greater dose tested that did not produced any per se effect on rats locomotion.

Effects of anandamide on VCMs induced by treatment with haloperidol

Haloperidol-treatment caused a marked increase on VCMs when compared with its vehicle ($p < 0.05$; Figure 2A and 2B). According with our previous data, haloperidol treatment increased VCM in 50% of animals (data not shown). Administration of anandamide was able to largely reduce the intensity of VCMs in haloperidol-injected rats ($p < 0.05$; Figure 2B). However, anandamide alone did not cause effect on VCMs in vehicle-treated rats (Figure 2 B).

Effects i.c.v. administration of CB1 antagonist (SR141716A) in rats

As previously describe, haloperidol-treatment caused a marked increase on VCMs when compared with its vehicle ($p < 0.05$; Figure 3A and 3B). Administration of anandamide was able to reduce the intensity of VCMs in rats ($p < 0.05$; Figure 3B). To investigate if the effects of anandamide were due to its binding to CB1 receptors, we injected the CB1 receptor antagonist SR 141716A prior to anandamide administration. SR 141716A completely abolished the effects of anandamide, without producing effect per se, in haloperidol-injected rats ($p < 0.05$; Figure 3B). However, neither anandamide nor SR141716A alone affect VCMs in vehicle-treated rats (Figure 3B).

Discussion

TD is a serious side effect caused by treatment with antipsychotic drugs. Particularly, it is problematic due to its high prevalence and the lack of a known mechanism which could cause TD. In rodents, this syndrome is named OD being the main observation the occurrence of VCMs after antipsychotic exposure. Our current results points to a new mechanism to VCMs development in rats which involves CB1 receptors signaling.

TD has been studied by different researchers throughout last decades concerning its mechanisms as well as possible managements [10, 13, 38, 39]. However, it is difficult to establish an efficacious treatment without understanding the mechanisms that lead to TD development. Different hypotheses have been proposed to explain TD which include the disturbed balance between dopaminergic and cholinergic systems, the dysfunction of nigrostriatal GABAergic neurons, excitotoxicity, hyperproduction of free radicals due to MAO metabolism and, the classical hypothesis related to increase in dopaminergic sensitivity [10, 40, 41, 42]. All of these present failures and inconsistencies. However, authors have some consensus among them that are the involvement of striatonigral dopaminergic pathway in the pathogenesis of TD [41, 42, 43, 44, 45, 46].

The main animal model used to study TD is antipsychotic induced OD in rodents. In this model, VCMs are important symptoms associated to OD [10, 39, 47]. Besides several hypotheses discussed in literature, alterations in dopaminergic system seems to be central to OD in rats [39, 41, 43, 44, 45, 46]. Alterations in GABAergic, cholinergic and glutamatergic system have been related in the literature as a cause or consequence of dopaminergic nigrostriatal pathway imbalance caused by antipsychotics [10, 48, 49]. Even free radical hypothesis has its origin in the increase of dopamine synthesis caused by blockage of D2 pre-synaptic receptors leading to fail in negative feedback to tyrosine hydroxylase. This event could promote an increase in MAO metabolism leading to reactive oxygen species production and consequently, neurotoxic events [41, 42, 43, 44]. Our group demonstrated that animals that develop VCMs in response to haloperidol or fluphenazine treatment present a decrease in dopamine uptake in striatum [11, 12]. Furthermore, molecules with action in specific targets in dopaminergic system as resveratrol seems to be more promissory to avoid VCM induced by antipsychotics in rats [33] than substances with GABAergic or antioxidant activity, as *Valeriana officinalis* or diphenyl diselenide [11, 12].

Of particular importance, a recent study in humans demonstrated that patients with TD present a decrease in dopamine transporter expression in striatum [13] pointing to dopaminergic system in the development of involuntary movements. Then, mechanisms which could alter dopamine release in basal ganglia deserve our special attention.

