



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA  
DOUTORADO EM FARMACOLOGIA**

**GERSILENE VALENTE DE OLIVEIRA**

**VITAMINAS B1, B6, B12 E COMPLEXO B NA PREVENÇÃO DA  
DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR HALOPERIDOL EM RATOS:  
AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E MECANISMOS ASSOCIADOS**

**ORIENTADORA: DANIELLE MACÊDO GASPAR**

**FORTALEZA  
2015**

**GERSILENE VALENTE DE OLIVEIRA**

**VITAMINAS B1, B6, B12 E COMPLEXO B NA PREVENÇÃO DA  
DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR HALOPERIDOL EM RATOS:  
AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E MECANISMOS ASSOCIADOS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

**Orientador: Profa. Dra. Danielle  
Macêdo Gaspar**

**FORTALEZA  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

O47v Oliveira, Gersilene Valente de.

Vitaminas B1, B6, B12 e complexo B na prevenção da discinesia orofacial induzida por haloperidol em ratos: avaliação comportamental e mecanismos associados./ Gersilene Valente de Oliveira. – 2015.

121 f.: il. color.

Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Haloperidol. 2. Clozapina. 3. Tiamina. 4. Vitamina B 12. 5. Vitamina B 6. I. Título.

---

CDD 616.399

**GERSIENE VALENTE DE OLIVEIRA**

**VITAMINAS B1, B6, B12 E COMPLEXO B NA PREVENÇÃO DA  
DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR HALOPERIDOL EM RATOS:  
AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E MECANISMOS ASSOCIADOS**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC**

---

**Profa. Dra. Roselei Fachinetto  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM**

---

**Prof. Dr. Eugenio de Moura Campos  
Universidade Federal do Ceará– UFC**

---

**Prof. Dr. José Ibiapina Siqueira Neto  
Universidade Federal do Ceará – UFC**

---

**Prof. Dr. José Eduardo Honório Ribeiro Junior  
Centro Universitário Christus- UNICHRISTUS**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **nossa senhora de Fátima** por saúde, fé, dedicação, discernimento e nunca desistir nos momentos difíceis.

Ao Meu Esposo, **Alisson Albuquerque**, pela união sincera, fidelidade, companheirismo, dedicação, determinação, força de vontade e empenho para sempre ser uma pessoa melhor e feliz. “Tenha isso e estarás sendo uma pessoa incrível”.

A minha **família** que me ajuda e me apoia em todos os momentos da minha vida.

Ao meu cachorro, **Napoleão**, pelos momentos de distração.

A Professora e Doutora **Danielle Macedo Gaspar**, pelo apoio, receptividade, disponibilidade, competência, paciência, orientações preciosas na elaboração desta tese.

A Professora e Doutora **Cléa Florenço** por ter me recebido na UFC e ter acreditado e ter me feito acreditar no meu potencial com relação à pesquisa científica.

A **Fernanda Yvelize**, por estar sempre presente quando necessito. Dizem que o autêntico valor da amizade está no difícil que é encontrá-la e mantê-la. Obrigada por tudo desde do tempo da graduação em fisioterapia.

Agradeço ao grupo de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (PDC): **Fernanda Yvelize, Patrícia Xavier, Adriana Costa e a todos do LNF** por troca de conhecimento, dedicação, compreensão e união. **Além de deixar as atividades diárias no laboratório divertidas e realização de trabalhos com competência.**

Agradeço a **Caroline Melo** pela amizade e troca de conhecimento.

Agradeço as técnicas do laboratório: **Vilani e Lena** por serem sempre solícitas.

Aos funcionários da secretária do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, pelos auxílios prestados aos alunos do Curso de Pós-Graduação.

Agradeço a **Veterinária** e ao **Biotério Central** por ter concedido os animais para se iniciar a pesquisa desse trabalho.

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, pelo auxílio e pela amizade conquistada.

E a todos quem fazem parte do Laboratório de Neurofarmacologia (LNF):

**À FUNCAP, CAPES (PROEX) e CNPq pelo apoio financeiro importantíssimo no desenvolvimento deste trabalho.**

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho  
Muito obrigada!

“Há um grande desejo em mim de sempre melhorar e  
Melhorar. É o que me faz feliz.  
E sempre que sinto que estou aprendendo menos, que a curva de aprendizado está nivelando,  
ou seja o que for, então não fico muito contente.  
E isso se aplica não só profissionalmente, como piloto, mas como pessoa”.

*AYRTON SENNA*

## RESUMO

### VITAMINAS B1, B6, B12 E COMPLEXO B NA PREVENÇÃO DA DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR HALOPERIDOL EM RATOS: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E MECANISMOS ASSOCIADOS

A Discinesia tardia (DT) é caracterizada por movimentos involuntários, principalmente na parte inferior da face, próximos da boca, com espasmos que podem ser leves ou severos. É uma alteração motora grave relacionada, mas não restrita à terapia antipsicótica. Tratamentos com antipsicóticos principalmente os da classe dos típicos, como o haloperidol (HAL) aumentam os riscos de DT. A fisiopatologia da DT é associada a um desequilíbrio em sistemas de neurotransmissão, dentre eles dopaminérgico e colinérgico, bem como com desequilíbrio oxidativo, principalmente em áreas cerebrais relacionadas ao controle do movimento, como o corpo estriado. As vitaminas (vit.) B, por sua vez, apresentam efeitos antioxidantes sendo cofatores para enzimas relacionadas à síntese de neurotransmissores. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos preventivos das vit. B1, B6, B12 ou Complexo B na discinesia orofacial (DO) induzida por HAL em ratos. Foram utilizados ratos Wistar machos tratados por via intraperitoneal com HAL (1 mg/kg, i.p.) por 21 dias ou concomitantemente com HAL e as vit. B1 (60 mg/kg), B6 (60 mg/kg) ou B12 (0,6 mg/kg) por via subcutânea, sozinhas ou em associação (complexo B). O complexo B consistiu na mistura das 3 vitaminas em iguais proporções. Um grupo de animais foi administrado clozapina (25 mg/kg), um antipsicótico atípico não relacionado ao desenvolvimento de DO. Os testes comportamentais foram realizados após 30 minutos no 1º, 7º e 21º dias de administração das fármacos e consistiram na determinação da atividade locomotora, catalepsia e movimentos de mastigação no vazio. No 21º dia os animais foram sacrificados e retiradas áreas cerebrais para as análises neuroquímicas e de expressão para tirosina hidroxilase (TH), receptores dopaminérgicos D1 e D2 e receptor muscarínico M1. Os resultados mostraram que o HAL aumentou o tempo de catalepsia no dia 7 e causou DO no dia 21. A administração das vit. B (B1: B6: B12) sozinhas ou em associação, juntamente com HAL, preveniu o desenvolvimento de DO e em menor extensão da catalepsia. O efeito preventivo das vit. B foi acompanhado por restauração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica. Além dos efeitos antioxidantes, as vit. B aumentaram a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em todas as áreas cerebrais estudadas, com o incremento máximo de atividade observada no hipocampo de animais co-tratados com vit. B12 e coquetel de vit. B. A clozapina não induziu DO e aumentou a atividade AChE semelhante para os grupos co-administrados com vit. B e HAL. A análise da expressão de receptores e enzimas relacionadas à síntese de neurotransmissores no corpo estriado por PCR-RT revelou que o HAL foi capaz de aumentar a expressão de receptores dopaminérgicos D1 e D2 e reduzir a expressão dos receptores muscarínicos M1. A expressão da tirosina hidroxilase (TH), passo limitante para a síntese de dopamina, se apresentou reduzida pelo HAL. Os dados sugerem que as vitamina do complexo B são capazes de prevenir as alterações induzidas pelo HAL apresentando, portanto, um papel promissor na prevenção de DO associada ao uso desta fármaco.

**Palavra Chave:** Discinesia tardia, haloperidol, clozapina, Vitamina B1, vitamina B6, vitamina B12, complexo B



## ABSTRACT

### **B1, B6, B12 VITAMINS AND B COMPLEX IN THE PREVENTION OF OROFACIAL DYSKINESIA INDUCED BY HALOPERIDOL IN RATS: BEHAVIORAL ASSESSMENT AND ASSOCIATED MECHANISMS**

Tardive dyskinesia (TD) is characterized by involuntary movements, mostly at lower face, near the mouth, with convulsion that can be light or hard. Is one severe disorder related, but restricted the antipsychotic therapy. Antipsychotic treatments above all the class of typical, like haloperidol (HAL) increase the risk of TD. The pathophysiology of TD is associated to a instability in neurotransmission system, such as dopaminergic and cholinergic, among others, as well as with oxidative instability mainly in brain areas related to the control of movement, as the striatum. B vitamins, in turn, show antioxidants effect and are cofactors to enzymes related to the synthesis of neurotransmitters. In this context, the present study aimed to determine the preventive effects of B1, B6, B12 vitamins or B complex against orofacial dyskinesia (OD) induced by HAL in rats. To do this male Wistar rats were intraperitoneally administered HAL (1 mg/kg, i.p.) for 21 days or concomitantly received HAL, B1 (60 mg/kg), B6 (60 mg/kg) or B12 (0,6 mg/kg) vitamin subcutaneously alone or in association. B complex consisted in the mix of 3 vitamins in equal proportions. One group of animals was administered with clozapine (25 mg/kg), an atypical antipsychotic not related to the development of OD. Behavioral tests were performed at the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of drugs administration. The behavioral tests performed were locomotor activity, catalepsy and chewing vacuous movements. At 21<sup>st</sup> day the animals were sacrificed and had their brain areas dissected for neurochemical analysis. The results showed that HAL increased catalepsy time at 7<sup>th</sup> day and OD at 21<sup>st</sup> day. Administration of B vitamins (B1:B6:B12) alone or in association, together with HAL, prevented the development of OD and in a lower extension, catalepsy. Preventive effect of B vitamins was accompanied by restoration of the levels of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation. Beyond the antioxidant effects, B vitamins increased the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in all brain areas studied, with the maximum increase of activity observed in the hippocampus of animals co-administered with B12 vitamins and B vitamins cocktail. Clozapine did not induce OD and increase in the activity of AChE. Analysis of the expression of receptors and enzymes related to the synthesis of neurotransmitters in striatum by PCR-RT revealed that HAL increased the expression of the dopaminergic receptors D1 and D2 and reduce an expression of the muscarinic receptors M1. Haloperidol decreased the expression of tyrosine hydroxylase (TH), a limiting step for the synthesis of dopamine. Taken together the results suggest that B vitamins prevented changes induced by HAL, presenting thus a promising role as a preventive approach against HAL-induced OD.

**Keywords:** tardive dyskinesia (TD), haloperidol, ciosapina, B1 vitamin, B6 vitamin, B12 vitamin, vitamin B cocktail.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Via dopaminérgica mesolímbica e antagonista de D2 .....	20
<b>Figura 2:</b> circuito da alça motora através dos gânglios da bases. Via excitatória (+) e via inibitório (-) .....	25
<b>Figura 3:</b> regulação fisiologica do movimento através da Via direta.....	26
<b>Figura 4:</b> regulação fisiologica do movimento através da Via Indireta .....	27
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática das vias de dopamina no sistema nervoso central. ....	28
<b>Figura 6:</b> Discinesia Tardia induzida por antipsicóticos .....	30
<b>Figura 7:</b> Estrutura química da tiamina ou vitamina B1. ....	36
<b>Figura 8:</b> Formas da vitamina B6 mais comuns encontradas:.....	38
<b>Figura 9:</b> Forma ativa da vitamina B6 .....	38
<b>Figura 10:</b> Reação química da cobalamina ou vitamina B12.....	40
<b>Figura 11:</b> Desenho experimental para testes comportamentais, bioquímicos e moleculares ..	48
<b>Figura 12:</b> Integração de defesa do sistema enzimático com conversão de O <sub>2</sub> em H <sub>2</sub> O e suas etapas intermediárias. ....	64
<b>Figura 13:</b> Mecanismos envolvidos na indução da peroxidação lipídica. ....	66
<b>Figura 14:</b> Movimentos de mastigação no vazio e protusão da língua em animais submetidos ao tratamento com haloperidol e vitaminas B. ....	69
<b>Figura 15:</b> Avaliação da catalepsia em ratos submetidos ao tratamento com haloperidol e vitaminas B.....	71
<b>Figura 16:</b> Avaliação dos níveis de GSH no corpo estriado em animais tratados com haloperidol e pré-tratados com vitaminas B.....	73
<b>Figura 17:</b> Avaliação dos níveis de MDA no corpo estriado em ratos tratados com haloperidol e pré-tratados com vitaminas B. ....	74
<b>Figura 18:</b> Avaliação da atividade enzimática da AChE no corpo estriado de animais tratados com vitaminas B e haloperidol ou clozapina.....	83
<b>Figura 19:</b> Avaliação da atividade enzimática da AChE no córtex pré-frontal de animais tratados com vitaminas B e haloperidol ou clozapina. ....	84
<b>Figura 20:</b> Avaliação da atividade enzimática da AChE no Hipocampo de animais tratados com vitaminas B e haloperidol ou clozapina. ....	85
<b>Figura 21:</b> Avaliação da expressão do receptor D1 no corpo estriado de animais tratados com cobalamina (vitamina B12) ou complexo B combinada ao haloperidol ou clozapina. ....	95
<b>Figura 22:</b> Avaliação da expressão do receptor D2 no corpo estriado de animais tratados com cobalamina (vitamina B12) ou complexo B combinada ao haloperidol ou clozapina. ....	96
<b>Figura 23:</b> Avaliação da expressão do receptor TH no corpo estriado de animais tratados com cobalamina (vitamina B12) ou complexo B combinada ao haloperidol ou clozapina. ....	97
<b>Figura 24:</b> Avaliação da expressão do receptor M1 no corpo estriado de animais tratados com vitamina B12 ou complexo B combinada ao haloperidol ou clozapina.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Mecanismo de ação dos antipsicóticos típicos e atípicos .....	21
<b>Tabela 2:</b> Fatores de riscos para DT .....	34
<b>Tabela 3:</b> Principais matérias utilizados nos experimentos .....	46
<b>Tabela 4:</b> Oligonucleotídeos utilizados nos estudos de expressão, constando: gene em questão, sequência dos iniciadores e o tamanho esperado. ....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>ATV</b>	Área tegmentar ventral
<b>B1</b>	Tiamina
<b>B6</b>	piridoxina
<b>B12</b>	cobalamina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CEPA</b>	Comitê de ética em pesquisa animal
<b>CPF</b>	Córtex pré-frontal
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Íon cobre
<b>D1</b>	receptor dopaminérgico tipo 1
<b>D2</b>	receptor dopaminérgico tipo 2
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Discinesia orofacial
<b>DT</b>	Discinesia tardia
<b>EO</b>	Estresse oxidativo
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>GABA</b>	Ácido gama amino butírico
<b>GMPc</b>	Monofostato cíclico de guanosina
<b>GR</b>	Glutathiona reduzida
<b>GSH</b>	Glutathiona redutase
<b>GSH-Px</b>	Glutathiona peroxidase

**GSSG** Glutathiona oxidada  
**HALO-** Haloperidol  
**H<sub>2</sub>O** Água  
**HO<sub>2</sub><sup>-</sup>** Hidroperoxila  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de hidrogênio  
**iNOS** Óxido nítrico sintase induzida  
**i.p** Intraperitoneal  
**Kg** Quilograma  
**L<sup>·</sup>** Radical lipídico  
**LO<sup>·</sup>** Radical alcoxila  
**LOO<sup>·</sup>** Radical peroxila  
**M1** receptor muscarinico  
**MMV** movimento de mastigação no vácuo  
**MDA** Malonildialdeido  
**mg** Miligrama  
**min** Minuto  
**mL** Mililitro  
**n** Número de animais  
**nACh** Acetilcolina neuronal  
**NADPH** Nicotinamina adenina de dinucleotídeo fosfato  
**NBT** Nitrotetrazolio  
**NMDA** N-metil-D-aspartato  
**NO** Óxido nítrico  
**NOS** Óxido nítrico sintase  
**O<sub>2</sub>** Oxigênio  
**O<sub>2</sub><sup>·</sup>** Radical superóxido  
**OH<sup>·</sup>** Hidroxila  
**p** Índice de significância  
**PCR-RT** reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa

**pH** Potencial hidrogeniônico

**PL** Protrusão da língua

**s.c** subcutâneo

**SNC** Sistema nervoso central

**TBARS** Ácido Tiobarbitúrico

**TH** Tirosina hidrosilase

## SUMÁRIO

<b>I.INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Circuito motor dos núcleos da base: vias direta e indireta do controle do movimento</b>	<b>23</b>
<b>1.2 As vias de dopamina no sistema nervoso central: implicações para os efeitos terapêuticos e colaterais dos antipsicóticos</b>	<b>28</b>
<b>1.3 DISCINESIA TARDIA</b>	<b>29</b>
1.3.1 Epidemiologia	30
1.3.2 Fisiopatologia da DT	31
1.3.3 Fatores de risco para Discinesia tardia (DT)	34
1.3.4 Modelo animal de Discinesia Orofacial	35
<b>1.4 VITAMINAS B</b>	<b>35</b>
<b>1.5 Justificativa e Relevância</b>	<b>41</b>
<b>II.OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
<b>3.1 MATÉRIAS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS</b>	<b>46</b>
<b>3.2 ANIMAIS</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Estratégia Experimental</b>	<b>47</b>
<b>3.4 Protocolo I – Testes Comportamentais</b>	<b>48</b>
3.4.1 Determinação da discinesia orofacial	48
3.4.2 Determinação da atividade da Catalepsia	49
<b>3.5 Protocolo II – Testes Neuroquímicos</b>	<b>49</b>
3.5.1 Dissecção das áreas cerebrais	49
<b>3.6 Avaliação do Estresse Oxidativo após administração dos antipsicóticos</b>	<b>50</b>
3.6.1 Determinação da concentração de Glutathione Reduzida (GSH)	50
3.6.2 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malondialdeído)	50
3.6.3 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	51
3.6.4 Dosagem de Proteína- Método de LOWRY	52
<b>3.7 Protocolo experimental III - Determinação da expressão de receptores dopaminérgicos tipo I (D1), tipo II (D2), (M1) e tirosina hidroxilase</b>	<b>52</b>
3.7.1 Extração de RNA	52

3.7.2	Síntese de cDNA	53
3.7.3	PCR em tempo real (qPCR)	53
<b>3.7.4</b>	<b>Primers</b>	<b>54</b>
3.7.4.1	Gene do receptor D1	54
3.7.4.2	Gene do receptor D2	55
3.7.4.3	Gene M1	56
3.7.4.4	Gene da enzima Tirosina Hidroxilase	57
3.7.4.5	Gene da Beta actina (padrão)	58
<b>3.8</b>	<b>Análise Estatística</b>	<b>59</b>
<b>IV.</b>	<b>CAPITULOS</b>	<b>60</b>
	<b>Vitaminas do complexo B atenuam a discinesia orofacial induzida por haloperidol em ratos: possível envolvimento de mecanismo antioxidante.</b>	<b>61</b>
	INTRODUÇÃO	62
	OBJETIVO	67
	RESULTADO	68
	DISCUSSÃO	75
	<b>Prevenção de alterações na atividade da acetilcolinesterase induzidas por haloperidol pela co-administração de vitamina B em modelo animal de discinesia tardia.</b>	<b>79</b>
	INTRODUÇÃO	80
	OBJETIVO	81
	RESULTADOS	82
	DISCUSSÃO	86
	<b>Investigação da expressão de RNAm dos receptores dopaminérgicos dos tipos D1 e D2, muscarínicos M1 e da tirosina hidroxilase em ratos administrados haloperidol e coadministrados com vitamina B12 e complexo B</b>	<b>91</b>
	INTRODUÇÃO	92
	OBJETIVO	94
	RESULTADO	95
	DISCUSSÃO	99
<b>V.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>100</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>103</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIA</b>	<b>105</b>
<b>VIII.</b>	<b>APÊNDICE</b>	<b>118</b>
	<b>APÊNDICE 2</b>	<b>120</b>





## **I.INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos antipsicóticos ou também chamados antipsicóticos, utilizados no tratamento da esquizofrenia, foram descobertos na década de 1950. O marco inicial na história dos antipsicóticos foi a descoberta casual dos efeitos da clorpromazina, cujo mecanismo de ação é o antagonismo de receptores da dopamina do tipo D2 na via mesolímbica. Este bloqueio está associado a uma redução do estado de hiperativação do sistema dopaminérgico associado aos estados psicóticos (SEEMAN P, 1975).

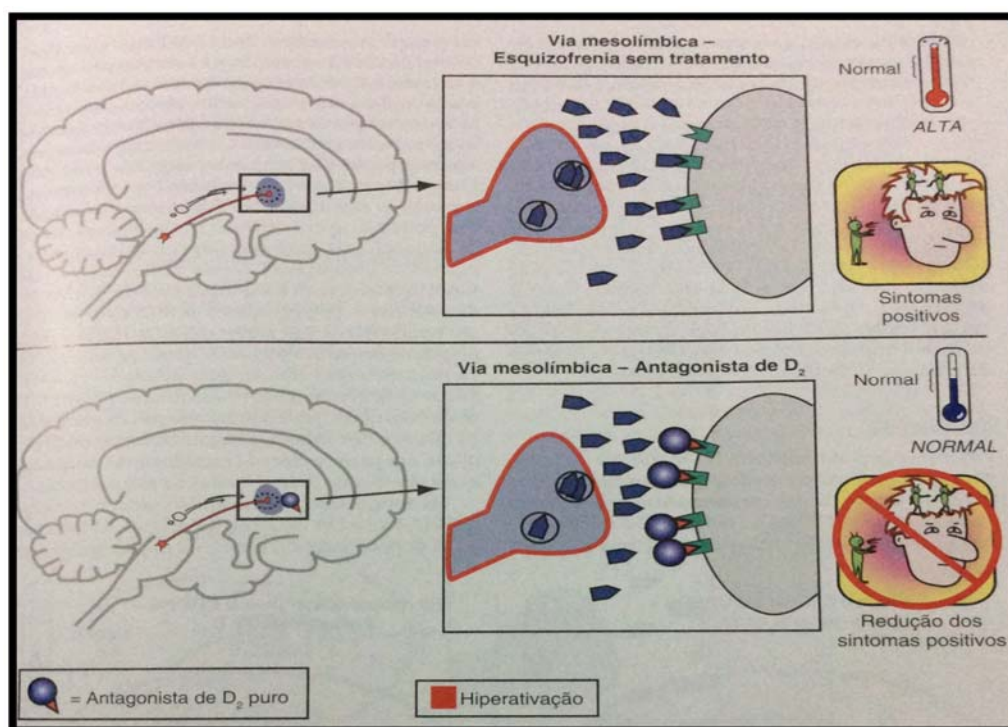
A clorpromazina é um antipsicóticos pertencente à classe química das fenotiazinas. Com poucos anos após o início de sua utilização, uma nova classe foi introduzida, a das butirofenonas, tendo como protótipo o Haloperidol (HAL). Esses fármacos foram inicialmente denominados “antipsicóticos”, curiosamente não devido aos seus efeitos terapêuticos, mas sim devido aos seus efeitos colaterais de “natureza neurológica”, os chamados efeitos extrapiramidais (KING, LAKSHMI, VORUGANTI, 2002).

Fármacos antipsicóticos têm sido bastante utilizadas para o tratamento de sintomas positivos da esquizofrenia (por exemplo, agitação, agressividade, alucinações, delírios, discurso e comportamento desorganizados, entre outros) e negativos (por exemplo, embotamento do afeto, isolamento social, falta de motivação, entre outros). Estes fármacos também são utilizados no tratamento do transtorno afetivo bipolar e doença de Alzheimer (BASCUNANA, 2000)

As ações terapêuticas dos antipsicóticos convencionais se devem, talvez ao bloqueio dos receptores D2 na via dopaminérgica especificamente na via dopaminérgica mesolímbica. Esse bloqueio tem o efeito de reduzir a hiperatividade dessa via que se acredita ser a causa dos sintomas positivos da psicose, além de bloquear os receptores mesocortical em que a DA já pode esta diminuída na esquizofrenia isso pode causar ou agravar os sintomas negativos e cognitivos, embora exista apenas baixa densidade de receptores dopaminérgicos no córtex. (BASCUNANA, 2000).

As diferentes ações terapêuticas e efeitos colaterais de antipsicóticos típicos e atípicos têm sido explicados baseados nas ações de seus receptores específicos. Antipsicóticos “típicos” (clássicos ou de primeira geração), atuam primordialmente nos sistemas dopaminérgicos, mesolímbico, mesocortical, nigroestriatal e tubérculo infundibular, que está relacionado com os efeitos colaterais. Estes fármacos são utilizados no tratamento de sintomas positivos, portanto são medicamentos eficazes para o tratamento de episódios psicóticos agudos e crônicos (como o haloperidol), que atuam preferencialmente bloqueando os receptores dopaminérgicos D2 (BASCUNANA, 2000).

**Figura 1: Via dopaminérgica mesolímbica e antagonista de D<sub>2</sub>**



Fonte: (STHAL.,2014)

Os antipsicóticos “atípicos” (recentes ou de segunda geração), são medicamentos mais bem tolerados e mais eficazes nos sintomas negativos. São fármacos que constituem a primeira opção para a tratamento do primeiro episódio psicóticos, quando há intolerância aos antipsicóticos típicos ou predominância dos sintomas negativos,

como a clozapina, substância antipsicótica com perfil farmacológico amplo, através da ação em vários sistemas de receptores. Em estudos pré-clínicos, ela demonstrou afinidade pelos receptores de serotonina 5HT2A/C, 5HT3, 5HT6; dopamina D1, D2, D3, D4, D5; muscarínicos M1-5 e histamina H1 (LIDDLE, 1993).

**Tabela 1:** Mecanismo de ação dos antipsicóticos típicos e atípicos

<b>Antipsicóticos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Autores</b>
<b>Típicos</b> <b>haloperidol)</b>	(Ex.: Bloqueio de receptores dopaminérgicos D2.	Positivo	BASCUNANA, 2000
<b>Atípicos</b> <b>clozapina)</b>	(Ex.: afinidade pelos receptores de serotonina 5HT2A/C, 5HT3, 5HT6; dopamina D1, D2, D3, D4, D5; muscarínicos M1-5 e histamina H1.	Positivo/Negativo	LIDDLE, 1993

Adaptado por, Oliveira, G.V

O haloperidol, fármaco pertencente à classe das butirofenonas, é um antipsicóticos indicado para o tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia (por exemplo, agitação, agressividade, alucinações, delírios, discurso e comportamento desorganizados, entre outros), sendo indicado para outras condições como síndrome de Tourette (MARTINDALE, 1999), tendo sido, por sua ampla ação, o antipsicóticos mais prescrito em todo o mundo (BALDESSARINI, 1996). Este medicamento possui características farmacológicas similares aos da classe dos fenotiazínicos (MARTINDALE, 1999) e apresenta-se disponível, no Brasil, com os nomes comerciais

de Haldol® e Haloperidol, nas formas de éster decanoato e sal lactato (KOROLKOVAS, 2001).

