



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

DINO CESAR DA SILVA CLEMENTE

**ESTUDO DO EFEITO DO BETA-CARIOFILENO NO MODELO DE
ESQUIZOFRENIA INDUZIDA POR CETAMINA EM CAMUNDONGOS.**

FORTALEZA

2019

DINO CESAR DA SILVA CLEMENTE

**ESTUDO DO EFEITO DO BETA-CARIOFILENO NO MODELO DE
ESQUIZOFRENIA INDUZIDA POR CETAMINA EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia.

Orientador: Prof. Dr. David Freitas de
Lucena

Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle
Macêdo

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S579e Silva Clemente, Dino Cesar da.
Estudo do efeito do Beta-cariofileno no modelo de esquizofrenia induzida por cetamina em camundongos / Dino Cesar da Silva Clemente. – 2019.
105 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. David Freitas de Lucena.

Coorientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Beta-cariofileno. 2. Olanzapina. 3. Agonista canabinoide. 4. Esquizofrenia. 5. Antipsicótico. I. Título.

CDD 615.1

DINO CESAR DA SILVA CLEMENTE

**ESTUDO DO EFEITO DO BETA-CARIOFILENO NO MODELO DE ESQUIZOFRENIA
INDUZIDA POR CETAMINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia.

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. David Freitas de Lucena
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Germana Silva Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará- UFC

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para conseguir ir em frente.

Aos meus pais, Ana Maria Borges de Oliveira (*in memoriam*) e Paulo César da Silva Clemente(*in memoriam*), que em vida foram meu alicerce e base para que eu não desistisse dos meus sonhos.

À minha irmã Ana Paula e ao meu sobrinho Samuel Oliveira, por acreditarem e aceitarem as minhas ausências.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. David de Lucena (orientador) e a Profa. Dra. Danielle Macêdo (coorientadora), pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo da minha formação e principalmente pela amizade e confiança na execução deste trabalho. Além de minha gratidão, admiro-os por seu caráter e sabedoria.

Ao Adriano Maia, um grande amigo que esteve me apoiando durante essa jornada. Pessoa essencial que contribuiu muito com seus ensinamentos para que este trabalho fosse realizado.

Sou muito grato por sua atenção, paciência e constante disponibilidade.

À Talita Matias minha amiga que esteve comigo nos momentos difíceis, mas que também contribuiu muito me passando suas experiências. Agradeço por sua fiel amizade.

Ao João Victor, meu amigo, gentil e inteligente, que ajudou na execução da parte prática deste trabalho.

À amiga e incentivadora Kátia Cilene, que me dava forças nos dias de estudo antes da seleção do programa e contribuiu na organização dos experimentos.

À técnica do laboratório Vilanir, que me acolheu tão bem e me deu sua benção com a medalha de São Bento.

Aos amigos de laboratório, agradeço-os: Natássia Lopes, Tatiane Araújo, Tatiana Queiroz, Ingrid, Nayana, Michele Jales, Roberta e Pedro Everson.

Em especial agradeço à minha equipe: Charliene Freire, Karol, Raica, Gabrielle, Michele Verde, Paloma Jucá, Cid Pinto, que contribuíram com a organização e planejamento nos dias de teste de comportamento.

À Profa. Ms. Rafaelly Siqueira, por ter acreditado em meu potencial e por ter me apresentado ao mundo fascinante da pesquisa. Obrigado por ser a pessoa em que sempre irei me espelhar.

À Profa. Dra. Germana Silva Vasconcelos, por gentilmente ter aceitado participar da minha banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Ricardo Lima, por gentilmente ter aceitado participar da minha banca examinadora.

Às secretarias do programa, pela grande ajuda e apoio.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela possibilidade de realização deste curso de Pós-Graduação.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“Um sonhador é alguém que só consegue encontrar seu caminho à luz da lua, e seu castigo é ver o amanhecer antes do resto do mundo”.

Oscar Wilde.

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno caracterizado pela presença de sintomas positivos, negativos e cognitivos, cuja farmacoterapia atual tem sido paliativa e de eficácia limitada. Assim, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de fármacos úteis no tratamento desse transtorno são de interesse. Nesse contexto, fitocanabinoides podem constituir uma fonte potencial para a modulação de sintomas da esquizofrenia. O beta-cariofileno (BCF) tem ação agonista CB2 e possui atividade antipsicótica. Os receptores CB2 estão bem caracterizados membros dos receptores acoplados à proteína G geralmente com proteínas G na família Gi/o e como a ativação de CB2 por ligantes canabinoides é não psicotrópica, considera-se o estudo de agonistas deste receptor promissor para intervenções terapêuticas, com potencial para aliviar os sintomas, sem causar efeitos colaterais ao sistema nervoso central. Desta forma, nosso estudo investigou as alterações comportamentais e neuroquímicas de animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia e avaliou se o tratamento com BCF foi capaz de reverter as alterações comportamentais e neuroquímicas em um modelo animal de esquizofrenia induzida por cetamina (20 mg / kg, i.p). No tratamento de reversão, camundongos Swiss machos adultos receberam solução salina ou cetamina (KET) por 14 dias. Do 8º ao 14º dia receberam adicionalmente BCF (10 ou 50 mg/kg, v.o) e olanzapina (OLANZA) (2,5 mg-kg, i.p) usada como antipsicótico padrão, 30 minutos após salina ou cetamina. Avaliamos os sintomas positivos (atividade locomotora e inibição pré- pulso - IPP), sintomas negativos (interação social) e cognitivos (labirinto em Y). Os parâmetros de estresse oxidativo, glutathiona reduzida (GSH), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nitrito foram medidos no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Também foram realizados os *dockings* moleculares entre BCF e receptor nuclear - PPAR α , BCF e receptor canabinoide CB2, BCF e enzima hidroxilase amida de ácidos graxos - FAAH, canabidiol – CBD e receptor PPAR α , CBD e receptor CB2, CBD e FAAH. O BCF reverteu alterações induzidas pela cetamina demonstrado nos parâmetros comportamentais e marcadores oxidativo, ou seja, redução do conteúdo de TBARS e diminuição dos níveis de nitrito no hipocampo. No estudo de *docking* molecular BCF mostrou compatibilidade química, espacial e energética com receptor CB2, a enzima FAAH e o receptor PPAR α . Nossos resultados apontam o potencial efeito antipsicótico do BCF na reversão do transtorno semelhante ao esquizofrênico e sugere que sua eficácia terapêutica com ação neuroprotetora e significativa por suas atividades antioxidantes e nitrérgicas, além de exibir interação com receptor CB2.

Palavras-Chave: Beta-cariofileno. Olanzapina. Agonista canabinoide. Esquizofrenia.
Antipsicótico.

ABSTRACT

BETA-CARYOPHYLLENE EFFECT STUDY ON KETAMINE-INDUCED SCHIZOPHRENIA MODEL IN MICE

Schizophrenia is a disorder characterized by the presence of negative and positive symptoms, whose current pharmacotherapy has been palliative and limited effectiveness. Thus, researches related to the development of drugs useful in the treatment of this disorder are of interest. In this context, phytocannabinoids may be a potential source for the modulation of symptoms of schizophrenia. Beta-caryophyllene (BCF) has CB2 agonist action and has antipsychotic activity. CB2 receptors have been triggered in a controlled manner by G protein-coupled receptors as active receptor cells are capable of activating therapeutic plaques, with potential to relieve symptoms, without collateral variations to the central nervous system. The present study investigated the behavioral and neurochemical alterations of animals submitted to the model similar to ketamine-induced schizophrenia (20 mg/kg, i.p.) and possible reversion with beta-caryophyllene was observed. In reversal treatment, adult male Swiss mice received either saline or ketamine for 14 days. On the 8th to 14th day they also received beta-caryophyllene (10 or 50 mg/kg, p.o.) and olanzapine (2.5 mg/kg, i.p.) used as standard antipsychotic, 30 minutes after saline or ketamine. Behavioral tests to evaluate positive symptoms, locomotor activity (open field) and pre-pulse inhibition (PPI), negative symptoms (social interaction) and cognitive (labyrinth in Y) were performed. The parameters of oxidative stress, reduced glutathione (GSH), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and nitrite were measured in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum. The molecular fittings between BCF and *peroxisome proliferator activated* receptor alpha - PPAR α , BCF and receptor CB2, BCF enzyme *fatty acid amide hydrolase* - FAAH and cannabidiol- CBD receptor PPAR α , CBD and receptor CB2, CBD receptor FAAH receptor were also carried out. BCF reversed changes induced by ketamine demonstrated in behavioral parameters and oxidative markers, that is, reduction of TBARS content and decrease of nitrite levels in, hippocampus. In the study of molecular docking BCF showed chemical, spatial and energetic compatibility with CB2 receptor, FAAH enzyme and PPAR α receptor. Our results point to the potential antipsychotic effect of BCF in the reversal of the schizophrenic-like disorder and suggest that its therapeutic efficacy with neuroprotective

action is significant for its antioxidant, nitregeric activities, besides displaying interaction with CB2 receiver.

Keywords: Beta-caryophyllene. Olanzapine. Cannabinoid agonist. Schizophrenia. Antipsychotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quatro projeções das vias dopaminérgicas.....	15
Figura 2 - Principais funções das vias centrais da dopamina.....	16
Figura 3 - Representação simplificada das estruturas glutamatérgicas.....	18
Figura 4 - Estrutura química do Beta-cariofileno	25
Figura 5 - Os múltiplos receptores alvos do Beta-cariofileno.....	28
Figura 6 - Esquema simplificado do mecanismo de inibição pré-pulso (IPP).....	30
Figura 7 - Drogas utilizadas nos experimentos	35
Figura 8 . Representação esquemática do tratamento dos grupos controle.....	37
Figura 9 . Representação esquemática do tratamento dos grupos tratamento.....	38
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental.....	39
Figura 11 - Arena de campo aberto, utilizado para avaliar ação de fármacos sobre a atividade locomotora.....	38
Figura 12 - Aparelho câmara de Inibição Pré Pulso, utilizado para avaliar o déficit de inibição pré pulso.....	39
Figura 13 - Aparato Labirinto em Y.....	40
Figura 14 - Desenho ilustrativo do aparato usado para avaliação da sociabilidade.....	41
Figura 15 –Número de cruzamentos	45
Figura 16 - Porcentagem de inibição pré-pulso.....	47
Figura 17 - Porcentagem de alterações corretas no teste de labirinto em Y).....	48
Figura 18 -Porcentagem de interação social.....	50
Figura 19 - Níveis de glutathione redutase (GSH)	52
Figura 20 - Níveis de peroxidação lipídica.....	55
Figura 21 - Níveis de Nitrito.....	57
Figura 22 - <i>Docking</i> BCF com receptor CB2.....	66
Figura 23 - Redocking CB2.....	67
Figura 24 - <i>Docking</i> CBD com receptor CB2.....	68
Figura 25 – <i>Docking</i> interação de FAAH com BCF.....	69
Figura 26 –Redocking FAAH.....	70
Figura 27 – <i>Docking</i> interação de FAAH com CBD.....	71

Figura 28- <i>Docking</i> interação de BCF com PPAR α	72
Figura 29- Redocking PPAR α	73
Figura 30- <i>Docking</i> interação de CBD com PPAR α	74
Figura 31- Resumo esquemático dos resultados obtidos na pesquisa.....	75

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Principais estudos e doenças que BCF apresentou efeito terapêutico.....	24
Tabela 1 - Predição de alvos do BCF pelo servidor SwissTargetPrediction.....	62
Tabela 2 - Escores de docking do BCF para os alvos protéicos mais promissores apontados pela predição computacional.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina 3'5' - mono fosfato cíclico
BCF	Beta-cariofileno
CBD	Canabidiol
CB2	receptor canabinóide
CE	Corpo Estriado
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CPF	Córtex Pré-Frontal
DA	Dopamina
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
FAAH	<i>fatty acid amide hydrolase</i>
GSH	Glutathiona Reduzida
HC	Hipocampo
H3PO4	Ácido Fosfórico
IPP	Inibição Pré- Pulso
KET	Cetamina
MDA	Malondialdeido
NMDA	N-metil-D- aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O2	Oxigênio Molecular
PCP	Fenciclidina

PPAR α *peroxisome proliferator activated* receptor alpha

SNC Sistema Nervoso Central

TBARS Ácido Tiobarbitúrico

5HT2 5- Hidroxitriptamina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1 Esquizofrenia	13
1.2 Fisiopatologia da Esquizofrenia	14
1.2.1 Hipótese Dopaminérgica e Esquizofrenia	15
1.2.2 Hipótese Glutamatérgica e Esquizofrenia.....	17
1.2.3- Estresse oxidativo e Esquizofrenia	19
1.3 Tratamento Farmacológico da Esquizofrenia	20
1.4 Beta-cariofileno	23
1.4.1 Beta-cariofileno e Esquizofrenia.....	23
1.4.2 Fontes e química medicinal de beta-cariofileno.....	25
1.4.3 Farmacocinética do BCF.....	26
1.4.4 Mecanismos farmacológicos e moleculares do beta-cariofileno	27
1.5 Docking Molecular	28
1.6 Cetamina e a indução da Esquizofrenia	29
1.7 Testes Comportamentais para o Estudo da Esquizofrenia.....	30
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Animais	36
4.2 Drogas.....	36
4.4 Testes Comportamentais.....	39
4.4.1 Teste Campo aberto.....	39
Figura 9. Arena de campo aberto, utilizado para avaliar ação de fármacos sobre a atividade locomotora.....	40
4.4.2 Inibição Pré-pulso (IPP).....	40
4.4.3 Labirinto em Y.....	42
4.4.4 Interação social	43
4.5 Estudo Neuroquímico.....	44

4.5.1 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo.....	44
4.5.2 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH).....	44
4.5.3 Peroxidação lipídica (TBARS)	44
4.5.1.5 Determinação dos níveis de nitrito.....	45
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
6 RESULTADOS	49
6.1 –Teste de Campo aberto- Atividade Locomotora.....	49
6.2 Inibição Pré-Pulso (IPP)	51
6.3 Labirinto em Y	53
6.4 Teste de interação social	54
6.5 Beta-cariofileno reverte algumas alterações pró oxidativas induzidas pela administração repetida de Cetamina em camundongos.....	56
6.5.1 Avaliação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH).....	56
6.5.2 Avaliação do Malondialdeído - TBARS	58
6.5.3 Avaliação dos Níveis de Nitrito.....	60
6.6 Afinidade e modo de ligação do beta-cariofileno aos alvos envolvidos em seus efeitos centrais e no sistema imune.....	62
7. DISCUSSÃO	76
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
9. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE - DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.....	100

INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia consiste em um transtorno mental que pode ser caracterizado por rupturas nos processos de pensamento, percepção, responsividade emocional e interações sociais (WHO,2018). Essa desordem mental apresenta um curso que varia entre os indivíduos. Desta forma a esquizofrenia é considerada persistente e pode ser grave e incapacitante (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2016). Segundo a WHO (2018) o transtorno afeta aproximadamente 24 milhões de pessoas em todo o mundo e comparando-se a outros transtornos mentais é o menos comum. Apresenta maior prevalência em homens (12 milhões) do que em mulheres (9 milhões), começando também mais cedo entre os homens, sendo que mulheres com esquizofrenia podem ter um melhor curso da doença do que aqueles (VASKINN et al., 2015).

Descrita há mais de cem anos, ao se observar sintomas que apresentavam uma deterioração global das funções mentais. Inicialmente definida por Kraeplin como demência precoce, que era justificado pelo fato de pacientes, geralmente adultos jovens, apresentarem psicoses associadas com perda de capacidades previamente adquiridas. Em 1911, o psiquiatra suíço Euger Bleuler modificou o termo do transtorno, batizando a doença com o nome de esquizofrenia, sendo utilizado em pacientes que apresentavam desconexão entre os processos de pensamentos e respostas emotivas (KAPCZINSKI et al.,2011).

Os sintomas da esquizofrenia são agrupados em sintomas positivos, negativos e cognitivos (WHO, 2018). Com um quadro clínico diversificado, caracterizado por delírios, alucinações e discurso desorganizado e sintomas que afetam a vida social e ocupacional do indivíduo. Há hipóteses de que os sintomas positivos ou psicóticos (alucinações visuais e auditivas, delírios, paranoia e pensamentos incoerentes) são causados ou resultam de uma hiperfunção dopaminérgica no estriado, do sistema límbico (LINDENMAYER et al., 2013). Já os sintomas negativos (ausência de comportamentos sociais, anedonia, alogia e avolição) e os sintomas cognitivos (distúrbios em funções executivas, como déficits na memória de trabalho e incapacidade de manter a atenção) são indicativos de uma hipoatividade dopaminérgica, e isso se deve a uma hipofunção glutamatérgica na região mesocortical (BENCHERIF et al., 2012; TANDON et al., 2013).

Para o diagnóstico da esquizofrenia, deve-se ter como base os critérios descritos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais (DSM-5). Seguindo os critérios de "checklist" do DSM-5, o transtorno é diagnosticado como esquizofrenia quando o paciente apresentadois ou mais sintomas e que cada um apresente uma quantidade significativa de tempo durante um período de um mês. Dentre esses, os listados a seguir: pensamentos desordenados manifestados por comportamento e discurso desorganizados, comportamento desorganizado ou catatônico, reduções proeminentes na expressão da emoção e diminuição das atividades úteis automotivadas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A predisposição genética é um fator importante que contribui para o desenvolvimento da esquizofrenia. Proeminentes anormalidades anatômicas ocorrem no cérebro em alguns casos deste transtorno. Vários achados anatômicos sugerem que o hipocampo, o córtex pré-frontal e o globo pálido (parte dos núcleos da base) são partes do sistema cognitivo que se encontram prejudicados pela esquizofrenia (KANDEL, 2014).

Exposições ambientais incluindo infecções e deficiências nutricionais são causas conhecidas dos transtornos neuropsiquiátricos e comprometem o desenvolvimento do cérebro. Foi proposto que esses fatores desempenham um importante papel na etiologia da esquizofrenia (BROWN et al., 2011).

Estudar a fisiopatologia da esquizofrenia vem sendo um desafio. Mesmo com avanços ainda não foi desvendado o que de fato acomete um indivíduo com o transtorno. Diversos estudos evidenciam desequilíbrios nos sistemas neurotransmissores, gerando hipóteses com o intuito de explicar a neurobiologia da esquizofrenia. Além disso, outras vias vêm sendo estudadas atualmente, a saber: dano inflamatório (MILLER et al., 2011), alterações oxidativas e nitrérgicas (MONTE et al., 2013; MACÊDO et al., 2012).

1.2 Fisiopatologia da Esquizofrenia

O avanço da medicina permite a neurociência um melhor entendimento da fisiopatologia da esquizofrenia, o que contribui para que novos alvos terapêuticos sejam descobertos. Para tanto, os sistemas de neurotransmissões são pesquisados, assim permitindo que descobertas neurobiológicas correlacionadas a sintomas clínicos da esquizofrenia possam levar ao desenvolvimento de novos tratamentos visando diferentes fases da doença. Nesse contexto, serão descritas a seguir as hipóteses mais comumente estudadas e aceitas para o

entendimento dos aspectos neurobiológicos da doença, que são: hipótese dopaminérgica, hipótese glutamatérgica e hipótese do estresse oxidativo.

1.2.1 Hipótese Dopaminérgica e Esquizofrenia

A dopamina (DA) pertence ao grupo das catecolaminas e desempenha importantes funções no Sistema Nervoso Central (SNC). A principal e mais antiga hipótese para a esquizofrenia baseia-se nas alterações da neurotransmissão dopaminérgica (STAHL, 2014; LINDENMAYER et al., 2013). Estudos demonstram o envolvimento de diversas vias dopaminérgicas na fisiopatologia da esquizofrenia (Fig. 1, Tab. 1) (SILVA, 2006; ROTH; ROGAN, 2009; BALY; COYLE 2011; STEFAN LEUTCH et al., 2011 LINDENMAYER et al., 2013; STAHL, 2014).

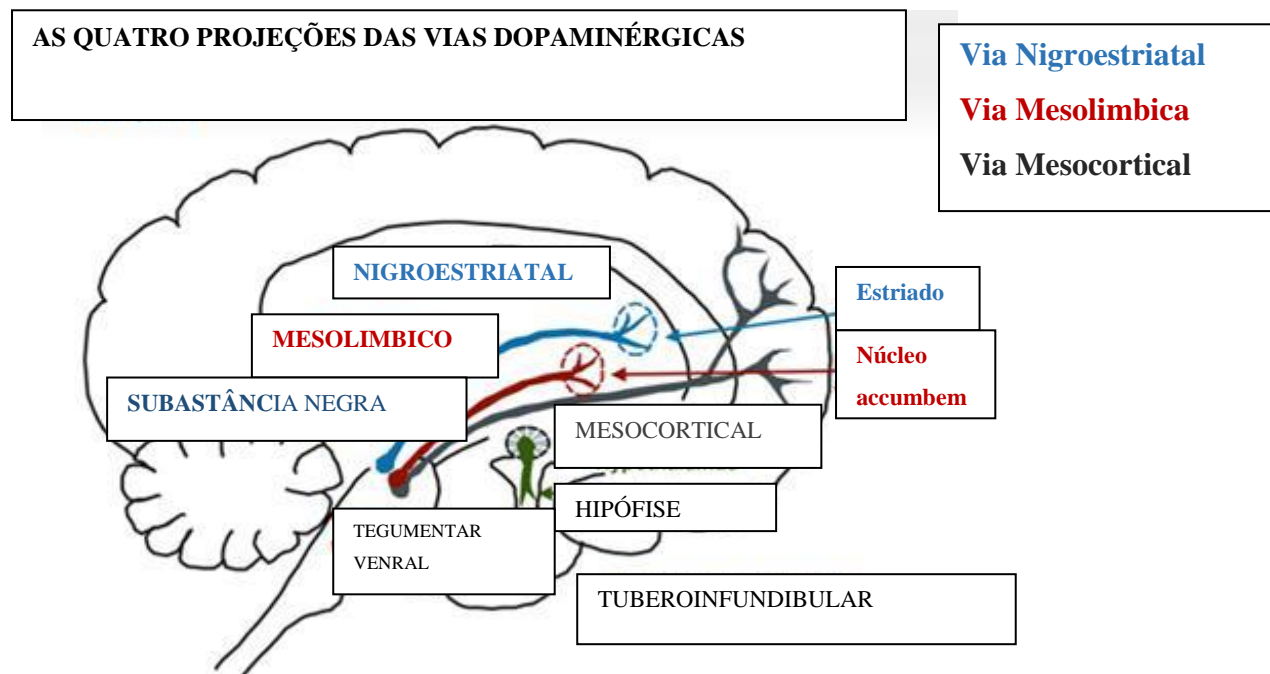


Figura 1- Quatro projeções das vias dopaminérgicas. Fonte: STEFAN LEUTCH *et al.*, 2011.

VIAS	FUNÇÕES
MESOLÍMBICA	Esta via desempenha funções relacionadas aos sentimentos e emoções. Sua expressão elevada contribui com os sintomas positivos. (BALY; COYLE 2011).
MESOCORTICAL	Com o bloqueio desta via ocorre um aumento dos sintomas negativos. (LINDENMAYER et al., 2013)
NIGROESTRIATADA	A via está envolvida com os movimentos voluntários. Distúrbios motores, como por ex., acatisia, distonia e tremores, são observados se um bloqueio da via acontecer. (ROTH; ROGAN, 2009).
TUBEROINFUNDIBULAR	Projeta-se do hipotálamo para a adeno-hipófise e tem como função o controle da secreção de prolactina. Se ocorrer um bloqueio os níveis do hormônio serão aumentados. (STAHL, 2014).
MEDULOPERIVENTRICULAR	Via relacionada com o comportamento alimentar. (SILVA, 2006).

Figura 2- Principais funções das vias centrais da dopamina. Modificado de SAMPAIO, 2016.

A hipótese de hiperfunção dopaminérgica surgiu para justificar o fato de que os sintomas positivos (delírios e alucinações) são desencadeados pela hiperatividade da transmissão dopaminérgica em receptores D2 na via mesolímbica (STAHL, 2014).

Dessa forma, o antagonismo de receptores do tipo D2 é um pré-requisito essencial para a eficácia terapêutica dos antipsicóticos. Além disso, surtos psicóticos podem ser induzidos em indivíduos saudáveis por drogas que facilitam ou aumentam a neurotransmissão dopaminérgica (SEEMAN, 2005; STAHL, 2014). Estudos reportam que os sintomas psicóticos resultariam de um desequilíbrio entre o sistema dopaminérgico cortical e o subcortical. Sendo que a diminuição da liberação de dopamina no córtex pré-frontal, causada por uma hipofunção glutamatérgica, pode ser o responsável pelo desenvolvimento de sintomas negativos, enquanto os sintomas positivos poderiam ser atribuídos ao aumento da atividade dopaminérgica no estriado sistema límbico (LARUELLE et al., 1999; HOWES et

al., 2009). O sistema cortical e subcortical estão relacionados funcionalmente via sistema glutamatérgico, sugerindo que sua disfunção poderia também precipitar sintomas psicóticos. Além disso, existe hipótese que relata a existência desse desequilíbrio da neurotransmissão glutamatérgica que desempenha um importante papel na esquizofrenia (DEMJAHA, A. et al. 2014; STAHL, 2014).