Literature data have previously showed the regulatory role of endocannabinoids on dopamine function [14, 26, 50, 51]. In 1999, Giufridda demonstrated that in freely moving rats, dopamine release is accompanied by the release of anandamide in the dorsal striatum which can act in turn to counter dopamine stimulation of motor activity [14]. Furthermore, opposite effects of anandamide in dopamine-mediated motor response were shown when the anandamide levels were increased by inhibiting its transport, which caused hypokinesia, and was reversed by administration of SR141716A [26] and when CB1 agonists and D2 family agonists were administered by local injection into individual basal ganglia nuclei [52, 53]. Because of previously demonstrated effects anandamide on locomotor activity, we performed a dose response curve of this endocannabinoid to choose a dose that does not alter locomotion in rats. Then the maximal dose tested which did not affect spontaneous locomotion was 6 nmol which was used in the experiments.

Considering the interactions between dopaminergic and cannabinoids system, endocannabinoids have been studied as a possible target to understand and treat motor disorders related to basal ganglia [14, 15, 16, 17, 18, 19]. Then, in this study, we evaluated the participation of CB1 receptor in VCMs induced by anandamide in rats. It was observed that haloperidol caused a marked increase in VCMs. The i.c.v. administration of anandamide decreases the VCMs in rats. This effect of anadamide is reversed by previous administration of SR141716A, showing the participation of CB1 receptors in VCMs induced by haloperidol in rats. Moreover, the basal ganglia, the main brain area that regulates motor behavior, express a high density of CB1 receptors [54, 55] and has elevated concentrations of endocannabinoids [56]. Although, CB1 receptors are co-expressed with D1 and D2 dopamine receptors in the striatum and their interactions are still far from being completely understood [57], it is known that CB1 and D2 receptors are coupled to $G_{\alpha i/o}$. However chronic activation of D2 receptors in striatal primary neuronal culture promotes the functional CB1 coupling to protein $G_{\alpha s}$, which results in increased levels of cAMP [58]. This interchanging of the CB1 receptor coupling to $G_{\alpha s}$ after persistent D2 receptor

activation could be the cannabinoid regulatory mode to attenuate dopamine activity. After the exposure to chronic dopamine antagonist, such as antipsychotic, this regulatory effect could be changed, and lead to the development of VCMs.

Conclusions

In conclusion, we have demonstrated that VCMs developed after acute and chronic treatment with haloperidol may be attenuated by anandamide and this effect is reversed by CB1 receptor antagonist. Our results contributed, at least in part, to explain the regulatory role of cannabinoids in orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats.

Acknowledgments

This work was supported by the PRONEM#11/2029-1 and PRONEX/FAPERGS. J.F., receive a fellowship from CNPq. J.R.R., E.M.R. and A.B. fellowship by CAPES. C.Q.L. receives a fellowship from CNPq and C.M.F. receives a fellowship from FAPERGS.

References

- [1] Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1987; 1:133-52.
- [2] Tarsy D, Baldessarini RJ. The pathophysiologic basis of tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry* 1977; 12:431-50.
- [3] Creese I, Burt D, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 1976; 192: 481-3.
- [4] Crane GE. Tardive dyskinesia in patients treated with major neuroleptics: a review of the literature. *Am J Psychiatry* 1968; 124: 40-48.
- [5] Kane JM. Tardive dyskinesia: epidemiology and clinical presentation. In: Bloom, F.E., Kupfer, D.J. (Eds.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, vol. 39. Raven Press, Ney York, pp. 1485-1495, 1995.
- [6] Egan MF, Hurd Y, Ferguson J, Bachus SE, Hamid EH, Hyde TM. Pharmacological and neurochemical differences between acute and tardive vacuous chewing movements induced by haloperidol. *Psychopharmacology* 1996; 127: 337-45.
- [7] Crane GE. Persistent dyskinesia. *Br J Psychiatry* 1973; 122: 395-405.
- [8] Jeste DV, Potki SG, Sinhá S, Feder S, Wyatt RJ. Tardive dyskinesia-reversible and persistent. *Arch Gen Psychiatry* 1979; 36: 585-90.
- [9] Casey DE. Tardive dyskinesia: reversible and irreversible. *Psychopharmacology* 1985; 2: 88-97.
- [10] Andreassen OA, Jorgensen HA. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Prog Neurobiol* 2000; 61: 525-541.