O haloperidol é completamente absorvido no trato gastrointestinal, sendo metabolizado no fígado, excretado na urina, no leite materno, nas fezes. Após administração oral, a meia-vida plasmática varia entre 12 e 38 horas, ligando-se cerca de 92% a proteínas plasmáticas. É amplamente distribuído nos tecidos e atravessa a barreira hematoencefálica (AHFS, 1999).

Apesar de ser amplamente prescrito, são descritos na literatura alguns efeitos indesejáveis, durante a farmacoterapia com este fármaco, como sedação, hipotensão, efeitos antimuscarínicos, porém os que ocorrem com maior frequência são os efeitos extrapiramidais (OLIVEIRA, 2002).

Por outro lado, a clozapina é a mais importante aquisição em terapia antipsicótica desde o advento da clorpromazina (LIEBERMAN,1994). Do ponto de vista farmacodinâmico, esta fármaco tem atividade antagonista em receptores 5-HT<sub>2A</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>4</sub>, colinérgico e histamínicos (KAHN, DAVIDSON, SIEVER,1993). O antagonismo em receptores D<sub>2</sub>, característico de antipsicóticos típicos, é menos proeminente com a clozapina (MELTZER,1998). Por ter características distintas das medicações até então disponíveis (JANNH,1995), a clozapina é considerada um antipsicótico atípico (BUCHANAM,1995). Entre essas características, podemos citar a eficácia legítima em 30-61% das psicoses refratárias às abordagens com antipsicóticos típicos (HOLFER, HUMMER, KEMMER, 2003) e a baixa incidência ou o adiamento das manifestações extrapiramidais e da discinesia tardia (DT) (KANE,1993; SACGEDEV,1995). Também se observou melhora dos sintomas negativos (anergia, anedonia, avolição, embotamento de afeto) e das funções cognitivas e sociais e redução da agressividade (LIEBERMAN,1994; BUCHANAM,1995; KANE1989; ABREU1995).

Portanto, já está bem estabelecido que a clozapina é o antipsicótico de escolha para os pacientes portadores de esquizofrenia, sendo considerado medicamento-padrão

por contar com o maior número de estudos e mostrar os melhores resultados para esta população (LINDENMAYER, 2000). Desde sua reintrodução, a clozapina foi indicada especificamente para os pacientes refratários à medicação convencional (KANE ET AL., 1988), e, embora a clozapina promova bons resultados, observa-se que 30% a 40% dos pacientes refratários não respondem também a estes antipsicóticos (TAYLOR ET AL., 2001), sendo tais pacientes denominados “respondedores incompletos” ou portadores de “esquizofrenia super-resistente a tratamento antipsicóticos” (HENNA NETO, 2001). Uma das estratégias para o tratamento destes pacientes é a associação da clozapina com outros medicamentos, proporcionando, assim, uma potencialização antipsicóticos (LIEBERMAN ET AL., 1998).

Estudos mostraram alta eficácia deste fármaco no antagonismo de outros tipos de receptores (como D1 e D4), receptores serotoninérgicos 5HT<sub>2A/C</sub>, 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>6</sub>; muscarínicos M1-5 e histamina H1, além exercer ação sobre a transmissão de glutamato no córtex cerebral (KAPCZINSKI.,2011)

Uma das estratégias para redução dos sintomas da DT é a substituição dos antipsicóticos típicos por um atípico. Fármacos como a clozapina, que bloqueiam de modo balanceado receptores D1 e D2, teriam menor propensão para causar DT. Outra vantagem farmacodinâmica da clozapina seria o bloqueio de heterorreceptores pré-sinápticos 5-HT<sub>2</sub> em neurônios dopaminérgicos nigrais, o que aumenta a liberação de dopamina na fenda sináptica por desinibição (LIDDLE, 1993).

### **1.1 Circuito motor dos núcleos da base: vias direta e indireta do controle do movimento**

Os núcleos da base têm um importante papel no movimento voluntário normal. Observações clínicas primeiramente sugeriram que estes núcleos estariam envolvidos no controle dos movimentos e na produção de alterações do movimento. De fato, o exame post mortem de pacientes com doença de Parkinson, Huntington e hemibalismo

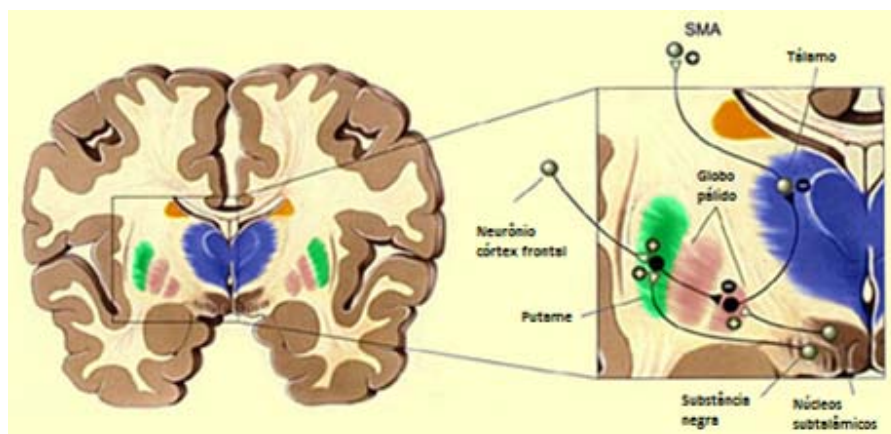
revelou alterações patológicas nestes núcleos. Estas doenças apresentam 3 características de distúrbios motores: (1) tremores e outros movimentos involuntários, (2) alterações de postura e tônus muscular, (3) lentidão dos movimentos sem paralisia. Portanto alterações nos núcleos da base podem levar a redução do movimento (Parkinson) ou movimento excessivo (Huntington e discinesias). (GUYTON E HALL,2006)

Os quatro principais núcleos do núcleo da base são: estriado, globo pálido, substância negra e núcleos subtalâmicos. O estriado por sua vez, se divide em caudado, putame e estriado ventral (que inclui o núcleo accumbens estando relacionado principalmente a modulação de aspectos emocionais). Estes núcleos estão interconectados e apresentam projeções para o córtex cerebral, tálamo e certos núcleos do tronco cerebral, sendo o estriado o maior receptor de impulsos de entrada provenientes do córtex cerebral, tálamo e tronco cerebral. Seus neurônios se projetam para o globo pálido e substância negra (Figura 2). (GUYTON E HALL,2006)

Todas as áreas do córtex enviam projeções excitatórias glutamatérgicas para porções específicas do estriado. Além disso, este núcleo recebe projeções excitatórias do tálamo, projeções dopaminérgicas do mesencéfalo e serotoninérgicas dos núcleos da rafe. Em torno de 90-95% dos tipos celulares do corpo estriado são compostos por neurônios espinhosos médios GABAérgicos de projeção. O estriado também apresenta dois tipos de interneurônios inibitórios: grandes neurônios colinérgicos e pequenas células contendo somatostatina, neuropeptídeo Y e óxido nítrico sintase (NOS). Estes interneurônios são responsáveis pela redução da atividade de neurônios levando impulsos de saída estriatais. Embora pequenos em número são responsáveis pela maioria da atividade tônica estriatal. (GUYTON E HALL,2006)



**Figura 2: circuito da alça motora através dos gânglios da bases. Via excitatória (+) e via inibitório (-)**



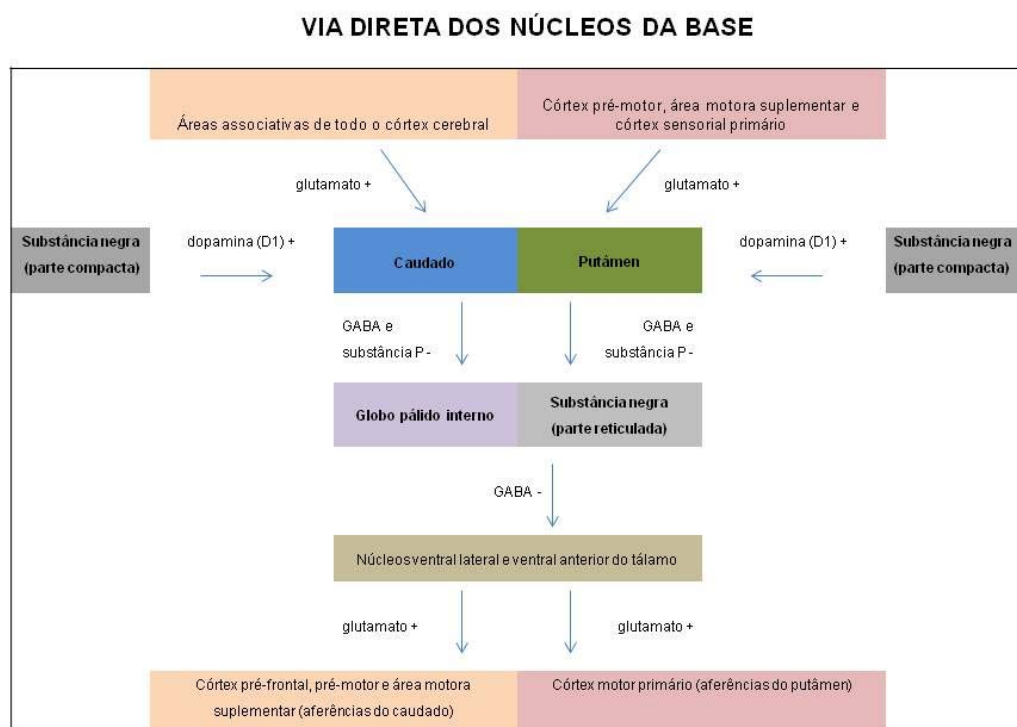
Fonte: <http://www.neurofisiologia.unifesp.br/sistmotor2.pdf>

Os dois núcleos de saída de informações dos núcleos da base são o segmento palidal interno e a substância negra pars reticulata (SNpr). Estes núcleos fazem uma inibição tônica do tálamo e do tronco encefálico. Esta saída inibitória é modulada por duas vias paralelas que se estendem dos núcleos estriatais para os dois núcleos de saída (tálamo e núcleos do tronco encefálico): Vias direta e indireta. A via indireta passa primeiramente pelo pálido externo e de lá para os núcleos subtalâmicos em vias puramente GABAérgicas. Finalmente esta via vai do núcleo subtalâmico para os núcleos de saída através de neurônios glutamatérgicos (Figura 2). Quando ocorre ativação da via direta do estriado para o pálido os neurônios tonicamente ativos do pálido são brevemente suprimidos, permitindo, então, que o tálamo e em último o córtex possam ser ativados. Em contraste, a ativação fásica da via indireta aumenta a inibição talâmica. Projeções dopaminérgicas provenientes da SNpr controlam esta via de maneira que os neurônios da via direta apresentam receptores D1 o que facilita a transmissão nesta via. Ao contrário, na via indireta receptores D2 inibem a transmissão (Figuras 3 e 4). (GUYTON E HALL, 2006)

Os distúrbios de movimento via de regra resultam de um desequilíbrio nas vias direta e indireta. De fato, o comportamento motor normal depende do equilíbrio entre as vias direta e indireta do estriado para o pálido. Movimentos hipercinéticos, como no caso

Huntington e discinesias, são caracterizadas por atividade motora excessiva. Em termos simplórios a sub-ativação da via indireta está relacionada aos distúrbios hiperkinéticos. (GUYTON E HALL,2006)

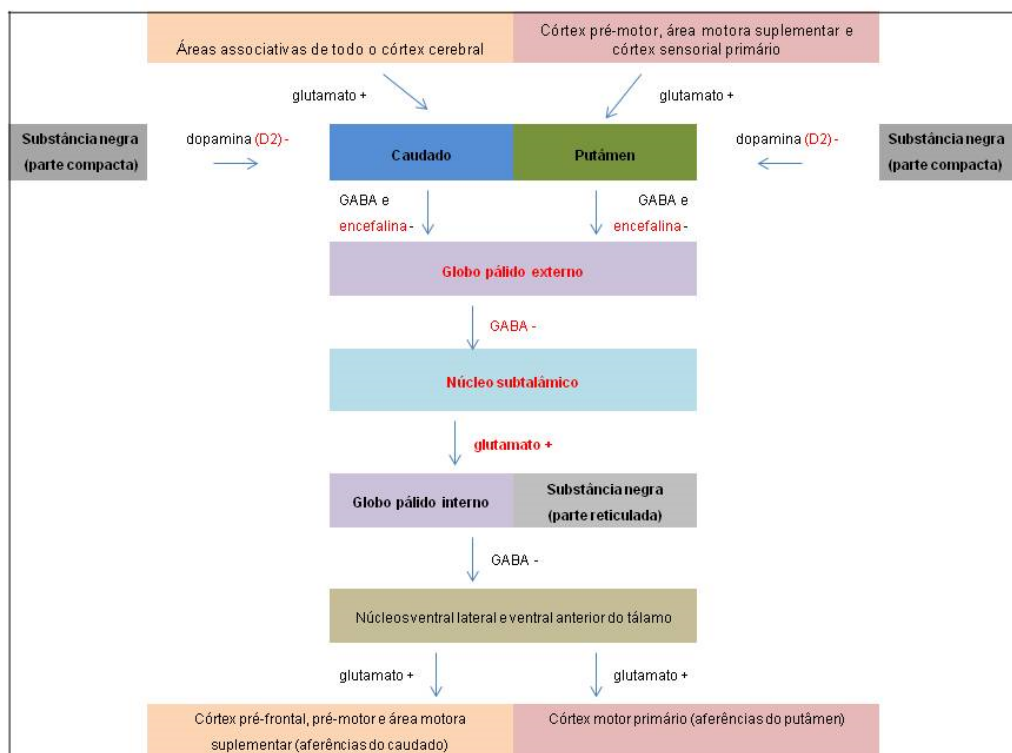
**Figura 3: regulação fisiológica do movimento através da Via direta**



Fonte: (GUYTON e HALL 1996).

**Figura 4: regulação fisiológica do movimento através da Via Indireta**

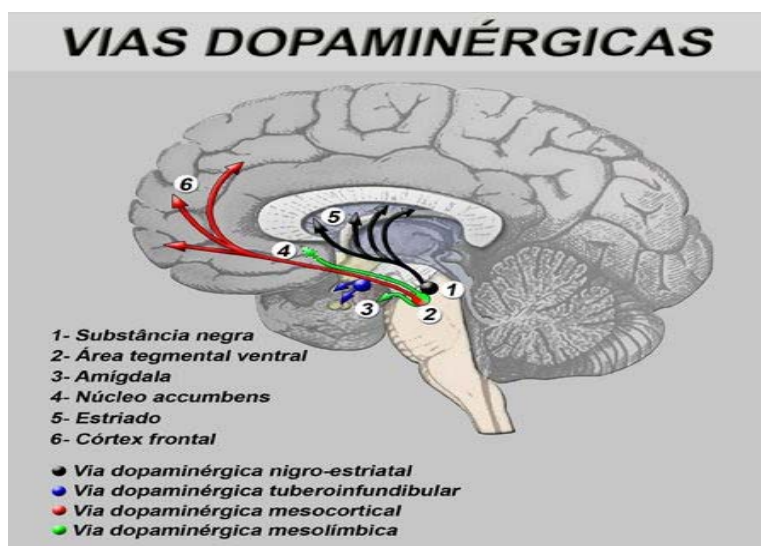
**VIA INDIRETA DOS NÚCLEOS DA BASE**



Fonte: (GUYTON E HALL 1996).

## 1.2 As vias de dopamina no sistema nervoso central: implicações para os efeitos terapêuticos e colaterais dos antipsicóticos

O antagonismo de receptores da dopamina é responsável pelo efeito terapêutico dos antipsicóticos, mas esse mecanismo também resulta em importantes efeitos colaterais extrapiramidais. A razão para tais efeitos pode ser prontamente deduzida pelo entendimento da função das vias dopaminérgicas relacionadas com controle do movimento conforme descrito na seção anterior (WISE,2005) (**Figura 5**).



**Figura 5: Representação esquemática das vias de dopamina no sistema nervoso central.**

A via meso-límbico-cortical projeta-se da área tegmental ventral para o núcleo acúmbens e para o córtex pré-frontal. A via nigroestriatal da substância negra para o estriado dorsal. Enfim, no hipotálamo, está indicada a via túbero-infundibular. Acesso: <https://www.google.com.br/search?q=vias+de+dopamina>

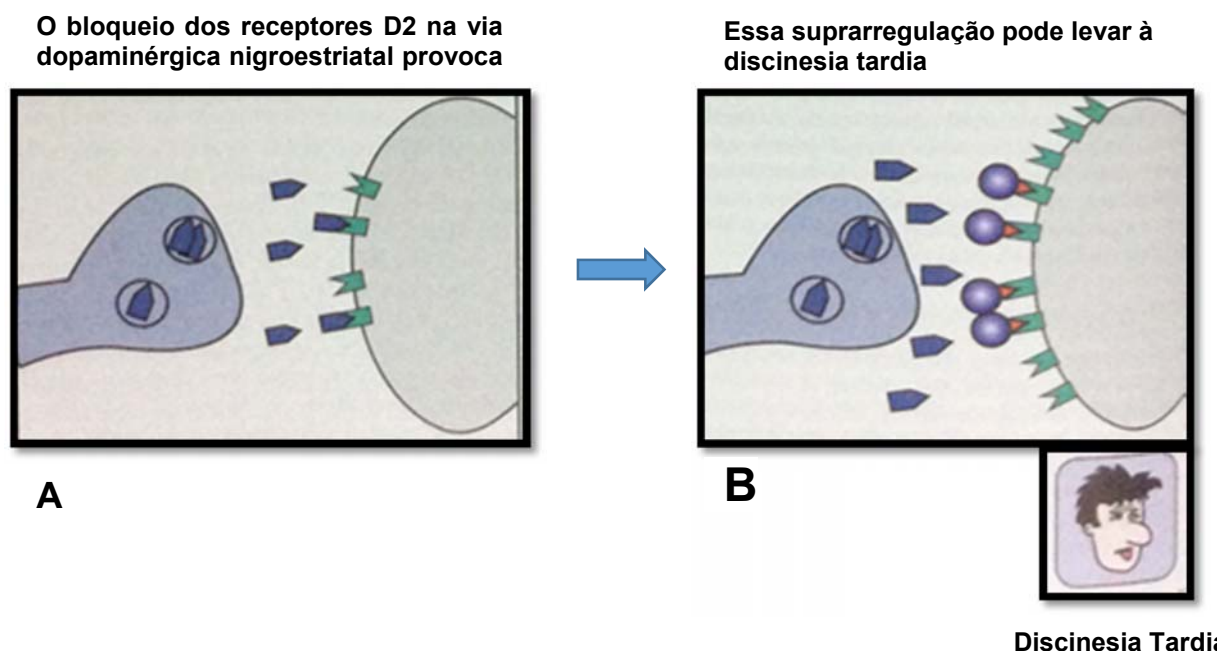
A dopamina é sintetizada por neurônios cujos corpos localizam-se no tronco cerebral e se projetam por diferentes vias. A via meso-límbico-cortical origina-se da área tegmentar ventral (ATV) e se projeta para um núcleo do estriado ventral chamado accumbens (via mesolímbica). Ela também envia projeções para o córtex pré-frontal (via mesocortical), sendo parte do chamado “feixe prosencefálico medial” (WISE, 2005).

Outra via dopaminérgica projeta-se da substância negra para o estriado dorsal (caudado-putamen, nos núcleos da base), sendo integrante do “sistema extrapiramidal” (HEIMER, 2003). Os antipsicóticos, ao antagonizarem essa via a curto prazo, induzem os efeitos colaterais chamados “efeitos extrapiramidais”, que são alterações motoras como bradicinesia e acatisia, constituindo a chamada “síndrome Parkinsoniana”. Após o tratamento prolongado, essas fármacos induzem uma nova homeostase nas neurotransmissões dopaminérgica e colinérgica envolvidas com a função dos núcleos da base causando movimentos involuntários da face e das extremidades, ou seja, a discinesia tardia (CASEY, 1994).

### **1.3 DISCINESIA TARDIA**

A DT é uma alterações neurológica relacionada principalmente ao uso prolongado de fármacos bloqueadoras de receptores dopaminérgicos centrais, nas vias dopaminérgicas nigroestriatais pode causar suprarregulação desses receptores , o que pode levar ao aparecimento de uma condição motora hiperkinética (DALE, 1950). A síndrome caracteriza-se por movimentos repetitivos, involuntários, hiperkinéticos, mais comumente afetando a região orofacial, manifestados como protusão da língua, movimento de beijar, mastigar e franzir. Essas manifestações de movimentos são usualmente denominadas na clínica de coreiformes na psiquiatria e de estereotipias na neurologia (BASSIT, 1999).

**Figura 6: Discinesia Tardia induzida por antipsicóticos**



Fonte: (STHAL.,2014)

Dada a importância desse distúrbio, nas últimas três décadas, diversos trabalhos vêm sendo realizados, a fim de estudar, a epidemiologia a fisiopatologia, os fatores de riscos e o tratamento para DT, na tentativa de tratá-las e principalmente prevenir os movimentos involuntários (BASSIT,1999).

#### 1.4 Epidemiologia

A DT acomete pelo menos 20% dos indivíduos em uso de antipsicóticos, com taxas de incidência para novos casos de aproximadamente 3 a 5% ao ano. Essa incidência parece ocorrer de maneira cumulativa e chegar a 30% entre os idosos expostos ao uso crônico de antipsicóticos (KANE,1995). Na população que usa antipsicóticos típicos, a prevalência média gira em torno de 15% a 25% para a DT.

A DT instala-se lentamente, seu curso é bastante variado e frequentemente estabiliza-se ao longo dos anos. Pode, em alguns casos, melhorar gradualmente, mesmo com o uso continuado de antipsicóticos. Quando o antipsicótico é descontinuado, estima-se que 5% a 40% dos casos em geral, e 50% a 90% dos casos leves, regridam, 30% deles em três meses e mais de 50% em 12 a 18 meses, segundo American Psychiatric Association (1994).

### **1.5 Fisiopatologia da DT**

A fisiopatologia da DT ainda é pobremente compreendida, mas acredita-se que resulte de um bloqueio crônico de receptores dopaminérgicos, particularmente receptores D2 e possivelmente D3. Os antipsicóticos típicos como o haloperidol se ligam fortemente aos receptores D2 por um longo tempo em comparação com agentes atípicos. Portanto, estes fármacos apresentam uma melhor eficácia antipsicóticos, mas uma maior propensão a causar DT do que os fármacos atípicos, os quais apresentam um menor grau de antagonismo de receptor D2, bem como uma rápida dissociação (12-24 h após uma dose única) destes receptores, o que justifica o menor risco de DT com estes fármacos (SEEMAN P, 2010). Além da dopamina, outros neurotransmissores estão envolvidos na DT, especialmente os 5HT2 que são amplamente distribuídos no estriado e acredita-se estarem envolvidos na modulação da atividade motora pela interação com a neurotransmissão dopaminérgica (SEGMAN RH, HERESCO-LEVY U, FINKEL B, ET AL, 2001). A alta atividade bloqueadora de receptores 5HT2 por antipsicóticos atípicos combinada com sua baixa ocupação de receptores D2, tem sido considerada como uma estratégia de proteção contra DT pela ausência de supra-regulação de receptores D2 observada no tratamento com estes fármacos (SEGMAN RH, HERESCO-LEVY U, FINKEL B, ET AL, 2001; GLAZER WM, 2000).

Uma das principais teorias sobre a patogênese da DT é a supra-regulação de receptores D2 pós-sinápticos com supersensibilidade destes receptores causada pelo tratamento com antipsicóticos. Esta teoria é difícil de provar, mas é reforçada pela observação comum que o aumento da dose de antagonistas de receptores

dopaminérgicos pode aliviar temporariamente os sintomas da DT, enquanto a retirada abrupta do antipsicóticos em tratamento pode exacerbar ou causar DT. Como os receptores D2 são inibitórios expressos em neurônios espinhosos médios que se projetam na via indireta, sua hipersensibilidade pode resultar em uma desinibição do globo pálido interno e núcleo subtalâmico, produzindo uma variedade de movimentos hiperkinéticos (TEO JT, EDWARDS MJ, BHATIA K, 2012). Porém, a teoria da supersensibilidade de receptores dopaminérgicos e a suprarregulação destes receptores não pode explicar o fato da DT persistir por anos e até décadas após a descontinuação dos antipsicóticos, desde que teoricamente os receptores dopaminérgicos na falta de bloqueio contínuo seria esperado reduzirem seu número devido a uma infra-regulação.

De acordo com a teoria recentemente proposta “plasticidade sináptica mal adaptada”, a hipersensibilidade de receptores D2 e alterações degenerativas de neurônios causada por aumento do estresse oxidativo pode resultar em efeitos secundários na plasticidade de sinapses glutamatérgicas em interneurônios estriatais, causando um desequilíbrio entre as vias estriatais direta e indireta e, portanto, produzindo um impulso de saída anormal para o córtex sensoriomotor (TEO JT, EDWARDS MJ, BHATIA K, 2012). A plasticidade cortical mal adaptada acoplada com o impulso de saída anormal dos núcleos da base, pode levar a formação de programas motores mal codificados e movimentos anormais.

A hipótese neurodegenerativa da DT é reforçada pela irreversibilidade dos sintomas após a descontinuação do fármaco (ELKASHEF AM, WYATT RJ, 1999). Os proponentes desta hipótese sugerem que os antipsicóticos podem aumentar a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres, levando a dano neuronal e degeneração de sistemas neurotransmissores. Modificações estruturais do cérebro, incluindo perda neuronal e gliose dos núcleos da base após exposição prolongada a antipsicóticos foram identificadas em estudos animais e em cérebros humanos posmorte (KIRIAKAKIS V, 1998). A hipótese neurodegenerativa se mistura à hipótese oxidativa. Neste contexto, o bloqueio de receptores de dopamina leva a um aumento da renovação de dopamina que está associado com aumento da formação de radicais livres pela monoamina oxidase e também pela auto-oxidação da dopamina em radicais livres



e quinonas (Elkashef AM, Wyatt RJ, 1999; Cho CH, Lee HJ., 2012). O aumento da produção de radicais livres associado a um comprometimento do sistema antioxidante foi previamente demonstrada após a administração crônica de antipsicóticos (CADET JL, PERUMAL AS ,1990).

Conforme supracitado, o metabolismo da dopamina leva a geração de espécies reativas de oxigênio, particularmente nos núcleos basais (BISHNOI et al., 2009). Este processo pró-oxidativo leva a danos aos neurônios gabaérgicos e interneurônios colinérgicos (IChs) (MILLER AND CHOUINARD, 1993). O GABA é o neurotransmissor mais encontrado nos núcleos da base e tem íntimas relações com os sistemas dopaminérgicos. Foram encontradas evidências de diminuição da atividade das vias gabaérgicas estriatais na DT. Interneurônios colinérgicos desempenham um papel central no circuito complexo que controla os movimentos voluntários (BONSI et al., 2011).