1.2.2 Hipótese Glutamatérgica e Esquizofrenia

Várias evidências têm ligado a normalidades na expressão do receptor glutamatérgico e esquizofrenia, com base em achados que apontam aumento agressivo dos sintomas em pacientes com o transtorno e o aparecimento de sintomas semelhantes à esquizofrenia e sintomas negativos em indivíduos saudáveis evocados por antagonistas do receptor de glutamato de D-aspartato (NMDAR) (GOFF; COYLE, 2001; HAAF et al. 2018). O sistema glutamatérgico é o maior sistema excitatório do sistema nervoso central humano e envolve uma série de receptores que são ativados pelo glutamato (Fig.3), entre eles o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (BRESSAN; PILOWSKY, 2003; REIS; ARRUDA, 2011). Esse receptor possui um canal com alta permeabilidade aos íons Ca^{2+} , Na^{+} e K^{+} . A abertura desse canal e o consequente aumento de Ca^{2+} intracelular parece ser o mecanismo responsável tanto pela plasticidade neuronal como pela neurotoxicidade, a qual esse receptor parece estar envolvido (FOLADOR, 2008). O glutamato, agindo em receptores NMDA, é o sinal de ativação principal para a produção de óxido nítrico (NO), já que a enzima óxido nítrico sintase (NOS) está fisicamente ligada ao receptor NMDA através da proteína PSD-95 (ESPLUGUES, 2002).

A ativação desse receptor leva a um influxo de cálcio tóxico que ativa várias enzimas, incluindo a NOS. Portanto os antagonistas NMDA, ao bloquearem o receptor, promovem a diminuição dos níveis de NO. O óxido nítrico é capaz de aumentar ainda mais a excitotoxicidade pelo fato de melhorar a liberação de glutamato a partir de neurônios pré-sinápticos e inibir transportadores de glutamato glial (LEVKOVITZ *et al.*, 2007). Estudos tanto *in vivo* como *in vitro* sugerem que o NO endógeno inibe os transportadores de monoaminas. A administração *in vivo* de doadores de NO aumenta o nível extracelular de dopamina nos neurônios do estriado (WEST; GALLOWAY; GRACE, 2002).

Tal fato pode ser visualizado na redução dos níveis basais e na utilização da dopamina no córtex pré-frontal de macacos quando foram expostos a repetidas doses de

fenciclidina (PCP), um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, efeito que persiste mesmo depois da interrupção do tratamento com a PCP (CHOI *et al.*, 2009).

Uma forte evidência do envolvimento desse neurotransmissor na esquizofrenia se deve ao fato de que a fenciclidina e a cetamina, antagonistas do receptor NMDA, induzem um quadro clínico semelhante à esquizofrenia em sintomas positivos, negativos e cognitivos, ao contrário da anfetamina, que só gera sintomas positivos (KRYSTAL *et al.*, 1999). Baseados nisso, os pesquisadores propuseram que a hipofunção dos receptores NMDA estaria envolvida na complexa fisiopatologia da esquizofrenia e que esse seria um modelo farmacológico mais convincente da doença que o modelo de hiperfunção dopaminérgica (BRESSAN; PILOWSKY, 2003).

Portanto, uma possibilidade é que os sintomas positivos sejam causados principalmente pela excessiva ativação do receptor de dopamina e os negativos causados pela ativação deficiente dos receptores NMDA figura 3 (STEPHEN, 2007; REIS; ARRUDA, 2011).



Figura 3- Representação simplificada das estruturas glutamatérgicas (STHAL, 2014).

1.2.3- Estresse oxidativo e Esquizofrenia

Substâncias que têm elétrons desemparelhados e são capazes de existência independente são chamadas de radicais livres. Por esta definição, o hidrogênio atômico é um radical livre porque tem só um elétron, assim como o oxigênio molecular (O₂), que possui dois elétrons desemparelhados (MAGDER, 2006). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) no organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Em condições fisiológicas, as vias de defesa compensam a produção de EROs e ERNs. Entretanto, em condições de produção excessiva ou comprometimento das defesas do organismo, as EROs e ERNs poderão reagir com ácidos graxos, proteínas e DNA, causando danos a esses substratos (SULLIVAN; O'DONNELL, 2012). Este desequilíbrio tem sido relacionado com a fisiopatologia de uma série de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, como depressão, esquizofrenia, doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Doença de Huntington, visto que o cérebro é particularmente susceptível aos danos decorrentes do estresse oxidativo (SINGH et al., 2019).

O tripeptídeo gama-glutamilcisteinilglicina (GSH), denominado de glutatona, é considerado o principal antioxidante não enzimático celular. Em sua forma reduzida (GSH), a glutatona está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (0,5-10mmol/L). Grande parte da GSH (85-90%) está presente no citosol e o restante em organelas como mitocôndrias e peroxissomas. As concentrações de GSH extracelulares são relativamente baixas (2-20umol/L no plasma) (SHUNGU et al., 2012).

De acordo com Padurariu, 2010 o estresse oxidativo tem papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia e de outras alterações mentais. Uma vez que o cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido à sua alta utilização de oxigênio, seu alto teor de oxidáveis ácidos graxos polinsaturados e a presença de metais redox-ativa (Cu e Fe) (DOS et al., 2009).

Enquanto o GSH protege o cérebro, os compostos produzidos pela peroxidação lipídica atuam como biomarcadores de estresse oxidativo. Os métodos de quantificação destes marcadores se desenvolveram como um modo de avaliar o estresse oxidativo, avaliando os produtos de degradação secundários como o malondialdeído (MDA) ou produtos oxidativos do ácido araquidônico como os isoprostanos (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

Em estudos realizados por McCREADIE e cols. 1995, e MAHALDIK e cols. 1998, foi visto que pacientes com esquizofrenia apresentavam desequilíbrio em suas defesas antioxidantes e conseqüentemente uma elevação em seus níveis de peroxidação lipídica. A avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é de suma importância para se estudar alterações de peroxidação lipídica em pacientes com o transtorno, sendo assim considerado um dos métodos mais utilizados para estudos que envolvem estresse oxidativo (ESTERBAUER H, 1993; DAKHALE et al., 2005).

O óxido nítrico (NO), também considerado uma importante enzima antioxidante, é definida por Mustafa et al., 2009, como uma molécula mensageira envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos no organismo de mamíferos. Em estudo *post-mortem*, foi confirmado níveis elevados de NO e NOS em análises de tecidos cerebrais de indivíduos com esquizofrenia e têm apontado que a NOS pode ser ativada na doença (YAO; LEONARD; REDDY, 2004).

Por fim, existe uma susceptibilidade do cérebro que decorre do alto teor de ácidos graxos insaturados, alto consumo de oxigênio e escassez dos sistemas de defesa antioxidantes (NG et al., 2008).

1.3 Tratamento Farmacológico da Esquizofrenia

Os antipsicóticos apresentam, possivelmente, os mais complexos mecanismos farmacológicos entre qualquer classe de fármacos no campo da psicofarmacologia clínica. Os fármacos usados no tratamento da psicose são frequentemente denominados antipsicóticos. No passado já foram chamados de neurolépticos. Embora esses termos sejam frequentemente empregados como sinônimos, eles têm diferenças pequenas, ainda que importantes, em sua conotação. O termo neuroléptico ressalta as ações neurológicas do fármaco, que se manifestam comumente como efeitos adversos do tratamento. Esses efeitos adversos, frequentemente denominados efeitos extrapiramidais, resultam do bloqueio dos receptores de DA nos núcleos da base e consistem nos sintomas parkinsonianos de lentidão, rigidez e tremor. (FALKAI et al., 2006).

O uso, há mais de 50 anos, de clorpromazina e haloperidol (antipsicóticos de primeira geração) revolucionou o tratamento de pacientes com esquizofrenia, pois são responsáveis pela atenuação de manifestações psicóticas pelo bloqueio de receptores de dopamina do tipo

2(MIYAMOTO et al., 2012). Em 1970, foram descobertos os antipsicóticos de segunda geração como clozapina, olanzapina, risperidona e aripiprazol (LIEBERMAN, 1996).

O termo antipsicótico denota a capacidade desses fármacos de abolir a psicose e de aliviar a desorganização do pensamento nos pacientes esquizofrênicos. A classificação atual dos antipsicóticos se baseia em antipsicóticos típicos (clássicos, convencionais ou de primeira geração), isto é, fármacos mais antigos com ações proeminentes no receptor D2 e antipsicóticos atípicos (de segunda geração), que constituem uma geração mais nova de fármacos com antagonismo D2 menos proeminente e, outras ações adicionais e, conseqüentemente, poucos efeitos extrapiramidais (MELTZER et al., 2003).

A classificação dos fármacos antipsicóticos típicos é subdividida em várias classes estruturais, das quais as mais relevantes são as fenotiazinas e as butirofenonas. A clorpromazina, por sua vez, é considerada o protótipo das fenotiazinas, enquanto o haloperidol é a butirofenona mais amplamente utilizada (NASRALLAH; TANDON, 2009; TANDON; NASRALLAH KESHAVAN, 2009).

Os antipsicóticos atípicos apresentam afinidade relativamente baixa pelos receptores D2. Ao contrário dos antipsicóticos típicos, sua afinidade pelos receptores D2 não se correlaciona com sua dose clinicamente efetiva. É importante frisar que os antipsicóticos atípicos compreendem um conjunto de fármacos estruturalmente distintos. Seus perfis de ligação aos receptores também diferem. Todos esses agentes exibem propriedades antagonistas combinadas nos receptores D2 de dopamina e nos receptores 5-HT₂ de serotonina, e a maioria também atua como antagonista dos receptores D4 de dopamina (GRAFF-GERRERO et al., 2009).

Os denominados antipsicóticos atípicos apresentam eficácia e perfil de efeitos adversos que diferem dos antipsicóticos típicos. Considera-se esses fármacos mais efetivos que os antipsicóticos típicos no tratamento dos sintomas “negativos” da esquizofrenia (KEEF, 2007). Além disso, comparações diretas de risperidona com haloperidol mostraram que a primeira é mais efetiva no combate dos sintomas positivos da esquizofrenia e na prevenção de uma recidiva da fase ativa da doença. Com relação aos efeitos indesejáveis, os antipsicóticos atípicos produzem sintomas extrapiramidais significativamente mais discretos que os antipsicóticos típicos (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010).

Os seis principais antipsicóticos atípicos são risperidona, clozapina, olanzapina, quetiapina, ziprasidona e aripiprazol. (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN 2010). Dentre os principais citados acima, clozapina e olanzapina são os mais utilizados, como controle antipsicótico em estudos experimentais com animais. A seguir uma breve descrição desses fármacos com seus mecanismos de ação e efeitos que podem causar no uso a longo prazo.

Clozapina, o primeiro antipsicótico atípico introduzido na prática clínica, apresenta uma farmacologia distinta: o fármaco liga-se aos receptores D1 a D5, bem como aos receptores 5-HT₂, e também bloqueia os receptores α 1-adrenérgicos, H1 e muscarínicos. Ela tem sido utilizada terapêuticamente em pacientes cujo tratamento com outros fármacos antipsicóticos falhou, seja por falta de eficácia ou pelo surgimento de efeitos adversos intoleráveis. O fármaco não tem sido utilizado como fármaco de primeira linha, dado um risco pequeno, porém significativo, de agranulocitose e convulsões. A administração de clozapina exige monitoramento frequente das contagens de leucócitos e acompanhamento rigoroso (CRILLY, 2007).

Olanzapina (OLANZA), antipsicótico atípico utilizado neste estudo como controle positivo, fármaco antagonista de 5HT_{2A} e D2, apresenta um potencial maior que a Clozapina, apresentando características clínicas diferentes deste último não apresentando as propriedades extremas sedativas da Clozapina, tendo como diferencial não aumentar os níveis de prolactina em casos de tratamento prolongado, porém por atuar em receptores anti-histamínicos e 5HT_{2C}, tem como propriedade o aumento de peso nos pacientes. (SAHA, CHANT, MACGRATH et al., 2007). Diante do exposto OLANZA foi escolhido como controle antipsicótico por apresentar menos efeitos colaterais, bem como ser um antipsicótico atípico ideal para o modelo utilizado no presente trabalho.

1.4 Beta-cariofileno

1.4.1 Beta-cariofileno e Esquizofrenia

Sesquiterpenos são metabólitos secundários que podem ser encontrados em grande variedade de famílias de plantas, apresentando diversos efeitos biológicos e farmacológicos. (DI SOTTO *et al.*,2010; DUHAMEL *et al.*, 2016). Diversos sesquiterpenos já foram identificados. As lactonas sesquiterpênicas são consideradas compostos ativos de várias plantas medicinais, com potencial efeitos antimicrobianos, citotóxicos, antitumorais, antiulcerativos e anti-inflamatórios, existindo outros não descritos ainda no sistema nervoso central (SNC) e no sistema cardiovascular. (ROBBLE *et al.*,1995).

Beta-cariofileno (BCF) uma lactona sesquiterpênica que pode ser extraída na forma de óleo essencial de plantas dietéticas e comestíveis, incluindo algumas especiarias como, por exemplo,*Eugenia caryophyllata* (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992), *Piper nigrum* (POLITEO *et al.*,2011), *Cinnamomum* spp. (canela) e *Cannabis sativa* (maconha), incluindo especiarias, tais como cravo (*Syzygium aromático*), orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum* spp.), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), lúpulo (*Humulus lupulus*) e pimenta preta (*Piper nigrum*), germander (*Teucrium* spp.) e óleo de copaíba (*Copaiba* spp.) (GHELARDINE *et al.*, 2001; DE ALMEIDA *et al.*, 2013; YANG; NIE, 2016; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2016). Assim, o óleo essencial de betacariofileno vem sendo bastante utilizado na medicina popular nas regiões Norte e Nordeste (RASMANN *et al.*,2005).

A planta *Cannabis* contém mais de 100 compostos terpeno-fenólicos farmacologicamente ativos, conhecidos como canabinóides, dentre esses o BCF, sendo um dos principais constituintes (cerca de 35%) no óleo essencial de maconha (*Cannabis sativa*L.), que é considerada uma importante fonte tradicional de canabinóides derivados de plantas ou fitocannabinóides, sendo um significante agonista sobre os receptores CB2 dos canabinóides (HENDRICKS *et al.*, 1975; CALLEJA *et al.*, 2013) Estudos recentes têm mostrado evidências significantes sobre o potencial envolvimento de receptores CB2 na patogênese da esquizofrenia. Um estudo mostrou que pacientes com primeiro episódio de psicose tiveram uma diminuição desses receptores em comparação aos controles saudáveis, corroborando com estudos pré-clínicos anteriores (BIOQUE *et al.*,2013; ISHIGURO *et al.*,2010).

Existem estudos *in vitro* que indicam que o BCF atua no receptor canabinóide do tipo CB2, favorecendo na inibição da vias pró-inflamatórias incluindo CD14/TLR4/MD2, resultando na diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL 1 β - IL-6, IL-8, TNF α (BENTO et al., 2011).

Além disso, BCF, tem demonstrado efeitos em algumas doenças, como por exemplo, Parkinson, depressão, ansiedade e ainda epilepsia com potencial terapêutico significativo por apresentar, atividade antioxidante e antiinflamatória (GERTSCH, *et al.* 2008; GALDINO *et al.* 2012.; ANAVI-GOFFER S, GERTSCH J. 2013; CHOI IY, JU C, 2013; CHANG et al., 2013; .; JOSHI R.K 2014; BAHY et al., 2014; KLAUKE A.L, RACZ I, PRADIER B, *et al.*, 2014 LIU H, SONG Z, LIAO D, *et al.* 2015; LIU S. 2014; JAVED et al., 2016) Na figura mostramos algumas doenças e estudos realizados com BCF.

Os receptores CB2 podem ser detectados em células da glia e em neurônios de várias regiões do cérebro, como o córtex cerebral, amígdala, o hipocampo, hipotálamo e cerebelo (GONG *et al.*, 2006). As evidências mais relatadas na literatura são que esses receptores desempenham significativo papel no controle da dor e inflamação, em modelos pré-clínicos, como por exemplo, modelo de doenças neuroinflamatórias ou neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica (SHOEMAKER et al., 2007) e doença de Huntington (SAGREDO et al., 2012), envolvimento em processos emocionais e não emocionais (MARCO; LAVIOLA, 2012).

Acredita-se que o BCF seja uma alternativa efetiva, segura e bem tolerada na terapêutica de pacientes esquizofrênicos, por ser um agonista seletivo dos receptores canabinóides tipo 2 (CB2) e não apresentar afinidade com os receptores canabinóides tipo 1 (CB1), assim justificando ausência de efeitos psicoativos secundários (GERTSCH et al. 2008). Daí surge a necessidade de que sejam feitos diversos estudos sobre sua atuação em diferentes condições psicóticas comparando assim os seus possíveis efeitos antipsicóticos. Portanto, há um interesse em explorar as potenciais propriedades antipsicóticas do sesquiterpeno beta-cariofileno.

Doenças	Receptores e via de sinalização	Referências
Alzheimer e Parkinson	Receptor CB2	CHENG Y, DONG Z, LIU S. 2014; JAVED et al., 2016.
Esquizofrenia	Receptor CB2	ANAVI-GOFFER S, GERTSCH J. 2013
Epilepsia	Receptor CB2	LIU H, SONG Z, LIAO D, <i>et al.</i> 2015
Depressão e ansiedade	Receptor CB2	GALDINO <i>et al.</i> 2012.; JOSHI R.K 2014; BAH I et al., 2014.
Isquemia Cerebral	Receptor CB2	CHOI IY, JU C, 2013; CHANG et al., 2013;
Dor e inflamação	Receptores CB2 e Erk1/2 e JNK1/2	KLAUKE A.L, RACZ I, PRADIER B, <i>et al.</i> , 2014; GERTSCH, <i>et al.</i> 2008;

Quadro 1: Principais estudos e doenças que BCF apresentou efeito terapêutico. Elaborado pelo autor.

1.4.2 Fontes e química medicinal de beta-cariofileno

O Beta-cariofileno (BCF), é encontrado principalmente em óleos essenciais extraído de diferentes partes ou planta inteira, principalmente as aromáticas (GERTSCH et al., 2008).

Geralmente, nas plantas, o BCF apresenta maior concentração nas partes aéreas, folhas, flores e florescimento e em traços em raízes, rizomas, caules e cascas de plantas diferentes (LUCCA et al., 2015; DIAS DDE et al., 2012).

O Beta-cariofileno (BCF), sesquiterpeno bicíclico, conhecido quimicamente como (trans- (1R, 9S) -8-Metileno- 4,11,11-trimetilbicyclo (7.2.0) (trans-(1R,9S)-8-Methylene-4,11,11-trimethylbicyclo (7.2.0), sendo também reconhecido por vários outros sinônimos, como cariofileno, trans-cariofileno, (-) - trans-cariofileno, β - (E) -cariolofeno e L-cariofileno (Figura 4) (VIJAYALAXMI et al., 2015). Opticamente, β -Caryophyllene e iso-caryophyllene são isômeros trans e cis duplo, respectivamente, enquanto α -humuleno é um isômero de anel aberto. Nas plantas, o sesquiterpeno é comumente encontrado em seus óleos essenciais em combinação com iso-cariofileno ou α -humuleno. (BUDAVARI et al., 1996).

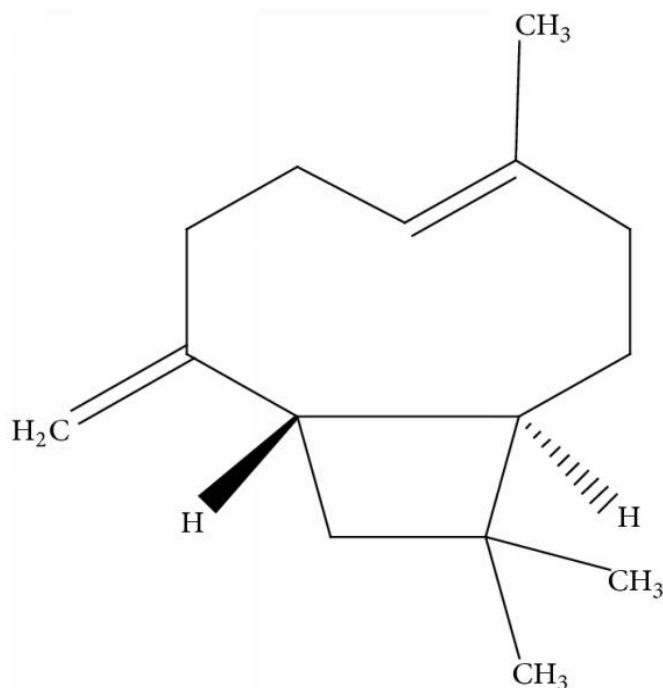


Figura 4: Fonte: <https://botanicatesting.com/beta-caryophyllene/>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-caryophyllene>

1.4.3 Farmacocinética do BCF

Estudos de biodisponibilidade e farmacocinética do BCF têm sido explorado em estudos com animais (ASAKAWA et al., 1986; LIU et al., 2013). A lipofilicidade (água octanol coeficiente de partição) do BCF representado pelos valores do log P 6,78 é considerado muito alto e isso é indicativo de sua alta penetração em toda a barreira hematoencefálica e transferência placentária (DE ALMEIDA et al., 2013; VINHOLES et al., 2014).

A lipofilicidade e as propriedades de volatilidade do BCF reduzem sua biodisponibilidade. Em um estudo uma formulação contendo um complexo de β -ciclodextrina (β -CD) em plasma de rato evidenciou solubilidade aumentada, taxa de dissolução, estabilidade e melhor biodisponibilidade em ratos (LIU et al., 2013).

No estudo citado a formulação do complexo BCF / β -CD apontou menor Tempo máximo (T_{max}) e maior Concentração máxima (C_{max}). Além disso, um aumento na AUC_{0-12h} (área sobre a curva) aproximadamente 2,6 vezes foi encontrado naqueles com apenas BCF no plasma. O estudo ainda mostrou que a dissolução *in vitro* de BCF foi rapidamente liberado da formulação (LIU et al., 2013). A administração de uma dose oral única de BCF é relatada

para mostrar T_{max} maior que 1 h. Os resultados do estudo apontam uma biodisponibilidade favorável BCF no complexo de inclusão e isso deve ser considerado um fator sucesso no direcionamento de seu desenvolvimento farmacêutico. Porém os estudos em humanos para determinar a farmacocinética, incluindo o metabolismo e biodisponibilidade do BCF, ainda são escassos e torna-se necessário ser investigado para outras aplicações clínicas (GERTSCH, 2008).

1.4.4 Mecanismos farmacológicos e moleculares do beta-cariofileno

Em alguns estudos, foi relatado que o BCF atua modulando consideráveis alvos moleculares em diferentes doenças e distúrbios neuropsiquiátricos Fig (5), alterando a expressão gênica, vias moleculares e celulares de sinalização ou por interação direta com os alvos impedindo a progressão e desenvolvimento de numerosos processos de doenças, como exemplo de alvos estudados e relatados na literatura, temos as enzimas SOD, iNOS e COX 2 (CHICCA et al., 2014; SHARMA et al., 2016).

Com relação à atividade farmacológica, foi demonstrado que o BCF apresenta interação e se liga a receptores CB2 (GERSTCH et al., 2008). Além disso o BCF atua como agonista funcional seletivo em numerosos estudos experimentais incluindo in vitro, in vivo e em sílico (GERSTCH et al., 2008).

Em um estudo de modelagem computacional, BCF interagiu com o sítio de ligação do 9-tetrahidrocanabinol. Além disso, BCF possui um anel ciclobutano incomum, considerado uma raridade na química verde e uma estrutura única que fornece uma geometria de interação para sua ligação a receptores CB2 (GERSTCH et al., 2008).

Os receptores CB2 estão bem caracterizados integrantes dos receptores acoplados à proteína G normalmente com proteínas G na família Gi/0. Quando os receptores CB2 são ativados, ocorrem numerosos efeitos intracelulares que podem ser de tipo de célula e ligante específico e ligante específico que, por sua vez, envolvem a inibição de vários canais de Ca²⁺ regulados por voltagem e atividade de adenilato ciclase e ativação de canais de K⁺, resultando em níveis mais baixos de AMPc ao longo com ativação de vias MAPK (FELDER et al., 1995). Por fim, CB2 acoplado à proteína Gi medeia os seus efeitos celulares através da inibição do adenililciclase e regulação dos fatores de transcrição (FELDER et al., 1995).