- [11] Fachinetto R, Vilarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Avila DS, Bürger ME, Calixto JB, Rocha JB, Ferreira J. Valeriana officinalis does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007a; 31:1478-86.
- [12] Fachinetto R, Vilarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Puntel RL, Paixão MW, Braga AL, Calixto JB, Rocha JB, Ferreira J. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2007b; 194:423-32.
- [13] Rizos EN, Chatziioannou S, Siafakas N, Douzenis A, Katsantoni E, Mandrapilia A, Bacalis S, Fotiadis C, Lykouras L. Increased striatal dopamine transporter levels, as indicated by a DAT scan, induced by ziprasidone in association to improvement of tardive dyskinesia - A case report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34: 1135-6.
- [14] Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 1999; 2:358 –63.
- [15] Segovia G, Mora F, Crossman AR, Brotchie JM. Effects of CB1 Cannabinoid Receptor Modulating Compounds on the Hyperkinesia Induced by High-Dose Levodopa in the Reserpine-Treated Rat Model of Parkinson's Disease *Movement Disorders* 2003; 18: 138–49.
- [16] Glass M, Van Dellen C, Blakemore C, Hannan AJ, Faull. Delayed onset of Huntington's disease in mice in a enriched environment correlates with delayed loss of Cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience* 2004; 123: 207–212.
- [17] Van der Stelt MFS, Michael Hill M, Crossman AR, Petrosinoa S, Di Marzo V, Brotchie JM. A role for endogenous cannabinoids in the generation of Parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned non human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J* 2005; 19:1140-2.

- [18] García-Arencibia M, González S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res* 2007; 1134: 162-170.
- [19] Dowie MJ, Howard ML, Nicholson LFB, Faull RLM, Hannan AJ, Glass M. Behavioural and molecular consequences of chronic cannabinoid treatment in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience* 2010; 170: 324–36.
- [20] Self DW. Anandamide: a candidate neurotransmitter heads for the big leagues. *Nat Neurosci* 1999, 2: 303-4.
- [21] Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168:299-325.
- [22] Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodríguez de Fonseca F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21:218-24.
- [23] Svíženská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90:501-11.
- [24] Julian MD, Martin AB, Cuellar B, Rodriguez De Fonseca F, Navarro M, Moratalla R, Garcia-Segura LM. Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 2003; 119:309-18.
- [25] Mátyás F, Yanovsky Y, Mackie K, Kelsch W, Misgeld U, Freund TF. Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 2006; 137:337-61.
- [26] Beltramo M, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Calignano A, Angel Gorriti M, Grammatikopoulos G, Sadile AG, Giuffrida A, Piomelli D. Reversal of Dopamine D2 Receptor Responses by an Anandamide Transport Inhibitor. *J Neurosci* 2000; 20:3401–7.

- [27] Ferrer B, Asbrock N, Kathuria S, Piomelli D, Giuffrida A. Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci* 2003; 18:1607-14.
- [28] Morgese MG, Cassano T, Cuomo V, Giuffrida A. Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB(1) and TRPV1 receptors. *Exp Neurol* 2007; 208:110-9.
- [29] Martinez A, Macheda T, Morgese MG, Trabace L, Giuffrida A. The cannabinoid agonist WIN55212-2 decreases L-DOPA-induced PKA activation and dyskinetic behavior in 6-OHDA-treated rats. *Neurosci Res* 2012; 72: 236-42.
- [30] Pérez-Rial S, García-Gutiérrez MS, Molina JA, Pérez-Nievas BG, Ledent C, Leiva C, Leza JC, Manzanares J. Increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesion and reduced development of dyskinesias in mice lacking CB1 cannabinoid receptors. *Neurobiol Aging* 2011; 32: 631-45.
- [31] Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk HJ, editor. *Experiments in personality*. London: Routledge & Kegan Paul; 1960. p. 76.
- [32] Fachinetto R, Bürger MB, Wagner C, Wondracek DC, Brito VB, Nogueira CW, Ferreira J, Rocha JBT. High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 81; 585-92: 2005.
- [33] Busanello A, Peroza LR, Wagner C, Sudati JH, Pereira RP, Prestes AL, Rocha JBT, Fachinetto R, Barbosa NBV. Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 101: 307–10.
- [34] Kane JM, Smith JM. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. *Arch Gen Psychiatry* 1982; 39: 473-81.