Danos no IChs têm sido implicados na fisiopatologia de várias doenças do movimento, tais como doença de Parkinson, distonia e DT (PISANI et al., 2007). Portanto, tem sido relatado que o movimento hiperkinético associado com DT reflete um desequilíbrio dopaminérgico e colinérgico com uma relativa dominação dopaminérgica, devido a uma hiperfunção dopaminérgica absoluta ou hipofunção colinérgica (TAMMINGA E WOERNER, 2002). Miller e Chouinard (1993) propuseram que DT ocorre como um resultado do dano e/ou degeneração do IChs. Em linha com essas hipóteses, vários experimentos pré-clínicos têm repetidamente reportado que células colinérgicas no estriado são perdidas ou reduzidas em quantidade, após a exposição prolongada ao haloperidol (MAHADIK *ET AL.*, 1988; JESTE *ET AL.*, 1992; GRIMM *ET AL.*, 2001). Na grande maioria dos estudos, a avaliação da função colinérgica cerebral e sua relação com a DT está baseada em danos morfológicos (imuno-histoquímica para acetilcolinesterase (AChE) (enzima responsável pela síntese de acetilcolina) (GRIMM *ET AL.*, 2001) ou bioquímicos (atividade enzimática de ChAT ou AChE).

A DT é também associada a um desequilíbrio entre D1 e D2 nos gânglios basais (TAMMINGA E WOERNER 2002). Estudos anteriores mostraram IChs que expressam D1- D5 como subtipos de receptores estriatais (YAN E SURMEIER., 1997), são

principalmente somatodendríticos e despolarizam a célula (promovendo a abertura não seletiva de canais de cátions e o fechamento de canais de K<sup>+</sup>), assim aumentando liberação ACh, enquanto que a ativação de receptor D2 diminui a neurotransmissão colinérgica (YAN ETAL., 1997).

### 1.5.1 Fatores de risco para Discinesia tardia (DT)

Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da DT são: idade avançada, sexo feminino quando acima de 65 anos, fatores genéticos possivelmente ligados ao metabolismo de fármacos, ingestão de álcool e o uso de fármacos ilícitas e lícitas (fumo). Além destes fatores doença como: *diabetes mellitus*, os transtornos de humor e mentais orgânicos, a presença de alterações neurológicas ou estruturais. A presença de sintomas extrapiramidais agudos é um forte preditor de risco. O tratamento intermitente com antipsicóticos típicos parece aumentar o risco de DT (BASSIT,1999)

**Tabela 2:** Fatores de riscos para DT

<b>Fatores de risco:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>✓ idade avançada;</li><li>✓ sexo feminino quando acima de 65 anos;</li><li>✓ fatores genéticos possivelmente ligados ao metabolismo de fármacos;</li><li>✓ ingestão de álcool; o uso de fármacos ilícitas e lícitas (fumo);</li><li>✓ doença como: <i>diabetes mellitus</i>; os transtornos de humor e mentais orgânicos; a presença de alterações neurológicas ou estruturais e, dentre os quadros esquizofrênicos, aqueles com predomínio de sintomas negativos;</li><li>✓ Presença de sintomas extrapiramidais agudos (forte preditor de risco);</li><li>✓ O tratamento intermitente com antipsicóticos típicos parece aumentar o risco de DT.</li></ul>

Adaptado por, Oliveira, G.V.

Segundo Bassit e Louzã (1999), o emprego de eletroconvulsoterapia não predispõe à DT, ao contrário do que alguns estudos da década de 60 indicavam, eles também estudaram que embora alguns autores tenham sugerido um papel para os anticolinérgicos como fator de risco para DT, a maioria dos estudos encontraram ausência de relação causal. Estudos realizados por Ghandirian e colaboradores em 1996, mostraram que o uso de lítio com antipsicóticos aumenta o risco de DT.

### **1.5.2 Modelo animal de Discinesia Orofacial**

Com o intuito de estudar os mecanismos relacionados à fisiopatologia da DT em humanos foram criados modelos animais para esta finalidade. Estes modelos, portanto, devem apresentar algumas características semelhantes à DT, por exemplo, serem induzidos pela administração prolongada de antipsicóticos. O modelo que tem sido utilizado para investigar a fisiopatologia e possíveis tratamentos para DT é o modelo de indução de MMV em roedores pela administração repetida de haloperidol por 21 dias, ou seja, um modelo de discinesia orofacial (DO). Esses movimentos desenvolvem-se gradualmente durante o tratamento prolongado ou agudo com antipsicóticos que assemelham-se aos movimentos orais da DT, caracterizados por rápidas depressões da mandíbula que lembram a mastigação, mas não são desencadeados por estímulos. Podem ser modelos devido a validade de face (sintomas lembram os humanos) e de construto (ocorre após o tratamento crônico com antipsicóticos) (NAIDU et al., 2003).

## **1.6 VITAMINAS B**

As vitaminas B são substâncias orgânicas que exercem funções em diferentes processos metabólicos. Consistem em: tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido

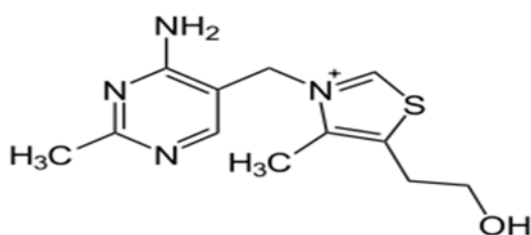
pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), ácido fólico (B9) cianocobalamina (B12). O ácido para-amino-benzóico (PABA) às vezes também é incluído neste grupo (MAHFOUZ et al., 2009). No presente estudo abordaremos apenas três: B1, B6 e B12.

Apesar de possuírem estruturas químicas diferentes e atividades biológicas diversas, essas vitaminas foram agrupadas em um único complexo por terem sido isoladas inicialmente da mesma fonte, leveduras e fígado. Por serem substâncias hidrossolúveis as vitaminas do complexo B não são armazenadas em quantidades consideráveis no organismo e devem ser ingeridas diariamente (SHEU et al., 1998).

O metabolismo destas substâncias está interligado, o que pode explicar a deficiência de mais de uma vitamina do complexo B no mesmo paciente.

Historicamente em 1961, McCollum e Kennedy isolaram do farelo de arroz um composto nomeado de vitamina B, que era capaz de combater o beribéri. Esta atividade antiberibéri encontra-se na fração termolábil do extrato do farelo de arroz, que foi denominada vitamina B1 ou Tiamina.

A Tiamina é composta quimicamente por uma pirimidina substituída e um componente tiazol (SHEU et al., 1998)



**Figura 7: Estrutura química da tiamina ou vitamina B1.**

Fonte: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/vitaminashidro.pdf>

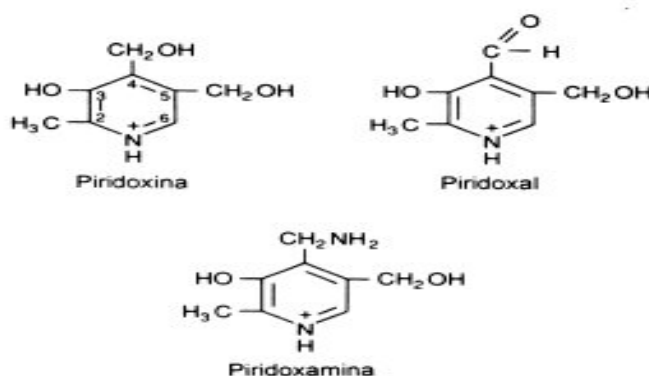
A Tiamina, apresenta ação anti-neurítica e é fundamental para o metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras, pois em combinação com o fósforo forma a coenzima tiaminapirifosfato (TPP) que participa da reação de descarboxilação do piruvato a acetato e acetil CoA, substância doadora de energia no ciclo de Krebs. A TPP também participa da descarboxilação de outros alfa – cetoácidos derivados de aminoácidos. A

redução da atividade desta enzima, resultante da deficiência da vitamina, compromete não só o metabolismo energético, mas também a síntese de ácidos nucléicos, neurotransmissores (GABA, acetilcolina e aspartato), proteínas e mielina.

As reservas corporais de tiamina concentram-se na musculatura cardíaca e esquelética, fígado, rins e Sistema Nervoso Central. A deficiência desta vitamina acarreta sintomas como: fadiga, depressão, anorexia e instabilidade emocional em casos iniciais (ou crônicos) e na forma aguda levam à confusão mental, incoordenação motora e paralisia de nervo ocular. Podem aparecer também sintomas gastrointestinais e insuficiência cardíaca (SHEU et al.,1998)

A deficiência grave pode causar alterações neuropsiquiátricas como as síndromes de Wernicke-Kosakoff (encefalopatia alcoólica), tendo como sinais e sintomas confusão mental, distúrbios oculomotores e ataxia. O quadro pode evoluir para a psicose de Kosakoff que tem como principal característica o quadro de amnésia, onde a memória imediata está intacta, mas a memória de curto prazo está comprometida, assim como alterações cardiovasculares ocorrem habitualmente como taquicardia, hipotensão postural e anormalidades eletrocardiográficas, que resolvem após a administração de tiamina (SHEU et al.,1998).

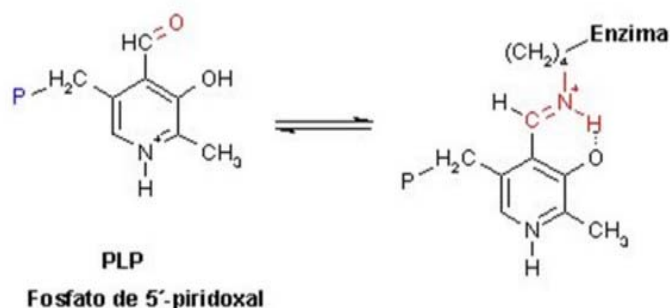
A vitamina B6 ou piridoxina foi isolada em 1930. Há tradicionalmente três formas dessa vitamina (piridoxina, piridoxal e piridoxamina). O que as diferencia é a natureza do grupo funcional ligado ao anel. A forma ativa, o piridoxal-5-fosfato (PLP), é formada pela fosforilação da piridoxina. As três formas da vitamina B6, a piridoxina (que ocorre primariamente em plantas) e o piridoxal e a piridoxamina (encontrados em alimentos de origem animal) podem servir como precursores do piridoxal-5-fosfato (MAHFOUZ et al., 2009).



**Figura 8: Formas da vitamina B6 mais comuns encontradas:**

Fonte: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/vitaminashidro.pdf>

A coenzima que contém um aldeído, o fosfato de piridoxal (PLP), é a forma ativa da vitamina B6. Para transportar o grupo amino, as enzimas aminotransferases requerem a participação da PLP. As vitaminas B2 e B3 são necessárias para a conversão das diferentes formas da vitamina B6 (MAHFOUZ et al., 2009).



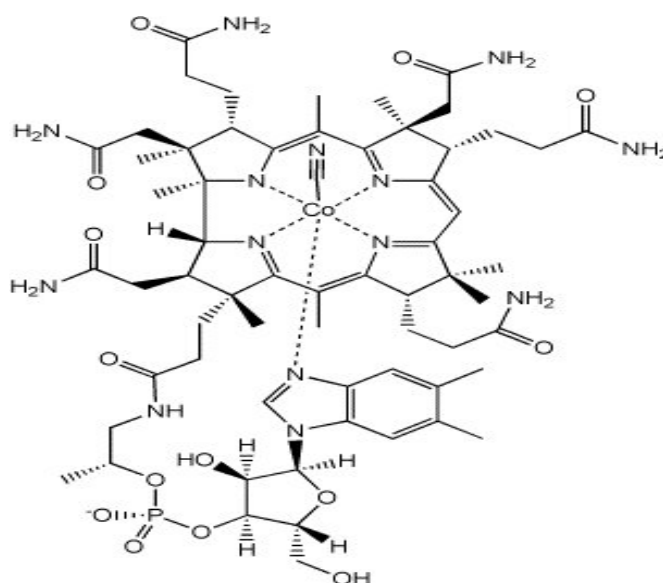
**Figura 9: Forma ativa da vitamina B6**

Fonte: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/vitaminashidro.pdf>

A importância da vitamina B6 está na sua participação como coenzima em reações enzimáticas chaves dentro do organismo que engloba desde o metabolismo da metionina, envolvido na via da metilação que quando alterada pode levar a problemas desde má formação (por exemplo, fechamento incompleto do tubo neural) até acúmulo de uma substância altamente inflamatória como a homocisteína cujos trabalhos vem

mostrando seu envolvimento na gênese da formação de placas ateroscleróticas, no processo inflamatório cerebral existente na Doença de Alzheimer, no metabolismo do triptofano, precursor da serotonina (esta vitamina age como cofactor da enzima quinurinaase que degrada o triptofano), no metabolismo do glutamato, principal neurotransmissor excitatório, na atuação junto à enzima ácido glutâmico descarboxilase que converte glutamato em GABA (ácido gama-aminobutírico), principal neurotransmissor inibitório, participando, portanto, em reações a nível cerebral que regulam o funcionamento do cérebro e, por conseguinte, podem gerar alterações no comportamento humano (MAHFOUZ et al., 2009)

A cobalamina ou vitamina B12 se refere a um grupo de compostos nos quais o íon cobalto está presente. As ligações do cobalto são com o nitrogênio do 5,6-dimetilbenzimidazol e com o cianeto nas preparações comerciais da vitamina na forma cianocobalamina. As formas de coenzima da cobalamina são a 5'-deoxiadenosilcobalamina, no qual o cianeto é substituído pela 5'-deoxiadenosina (formando uma ligação incomum carbono-cobalto), e a metilcobalamina, na qual o cianeto é substituído por um grupo metila (KARAKULA et al., 2009).



**Figura 10: Reação química da cobalamina ou vitamina B12.**

Fonte: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/vitaminashidro.pdf>

A vitamina B12 participa do metabolismo do aminoácido metionina e do ácido fólico, bem como da síntese de ácidos nucleicos sendo necessária para a mobilização (oxidação) de lipídeos e para a manutenção da reserva energética dos músculos. Sua participação na síntese de ácidos nucleicos faz com que sua deficiência prejudique a mitose, e portanto, afete marcadamente os tecidos que necessitam de uma alta taxa de renovação celular, como o tecido hematopoiético. Desta forma a anemia megaloblástica é um dos sinais de deficiência de cobalamina. A deficiência de vitamina B12 leva à anemia perniciosa (por ausência de fator intrínseco) ou megaloblástica. Podem aparecer sintomas neurológicos associados, posteriores aos sinais e anemia, tais como, perda da memória, parestesias, diminuição da sensibilidade em membros inferiores e em casos avançados, desmielinização de neurônios da medula espinal. Sintomas gerais como anorexia e perda do apetite, além de diarreia e manifestações dermatológicas também são comuns. Os sintomas relacionados à anemia respondem melhor à suplementação de vitamina B12 do que os neurológicos (KARAKULA et al., 2009)



Estudo realizados por Sheu em 1998 com ratos observou que a deficiência de tiamina reduz a atividade de enzimas dependentes de tiamina. No entanto, pesquisas realizadas em roedores com a administração de vitamina B6 mostraram atividade antioxidante, em células endoteliais expostas a 0,5 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mahfouz, 2009). Tal efeito também foi observado no fígado de rato e coração (Cabrini em 1998). A forma ativa da vitamina B6, Piridoxal 5-fosfato, funciona como uma coenzima em todas as reações de transaminação e descarboxilação, tais como a conversão de L-3,4-dihydroxyphenylalanine de dopamina e de glutamato para o GABA (Sorolla, 2010).

A deficiência de vitamina B12 em animais roedores levou a um aumento dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e lesões vasculares no endotélio assim como estresse oxidativo (Karakula, 2009).

## **1.7 Justificativa e Relevância**

Apesar do advento dos antipsicóticos típicos como o haloperidol são estratégias terapêuticas eficazes para o tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia, bem como nos casos refratários da doença. Estes fármacos são baratos, mas seu uso se torna comprometido pela manifestação de efeitos colaterais como o Parkinsonismo e DT.

A DT é via de regra induzida por antipsicóticos sendo uma condição permanente em 30 a 50% dos pacientes que cessam a medicação (KANE., 1994). As primeiras descrições da síndrome faziam referência a movimentos involuntários e persistentes do tipo abrir e fechar a boca, mastigar, sugar e lambe os lábios. Mais tarde o quadro clínico foi ampliado, com a inclusão de movimentos coreo-atetósicos de dedos, mãos e pés, além de hipercinesias axiais no diafragma, acompanhadas de grunhidos e dificuldade respiratória. Em relação aos lábios foram descritos ainda movimentos de franzir e beijar ( KANE., 1994).

Neste contexto, as vitaminas do complexo B podem se tornar eficientes coadjuvantes nas terapias com antipsicóticos típicos, além de minimizarem os efeitos adversos extrapiramidais como a DO são de baixo custo e fácil acesso à população o que pode permitir sua inserção na lista básica de medicações, sendo, portanto de utilidade para o Sistema Único de Saúde. Portanto, o uso concomitante de vitaminas B com antipsicóticos como o haloperidol acarretará possivelmente em um baixo custo para o tratamento da esquizofrenia.

## **II.OBJETIVOS**

---

## II. OBJETIVOS

### Central

Os objetivos deste trabalho foi avaliar os efeitos preventivos das vitaminas B1, B6, B12 e complexo B na DO induzida por haloperidol em ratos: avaliação comportamental e mecanismo associado.

### Específicos:

Para facilitar a leitura e compreensão do estudo neste trabalho os objetivos específicos foram dividido em capítulos listados a seguir:

#### CAPITULO 1:

- ✓ Estudar as Vitaminas do complexo B que atenuam a discinesia orofacial induzida por haloperidol em ratos: possível envolvimento de mecanismo antioxidante.

#### CAPITULO 2:

- ✓ Prevenir as alterações na atividade da acetilcolinesterase induzidas por haloperidol pela co-administração de vitamina B em modelo animal de discinesia tardia

#### CAPITULO 3:

- ✓ Investigar a expressão de RNAm dos receptores dopaminérgicos dos tipos D1 e D2, muscarínicos M1 e da tirosina hidroxilase em ratos administrados haloperidol e coadministrados com vitamina B12 e complexo B

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

### 3.1 MATÉRIAS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

**Tabela 3:** Principais matérias utilizados nos experimentos

MATERIAL	MARCA/ MODELO
✓ <b>Balança analítica</b>	Modelo H5, Mettler, Suíça
✓ <b>Centrífuga refrigerada</b>	Modelo Marathon 26KMR, Fisher scientific
✓ <b>Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro</b>	Sarstedt, Alemanha Oriental
✓ <b>Espectrofotômetro</b>	Modelo Beckman Du 640b, Fullerton, CA, USA
✓ <b>Estufa para secagem</b>	Modelo 315 SEFANEM, SP, Brasil
✓ <b>Freezer -70 ° C</b>	Modelo ULT2586-3D14, Revco Scientific, Inc Asheville, N.C., USA
✓ <b>Homogeneizador manual</b>	Bellico, USA
✓ <b>Medidor de PH, modelo B374</b>	Micronal, SP, Brasil
✓ <b>Espectrofotômetro extração</b>	NanoDrop®
✓ <b>Termociclador iQ5</b>	BioRad®


### 3.2 ANIMAIS

Foram utilizados aproximadamente 160 ratos Wistar, machos (180-200g). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos a um ciclo claro/escuro de 12 h e ambientados em grupos de 6 animais por caixa com livre acesso a ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*. O peso dos animais foi monitorado diariamente. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa animal (CEPA) da UFC sob o número 29/2014 e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América.

### 3.3 Estratégia Experimental

No presente trabalho os animais foram tratados com haloperidol por 21 dias para indução da DO. O comportamento dos animais foi avaliado no 7º dia de tratamento para avaliação da catalepsia, comportamento relacionado ao Parkinsonismo decorrente do bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2. Após 21 dias a DO foi avaliada. O protocolo de prevenção envolveu a administração de vitaminas B sozinhas ou em associação administradas 30 min antes do haloperidol desde o primeiro dia de tratamento. Um grupo de animais recebeu o antipsicóticos atípico clozapina 25 mg/kg. Os animais controle receberam solução fisiológica por via intraperitoneal. As medicações foram preparadas a partir de comprimidos ou ampolas existentes no mercado.

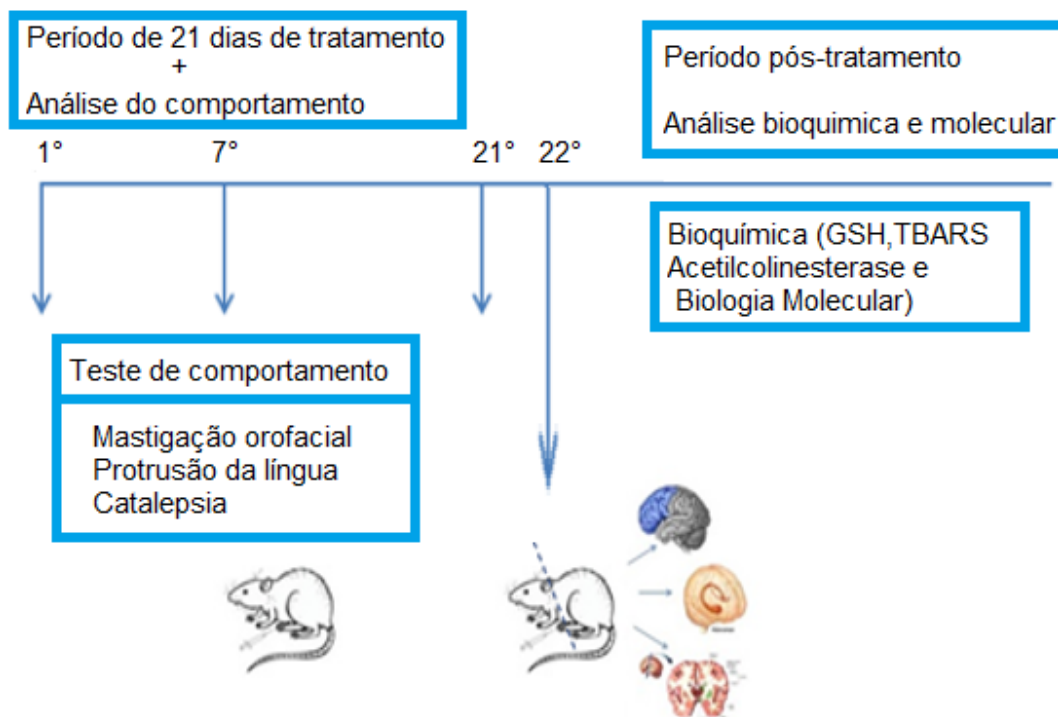
Os animais foram divididos em seis grupos, a saber:

<p><b>Grupos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Salina (0,1ml por 100g, i.p.);</li> <li>✓ Haloperidol (1 mg/kg, i.p.);</li> <li>✓ B1 (60mg/kg, s.c) + haloperidol (1 mg/kg, i.p);</li> <li>✓ B6 (60 mg/kg, s.c) + haloperidol (1 mg/kg, i.p);</li> <li>✓ B12 (0,6 mg/kg, s.c) + haloperidol (1 mg/kg, ip);</li> <li>✓ <u>Complexo vitamínico B1; B6; B12</u> (60mg/kg; 60mg/kg; 0,6mg/kg s.c) + haloperidol (1mg/kg i.p);</li> <li>✓ *Clozapina (25 mg/kg, i.p).</li> </ul> <p>✓ *Somente para avaliação da variável biologia molecular e <u>acetilcolinesterase</u> foram <u>acrescentado</u> ao grupo em questão, Clozapina 25mg/kg</p>	 <p>As administrações das medicações em associações foram feitas respeitando um intervalo de 30 min</p>
--	--

Os testes comportamentais foram realizados 30 minutos após o 1º, 7º e 21º dias de administração das fármacos. Após o 21º os animais foram sacrificados e retiradas suas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo da base), para análise

bioquímica. A avaliação da expressão do RNAm para da tirosina hidroxilase e dos receptores D1, D2, M1 foi realizada nos núcleos da base.

**Figura 11: Desenho experimental para testes comportamentais, bioquímicos e moleculares**



### 3.4 Protocolo I – Testes Comportamentais

#### 3.4.1 Determinação da discinesia orofacial

Os animais foram colocados em uma arena 50 x 50 x 50 cm com espelhos na base e nas laterais. Assim, o observador tem maior ângulo de visualização. Os animais foram avaliados individualmente, avaliando o número de mastigações vazias, protrusões da língua.

No presente estudo, movimento de mastigação no vazio (MMV) se refere a aberturas no plano vertical, não voltada para material físico. A protrusão da língua (PL) se refere ao comportamento estereotipado da língua com saliências (captura da mosca



pela língua). A contagem foi interrompida sempre que o rato iniciava o *grooming* (NAIDU et al., 2003).

### **3.4.2 Determinação da atividade da Catalepsia**

Neste teste, os membros anteriores do animal foram apoiados em uma barra rígida com 2 cm de espessura e 15 cm de altura. Os animais foram inicialmente habituados nessa barra durante 30 segundos e posteriormente medido o tempo em que eles permanecem imóveis com os membros anteriores sobre a barra. O tempo máximo de observação foram de 150s. O estado cataléptico foi considerado positivo quando o animal permaneceu imóvel na barra por um tempo maior ou igual a 60 segundos, sendo determinada, tendência à catalepsia se os mesmos apresentarem tempos estatisticamente superiores aos dos animais controles (AHLENIUS & HILLEGART, 1986).

## **3.5 Protocolo II – Testes Neuroquímicos**

### **3.5.1 Dissecação das áreas cerebrais**

Imediatamente após os ensaios comportamentais os animais foram sacrificados por decapitação, os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo. O córtex foi divulsionado e rebatido para os lados, expondo parte do corpo estriado. O hipocampo e corpo estriado (caudado, putamen e núcleo acumbens) foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento.

Após a retirada do corpo estriado (CE) o rebatimento do córtex foi desfeito e removida em sua porção superior e mediana, uma extensão em torno de 3-5 mm, tendo como limite posterior um plano imaginário que dividia o cérebro em partes iguais,

anterior e posterior. A porção cortical assim retirada corresponde a área motora do córtex fronto-parietal (ZILLES; WREE, 1985). Além da porção superior e mediana foi dissecada a região mais anterior do frontal (córtex pré-frontal).

Terminada a dissecação, cada área (córtex pré frontal, hipocampo, corpo estriado) foi colocada em papel alumínio devidamente identificada, pesada e conservada em freezer para uso posterior de 150s.

