UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS ARARANGUÁ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE MEDICINA

Beatriz Carminati dos Santos

O efeito do Sistema Endocanabinoide na fadiga induzida pela Reserpina em um modelo animal da Doença de Parkinson

Araranguá
2026

Beatriz Carminati dos Santos

O efeito do Sistema Endocanabinoide na fadiga induzida pela Reserpina em um modelo animal da Doença de Parkinson

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Medicina do Campus Araranguá da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientador(a): Prof. Aderbal Silva Aguiar Jr, PhD

Araranguá

2026

Santos, Beatriz Carminati dos
O efeito do Sistema Endocanabinoide na fadiga induzida pela Reserpina em um modelo animal da Doença de Parkinson / Beatriz Carminati dos Santos ; orientador, Aderbal Silva Aguiar Júnior, 2026.
52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Araranguá, Graduação em Medicina, Araranguá, 2026.

Inclui referências.

1. Medicina. 2. Doença de Parkinson. 3. Fadiga. 4. Sistema Endocanabinoide. I. Aguiar Júnior, Aderbal Silva. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Medicina. III. Título.

Beatriz Carminati dos Santos

O efeito do Sistema Endocanabinoide na fadiga induzida pela reserpina em um modelo animal da Doença de Parkinson

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Medicina e aprovado em sua forma final pelo Curso de Medicina.

Araranguá, 16 de junho de 2026.

Banca examinadora

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Jr, PhD
Orientador

Profª. Dra. Roberta De Paula Martins De Melo
(UFSC)

Prof. Dr. Marcelo Gomes de Gomes
(UFSC)

Araranguá, 2026

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Júnior, pela oportunidade em ingressar no LABIOEX e incentivo em realizar este projeto. Obrigada por todo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À médica-veterinária Dra. Amanda, minha mais sincera gratidão por ter me guiado e ensinado com tamanha paciência e dedicação em cada etapa deste projeto.

Aos meus colegas de iniciação científica que se tornaram verdadeiros amigos, Laíze, Izabely, Ana Paula e Sávio. Agradeço também as doutorandas Tatyana, Izabel e Naiara, por me introduzirem ao universo da pesquisa experimental. Este trabalho não seria possível sem a participação de todos vocês!

À minha família, pelo apoio incondicional durante todo este período dedicado a graduação e a realização desse TCC. Amo vocês!

Ao meu namorado, Bruno, meu melhor amigo. Obrigada pela compreensão e incentivo em todos os momentos.

“A doença é muito antiga, e nada nela mudou. Somos nós que mudamos, à medida que aprendemos a reconhecer o que antes era imperceptível.”

Jean-Martin Charcot

RESUMO

Introdução: A Doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa progressiva que afeta a qualidade de vida devido a sintomas motores e não motores, como a fadiga, considerada um dos sintomas mais incapacitantes. A fadiga central, definida como uma redução da capacidade de sustentar o drive neural, é um dos principais contribuintes, mas seus mecanismos permanecem pouco esclarecidos. **Objetivo:** Este estudo buscou investigar o papel do Sistema Endocanabinoide na fadiga em um modelo experimental de Doença de Parkinson induzido por reserpina, avaliando os efeitos centrais dos antagonistas CB1R (AM251) e CB2R (AM630) sobre a força muscular e a catalepsia. **Métodos**: Foram utilizados 45 camundongos Swiss submetidos inicialmente à cirurgia para implantação de cânula intracerebroventricular (i.c.v.). Após o período de recuperação cirúrgica, os animais receberam reserpina na dose de 1 mg/kg, por via subcutânea, em duas aplicações realizadas 48 e 24 horas antes dos testes comportamentais. Posteriormente, foram administrados os antagonistas dos receptores canabinoides CB1R e CB2R (AM251 e AM630, respectivamente) pelas cânulas intracerebroventriculares implantadas. As doses utilizadas foram de 0,5 µg/µL para o AM251 e 0,1 µg/µL para o AM630, ambas por via i.c.v. A catalepsia induzida pela reserpina foi avaliada por meio do teste da barra, o desempenho neuromuscular foi analisado pelo teste de força de preensão e a atividade locomotora foi avaliada pelo teste de campo aberto. **Resultados e discussão:** O AM251, um antagonista do receptor CB1, aboliu a catalepsia e aumentou o tempo de preensão, indicando que a sinalização do CB1 restringe a persistência motora por meio da inibição pré-sináptica do drive excitatório. Em contraste, o AM630, um antagonista do receptor CB2, aumentou a força máxima de preensão sem afetar a persistência ou a inibição motora, sugerindo que a sinalização do CB2 modula a expressão de força, provavelmente por meio de efeitos indiretos sobre a excitabilidade neuronal. O declínio da força permaneceu inalterado, excluindo mecanismos de fadiga periférica. **Conclusão:** Esses achados demonstram que os receptores canabinoides regulam diferencialmente a fadiga central e a força, revelando uma dissociação entre persistência motora e desempenho máximo no parkinsonismo.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Sistema Endocanabinoide, Fadiga.