- [35] Shirakawa O, Tamminga CA. Basal ganglia GABA_A and dopamine D₁ binding site correlates of haloperidol-induced oral dyskinesias in rat. *Exp Neurol* 1994; 127: 62-9.
- [36] Lichtman AH, Martin BR. The selective cannabinoid antagonist SR 141716A blocks cannabinoid-induced antinociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 57: 7–12.
- [37] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (2nd ed.) Academic Press, Sydney; Orlando (1986).
- [38] Apud JA, Egan MF, Wyatt RJ. Neuroleptic withdrawal in treatment-resistant patients with schizophrenia: tardive dyskinesia is not associated with supersensitive psychosis. *Schizophr Res* 2003; 63:151-60.
- [39] Egan MF, Apud J, Wyatt RJ. Treatment of tardive dyskinesia. *Schizophr Bull* 1997; 23:583-609.
- [40] Cadet JL, Lohr JB, Jeste DV. Tardive dyskinesia and Schizophrenic burnout: the possible involvement of cytotoxic free radicals. In: Henn FA, DeLisi LE (Eds). *Handbook of schizophrenia: The neurochemistry and pharmacology of schizophrenia*. Elsevier, Amsterdam (1987) 425-438.
- [41] Lohr JB. Oxygen free radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations. *Arch Gen Psychiatry* 1991; 48: 1097-1106.
- [42] Lohr JB, Kuczenski R, Niculescu AB. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. *CNS Drugs* 2003; 17: 47-62.
- [43] Andreassen OA, Ferrante RJ, Beal MF, Jorgensen HA. Oral dyskinesias and striatal lesions in rats after long-term co-treatment with haloperidol and 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 1998; 87: 639-48.
- [44] Andreassen OA, Ferrante RJ, Aamo TO, Beal MF, Jørgensen HA. Oral dyskinesias and histopathological alterations in substantia nigra after long-term haloperidol treatment of old rats. *Neuroscience* 2003; 122:717-25.

- [45] Saldaña M, Bonastre M, Aguilar E, Marin C. Differential nigral expression of Bcl-2 protein family in chronically haloperidol and clozapine-treated rats: Role in neurotoxicity and stereotyped behavior. *Exp Neurol* 2006; 203:302-8.
- [46] Yonder KK, Hutchins GD, Morris ED, Brashear A, Wang C, Shekhar A. Dopamine transporter density in schizophrenic subjects with and without tardive dyskinesia. *Schizophr Res* 2004; 71:371-5.
- [47] Casey DE. Tardive dyskinesia: pathophysiology and animal models. *J Clin Psychiatry* 2000; 61: 5–9.
- [48] Burger ME, Fachineto R, Alves A, Callegari L, Rocha JB. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. *Brain Res* 2005; 1031:202-10.
- [49] Castro JP, Frussa-Filho R, Fukushiro DF, Silva RH, Medrano WA, Ribeiro Rde A, Abílio VC. Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. *Brain Res Bull* 2006; 68:436-41.
- [50] Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 2002; 5:446–51.
- [51] Kofalvi A, Rodrigues RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, Sperlagh B. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* 2005; 25: 2874–84.
- [52] Sañudo-Peña MC, Patrick SL, Patrick RL, Walker JM. Effects of intranigral cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system. *Neurosci Lett* 1996; 206:21–4.
- [53] Sañudo-Peña MC, Walker JM. Effects of intrapallidal cannabinoids on rotational behaviour in rats: interactions with the dopaminergic system. *Synapse* 1998; 28:27–32.

- [54] Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1992; 48: 655–68.
- [55] Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998; 83: 393–411.
- [56] Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, Brotchie JM. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 2000; 14: 1432–8.
- [57] Glass M, Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 1997; 17: 5327–33.
- [58] Jarrahian A, Watts VJ, Barker EL. D2 Dopamine Receptors Modulate G-Subunit Coupling of the CB1 Cannabinoid Receptor. *JPET* 2004; 308: 880–6.
- [59] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-4.
- [60] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-5.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1: Dose response curve of i.c.v. administration of anandamide on spontaneous locomotor activity in rats (n=3). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. *represents statistical differences from control group.

Figure 2: Anandamide effects on number of VCMs induced by haloperidol in rats. (A) Number of VCMs on 27th days after haloperidol administration. (B) Number of VCMs after anandamide (6 nmol, i.c.v) or vehicle (i.c.v.) administration on 28th days after haloperidol administration (n=3-6). Data were analyzed by test t (A) or one way-ANOVA followed by tukey post hoc test (B). *represents difference from control group and #represents differences from haloperidol group.