### **3.6 Avaliação do Estresse Oxidativo após administração dos antipsicóticos**

#### **3.6.1 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)**

Foram retirados 400µL do sobrenadante e adicionados a 320µL de água destilada e mais 80µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida foi recolhido 400µL do sobrenadante e acrescidos 800µL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20µl de DTNB 0,01M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412nm através de leitor de placas. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão. (SEDLAK E HANUS, 1982 )

#### **3.6.2 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malondialdeído)**

A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade de radicais livres do oxigênio. O método mais empregado para a determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar uma solução de cor rosa, que tem absorvância máxima em pH ácido em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste cromóforo num comprimento de onda de 535 nm e pH 1,0 é de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

Para a realização dos experimentos as áreas cerebrais foram homogeneizadas a 10 % em uma solução de cloreto de potássio 1,19 % gelada.

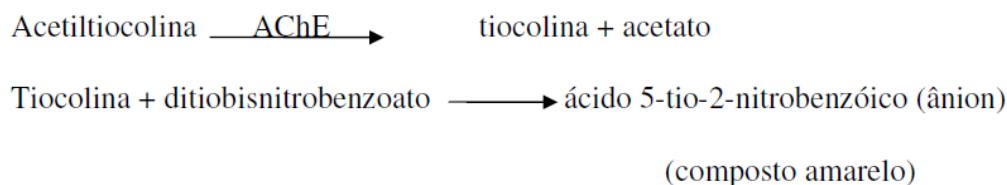
Após obtenção dos homogenatos 125 µl de cada sobrenadante foi adicionado a 225 µl de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e a 125 µl de um sistema catalisador contendo sulfato ferroso e ácido ascórbico em um tubo de ensaio. A reação foi interrompida pela adição de 250 µl de ácido tricloroacético 10 % e em seguida centrifugada a 3000 rpm por 15 min. Após centrifugação o sobrenadante foi separado e acrescido a este 250 µl de ácido tiobarbitúrico 0,8 %. Após agitação essa mistura foi mantida em Banho Maria com água fervente (100 °C) por 15 min e logo em seguida à retirada do Banho Maria foi colocada em um banho de gelo para o retorno da reação à temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 532 nm. (HUANG et al., 1998)

### **3.6.3 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade da acetilcolinesterase foi determinada segundo Ellman *et al* (1961), tendo como princípio a medida da velocidade de produção de tiocolina, à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. A coloração é medida em 412 nm, através de um espectrofotômetro.

A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos. A atividade específica foi expressa em nanomoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto (nmoles/mg de proteína/min).

**Reação:**



No presente estudo os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato 10% e o homogenato (5 µL) foi adicionado a uma cubeta contendo 500 µL do tampão, 895 µL de água destilada e 50 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M e a absorbância zerada.

Após a absorbância ser deixada em zero a cubeta foi retirada e acrescentado 50µL de iodeto de acetiotiocolina (ATC) sendo a absorbância novamente registrada por 3 min em 412 nM. A atividade da enzima foi calculada como modificações na absorbância do minuto 3 para o minuto 0, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato (LOWRY *et al.*, 1951).

### 3.6.4 Dosagem de Proteína- Método de LOWRY

A quantidade de proteína em homogenatos foi determinada a 25°C utilizando albumina sérica bovina com padrão, de acordo com o método previamente descrito (LOWRY *et al.*, 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente. Esta coloração foi medida em 750 nm, através de um espectrofotômetro.

## 3.7 Protocolo experimental III - Determinação da expressão de receptores dopaminérgicos tipo I (D1), tipo II (D2), (M1) e tirosina hidroxilase

### 3.7.1 Extração de RNA

O RNA das amostras foi isolado utilizando o kit de extração **Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Pack** da BioRad®, segundo descrito pelo fabricante.

Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® pela absorvância a 260nm. O grau de pureza do RNA foi avaliado pela relação 260/280nm.

### 3.7.2 Síntese de cDNA

Após isolamento e quantificação, o RNA extraído foi convertido em cDNA pela reação de transcriptase reversa. Para tal reação foi utilizada a enzima **iScript cDNA Synthesis Kit** (BioRad®). O protocolo de síntese seguiu as recomendações do fabricante, com uma quantidade de RNA total padronizada de 500ng para cada amostra.

### 3.7.3 PCR em tempo real (qPCR)

O cDNA foi, então, submetido a reação de PCR em tempo real (qPCR), afim de se avaliar diferenças de expressão nos genes alvo, nos diferentes grupos estudados.

As reações foram realizadas no termociclador iQ5 (BioRad®), utilizando o reagente **Power SYBR® Green PCR Master Mix** (Applied Biosystems®), conforme recomendado pelo fabricante.

Os oligonucleotídeos (primers) utilizados na amplificação dos genes alvo foram desenhados utilizando o programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen®) e encontram-se listados abaixo (Quadro 1). Como controle endógeno o gene  $\beta$ -actina foi utilizado.

**Tabela 4:** Oligonucleotídeos utilizados nos estudos de expressão, constando: gene em questão, sequência dos iniciadores e o tamanho esperado.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Tamanho
			Amplicon (pb)
D1	GTCTGTGATCATGGGGGTGTT	TCTCCTCAGAGCCACAGAAGG	86
D2	GTACCCACCCTGAGGACATGA	CATCTCCATTTCCAGCTCCTG	119
TH	CAGTACAAGCACGGTGAACCA	GCAGGCATGGGTAGCATAGAG	111
M1	GAAGGGCAGCTCTGATGATTG	TCCGCTCCCCAACTAGGTATT	96
B-Actina	AGAGCTATGAGCTGCCTGACG	CACAGGATTCCATACCCAGGA	105

As reações foram conduzidas utilizando as seguintes condições de termociclagem: 95°C por 10 min.; seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg; 52°C por 1 min.; seguido da curva de dissociação de 87 ciclos de 52°C a 95°C por 30 seg.; variando a temperatura em 0,5°C por ciclo.

Os valores quantitativos foram obtidos pelos valores de  $C_T$  ("threshold cycle"), no qual o aumento do sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectado. O cálculo matemático utilizado para aferir a expressão dos genes analisados se baseou no método descrito por Livak e Schmittgen (2001).

A especificidade da reação de qPCR foi verificada através da curva de dissociação realizada ao final de cada amplificação.

### 3.7.4 Primers

#### 3.7.4.1 Gene do receptor D1

- Acesso: NM\_012546
- Gene: 1..2236 (Drd1)
- CDS: 60..1400

<b>Foward: 5' GTCTGTGATCATGGGGGTGTT 3'</b>
<b>Reverse: 5' TCTCCTCAGAGCCACAGAAGG 3'</b>

Sequence Name:

NM\_012546

Target Sequence:

```

1   10   20   30   40   50   60   70   80   90
1   GGCTAAGCCTGGTCAAGAACTTGAGGGGCAAGTCCCAGGAGTGTTCCTCTGGAAGATGGCTCCTAACACTTCTAOCATGGATGAGGCCGGGCTGOC
101 AGGGGAGAGGGATTTCCTCTTTGCACTCCTCACGGCCTGTTTCTGTCACTGCTCATCTGTCCACTCCTCGGGCAATACDCTTGTCTGTGGGGCGTGC
201 ATCCGGTTTGGACACCTGAGGTCAGAGTGAACAACTTCTTTGTCACTCTTTAGCTGTGTCAAGATCTCTTGGTGGCTGTCTGGTCACTGCCCTGGAAG
301 CTGTGGCCAGATTTGCTGGCTTTTGGCCTTTGGTCCCTTTTGAACATCTGGGTAGCCTTTGACATCATGTGCTCTAAGGCGTCCATTCTGAACCTCTG
401 CGTGATCAGCGTGGACAGGTACTGGGCTATCTCCAGCCCTTCCAGTATGAGAGGAAGATGACCCCAAGCAGCCTTCACTCGATTAGCGTAGCATGG
501 ACTCTGTCTGTCTTATATCTCTCAATCCAGTACAGCTAAGCTGSCACAAGGCCAAGCCACATGGCCCTTGGATGGCAATTTTACCTCCTGGAGGACA
601 CCGAGGATGACAACTGTGACACAAGGTTGAGCAGGACGTATGCCATTTCACTGTCCTCATCAGCTTTTACATCCCGTAGCCATTATGATCGTCAOCTA
701 CACCAGTATCTACAGGATTGCCAGAAACAATCCGGGCACTCTCAGCCTTGGAGGGGCAAGATCCATGCCAAGAAATTGCCAGACCCCGCAGGTAAC
801 GGGAAACCCGTOGAATGGGCCAGTCTGAAAGTCCCTTTAAGATGTCCTTCAAGAGGGAGACGAAAGTCTAAAGACGCTGTCTGTGATCATGGGGGTGT
901 TTGTGTGCTGCTGCCCTCCTTCTTCACTCGAACTGTATGGTGCCTTCTGTGGCTCTGAGGAGAGCCAGCCATCTGCATCGATTCCATCACTTCGA
1001 TTGTGTTGTGTGGTTGGGTGGGCAATCTTCCCTGAACCCCAATTTATGCTTTTAAAGTCTGACTTCCAGAGGGCTTCTCAACCTCTTAGGATGC
1101 TACAGACTCTGCCCTACTAAGAAATAAGCCATAGAGACGGTGAACATTAACAACAATGGGGCTGTGGTGTTTTCCAGCCACCATGAGCCCGGAGGCTCCA
1201 TCTCCAGGACTGTAATCTGGTTTACCTGATCCCTCATGCCGTGGGCTCCTCTGAGGACCTGAAAGAGGAGGGCTGGTGAATAGCTAAGCCACTGGA
1301 GAAGCTGTCCCGACCTTATCGGTATATTTGGACTATGACACCGATGTCTCTAGAAAAGATCCAACCTGTACACACAGTGGACAGCATTCCACTTGA
1401 ATATTGGTCTCATCTCTGAGGCCAAGAGTTCCCTTGGGCTTGTCTTTAAGGAATTAACAGGAGATCCCTCTGCTGCTTTTGGACAATTAAGAGCTTC
1501 TCAAACCTCACTGATTCCAGTGTATCTCTAGCTTCAAGGGAATGACTTCCGCTCTGAAATCAGTTTGGGAGTATTATCTTAGGACATTATAAAACAACA
1601 ACAAAACAAACAAACAAACAAATAGGCCAAGAGTCAACTGTAACAGCTTCACTTAAAAATCGAACTTCCAGAAAGGAGGGTAGGAGTTGAGTTT
1701 GCTCCAAACAGGTGCTAAAACCTGTCOGAGCAGTTTTCAGATTGGAAAGGTAGGTGCATGCCCTTGTAAATTAACCTTCCAAATAAATAGCCCTTA
1801 CAGCAGGAGTGGGATTCCTTTTCTCAGAATTGACAGATGCATTTGTGATGACGGTTTTATTTATTTATTTATTGACTATATGAATATTTAAATTTAT
1901 CATAGTGAATCTATATTTAAACATATTTAAACAGAGCAAAOCCATGTGTTATCTGAGACTGACCTTCCATTTGTACTAGCCTTTATGAGCCAAATGAAAAC
2001 TAOCGTAGACTCTGAGATTCTGAATTTGTGAGTTACTTCTGGGAACACAGCAAGACTGATGTGGTGGCTCCTTAACTOGACAAGGACACAAAAGAAACGC
2101 AAGAGGAGAGTGAATAAGCCAAATGCTCCCTAAAAAGATTTTGAAGATAGTGTTTTTTTTTTTTTTAAAAAGAACTACTATTGTGTTCTGAA
2201 TGTTTTAAATGGCAGAGGCTTTCCCGGGGCAATT

```

Rank: 3   Product Length: 86   Product Region: 881-966				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> NM_012546 3 F	52.38	FWD	21	60.86
<input type="checkbox"/> NM_012546 3 R	57.14	REV	21	60.88
5' Addition	Primer Sequence			
	G T C T G T G A T C A T G G G G G T G T T			
	T C T C C T C A G A G C C A C A G A A G G			

### 3.7.4.2 Gene do receptor D2

- Acesso: NM\_012547
- Gene: 1..2750 (Drd2)
- CDS: 347..1681

Foward: 5' **G T A C C C A C C C T G A G G A C A T G A** 3'

Reverse: 5' **C A T C T C C A T T T C C A G C T C C T G** 3'

Sequence Name:

NM\_012547

Target Sequence:

```

1  CTGGTGCCTCTTTGGGCGCAGCCCTCTGCCCCTCCCGCCTGGTCCCGCGCTGGCTCCCGTCTCCGCCCCGCTGTCCTGCCCGCCGGGCG
101 CGGTCTACTGCTCCCGGAGCCGCGGAGCCGCGGCGAGCCGCTGCGGTGGATGGCGGGGAGCTGGAAGCCTCGAGCAGCCGGCGCTTCTCTGCCCGCCGGG
201 GGGACCGGCGCCCGGAGCGCTGCGGAGGGGCGCCCTGCGGTGGATGGCGGGGAGCTGGAAGCCTCGAGCAGCCGGCGCTTCTCTGCCCGCCGGG
301 CCATATGGCTTGAAGAGCCGCTGCCACCCAGTGGCCCACTGCCCAATGGATCCACTGAACTGCTGCTGGTACGATGACGATCTGGAGAGGGCAGAACTGG
401 AGCCGGCCCTCAATGGGTCAGAAAGGAGGACAGAGCCCACTACAATACTATGCCATGCTGCTCACTCCCTCATCTTTATCATCTGCTTTGGCA
501 ATGTGCTGGTGGCATGGCTGTATCCCGAGAGAGGCTTTGCAGACCACCACTACTTGTATGTCAGCCTTGGTGGTGTGATCTTGGTGGCCAC
601 ACTGGTAAATGCGTGGTGTCTACTGGAGGTGGTGGTGAAGTGGAAATTCAGCAGGATTCAGTGTGACATCTTTGTCACTCTGGATGTCAATGATGTC
701 ACAGCAAGCATCTGAACTGTGTGCCATCAGCAATGACAGGTACACAGCTGTGGCAATGCCATGCTGTATAACACAGCCTACAGCTCCAAAGCGCGAG
801 TTAAGTGCATGATTGCCATTGTCTGGTCTCTCTTCAACATCTCTGCCACTGCTCTTGGACTCAACAATACAGAGCCAGAAATGAGTGTATCATTGCG
901 CAACCCCTGCCTTTGGTGTACTCTCCTCATTGTCTCAATCTCAGTGGCCCTTCATCGTCACTCTGCTGGTCTATATCAAAATCTACATCGTCTCCGGGAG
1001 CCGCGGAGAGGGGTCAACACCAAGGCGAGCAGTGGCTTTCAGAGCCAACTGAAAGACACCACTCAAGGGCACTGTACCCACCCCTGAGGACATGAAAC
1101 TCTGCAACCGTTATCATGGAATCAATGGGATTTCCAGTGAACAGGGCGGAGATGGATGCTGCCCCGAGCTCAGGAGCTGGAAATGGAGATGCTGTC
1201 AAGCACAATGCCCGAGAGGAGCCCGTATAGCCCACTCCCTCCAGTCAACCAAGCTCACTCTCCCTGATCCATCCCAACAGCCCTACATAGCAAC
1301 CCTGACAGTCTGCCAAACCCAGAGAGAAATGGGCAACCCAAAGATTGTCAATGCCAGGATGCCAAGTCTTTGAGATCCAGACCATGCCAAATGGCAAAA
1401 CCGGAGCCTCCCTTAAAGAGATGAGCCCGCAGAAAGCTCTCCAGCCAGAGAGAGAAAGGCCACTCAGATGCTTGCATTGTCTCGGTGTGTCATCAT
1501 CTGCTGCTGCCCTTCTTCATCAAGCACATCTGAAATATACACTGTGATTGCAACATCCCAACAGTCTCTACAGCGCCTTCACATGGCTGGGCTATGTC
1601 AACAGTCCCGTTCAACCCATCATCTACACCCTTCAACATCGAGTTCCGCAAGGCTTTCATGAAATCTTGCAGTGTGAGTCTGCCCCCTGCTGCAAC
1701 AGCAGCTGCTTCCACCTCCCTGCTATGCAAGGCCAGACCTCATCCCTGCAAGCTGTGGGCAAGAGGCCAGATGGACTGGCTCTCTCGACCCCTGC
1801 AGCCCTGCAAGTGTAGCTTGGCTGATGCCCTCTCTGCCACACACCCCTCATCCCTGCCAGGTAAGGCCAGGAGACTGGTATCTTACCAGCTCTGG
1901 GTTGGAGCCATGGCTCAGGGCAGCTCACAGAGTGGCCCTCTCATATCCAGACCCCTGCTCCTTGGCACCAAGATGCAAGCGCCCTGCTTGCACCTCTCT
2001 TTGGGACAGAAACTAGCTCAGTGGTCGAGCACACCCCTGATCGCTGGCTTGGCCCTGGCCCTTGCCTTGCCTGTGCCGGATCAGGTTGGGAGGGAGCGAC
2101 AGTCTTACTTTATAGGAACACATAGGAAGCCTTCAAGACACAGGCAAGCTCCTCAGGCACATCAGTGTCAAGAGACACACATAAACACCCAGGTAGCTCC
2201 ATGGACCCAGAAACTGAGGCTGAAAAATCTGTTTTCCACTCCAACCTAGTGTGAGTCCCTACTTTTCATAGCCATGGGTATTACTATGCTCACT
2301 TGTATAGTATCCCATGGGTTCTGTACCGTTTGGGGGAAAACAACCTAATCTCAAGGCCCAAGAGAACTGTAAAGGAGAAAAATAGGCTGATCT
2401 CCTCTACTCTCCAAATCCACTCCACCCTCTTGATATACCTTGGATGATCCATCTCAGCAGAAATGCTGGCCAGTCAAGGCTTGGACCAAGTGTGG
2501 AGTTGAAGCTGGATGTGTAACCTGGGCTCTTTGGGCTGGGGGGTGTGTAACATGCTCTCTTCCATATCTCTTCCCTCCAGTGGCTCTGCCCTTA
2601 GAAGAGCTGTGGATGGGCTGCTGGGACTGCTGATACCAATGGGCCCTGGCCCTGAATGAGGAGGGGAGCTGCAATTTGGAGGTTCTGGGATCCAACTC
2701 TGTAACTACTATACCTGCCAAAACCTAATAAAACCTTGACAAAGATC

```

Rank: 2 | Product Length: 119 | Product Region: 1077-1195

Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> NM_012547 2 F	57.14	FWD	21	60.99
<input type="checkbox"/> NM_012547 2 R	52.38	REV	21	60.94

5' Addition

Primer Sequence



G T A C C C A C C C T G A G G A C A T G A



C A T C T C C A T T T C C A G C T C C T G

### 3.7.4.3 Gene M1

- Acesso: NM\_08077.1
- Gene: 1..1383(Th)
- CDS: 1..1383

Foward: 5' GAAGGGCAGCTCTGATGATTG 3'

Reverse: 5' TCCGCTCCCCAACTAGGTATT 3'



Sequence Name:

M1receptor

Target Sequence:

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
1  ATGAACACCTCAGTGCCDCCTGCTGTGTCAGTCCCAACATCACTGTCTTGGCAOCCAGGAAAGGGTCCCTGGCAGGTGGCTTCATCGGGATCAACCACAGGCC
101 TCCTGTCTCTAGCTACAGTGACAGGCAAOCTACTGGTACTCATCTCCTTCAAGGTCAACACCGAGCTCAAGACAGTCAACAACTACTTCTGCTGAGCCT
201 GGCCTGTGCTGACCTATCATTTGGCACCTTCTCCATGAACCTCTATAOCCAGTACCTGCTCATGGGCCACTGGGCTCTGGGCACACTGGCCTGTGACCTC
301 TGGCTGGCCTGGACTATGTGGCCAGCAAGGCCCTGTGTCATGAATCTTCTGCTCATCAGCTTTGACCGTTACTTCTGGGTGACCCGACCCCTGAGCTACC
401 GAGCCAAGGCACTCCCGAAGGGCAGCTCTGATGATTGGCCTAGCATGGCTGGTTTCTTCTGTTCTCTGGGCCACAGCCATCCCTCTTCTGGCAATACCT
501 AGTTGGGGAGGGGACAGTGTCTGGCTGGGCACTGCTACATCCAGTTCCCTCTCCCAACCCATCATCACTTTTGGCACAGCCATGGCCGCTTCTACCTCCCT
601 GTCACGGTCATGTGTACACTGTACTGGGCACTTACCCGGGAGACAGAAAACCGAGCCCGGGAGCTGGCCGCTGCAGGGCTCTGAGACACCAGGCAAG
701 GTGGTGGCAGCAGCAGCTCAGAGAGGTCACAGCCAGGGCTGAAAGGCTCAOCCGAGTGGCTCCAGGCCGCTGCTGGCCTGTTGCCGGCCACCCAG
801 GCTCCTGCAGGCCACAGCTGGAAAGGAAGAAAGAGGAGGATGAAGGCTCCATGGAGTCCCTCACATCCCTCGAAGGTGAGGAGCTGGCTCAGAAAGT
901 GTGATCAAGATGCCATGTTAGATTCTGAAGCACAGGCCACCCAAAGCAGCCTCCAAAAGCTCCCAAAATACAGTCAAGAGGCCACCAAGAAAGGCC
1001 GAGACCGAGGGCCAAAGGGCCAAAACCCCGAGGGAAAGAACAGCTGGCCAAAGAAAGACTTCTCACTGGTCAAGGAAAGAGGCACTGGACCCCT
1101 GAGTGCATCCCTGCTGGCCTTCACTCCCTGACACCATATAACATCATGGTCTGGTATCTACCTTCTGCAAGGACTGTGTTCTGAAACCCCTGTGG
1201 GAGCTGGGCTACTGGCTATGCTACGTCACAGCACTGTCAACCCCATGTGCTATGCAGCTGTGCAACAAAGCCCTCCGGGACAGTTCGGCTGCTGCTGC
1301 TCTGCCCTGGGCAAGAGGGGCTGGCCAAAGATCCCAAGGCCCTGGCTCTGTGCAOCCGACCCCTCCCGCAATGCTAA

```

Rank: 1   Product Length: 96   Product Region: 419-514				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> M1receptor 1 F	52.38	FWD	21	61.08
<input type="checkbox"/> M1receptor 1 R	52.38	REV	21	61.00
5' Addition	Primer Sequence			
	G A A G G G C A G C T C T G A T G A T T G			
	T C C G C T C C C C A A C T A G G T A T T			

### 3.7.4.4 Gene da enzima Tirosina Hidroxilase

- Acesso: NM\_012740.3
- Gene: 1..1770 (Th)
- CDS: 12..1502

Foward: 5' C A G T A C A A G C A C G G T G A A C C A 3'

Reverse: 5' G C A G G C A T G G G T A G C A T A G A G 3'

Sequence Name:

NM\_012740

Target Sequence:

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90
1      CAGCTTGCACTATGCCACCCAGCGCCCTCGCCACAGCCCAAGGGCTTCAGAAAGGGCGTCTCAGAGCAGGATGCCAAGCAGGGCGAGGCTGTCC
101     GTCCCCAAGGTTTCATCGGACGGGACAGAGTCTCATOGAGGATGCCCGCAAGGAGCGGGAGGGGGGCGCAGCTGCAGCAGCAGCAGCGGTAGCCTCTCG
201     GAACCTGGGAAACCACCTGGAGGCTGTGGTATTTGAGGAGAGGGATGGGAATGCTGTTCTCAACCTGCTCTTCTCCCTGAGGGGTACAAAACCTCTCTCT
301     TGTCTCGGGCTGAAAAATATTTGAGACATTTGAAGCCAAAATTCACCACTTAGAGACCCGGCTGCCAGAGGCCACTGGCAGGAAGCCCCACCTGGA
401     GTATTTTGTGCGCTTCGAGGTGCCAGTGGAGACTGGCTGCCCTCTCAGCTCTGTGCGTCCGGTGTCTGAOGACGTGGCGAGTGGCAGAGAGGACAAAG
501     GTCCCTGGTTCOCAGAAAAGTGTGGAAATGGACAAAGTGTCAOCCACTGGTCAOCCAGTTTGAOCCGTGATCTGGAOCCAGCCOCCGGCTTCTCTG
601     ACCAGGTGTATOGCCAGCGTGGAAAGCTGATTCAGAGATTGGCTTCCAGTACAAGCAGCGTGAOCCAAATTCOCCATGTGGAATACACAGGGGAAGAGAT
701     TGCTACCTGGAAAGGAGTATATGTCAOCTGAAGGGCTCTATGCTAACCATGCCCTGCCGGGAGCACCTGGAGGGTTTCCAGCTTCTGGAAACGGTACTGT
801     GGCTACCGAGAGGACAACATGCCACAGCTGGAGGAGTGTCCCGCTTCTTGAAGGAGCGGACTGGCTTCCAGCTGGACCCGTGGCCGGTCTACTGTCCG
901     CCGGTGATTTCTGGCCAGTCTGGCTTCGGGTGTTCAATGCAOCCAGTATACCGCCATGCCCTCTCACCTATGCATTCACCTGAGCCGGACTGCTG
1001    CCATGAGCTGTGGGACATGTADCCATGTTGGCTGAOCCACATTTGCCAGTTCCTCCAGGACATTTGGACTTGCACTCTGGGGGCTCAGATGAAGAA
1101    ATTGAAAACTCCACGGTGTACTGGTTCACCTGTGGAATTCGGGCTATGTAACAGAAATGGGGAGCTGAAGGCTTATGGTGCAGGGCTGCTGTCTTCT
1201    ACGGAGAGCTCCTGCACTCCCTGTGAGAGGAGCTGAGGTCCGAGCTTTGACCCAGACACAGCAGCTGCAAGCCCTACCAAGATCAAACCTACCAAGCC
1301    TGTGTACTTTGTGTCGAGAGCTTCAATGAGCCAGGACAAAGCTCAGGAACATGCTCTCGTATCCAGCGCCATTCCTGTGAAGTTTGAOCCGTAC
1401    ACACTGGCCATTGAGGTACTGGACAGCCCTCACACCATCCAGGCTCCTTGGAGGGGGTCCAGGATGAGCTGCACAOCCGGCCACAGCACTGAGTGGCA
1501    TTAGCTAAATGCATAGGTTACCAOCCACAGGTGCCAGGGCTTTCCAAAGTCTCCATCCOCTTCTCCAAOCTTTCCTGGCCAGAGGCTTTCCCATGTG
1601    TGTGGCTGGGCCCTTTGATGGGCTCCTCTTGGACCCOCCATCCTCCCAACACTGCTTCTCAOCCATGTCTTACTACTGCATGCATCCAGGGTGGTCTGC
1701    ATTCCTCTGCCCTCCATGCTCTATACTAACCCTGATTATTCTCTCAATAAAGGAAGGAAGAAATCTAACC

```

Rank: 2   Product Length: 111   Product Region: 648-758				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> NM_012740 2 F	52.38	FWD	21	60.96
<input type="checkbox"/> NM_012740 2 R	57.14	REV	21	60.96
5' Addition	Primer Sequence			
	C A G T A C A A G C A C G G T G A A C C A			
	G C A G G C A T G G G T A G C A T A G A G			

### 3.7.4.5 Gene da Beta actina (padrão)

- Acesso: NM\_031144.2
- Gene: 1..1296 (Actb)
- CDS: 82...1209

Foward: 5' A G A G C T A T G A G C T G C C T G A C G 3'

Reverse: 5' C A C A G G A T T C C A T A C C C A G G A 3'

Sequence Name:

NM\_031144

Target Sequence:

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
1      GGGTGGAGTCCGGTCCACCCGGAGTACAACTTCTTGCAGCTCCTCCGTGGCCGTCACACCCGCCACCCAGTTCCGCATGGATGACGATATCGCTG
101     CGCTCGTGTGCAACGGCTCCGGCATGTGCAAGCCGGCTTGGGGGGAOGATGCTCCCGGGCGGTCTTCCCTCCATCGTGGCCGCGCCTAGGCA
201     CCAGGGTGTGATGGTGGGTATGGGTGAGAGGACTCCTACGTGGGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTGACCCCTGAAGTACCCATTGACAC
301     GGCATTGTCACCAACTGGGACGATATGGAGAAGATTGGCACCACTTTCTACAATGAGCTGGGTGGCCCTGAGGAGCAOCCCTGTGCTGCTCACC
401     AGGCCCTCTGAACCTTAAAGGCCAACCGTGAAGAGATGACCCAGATCATGTTTGGACCTTCAACACCCGAGCCATGTACGTACCATCCAGGCTGTGTT
501     GTCCCTGTATGCTCTGGTGTACCACTGGCATTGTGATGGACTCCGGAGACGGGGTCAOCCACACTGTGGCCATCTATGAGGGTTAAGCGCTCCCTCAT
601     GGCATCCTGGCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACAGACTACCTCATGAAGATCCTGACCGAGCGTGGCTACAGCTTCAACCACACAGCTGAGAGGG
701     AAATCGTGGGTGACATTAAGAGAGAGCTGTGCTATGTTGGCCCTAGACTTGGAGCAAGAGATGGCCACTGGCCGATCCTCTTCCCTCCGGAGAGAGCTA
801     TGAGTGCCTGACGGCTCAGGTCACTACTACGGCAATGAGCGGTTCCGATGCCCGAGGCTCTCTTCCAGCCTTCTTCCCTGGGTATGGAATCCTGTGGC
901     ATCCATGAAACTACATTCAATTCCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAAGACTCTATGCCAACACAGTGTGCTGCTGGTGGCACCCATGTACC
1001    CAGGCATTGCTGACAGGATGCAAGAGGATTACTGGCCCTGGCTCCTAGCACCATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCTGAGCCAGTACTCTGTGTG
1101    GATTGGTGGCTCTATCCTGGCCCTCACTGTCCACTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCTCCATCGTGCACCGCAAA
1201    TGCTTCTAGGCGGACTGTTACTGAGCTCGGTTTACACCCCTTCTTGGACAAAACCTAAGTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

Rank: 2   Product Length: 105   Product Region: 794-898				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> NM_031144 2 F	57.14	FWD	21	61.04
<input type="checkbox"/> NM_031144 2 R	52.38	REV	21	60.92
5' Addition	Primer Sequence			
	A G A G C T A T G A G C T G C C T G A C G			
	C A C A G G A T T C C A T A C C C A G G A			

[Highlight Target Sequence](#)

Os *primers* foram criados pelo programa OligoperfectPrimer e a sequência de diferentes receptores de expressão gênica do RNAm, *Forward* e *Reverse*, foram confirmados através do programa BLAST.