ABSTRACT

Introduction: Parkinson's Disease (PD) is a progressive neurodegenerative condition that affects quality of life due to motor and non-motor symptoms, such as fatigue, which is considered one of the most disabling symptoms. Central fatigue, defined as a reduction in the ability to sustain neural drive, is one of the main contributors, but its mechanisms remain poorly understood. **Objective**: To investigate the role of the Endocannabinoid System in fatigue in a reserpine-induced experimental model of Parkinson's Disease, evaluating the central effects of CB1R (AM251) and CB2R (AM630) antagonists on muscle strength and catalepsy. **Methods:** Forty-five Swiss mice were initially subjected to surgery for intracerebroventricular cannula implantation. After the surgical recovery period, the animals received reserpine at a dose of 1 mg/kg, subcutaneously, in two administrations performed 48 and 24 hours before the behavioral tests. Subsequently, cannabinoid receptor CB1R and CB2R antagonists (AM251 and AM630, respectively) were administered through the implanted intracerebroventricular cannulas. The doses used were 0.5 µg/µL for AM251 and 0.1 µg/µL for AM630, both administered intracerebroventricularly (i.c.v.). Reserpine-induced catalepsy was evaluated using the bar test, while neuromuscular performance was analyzed using the grip strength test. **Results and discussion**: AM251, a CB1 receptor antagonist, abolished catalepsy and increased grip time, indicating that CB1 signaling restricts motor persistence through presynaptic inhibition of excitatory drive. In contrast, AM630, a CB2 receptor antagonist, increased maximal grip strength without affecting persistence or motor inhibition, suggesting that CB2 signaling modulates force expression, probably through indirect effects on neuronal excitability. Force decline remained unchanged, excluding peripheral fatigue mechanisms. **Conclusion:** These findings demonstrate that cannabinoid receptors differentially regulate central fatigue and force, revealing a dissociation between motor persistence and maximal performance in parkinsonism.

Keywords: Parkinson's Disease, Endocannabinoid System, Fatigue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – CB1R na sinapse dopaminérgica da via nigroestriatal.....15

Figura 2 – Desenho experimental.....18

Figura 3 – Teste de força de preensão.....22

Figura 4 – Campo aberto.....23

Figura 5 – Confirmação do direcionamento ventricular correto.....24

Figura 6 – Resultados.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Intensidade cataléptica.....21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG – Araquidonoilglicerol

AEA – Anandamida

AUC – Área sob a curva

CBD – Canabinoides

CBR1 – Receptor canabinoide 1

CB2R – Receptor canabinoide 2

CBRs – Receptores canabinoides

DA – Dopamina

DP – Doença de Parkinson

eCBs – Endocanabinoides

GB – Gânglios da Base

LABIOEX – Laboratório de Biologia do Exercício Físico

SEC – Sistema Endocanabinoide

SN – Substância Negra

SNc – Substância Negra compacta

SNpc – Substância nigra pars compacta

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVOS 17
2.1. OBJETIVO GERAL 17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
3. METODOLOGIA 18
3.1. ANIMAIS 18
3.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E ANTAGONISMO DOS RECEPTORES CB1/CB2 19
3.3. PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA 20
3.4. TESTE DE FORÇA DE PREENSÃO 21
3.5. ATIVIDADE LOCOMOTORA - CAMPO ABERTO 22
3.6. ANÁLISE DE DADOS 23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
5. CONCLUSÃO 30
6. REFERÊNCIAS 31
7. ANEXO A – APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA 34
8. ANEXO B - NORMAS DA REVISTA ACS PHARMACOLOGY & TRANSLATIONAL SCIENCE 35
9. ANEXO C – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA ACS PHARMACOLOGY & TRANSLATIONAL SCIENCE 41