Figure 3: SR141716A and/or anandamide effects on number of VCMs induced by haloperidol in rats. (a) Number of VCMs on 27th days after haloperidol administration. (b) Number of VCMs after anandamide (6 nmol, i.c.v)/vehicle (i.c.v.) and/or SR141716A (30 µg, i.c.v.)/vehicle (i.c.v.) administration on 28th days after haloperidol administration (n=3-6). Data were analyzed by test t (A) or one way-ANOVA followed by tukey post hoc test (B). *represents difference from control group and #represents differences from haloperidol group.

FIGURE 1:

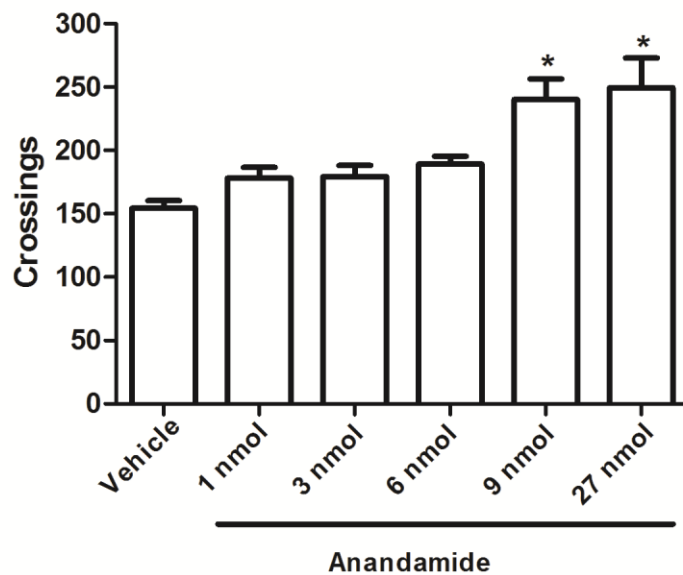


FIGURE 2:

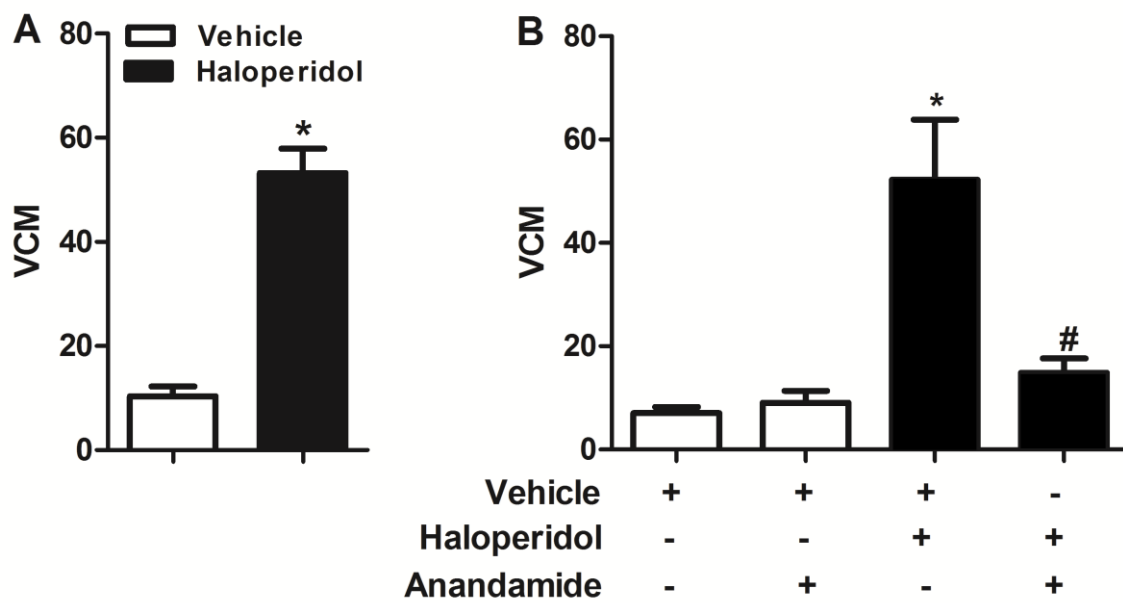
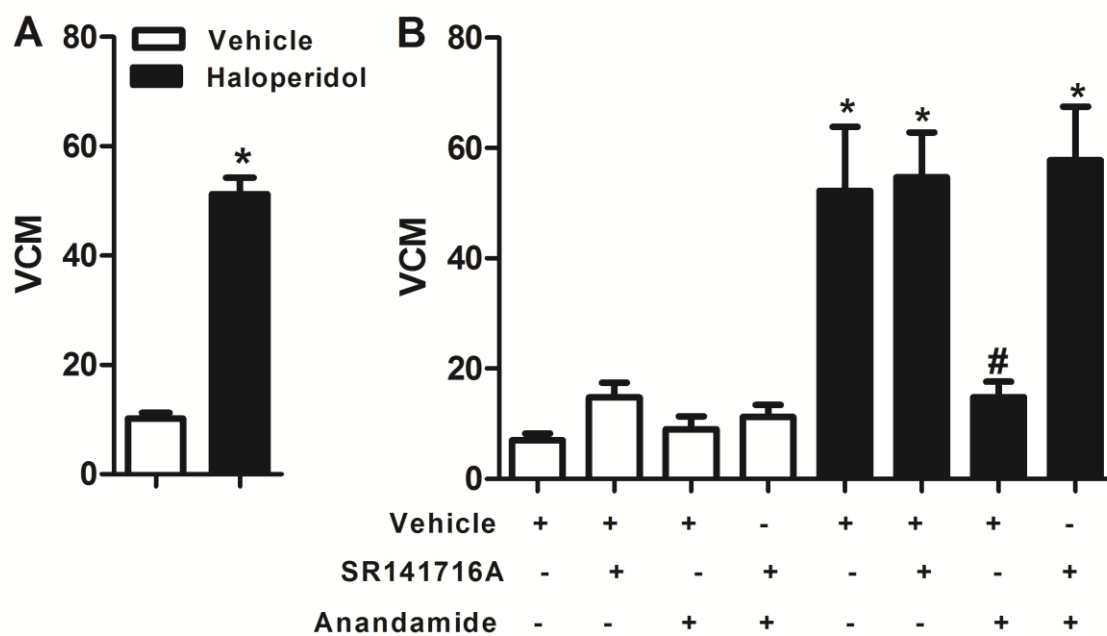


FIGURE 3:



4. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- A administração de anandamida doses igual ou superior a 9 nmol, i.c.v, aumentou a atividade locomotora em ratos;

- A administração de anandamida i.c.v., na dose de 6 nmol reduziu os movimentos de mascar no vazio induzidos por haloperidol em ratos.

- A administração de SR141716A, i.c.v., reverteu os efeitos da anandamida sobre os movimentos de mascar no vazio induzidos por haloperidol em ratos.

5. CONCLUSÃO FINAL

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que a ativação dos receptores CB1 pode reduzir os MMVs induzidos por haloperidol em ratos. Estes dados confirmam estudos prévios relacionados à regulação da função dopaminérgica por agonistas canabinóides e demonstram que uma das possíveis causas da discinesia orofacial pode ser o desequilíbrio do sistema endocanabinóide, que passa a ter sua função diminuída decorrente do crônico antagonismo dopaminérgico desencadeado pelo haloperidol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Psychiatric Association. eds. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington DC: **American Psychiatric Association**, 1994.

ANDEN, N.E. et al. Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. **Life Sciences**.3:523–530, 1964.

Anden N.E. et al., . Receptor activity and turnover of dopamine and noradrenaline after neuroleptics. **European Journal of Pharmacology** 11: 303–314, 1970

ANDERSEN, P.H. et al. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. **Trends in Pharmacological Sciences**.11:231–236, 1990

ANDREASSEN, O.A., JORGENSEN, H.A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? **Progress in Neurobiology**.61: 525-541, 2000.

BELTRAMO, M. et al. Reversal of Dopamine D2 Receptor Responses by an Anandamide Transport Inhibitor. **The Journal of Neuroscience**. 20:3401-3407, 2000.

BISOGNO, T. et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. **Biochemical Journal**. 351: 817–824, 2000.