### 3.8 Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para os dados paramétricos. O programa de computador usado foi o *GraphPad Prism 5.0*. Em todos os casos foi utilizado o critério de significância de  $p < 0,05$ .



## CAPITULO 1

**Vitaminas do complexo B atenuam a discinesia orofacial induzida por haloperidol em ratos: possível envolvimento de mecanismo antioxidante.**

## INTRODUÇÃO

Discinesia tardia (DT) é uma alteração motora grave relacionada a terapia antipsicótica, cuja fisiopatologia é associada ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo (EO) é resultado de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no organismo. Esse desequilíbrio tem sido relacionado com a fisiopatologia de uma série de doenças, incluindo transtornos neuropsiquiátricos (HAMAI ET AL., 2006; JUNG ET AL., 2007; BERCK ET AL., 2011; LIU ET AL., 2012).

As EROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Fisiologicamente o oxigênio ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons o que resulta na formação de água ( $H_2O$ ). Durante esse processo, metabólitos intermediários como o radical superperóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^-$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são produzidos. A redução completa do  $O_2$  deve acontecer dentro da mitocôndria, o que neutraliza as EROS (COHEN, 1989). Em face das reações univalentes da oxidação do  $O_2$  na cadeia transportadora de elétrons, a mitocôndria é considerada a maior formadora de radicais livres (GREEN ET AL, 2004).

Em condições fisiológicas o corpo dispõe de mecanismos antioxidantes que conseguem neutralizar as EROS, porém em desequilíbrio por uma produção excessiva de EROS, por uma ineficiência do sistema antioxidante ou ainda pela combinação dos dois fatores, caracterizado o EO, um processo fisiopatológico que pode levar a toxicidade celular e até mesmo um dano ou morte da mesma. Esse sistema fisiológico antioxidante é constituído por agentes de ação não enzimática e enzimática (HALLIWELL, 2007; BARREIROS ET AL, 2006).

O sistema de defesa não enzimático é composto por reagentes exógenos e são, normalmente, obtidos na alimentação. As vitaminas, sais minerais e compostos fenólicos são os mais evidentes, porém dentre os maiores destaques antioxidantes exógenos estão: vitamina C, betacaroteno, precursor da vitamina A e  $\alpha$ -tocoferol, precursor da E. Dentre os sais minerais ferro, magnésio, cobre e selênio são sais minerais ativos no combate as EROs (PRASAD ET AL, 2007).

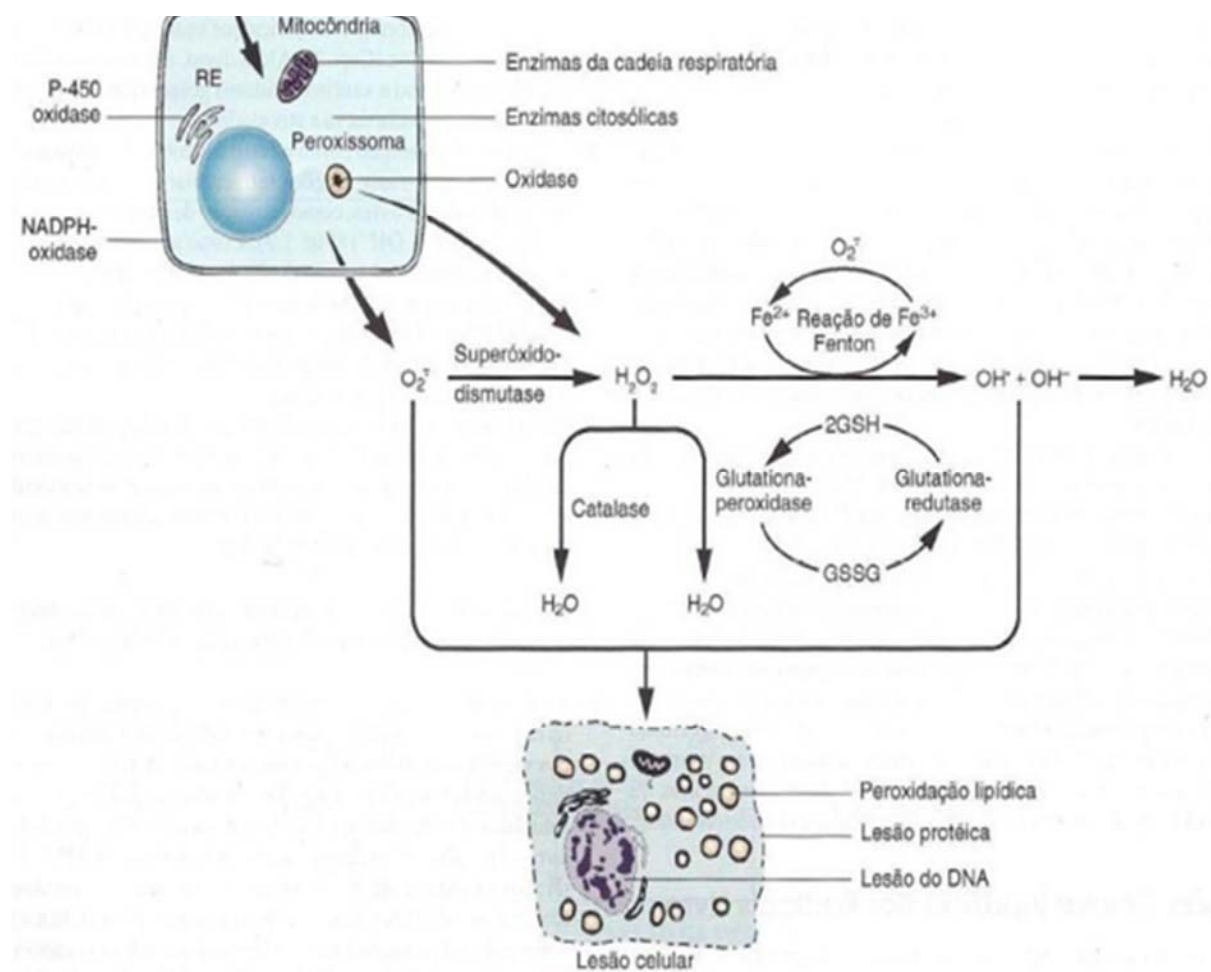
O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPS-Px), estas enzimas estão presentes tanto no citoplasma celular como na mitocôndria, local onde há maior produção de EROs. A SOD sofre dismutação e catalisa a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a partir do radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ). As enzimas CAT e glutathione peroxidase (GPS-Px) impedem o acúmulo de  $H_2O_2$  que, apesar de não possuir pares de elétrons livres que caracterizam os radicais livres, tem alta capacidade de provocar danos nas células. (FERREIRA, 1997; LAMBETH ET AL., 2008; ROVER ET AL, 2001).

O acúmulo do ( $H_2O_2$ ) por meio das reações de Fenton Haber-Weiss, formam o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), contra o qual não existe defesa enzimática. A GPS-Px reduz o  $H_2O_2$  à água, mas para isso precisa da conversão da glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), essa última promove ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura. Para completar o ciclo, a enzima Glutathione Redutase (GR) reduz a molécula de GSSG à sua forma reduzida em uma reação de oxidação da molécula de nicotinamida adenina de dinucleotídeo fosfato (NADPH) (KULAK ET AL., 2013) (Figura 12)

Assim, fica clara a importância do sistema glutathione, a saber, glutathione redutase (GR), pois é responsável pela recuperação da glutathione reduzida (GSH), o que possibilita a manutenção do ciclo redox da glutathione de forma íntegra e, permite assim o equilíbrio entre os sistemas de defesa enzimáticos (ROVER ET AL, 2001).

A GSH está envolvida também na manutenção do estado redox de tiol, o qual modula processos redox-sensíveis, sendo desta maneira indispensável para a regulação do ciclo celular e diferenciação celular, a ativação de receptores, transdução de sinal e a ligação de fatores de transcrição para o DNA (KULAK ET AL., 2013).

**Figura 12: Integração de defesa do sistema enzimático com conversão de  $O_2$  em  $H_2O$  e suas etapas intermediárias.**

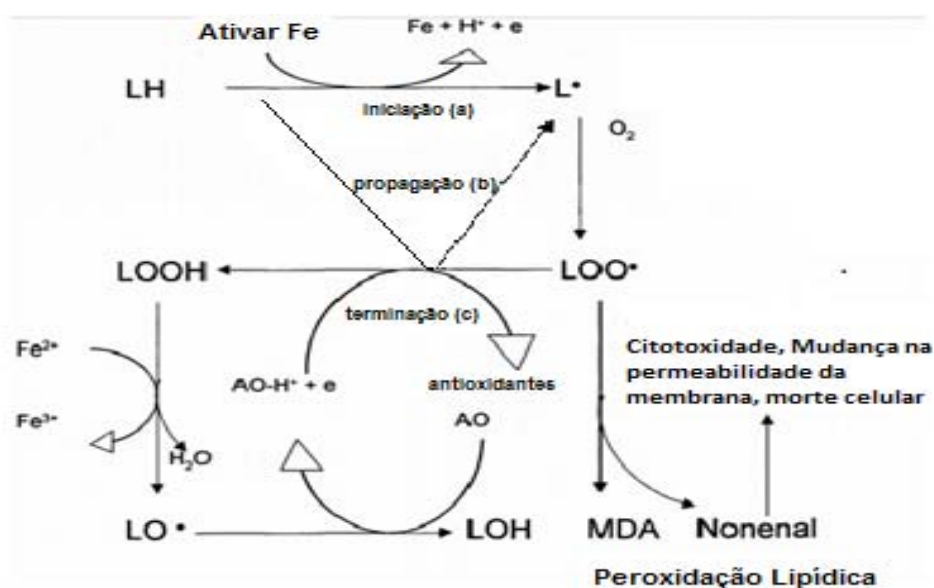


FONTE: (DEVASAGAYAM et al., 2003).



Um dos danos causados diretamente pelas EROs é a peroxidação lipídica. Esse processo ocorre quando as EROs reagem com ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e lipoproteínas, o que resulta na formação de radicais lipídico ( $L\cdot$ ), alcoxila ( $LO\cdot$ ) e peroxila ( $LOO\cdot$ ), que, por sua vez degradam a estrutura lipídica da membrana celular. Em função disto, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, podendo resultar em morte celular (Hershko, 1989; Lima & Abdala, 2001)

A partir da peroxidação lipídica são formados produtos secundários como alcanos, aldeídos e isoprostanos, estes produtos são usados como marcadores biológicos, desempenhando desta maneira a função de indicadores de EO e dano celular. O Malondialdeído (MDA) é um dos marcadores biológicos mais utilizados. Sua sensibilidade ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) permite sua identificação através da formação de coloração rosa (DEVASAGAYAM et al, 2003). (**Figura 13**).



**Figura 13: Mecanismos envolvidos na indução da peroxidação lipídica.**

Reação em cadeia com formação de radicais lipídicos nas fases de iniciação, propagação e terminação. Formação de MDA a partir do radical peróxido (DEVASAGAYAM et al., 2003).

Todos os tecidos corporais estão suscetíveis aos danos causados pelas EROs, porém o sistema nervoso central (SNC) devido ao seu grande consumo de O<sub>2</sub> e ainda baixa propriedade antioxidante, apresenta maior vulnerabilidade em desenvolver o EO (OLMEZ & OZYURT, 2012; KHAIROVA ET AL., 2012).

O cérebro é um órgão abundante em ácidos graxos poliinsaturados, que agem como substrato para a formação de peróxidos lipídicos, ele contém grande quantidade de ferro livre que é formador do radical OH e, além disso, é formado basicamente por células estáveis onde a maturidade é estabilizada por volta de 30 anos de idade. Essas características tornam este órgão extremamente vulnerável ao desenvolvimento de injúrias, principalmente as relacionadas ao EO (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1989).

Como o EO está envolvido na fisiopatologia da DO, no presente capítulo nossa hipótese de trabalho foi que o haloperidol seria capaz de causar um desequilíbrio oxidativo e que o efeito preventivo das vitaminas B estaria relacionado a um restabelecimento da função oxidativa normal.

## OBJETIVO

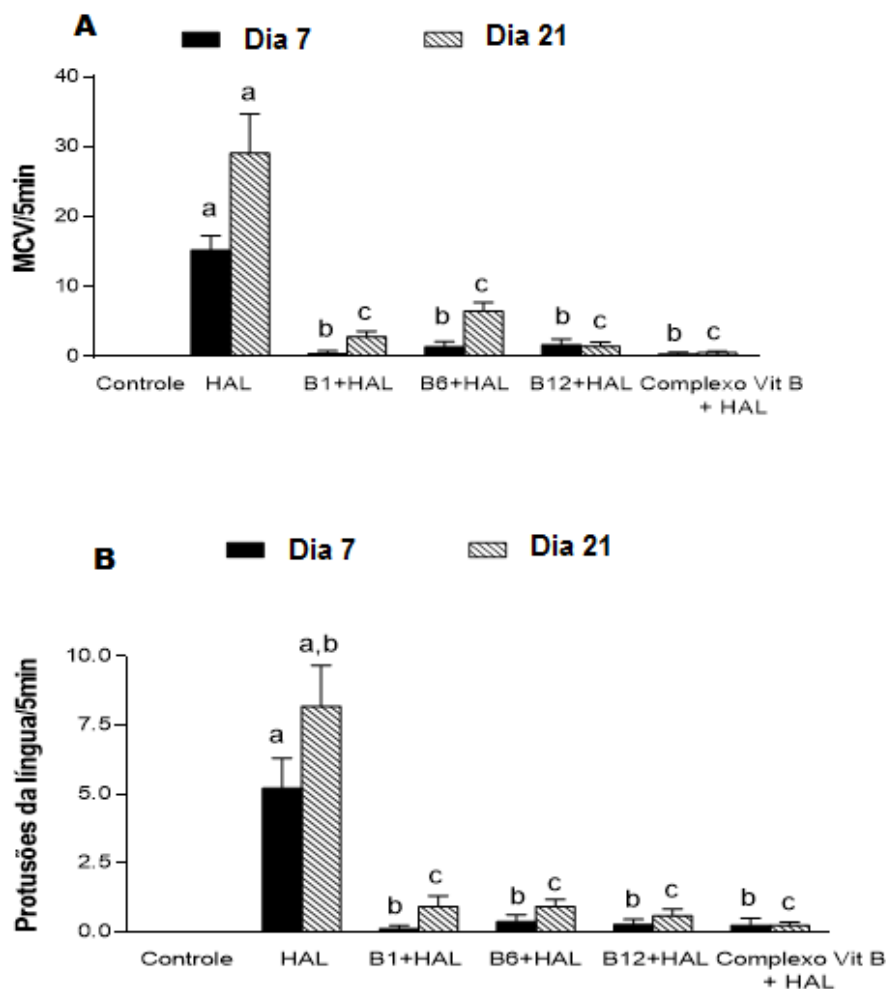
O presente capítulo teve como objetivo:

- ✓ Avaliar a indução de MMV e PL por haloperidol em ratos;
- ✓ Avaliar o tempo da catalepsia induzida por haloperidol em ratos;
- ✓ Determinar os níveis de defesas antioxidantes no corpo estriado de animais pertencentes aos grupos controle e tratado, utilizando como parâmetro os níveis de GSH;
- ✓ Verificar os níveis de dano às membranas celulares através da determinação da peroxidação lipídica no corpo estriado dos animais controle e tratado, através do marcador MDA.

## RESULTADO

### 1. Avaliação comportamental de discinesia orofacial induzidos por haloperidol em ratos

O tratamento dos animais durante 7 ou 21 dias com HAL na dose de 1 mg/kg/dia resultou em aumentos significativos no MMV (Fig. 14 a) e PL (Fig. 14 b), em comparação com o grupo controle [VCMS: dia 7 ( $F(5,68) = 18,19$ ,  $P < 0,001$ ); dia 21 ( $F(5,84) = 28,45$ ,  $P < 0,001$ )]. Estas alterações comportamentais estão associadas à DO. A coadministração das vitaminas B sozinhas (B1, B6, B12) e na forma de coquetel de vitamina B reduziu significativamente as MMV quando comparadas com o grupo tratado com o HAL ( $P < 0,01$ ). A coadministração das vitaminas B (B1, B6, B12 e complexo B) também diminuiu PL em ambos os dias experimentais quando comparado com o grupo tratado com HAL [dia 7 ( $F(5,69) = 8,147$ ,  $P < 0,001$ ); dia 22 ( $F(5,88) = 33,66$ ,  $P < 0,001$ )].

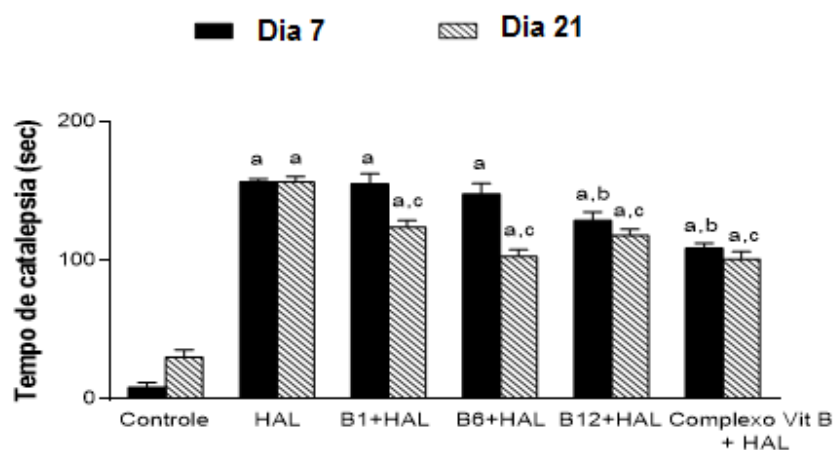


**Figura 14: Movimentos de mastigação no vazio e protusão da língua em animais submetidos ao tratamento com haloperidol e vitaminas B.**

Os ratos foram tratados com HAL e VIT B por 21 dias e no 7º e 21º dias submetidos às metodologias comportamentais. Nº de animais: 6-8 <sup>a</sup>p<0,05 vs. controle, <sup>b</sup>p<0,05 vs. HAL 7, <sup>c</sup>p<0,05 vs. HAL 21, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

## 2. AVALIAÇÃO DA CATALEPSIA INDUZIDA POR HALOPERIDOL EM RATOS

Os animais foram tratados com haloperidol para avaliação do tempo de catalepsia. O HAL aumentou significativamente a atividade cataléptica quando comparado com o grupo de controle no dia 7 e 21 [dia 7 ( $F(5,58) = 217,7, P < 0,001$ ); dia 21 ( $F(5,70) = 86,3, P < 0,001$ )]. A avaliação dos animais no dia 7 mostrou que o pré-tratamento com vitamina B12 e coquetel de vitamina B antes do HAL diminuiu o tempo de catalepsia ( $P < 0,001$ ). No dia 21, todos os grupos tratados com vitaminas B individual e coquetel de vitamina B apresentaram redução da atividade cataléptica ( $P < 0,001$ ). O encurtamento do tempo de catalepsia foi maior (cerca de 35%) nos animais tratados com B12 e coquetel de vitamina B no dia 21 do experimento.



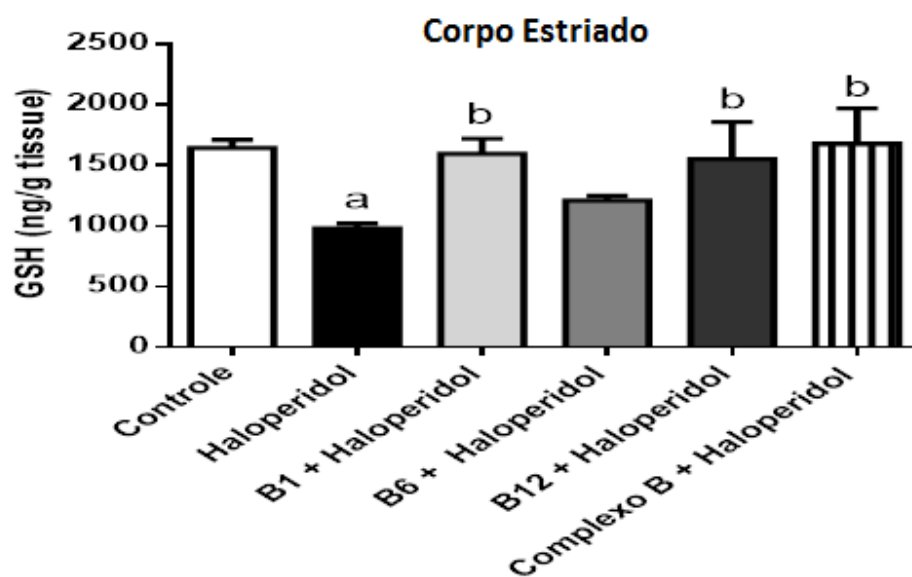
**Figura 15: Avaliação da catalepsia em ratos submetidos ao tratamento com haloperidol e vitaminas B.**

Os ratos foram tratados com HAL e VIT B por 21 dias e no 7º e 21º dias submetidos às metodologias comportamentais. Nº de animais: 6-8 <sup>a</sup>p<0,05 vs. controle, <sup>b</sup>p<0,05 vs. HAL 7, <sup>c</sup>p<0,05 vs. HAL 21. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

### 3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

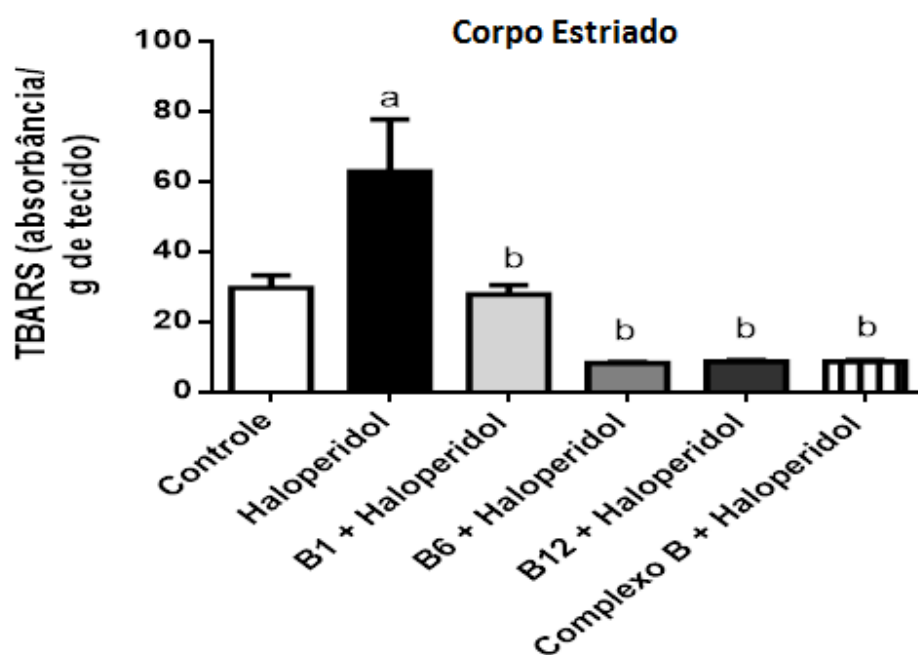
Ocorreu redução dos níveis de GSH com o tratamento com o HAL quando comparado com o grupo de controle [ $F(5,38) = 3,9, P < 0,05$ ]. A co-administração de vitamina B1, vitamina B12 ou coquetel de vitamina B preveniu significativamente ( $P < 0,05$ ) a diminuição dos níveis de GSH observada pelo tratamento com HAL (Fig. 16). A fim de determinar a magnitude da peroxidação lipídica no CE seguindo DO induzida por HAL, os níveis de MDA foram determinados. Haloperidol aumentou os níveis de MDA [ $F(5,43) = 12,29, P < 0,01$ ], enquanto que a co-administração de B1, B6, B12 ou do coquetel de vitamina B preveniu o aumento dos níveis de MDA induzido por HAL ( $P < 0,001$ ) (Fig. 17).