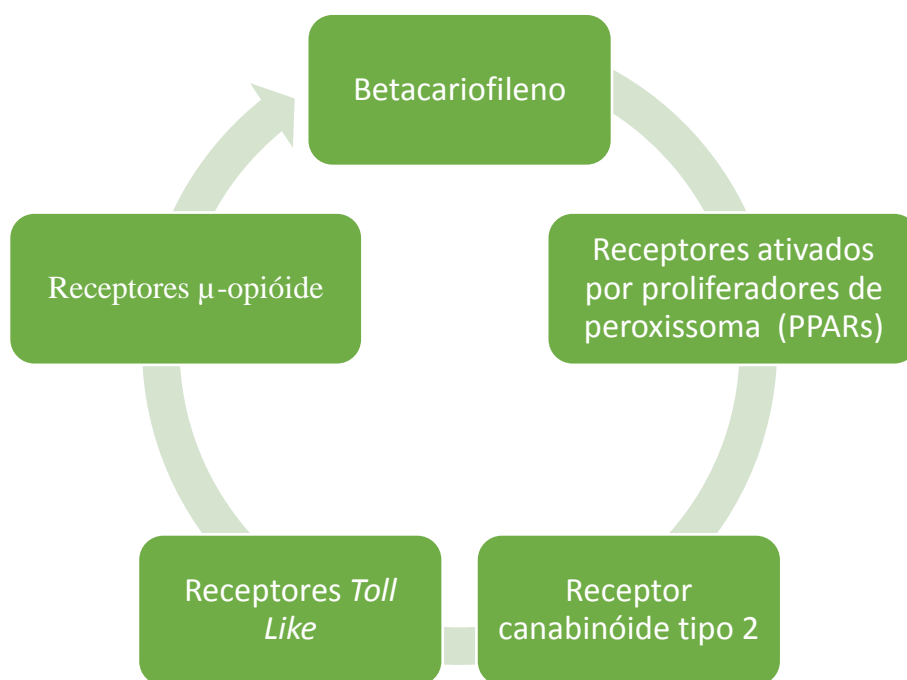


Figura 5. Os múltiplos receptores alvos do Betacariofileno. Elaborado pelo autor.

1.5 Docking Molecular

O Docking Molecular surgiu com o objetivo de prever estruturalmente a interação intermolecular entre duas ou mais moléculas, sendo particularmente útil no estudo e desenvolvimento de fármacos (SOUSA; FERNANDES; JOA, 2006). Uma forma de avaliação se dá através do cálculo das energias intra e intermolecular das estruturas, que podem ser proteínas ou ligantes, em seus estados ligados e não-ligados (MORRIS et al., 2014).

Um típico protocolo de Docking envolve a definição da estrutura do ligante e da proteína-alvo, a preparação dos arquivos de entrada para submissão ao programa de Docking, os resultados estruturais reportados da ancoragem e posterior análise dos resultados através da avaliação dos *scores* obtidos. Na avaliação de resultados de Docking Molecular, há uma avaliação de estruturas de encaixes propostas, agrupadas pelo RMSD (*Root Mean Square Deviation*) e uma função de potencial de interação, representado por uma energia. A configuração de menor *score* de energia é prevista como a "melhor combinação", ou seja, o modo de ligação (SELVAM et al., 2017). As estruturas de vários ligantes e proteínas podem ser encontrados em bancos de dados públicos, como o Protein Data Bank e o PubChem.

Dentre os tipos de Docking Molecular pode-se assumir uma maior ou menor flexibilidade do sistema. Isso, por sua vez, interfere na quantidade de tempo e processamento exigido para obter os resultados (MORRIS; LIM-WILBY, 2008). O grau de liberdade incluso na busca conformacional é um aspecto fundamental da eficiência do processo (SOUSA et al, 2006). Para o seguinte estudo, foi realizado ensaios de *docking* molecular, usando o programa Glide (Schrödinger, USA), no modo de precisão extra (XP)(FRIESNER et al., 2006; SHELLEY et al., 2007). As estruturas cristalográficas das proteínas foram coletadas do *Protein Data Bank* (PDB)(BERMAN et al., 2000)e, quando não disponíveis, construídas utilizando modelos de homologia tridimensionais pelo servidor SWISS-MODEL(BERTONI et al., 2017; BIENERT et al., 2017; WATERHOUSE et al., 2018), com o objetivo de avaliar os melhores alvos e sítios de ligação para o Beta-cariofileno entre os receptores CB2, PPAR α e anandamida amino hidroxilase.

1.6 Cetamina e a indução da Esquizofrenia

Cetamina (KET) é um anestésico dissociativo que age afetando a atividade glutamatérgica via bloqueio do receptor NMDA (ELLISON, 1995). Devido ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} , os antagonistas do receptor NMDA promovem uma diminuição dos níveis de óxido nítrico neuronal (ALAGARSAMY; LONART; JOHNSON, 1994; NODA *et al.*, 1996; OSAWA; DAVILA, 1993; BECKER et al., 2003). A capacidade que os antagonistas do receptor NMDA têm de induzir muitos, se não a maioria dos sintomas, como positivos (déficit de IPP, hiperlocomoção), negativos (déficits de interação social) e memória de trabalho, sintomas estes associados à esquizofrenia. Diante disto, sugere-se que a disfunção ou desregulação do receptor NMDA, por si só, é suficiente para explicar essas características da doença (KANTROWITZ; JAVITT, 2010).

Outro efeito da KET na esquizofrenia é a sua relação com o estresse oxidativo. Vários estudos realizados em pacientes esquizofrênicos tratados e não tratados apontam para a elevação de produtos da peroxidação lipídica, biomarcadores específicos de estresse oxidativo e fosforilação oxidativa mitocondrial (o que leva à formação de radicais superóxido e outras espécies reativas de oxigênio) (ARVINDAKSHAN *et al.*, 2003; DIETRICH-MUSZALSKA *et al.*, 2009; DIETRICH-MUSZALSKA; OLAS, 2009; TREASADEN; PURI, 2008).

Estudos mostraram que a administração de KET (10 mg/kg) em ratos provocou um aumento na peroxidação lipídica e oxidação de proteína no cérebro dos animais. A

atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase foi diminuída, sugerindo que houve um aumento no dano oxidativo e uma diminuição na atividade das defesas antioxidantes enzimática no modelo animal de esquizofrenia (DOS SANTOS, 2009).

O antagonismo NMDA é considerado um modelo altamente válido de esquizofrenia, usado como agente na pesquisa para o desenvolvimento de novos antipsicóticos e para determinar a correlação neuroquímica da psicose (LEV KOVITZ *et al.*, 2007), provavelmente porque o bloqueio de receptores NMDA interfere com a neurotransmissão dopaminérgica, a qual está envolvida com a esquizofrenia (VASCONCELOS *et al.*, 2005). Diante do exposto, a cetamina é o antagonista que mais tem recebido atenção em diversos trabalhos na literatura científica, por apresentar validade de face, constructo e preditiva. (CHINDO *et al.*, 2012; MONTE *et al.*, 2013).

1.7 Testes Comportamentais para o Estudo da Esquizofrenia

Um dos modelos comportamentais mais utilizados para a avaliação dos sintomas da esquizofrenia é o modelo da Inibição Pré-pulso (IPP) do sobressalto, que oferece uma medida operacional do filtro sensorio-motor refletido pela capacidade de inibição de um reflexo de sobressalto, quando um estímulo sensorial é precedido por outro de menor intensidade (HOFFMAN; ISON, 1980). A habilidade de distinguir estímulos externos de relevância fisiológica ou cognitiva, fornecida pelo filtro sensorio-motor, está comprometida em indivíduos com determinadas desordens psiquiátricas (SALUM *et al.*, 2008).

A IPP é uma forma de plasticidade do reflexo do sobressalto, caracterizada por uma redução normal no sobressalto em resposta a um estímulo auditivo intenso (pulso), quando este é precedido imediatamente (30-500 ms) por um estímulo mais fraco (pré-pulso) (BRAFF *et al.*, 1978).

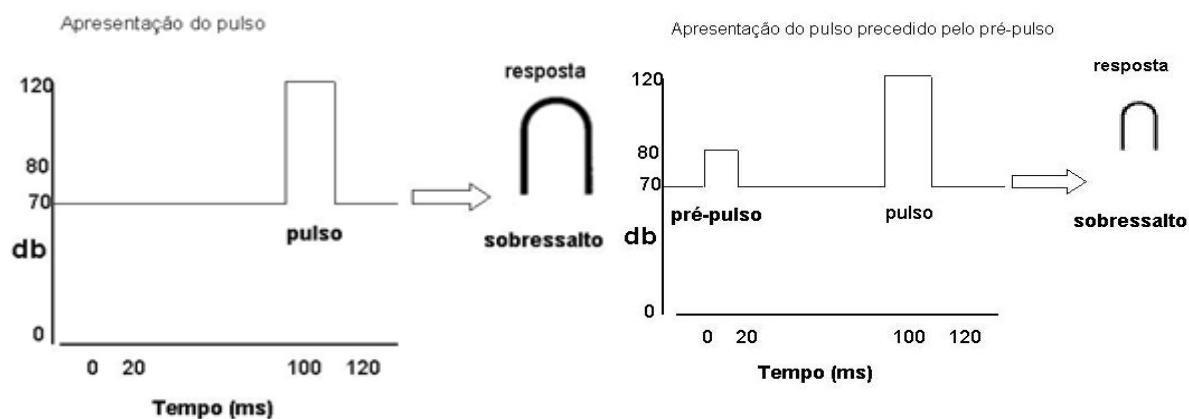


Figura 6. Esquema simplificado do mecanismo de inibição pré-pulso (IPP). Modificados de Salum *et al.*, 2008.

Em resposta ao estímulo fraco a ativação de processos cerebrais é aumentada, o que impede a responsividade a eventos sensoriais posteriores durante uma rápida janela temporal. Este período protege a informação contida no estímulo inicial, para que seja adequadamente processada, durante o qual, somente estímulos suficientemente grandes serão capazes de ultrapassar este filtro protetor (SALUM *et al.*, 2008).

A inibição pré-pulso ocorre naturalmente em humanos e na maioria dos animais experimentais, mas é diminuída ou ausente em esquizofrênicos. Assim, a IPP tem sido sugerida como um útil endofenótipo em potencial para a esquizofrenia (MANSBACH; GEYER; BRAFF, 1988).

A hiperlocomoção farmacologicamente induzida é considerada um importante indicador dos sintomas positivos associados à esquizofrenia. Neste contexto, o objetivo do teste de campo aberto é medir mudanças comportamentais quando os ratos são colocados em um novo ambiente como no meio de um espaço aberto (VAN DEN BUUSE, 2010).

Na esquizofrenia, a disfunção cognitiva é global e generalizada e sim específica e seletiva, incluindo problemas de atenção e percepção, resolução de problemas, memória de curto e longo prazo e, em particular, a memória de trabalho (BEGOU *et al.*, 2008). Labirinto em Y é um teste para medir a memória espacial de trabalho (memória de curto prazo). É baseado na tendência natural de roedores de explorar novos ambientes (DELLU *et al.*, 2000).

Nesse sentido os animais com sintomas símile a esquizofrenia como os sintomas negativos da esquizofrenia devem ser analisados através do teste de interação

social (NEILL et al., 2010). Por mais que seja difícil mimetizar tais sintomas, por serem difíceis de identificação em animais, porque existe falta de resposta a emoção evocada por estímulos em animais. Assim, o teste torna-se válido, devido vários grupos mostraram o sucesso da inibição social, com indução por antagonismo dos receptores NMDA em animais (BECKER; GRECKSCH, 2004; BRUINS SLOT et al., 2005).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A fisiopatologia da esquizofrenia não está totalmente elucidada e, com base nos mecanismos de ação dos fármacos utilizados na terapêutica, as vias dopaminérgicas, glutamatérgica, serotoninérgica e colinérgica têm sido amplamente estudadas e discutidas. Tendo em vista que o tratamento da esquizofrenia é realizado essencialmente com antipsicóticos e que estes fármacos não são eficientes em tratar toda a heterogeneidade esquizoide, a comunidade científica busca novas alternativas de tratamento que sejam mais eficazes, de baixo custo e reduzidos efeitos colaterais.

Atualmente evidências apontam para o possível envolvimento do sistema canabinóide na esquizofrenia. Esse sistema atraiu o interesse dos farmacologistas pelo seu potencial como alvos terapêuticos para várias doenças que vão desde a obesidade até a doença de Parkinson e da esclerose múltipla à dor (JAVED et al., 2016; ALBERTI et al., 2017). Inicialmente, a investigação centrou-se no receptor canabinóide 1 (CB1), mas o potencial terapêutico desses fármacos não está completamente esclarecido. Recentemente a possibilidade de se atingir o receptor canabinóide 2 (CB2) emergiu como uma alternativa devido ao seu importante papel na função imunológica e na inflamação, vias estas associadas diretamente a transtornos neuropsiquiátricos (JAVED et al., 2016).

Dentre os compostos canabinóides conhecidos o sesquiterpeno beta-cariofileno (BCF) (agonista CB2) é tido por possuir ação antiantioxidante (LOURENS et al 2004, SINGH et al 2006), anti-inflamatória (TAMBE et al.,1996, CHO et al., 2007), anticancerígeno (KUBO et al., 1996) e antibiótica (ALMA et al., 2003, LOURENS *et al.*, 2004; PICHETTE *etal.*, 2006).

O papel dos CB2 na esquizofrenia, depressão e toxicod dependência foi demonstrado em diferentes estudos e os resultados são consistentes com a expressão neuronal do receptor (ONAIVI et al., 2008, HU et al., 2009 GARCÍA-GUTIÉRREZ e MANZANARES, 2011, ORTEGA-ALVARO et al., 2011;; 2012, 2013. BAHÍ et al., 2014, , ORTEGA-ÁLVARO et al., 2015, RODRÍGUEZ-ARIAS et al., 2015).

Diante do exposto, resolvemos estudar o BCF na reverção dos sintomas esquizofrenia-símile, pois ao analisarmos os estudos citados acima foi observado que o fitocanabinóide induz uma ação agonista completa nos receptores canabinóides tipo 2 (CB2), um receptor acoplado à proteína G representando importante alvo terapêutico para várias

doenças, principalmente em neurodegenerativas e no transtorno da ansiedade, sendo esta última considerada está relacionado com a propriedade de ativação dos receptores CB2, que são expressos em várias regiões do cérebro, apresentando a vantagem de ser desprovida de efeitos adversos psicotrpicos canabinoides ao contrário dos receptores CB1.

Neste contexto, pretende-se com este trabalho defender a hipótese de que o BBCF é capaz de reverter os sintomas comportamentais e neuroquímicos do tipo esquizofrenia-símile induzido por cetamina. Esperamos, portanto, que nossos resultados possam contribuir para a compreensão da fisiopatologia da esquizofrenia, bem como contribua para o possível desenvolvimento de uma nova droga para o tratamento deste transtorno.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os efeitos do tratamento com beta-cariofileno em modelo de esquizofrenia induzidas pela administração repetida de cetamina em camundongos.

3.2 Específicos

- ✓ Avaliar as alterações comportamentais em camundongos submetidos ao modelo de esquizofrenia por cetamina e tratados com Beta-cariofileno utilizando os testes de: inibição pré-pulso, teste de campo aberto, labirinto em Y e interação social.
- ✓ Determinar a concentração de mediadores do estresse oxidativo, peroxidação lipídica (TBARS), glutatona reduzida (GSH), e nitrito nas áreas cerebrais (Córtex Pré Frontal (CPF), Hipocampo (HC) e Corpo Estriado (CE). COMPLETAR SENTENÇA
- ✓ Buscar identificar possíveis ligações, os sítios e tipos de ligação da Beta-cariofileno e receptor CB2, Beta-cariofileno e receptor PPARalpha, Beta-cariofileno e anandamida amino hidroxilase (FAAH), através do estudo do *docking* molecular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados camundongos *Swiss* adultos (25-30 g) machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), alojados em gaiolas, com alimentos e água *ad libitum* e com ciclos claro/escuro de 12/12 h e ambientados em grupos com livre acesso à comida e água.

As condições dos animais utilizados neste estudo estão de acordo com os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, sob o número 100/2017 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.

4.2 Drogas

DROGAS	CONCENTRAÇÃO UTILIZADA	LABORATÓRIO
Beta-cariofileno- BCF	10 e 50 mg/kg	SIGMA ALDRICH, (St. Louis, MO, EUA)
Cloridrato de Cetamina-KET	2mg/ mL	Cristália Ltda
Olanzapina- Olanza	2,5 mg/kg	Zopix, EMS SIGMA PHARMA LTDA

Figura 7: Drogas utilizadas nos experimentos. Elaborado pelo autor.

Beta-cariofileno (10 mg/kg e 50 mg/kg) foram diluídos em solução de Azeite de Oliva (JAVED et al., 2016).

Cloridrato de Cetamina 50mg/ml foi diluído em soro fisiológico 0,9 % para uma concentração de 2mg/ml, de onde, posteriormente, foi retirada uma dose de 20 mg/kg de peso corporal do animal. Para o controle antipsicótico utilizou-se Olanzapina 2,5mg/ kg. As doses e diluições foram selecionadas com bases em estudos anteriores (NINAN; KULKARNI, 1999; VASCONCELOS et al., 2015; ARAUJO et al.,2015; ARAUJO et al., 2016).

Todas as soluções foram injetadas via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 0,1 ml a cada 10g de peso corporal. Com exceção do Beta-cariofileno que foi administrado via oral (por gavagem) de acordo com o peso.

4.3 Estratégia Experimental

O presente estudo utilizou o modelo de reversão com o objetivo de reproduzir os sintomas agudos da esquizofrenia.

O tratamento de reversão foi desenvolvido de acordo com protocolos anteriores (HATTA et al., 2009; MONTE et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015).

Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais (n= 6-8) Fig. 10: Grupo 1: Salina (0,9%), Grupo 2: Cetamina (KET), Grupo 3: Sal + BCF 10 mg/kg, Grupo 4: Sal + BCF 50 mg/kg, Grupo 5: Sal + OLANZA 2,5 mg/kg, Grupo 6: KET 20mg/kg + BCF 10 mg/kg, Grupo 7: KET 20 mg/kg + BCF 50 mg/kg e Grupo 8: KET + OLANZA 2,5 mg/kg, cada grupo recebeu uma injeção *i.p* diária de Cetamina (KET) 20 mg/kg ou salina 0,9% (grupo controle) por 14 dias (Fig. 8). A partir do oitavo dia de tratamento, 30 minutos após da administração de KET, os animais receberam adicionalmente uma administração diária, *v.o* (gavagem), de Beta-cariofileno (10 ou 50 mg/kg) ou OLANZA 2,5 mg/kg até o décimo quarto dia do protocolo (Fig. 9).

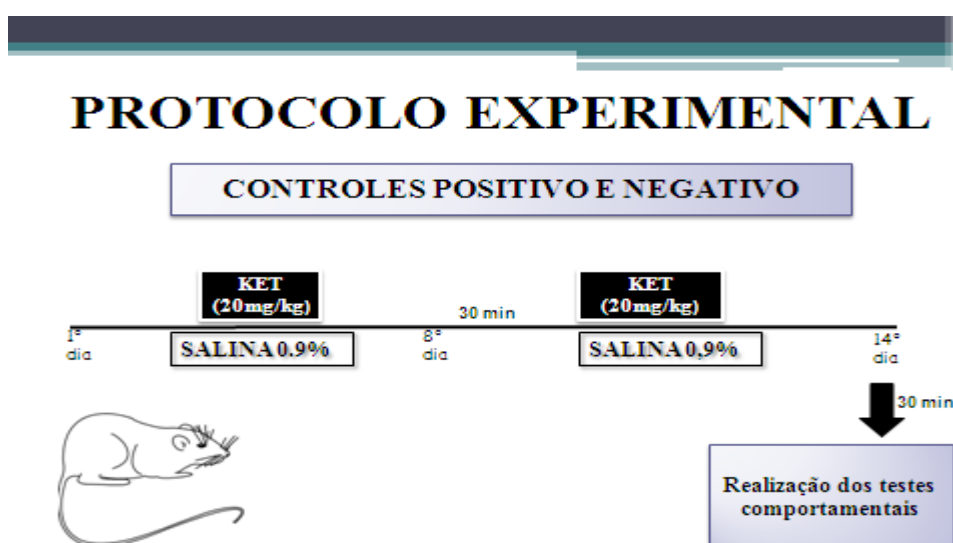


Figura 8. Representação esquemática do tratamento dos grupos controle. (Elaborado pelo autor).

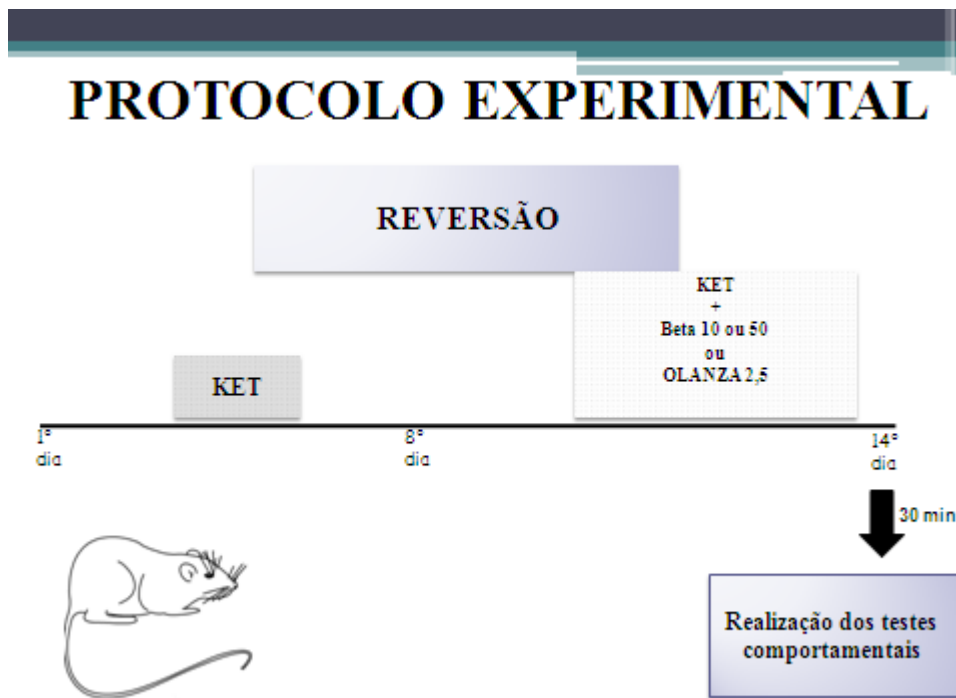


Figura 9. Representação esquemática do tratamento dos grupos tratamento. (Elaborado pelo autor).

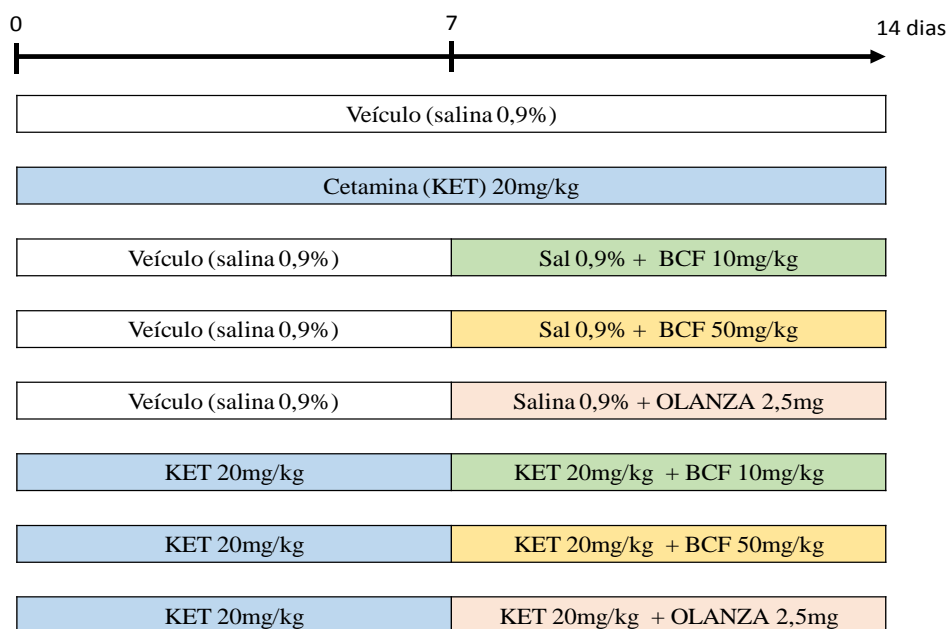


Figura 10. Representação esquemática dos grupos experimentais. BCF: Beta-cariofileno, OLANZA: Olanzapina, KET: cetamina. (Elaborado pelo autor).

4.4 Testes Comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados 30 minutos após o último dia tratamento de acordo com os grupos descritos na tabela acima (Figura 5).

4.4.1 Teste Campo aberto

A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto (ARCHER, 1973). Este teste foi realizado em campo de 30 cm X 30 cm rodeado por paredes de 15 cm de altura feitas de acrílico, dividido em nove partes iguais Fig. 11. Os animais foram cuidadosamente colocados no centro do campo e exploraram livremente o cenário por 1 min (período de habituação). Os parâmetros avaliados foram o número de quadrados cruzados (com as quatro patas, ou seja a hiperlocomoção).



Figura 11. Arena de campo aberto, utilizado para avaliar ação de fármacos sobre a atividade locomotora

4.4.2 Inibição Pré-pulso (IPP)

A Inibição Pré-Pulso (IPP) é caracterizada pela redução de um reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando imediatamente precedido por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (HOFFMAN; ISON, 1980; SWERDLOW; GEYER; BRAFF, 2001). A reação corporal dos ratos a um estímulo acústico foi monitorada em uma câmara de IPP (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP-175) conectada a um tubo (diâmetro 8,2 cm, comprimento 20 cm) montada em uma caixa fechada ventilada foi utilizada fig. 12.