BLANCHET, P.J. et al. Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. **Behavioral and Brain Functions**. 8:12-17 2012

BORGKVIST, A.; FISONE, G. Psychoactive drugs and regulation of the cAMP/PKA/DARPP-32 cascade in striatal medium spiny neurons. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 31:79-88, 2007.

CADET, J.L., LOHR, J.B., JESTE, D.V. Tardive dyskinesia and Schizophrenic burnout: the possible involvement of cytotoxic free radicals. In: Henn FA, DeLisi LE (Eds). Handbook of schizophrenia: The neurochemistry and pharmacology of schizophrenia. **Elsevier**, Amsterdam p.425-438, 1987.

CANCRO R.; LEHMAN H.E. Schizophrenia: clinical features, In: Sadock BJ, Sadock V.A. **Comprehensive Textbook of Psychiatry** 7th ed. Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

CARLSSON A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology** .1:179–86, 1988.

- CARLSSON A. The neurochemical circuitry of schizophrenia. **Pharmacopsychiatry**.39: 10-14, 2006.
- CARLSSON A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**.1:179–86, 1988
- CASEY, D. E. Tardive dyskinesia: pathophysiology and animal models. **Journal of Clinical Psychiatry**. 61:4: 5–9, 2000.
- CHERTOK, L. 30 years later. The story of the discovery of neuroleptics. **Annales Medico-Psychologiques**. 140:971–6, 1982
- CREESE, I.; BURT, D.H.; SNYDER, S.H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. **Science**.192: 481–483, 1976
- DI MARZO V.; DEUTSCH G.G. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. **Neurobiology of Disease**.5: 386-404, 1998.
- DI MARZO, V. et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**.372: 686–691., 1994.
- DOWIE, M.J. et al. Behavioural and molecular consequences of chronic cannabinoid treatment in Huntingt'n's disease transgenic mice.**Neuroscience**. 170:324–336, 2010.
- EGAN, M.F. et al. Pharmacological and neurochemical differences between acute and tardive vacuous chewing movements induced by haloperidol. **Psychopharmacology**.127: 337-345, 1996.
- ELLENBROEK, B.A. Treatment of schizophrenia: a clinical and preclinical evaluation of neuroleptic drugs.**Pharmacology & Therapeutics**. 57:1–78, 1993
- FACHINETTO R. et al. Valeriana officinalis does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 31:1478-86, 2007a
- FACHINETTO R. et al. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. **Psychopharmacology** (Berl) 2007b; 194:423-32.
- FERRER, B. et al. Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. **European Journal of Neuroscience**. 18:1607–1614., 2003

GARCÍA-ARENCIBIA, M. et al. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Research**. 1134, 162-170, 2007.

GARDOS, G.; COLE, J.O. The prognosis of tardive dyskinesia, **Journal of Clinical Psychiatry**. 44: 177–179, 1983.

GERDEMAN, G.L.; RONESI, J.; LOVINGER, D.M. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. **Nature Neuroscience**. 5: 446-451, 2002.

GIUFFRIDA, A. et al. D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. **Nature Neuroscience**.2:358 –363, 1999.

GLASS, M.; DRAGUNOW, M.; FAULL, R. L.; Cannabinoid receptors in the human brain: A detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. **Neuroscience**.77: 299–318, 1997.

GLASS, M. et al. Delayed onset of Huntington's disease in mice in a enriched environment correlates with delayed loss of Cannabinoid CB1 receptors. **Neuroscience**. 123: 207–212, 2004.

GOLDBERG R.J. Tardive Dyskinesia in Elderly Patients: An Update. **American Medical Directors Association**, 2003

GULLIN, O.; LARUELLE M. Neurobiology of Dopamine in Schizophrenia. **Cell science Reviews**. 2:79-107, 2005.

HENDERSON, D.C. Diabetes mellitus and other metabolic disturbances induced by atypical and antipsychotic agents. **Current diabetes Reports**. 2: 135-140, 2002.

HERKENHAM, M. et al. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. **Brain Research**: 547:267–274, 1991.

HUANG, S.M. et al. An endogenous capsaicin like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.99: 8400–8405, 2002.

KANE, J. M. Tardive dyskinesia: epidemiology and clinical presentation. In: BLOOM, F.E., KUPFER, D.J. (Eds.), **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**, vol. 39. Raven Press, New York, pp. 1485-149, 1995.