**Figura 16: Avaliação dos níveis de GSH no corpo estriado em animais tratados com haloperidol e pré-tratados com vitaminas B.**

Ratos foram tratados com HAL e VIT B por 21 dias e no 21º dia submetidos às metodologias bioquímicas. N°de animais: 6-8 <sup>a</sup>p<0,05 vs. controle, <sup>b</sup>p<0,05 vs. HAL, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.



**Figura 17: Avaliação dos níveis de MDA no corpo estriado em ratos tratados com haloperidol e pré-tratados com vitaminas B.**

Ratos foram tratados com HAL e VIT B por 21 dias e no 21º dia submetidos às metodologias bioquímicas. Nº de animais: 6-8 <sup>a</sup>p<0,05 vs. controle, <sup>b</sup>p<0,05 vs. HAL, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, a administração crônica de HAL aumentou significativamente os movimentos de DO e PL. Estes parâmetros comportamentais são utilizados para modelar os aspectos clínicos da DO, bem como prever potenciais agentes terapêuticos potenciais no tratamento da DO (BISHNOI et al., 2009).

A administração crônica por via intraperitoneal do HAL em ratos aumenta significativamente os movimentos de DO o está relacionado a um efeito DT-símile (ROPKE et al., 2014)

No nosso estudo a administração crônica de HAL causou dano oxidativo evidenciado pelo aumento significativo dos níveis de MDA (peroxidação lipídica) e pela diminuição dos níveis de GSH no corpo estriado de ratos. Estas alterações nos parâmetros de estresse oxidativo induzido pelo tratamento HAL já foram relatados em outros estudos e desempenham um papel na fisiopatologia da DO (BISHNOI et al, 2007; THAAKUR E HIMABINDHU, 2009).

No presente trabalho a avaliação da GSH se justifica visto que o tripeptídeo glutationa (g-glutamyl-cysteinyl-glicina) é o principal antioxidante intracelular. Além disso, enzimas tais como as peroxidases de glutationa usam GSH como um cofator para a conversão de  $H_2O_2$  para água (YUDKOFFET al., 1990). Na falha deste e outros mecanismos a principal consequência do estresse oxidativo são danos às macromoléculas celulares por adição de elétrons livres para ácidos graxos, causando peroxidação lipídica (DUGAN e CHOI, 1999).

As vitaminas do complexo B de forma individual e combinada, B1/ B6/B12, utilizadas nesta pesquisa, foram capazes de atenuar o desenvolvimento da DO induzido pelo tratamento crônico com HAL, evidenciado pela diminuição do número de MMV e PL. Ambas as vitaminas B1 e B12, e coquetel também impediram as alterações em parâmetros de estresse oxidativo induzido pelo HAL (ou seja, preveniram o aumento de

MDA e diminuição dos níveis de GSH). Até onde sabemos este foi o primeiro estudo pré-clínico explorando o possível envolvimento do efeito antioxidante de vitaminas do complexo B em seu efeito benéfico em DO. Curiosamente, apenas a vitamina B6 não alterou os níveis de GSH embora foi capaz de prevenir o desenvolvimento DO e diminuir os níveis de MDA. Assumimos que esta vitamina poderia estar agindo por meio de outros mecanismos antioxidante, que não foram avaliados neste estudo (ou seja modulação da SOD e catalase).

O propósito de estudar a prevenção de DO utilizando vitaminas do complexo B veio de alguns estudos sobre o uso da piridoxina (Vitamina B6) no tratamento de pacientes sofrendo de alterações extrapiramidais pelo uso de fármacos antipsicóticos (LERNER et al., 1999, 2001). Neste contexto, LERNER et al., 2007 realizaram um estudo com 50 pacientes diagnosticados com esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo, e mostraram que vitaminas B6 parecem ser eficazes na redução de sintomas DO, mas de acordo com os autores, os mecanismos específicos desta atenuação não estavam claros. Outro estudo mostrou que o tratamento com vitamina B6 também melhorava DO e Parkinsonismo em um estudo aberto envolvendo 15 pacientes que sofriam de esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo e expostos a antipsicóticos típicos (MIODOWNIK et al., 2003).

Várias linhas de evidência sugerem que a tiamina (vitamina B1) pode servir como um composto antioxidante. Em ratos, a deficiência de tiamina reduz a atividade de enzimas tiamina dependente (SHEU et al., 1998) e aumenta os marcadores de estresse oxidativo (GIBSON e ZHANG, 2002).

A vitamina B6, por sua vez, mostra atividade antioxidante em células endoteliais expostas a 0,5 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MAHFOUZ et al., 2009). Este efeito também foi observado em fígado e coração de rato (CABRINI et al., 1998). Piridoxal 5-fosfato, a forma ativa de vitamina B6 age como uma coenzima em todas as reações de transaminação, e em algumas reações de descarboxilação e desaminação, tais como a conversão de L-3,4-dihidroxifenilalanina para dopamina e glutamato para GABA

(SOROLLA et al., 2010). Como resultado, alguns dos efeitos antidiscinético aqui relatado para a vitamina B6 podem ser explicados pela regulação da síntese de neurotransmissores.

A vitamina B12 participa no metabolismo da S - adenosilmetionina um doador de grupos metila que exerce um papel decisivo no funcionamento do sistema nervoso central através da regulação da síntese de neurotransmissores (por exemplo, a serotonina) e fosfolípidos que são componentes estruturais da bainhas de mielina e de receptores de células neuronais. A deficiência de vitamina B12, leva à ativação de receptores de N-metil-D-aspartato, lesões no endotélio vasculare, e estresse oxidativo (KARAKULA et al., 2009). Juntas, estas atividades da vitamina B12, proporcionam uma explicação para as propriedades antioxidantes do presente composto, tal como observado no presente estudo.

A prevenção do estresse oxidativo induzido por HAL após a administração de cada vitamina B (B1, B6 e B12) sozinho, e em combinação, pode ser devido a distinta e vias sobrepostas. No entanto, um efeito sinérgico não foi observado no presente estudo. Isto pode ter sido devido ao fato de cada tratamento for altamente eficaz em aliviar DO (isto é, uma redução de 95% no PL e MMV). Assim, o modelo pode carecer de sensibilidade para detectar diferenças e sinergias devido a um efeito de "teto".

A catalepsia também foi prevenida por vitaminas B coadministradas com HAL. Em roedores, a catalepsia é caracterizada pela perda do movimento voluntário onde os membros estranhamente permanecem em posições apoiadas sobre uma barra. A catalepsia induzida pelo HAL é considerada como um modelo animal de acinesia parkinsoniana, o que reflete o comprometimento da estabilidade postural e a incapacidade de iniciar ativamente movimentos. Os membros tendem a permanecer em qualquer que seja a posição em que são colocadas, proporcionando um método comportamental robusto para estudar disfunção nigrostriatal. A catalepsia também pode estar associada com transtornos psicóticos (por exemplo, catatonia), toxicidade do fármaco no sistema nervoso, e outras condições. Portanto, a catalepsia é usada como

um modelo de sistema extrapiramidal (HOFFMAN E DONOVAN, 1995) e para o rastreo de fármacos antiparkinsonianas (LORENC-KOČÍ et al., 1996).

A acinesia induzida por HAL é o resultado do bloqueio de receptores D2 no ST (ELLENBROEK et al., 1985). A depleção de catecolaminas e outras hipóteses neuroquímicas têm sido propostas para o desenvolvimento da catalepsia tais como alterações na neurotransmissão GABAérgica, colinérgica, glutamatérgica e serotoninérgica na via nigro-estriatal (NEAL-BELIVEAU et al., 1993;. OKUYAMA, 1999; BAZIAN, 2001).

Pesquisadores acreditam que o desequilíbrio oxidativo em neurônios dopaminérgicos da substancia negra seja a principal causa de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson. Portanto, as substâncias antioxidantes podem desempenhar um papel importante na prevenção de parkinsonismo e por interferirem no estresse oxidativo relacionado à progressão da neurodegeneração (MORRIS et al., 2010). Baseado no fato de que as vitaminas B mostram propriedades antioxidantes e que os compostos com atividade antioxidante apresentaram resultados promissores na prevenção da catalepsia (NAIR et al., 2008; RASHEED et al., 2010; TREVIZOL et al., 2011), propriedades antioxidantes também podem explicar efeitos protetores das vitaminas B como demonstrado neste estudo.

A eficácia de vitaminas B foi mais pronunciado na prevenção de DO do que na catalepsia. Discinesia orofacial e catalepsia envolvem mecanismos biológicos distintos. Por exemplo, a fisiopatologia da DO envolve uma hipersensibilidades de receptores de dopamina como consequência do bloqueio crônico destes receptores induzida por fármacos antipsicóticos (MARGOLESE et al., 2005), ao passo que o Parkinsonismo está relacionado ao bloqueio de receptores dopaminérgicos (HIROSE, 2006). No entanto, estresse oxidativo está associado com o desenvolvimento de ambas as condições (ZAI et al., 2010). Todas as vitaminas B estudadas mostram efeitos antioxidantes. Portanto, os resultados deste estudo sugerem um importante papel de mecanismos antioxidantes na prevenção da DO induzida pelo tratamento crônico com haloperidol.

## Capitulo 2

**Prevenção de alterações na atividade da acetilcolinesterase induzidas por haloperidol pela co-administração de vitamina B em modelo animal de discinesia tardia.**

---

## INTRODUÇÃO

Danos aos interneurônios colinérgicos estriatais têm sido implicados na fisiopatologia de várias alterações do movimento, tais como doença de Parkinson, distonia e DT (Pisani et al. 2007). Por conseguinte, tem sido relatado que os movimentos hiperkinéticos associados à DT refletem um desequilíbrio dopaminérgico-colinérgico com uma relativa dominância dopaminérgica devido à hiperfunção dopaminérgica absoluta ou hipofunção colinérgica (TAMMINGA E WOERNER 2002).

Miller e Chouinard em 1993 propuseram que a DT ocorre como resultado de danos e/ou degeneração de interneurônios colinérgicos estriatais. Em linha com as hipóteses desses autores, várias experiências pré-clínicas têm repetidamente relatado que as células colinérgicas no estriado são perdidas ou reduzidas em quantidade após a exposição prolongada ao haloperidol e flufenazina (MAHADIK ET AL 1988; JESTE ET AL. 1992; GRIMM ET AL. 2001). Na grande maioria dos estudos, a avaliação da função colinérgica cerebral e sua relação com a DT é baseada em dados morfológicos (imunohistoquímica para colina acetil transferase-ChAT, a enzima responsável pela síntese de ACh) (GRIMM et al. 2001) ou análises bioquímicas (atividades enzimáticas de ChAT ou acetilcolinesterase-AChE) (MAHADIK ET AL., 1988; MAHADIK E MUKHERJEE 1995).



## OBJETIVO

Face ao que foi exposto o presente capítulo tem como objetivo:

- ✓ Estudar o efeito preventivo das vitaminas B sozinhas ou em associação contra as alterações da atividade da enzima AChE induzidas por haloperidol em ratos.

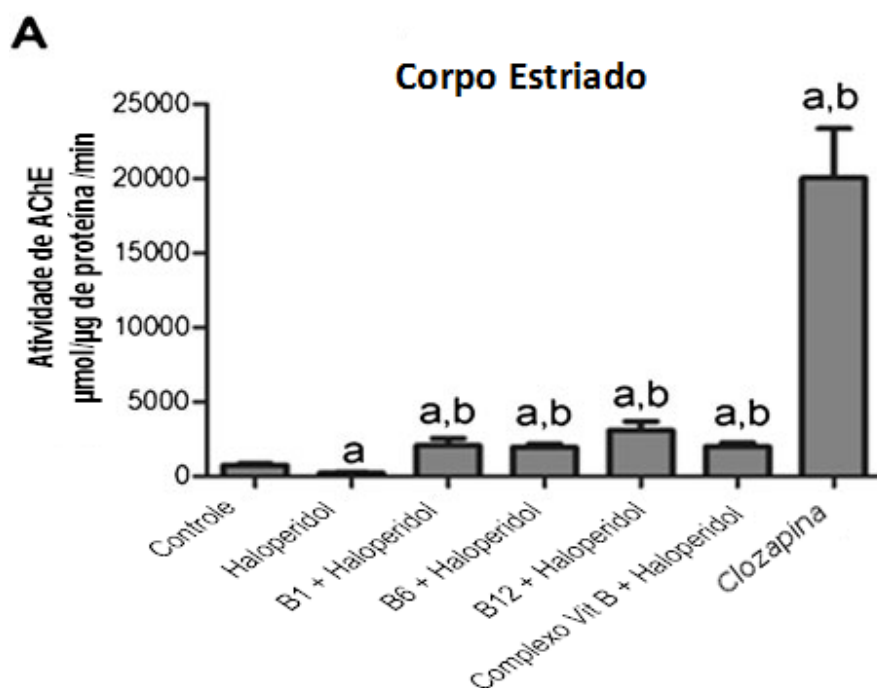
## RESULTADOS

#

Conforme previamente mostrado no capítulo 1 do presente estudo a administração de HAL por 21 dias resultou em significativo aumento no número de movimentos de mastigação vazia (MMV) ( $p < 0.001$ ) e de protusão da língua (PL) ( $p < 0.001$ ) quando comparado aos ratos do grupo controle, conforme avaliado no dia 21. A co-administração de vitamina B com HAL reduziu significativamente o número de MMV e PL quando em comparação aos animais tratados com HAL, conforme as seguintes percentagens: Vitamina B1 (MMV: 87.6%, PL: 91.8%), Vitamina B6 (MMV: 79.1%, PL: 93%), Vitamina B12 (MMV: 97.1%, PL: 96.2%), Coquetel de vitaminas B (MMV: 98%, PL: 97.8%), trazendo os valores de MMV e PL para o controle.

O número de MMV nos animais tratados com clozapina foi mais alto quando comparado com ratos do grupo de controle ( $p < 0.05$ ), mas cerca de 2.4 vezes menor que o grupo tratado com HAL ( $p < 0.05$ ). O número de PL registrado em animais tratados com clozapina foi similar ao do grupo controle e, portanto, significativamente menor que os valores observados em ratos tratados com HAL ( $p < 0.001$ ).

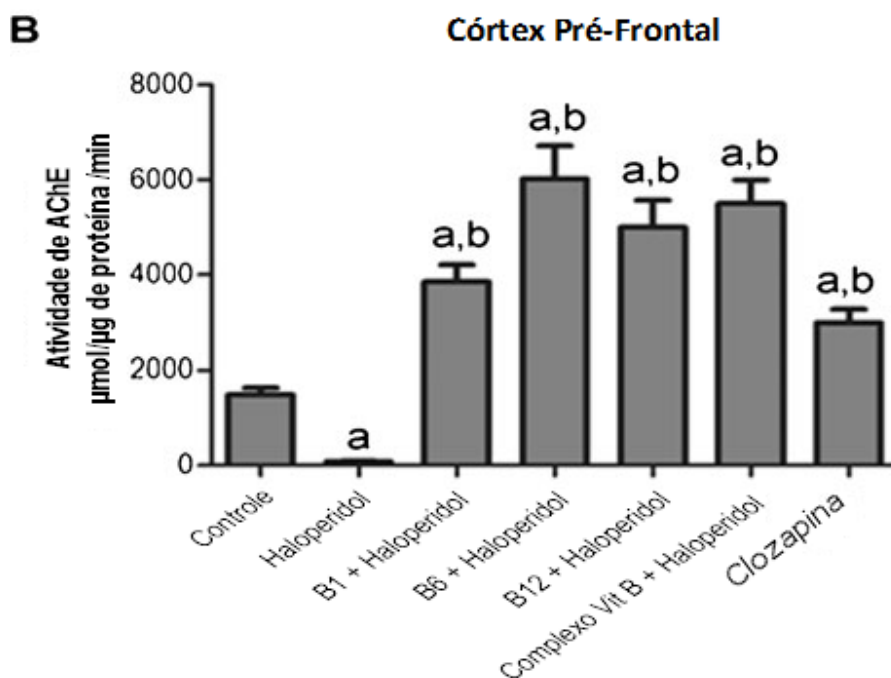
A Figura 18 mostra que a administração crônica de HAL resultou em um decréscimo significativo de 71% da atividade de AChE no CE quando comparado aos animais do grupo de controle. Nossos resultados revelaram que a coadministração de HAL com vitamina B1, B6, B12 ou coquetel que vitamina B aumentou a atividade de AChE quando comparados aos os ratos do grupo de controle e aos tratados com HAL. A administração de clozapina durante 21 dias causou um aumento considerável de 27 vezes na atividade de AChE quando comparado com os ratos do grupo de controle e os tratados com HAL [ $F(6,46)=35.53$ ,  $p < 0.001$ ].



**Figura 18: Avaliação da atividade enzimática da AChE no corpo estriado de animais tratados com vitaminas B e haloperidol ou clozapina.**

A administração crônica de haloperidol resultou numa diminuição significativa da atividade da AChE em 71 %, em comparação com os animais controle. A análise post-hoc revelou que a coadministração de haloperidol com vitamina B1 , B6 , B12 ou complexo de vitamina B aumentou a atividade da AChE em comparação com os animais controle e animais tratados com haloperidol. N°de animais: 6-8 <sup>a,b</sup> $p < 0,05$ . ANOVA e Student Newman Keuls como pós-teste vs. controle e haloperidol, respectivamente.

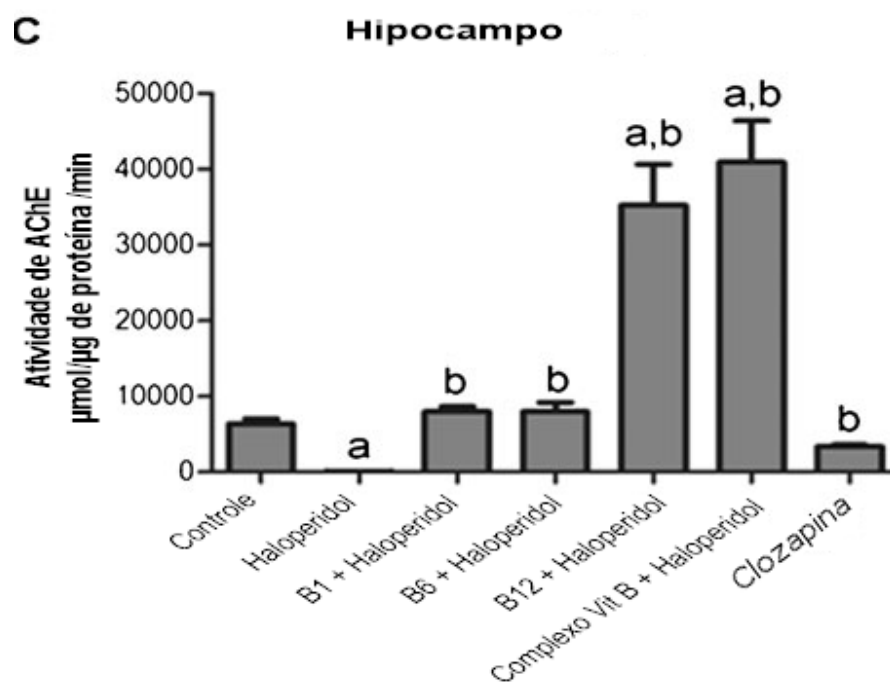
Um decréscimo significativo de 95% na atividade de AChE também foi observado após o tratamento de HAL no CPF (Fig. 19). A coadministração de HAL com vitamina B1, B6, B12 ou complexo de vitamina B, assim como a fármaco antidiscinésica clozapina, também aumentou a atividade de AChE comparado com os grupos de controle e de tratamento com halo [F(6,52)=40.99,  $p < 0.001$ ].



**Figura 19: Avaliação da atividade enzimática da AChE no córtex pré-frontal de animais tratados com vitaminas B e haloperidol ou clozapina.**

Nº de animais: 6-8 <sup>a,b</sup> $p < 0,05$ . ANOVA e Student Newman Keuls como pós-teste vs. controle e haloperidol, respectivamente.

Finalmente, no hipocampo, o HAL também diminuiu a atividade de AChE em 99% quando comparado aos animais do grupo de controle (Fig. 20). A coadministração de HAL com vitamina B1, B6 e somente clozapina aumentaram significativamente a atividade de AChE quando comparado aos ratos tratados somente com HAL. A coadministração de HAL com vitamina B12 e coquetel de vitamina B aumentou significativamente a atividade de AChE em 5.5 e 6.4 vezes, respectivamente, quando comparado à animais do grupo de controle e em 447 e 519 vezes, respectivamente, quando comparado a animais tratados com halo [ $F(6,52)=43.35$ ,  $P < 0.01$ ].



**Figura 20: Avaliação da atividade enzimática da AChE no Hipocampo de animais tratados com vitaminas B e haloperidol ou clozapina.**

N° de animais: 6-8  $a,bp < 0,05$ . ANOVA e Student Newman Keuls como pós-teste vs. controle e haloperidol, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a coadministração de vitaminas B em ratos tratados com haloperidol por 21 dias preveniu o decréscimo induzido por haloperidol da atividade da AChE no CE, CPF e HC. Essas áreas do cérebro são implicadas na fisiopatologia da DT (MAHADIK et al. 1988). Nossos achados também demonstraram que o reestabelecimento de atividade da AChE estava associado com reduções no número de MMVs e PLs induzidas por haloperidol. Esses modelos de parâmetros comportamentais são aspectos clínicos de DT, e evidências de estudos pré-clínicos sugerem que a prevenção de DO induzida por haloperidol é uma importante ferramenta na descoberta de potenciais agentes terapêuticos para DT (BISHNOI et al. 2009).

Para reforçar nossos achados relacionados aos mecanismos antidiscinésicos de vitamina B, a administração do fármaco antidiscinésico padrão, clozapina, sozinha durante 21 dias foi utilizada. A clozapina alterou a atividade de AChE de forma similar ao observado nos grupos coadministrados com vitaminas B e haloperidol. Devido ao fato da clozapina atuar como um antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos (M1) (OLIANAS et al. 1999), nós podemos deduzir que quando as vitaminas B são associadas com haloperidol, elas devem prevenir a disfunção colinérgica induzida por este antipsicótico típico, apresentando, desta maneira, propriedades antidiscinésicas que são parcialmente relacionadas com a correção de alterações na neurotransmissão colinérgica induzidas por haloperidol.

O uso clínico de fármacos dopaminérgicos, como o haloperidol, pode levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de complicações motoras, como Parkinson, distonia, hipercinesia e comportamento estereotipado (MILLER E CHOUINARD 1993). Esses distúrbios motores causados por agentes dopaminérgicos são associados com um desequilíbrio entre a ACh estriatal e níveis de dopamina (PISANI et al. 2007). Além desse desequilíbrio, o tratamento a longo prazo com antipsicóticos é também relacionado com uma perda de células viáveis no corpo estriado de animais, assim como em pacientes esquizofrênicos tratados com antipsicóticos. Além disso, estudos cerebrais pós-morte em pacientes esquizofrênicos indicam que a DT está associada com

alterações patológicas, principalmente em grandes neurônios do estriado (presumivelmente IChs) (JESTE ET AL. 1992).

Estudos anteriores mostraram que a administração crônica de HAL em ratos estava associada com a perda de neurônios colinérgicos em diversas regiões cerebrais, incluindo CE, HP e córtex cerebral (MAHADIK et al. 1988). Nossos resultados confirmaram os resultados desses estudos anteriores, assim como mostraram que a administração crônica de HAL por 21 dias também resultou em um comprometimento da neurotransmissão colinérgica nas regiões CE, CPF e HP. Um aprimoramento/decréscimo adaptativo da atividade da AChE para compensar um aumento/diminuição da ACh endógena, respectivamente, tem sido amplamente descrito (MAHADIK AND MUKHERJEE 1995; MARTELLA ET. AL 2009). Portanto, a diminuição na atividade de AChE é relacionada com a perda de neurônios colinérgicos (MAHADIK AND MUKHERKEE 1995).

A DT também está associada com o desequilíbrio entre os efeitos mediadores de D1 e D2 no gânglio basal (TAMMINGA E WOERNER 2002). Estudos anteriores mostraram que IChs estriados expressam D1 como subtipos de receptor D5 (YAN AND SURMEIER 1997), que são principalmente somatodendríticos e despolarizam a célula através da promoção da abertura não-seletiva dos canais de cátion e do fechamento dos canais de K<sup>+</sup>, aumentando, assim, a liberação de ACh, enquanto a ativação dos receptores D2 diminui a neurotransmissão colinérgica (YAN et al. 1997). A administração crônica de HAL induz uma supra-regulação dos receptores D2, bem como um aumento da dopamina liberada no estriado de ratos que apresentam MMVs (TAMMINGA AND WOERNER 2002). O bloqueio dos receptores D2 por HAL leva a dopamina a se ligar à receptores D1 não bloqueados que, com o passar do tempo, são regulados negativamente (TAMMINGA AND WOERNER 2002). Essa nova homeostase gerada pela administração a longo prazo do HAL em receptores D1-D2 resulta, portanto, em uma diminuição da atividade dos IChs estriados; em outras palavras, prejudica a neurotransmissão colinérgica.

Em nosso estudo anterior (MACEDO et al. 2011), demonstramos que as vitaminas B foram efetivas na prevenção da DT induzida por HAL em ratos e mostramos que as atividades antioxidantes dessas vitaminas no corpo estriado estavam envolvidas neste efeito (MACEDO et al. 2011). Neste relato anterior, postulamos que as vitaminas B eram capazes de prevenir a DO pelo aumento dos níveis do principal antioxidante intracelular, a GSH, desta forma, protegendo as membranas celulares da peroxidação lipídica. Esse mecanismo pode prevenir danos oxidativos nos IChs do corpo estriado. Por exemplo, as vitaminas B reverteram as reduções de atividade de AChE no CE induzidas por HAL, o que sugere que esses regimes de tratamento com as vitaminas podem preservar a integridade e a função desses IChs.

Pesquisas anteriores mostraram que a deficiência de tiamina (vitamina B1) resulta em perda de neurônios colinérgicos do cérebro, alterações nos níveis de ACh estimulados no hipocampo e no córtex (ANZALONE et al. 2010) e redução de síntese de ACh em todo o cérebro. A piridoxina (vitamina B6), por outro lado, está implicada nas reações enzimáticas que catalisam a síntese e o metabolismo dos neurotransmissores, como a dopamina, a norepinefrina e a acetilcolina (EBADI 1981). A cianocobalamina (vitamina B12) parece estar envolvida na síntese de ACh, segundo estudos utilizando animais alimentados com uma dieta deficiente em colina que foram capazes de sintetizar ACh quando administrada a vitamina B12 (SASAKI et al. 1992). Essas evidências estão em conformidade com as nossas presentes descobertas que sugerem que as vitaminas B podem proteger a função dos neurônios colinérgicos após o tratamento crônico com HAL em áreas do cérebro envolvidas na fisiopatologia da DT (CE, HP e CPF) (MAHADIK AND MUKHERJEE 1995; PEREIRA et al. 2011).