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa de caráter progressivo lento e multissistêmico que afeta as pessoas, principalmente nos últimos anos de vida, sendo o envelhecimento considerado seu principal fator de risco (Binda et al., 2023; Sveinbjornsdottir, 2016).

A DP foi descrita clinicamente pela primeira vez por James Parkinson (1817) como ‘paralisia agitante’, uma síndrome neurológica caracterizada por movimento trêmulo involuntário associado à diminuição da força muscular em partes do corpo que não estão em atividade, mesmo quando apoiadas; tendência à inclinação anterior do tronco; e progressão do passo de caminhada para um passo acelerado, semelhante à corrida. Posteriormente, Jean-Martin Charcot refinou os achados clínicos da enfermidade, contribuindo para a ampliação e disseminação internacional de sua descrição sob o nome de Doença de Parkinson (Goetz, 2011). Nos anos que se seguiram a esses estudos, provou-se que o comprometimento motor no parkinsonismo se estende além dos sintomas clássicos, como tremor e rigidez, para incluir fraqueza e fadiga que limitam de forma marcante a capacidade funcional (Klemann et al., 2018).

A DP se caracteriza patologicamente pelo acúmulo neurítico cerebral de α-sinucleína (α-syn) mal dobrada e agregada contendo inclusões intracitoplasmáticas conhecidas como corpúsculos de Lewy e neuritos (Braak et al., 2004). O acúmulo de corpos de Lewy em neurônios em processo de degeneração acarreta a perda, principalmente, de neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN) *pars compactar,* e, assim, a diminuição dos níveis de dopamina no corpo estriado (Binda et al., 2023; Klemann et al., 2018). A degeneração dos neurônios nigroestriatais dopaminérgicos com corpos de Lewy é descrita como o principal correlato neuropatológico do comprometimento motor na doença de Parkinson, mas também há danos semelhantes em seu citoesqueleto que podem ser causados pelas células nervosas glutamatérgicas, colinérgicas, GABAérgicas, triptaminérgicas, noradrenérgicas e adrenérgicas (Sveinbjornsdottir, 2016).

A fadiga central, definida como uma capacidade reduzida de gerar ou sustentar o impulso neural durante o esforço voluntário, é cada vez mais reconhecida como um importante contribuinte para a incapacidade e frequentemente está dissociada da falha muscular periférica (Davis; Bailey, 1997; Enoka; Duchateau,

2008). Esses déficits surgem de disfunção nos circuitos córtico–núcleos da base, onde a sinalização monoaminérgica alterada perturba o equilíbrio entre entradas excitatórias e inibitórias necessárias para a produção motora sustentada (DeLong, 1990; Chaudhuri; Behan, 2004). Apesar de sua relevância clínica, os mecanismos subjacentes à fadiga central no parkinsonismo permanecem pouco compreendidos.

Modelos experimentais baseados na depleção de monoaminas têm fornecido importantes insights sobre a neurobiologia da fadiga. Em particular, o parkinsonismo induzido por reserpina produz um fenótipo de fatigabilidade que não é explicado por comprometimentos periféricos ou metabólicos, sustentando uma origem central da limitação motora (Scheffer et al., 2021; Leão et al., 2015). Esse modelo tem sido fundamental para demonstrar que a fadiga emerge independentemente de alterações na nocicepção, na função cardiovascular ou na bioenergética muscular, reforçando o conceito de que mecanismos centrais governam o declínio no desempenho motor.