Figura 12. Aparelho câmara de Inibição Pré Pulso, utilizado para avaliar o déficit de inibição pré-pulso.

Os camundongos foram colocados em um contêntor (4,5×5,0×5,5 cm) consistido de barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro com espaçamento de 0,8 centímetros de distância. O contêntor é mantido preso sobre uma balança, chamada de plataforma de resposta, através de quatro miniaturas parafusos. Um alto-falante localizado a 15 cm do contêntor foi usado para fornecer os estímulos de pulso, pré-pulso e ruído de fundo. O contêntor, a plataforma e o auto-falante ficam localizados dentro de uma câmara acústica ventilada (64×60×40 cm). Procedimentos de calibração foram realizados antes dos experimentos para garantir sensibilidade equivalente das plataformas de resposta ao longo do período de teste.

A sessão de testes começou ao colocar um animal no contêntor para a aclimação, que consistiu em uma exposição de 5 minutos a ruído de fundo (65 dB). Após o período de aclimação, os camundongos são apresentados a uma série de 10 estímulos de treino (pulsos sozinho -120 dB, 50 ms de duração), com um ensaio de inter-intervalo de 20 s. O objetivo desta fase é permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo: 74 ensaios pseudorandomizados divididos em oito categorias diferentes, apresentados com um intervalo inter-estímulos de 20 s: 20 apresentações de pulsos sozinho (120 dB, 50 ms de duração), 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulsos sozinho (70, 75 e 80 dB, frequência 3000 Hz, 20 ms de duração), 10 apresentações de cada intensidade de pré-pulso + intensidade de pulso (com intervalo de 50 ms entre pré-pulso e pulso) e ausência de estímulo. Nesse bloco o animal só recebe o estímulo de ruído de fundo (LEVIN *et al.*, 2011).

A média da amplitude de resposta de sobressalto aos ensaios de pulso sozinho (P) e pré-pulso + pulso (PP + P) foi calculada para cada animal. O nível de IPP em cada camundongo é definido como a porcentagem da redução da amplitude do sobressalto nos ensaios de PP + P em comparação com a amplitude do sobressalto nos ensaios de P, de acordo com a seguinte fórmula: $\% \text{ PPI} = 100 - [100 \times (\text{PP} + \text{P} / \text{P})]$. Usando esta fórmula, um valor de IPP de 0% denota que não houve diferença entre a amplitude da resposta de sobressalto do pulsos sozinho e do pré-pulso + pulso. Consequentemente não houve IPP. Espera-se que o grupo de animais lesionados (controle positivo), com KET apresente déficits de IPP neste teste comportamental (LEVIN *et al.*, 2011).

4.4.3 Labirinto em Y

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada pela taxa de alternações espontâneas em um labirinto em Y. O labirinto (fig. 13), consiste em três braços idênticos (40 x 5 x 16 cm) posicionados em ângulos iguais (SARTER *et al.*, 1988). Antes do teste, os braços são numerados, sendo o animal colocado em um deles e deixado para explorar o ambiente. A duração do teste é de 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foram então anotadas e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição.

Uma alternância é considerada correta se o animal visitar um novo braço e não retornar ao braço anteriormente visitado. Assim, a porcentagem das alternações é calculada como a razão entre as alternações corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100.

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância no grupo controle negativo, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último. Entre cada sessão o labirinto será higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.



Figura 13. Aparato Labirinto em Y– Fonte:<https://ugobasilebrasil.com.br/categorias-produtos/y-maze-for-rats-or-mice-optimized-for-videotracking/>

4.4.4 Interação social

O objetivo do teste de interação social consiste em avaliar os animais quanto à sociabilidade. Assim, os animais foram inseridos em um aparato de acrílico (60×40 cm) dividido em três compartimentos (fig. 14). Em um dos compartimentos da lateral havia uma gaiola de ferro contendo um animal do mesmo sexo e idade (câmara social), na outra lateral uma gaiola de ferro sem animal em seu interior (câmara oposta) e no meio a caixa estava livre. Os animais foram inseridos na câmara do meio e seus comportamentos registrados durante cinco minutos (RADYUSHKIN et al., 2009). No teste foi avaliado: o tempo (em segundos) em que o animal permaneceu explorando o compartimento com animal e sem animal, assim como o número total de entradas na câmara com animal e sem animal. Posteriormente, estes valores foram convertidos em percentual do tempo gasto na câmara com animal, percentual do tempo cheirando a caixa com animal e o percentual de entradas na câmara animal.

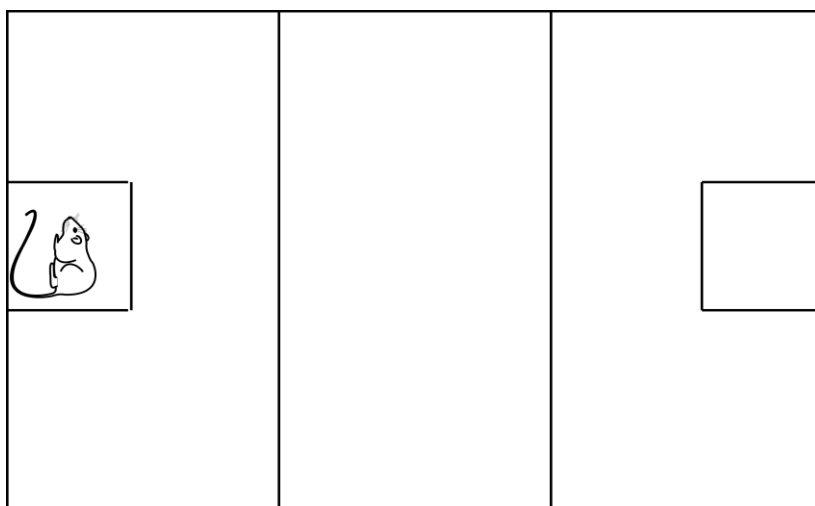


Figura 14. Desenho ilustrativo do aparato usado para avaliação da sociabilidade.

4.5 Estudo Neuroquímico

Logo após concluir os testes comportamentais, os camundongos foram eutanasiados por decapitação e as áreas córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram dissecados sobre a placa de gelo. Em seguida rapidamente foram armazenados em caixas específicas de eppendorf e foram congeladas a -70°C para posteriormente serem realizados os estudos neuroquímicos

4.5.1 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo

4.5.2 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em EDTA 0,02M. Em seguida retirados 400 μL desse homogenato e adicionados a 320 μL de água destilada e mais 80 μL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Após foi recolhido 400 μL do sobrenadante e acrescidos 800 μL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20 μL de DTNB 0,01M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412nm através de espectrofotômetro. A concentração de glutathiona reduzida é expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

4.5.3 Peroxidação lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi medido através da determinação dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de DRAPER & HADLEY (1990), seguindo o protocolo: foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. 0,25 mL do homogeneizado foi misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente ($95-100^{\circ}\text{C}$) por 15 min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v). A seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de tecido.

4.5.1.5 Determinação dos níveis de nitrito

Esta determinação terá como base o método descrito por Green (Green et al.,1982). O ensaio foi baseado na reação de Griess para determinar a produção de NO. Resumidamente, 100 ml de sobrenadante foi incubado com 100 ml de reagente de Griess, que consiste em partes iguais (1: 1 : 1 : 1) 1 % de sulfanilamida dissolvido em de H₃PO₄ , 0,1% de N-(1- naftilo)-tilenodiamina, ácido clorídrico e de água destilada à temperatura ambiente durante 10 min . A absorbância foi medida a 560 nm em um leitor de microplacas. O teor de nitrito de sódio foi determinada a partir de uma curva padrão gerada a nitrito usando NaNO₂ (variando entre 0,75 e 100 mM) como padrão e sendo expressa como nM de nitrito/g de tecido úmido.

4.6 Métodos Computacionais

Predição de alvos

Para prever os possíveis alvos moleculares de interação do beta-cariofileno, a representação SMILES - simplified molecular-input line-entry system – da referida molécula obtida do banco de dados Pubchem (PubChem ID: 5281515) foi submetida no servidor online SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Esse servidor é utilizado para a predição de alvos de ligação de moléculas bioativas, e, para tal, realiza combinações de medidas de similaridades 2D e 3D entre os fármacos testados e bibliotecas de moléculas bioativas com alvos já conhecidos, estabelecendo regras de QSAR (quantitative structure-activity relationship) (GFELLER et al., 2014).

Busca de Estruturas Cristalográficas

As estruturas cristalográficas das seguintes proteínas foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (BERMAN et al., 2000) com seus respectivos códigos de identificação (PDB IDs): receptor canabinoide 2 (CB2): 5ZTY e Hidrolase amida de Ácidos Graxos (Fatty Acid Amide Hydrolase-FAAH): 4DO3. Apenas estruturas com ligantes co-cristalizados e com níveis de resolução (em Angstroms, Å) iguais ou menores que 3,0 Å foram utilizados.

Cálculos de Docking Molecular

O ensaios de docking foram conduzidos no pacote de programas Maestro Schrodinger (SCHRODINGER et al., 2004) e Schrodinger (SCHRODINGER, 2000) Schrödinger, LLC, Nova York, NY, 2015., "nd) em modo de precisão extra (XP). Para isso, nós preparamos as estruturas de proteínas através da ferramenta "Protein Preparation Wizard" (MADHAVI SASTRY et al., 2013, "Schrödinger Release 2015-2: Assistente de Preparação de Proteínas, Schrödinger, LLC, Nova York, NY, 2015," nd), adicionando hidrogênios livres (OPLS-2005) e minimizando a energia da estrutura por meio do campo de força OPLS-2005 (BANKS et al., 2005). Os ligantes, por sua vez, foram preparados através da ferramenta LigPrep ("Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, Nova Iorque). , NY, 2015., "nd), corrigindo o estado de protonação de acordo com Epik (ph: 7.3) (GREENWOOD et al. 2010," Schrödinger Release 2015-2: Epik, Schrödinger, LLC, Nova Iorque, NY, 2015, "Shelley et al., 2007) e minimização de energia no mesmo campo de força OPLS-2005. As coordenadas

da grade de encaixe (grid) foram construídas com base nas coordenadas dos ligantes co-cristalizados nas estruturas. Os diagramas de interações 2D foram construídos pela ferramenta "Ligand Interaction Diagram" do pacote Maestro. O programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY, W., DALKE, A. E SCHULTEN, 1996) foi usado para a inspeção visual de poses de encaixe 3D.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 6.0. Os resultados comportamentais, parâmetros de estresse oxidativo e avaliação nitrérgica foram analisados por two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey seguido pelo teste post-hoc para comparações múltiplas, sendo previamente analisada a fidelidade dos dados. Valores significativos para todas as análises considerados quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 –Teste de Campo aberto- Atividade Locomotora

No presente estudo, administração repetida de KET causou hiperlocomoção no teste de campo aberto (Fig.15) quando comparados com os camundongos tratados com solução salina [$F(3, 48) = 11,68; p < 0,0001$]. A hiperlocomoção induzida pela administração de KET foi revertida pelo tratamento com BCF 10 ($p < 0,0001$), já o tratamento com BCF 50 não apresentou significância após analisarmos em comparações múltiplas. Os animais tratados com Olanza também apresentaram uma significativa redução da atividade locomotora, quando comparados aos animais tratados com KET ($p < 0,0001$).

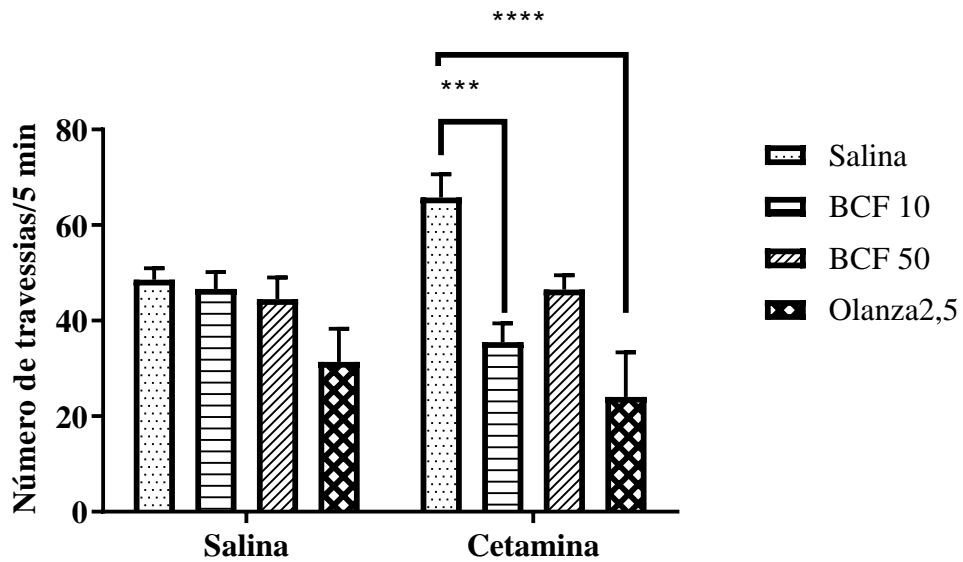


Figura 15-Número de cruzamentos dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por Cetamina KET (20mg/kg) e tratados com BCF (10 ou 50 mg/kg) ou Olanza (2,5mg/kg). Barra representa a média \pm EPM do número de cruzamentos, (n = 8-10 animais/grupo). (***) $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$) de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey *post hoc test*. Abreviações:BCF= Beta-cariofileno, Olanza-Olanzapina.

6.2 Inibição Pré-Pulso (IPP)

No presente estudo a análise de dados por *two way* ANOVA revelou efeitos significativos de "intensidades de pré-pulso" $F(3,46) = 5,127, p = 0,0038$ e "grupos experimentais" $F(3,46) = 6,768, p = 0,0007$. A análise post hoc pelo teste de Tukey revelou os animais tratados com KET apresentaram uma diminuição nas intensidades de pré-pulso de 70 ($p < 0.001$) quando comparados ao grupo tratado apenas com solução salina. A administração de BCF 50, ou Olanza após a administração de KET reverteu significativamente as alterações induzidas por KET apenas na intensidade de pré-pulso de 70 ($p < 0.0001$). Na intensidade 75 apenas BCF 50, após a administração de KET reverteu significativamente as alterações induzidas por KET s nesta intensidade de pré-pulso. Na intensidade 80 BCF 50 apresentou resultado significativo, revertendo a alteração induzida por KET (fig. 16).

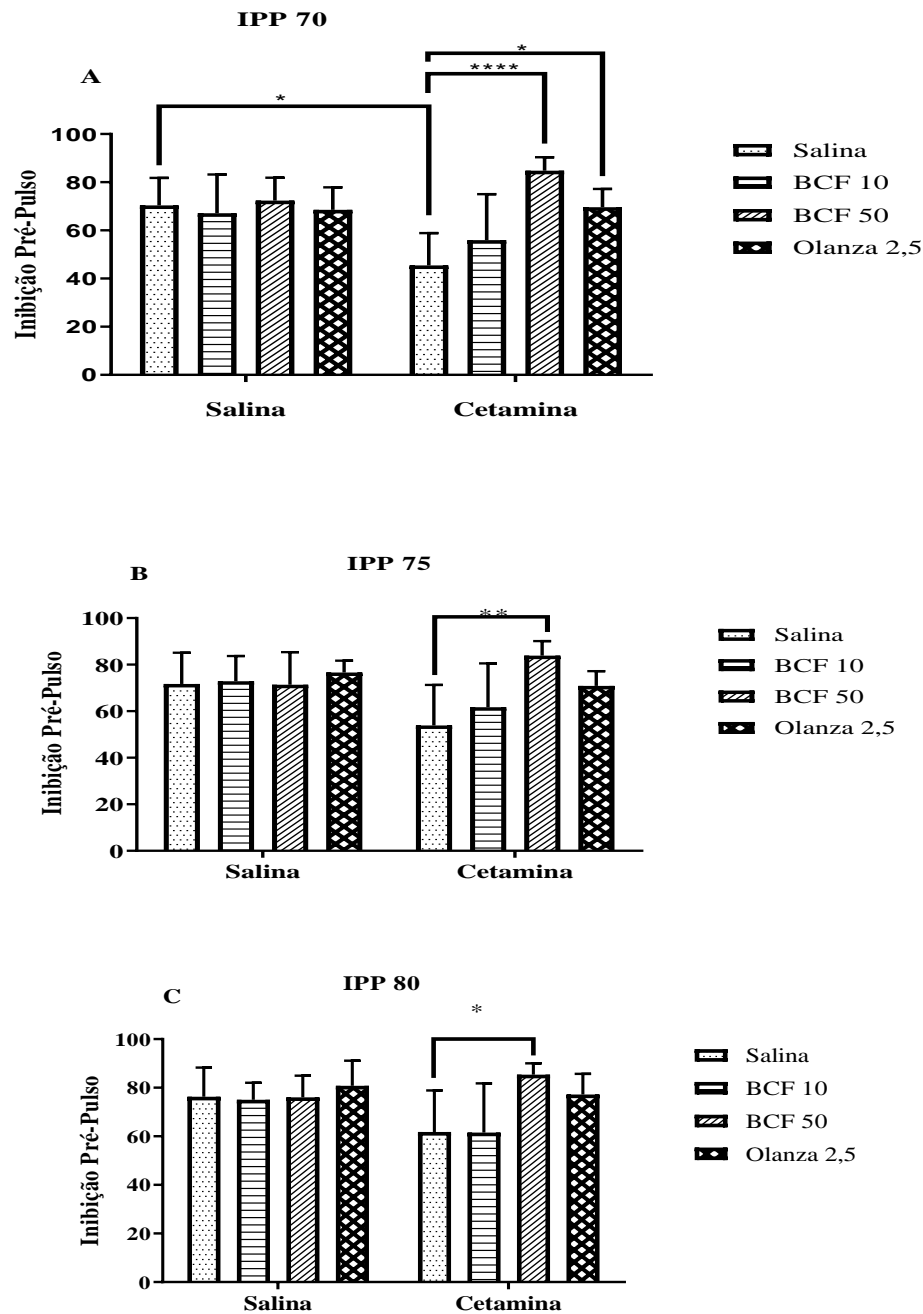


Figura 16. Efeito em percentagem da Inibição do Pré-Pulso em PP70 (A), PP75 dB (B) e PP80 dB (C) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por KET (20mg/kg) e tratados com BCF (10 ou 50 mg/kg) ou Olanza 2,5 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM do IPP ($n = 8-10$ animais/grupo). * ($P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$); de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey's *post hoc test*. Abreviações: BCF =beta-cariofileno, Olanza- Olanzapina

6.3 Labirinto em Y

Com relação à memória de trabalho, foi realizado o teste do labirinto em Y. Os resultados (Fig. 17) mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com KET. Na análise ANOVA de duas vias, não foi possível observar um efeito significativo dos fatores “tratamento antipsicótico”, “modelo de esquizofrenia” e a “interação”. No teste de comparações múltiplas não obtivemos uma redução significativa do número de percentual de acertos.

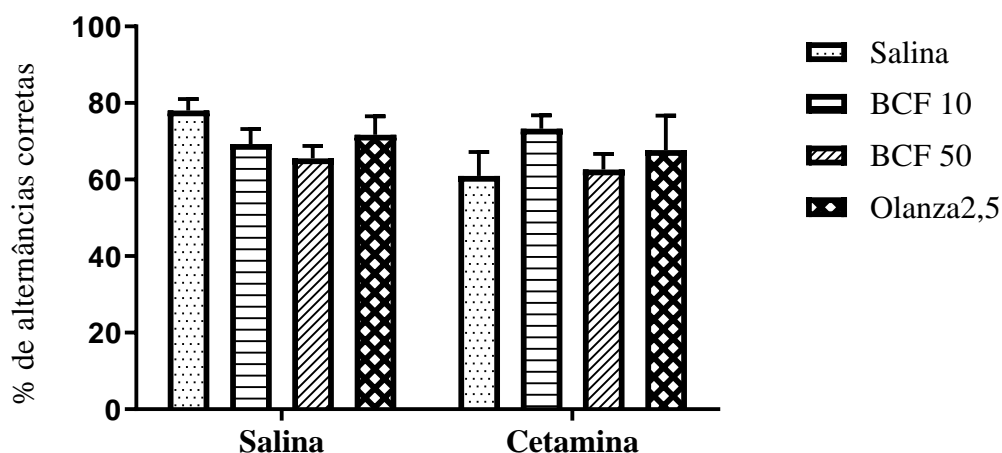


Figura 17. Porcentagem de alterações corretas no teste de labirinto em Y - Efeitos na percentagem de acertos pelo beta-cariofileno(10 ou 50 mg/kg) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido pela KET (20mg/kg). Cada barra representa a média. As barras representam a média \pm E.P.M (n=6-10 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey como *post hoc*, quando comparado ao grupo veículo. Abreviações: BCF =beta-cariofileno, Olanza- Olanzapina.

6.4 Teste de interação social

Para avaliarmos os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia utilizamos o teste de interação social, com o intuito de determinarmos o tempo de preferência social dos animais. Em nossos resultados da interação social (Fig. 18), o teste ANOVA de duas vias apresentou uma interação significativa entre os grupos [$F(3,55)= 5.645$; $P=0.019$] no número de idas até a caixa sem animal. No teste de comparações múltiplas, houve diferença significativa entre os grupos salina-Olanza e o grupo KET-Salina ($p<0,01$) e o tratamento com BCF 50 após o modelo de esquizofrenia com cetamina foi capaz de reduzir o número de entradas na caixa sem animal quando comparada ao grupo submetido apenas ao modelo de cetamina ($p<0.05$). Na avaliação do tempo de preferência pela caixa com animal, houve diferença significativa entre os grupos [$F(3,55)= 4.4154$; $p= 0.0101$]. No teste de comparações múltiplas foi possível observar que o modelo de indução de esquizofrenia com cetamina sozinho diminuiu o tempo de preferência pela caixa com animal, quando comparado com o grupo salina ($p<0.05$), mas nenhuma das doses de BCF apresentou significância neste quesito. Ao analisar o tempo de interação na caixa sem animal, o teste ANOVA mostrou que existe uma interação significativa entre os grupos [$F(2,42)= 10.06$; $P=0.0003$]. No teste T, foi possível observar que o modelo de indução de esquizofrenia pela cetamina aumentou o tempo de interação na caixa sem animal quando comparado aos grupos salina ($p<0,01$) e o grupo tratado com BCF 50 apresentou uma redução na preferência pela caixa sem animal com resultado significativo ($p<0.05$)

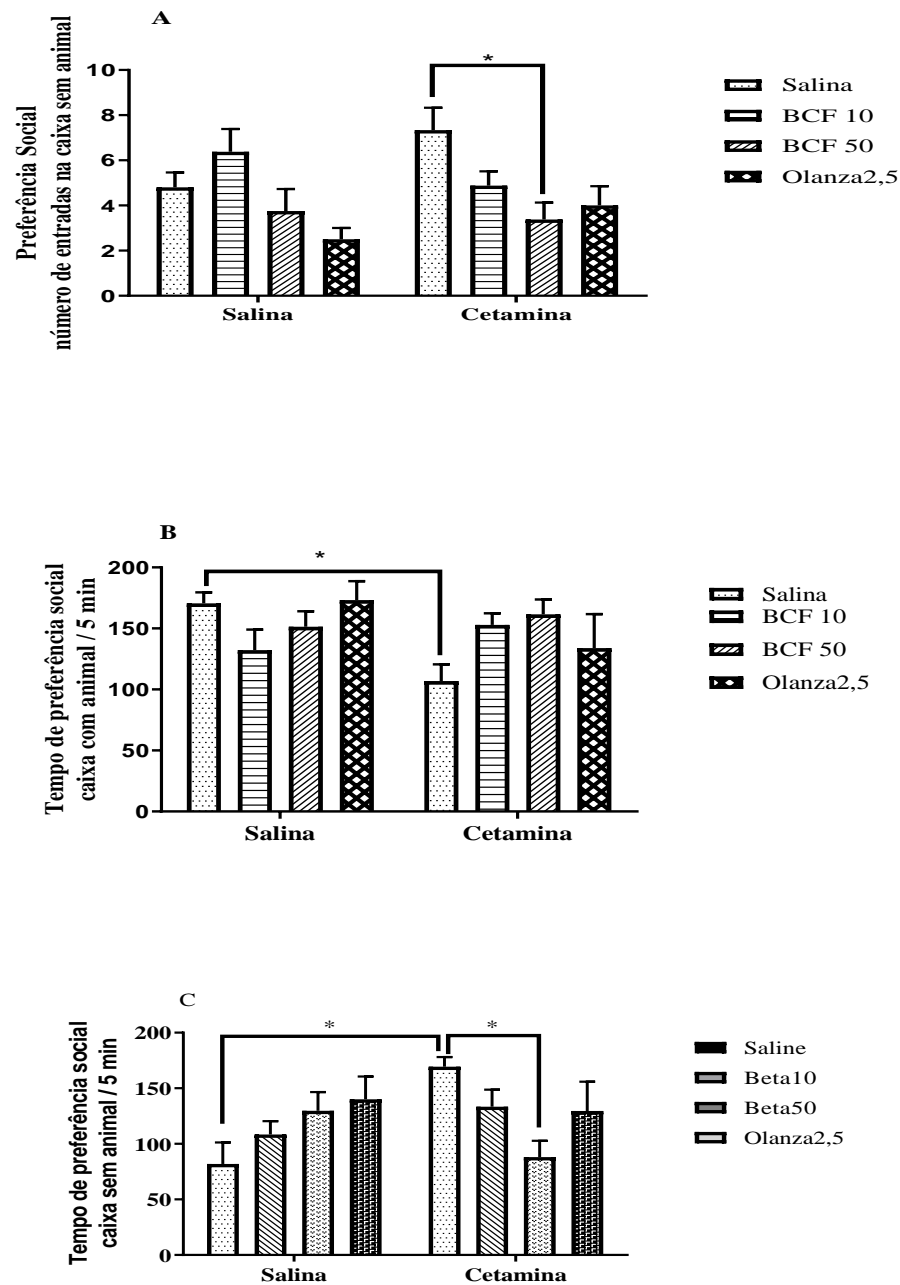


Figura 18. Tempo de preferência social dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por KET (20mg/kg) e tratados com BCF (10 ou 50 mg/kg) ou Olanza (2,5mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 6-10 animais/grupo). * ($P < 0.05$) versus salina; versus KET; de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey *post hoc test*. Abreviações: BCF =betacariofileno, Olanza- Olanzapina.