Importante notar, como as presentes descobertas mostraram, que a vitamina B12 e o coquetel de vitamina B reverteram a diminuição da atividade de AChE induzida por HAL no hipocampo. Essa área cerebral é relacionada com as deficiências cognitivas da DT (BARNES et al. 1994). O hipocampo também está associado com as complicações motoras da DT, desde que diversas alterações funcionais foram observadas nesta área do cérebro na DT, bem como em reserpina e discinesias induzidas por levodopa (PEREIRA ET AL. 2011; CERASA ET AL. 2012).



A clozapina é a melhor opção de tratamento em diversas circunstâncias clínicas, incluindo esquizofrenia, psicoses na doença de Parkinson, assim como na prevenção e tratamento da DT. Contudo, esse fármaco está associado com muitos efeitos colaterais (RAJA, 2011).

Uma das vias neurotransmissoras de tratamento da clozapina é a colinérgica (OLIANAS et al. 1999). O foco sobre o sistema colinérgico foi reforçado pela crescente necessidade de melhores tratamentos de déficits cognitivos na esquizofrenia (FRIEDMAN, 2004). Portanto, fármacos colinomiméticos, tais como fisostigmina (inibidora de AChE) (JONES AND SHANNON 2000), assim como os fármacos antipsicóticos (JONES et al. 2005), revertem efeitos antipsicóticos induzidos pelas fármacos anticolinérgicas atropina e escopolamina (BARAK AND WEINER 2007).

Os antagonistas muscarínicos clinicamente utilizados para reduzir os efeitos secundários extrapiramidais associados com fármacos antipsicóticos (TANDON 1999) têm sido reportados como exarcebadores dos sintomas da esquizofrenia e interferentes nos efeitos terapêuticos dos fármacos antipsicóticos (JOHNSTONE et al. 1983). Assim, uma vez que: i) a clozapina atua como um agonista nos receptores muscarínicos centrais e periféricos (OLIANAS et al. 1999) e as alterações na atividade de AChE foram similares entre os grupos tratados com a associação de haloperidol + vitamina B e clozapina, podemos especular que as vitaminas B, dentro da nossa situação experimental, são capazes de atenuar as alterações nas neurotransmissões colinérgicas induzidas por HAL, possivelmente por aumento da neurotransmissão de ACh, sendo, assim, uma estratégia segura na prevenção dos DO quando comparadas à clozapina.

Em resumo, além dos efeitos antioxidantes na prevenção da DT (Macedo et al. 2011), as vitaminas B também podem ser importantes na restauração da neurotransmissão colinérgica padrão em áreas cerebrais relacionadas à fisiopatologia da DT, isso é, corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal (PEREIRA et al. 2011). Essa proteção das vitaminas B contra alteração/perda da neurotransmissão colinérgica

induzida por HAL é clinicamente relevante, porque além da prevenção das perturbações motoras observadas na DT, elas podem ser importantes ferramentas para prevenir o declínio cognitivo associado à DT, principalmente pelo grande aumento de atividade da AChE no hipocampo induzida pela administração de vitamina B12 e vitaminas do complexo B, como visto em nossos resultados, embora mais estudos sejam necessários para esclarecer o papel dessas vitaminas nos déficits cognitivos induzidos pela administração crônica do HAL.

**CAPITULO 3**

**Investigação da expressão de RNAm dos receptores dopaminérgicos dos tipos D1 e D2, muscarínicos M1 e da tirosina hidroxilase em ratos administrados haloperidol e coadministrados com vitamina B12 e complexo B**

---

## INTRODUÇÃO

A teoria clássica explica que o bloqueio crônico dos receptores dopaminérgicos D2 a nível estriatal, induz o seu aumento e hipersensibilidade. Consequentemente ocorrem comportamentos relacionados com hiperatividade dopaminérgica (SETHI, 2006). Evidências também apontam a participação direta da dopamina nesta resposta, visto que agentes depletors de dopamina como a reserpina são efetivos contra a discinesia (FAHN et al., 1983).

De acordo com a teoria recentemente proposta “plasticidade sináptica mal adaptada”, a hipersensibilidade de receptores D2 e alterações degenerativas de neurônios causada por aumento do estresse oxidativo pode resultar em efeitos secundários na plasticidade de sinapses glutamatérgicas em interneurônios estriatais, causando um desequilíbrio entre as vias estriatais direta e indireta e, portanto, produzindo um impulso de saída anormal para o córtex sensoriomotor (TEO JT, EDWARDS MJ, BHATIA K, 2012).

O metabolismo da dopamina leva a geração de espécies reativas de oxigênio, particularmente nos núcleos basais (BISHNOI et al., 2009). Este processo pró-oxidativo leva a danos ao GABA estriatal e interneurônios colinérgicos (IChs) (MILLER AND CHOUINARD, 1993). O GABA é o neurotransmissor mais encontrado nos núcleos da base e tem íntimas relações com os sistemas dopaminérgicos. Foram encontradas evidências de diminuição da atividade das vias gabaérgicas estriatais na DT. IChs desempenham um papel central no circuito complexo que controla os movimentos voluntários (BONSI et al., 2011).

Danos no IChs têm sido implicados na fisiopatologia de várias doenças do movimento, principalmente na DT (PISANI et al., 2007). Portanto, tem sido relatado que o movimento hiperkinético associado com DT reflete um desequilíbrio dopaminérgico e colinérgico com uma relativa hiperfunção dopaminérgica absoluta ou hipofunção colinérgica (TAMMINGA E WOERNER, 2002). Miller and Chouinard (1993) propuseram

que DT ocorre como um resultado do dano e/ou degeneração do IChs. Em linha com essas hipóteses, vários experimentos pré-clínicos têm repetidamente reportado que células colinérgicas no estriado são perdidas ou reduzidas em quantidade, após a exposição prolongada ao haloperidol (MAHADIK *ET AL.*, 1988; JESTE *ET AL.*, 1992; GRIMM *ET AL.*, 2001).

A DT é também associada a um desequilíbrio entre D1 e D2 nos gânglios basais (TAMMINGA E WOERNER 2002). Estudos anteriores mostraram IChs que expressam D1- D5 como subtipos de receptores estriatais (YAN E SURMEIER., 1997), são principalmente somatodendríticos e despolarizam a célula (promovendo a abertura não seletiva de canais de cátions e o fechamento de canais de K<sup>+</sup>), assim aumentando liberação ACh, enquanto que a ativação de receptor D2 diminui a neurotransmissão colinérgica (YAN ETAL., 1997). Neste contexto, substâncias bloqueadoras do receptor D2 aceleram a despolarização dos IChs aumentando a liberação de ACh, que, agindo em receptores muscarínicos M1 é uma das causas dos movimentos hiperkinéticos.

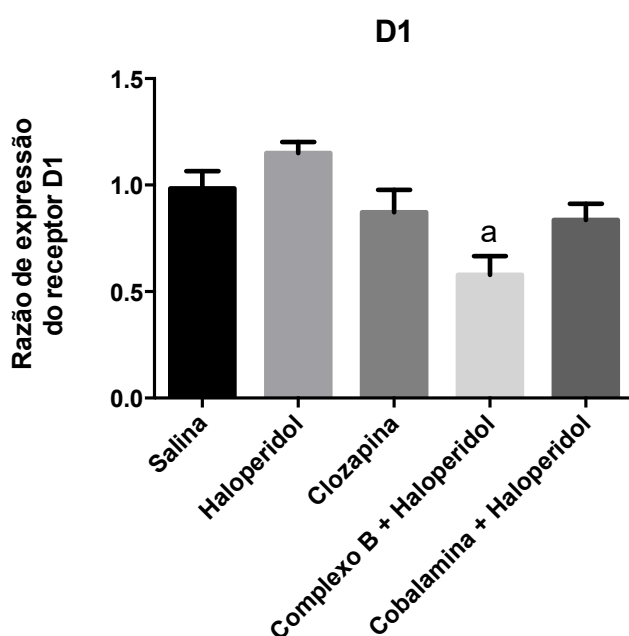
## OBJETIVO

O presente capítulo tem como objetivo:

- ✓ Investigar a expressão do RNAm dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2, bem como, muscarínico M1 e da enzima limitante para a síntese da dopamina, tirosina hidroxilase em ratos administrados haloperidol e coadministrados vitamina B12 e complexo B

## RESULTADO

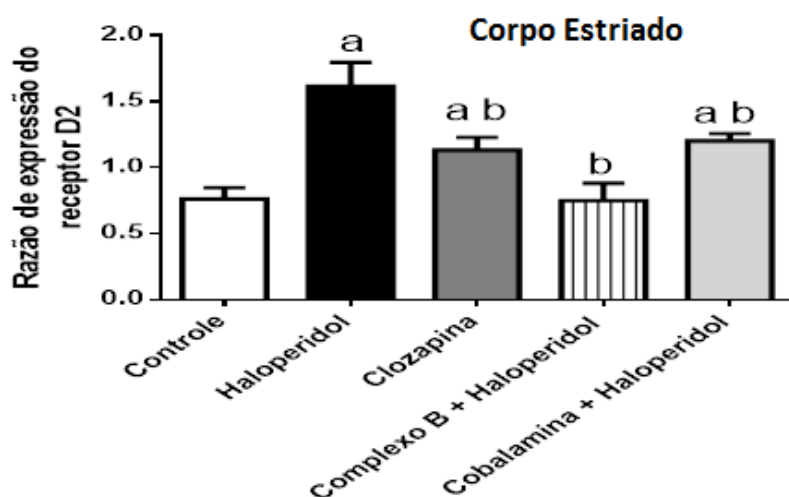
Os animais tratados por 21 dias com haloperidol ( $1,15 \pm 0,051$ ,  $p < 0,05$ ), portanto, animais discinéticos, não apresentaram alteração da expressão dos receptores D1 quando comparado ao controle. Apenas o pré-tratamento com complexo B foi capaz de reduzir a expressão dos receptores D1. Nenhuma alteração foi vista nos animais tratados com clozapina e cobalamina + haloperidol em relação ao controle.



**Figura 21: Avaliação da expressão do receptor D1 no corpo estriado de animais tratados com cobalamina (vitamina B12) ou complexo B combinada ao haloperidol ou clozapina.**

A administração crônica de haloperidol, e não de clozapina, promoveu um aumento significativo da expressão de D1 em comparação com os animais controle. A co-administração de complexo B com haloperidol diminuiu, de maneira significativa, a expressão do receptor dopaminérgico quando comparado com todos os outros grupos. A cobalamina impediu o aumento da expressão do receptor dopaminérgico induzido por haloperidol. N° de animais: 6-8  $p < 0,05$ . ANOVA e Student Newman Keuls como pós-teste hoc  $p < 0,05$ .

De forma semelhante ao observado em relação ao receptor D1, a administração repetida de haloperidol causou um aumento na expressão do receptor D2 quando comparado aos animais controle. Os animais administrados B12 + HAL ou clozapina apresentaram uma redução na expressão deste receptor quando comparado aos animais administrados haloperidol. O tratamento concomitante com complexo B + HAL manteve a expressão dos receptores D2 semelhante à do grupo controle.



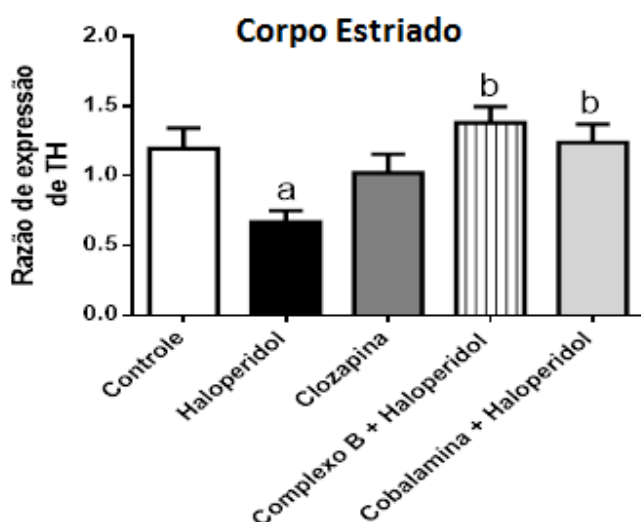
**Figura 22: Avaliação da expressão do receptor D2 no corpo estriado de animais tratados com cobalamina (vitamina B12) ou complexo B combinada ao haloperidol ou clozapina.**

A administração crônica de haloperidol, promoveu um aumento significativo da expressão do receptor D2 em comparação com os animais controle. O grupo clozapina também aumentou a expressão dopaminérgica do receptor, entretanto o aumento não foi tão expressivo como o grupo do haloperidol. O complexo B previniu o aumento da expressão de receptor D2 em animais tratados com Haloperidol. A cobalamina atenua parcialmente o aumento da expressão de D2 por haloperidol. N° de animais: 6-8  $p < 0,05$ . ANOVA e Student Newman Keuls como pós-teste hoc  $p < 0,05$ .

A administração crônica de haloperidol causou uma redução na expressão da TH quando comparada ao grupo controle. A administração concomitante da vitamina B12 ou



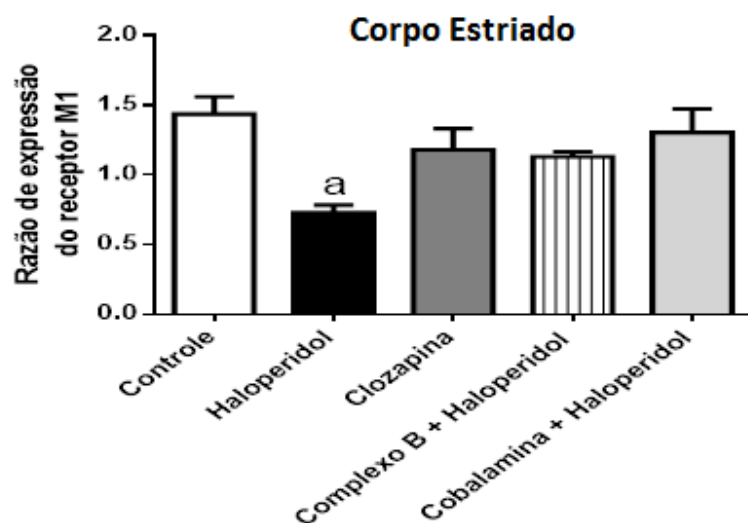
complexo B com haloperidol foi capaz de prevenir as alterações na TH induzidas pelo haloperidol. Não houve alteração na expressão da TH nos animais tratados cronicamente com clozapina.



**Figura 23: Avaliação da expressão do receptor TH no corpo estriado de animais tratados com cobalamina (vitamina B12) ou complexo B combinada ao haloperidol ou clozapina.**

A administração crônica de haloperidol, diminui a expressão do receptor TH, o mesmo não ocorreu com a Clozapina em comparação com os animais controle. O tratamento tanto do complexo B como cobalamina impediu a diminuição induzida por haloperidol. N° de animais: 6-8  $p < 0,05$ . ANOVA e Student Newman Keuls como pós-teste hoc  $p < 0,05$ .

O tratamento crônico com HAL reduziu a expressão dos receptores M1 em relação aos animais controle. Os animais administrados vit B12+HAL e complexo B + HAL, bem como os administrados cronicamente clozapina não apresentaram alteração na expressão do receptor M1.



**Figura 24: Avaliação da expressão do receptor M1 no corpo estriado de animais tratados com vitamina B12 ou complexo B combinada ao haloperidol ou clozapina.**

A administração crônica de haloperidol, diminui a expressão do receptor M1, o mesmo não ocorreu com a Clozapina em comparação com os animais controle. O tratamento tanto do complexo B como cobalamina atenuaram a diminuição induzida por haloperidol. N° de animais: 6-8  $p < 0,05$ . ANOVA e Student Newman Keuls como pós-teste hoc  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Nossos dados mostram, que os animais tratados durante 21 dias com HAL apresentaram aumento da expressão de receptores D2 acompanhado por redução da expressão da enzima tirosina hidroxilase e dos receptores M1. Estes resultados mostram, portanto, uma redução na transmissão colinérgica do corpo estriado de animais discinéticos acompanhada por um aumento da via D2, o que contribui ainda mais para a redução da função dos IChs evidenciada na DT. Corroborando com o nosso estudo ratos tratados durante 28 dias com HAL apresentaram uma maior expressão de receptores D2 (ROPKE, 2014). Este aumento da expressão do receptor D1 está associado a uma supregulação deste receptor causada pelo bloqueio por HAL.

Os distúrbios verificados na atividade da via indireta estão presentes em doenças que envolvem os NB. A hipoativação desta via também é apresentada por pacientes esquizofrênicos que possuem expressão aumentada de receptores D2 nos MSNs do estriado e da concentração mesolímbica de DA (ABI-DARGHAM et al., 2010; SIMPSON et al., 2010). Por sua vez, também ocorre hiperativação da via indireta na doença de Parkinson e discinesia tardia como resultado da perda progressiva de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (GERFEN e SURMEIER, 2011; DELONG E WICHMANN, 2007). Isso sugere que as vias direta e indireta trabalham em conjunto, num fino equilíbrio produzido pela modulação dopaminérgica em receptores D1 e D2 (CALABRESI et al., 2014; CAZORLA et al., 2014; SURMEIER, 2013; CUI et al., 2013).

A redução da expressão da TH, por outro lado, pode ser ocasionado pelo aumento da expressão de receptores D2 pré-sinápticos que estão relacionados a uma redução da síntese e liberação de dopamina. Este mecanismo está relacionado à inibição da fosforilação da TH via redução do AMPc intracelular (Lindgren et al., 2001).

Nossos resultados mostraram que a administração da vitamina B12, bem como do complexo B foi capaz de prevenir as alterações nos receptores D2, M1 e na TH ocasionadas pelo tratamento crônico com HAL. Neste contexto, as vitaminas B são uma estratégia promissora para a prevenção da DT.

## **V. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

**NO CAPÍTULO 1** Vitamina B atenua discinesia orofacial em ratos induzida por haloperidol: possível envolvimento de mecanismos antioxidante

- ✓ A administração diária de vitaminas B (B1: B6: B12 em 60: 60: 0,6 mg / kg) sozinha ou o coquetel de vitamina B, juntamente com HAL, impediu o desenvolvimento de OD.
- ✓ Tempo de catalepsia reduziu em todos grupos tratados com vitaminas B, mas em menor grau do que OD.
- ✓ A participação do estresse oxidativo foi avaliada pela determinação do nível da glutatona reduzida (GSH) e a formação de peróxidos de lípidos no corpo estriado. HAL diminuíram significativamente os níveis de GSH e reforçada de peroxidação lipídica, enquanto B1, B12 e coquetel de vitamina B evitou a diminuição dos níveis de GSH. Todos os grupos tratados com vitaminas B apresentaram uma redução na formação lipídica de peridoxico. Os dados sugerem um papel promissor para as vitaminas B na prevenção de OD( MACEDO, 2011)

**CAPÍTULO 2** Prevenção de alterações induzidas pelo haloperidol em atividade da acetilcolinesterase no cérebro por co-administração de vitaminas B em um modelo de roedor de discinesia tardia

- ✓ Administração de Vitaminas B (B1: B6: B12 a 60: 60: 0,6 mg / kg, sc) sozinha e coquetel de vitamina B co-administrado com haloperidol desenvolvimento impedido OD e um aumento da atividade da AchE em todas as áreas cerebrais estudadas, com o incremento máximo de atividade observada no hipocampo de animais co-tratados com vitamina B12 e coquetel de vitamina B. A fármaco, clozapina não induziu DT e aumentou a atividade AChE semelhante para os grupos co-administrados com vitamina B e HAL.  
Os dados apresentados sugerem que as vitaminas B pode evitar alterações induzidas pelo haloperidol em atividade AchE o que pode ser relacionado com mecanismo subjacente no seu efeito antidiscinetico (OLIVEIRA, 2013)

**CAPÍTULO 3** Investigar a expressão do RNAm dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2, bem como, muscarínico M1 e tirosina hidroxilase em ratos administrados haloperidol e coadministrados vitamina B12 e complexo B

- ✓ A análise da expressão de receptores e enzimas relacionadas à síntese de neurotransmissores no corpo estriado por PCR-RT revelou que o HAL foi capaz de aumentar a expressão de receptores dopaminérgicos D1 e D2 e reduzir a expressão dos receptores muscarínicos M1. A expressão da tirosina hidroxilase (TH) passo limitante para a síntese de dopamina apresentou-se reduzida pelo HAL. A administração da Vit B12 e complexo B foi capaz de prevenir estas alterações apresentando resultados semelhantes aos da clozapina. Os dados sugerem que as vit B são capazes de prevenir as alterações induzidas pelo HAL apresentando, portanto, um papel promissor na prevenção de DO associada ao uso desta fármaco.

## **VI.CONCLUSÃO**

---

## VI. CONCLUSÃO

A análise dos resultados apresentados nos capítulos deste trabalho, nos permitiu concluir que:

- ✓ O tratamento concomitante com vitaminas B, principalmente B12 e complexo B (B1, B6 e B12) é capaz de prevenir as alterações discinéticas induzidas pelo haloperidol. Mecanismos como efeito antioxidante e prevenção de alterações em mecanismos de neurotransmissão colinérgica e dopaminérgica estão envolvidos no mecanismo antidiscinético destas vitaminas.



## **VII.REFERENCIA**

---

## VII.REFERENCIA

ABILIO VC, ARAUJO CC, BERGAMO M, CALVENTE PR, D'ALMEIDA V, RIBEIRO RDE A, FRUSSA-FILHO R . Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 27: 109–114. 2003

ABREU PSB, SCHESTATSKY S, LOBATO MI. O uso da Clozapina em pacientes em pacientes esquizofrênicos. **J Brás Psiquiatr** ;44(2):59-62.1995

ADLER LA, ROTROSEN J, EDSON R, LAVORI P, LOHR J, HITZEMANN R, et al. Vitamin E treatment for tardive dyskinesia. Veterans Affairs Cooperative Study 394 Study Group. **Arch Gen Psychiatry** 56:836–841. 1999

AMERICAN HOSPITAL FORMULARY SERVICE. *Drug Information*. 41 ed. Bethesda: **American Society of Health- System Pharmacists**,. 3350p.1999

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Tardive Dyskinesia: a task force report of the American Psychiatric Association. Washington DC, **American Psychiatric Press**, 1994;

ANDERSON D. Antioxidant defenses against reactive species causing genetic and other damage. *Mutat Res* , Amsterdam, 350(1), 103-108, 1996.

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

BALDESSARINI, R.J. A plea for integrity of the bipolar disorder concept. **Bipolar Disorders**. 2, pp. 3–7, 2000

BALDESSARINI, R.J. Fármacos e o tratamento de distúrbios psiquiátricos - psicose e ansiedade. In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. editors) - *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9ed. México: The McGraw – Hill Companies, p.293-309.1996

BASCUNANA, H., VILLARREAL, I., ALFONSO, S., BERNABEU, M., TERRE, R. Agitation in head injury. I. Definition and treatment with anxiolytic neuroleptics and antiepileptic drugs. **Rev Neurol**. 30, pp. 850–854. 2000

BASSIT DP, LOUZĂNETO MR. eds. Discinesia tardia. São Paulo: **Casa do Psicólogo**, 1999

BAZIAN AS. Divergent and convergent mechanisms of the integrative activity of the mammalian brain. **Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova** 51: 514–528.2001

Barbosa, E. R.; Haddad, M.S. & Gonçalves, M. R. R. . Distúrbios do movimento. In: Nitrini, R. & Bacheschi, L. A. ***A neurologia que todo médico deve saber***. 2ª ed. São Paulo: Atheneu. (297-321) 2005

BISHNOI M, CHOPRA K, KULKARNI SK . Co-administration of nitric oxide (NO) donors prevents haloperidol-induced orofacial dyskinesia, oxidative damage and change in striatal dopamine levels. **Pharmacol Biochem Behav** 91: 423-429.2009

BISHNOI M, CHOPRA K, KULKARNI SK . Theophylline, adenosine receptor antagonist prevents behavioral, biochemical and neurochemical changes associated with an animal model of tardive dyskinesia. **Pharmacol Rep** 59:181 191. 2007

BUCHANAN RW. Clozapine: Efficacy and Safety. **Schizophr Bull**;21:4.1995

CABRINI L, BERGAMI R, FIORENTINI D, MARCHETTI M, LANDI L, TOLOMELLI .Vitamin B6 deficiency affects antioxidant defences in rat liver and heart.**Biochem Mol Biol Int** 46:689–697. 1998

CABRINI L, BERGAMI R, FIORENTINI D, MARCHETTI M, LANDI L, TOLOMELLI B Vitamin B6 deficiency affects antioxidant defences in rat liver and heart. **Biochem Mol Biol Int** 46:689–697. 1998

CADET JL, PERUMAL AS. Chronic treatment with prolixin causes oxidative stress in rat brain. **Biol Psychiatry** 1990;28:738–740, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-3223\(90\)90461-A](http://dx.doi.org/10.1016/0006-3223(90)90461-A).

CADET JL; LOHR JB. Possible involvement of free radical in neuroleptic-induced movement disorders.**Annals New York Academy of Sciences**; 570: 176-85. 1989;

CASEY DE. Motor and mental aspects of acute extrapyramidal syndromes. **Acta Psychiatr Scand** ; 89(suppl 380): 14-20. 1994

CERASA A, PUGLIESE P, MESSINA D, MORELLI M, GIOIA MC, SALSONE M, NOVELLINO F, NICOLETTI G, ARABIA G, QUATTRONE A Prefrontal alterations in Parkinson's disease with levodopa-induced dyskinesia during fMRI motor task. **Mov Disord** 27(3):364–371 2012

CHO CH, LEE HJ. Oxidative stress and tardive dyskinesia: Pharmacogenetic evidence. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 2012;pii: S0278–5846(12)00274-6. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.10.018.

CORRELL CU, SCHENK EM . Tardive dyskinesia and new antipsychotics. **Curr Opin Psychiatry** 21:151–156.2008

COSTALL B, NAYLOR RJ . On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. **Psychopharmacologia** 34: 233–241. 1974

CUESTA MJ, PERALTA V, ZARZUELA A. Effects of olanzapine and other antipsychotics on cognitive function in chronic schizophrenia: a longitudinal study. **Schizophr Res** 48, 17–28. 2001

DANIEL, D.G. Antipsychotic treatment of psychosis and agitation in the elderly. **J Clin Psychiatry**. 61pp. 49–52. 2000

DUGAN LL, CHOI DW . Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**. p. 723.1999

DUKE PJ, PANTELIS C, BARNES TRE. South Westminster schizophreniasurvey: alcohol use and its relationship to symptoms, tardive dyskinesia and illness onset. **B J Psychiatry** 164:630-636. 1994;

EBADI M Regulation and function of pyridoxal phosphate in CNS. *eurochem Int* 3(3–4):181–205 Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol** 7:88–95 1981

EGAN MF, APUD J, WYATT RJ. **Treatment of tardive dyskinesia.Schizophr Bull**; 23(4):583-609. 1997;

ELKASHEF, A.M.; WYATT, R.J. Tardive dyskinesia: possible involvement of free radicals and treatment with vitamin E. **Schizophr Bull** , 25, 731-740, 1999.