Nesse contexto, trabalhos anteriores demonstraram que a sinalização do receptor de adenosina A2A regula criticamente a resistência à fadiga por meio da interação com vias dopaminérgicas, particularmente envolvendo interações entre receptores A2A–D2 (Aguiar et al., 2020; de Bem Alves et al., 2024). Esses achados estabelecem a neuromodulação como um determinante-chave da persistência motora e do comportamento relacionado ao esforço, sugerindo que diferentes sistemas neuromoduladores podem controlar diferencialmente componentes da produção motora.

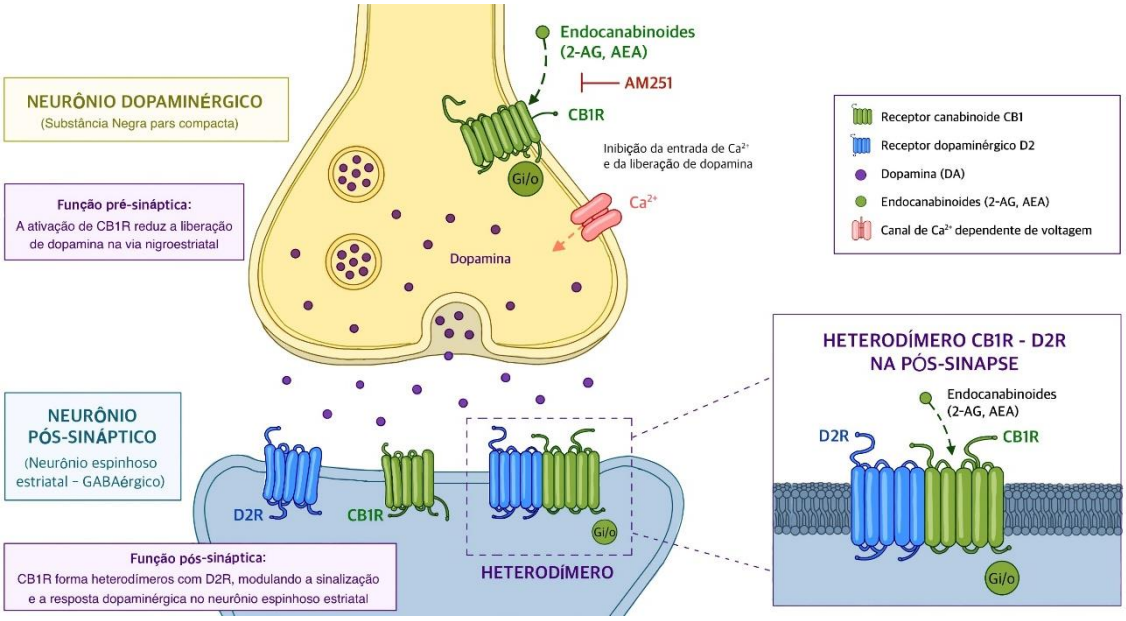
O Sistema Endocanabinoide (SEC) é uma rede composta por receptores canabinoides (CBRs), ligantes endógenos e enzimas responsáveis pela síntese e degradação de endocanabinoides (Baul; Manikandan; Sen, 2019; Patricio et al., 2020). A interação entre esses componentes regula diversas funções biológicas, destacando o papel do SEC na manutenção da homeostase (Baul; Manikandan; Sen, 2019). Os endocanabinoides (eCBs), moléculas lipídicas sintetizadas endogenamente, são produzidos sob demanda em resposta a um aumento nos níveis intracelulares de cálcio ([Ca2+]i), desempenhando um papel essencial na sinalização celular (Mechoulam; Parker, 2013).

Os receptores canabinoides são classificados em dois principais subtipos: receptor canabinoide tipo 1 (CB1R) e receptor canabinoide tipo 2 (CB2R) (Patricio et al., 2020). Receptores CB1 são altamente expressos em redes corticais e dos

núcleos da base e atuam como inibidores pré-sinápticos da liberação de neurotransmissores, restringindo assim o impulso excitatório e a excitabilidade dos circuitos (Lovinger, 2010; Busquets-Garcia; Bains; Marsicano, 2018). Em contraste, receptores CB2 são menos abundantes nos neurônios e estão principalmente associados à sinalização glial e neuroimune, sugerindo uma influência mais indireta na função neuronal (Cabral et al., 2008; Stella, 2004).