6.5 Beta-cariofileno reverte algumas alterações pró oxidativas induzidas pela administração repetida de Cetamina em camundongos.

6.5.1 Avaliação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

Os animais que receberam repetidamente KET apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de GSH no CPF [F (3, 52) = 14,02 ; $p < 0,0001$], HC [F (3, 52) = 20,62 ; $p < 0,0001$] e CE [F 3, 52) = 17.15 ; $p < 0,0001$] quando comparados com o grupo que recebeu apenas salina (grupo controle). Porém, os animais que foram tratados com BCF 10 e 50 não apresentaram resultados significativos, porém como já era esperado o grupo tratado olanza, após a administração de KET, apresentaram um aumento significativo nos níveis de GSH no CPF ($p < 0,0001$), HC ($p < 0,0001$) e CE ($p < 0,0001$) quando comparados com os animais que receberam apenas KET, (fig. 19).

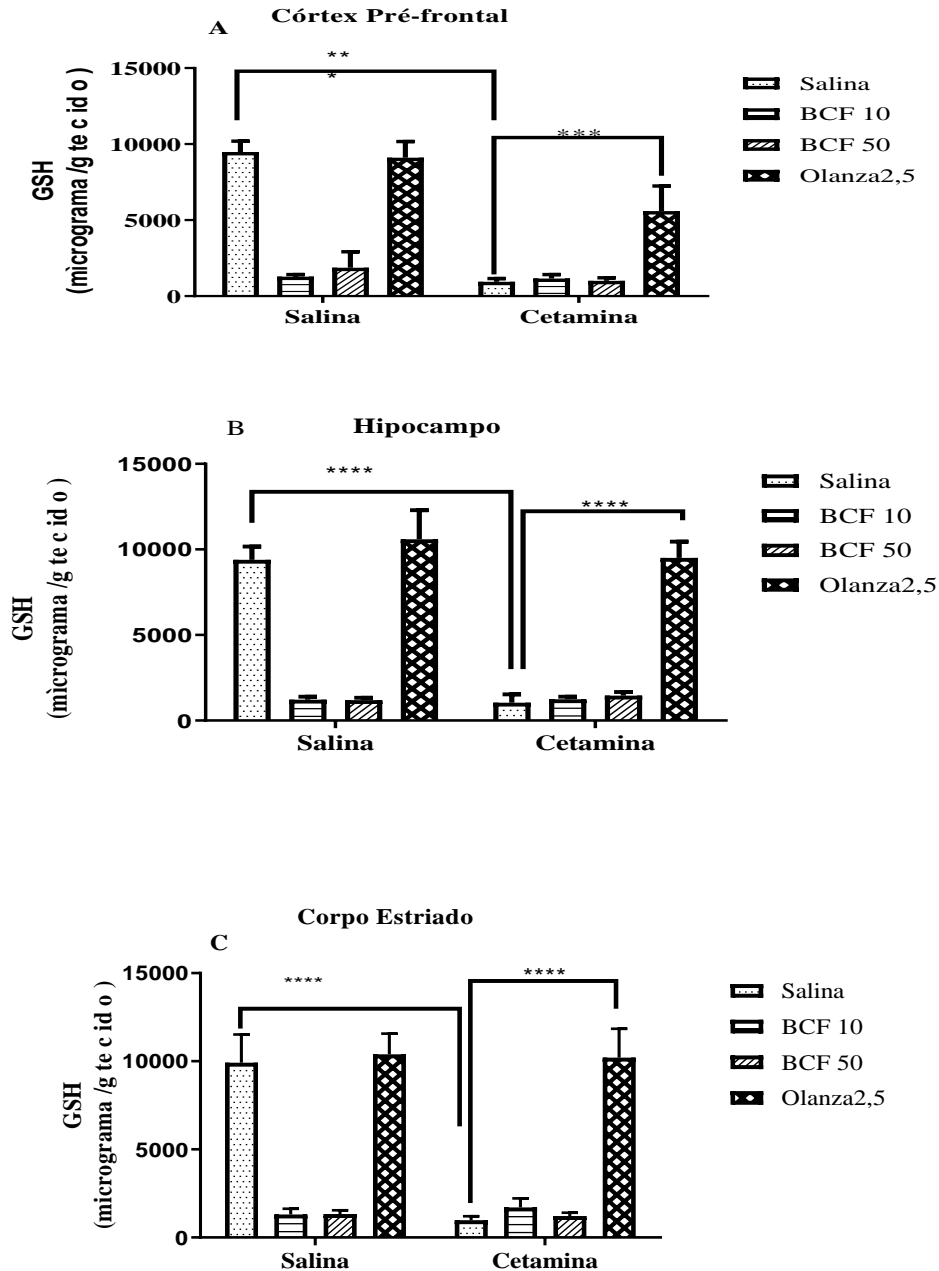


Figura 19. Níveis de glutatona redutase (GSH) do córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por KET (20mg/kg) e tratados com BCF (10 ou 50 mg/kg) ou Olanza (2,5mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 8-10 animais/grupo). De acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey's *post hoc test*. Abreviações: BCF= Betacariofileno, Olanza- Olanzapina

6.5.2 Avaliação do Malondialdeído - TBARs

Em relação ao dano oxidativo lipídico (Fig. 20), um aumento nos níveis de MDA (marcador da peroxidação lipídica) foi observado após a administração de KET no CPF [$F(3, 50) = 16,48$; $p < 0,0001$], HC [$F(3, 51) = 21,98$; $p < 0,0001$] e CE [$F(3, 51) = 15,06$; $p < 0,0001$] quando comparadas ao grupo tratado apenas com grupo salina. A administração de BCF 10 e 50e olanzapina, após KET foi capaz de reverter essas alterações no CPF ($p < 0,0001$), HC ($p < 0,0001$). CE ($p < 0,0001$).

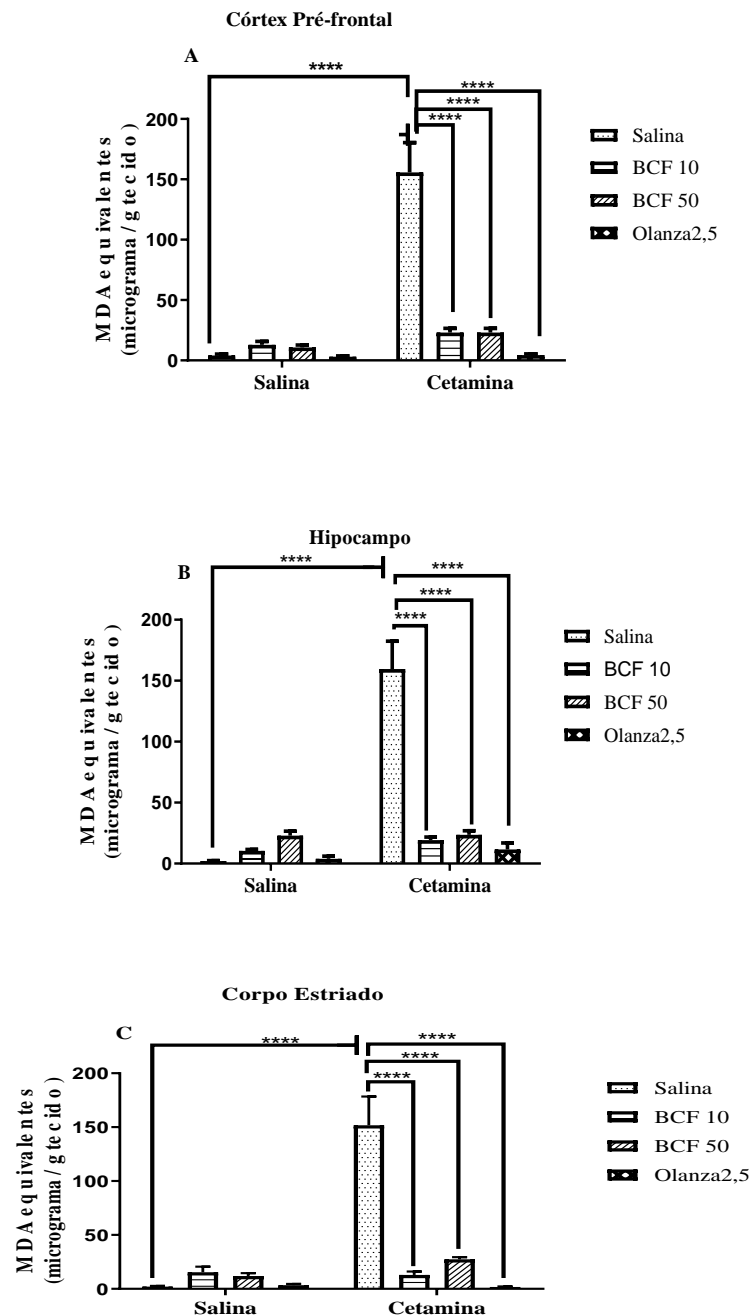


Figura 20- Níveis de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por KET (20mg/kg) e tratados com BCF (10 ou 50 mg/kg) ou Olanza (2,5mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 8-10 animais/grupo). ****P < 0.0001 de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey's *post hoc test*. Abreviações:BCF = Beta-cariofileno, Olanza= Olanzapina.

6.5.3 Avaliação dos Níveis de Nitrito

Os níveis de nitrito (Fig. 21) foram aumentados significativamente apenas no HC de animais tratados com KET [F (3, 35) = 34,47; $p < 0,0001$]. O tratamento com BCF 10, após a administração de KET foi capaz de reverter significativamente esta alteração ($p < 0,0001$). Porém nesta área, a administração de olanza causou aumento nos níveis de nitrito quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Em relação ao córtex pré-frontal e corpo estriado (Figura A e C), não houve alterações com significância nas doses utilizadas de BCF, após avaliar em teste de comparações múltiplas.

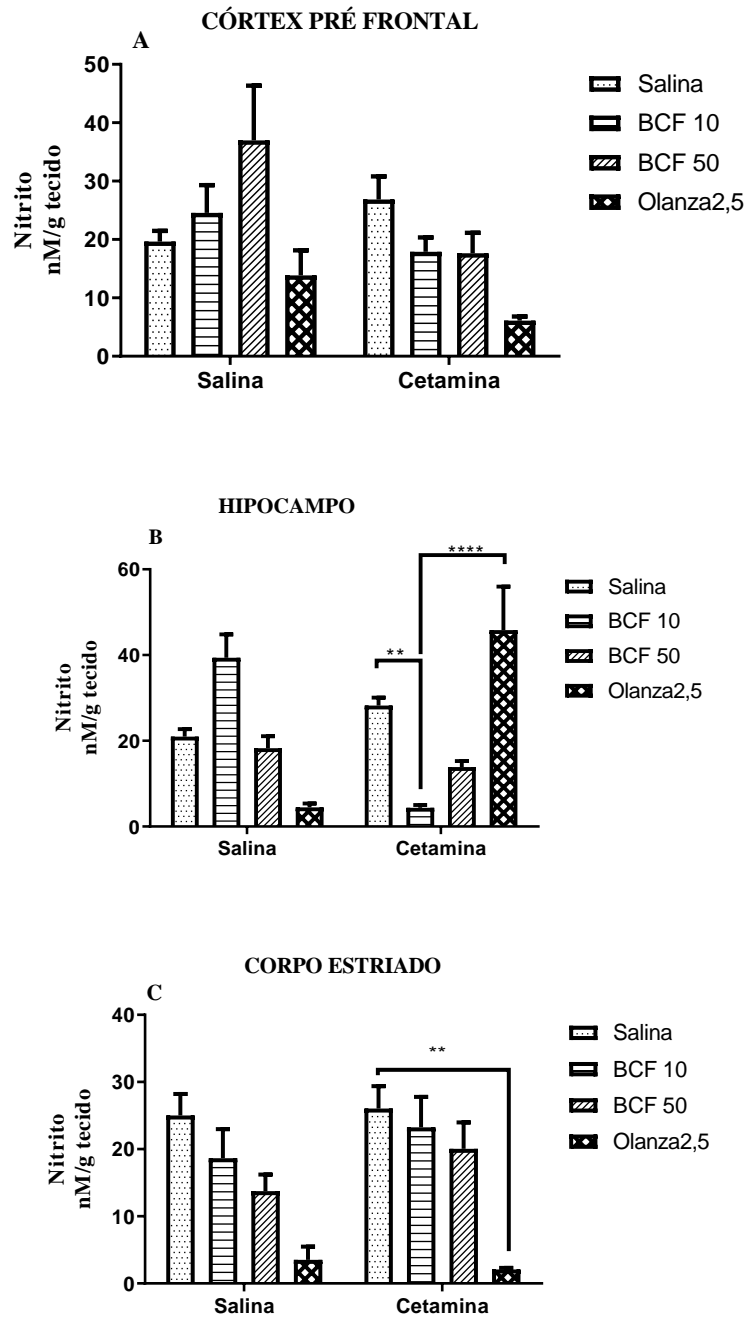


Figura 21. Níveis de nitrito no córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por KET (20mg/kg) e tratados com BCF (10 ou 50 mg/kg) ou Olanza (2,5mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 8-10 animais/grupo). ****P < 0.0001 de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey's *post hoc test*. Abreviações:BCF = Beta-cariofileno, Olanza= Olanzapina

6.6 Afinidade e modo de ligação do beta-carioileno aos alvos envolvidos em seus efeitos centrais e no sistema imune.

Inicialmente, no estudo de predição de alvos para o BCF foram observados alvos promissores que podem justificar seus efeitos centrais e no sistema imune, tais foram: receptor nuclear PPARalpha, receptor canabinoide CB2 e hidroxilase amida de ácidos graxos (FAAH), também conhecida por anadamida hidroxilase .

No ensaio de predição de alvos pelo servidor online SwissTargetPrediction para o ligante BCF, foram encontrados alguns alvos protéicos (tabela 1) com interessantes escores de probabilidade de interação (tabelas 2), tais foram: o receptor nuclear PPAR α (0.709 ou 70.9%), o receptor acoplado à proteína G CB2 (0.709 ou 70.9%) e a enzima FAAH (0.05 ou 5%).

Tabela 1 – Predição de alvos do BCF pelo servidor SwissTargetPrediction

Target (Protein)	UniprotID	Espécie	Abreviação	Classe do alvo	Probabilidade de interação
Receptor de peroxisoma proliferador ativado alpha	Q07869	<i>Homo sapiens</i>	PPAR α	Receptor nuclear	0.709
Receptor canabinoide 2	P34972	<i>Homo sapiens</i>	CB2	Receptor acoplado à proteína G	0.709
Hidrolase de Anandamida	O00519	<i>Homo sapiens</i>	FAAH	Enzima	0.05

Abreviações: PPAR α : *peroxisomeproliferatoractivated receptor alpha*; CB2: receptor canabinoide 2; FAAH: *fattyacidamidehydrolase*.

Tabela 2 – Escores de docking do BCF para os alvos protéicos mais promissores apontados pela predição computacional.

Protein	PDB ID or model	Binding site	Drug	Docking score (kcal·mol ⁻¹)
PPARα	2P54	735 (Ligante co-cristalizado)	Beta-cariofileno	- 4.06
			*2-METHYL-2-(4-{{(4-METHYL-2-[4-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]-1,3-THIAZOL-5-YL)CARBONYL)AMINO]METHYL}PHENOXY)PROPANOIC ACID	- 13.88
			Canabidiol	- 5.28
CB2	5ZTY	9JU (Ligante co-cristalizado)	Beta-cariofileno	- 7.61
			9JU:N-(adamantan-1-yl)-1-(5-hydroxypentyl)-4-methyl-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxamide *	- 9.47
			Canabidiol	- 9.14
FAAH	6MRG	JXV (Ligante co-cristalizado)	Beta-cariofileno	- 7.12
			JXV: (1R)-2-{{[6-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)pyrimidin-4-yl]amino}-1-phenylethan-1-ol	- 11.56
			Canabidiol	- 7.59

Abreviações: PPAR α : *peroxisomeproliferatoractivated* receptor alpha; CB2: *receptor canabinóide 2*; FAAH: *fattyacidamidehydrolase*

Beta-cariofileno (BCF) apresentou um alto escore de docking quando ancorado no receptor CB2: $-7.61 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Esse cristal possui um ligante (com atividade agonista) co-cristalizado no sítio de atividade desse receptor, determinando as coordenadas da caixa de encaixe. BCF realizou diversas interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos (Val105, Phe106, Leu107, Leu108, Val113, Phe117, Phe91, Phe94, Leu 182, Phe 183, Pro184. Ademais, BCF realiza interações carregadas positivamente com o resíduo Lys109 e negativamente Asp101 (Fig. 22). O escore de redocking do ligante co-cristalizado foi de $-9.47 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, valor próximo ao escore de docking do BCF, apontando para uma potencial interação favorável desse composto com esse sítio do receptor CB2 (Fig. 23). A fim de possuir validade externa experimental, nós também realizamos cálculos de docking para o agonista natural desses receptores, o canabidiol (CBD), que apresentou um escore de docking bastante favorável (como esperado) de $-9.14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 24).

Em relação à enzima FAAH, o BCF também apresentou um escore relativamente alto de $-7.61 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Esse cristal também possui um ligante (com atividade agonista) co-cristalizado no sítio de atividade desse receptor, determinando as coordenadas da caixa de encaixe. Nesse sítio, o BCF realizou diversas interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos (Val276, Phe432, Leu408, Pro484, Ala490, Val491, Met495). O BCF também realizou interações hidrofílicas com os resíduos Ser241, Ser376, Thr377, Thr488, Thr494. Por fim, BCF realiza interações carregadas positivamente com os resíduos Arg484 e negativamente com Asp195 e Glu373 (Fig. 25). O escore de redocking do ligante co-cristalizado foi de $-11.56 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Fig. 26). O escore de docking CBD, por sua vez, foi de $-7.59 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, reforçando a similaridade de atividade farmacológica desses ligantes (Fig. 27).

Porém, para o receptor nuclear PPAR α , BCF apresentou um baixo escore de docking quando ancorado ao receptor: $-4.06 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Esse cristal possui um ligante (com atividade agonista) co-cristalizado em seu sítio de atividade, determinando as coordenadas da caixa de encaixe. BCF realizou diversas interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos (Val281, Cys278, Cys276, Phe273, Ile272, Leu321, Phe318, Ile317 e Tyr314. Ademais, BCF realiza interações carregadas positivamente com o resíduo Lys358, e hidrofílicas com Ser280, Thr279, Gln277, Ile274, Ile440 (Figura 28). O escore de redocking do ligante co-cristalizado foi de $-13.88 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, valor muito superior ao escore de docking do BCF, apontando para

uma potencial interação desfavorável desse composto com esse sítio do PPAR α (Fig. 29). Nós também realizamos cálculos de docking para a interação do canabidiol (CBD) com esse receptor que apresentou um escore de docking bastante similar ao encontrado para o BCF de -5.82 kcal·mol⁻¹(Fig. 30).