ELLENBROEK B, SCHWARZ M, SONTAG KH, JASPERS R, COOLS A. Muscular rigidity and delineation of a dopamine-specific neostriatal subregion: tonic EMG activity in rats. **Brain Res** 345:132–140. 1985

FREEDMAN R. SCHIZOPHRENIA – Drug Therapy. **N Engl J Med**;349:1738-49.2003

FRIEDMAN JI Cholinergic targets for cognitive enhancement in chizophrenia: focus on cholinesterase inhibitors and muscarinic agonists. **Psychopharmacology** 174(1):45–53 2004

GHADIRIAN AM, ANNABLE L, BÉLANGER MC, CHOUINARD G. A cross-sectional study of parkinsonism and tardive dyskinesia in lithium-treated affective disordered patients. **J Clin Psychiatry** 57:22-28, 1996;

GIBSON GE, SHEU KF, BLASS JP, BAKER A, CARLSON KC, HARDING B, PERRINO P . Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. **Arch Neurol** 45: 836-840.1988

GIBSON GE, ZHANG H Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. **Neurochem Int** 40(6):493–504 2002

GIBSON GE, ZHANG H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. **Neurochem Int** 40:493–504.2002

GLAZER WM. Expected incidence of tardive dyskinesia associated with atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 2000;61:21–26.

GRIMM JW, CHAPMAN MA, ZAHM DS, SEE RE Decreased choline acetyltransferase immunoreactivity in discrete striatal subregions following chronic haloperidol in rats. **Synapse** 39(1):51–57. 2001

Guyton, A. C. & Hall, J. E. The cerebellum, the basal ganglia, and overall motor control. In: **Textbook of medical physiology** . 9th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. (715-731) 1996.

GYORGY, P. Reminiscences on the Discovery on the Discovery and significance of some of the B vitamins. **J. Nutr., Bethesda**, v.91, n2, supl.1, p 5-9, feb.1967.

HANIG, R.C.; APRISON, M.H. Determination of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium, zinc and chloride concentrations in several brain areas. **Ann. Biochem**, 21, 169-177, 1967.

HEIMER L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. **Am J Psychiatry** ; 60: 1726- 39.2003

HENNA NETO, J. – Esquizofrenia Super-Resistente a Tratamento Antipsicótico: **Aspectos Clínicos e de Neuroimagem**. Projeto de Pesquisa de Doutorado em andamento no Departamento de Psiquiatria da FMUSP. 2001.

HEUSLER, P; TANCREDI, AN; LOOCK, T; CUSSAC, D. Antipsychotics differ in their ability to internalise human dopamine D2S and human serotonin 5-HT1A receptors in HEK293 cells. **European Journal of Pharmacology**, 581pp. 37-46. 2008,

HIROSE G. Drug induced parkinsonism: a review. **J Neurol** 253: III/22–III/24.2006

HOFER A, HUMMER M, KEMMLER G, KURZ M, KURZTHALER I, FLEISCHHACKER WW. The safety of clozapine in the treatment of first and multiple episode patients with treatment resistant schizophrenia. **Int J Neurosychopharmacol** ;6:201-206. 21. 2003

HOFF JI, VAN HILTEN BJ, ROOS RA . A review of the assessment of dyskinesias. **Mov Disord** 14:737–743. 1999

HOFFMAN DC, DONOVAN H. Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. **Psychopharmacology** (Berl) 120:128–133. 1995

JANN M. Clozapine. **Pharmacotherapy** ;11:179-195. 1991

JESTE DV, LACRO JP, PALMER B, ROCKWELL E, HARRIS MJ, CALIGIURI MP. Incidence of tardive dyskinesia in early stages of low-dose treatment with typical neuroleptics in older patients. **Am J Psychiatry**; 156(2):309-311. 1999;

JESTE DV, LOHR JB Hippocampal pathologic findings in schizophrenia. A morphometric study. **Arch Gen Psychiatry** 46 (11):1019–1024 1989

JESTE DV, LOHR JB, MANLEY M Study of neuropathologic changes in the striatum following 4, 8 and 12 months of treatment with fluphenazine in rats. 106(2):154–160. 1992

JOHNSTONE EC, CROW TJ, FERRIER IN, FRITH CD, OWENS DG, BOURNE RC, GAMBLE SJ Adverse effects of anticholinergic medication on positive schizophrenic symptoms. **Psychol Med** 13(3):513–527 1983

JONES CK, EBERLE EL, SHAW DB, MCKINZIE DL, SHANNON HE Pharmacologic interactions between the muscarinic cholinergic and dopaminergic systems in the modulation of prepulse inhibition in rats. **J Pharmacol Exp Ther** 312(3):1055–1063 2005

JONES CK, SHANNON HE Muscarinic cholinergic modulation of prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. **J Pharmacol Exp Ther** 294(3):1017–1023 2000

KAHN RS, DAVIDSON M, SIEVER L. Serotonin function and treatment response to clozapine in schizophrenic patients. **Am J Psychiatry**;150:1337-42. 1993

KANE JM. Extrapyramidal side effects are unacceptable. Eur **Neuropsychopharmacol** 11 (Suppl 4):S397–S403.2001

KANE JM, MARGARET GW, POLLACK, S. Does clozapine cause tardive dyskinesia? **J Clin Psychiatry** ;54:327-30.1993

KANE JM, MAYERHOFF D. Do negative symptoms respond to pharmacological treatment? **Br J Psychiatry Suppl** ;7:115-8.1989

KANE JM, WOERNER M, LIEBERMAN J (1988) Epidemiological aspects of tardive dyskinesia. *Encephale* 14(Spec No):191–194

KANE JM, WOERNER M, LIEBERMAN J. Tardive dyskinesia: prevalence, incidence, and risk factors. **J Clin Psychopharmacol** 8:52S–56S.1988

KANE JM. Tardive dyskinesia in affective disorder. **J Clin Psychiatry** 60(5):43-47. 1999;

KANE JM. Tardive dyskinesia: epidemiological and clinical presentation. In: Bloom FE, Kupfer DJ. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. 4th edition. **New York, Raven Press**, 1485-95. 1995;

KARAKULA H, OPOLSKA A, KOWAL A, DOMANSKI M, PLOTKA A, PERZYNSKI J. Does diet affect our mood The significance of folic acid and homocysteine. **PolMerkur Lekarski** 26:136–141, 2009.

KARAKULA H, OPOLSKA A, KOWAL A, DOMANSKI M, PLOTKA A, PERZYNSKI J. Does diet affect our mood The significance of folic acid and homocysteine. *Pol Merkur Lekarski* 26:136–141.2009

KIRIAKAKIS V, BHATIA KP, GUINN NP, MARSDEN CD. The natural history of tardive dystonia. A long-term follow-up study of 107 cases. *Brain* 1998;121: 2053–2066, doi: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/121.11.2053>.

KOROLKOVAS, A. Fármacos psicotrópicos. In: *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 8ed., Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 583p.2001

LARSON, N.A.; et al. Topographical distribution of arsenic, manganese, and selenium in the human brain. **J Neurol Sci** , 42, 407-416, 1979

LATIMER PR . Tardive dyskinesia: a review. *Can J Psychiatry* 40:S49–S54.1995

LERNER V, KAPTSAN A, MIODOWNIK C, KOTLER M . Vitamin B6 in treatment of tardive dyskinesia: a preliminary case series study. *Clin Neuropharmacol* 22:241–243. 1999

LERNER V, KAPTSAN A, MIODOWNIK C, KOTLER M. Vitamin B6 in treatment of tardive dyskinesia: a preliminary case series study. **Clin Neuropharmacol**22:241–243, 1999

LERNER V, MIODOWNIK C, KAPTSAN A, BERSUDSKY Y, LIBOV I, SELA BA, WITZTUM E . Vitamin B6 treatment for tardive dyskinesia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. **J Clin Psychiatry** 68(11):1648–1654 2007

LERNER V, MIODOWNIK C, KAPTSAN A, BERSUDSKY Y, LIBOV I, SELA BA, WITZTUM E . Vitamin B6 treatment for tardive dyskinesia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. **J Clin Psychiatry** 68(11):1648–1654. 2007

LERNER V, MIODOWNIK C, KAPTSAN A, BERSUDSKY Y, LIBOV I, SELA BA, WITZTUM E . Vitamin B6 treatment for tardive dyskinesia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. **J Clin Psychiatry** 68:1648–1654.2007

LERNER V, MIODOWNIK C, KAPTSAN A, COHEN H, MATAR M, LOEWENTHAL U, KOTLER M Vitamin B(6) in the treatment of tardive dyskinesia: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. **Am J Psychiatry** 158:1511–1514, 2001.

LERNER V, MIODOWNIK C, KAPTSAN A, COHEN H, MATAR M, LOEWENTHAL U, KOTLER M. Vitamin B(6) in the treatment of tardive dyskinesia: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. **Am J Psychiatry** 158:1511–1514. 2001

LIDDLE PF, BARNES TR, SPELLER J, KIBEL D. Negative symptoms as a risk factor for tardive dyskinesia in schizophrenia. **B J Psychiatry** 163:776-780, 1993;

LIEBERMAN JA, KANE JM, JOHNS CA. Clozapine: guidelines for clinical management. **J Clin Psychiatry** ;50:329-38.1989

LIEBERMAN JA. Clinical effects of clozapine in chronic schizophrenia: response to treatment and predictors of outcome. **Am J Psychiatry** ;151:12. 1994

LOHR JB, KUCZENSKI R, NICULESCU AB Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. **CNS Drugs** 17:47–62. (2003).

LORENC-KOCI E, WOLFARTH S, OSSOWSKA K . Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of parkinsonian rigidity. *Exp Brain Res* 109:268–276.1996

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193(1):265–275. 1951

MACEDO DS, DE OLIVEIRA GV, LIMA GOMES PX, RAMOS DE ARAUJO FY, DE SOUZA CM, MENDES VASCONCELOS SM, DE BARROS VIANA GS, FLORENCO DE SOUSA FC, CARVALHO AF B vitamins attenuate haloperidol-induced orofacial dyskinesia in rats: possible involvement of antioxidant mechanisms. **Behav Pharmacol** 22(7):674– 680, 2011

MACEDO DS, DE OLIVEIRA GV, LIMA GOMES PX, RAMOS DE ARAUJO FY, DE SOUZA CM, MENDES VASCONCELOS SM, DE BARROS VIANA GS, FLORENCO DE SOUSA FC, CARVALHO AF B vitamins attenuate haloperidol-induced orofacial dyskinesia in rats: possible involvement of antioxidant mechanisms. **Behav Pharmacol** 22(7):674– 680. 2011

MAHADIK SP, LAEV H, KORENOVSKY A, KARPIAK SE Haloperidol alters rat CNS cholinergic system—enzymatic and morphological analyses. **Biol Psychiatry** 24(2):199–217. doi:10.1016/0006-3223 (88)90275-2 1988

MAHADIK SP, MUKHERJEE S Monosialoganglioside cotreatment prevents haloperidol treatment-associated loss of cholinergic enzymes in rat brain. *Biol Psychiatry* 38(4):246–254. doi:10.1016/ 0006-3223(94)00304-I 1995



MAHFOUZ MM, ZHOU SQ, KUMMEROW FA. Vitamin B6 compounds are capable of reducing the superoxide radical and lipid peroxide levels induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vascular endothelial cells in culture. **Int J Vitam Nutr Res** 79: 218–229.2009

MARGOLESE HC, CHOUINARD G, KOLIVAKIS TT, BEAUCLAIR L, MILLER R tardive dyskinesia in the era of typical and atypical antipsychotics. Part 1. pathophysiology and mechanisms of induction. *Can J Psychiatry* 50: 541–547. 2005

MARTELLA G, TASSONE A, SCIAMANNA G, PLATANIA P, CUOMO D, VISCOMIT, BONSI P, CACCI E, BIAGIONI S, USIELLO A, BERNARDI G, SHARMA N, STANDAERT DG, PISANI A Impairment of bidirectional synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of DYT1 dystonia: **role of endogenous acetylcholine**. *Brain* 132(Pt 9):2336–2349. doi:10.1093/brain/awp194 2009

MARTINDALE: *The Extra Pharmacopoea*. 32ed. Tauton Massachusetts: **World Color Book Services**. 2315p.1999

MELTZER H. Novel Antipsychotic Drugs. **Raven Press**;1:1-13.1992

MELTZER HY. Measuring outcome in schizophrenia: differences among atypical antipsychotics. **J Clin Psychiatry** ;59:3-9. 1998

METZ TO, ALDERSON NL, THORPE SR, BAYNES JW . Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications. **Arch Biochem Biophys** 419:41–49.2003

MILLER R, CHOUINARD G Loss of striatal cholinergic neurons as a basis for tardive and L-dopa-induced dyskinesias, neuroleptic-induced supersensitivity psychosis and refractory schizophrenia. **Biol Psychiatry** 34(10):713–738 1993

MIODOWNIK C, COHEN H, KOTLER M, LERNER V. Vitamin B6 add-on therapy in treatment of schizophrenic patients with psychotic symptoms and movement disorders. **Harefuah** 142:592–596,647. 2003

MITCHELL IJ, COOPER AC, GRIFFITHS MR, COOPER AJ . Acute administration of haloperidol induces apoptosis of neurones in the striatum and substantia nigra in the rat. **Neuroscience** 109:89–99.2002

MORRIS JK, BOMHOFF GL, STANFORD JA, GEIGER PC. Neurodegeneration in an animal model of Parkinson's disease is exacerbated by a high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R1082–R1090. 2010

NAIDU PS, KULKARNI SK . Excitatory mechanisms in neuroleptic-induced vacuous chewing movements (VCMs): possible involvement of calcium and nitric oxide. **Behav Pharmacol** 12:209–216. 2001

NAIDU PS, SINGH A, KULKARNI SK Quercetin, a bioflavonoid, attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia. **Neuropharmacology** 44(8):1100–1106 2003

NAIDU PS, SINGH A, KULKARNI SK . Quercetin, a bioflavonoid, attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia. **Neuropharmacology** 44:1100–1106.2003

NAIR V, ARJUMAN A, GOPALAKRISHNA HN, NANDINI M . Effect of *Withania somnifera* root extract on haloperidol-induced catalepsy in albino mice. **Phytother Res** 22:243–246.2008

NEAL-BELIVEAU BS, JOYCE JN, LUCKI I . Serotonergic involvement in haloperidol-induced catalepsy. **J Pharmacol Exp Ther** 265:207–217. 1993

OKUYAMA S . Atypical antipsychotic profiles of sigma receptor ligands. **Nippon Yakurigaku Zasshi** 114:13–23.1999

OLIANAS MC, MAULLU C, ONALI P Mixed agonist–antagonista properties of clozapine at different human cloned muscarinic receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells. **Neuropsychopharmacology** 20(3):263–270. doi:10.1016/s0893-133x(98)00048-7 1999

OLIVEIRA GV; MACEDO D S.Prevention of haloperidol-induced alterations in brain acetylcholinesterase activity by vitamins B co-administration in a rodent model of tardive dyskinesia **Metab Brain Dis**, 20013

OLIVEIRA, I.R. Antipsicóticos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.271-290.2002

PEREIRA RP, FACHINETTO R, ADS P, WAGNER C, SUDATI JH, BOLIGON AA, ATHAYDE ML, MORSCH VM, TEIXEIRA ROCHA JB Valeriana officinalis ameliorates vacuolar chewing movements induced by reserpine in rats. **J Neural Transm** 118(11):1547– 1557. doi:10.1007/s00702-011-0640-7 2011

PISANI A, BERNARDI G, DING J, SURMEIER DJ Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. **Trends Neurosci** 30(10):545–553. doi:10.1016/j.tins.2007.07.008 Raja M (2011) Clozapine safety, 35 years later. **Curr Drug Saf** 6 (3):164–184 2007

QING H, XU H,WEI Z, GIBSON K, LI XM The ability of atypical antipsychotic drugs versus haloperidol to protect PC12 cells against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis. **Eur J Neurosci** 17:1563–1570.2003

RASHEED AS, VENKATARAMAN S, JAYAVEERA KN, FAZIL AM, YASODHA KJ, ALEEM MA, et al. Evaluation of toxicological and antioxidant potential of *Nardostachys jatamansi* in reversing haloperidol-induced catalepsy in rats. **Int J Gen Med** 3:127–136. 2010

- ROGOZA RM, FAIRFAX DF, HENRY P, N-MARANDI S, KHAN RF, GUPTA SK, MISHRA RK. Electron spin resonance spectroscopy reveals alpha-phenyl-N tertbutylnitron spin-traps free radicals in rat striatum and prevents haloperidolinduced vacuous chewing movements in the rat model of human tardive dyskinesia. **Synapse** 54:156–163. 2004
- SACGDEV P, KRUK J, KNEEBONE M. Clozapine-induced neuroleptic malignant syndrome: review and report of new cases. **J Clin Psychopharmacol**;15:365-71.1995
- SASAKI H, MATSUZAKI Y,MEGURO K, IKARASHI Y,MARUYAMA Y, YAMAGUCHI S, SEKIZAWA K (1992) Vitamin B12 improves cognitive disturbance in rodents fed a choline-deficient diet. **Pharmacol Biochem Behav** 43 (2):635–639
- SEDLAK J, HANUS L. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. **Endocrinol Exp** 16:103–109. 1982
- SEEMAN P. Dopamine D2 receptors as treatment targets in schizophrenia. *Clin Schizophr Relat Psychoses* 2010;4:56–73, doi: <http://dx.doi.org/10.3371/CSRP.4.1.5>.
- SEEMAN P, CHAU-WONG M, TEDESCO J, WONG K. Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(11):4376-4380.
- SEGMAN RH, HERESCO-LEVY U, FINKEL B, et al. Association between the serotonin 2A receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001;6:225–229, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4000842>.
- SHARMA H. Treatment of Tardive Dyskinesia by tetrabenazine, clonazepam and vitamin E. **Indian J Psychiatry** 51:162–163. 2009
- SHARMA S, PALADINO P, GABRIELE J, SAEEDI H, HENRY P, CHANG M, et al. Pro-Leu-glycinamide and its peptidomimetic, PAOPA, attenuate haloperidol induced vacuous chewing movements in rat: a model of human tardive dyskinesia. **Peptides** 24:313–319. 2003
- SETHI K, MORGAN J: Trastornos del movimiento inducidos por fármacos. In: *Enfermedad de Parkinson y trastornos del movimiento*: CIDADE, Lippincott Williams and Wilkins:394-408 2006
- SHEU KF, CALINGASAN NY, LINDSAY JG, GIBSON GE Immunochemical characterization of the deficiency of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in thiamine-deficient rat brain. **J Neurochem** 70:1143–1150. 1998
- SOROLLA MA, RODRIGUEZ-COLMAN MJ, TAMARIT J, ORTEGA Z, LUCAS JJ, FERRER I, ET AL. Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism. **Free Radic Biol Med** 49:612–621. 2010

STRACKE H, HAMMES HP, WERKMANN D, MAVRAKIS K, BITSCH I, NETZEL M, ET AL. Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 109:330–336. 2001

STRACKE H, LINDEMANN A, FEDERLIN K. A benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 104:311–316. 1996

TAMMINGA CA, WOERNER MG CLINICAL course and cellular pathology of tardive dyskinesia. In: Davies KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (eds) *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. American College of **Neuropsychopharmacology**, pp 1831–18412 2002

TANDON R Cholinergic aspects of schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* 37:7–11  
Thomas TM, Smith Y, Levey AI, Hersch SM Cortical inputs to m2-immunoreactive striatal interneurons in rat and monkey. *Synapse* 37(4):252–261. doi:10.1002/1098-2396(20000915)37:4<252::AID-SYN2>3.0.CO;2-A 2000

Teo JT, Edwards MJ, Bhatia K. Tardive dyskinesia is caused by maladaptive synaptic plasticity: a hypothesis. *Mov Disord* 2012;27:1205–1215, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25107>.

THAAKUR S, HIMABINDHU G . Effect of alpha lipoic acid on the tardive dyskinesia and oxidative stress induced by haloperidol in rats. **j neural Transm** 116:807–814. 2009

TREVIZOL F, BENVEGNI DM, BARCELOS RC, PASE CS, SEGAT HJ, DIAS VT, ET AL. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: Prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. **Behav Brain Res** 221:13–18. 2011

UKAIW, OZAWA H, TATENO M, HASHIMOTO E, SAITO T . Neurotoxic potential of haloperidol in comparison with risperidone: implication of Akt-mediated signal changes by haloperidol. **J Neural Transm** 111:667–681. 2004

WISE RA. Forebrain substrates of reward and motivation. **J Comp Neurol**; 493: 115-21. 2005

WOODS SW, MORGENSTERN H, SAKSA JR, WALSH BC, SULLIVAN MC, MONEY R, HAWKINS KA, GUEORGUIEVA RV, GLAZER WM Incidence of tardive dyskinesia with atypical versus conventional antipsychotic medications: a prospective cohort study. **J Clin Psychiatry** 71(4):463–474. doi:10.4088/JCP.07m03890yel 2010

WOODS SW, MORGENSTERN H, SAKSA JR, WALSH BC, SULLIVAN MC, MONEY R, et al. Incidence of tardive dyskinesia with atypical versus conventional antipsychotic medications: a prospective cohort study. **J Clin Psychiatry** 71:463–474. 2010

YAN Z, SONG WJ, SURMEIER J D2 dopamine receptors reduce Ntype Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. **J Neurophysiol** 77(2):1003–1015 1997

YAN Z, SURMEIER DJ D5 DOPAMINE RECEPTORS ENHANCE ZN<sup>2+</sup> + SENSITIVE GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. **Neuron** 19(5):1115– 1126 1997

YUDKOFF M, PLEASURE D, CREGAR L, LIN ZP, NISSIM I, STERN J. Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [<sup>15</sup>N]glutamate. **J Neurochem**; 55:137–145. 1990

ZAI CC, TIWARI AK, BASILE V, DE LUCA V, MULLER DJ, VOINESKOS AN, ET AL. Oxidative stress in tardive dyskinesia: genetic association study and metaanalysis of NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and superoxide dismutase 2 (SOD2, MnSOD) genes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:50–56. 2010

ZHANG XY, TAN YL, ZHOU DF, CAO LY, WU GY, HAILE CN, ET AL. Disrupted antioxidant enzyme activity and elevated lipid peroxidation products in schizophrenic patients with tardive dyskinesia. **J Clin Psychiatry** 68: 754–760. 2007

## VIII. APÊNDICE

---

## VIII. APÊNDICE

## APÊNDICE 1

NCBI Resources How To

PubMed.gov  
US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

PubMed Advanced

Abstract Send to:

Behav Pharmacol. 2011 Oct;22(7):674-80. doi: 10.1097/FBP.0b013e32834aff6d.

**B vitamins attenuate haloperidol-induced orofacial dyskinesia in rats: possible involvement of antioxidant mechanisms.**

Macêdo DS<sup>1</sup>, Oliveira GV, Gomes PX, Araújo FY, Souza CM, Vasconcelos SM, Viana GS, Sousa FC, Carvalho AF.

Author information

**Abstract**

Tardive dyskinesia (TD) is a serious motor disorder related to antipsychotic therapy, whose pathophysiology is associated to oxidative stress. Treatments that maintain antipsychotic efficacy while reducing TD risk are awaited. Haloperidol (HAL), a typical antipsychotic, is used as a putative murine model of TD. Here, we evaluated the protective role of vitamins B1, B6, and B12 alone or in combination (vitamin B cocktail) in preventing the HAL-induced orofacial dyskinesia (OD), based on their antioxidant properties. HAL (1 mg/kg) administered intraperitoneally to Wistar rats for 21 days caused OD and increased catalepsy time. The daily administration of B vitamins (B1 : B6 : B12 at 60 : 60 : 0.6 mg/kg) alone or the vitamin B cocktail, along with HAL, prevented the development of OD. Catalepsy time reduced in all groups treated with B vitamins, but to a lesser extent than OD. The participation of oxidative stress was assessed by the determination of reduced glutathione (GSH) levels and lipid peroxide formation in the striatum. HAL significantly decreased GSH levels and enhanced lipid peroxidation, whereas B1, B12, and vitamin B cocktail prevented the decrease in GSH levels. All groups treated with B vitamins presented a decrease in lipid peroxide formation. The data suggest a promising role for B vitamins in the prevention of OD.

PMID: 21918383 [PubMed - indexed for MEDLINE]

MeSH Terms, Substances

LinkOut - more resources



## APÊNDICE 2

NCBI Resources How To

PubMed.gov  
US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

PubMed Advanced

Abstract ▾ Send to: ▾

Metab Brain Dis. 2013 Mar;28(1):53-9. doi: 10.1007/s11011-012-9345-3. Epub 2012 Oct 25.

**Prevention of haloperidol-induced alterations in brain acetylcholinesterase activity by vitamins B co-administration in a rodent model of tardive dyskinesia.**




de Oliveira GV<sup>1</sup>, Gomes PX, de Araújo FY, Vasconcelos SM, Júnior HV, de Sousa FC, de Lucena DF, Hyphantis TN, Carvalho AF, Macêdo DS.

⊕ Author information

**Abstract**

Tardive dyskinesia (TD) is an iatrogenic syndrome being a significant adverse outcome of typical and atypical antipsychotic therapy. Recently we demonstrated that vitamins B (B1, B6, B12 alone or in combination) were able to prevent haloperidol-induced orofacial dyskinesia (OD) possibly by their antioxidant activity in the striatum, using a well-established model of TD. Here, based on the fact that alterations in cholinergic neurotransmission are related to TD pathophysiology and that vitamins B seems to influence brain cholinergic neurotransmission, we decided to investigate the effects of vitamins B1, B6, B12 and their association, vitamin B cocktail in haloperidol-induced cholinergic alterations, evaluated by alterations in acetylcholinesterase (AChE) activity, in striatum, prefrontal cortex and hippocampus, as a way to determine the participation of cholinergic neurotransmission, in these vitamins antidyskinetic mechanism. Haloperidol 1 mg/kg i.p. daily administration during 21 days to Wistar rats caused OD while decreased AChE activity in all brain areas studied. Vitamins B administration (B1:B6:B12 at 60:60:0.6 mg/kg, s.c) alone and vitamin B cocktail co-administered with haloperidol prevented OD development and increased AChE activity in all brain areas studied, with the maximum activity increment observed in the hippocampus of the animals co-treated with vitamin B12 and vitamin B cocktail. The antidyskinetic drug, clozapine did not induce OD and increased AChE activity similarly to the groups coadministered with vitamin B and HAL. The present data suggest that vitamins B can prevent haloperidol-induced alterations in AChE activity what can be related to the mechanism underlying their antidyskinetic effect.

PMID: 23095989 [PubMed - indexed for MEDLINE]

MeSH Terms, Substances ▾

LinkOut - more resources ▾