Além disso, o CB1R é considerado o principal receptor envolvido no controle da atividade sináptica dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, embora esses neurônios não expressem CB1 tão bem quanto outras subpopulações de neurônios dopaminérgicos, como a via mesoestriatal e o sistema córtico-límbico (García et al., 2016). Esta evidência corrobora com o entendimento que ambos os sistemas, endocanabinoide e dopaminérgico, interajam diretamente na pós-sinapse, por meio da capacidade neuromoduladora dos receptores CB1 de formar heterodímeros com os receptores D2 em neurônios de projeção estriatal (Patricio et al., 2020).

Figura 1 – CB1R na sinapse dopaminérgica da via nigroestriatal



Na via nigroestriatal, os receptores CB1 (CB1R) estão localizados principalmente em terminais pré-sinápticos dopaminérgicos, onde a ativação por endocanabinoides reduz a liberação de dopamina. Além disso, na pós-sinapse, os CB1R formam heterodímeros com os receptores dopaminérgicos D2 em neurônios de projeção estriatal, modulando a sinalização dopaminérgica.
Fonte: Elaborado pela autora

Diante do exposto, levantamos a hipótese de que a sinalização dos receptores canabinoides regula diferencialmente componentes distintos do

desempenho motor no parkinsonismo, dissociando a inibição motora, a geração de força e a capacidade de sustentar o impulso neural. Para testar isso, utilizamos um modelo induzido por reserpina de depleção de monoaminas e avaliamos a inibição motora (catalepsia) juntamente com o desempenho neuromuscular por meio de uma tarefa de força de preensão, que permite a avaliação da força máxima.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do Sistema Endocanabinoide em um modelo experimental da Doença de Parkinson induzida farmacologicamente pela reserpina, associada à fadiga em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar o modelo animal da doença de Parkinson, induzido pela reserpina, pelo teste de catalepsia.

2.2.2. Avaliar, a nível central (estereotaxia, ventrículo), o efeito do sistema endocanabioide na fadiga do antagonista de receptor canabinoide 1 (CB1R), o fármaco AM251, por meio do desempenho anaeróbico (força muscular), e da atividade locomotora, através do campo aberto;

2.2.3. Avaliar, a nível central (estereotaxia, ventrículo), o efeito do sistema endocanabioide na fadiga do antagonista de receptor canabinoide 2 (CB2R), com o fármaco AM630, por meio do desempenho anaeróbico (força muscular), e da atividade locomotora, através do campo aberto;

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

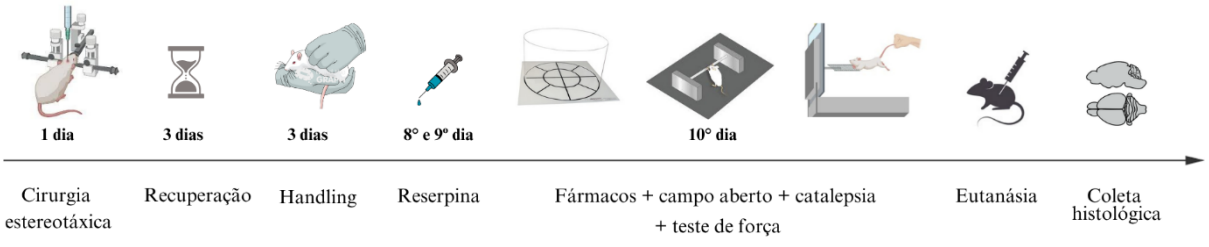
Foram utilizados 45 camundongos Swiss adultos fêmeas (8-10 semanas de idade, peso 25-45g ± 2) do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em grupos (até oito animais por gaiola) sob condições controladas (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acesas às 07:00 horas; temperatura ambiente de 21 ± 1 °C) com acesso livre à água potável, fresca e limpa, ração comercial para roedores e maravalhas fornecidas pelo Biotério Central da UFSC. As gaiolas foram enriquecidas ambientalmente com material para nidificação e abrigos de polipropileno. Os abrigos foram temporariamente removidos após a cirurgia estereotáxica para evitar interferência no posicionamento da cânula. Os animais foram monitorados regularmente para garantir o bem-estar ao longo de todo o período experimental.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes brasileiras para experimentação animal (Lei 11.794/2008 e regulamentações do CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC; número de protocolo 1069240325) (ANEXO A).