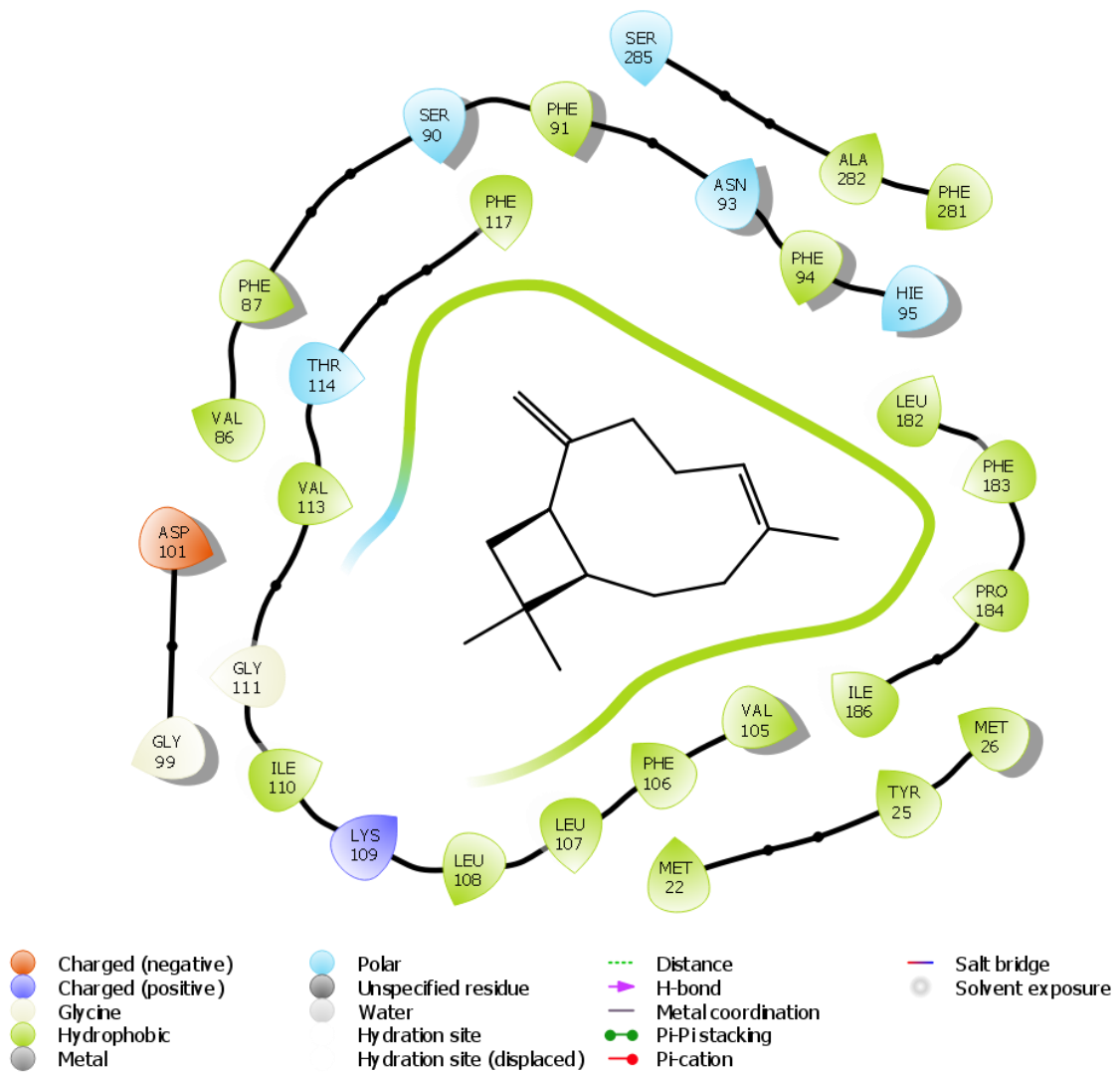


Figura 22- Docking BCF com receptor CB2

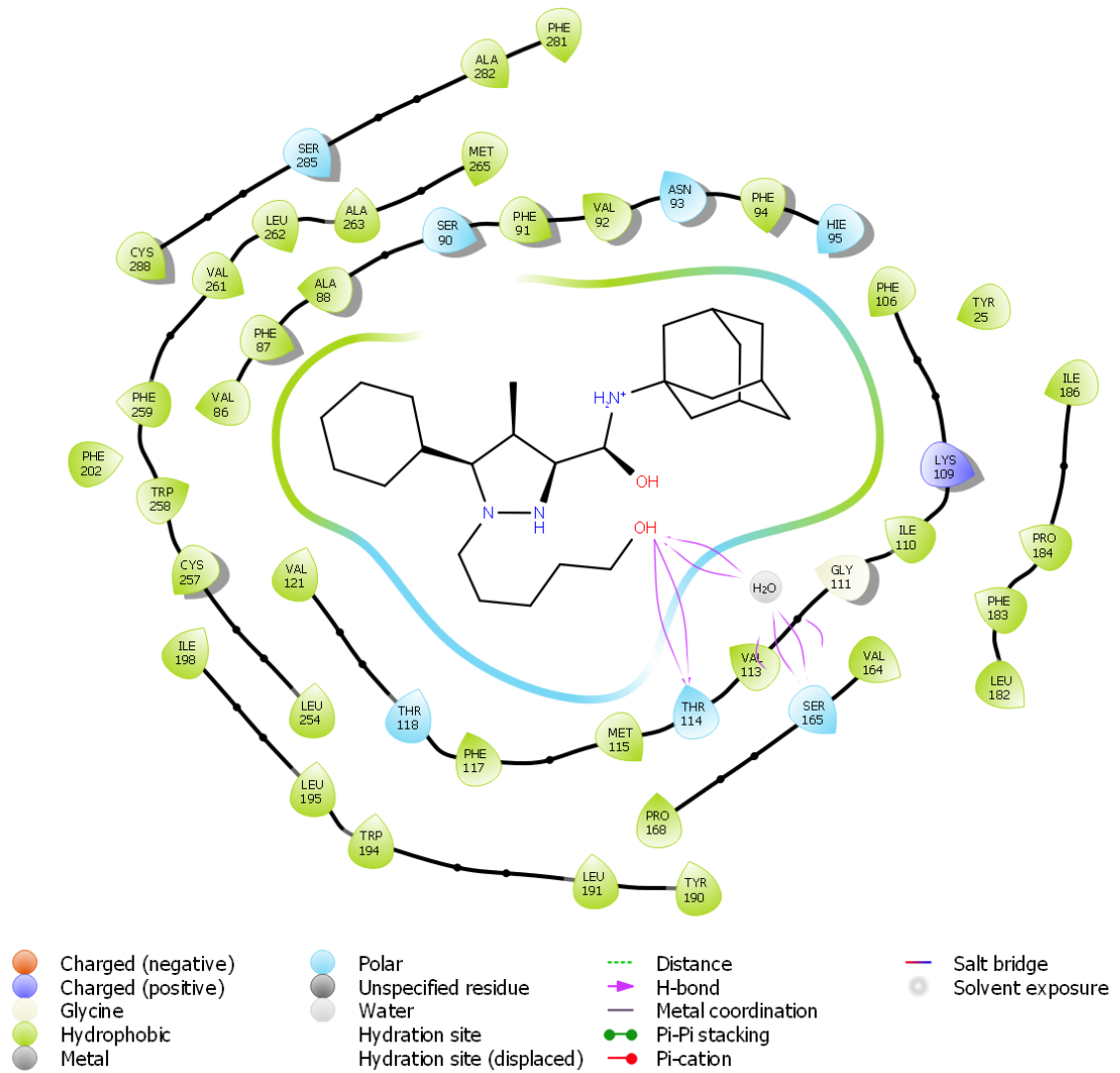


Figure 23- Redocking CB2

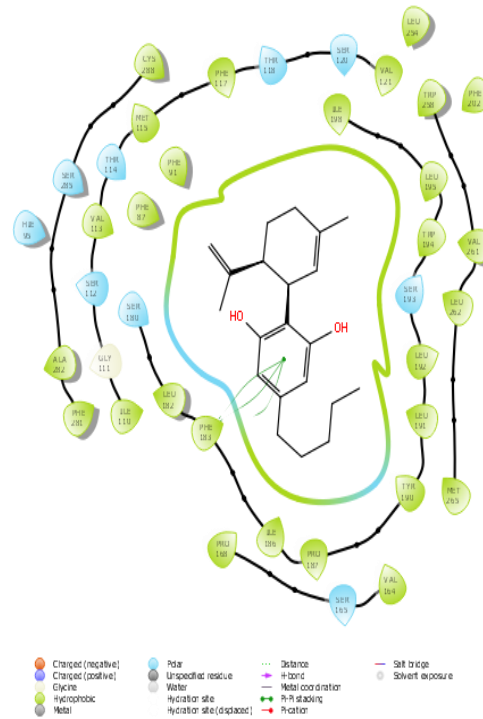


Figura 24-*Docking* CBD com receptor CB2

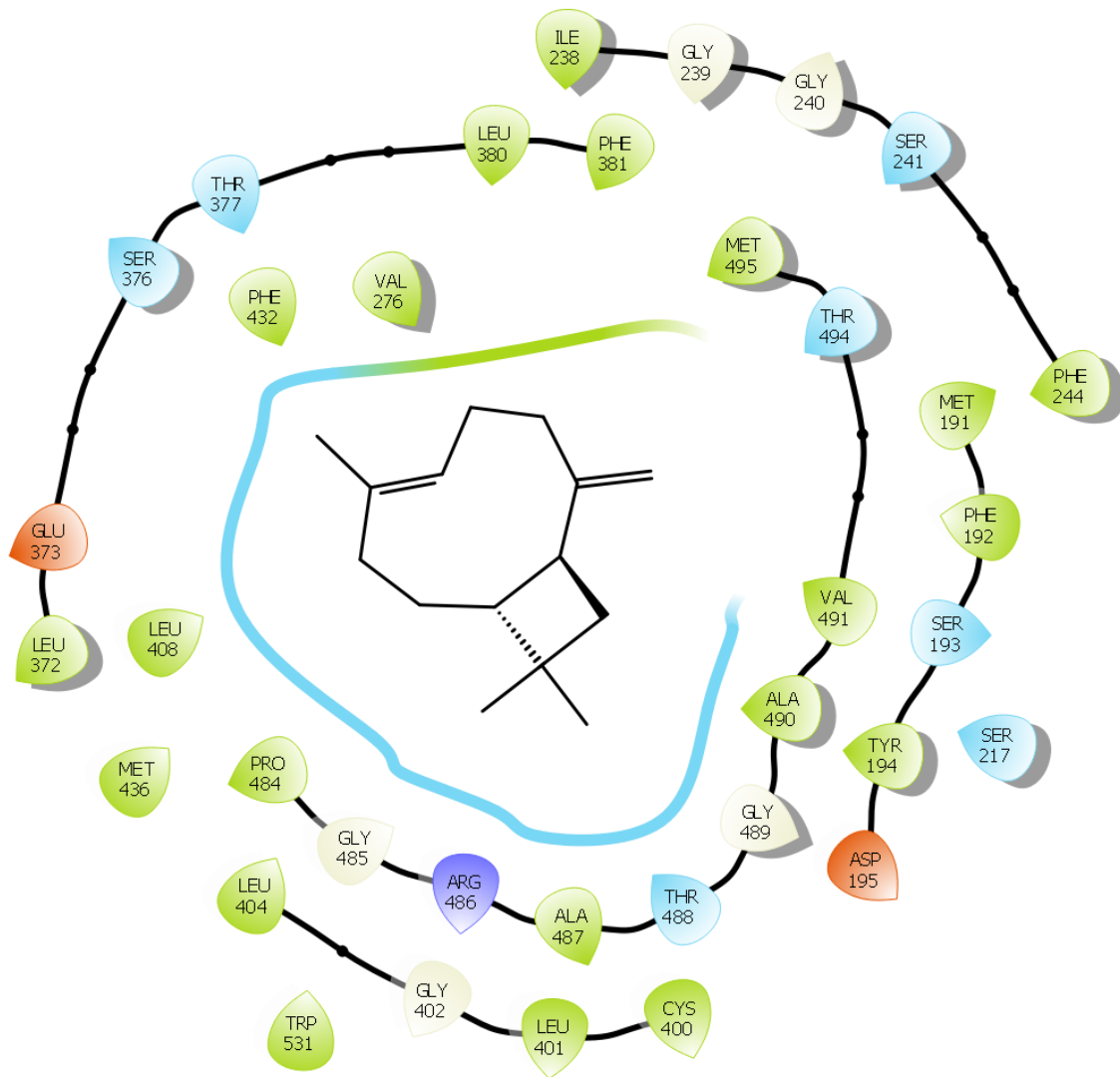


Figura 25 – Docking interação de FAAH com BCF

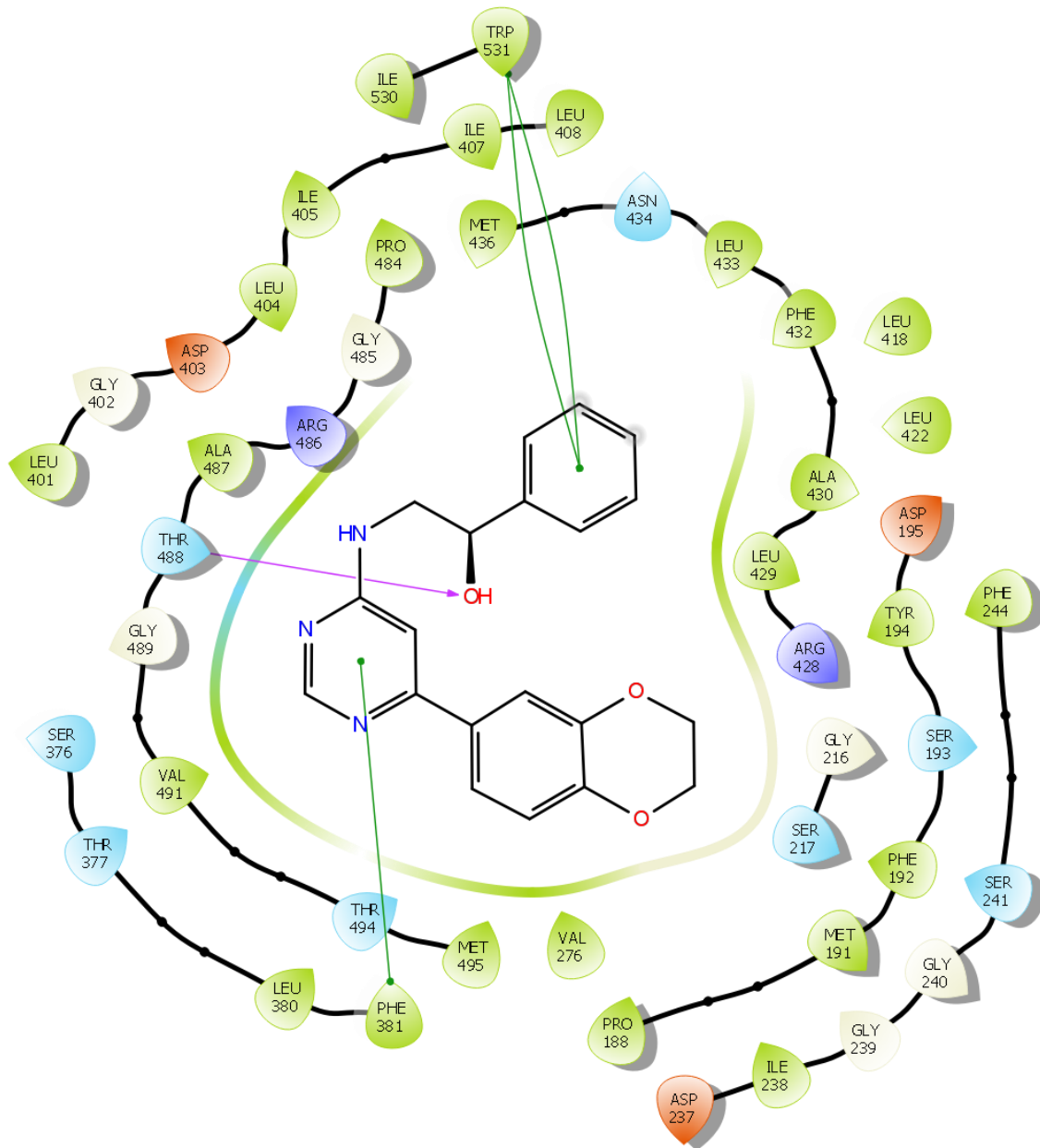


Figura 26 – Redocking FAAH

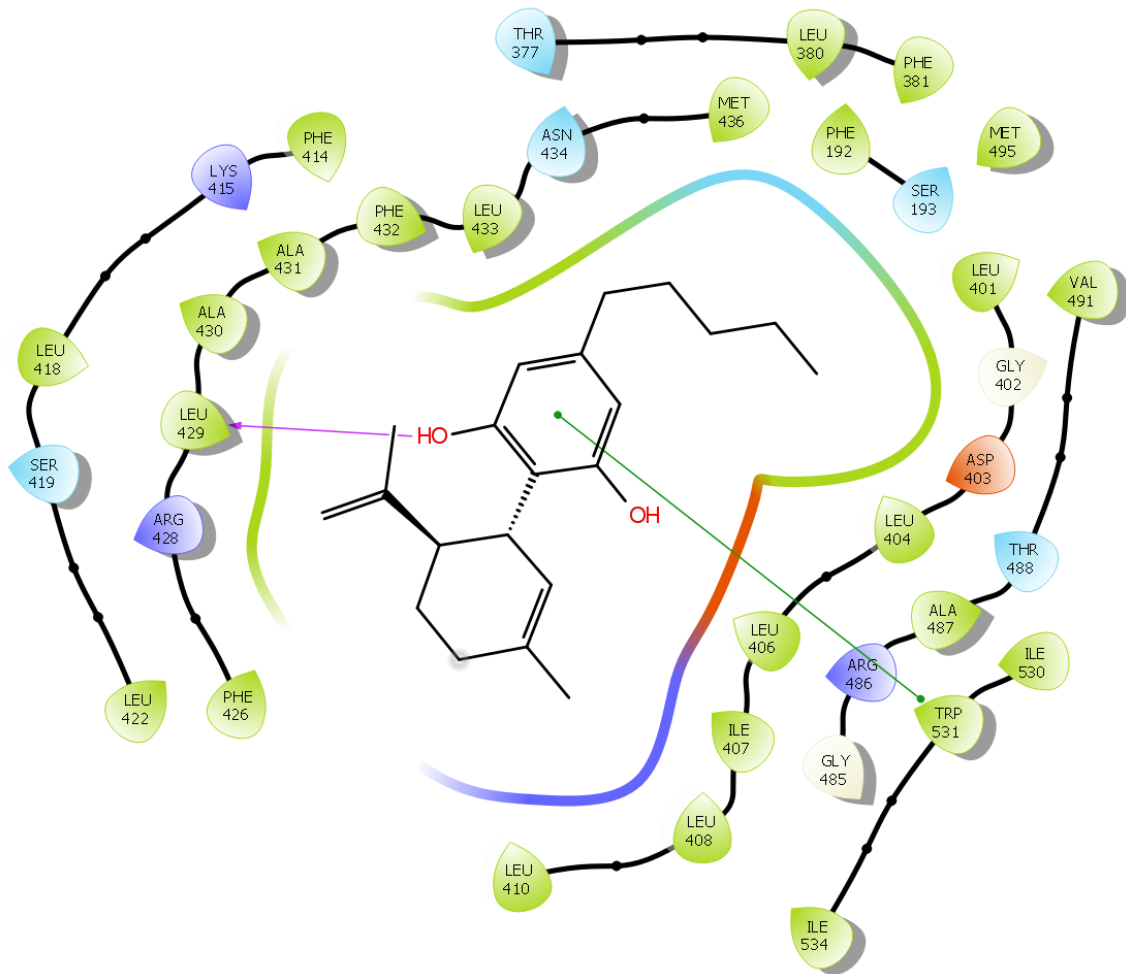


Figura 27 – Docking interação de FAAH com CBD

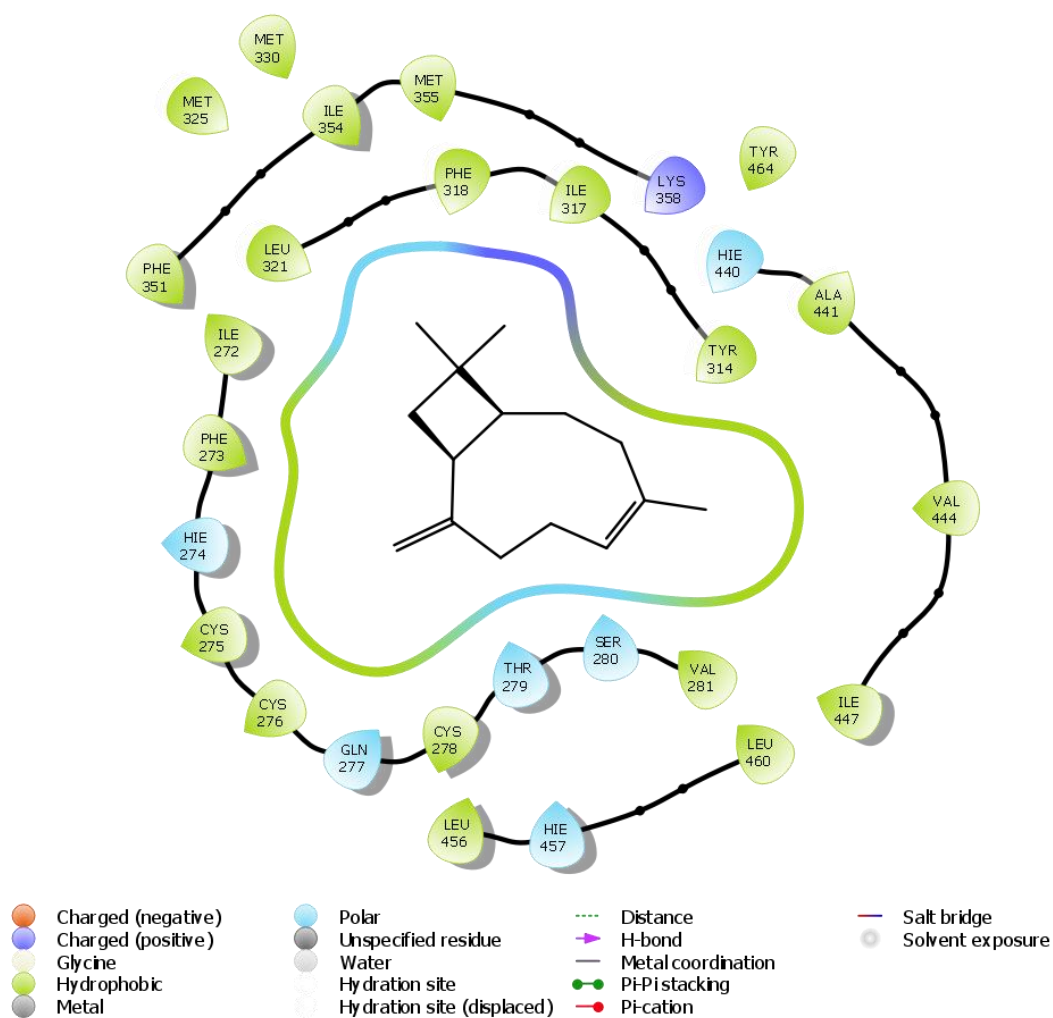


Figura 28 – Docking interação de BCF com PPAR α .

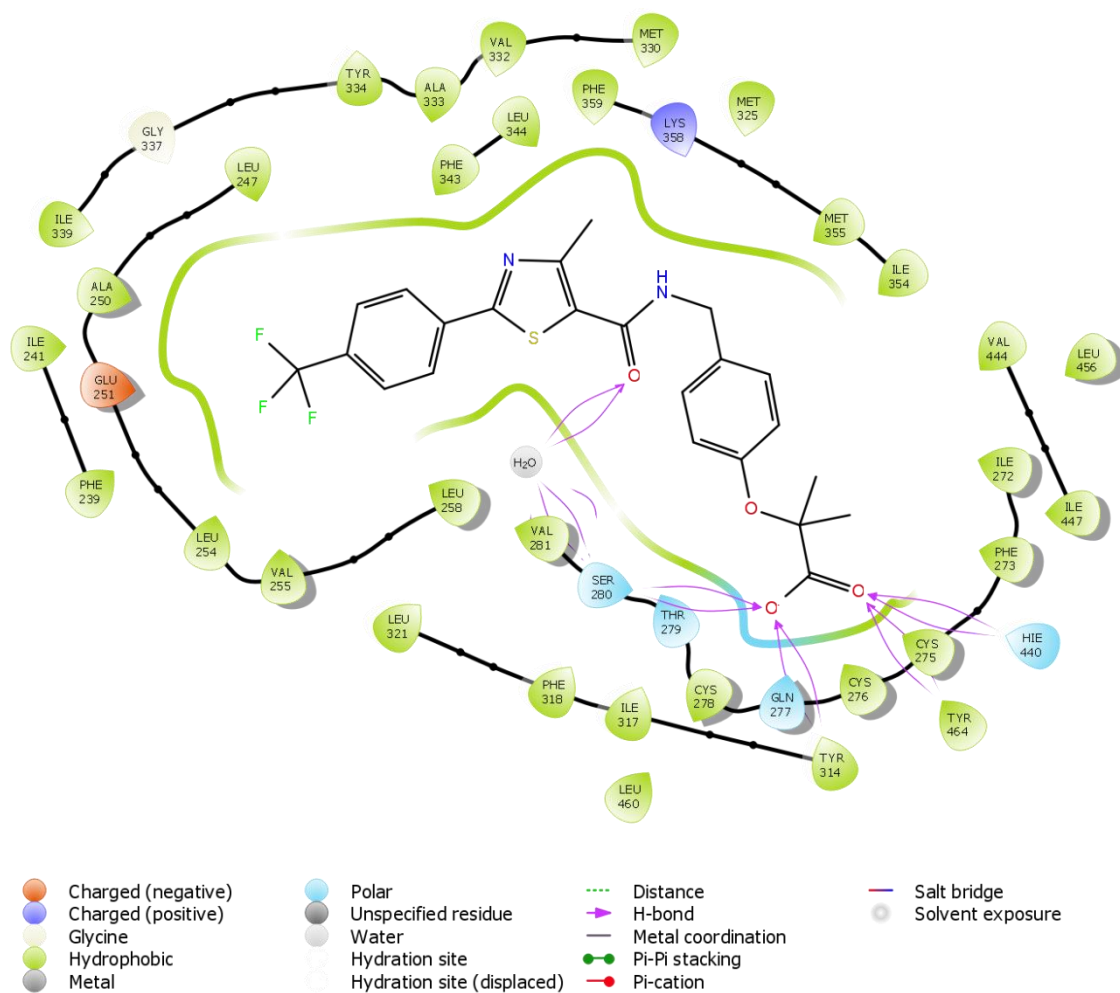


Figure 29– Redocking PPAR α

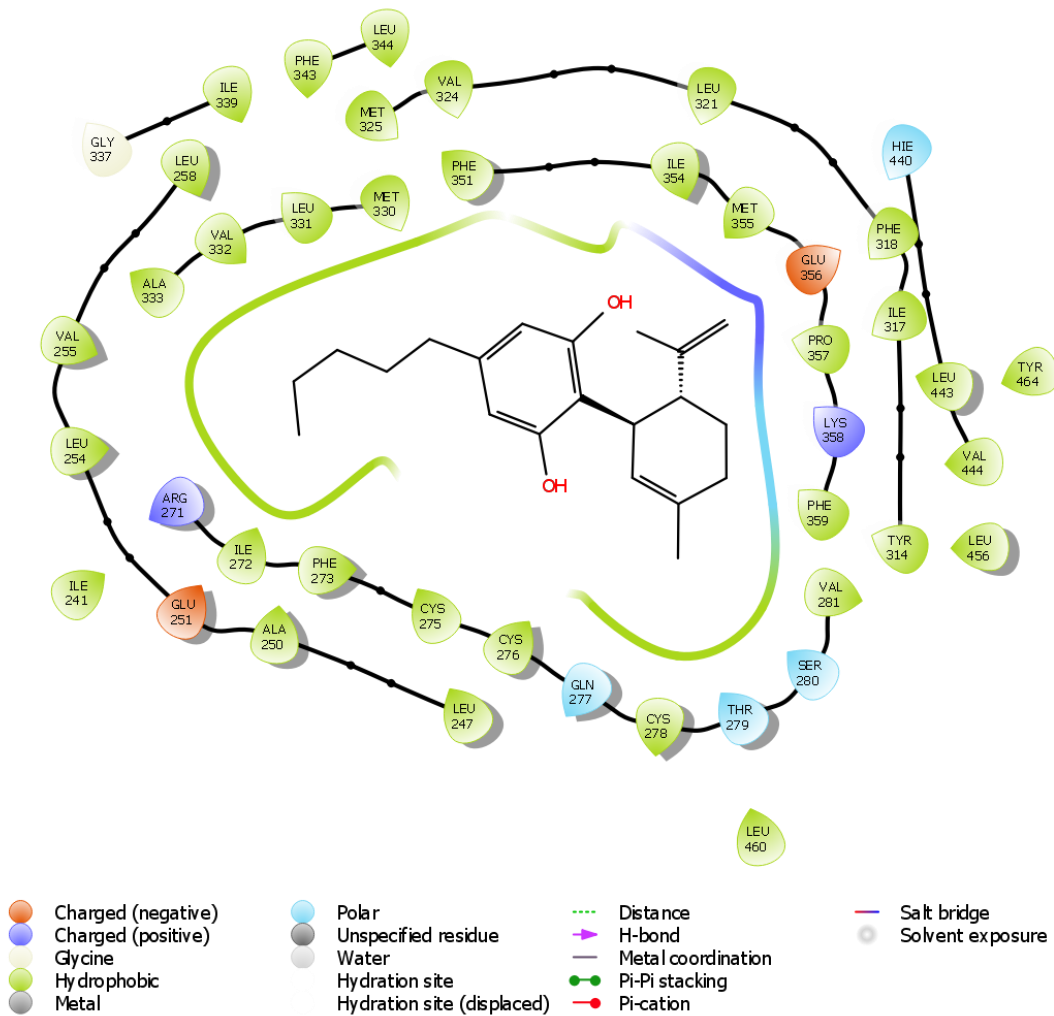


Figura 30-Docking interação de CBD com PPAR α

TESTE	KET	BCF 10 mg/Kg	BCF 50 mg/Kg	OLANZA
CAMPO ABERTO	↑	↓	-	↓
PP 70	↓	↑	↑	↑
PP75	↓	-	↑	-
Y-MAZE	-	-	-	-
INTERAÇÃO SOCIAL	↓	↑	↑	↑
GSH	↓	-	-	↑ CPF, HC e CE
TBARS	↑	↓ CPF, HC e CE	↓ CPF, HC e CE	↓ CPF, HC e CE
NITRITO	↑	↓ HC	↓ HC	↓ HC

Figura 31. Resumo esquemático dos resultados obtidos na pesquisa

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, reproduziu-se o modelo de esquizofrenia-símile induzido por Cetamina, como descrito na literatura (CHINDO et al., 2012). A esquizofrenia-símile foi induzida com administração de KET, na dose 20 mg/kg em camundongos *Swiss*, como descrito por Vasconcelos et al., 2005. Nesta dose, os sinais clínicos apresentados por pacientes com o transtorno da esquizofrenia, tais como sintomas positivos e negativos que podem ser mimetizados em modelos animais para estudos experimentais da esquizofrenia. (JAVITT et al., 2012). Neste trabalho o BCF foi testado nas doses de 10 e 50 mg/kg, as quais foram escolhidas de acordo com as doses já relatadas na literatura (BAHI et. al., 2014; JAVED et al., 2016). Também foi demonstrado afinidade da BCF na ligação com os receptores: receptor nuclear PPAR α , o receptor acoplado à proteína G CB2 e a enzima FAAH. através do estudo de docking molecular.