KANE J.M, SMITH J.M. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. **Archives of General Psychiatry**. v. 8139:473, 1982

- KANEDA, H. et al. Co-administration of progabide inhibits haloperidol-induced oral dyskinesias in rats. **European Journal of Pharmacology**.121, 43-49, 1992.
- KAY, S. R.; FISZBEIN, A.; OPLER, L.A. The positive and negative syndrome escale (PANSS) for schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**.13:261–269, 1987.
- KENDRICK, T. The newer, ‘atypical’ antipsychotic drugs - their development and current. **British Journal of General Practice**. 49: 745-749, 1999.
- KOFALVI, A. et al. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. **The Journal of Neuroscience**. 25: 2874-2884, 2005.
- LARUELLE, M.; KEGELES, L. S.; ABI-DARGHAM, A. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1003, 138– 158, 2003
- LEWIS D.A.; Lieberman, J.A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. **Neuron**.28:325-334, 2000.
- LOHR, J.B.; JESTED.V Neuroleptic-induced movement disorders: tardive dyskinesia and other tardive symptoms. In: Cavenar Jr, J.O. editor. **Psychiatry**. Philadelphia (PA): Lippincott, 1-17, 1998.
- MATSUDA L.A. et al. TI.Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**. 346: 561-564, 1990
- MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical. Pharmacology**. 50:83-90, 1995.
- MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**. 78:189-225, 1998
- NIEMEGEREERS, C..J. E. Pharmacology and mechanism of action of neuroleptics haloperidol and haloperidol decanoate. Workshop haloperidol decanoate. **Departament of Pharmacology, Janssen Pharmaceutics Belgium**. 1-13, 1983.
- OKAMOTO, Y. et al. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. **Journal of Biological Chemistry**.279: 5298–5305, 2004.
- PAXINOS, G., WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (2nd ed), **San Diego, Academic Press**, 1986.
- PERTWEE, R.G.Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. **Life Sciences** 76, 1307-1324, 2005.

PORTER, A.C. et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the cb1 receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 301: 1020-1024, 2002.

RIZOS E. N. et al. Increased striatal dopamine transporter levels, as indicated by a DAT scan, induced by ziprasidone in association to improvement of tardive dyskinesia - A case report. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**.2010; 34: 1135-6.

RUBINSTEIN, M. et al. Adaptative mechanisms of striatal D1 and D2 dopamine receptors in response to a prolonged reserpine treated mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 252: 810-816, 1990.

SEEMAN P, LEE T. Antipsychotic drugs: Direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. **Science**. 188: 1217-1219, 1975

SEGOVIA, G. et al. Effects of CB1 Cannabinoid Receptor Modulating Compounds on the Hyperkinesia Induced by High-Dose Levodopa in the Reserpine-Treated Rat Model of Parkinson's Disease. **Movement Disorders**.18: 138–149, 2003

SIERADZAN, K.A. et al. Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. **Neurology** 57: 2108–2111, 2001.

SOKOLOFF, P. et al. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. **CNS & Neurological Disorders- Drug Targets**. 5:25-43, 2006.

SCHMUTZ, J. et al. *Chronicles of Drug Discovery*, vol. 1. **Wiley, New York**. 39– 59, 1982.

TAMMINGA, C.A.; DALE, J.M.; GOODMAN, L.; KANEDA, H.; KANEDA, N. Neuroleptic-induced vacuous chewing movements as an animal model of tardive dyskinesia: a study in three rat strains. **Psychopharmacology**. 102: 474-478, 1990

TOUWN, M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. **Journal of Psychoactive Drugs**.13:23-34 1981.

VAN DER STELT, M.F.S, et al. A role for endogenous cannabinoids in the generation of Parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned non human primate models of Parkinson's disease. **FASEB Journal** 2005

VASQUEZ, C.; LEWIS, D.L. The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors. **The Journal of Neuroscience**.19, 9271-9280, 1999.

WEINBERGER, D.R. Implications of the normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. **Archives of General Psychiatry**.44:660-669, 1987

WORREL, J.A. et al. Atypical antipsychotic agents: A critical review. **American Journal of Health-System Pharmacy**.57: 238-258, 2000.