Os sintomas positivos e negativos da esquizofrenia, bem como o déficit cognitivo induzido por KET, foram parcialmente atribuídos ao bloqueio dos receptores NMDA (NMDARs). De acordo com tal evidência, o bloqueio dos NMDARs, localizado nos neurônios inibitórios GABAérgicos das regiões límbica e subcortical do cérebro, produz um aumento da atividade neuronal no circuito límbico-estriatal devido ao aumento da liberação de glutamato e de dopamina, sendo este evento relacionado aos sintomas positivos da esquizofrenia. Por conseguinte, o bloqueio dos NMDARs na área tegumentar ventral (ATV) induz a diminuição da liberação de dopamina no CPF, pois a produção basal de neurônios dopaminérgicos, que se projetam para o CPF, está sob o controle excitatório dos receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA na ATV, bem como dos receptores AMPA no CPF, sendo, portanto, esse bloqueio parcialmente responsável pelos sintomas negativos e cognitivos (JAVITT; ZUKIN, 1991; MOGHADDAM et al., 1997; CHATTERJEE et al., 2012; GASS et al., 1993; LORRAIN et al., 2003; BALLA et al., 2009).

Considera-se a administração repetida de cetamina um modelo farmacológico relevante para indução de sintomas tipo esquizofrenia-símile, pois apresenta validade de face constructo e preditiva (CHINDO et. al., 2012). Entretanto, a validade de face dos sintomas positivos em modelos animais é questionável por apresentar limitações em mimetizar em animais fenômenos observados apenas em humanos, como alucinações auditivas e delírios. Ainda assim, a literatura ao tratar de modelos animais que avaliam estes sintomas se

concentra em duas categorias principais de alterações comportamentais: hiperatividade locomotora e déficits da IPP (VAN DEN BUUSE, 2010). A hiperatividade locomotora pode ser induzida por doses moderadas de cetamina (VAN DEN BUUSE, 2010), já a deficiência de IPP é indicativa de um prejuízo nos mecanismos associados ao correto funcionamento do filtro sensorio-motor, um processo antecipatório que, por sua vez, impede a sobrecarga sensorial e a fragmentação cognitiva (GEYER et al., 2002; GEYER, 1999; POWELL et al., 2009). Assim, o modelo de IPP representa a "interface entre a psicose e cognição" (SALUM et al., 2008).

Nesse contexto, nosso estudo mostra que a administração de ambas as doses de BCF (10mg/kg e 50mg/kg) foram capazes de reverter os sintomas positivos da esquizofrenia induzidos por KET em camundongos através da redução da atividade locomotora e dos níveis de IPP induzidas por KET, com resultados comparáveis aos da OLANZA. Com relação ao déficit de IPP observados, nos pulsos 70 75 e 75 dB apenas a dose de 50 mg/kg apresentou significância relevante em nosso estudo. Vale enfatizar que, no modelo de esquizofrenia induzido por KET em camundongos, apenas antipsicóticos da classe dos atípicos ou segunda geração mostram propriedade em reverter os sintomas positivos (MONTE et al., 2013).

Nosso resultado de atividade locomotora está de acordo com um estudo realizado por Oliveira e cols. 2016, em modelo de epilepsia, com indução por pentilenotetrazol, que usou uma dose de 100 mg/kg em camundongos adultos C57BL / 6, de ambos os sexos e evidenciou em seus resultados que BCF reduz esse parâmetro. Com relação ao déficit de IPP, não existem relatos na literatura de estudos utilizando o modelo de esquizofrenia com indução por cetamina utilizando o composto BCF.

Após a avaliação dos efeitos comportamentais do BCF nos sintomas positivos, os animais foram submetidos ao teste de memória operacional (Y-Maze), com o objetivo de avaliar o déficit cognitivo causado pela administração de KET. Em nosso estudo observou-se que as doses administradas de BCF não apresentaram efeitos de reversão nas alterações da memória de trabalho induzidas por KET, bem como ao tratamento com OLANZA. O referido sintoma vem sendo relacionado com alterações pró-oxidante e também inflamatórias observadas no transtorno da esquizofrenia (DO et al., 2009); e estudos evidenciam que BCF apresenta atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (GUO et al., 2014; SHARMA et al., 2016).

Estudos mostram que a KET provoca mudanças comportamentais em roedores, estando relacionados aos déficits sociais do transtorno da esquizofrenia. Tais efeitos da KET no teste de interação social correspondem bem com as observações clínicas que os antagonistas de NMDA induzem, ou seja, sugerindo que o isolamento social em ratos pode ser preditivo de sintomas negativos da esquizofrenia. (KOROS et al., 2007). Diante disto, considera-se o isolamento social um dos sintomas principais desta desordem mental (LYSAKER et al., 2012).

Em nosso estudo a dose de BCF 10 mg/kg não apresentou efeito significativo, assim não foi capaz de reverter este sintoma do transtorno, já a dose de BCF 50 mg/kg foi capaz de reverter as diminuições dos números de entradas e tempo de preferência social induzido por KET. A dose citada revelou um aumento da interação social superior aos valores do antipsicótico olanzapina. Assim, observou-se que os animais tratados com BCF na dose 50 mg/kg aumentaram a preferência pela área do aparato que tinha outro animal do mesmo sexo e tamanho (camundongo macho). Estudos mostram que os sintomas negativos e cognitivos estão relacionados à esquizofrenia com alterações inflamatórias e oxidativas (MONJI *et al.*, 2009; LIEBERMAN, 1999; PEREZ-NERI *et al.*, 2006; MULLER; SCHWARZ, 2010).

Além das alterações comportamentais, evidências experimentais apontam forte relação entre desequilíbrio oxidativo e fisiopatologia da esquizofrenia (GYSIN et al., 2007; REDDY; YAO, 1996; SILVA et al., 2016). Por conseguinte, estresse oxidativo é considerado um mecanismo reconhecido no processo de envelhecimento e na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e psiquiátricas, como a doença de Alzheimer, Parkinson, Déficit de Atenção e Hiperatividade, esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão (GRASES et al., 2014).

Beta-carbófileno tem mostrado efeito pró-oxidante em estudo recente em modelo de Parkinson (JAVED et al., 2016; et al., 2017). Decidimos estudar compostos oxidativos e nítricos em várias áreas do cérebro, como o CPF, HC e CE, relacionados à neurobiologia desse transtorno mental (DE OLIVEIRA VIANA ARRUDA et al., 2008; MONTE et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015; SAMPAIO et al., 2018a) em animais submetidos ao modelo KET de esquizofrenia e tratados com diferentes doses de BCF.

Um dos principais marcadores do processo de peroxidação lipídica o malondialdeído (MDA) vem sendo atribuído a uma maior extensão de danos no hipocampo e córtex pré-frontal, em modelos animais (THAKARE; DHAKANE; PATHEL, 2017). Por conseguinte,

quanto mais elevados os níveis de MDA, maior o comprometimento na memória de trabalho, espacial e na memória declarativa tardia (TALAROWSKA et al., 2012).

Em relação aos parâmetros neuroquímicos, nossos achados no presente estudo mostram que BCF (10 e 50 mg/ kg) promoveu redução da concentração de TBARS e aumentou a concentração de GSH em ambas as doses, no CPF, HC e CE quando comparada com o grupo KET. Sabe-se que o aumento da concentração de substâncias pró-oxidantes, como GSH e TBARS, estão relacionadas com a fisiopatologia da esquizofrenia (TSAI et al., 2013; GYSIN et al., 2007; (ZHANG et al., 2010a). Vale a pena ressaltar que não há nenhum estudo anterior investigando a ação antioxidante de BCF em diferentes áreas do cérebro em modelo de esquizofrenia.

Diversos são os mecanismos cerebrais para tornar estável a homeostase entre processos oxidativos e antioxidantes. A enzima GSH apresenta efeitos antioxidantes e propriedades protetoras do sistema nervoso central. Alteração na síntese de GSH está associado à esquizofrenia (GYSIN et al., 2007; KULAK; CUENOD; DO, 2012).

Em estudos anteriores do nosso grupo (MONTE et al., 2013; SAMPAIO et al., 2018b) mostraram que a administração repetida de KET a camundongos adultos diminui os níveis de GSH em CPF e CE e que substâncias antioxidantes revertem essa ação. Um estudo conduzido por Javed e cols. 2016 mostrou evidências da ação antioxidante de BCF, com a dose 50 mg/kg em um estudo no modelo de Parkinson induzido por rotenona, contribuindo para um aumento dos níveis da enzima GSH o que confirma a ação antioxidante de BCF (JAVED et., 2016).

Em nossos resultados neuroquímicos obtivemos resultados que demonstrou que KET diminuiu significativamente os níveis de GSH no CPF, HC e CE de camundongos *swiss* machos e que esse efeito não foi revertido por BCF nas doses estudadas apenas o antipsicótico usado no estudo foi capaz de aumentar os níveis de GSH com resultados significantes.

Para investigação de transtornos psiquiátricos, incluindo a esquizofrenia, o uso do biomarcadores do estresse oxidativo, como os danos oxidativos de lípidios, são comumente utilizados para avaliação do desequilíbrio oxidativo que está correlacionado com diversos transtornos (ZHANG et al., 2012). Um estudo envolvendo esses biomarcadores aponta um aumento nos níveis de TBARS em pacientes com esquizofrenia em comparação com pacientes controle (ZHANG et al., 2010a). No presente trabalho, em nossos resultados, KET também aumentou os níveis de MDA, um marcador de peroxidação lipídica, em CPF, HC e

CE. Mostramos que o tratamento com BCF 10 e 50 mg/kg, bem como a olanzapina, foram capazes de reverter esse efeito de KET em todas as áreas estudadas. Nosso estudo corrobora com pesquisas que apontam ação antioxidante de BCF em estudos de sua ação anticonvulsivante e no tratamento do Parkinson (OLIVEIRA et al., 2016; JAVED et al., 2016).

Um estudo recente realizado por Tchekalarova e colaboradores (2018), demonstrou de modo semelhante a esses resultados que o tratamento intraperitoneal com BCF nas doses de 50 e 100 mg/kg reduziu os níveis de MDA no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida pelo ácido caínico. Diante disto, observa-se que essa ação antioxidante na reversão nos níveis de TBARS parece estar relacionada com a descrição da cadeia de quebra, eliminação de radicais livres e excelente atividade oxidante de BCF (JAVED et al., 2016; CHANGEN et al., 2007).

Na literatura é bem discutido que o óxido nítrico (NO) também está relacionado à fisiopatologia da esquizofrenia. Em estudos anteriores foram demonstrados que pacientes esquizofrênicos tanto diminuições quanto aumentos na atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (BERNSTEIN; BOGERTS; KEILHOFF, 2005). Nos resultados do estudo realizado por Javed e colaboradores (2016) foi demonstrado as propriedades antioxidantes do beta-cariofileno, após administração intraperitoneal, na dose de 50 mg/kg, em ratos *Wistar* submetidos ao modelo de Doença de Parkinson induzido por rotenona. Uma vez que esta substância provocou aumento do estresse oxidativo e nitrosativo, marcado pela elevação dos níveis de MDA e nitrito, o tratamento com BCF foi capaz de reverter de forma significativa esse aumento na região do mesencéfalo dos animais. No entanto, a administração de BCF na dose mais alta reduziu a concentração de nitrito nessa área do cérebro. Curiosamente, nos últimos anos, a administração de doadores de NO a pacientes esquizofrênicos está trazendo resultados importantes no controle dos sintomas agudos (MAIA DE OLIVEIRA et al., 2012). Em nossos resultados, demonstramos que a administração repetida de KET aumentou os níveis de nitrito, no HC, e este efeito foi revertido pela administração de BCF 10 mg/kg.

É comum se utiliza estes parâmetros como, a energia de ligação, distância entre as ligações, compatibilidade espacial e energética como parâmetro para indicar a possível ação entre duas moléculas ou composto (DAMASCENO et al., 2016; MELO JÚNIOR et al., 2017)

Os resultados do *docking* realizado com BCF demonstraram que essa molécula apresenta um alto escore de *docking* quando ancorado ao receptor CB2, ainda no redocking do

ligante co-cristalizado apontou uma potencial interação favorável do composto com sítio do receptor CB2. Ainda em nosso estudo afim validar foi realizado o docking para CBD o agonista natural desses receptores que, por sua vez, apresentou resultado favorável ao se comparar seu escore de docking ao de BCF. Achado importante no estudo, pois ativação dos receptores CB2 representam um alvo terapêutico importante em numerosas doenças (CALLEJA et al., 2013).

Com relação a enzima FAAH, o composto BCF também um escore relativamente alto e o cristal também possui um ligante com atividade agonista, no sítio de atividade do receptor e ao realizar o docking para CBD, foi observado a similaridade de atividade farmacológica desses ligantes. FAAH é uma enzima que atua degradando o sistema endocanabinóide (ECS), principalmente anandamida e 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Assim aumenta o tom da sinalização deste sistema. Diante do exposto existe um crescente consenso de que os canabinoides podem modular sintomas semelhantes à esquizofrenia (KRUK-SLOMKA et al., 2016; KRUK-SLOMKA 2017), bem como que existem algumas descobertas de modulação indireta dos níveis de endocanabinóides ganham com inibidores da FAAH na memória ou locomoção em roedores (CLAPPER J.R, MANGIERI R.A, PIOMELLI D. 2009; SEILLIER et al., 2010). Diante disto, pode-se considerar que estudos sobre inibição FAAH podem abrir uma nova abordagem para o desenvolvimento de medicamentos que agem indiretamente, reforçando as ações dos mediadores endógenos de amidas lipídicas.

Ao analisarmos o *docking* de BCF com o receptornuclear PPAR α , foi visto que apresentou um baixo escore de docking, já no escore de redocking foi observado um valor superior ao escore de docking de BCF, o que revelou uma potenciação desfavorável do composto como sítio do PPAR α . Com relação ao docking para CBD e PPAR α o resultado foi bastante similar ao do BCF. Ressalta-se que os PPARs são membros importantes da superfamília de receptores nucleares, que funcionam como fatores de transcrição ativados por ligantes e desempenham um papel crítico na diferenciação e proliferação de células, organogênese bem como inflamação (KOTA B.P, HUANG T.H, ROUFOGALIS B.D 2005).

Em relação ao estudo de *docking* molecular de BCF nos receptores CB2, PPAR α e a enzima FAAH nós observamos que esse composto se ligou com alta afinidade ao receptor CB2 e a enzima FAAH. Esses resultados juntos levam a sugerir que a ação antipsicótica de BCF esteja relacionada ao sistema canabinóide, por promover ativação de CB2, que não possui efeito psicoativo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos resultados apresentados neste trabalho permitiu as seguintes considerações:

O Beta-cariofileno revelou uma atividade antipsicótica, revertendo alterações comportamentais esquizofrenia-símile, como hiperlocomção, déficit de inibição Pré-Pulso e isolamento social em animais submetidos a modelos de esquizofrenia por KET.

O Beta-cariofileno administrado nas 10 e 50 mg/kg doses não apresentou significância com relação aos níveis de glutathiona reduzida (GSH) nas áreas estudadas em animais submetidos a modelos de esquizofrenia por KET.

O Beta-cariofileno administrado nas 10 e 50 mg/kg doses reduziu significativamente a lipoperoxidação lipídica nas áreas estudadas em animais submetidos a modelos de esquizofrenia por KET.

O Beta-cariofileno administrado nas 10 mg/kg dose reduziu significativamente a os níveis de nitrito no hipocampo em animais submetidos a modelos de esquizofrenia por KET.

In silico, o Beta-cariofileno interage com receptor canabinoide 2 (CB2), com a enzima anandamida hidroxilase (FAAH) e ainda ligação com score mais baixo com receptor PPARalpha.

9. CONCLUSÃO

Os dados dessa pesquisa sugerem que o beta-cariofileno possui ação sobre o sistema nervoso central, apresentando efeito tipo antipsicótico, uma vez que o tratamento com essa droga mostrou resultados significativos em modelos animal de esquizofrenia induzida por cetamina. Ademais, o beta-cariofileno reverteu alterações comportamentais semelhantes à esquizofrenia induzidas pela cetamina. Além disso, o tratamento com beta-cariofileno atenuou o estresse oxidativo nas áreas cerebrais do hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado, ao reduzir as concentrações de malondialdeído e de nitrito apenas no hipocampo. Ainda em estudo de *docking* molecular foi observado importantes ligações com excelentes escores de *docking* com receptor canabinoide CB2, com a enzima hidroxilase amida de ácidos graxos (FAAH) e com escore menor com receptor nuclear PPARalpha, contribuindo com informações dos alvos envolvidos em seus efeitos centrais e no sistema imune o composto pode se ligar. Dessa forma, diante desses significativos resultados, estudos subsequentes empregando o beta-cariofileno devem ser encorajados a fim de se aprofundar os conhecimentos acerca de suas propriedades no tratamento da esquizofrenia, já que nossos resultados apontam o potencial efeito antipsicótico do beta-cariofileno na reversão do transtorno semelhante ao esquizofrênico e sugere que sua eficácia terapêutica com ação neuroprotetora e significativa por suas atividades antioxidantes e nitrérgicas, além de exibir interação com receptor CB2.

REFERÊNCIAS

ALBERTI T.B, BARBOSA W.L.R, JOSÉ LUIZ FERNANDES VIEIRA J;L:V,RAPOSO N.R.B. DUTRA R.C. (β)-Caryophyllene, a CB2 Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis **Int. J. Mol. Sci.** **2017**, 18, 691; doi:10.3390/ijms18040691.

ALAGARSAMY, S.; LONART, G.; JOHNSON, K.M. Regulation of nitric oxide synthase activity in cortical slices by excitatory amino acids and calcium. **J. Neurosci. Res.**, v.38, p.648–653, 1994.

ALMA, M. H. et al. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities of the essential oils from *Origanum syriacum*. L. growing in Turkey. **Biol. Pharm. Bull.** 26: 1725–1729. (2003).

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. [s.l.] American Psychiatric Association, 2013.

ANDRADE-SILVA, M. CORREAS, L.B.; CANDÉA et al. The cannabinoid 2 receptor agonist b-caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by *Mycobacterium bovis* BCG by inhibiting neutrophil migration. **Inflammation Research**, v. 65, n. 11, p. 869-879, 2016.

ARVINDAKSHAN, M. et al. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. **Biol. Psychiatry**, v.53, p.56-64, 2003.

ASAKAWA Y, ISHIDA T, TOYOTA M, TAKEMOTO T. Terpenoid biotransformation in mammals. IV Biotransformation of (+)- longifolene, (-)-caryophyllene, (-) caryophyllene oxide, (-)- cyclocolorenone, (+)-nootkatone, (-)-elemol, (-)-abietic acid and (+)-dehydroabietic acid in rabbits. **Xenobiotica** 1986; 16: 753-67.

B HALLIWELLS CHIRICO The American Journal of Clinical Nutrition, Volume 57, Issue 5, 1 May 1993, Pages

BAHI et al., β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**. Junho, 2014.

BALLA et al., 2009.

BALLA, A. et al. GABAB/ NMDA receptor interaction in the regulation of extracellular dopamine levels in rodent prefrontal cortex and striatum. **Neuropharmacology** v.56, p.915-921, 2009.

BALY, D. T.; COYLE, J.T. Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of Schizophrenia. **Neurosci Biobehav Rev**, v.35, p 848-70, 2011.

BECKER, A.; GRECKSCH, G. Ketaine-Induced Changes in Rat Behaviour: A possible Animal Model of Schizophrenia. Test of Predictive Validity. **Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatr** v. 28, p. 1267-1277, 2004.

BEGOU, M. et al. The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. **Neuroscience**, v. 157(1), p.29-39, 2008.

BENCHERIF, M.; STACHOWIAK, MK.; KUCINSKI, AJ.; LIPPIELO, PM.; Alpha7 nicotinic cholinergic neuromodulation may reconcile multiple neurotransmitter hypothesis of schizophrenia. **Medical hypothesis**, v 78, n.5, p. 594-600, 2012.

BENTO, A.F.; MARCON, R.; DUTRA, R.C. et al. β -caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through cb2 receptor activation and PPAR γ pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, 2011.

BERNSTEIN HG et al. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. **Schizophr Res** 78(1): 69–86, 2005.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000

BERTONI, M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10480, dez. 2017.

BHATTACHARYA, D. et al. 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. Web Server issue, p. W406–W409, 8 jul. 2016.

BIENERT, S. et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D313–D319, jan. 2017

BIOQUE M, et al. Peripheral endocannabinoid system dysregulation in first-episode psychosis. **Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol** 2013; 38: 2568-77.

ISHIGURO H, et al. A nonsynonymous polymorphism in cannabinoid CB2 receptor gene is associated with eating disorders in humans and food intake is modified in mice by its ligands. **Synapse**. 2010 Jan; 64(1):92-6.

BRAFF, D.L et al. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. **Psychophysiology**, v.15, p.339-343, 1978.

BRAFF, D.L.; STONE, C.; CALLAWAY, E.; GEYER, M. A.; GLICK, I.; BALI, L. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. **Psychophysiology**, v.15, p.339-343, 1978.

BRESSAN, R.A.; PILOWSKY, L.S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Rev Bras Psiqu.**, v.25, p.177–183, 2003.

BROWN, A. The environment and susceptibility to schizophrenia. **Prog Neurobiol**, v. 93, p. 23–58, 2011.

BRUINS SLOT, L.; KLEVEN, M.S.; NEWMAN TANCREDI, A. Effects of a novel antipsychotics with mixed D2, antagonist/ 5-HT 1A agonist properties on PCP- induced social interaction deficits in the rat. **Neuropharmacology** v.49 (7), p.996, 2005.

BUDAVARI S, O'NEIL M, SMITH A, HECKELMAN P, OBENCHAIN J. The Merck Index, Print Version. Twelfth ed. USA: CRC Press 1996.

CALLEJA MA, VIEITES JM, MONTERO-MELENDZ T, TORRES MI, FAUS MJ, GIL A, SUAREZ A. The antioxidant effect of beta-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **Br J Nutr** , 109(3): 394-401, 2013.

CHANG H.J, KIM J.M, LEE J.C, KIM W.K, CHUN H.S. Protective effect of beta-caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury. **J Med Food** 2013; 16: 471-80.

CHATTERJEE, M. et al. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 6, p. 983–991, 2012.

CHENG Y, DONG Z, LIU S. beta-Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 receptor activation and the PPARγ pathway. **Pharmacology** 2014; 94:1-12.

CHICCA A, CAPRIOGLIO D, MINASSI A, *et al.* Functionalization of beta-caryophyllene generates novel polypharmacology in the endocannabinoid system. **ACS Chem Biol** 2014; 9: 1499-507

CHINDO, B.A et al., ketamine-enhanced immobility in forced swim test: a possible animal model for the negative symptoms of schizophrenia. **Progress in neuro-psychopharmacology biological psychiatry**, v. 38 , n. 2, p. 301-6, 7 ago. 2012.

CHO, J. A., CHANG, H. J., LEE, S.-K., KIM, H.-J., HWANG, J.-K., CHUN, H. S. Amelioration of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Sci.** 80: 932–939. (2007).

CHOI, Y.K.; SNIGDHA, S.; SHAHID, M.; NEILL, J.C.; TARAZI, F.I. Subchronic effects of phencyclidine on dopamine and serotonin receptors: implications for schizophrenia. **J Mol Neurosci.**, v.38(3), p.227-35, jul 2009.

CHOI IY, J.U C, ANTHONY JALIN A.M, LEE DA I, PRATHER P.L, KIM W.K. Activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury. **Am J Pathol** 2013; 182:928-39.

CLAPPER J.R, MANGIERI R.A, PIOMELLI D .The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabis dependence. **Neuropharmacology** 56(1):235–243, 2009

CRILLY, J. The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis. **Hist. Psychiatry**, v.18, p.39–60, 2007.

DAKHALE, G.N.; KHANZODE, S.D.; KHANZODE S.S.; SAOJI A. Supplementation of vitamin C with atypical antipsychotics reduces oxidative stress and improves the outcome of schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl)** v 182, p 494-498 2005.

DAMASCENO, M.B.M.V, et al. "Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. **Chemico-biological interactions**. v.256,p. 9-15, 2016.

DE ALMEIDA BORGES VR, RIBEIRO AF, DE SOUZA ANSELMO C, CABRAL LM, DE SOUSA VP. Development of a high performance liquid chromatography method for quantification of isomers betacaryophyllene and alpha-humulene in copaiba oleoresin using the Box-Behnken design. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 2013; 940: 35-41.

DELLU, F.; CONTARINO, A.; SIMON, H.; KOOB, G.F.; GOLD, L.H. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. **Neurobiol Learn Mem.**, v.73,p.31–48, 2000.

DEMJAHA, A. et al. Antipsychotic Treatment Resistance in Schizophrenia Associated with Elevated Glutamate Levels but Normal Dopamine Function. **Biological Psychiatry**, 2014.

DI SOTTO A.; MAZZANTI G.; CARBONE F.; HRELIA P.; MAFFEI F. Inhibition by betacaryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Metation research**. 17;699 (1-2): 22-8. Pubmed PMID: 20398787, 2010.

DIAS DDE O, COLOMBO M, KELMANN RG, *et al.* Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of betacaryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Anal Chim Acta** 2012.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; OLAS, B. Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. **Platelets**. v.20, p.90-96, 2009.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; OLAS, B.; GŁOWACKI, R.; BALD, E. Oxidative/Nitrative Modifications of Plasma Proteins and Thiols from Patients with Schizophrenia. **Neuropsychobiology**, v.59, p.1–7, 2009.

DO, K. Q. et al. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 19, n. 2, p. 220–230, 1 abr. 2009.

DOS SANTOS, C. M. S. **Efeitos da administração de diferentes doses subanestésicas de cetamina sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos**. 2009. Dissertação

(Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2009.

DUHAMEL, N.; MARTIN, D.; LARCHER, R.; FEDRIZZI, B. et al. Convenient synthesis of deuterium labelled sesquiterpenes. **Tetrahedron Letters**, v. 57, p. 4496-4499, 2016

ELLISON, G. The N-methyl-d-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. **Brain Res. Brain Res. Ver.** v.20, p.250–267, 1995.

ESPLUGUES, J. NO as signalling molecule in the nervous system. **British Journal of Pharmacology**, v.135, p.1079-1095, 2002.

FALKAI, P et al., World Federation of societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological for biological treatment of schizophrenia, part 2: long-term treatment of schizophrenia. **The World journal of biological psychiatry: the official journal of the World Federation of societies of Biological Psychiatry**, v.7, n.1, p. 5-40, jan. 2006.

FENDRI, C et al., Oxidative stress involvement in schizophrenia pathophysiology: a review. **L' Encéphale**, v.32, n. 2 Pt 1, p. 244-52, 2006.

FOLADOR, T.S. **Expressão dos receptores de glutamato do tipo NMDA no cerebelo de aves durante o envelhecimento.** Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Universidade Cidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FRIESNER, R. A. et al. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 6177–6196, out. 2006.

GALDINO P.M, NASCIMENTO M.V, FLORENTINO I.F, *et al.* The anxiolyticlike effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, beta-caryophyllene, in male mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 2012; 38:276-84.

GARCÍA-GUTIÉRREZ MS, MANZANARES J. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. **J Psychopharmacol.** 2011 Jan; 25(1):111-20

GERTSCH J. Anti-inflammatory cannabinoids in diet: Towards a better understanding of CB(2) receptor action? **Commun Integr Biol** 2008; 1: 26-8.

GHELARDINI C, GALEOTTI N, DI CESARE MANNELLI L, MAZZANTI G, CBARTOLINI A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **Farmaco** 2001; 56(5-7): 387-9.

GOFF, D.C.; COYLE, J.T. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. **Am. J. Psychiatry**. v.158, p.1367– 1377, 2001.

GOLAN, DAVID E, *Princípios de Farmacologia: A base a base fisiopatológica da farmacoterapia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GONG J-P,. ONAIVI ES,. ISHIGURO H,. LIU Q-R, TAGLIAFERRO PA,;BRUSCO A,. *et al*. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Res** 2006; 1071: 10-23.

GOODMAN & GILMAN, *As Bases farmacológicas da terapêutica*, 13. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

GRAFF-GUERRERO A., MAMO D., SCHAMI C.M., MIZRAHI R.,MARCON H., BARSOUM P., RUSJAN P., HOULE S., WILSON A., KAPUR S. ARCH. Effects of the 5HT antagonist cyproheptadine on neuropsychological function in chronic schizophrenia. **Gen Psychiatric**. 2009.

GRASES, G. et al. Evidence of Higher Oxidative Status in Depression and Anxiety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

GREENWOOD, J. R. et al. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 6–7, p. 591–604, jun. 2010.

GUO, K. *et al*. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF-κB activation in microglia. **The Journal of Molecular Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 41-48, 2014.

GYSIN, R. et al. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: Convergent genetic and functional evidence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 42, p. 16621–16626, 2007

HAAF et al. Glutamatergic Deficits in Schizophrenia – Biomarkers and Pharmacological Interventions within the Ketamine Model. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 19, 293-307, 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. *Free radicals in Biology and Medicine*. **New York: Oxford University Press**, 2007.

HENDRIKS H, MALINGRÉ TM, BATTERMAN S, BOS R. Mono- and sesquiterpene hydrocarbons of the essential oil of *Cannabis sativa*. **Phytochemistry** 1975; 14: 814-5.

HOFFMAN, H.S.; ISON, J.R. Reflex modification in the domain of startle. I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychol Ver**. v.87, p.175–89, 1980

HOWES, O. D.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. **Schizophrenia bulletin**, v. 35, n. 3, p. 549–62, maio 2009.

HU B, DOODS H, TREEDE RD, CECI A. Depression-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the CB2-selective agonist GW405833. **Pain**. 2009 Jun; 143(3):206-12

ISHIGURO H,;HORIUCHI Y,;ISHIKAWA M, KOGA M, IMAI K, SUZUKI Y,; et al. Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia. **Biol Psychiatry**2010; 67: 974-82.

JOSHI R.K. GC/MS analysis of the essential oil of *Leucas indica* from India. *Nat Prod Commun* 2014; 9: 1607-8.

JAVED et al., Cannabinoid Type2 (CB2) Receptors Activation Protects against Oxidative Stress and Neuroinflammation Associated Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**. V.10, 2016

JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; EMDADULHAQUE, M.; OJHA, S.K. Cannabinoid type 2 (CB2) receptors activation protects against oxidative stress and neuroinflammation associated dopaminergic neurodegeneration in rotenone model of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p.321, 2016.

JAVITT D.C, ZUKIN S.R, HERESCO-LEVY U, et al. Has an angel shown the way? Etiological and therapeutic implications of the PCP/NMDA model of schizophrenia. **Schizophr Bull**38: 958–966. 2012.

KANDEL, E. R. **Principles of neural science**. 6th. ed. [s.l.] McGraw-Hill Education/Medical, 2014.

KANTROWITZ, J.T.; JAVITT, D.C. N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: The final common pathway on the road to schizophrenia? **Brain Research Bulletin** v.83, p.108–121, 2010.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IQUIERDO I.; **Base biológicas dos transtornos psiquiátricos, uma abordagem translacional**, 3. Edição, Artmed, 2011.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J. *Compêndio de Psiquiatria*. 11. Ed. Porto Alegre: Artmed 2017

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. **Farmacologia básica e clínica**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

KEEFE, R. S. E. et al. Neurocognitive Effects of Antipsychotic Medications in Patients With Chronic Schizophrenia in the CATIE Trial. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 633, 1 jun. 2007.

KLAUKE AL, RACZ I, PRADIER B, *et al.* The cannabinoid CB(2)receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **Eur Neuropsychopharmacol** 2014; 24: 608-20.

KOROS.E, *et al.*, The selective mGlu5 receptor antagonist MTEP, similar to NMDA receptor antagonists, induces social isolation in rats. **Neuropsychopharmacology** 32: 562-567, 2007.

KOTA B.P, HUANG T.H, ROUFOGALIS B.D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacol Res** 51(2): 85-94, 2005

KRUK-SLOMKA M, BUDZYNSKA B, SLOMKA T, BANASZKIEWICZ I, BIALG The influence of the CB1 receptor ligands on the schizophrenia-like effects in mice induced by MK-801. **NeurotoxRes** 30(4):658–676, 2016.

KRUK-SLOMKA M, BANASZKIEWICZ I, BIALA G . The impact of CB2 receptor ligands on the MK-801-induced hyperactivity in mice. **Neurotox Res** 31(3):410–420, 2017.

KRYSTAL, J.; BELGER, A.; D'SOUZA, C.; ANAND, A.; CHARNEY, D.S.; AGHAJANIAN, G.K.; MOGHADDAM, B. Therapeutic implications of the hyperglutamatergic effects of NMDA antagonists. **Neuropsychopharmacol.** v.21, p.S143-S157, 1999.

LARUELLE, M. *et al.* Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 1, p. 56–72, 1 jul. 1999.

LEVKOVITZ, Y.; LEVI, U.; BRAWA, Y.; COHENB, H. Minocycline, a second-generation tetracycline, as a neuroprotective agent in an animal model of schizophrenia. **Brain Research.** v.1154, p.154–162, 2007.

LEVIN, R. *et al.* Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1748–1752, 15 ago. 2011.

LIEBERMAN, J.A. Atypical antipsychotic drugs as a first-line treatment of schizophrenia: a rationale and hypothesis. **The Journal of clinical psychiatry**, v 57 Suppl 11, p. 68-71, 1996.

LINDENMAYER, J *et al.*, A systematic review of psychostimulant treatment of negative symptoms of schizophrenia: Challenges and therapeutic opportunities. **Schizophrenia Research**, v 147, p. 241-252, 2013.

LIU H, YANG G, TANG Y, CAO D, QI T, QI Y, FAN G. Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of beta-caryophyllene/beta-cyclodextrin inclusion complex. **Int J Pharm** 2013; 450: 304-10.

LIU H, SONG Z, LIAO D, *et al.* Neuroprotective effects of transcaryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochem Res** 2015; 40: 118-23

LOURENS, A. C., REDDY, D., BASER, K. H., VILJOEN, A. M., VAN VUUREN, S. F. In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. **J. Ethnopharmacol.** (2004) 95: 253–258.

LUCCA LG, DE MATOS SP, BORILLE BT, *et al.* Determination of betacaryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 104: 144-8.

MACÊDO, D. S. *et al.* Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: a systematic review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 179–186, mar. 2012.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, 10:208, 2006.

MAHADIK SP, MUKHERJEE S, SCHEFFER R, CORRENTI E.E, MAHADIK J.S. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol Psychiatry* 43: 674-679, 1998.

MAIA DE OLIVEIRA JP *et al.* Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. **Rev Bras Psiquiatr** 34(SUPPL2): 149–155, 2012.

MANSBACH, R.S.; GEYER, M.A.; BRAFF, D.L. Dopaminergic stimulation disrupts sensorimotor gating in the rat. **Psychopharmacology**. v.94, p.507-514, 1988.

MARCO E.M, LAVIOLA G. The endocannabinoid system in the regulation of emotions throughout lifespan: a discussion on therapeutic perspectives. **J Psychopharmacol** 2012; 26: 150-63.

McCREADIE R.G, MACDONAL E, WILES D, CAMPBELL G, PATTERSON J.R. The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV. Plasma lipid peroxide and serum vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. **Br J Psychiatry** 167: 610-617, 1995.

MELO JÚNIOR, J.M.A.; Damasceno, M. D. B. M. V., Santos, S. A. A. R., Barbosa, T. M., Araújo, J. R. C., Vieira-Neto, A. E., Wong, D. V. T.; Campos, A. R. Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. **Inflammopharmacology**, v.2, n.25, p.247-254, 2017.

MELTZER, H. Y. *et al.*, Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Progress in neuro-psychopharmacology & Biological psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1159-72, out. 2003.

MEYER, U.; FELDON, J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. **Progress in Neurobiology**. v.90, p.285–326, 2010.

- MIYAMOTO et al., Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. **Molecular Psychiatry** v. 17, 1206 – 1227, 2012.
- MILLER B.J, et al. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. **Biol Psychiatry**. v.70 p.663-71, 2011
- MONTE, A. S et al., Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. **Journal of psychopharmacology**. V. 27, p. 1032– 1043, 2013.
- MORRIS, G. M. et al. **AutoDock Version 4.2: Updated for version 4.2.6 User Guide**, 2014.
- MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. In: KUKOL, A. (Ed.). **Molecular Modeling of Proteins**. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. p. 365–382.
- MOURI, A.; NODA, Y.; ENOMOTO, T.; NABESHIMA, T. Phencyclidine animal models of Schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. **Neurochemistry International** v.51, p.173–184, 2007.
- MUSTAFA, A . K.; GADALLA, M.M.; SNYDER, S.H. **Signaling by gasotransmitters**. **Science signaling**, v.40, n 6-8, p. re2, jan. 2009.
- NASRALLAH, H.A.; TANDON, R. Classic antipsychotic medications, In: Nemeroff, C., Schatzberg, A. (Eds.), **American Psychiatric Press Textbook of Psychopharmacology**, 4th edition. Washington D.C, **American Psychiatric Press**, p. 533–554, 2009.
- NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. **Schizophrenia**. Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia/index.shtml>>. Acesso em: 25 set. 2017.
- NEILL, J.C.; BARNES, S.; COOK, S.; GRAYSON, B.; IDRIS, NF.; MCLEAN, S.L.; SNIGDA, S.; RAJAGOPAL, L.; M.K. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: Focus on NMDA receptor antagonism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128 (3), p. 419-432, 2010.
- NG TY-T, RAINBOW PS, AMIARD-TRIQUET C, AMIARD J-C & WANG W-X (2008) Decoupling of cadmium biokinetics and metallothionein turnover in a marine polychaete after metal exposure. **Aquatic Toxicology** 89:47-54.
- NODA, Y.; YAMADA, K.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in the development of tolerance and sensitization to behavioural effects of phencyclidine in mice. **Br. J. Pharmacol.** v.117, p.1579–1585, 1996.
- OLIVEIRA et al., Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures . **Epilepsy & Behavior** v. 56, p. 26–31,, 2016.

ONAIVI ES, CARPIO O, ISHIGURO H, SCHANZ N, UHL GR, BENNO R. Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption. Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption. (2008).

ORTEGA-ALVARO A, ARACIL-FERNÁNDEZ A, GARCÍA-GUTIÉRREZ MS, NAVARRETE F, MANZANARES J. Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. **Neuropsychopharmacology**. 2011 Jun; 36(7):1489-504.

OSAWA, Y.; DAVILA, J.C. Phencyclidine, a psychotomimetic agent and drug of abuse, is a suicide inhibitor of brain nitric oxide synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.194, p.1435–1439, 1993.

PADURARIU, M.;CIOBICA, A.; DOBRIN, I.; STEFANESCU, C. Evaluation of antioxidante enzymes activities and lipid peroxidation in schizoprenic patiets treated with atipycal antipsychotics. **Neurosci. Let.**, v. 49, n.3, p 317-320, 2010.

Phytochemistry 1975; 14: 814-5.

PICHETTE, A., LAROUCHE, P.-L. LEBRUN, M., LEGAULT, J. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. **Phytother. Res.** 20: 371–373 (2006).

POLITEO O.; SKOCIBUSIC M.;MARAVIC A.; RUSCIC M.; Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of endemic Dalmatian black pine (*pinus nigra* ssp *dalmatica*). **Chemistry e biodiversity.** 8 (3): 540-7. PubMed PMID. 21404437, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016

RASMANN et al., Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect damaged maize roots. *Nature* volume 434, pages 732–737 (2005).

REDDY, R. D.; YAO, J. K. Free radical pathology in schizophrenia: A review. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 55, n. 1–2, p. 33–43, 1996.

REIS, G.C; ARRUDA, A.L.A. Fisiopatologia da esquizofrenia baseada nos aspectos moleculares da hipótese glutamatérgica. **Rev. Bras. Farm.** 92(3): 118-122, 2011

ROBLES M.; AREGULLIN M.; WEST J.; RODRIGUES E.; Recent Studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. **Planta Médica.** 61(3) : 199-203. PubMed PMDI, junho 2015.

RODRÍGUEZ-ARIAS M, NAVARRETE F, BLANCO-GANDIA MC, ARENAS MC, AGUILAR MA, BARTOLL-ANDRÉS A, VALVERDE O, MIÑARRO J, MANZANARES J. Role of CB2 receptors in social and aggressive behavior in male mice. **Psychopharmacology (Berl)**. 2015 Aug; 232(16):3019-31

ROTH, B. L.; ROGAN, S. C. Neuropharmacological Profiles of Antipsychotic Drugs. In: **Dopamine Handbook**. [s.l.] Oxford University Press, 2009. p. 520–539

SALUM, C. et al., Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. **Brain Res** v.1198, p.27–33, 2008.

SAGREDO, O. *et al.* Cannabinoids: novel medicines for the treatment of Huntington's disease. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 41-48, 2012.

SAHA S, CHANT D, MCGRATH J.A, Systematic Review of Mortality ins Schizophrenia: In the Differential Mortality Gap Worsening Over time?. **Arch Gen Psychiatric**; 64(10): 1123-1131, 2007.

SEEMAN, P.; KAPUR, S. Schizophrenia: More dopamine, more D2 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p.7673-7675, 2005.

SEILLIER A, ADVANI T, CASSANO T, HENSLER JG, GIUFFRIDA A .Inhibition of fatty-acid amide hydrolase and CB1 receptor antagonism differentially affect behavioural responses in normal and PCP-treated rats. **Int J Neuropsychopharmacol** 13(3):373–386, 2010.

SELVAM, K. et al. Cellulase enzyme: Homology modeling, binding site identification and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, v. 1150, n. Supplement C, p. 61–67, 2017.

STEFAN LEUCHT, MD; CHRISTOPH U.; CORRELL, MD; RENE, S; KAHN, MD. 2012. Research directions in schizophrenia treatment: mechanisms of action for next-generation agents. Faculty and Disclosures. **Medscap multispecialty**. CME 10/13/2012.

SHARMA et al., Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise, **Current Pharmaceutical Design**, 2016, 22, 1-28.

SHOEMAKER, J. L. *et al.* The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 1, p. 87-98, 2007.

SHUNGU, D.C. N-acetylcysteine for the treatment of glutathione deficiency and oxidative stress in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v.71, n.11, p.937-8, 2012.

SILVA, R.C.B. Esquizofrenia: uma revisão. **Psicologia USP**, v.17, n. 4, p. 263-285, 2006

SILVA, A. H. et al. Pharmacognostical Analysis and Protective Effect of Standardized Extract and Rizonic Acid from *Erythrina velutina* against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. **Pharmacognosy magazine**, v. 12, n. 48, p. 307–312, 2016.

SINGH et al., Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, 2019. 24, 1583;

SOUSA, F.; FERNANDES, P. A.; JOA, M. Protein-Ligand Docking: Current Status and Future. v. 26, n. March, 2006.

SULLIVAN E. M; O'DONNELL, P. Inhibitory interneurons oxidative stress, and schizophrenia,. **Shizophrenia bulletin**, v.38, n.3, p.373-6, maio 2012.

STAHL, SM.; **Psicofarmacologia Bases Neurocientíficas e aplicações práticas**. 4 ed. – Rio de Janeiro- 2014.

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

TALAROWSKA, M. et al. Malondialdehyde plasma concentration correlates with declarative and working memory in patients with recurrent depressive disorder. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 5, p. 5359-5366, 2012.

TAMBE, Y., TSUJIUCHI, H., HONDA, G., IKESHIRO, Y., TANAKA, S. (1996). Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, b-caryophyllene. **Planta Med**. 62: 469–470

TANDON, R. et al. Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. **Schizophrenia Research**, v. 150, n. 1, p. 3–10, out. 2013.

TANDON, R.; NASRALLAH, H.A.; KESHAVAN, M.S. Schizophrenia, “Just the Facts” 4. Clinical features and conceptualization. **Schizophr. Res.** v.110, p.1–23, 2009.

TANDON, R.; NASRALLAH, H.A.; KESHAVAN, M.S. Schizophrenia, “Just the Facts” 5. Treatment and prevention Past, present, and future. **Schizophrenia Research** v.122, p.1–23, 2010.

TCHEKALAROVA, J. et al. Pharmacological characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene on seizure models in mice. **European Journal of Epilepsy**, v. 57, p. 22-26, 2018.

THAKARE, V. N.; DHAKANE, V. D.; PATEL, B. M. Attenuation of acute restraint stress-induced depressive like behavior and hippocampal alterations with protocatechuic acid treatment in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 2, p. 401-413, 2017.

TREASADEN, I.H.; PURI, B.K. Cerebral spectroscopic and oxidative stress studies in patients with schizophrenia who have dangerously violently offended. **BMC Psychiatry**. v.17, p.8 Suppl 1:S7, 2008.

TSAI, et al., Change in Oxidative Stress Markers in Patients with Schizophrenia: The Effect off Antipsychotic Drugs. **Psychiatry Res** v.13, p. 0004-0009, 2013

VAN DEN BUUSE, M. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects. **Schizophrenia Bulletin**, v. 36, n. 2, p. 246–270, 2010.

VASCONCELOS, S.M.M.; ANDRADE, M.M.; SOARES, P.M.; CHAVES, B.G.; PATROCÍNIO, M.C.A.; SOUSA, F.C.F.; MACÊDO, D.S. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. **Rev. Psiq. Clín.** v.32 (1), p.10-16, 2005.

VASCONCELOS, G. S. Reversão de sintomas comportamentais tipo-esquizofrenia e alterações neuroquímicas induzidos por cetamina pela administração de ácido alfa-lipóico sozinho e combinado à clozapina em camundongos. 2015. 76 f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2015.

VASKINN, A.; ANTONSEN, BT.; FRETLAND, R.A.; DZIOBEK, I.; SUNDET, K. ; WILBERG, T. Theory of mind in women with borderline personality disorder or schizophrenia: differences in overall ability and error patterns. **Front pshycol.**, v.6 , p. 1-7, 2015

VIJAYALAXMI, A.; VASUDHA, B.; NAZIA, B.; KOWMUDI, V. et al. Anti-arthritic and anti inflammatory activity of beta caryophyllene against freund’s complete adjuvant induced arthritis in wistar rats. **Journal of Bone Reports & Recommendations**, v. 1, n. 29, 2015

VINHOLES J, RUDNITSKAYA A, GONCALVES P, MARTEL F, COIMBRA MA, ROCHA SM. Hepatoprotection of sesquiterpenoids: a quantitative structure-activity relationship (QSAR) approach. **Food Chem** 2014; 146: 78-84.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, jul. 2018.

WEST, A.R.; GALLOWAY, M.P.; GRACE, A.A. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. **Synapse**. v.44, p.227–45, 2002

WORLD HELATH ORGANIZATION. Statistics on Schizophrenia, 2018 .Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>. Acesso em 02 fev 2019

YAO, J. K.; LEONARD, S.; REDDY, R. D. Increased nitric oxide radicals in postmortem brain from patients with schizophrenia. **Schizophr Bull**, v. 30, n. 4, p. 923–934, 2004.

YANG, J.; NIE, Q. Engineering Escherichia coli to convert acetic acid to β-caryophyllene. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p.74, 2016.

ZHANG, M. et al. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. **Science China Life Sciences**, v. 53, n. 1, p. 112–124, 2010a.

ZHENG G. Q.; KENNEY P.M.; LAM L.K.; Sesquiterpenes from clove (Eugenia caryophyllata) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural products**. 55(7) : 999-1003. PUBMED PMDI.7617758.1992

APÊNDICE

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DO EFEITO PREVENTIVO E TERAPÊUTICO DO BETA-CARIOFILENO NO MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDA POR CETAMINA EM CAMUNDONGOS", protocolo nº100/2017, sob-responsabilidade do Prof. Dr. David de Lucena, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 21 de setembro de 2017.

Vigência do projeto	30/10/2017 a 28/06/2019
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico swiss
Nº de Animais	352
Peso/Idade	20 - 30g - 60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 22 de setembro de 2017.

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1666982