3.1.1. Desenho experimental

O delineamento está ilustrado na figura 2. Os camundongos foram aleatoriamente alocados em grupos Antagonista CB1 (AM251), Antagonista CB2 (AM630) e grupo controle (DMSO).

Figura 2 – Desenho experimental



No primeiro dia, os animais realizaram a cirurgia estereotáxica com a implantação da cânula intracerebroventricular. Após 3 dias de recuperação, os animais realizaram o handling e adaptação aos testes durante 3 dias. No 8° dia e 9º dia, foram administradas a doses de Reserpina, seguidas por 24h de descanso. No 10° dia, foi administrado o fármaco e, então, os animais realizaram o campo aberto, catalepsia e o teste de força. Logo em seguida, finalizou com a eutanásia e coleta do cérebro para análise do correto posicionamento da cânula.

Fonte: Elaborado pela autora

3.1.2. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram definidos previamente como posicionamento incorreto da cânula ou problemas técnicos durante os procedimentos experimentais (por exemplo, instabilidade do sistema de registro ou desvios do protocolo). Assim, 17 dos 45 animais inicialmente alocados foram excluídos, resultando em uma amostra final de 28 animais (Veículo: n = 10; AM251: n = 9; AM630: n = 9).

3.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E ANTAGONISMO DOS RECEPTORES CB1/CB2

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) associada à xilazina (7,5 mg/kg), ambas por via intraperitoneal, seguida de botão anestésico com lidocaína a 0,2% (até 0,1 mL, sem vasoconstritor). O bregma foi utilizado como ponto zero para o ajuste das coordenadas estereotáxicas, que foram definidas para os ventrículos (AP -0,5 mm; ML ±1 mm; DV -2,3 mm) (Paxinos; Franklin, 2012). Em seguida, realizou-se a perfuração do crânio no ponto determinado com broca odontológica, além de duas perfurações adicionais para fixação de parafusos de sustentação em arranjo triangular; posteriormente, a cânula foi posicionada e fixada com acrílico, formando um “capacete” sobre a área. Por fim, o animal foi retirado do aparelho e mantido em recuperação em caixa aquecida até completa recuperação anestésica.

Ambos os grupos de animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, com implantação de uma cânula nos ventrículos nas seguintes coordenadas: AP -0,5 mm, ML ±1 mm, DV -2,3 mm. O procedimento cirúrgico foi previamente padronizado em nosso laboratório, sendo realizado sob condições ambientais semelhantes e pelo mesmo operador.

Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos experimentais por randomização simples para receber veículo (0,5% DMSO em solução salina a 0,9%), o antagonista do receptor CB1 AM251 (Cayman Chemical; CAS 183232-66-8) ou o antagonista do receptor CB2 AM630 (Cayman Chemical; CAS 164178-33-0). AM251 (0,5 µg/µL, i.c.v.) e AM630 (0,1 µg/µL, i.c.v.) foram dissolvidos em DMSO e diluídos em NaCl estéril a 0,9% (solução salina) para obter uma concentração final de DMSO de 0,5%. O grupo veículo recebeu a mesma solução sem compostos ativos.

As infusões intracerebroventriculares foram realizadas, com uma seringa Hamilton acoplada, a uma taxa de 1 µL/min, com um volume total de 2 µL por animal. Após a infusão, a agulha foi mantida no local por 3 minutos para permitir a difusão e minimizar o refluxo.

O correto direcionamento ventricular e a administração do fármaco foram confirmados em todos os animais por meio da infusão intracerebroventricular de corante Azul Brilhante realizada após a eutanásia. Os cérebros foram então cuidadosamente dissecados, e a distribuição do corante no sistema ventricular foi verificada visualmente com o uso de um estereomicroscópio (Firstlab, FL21-BA, objetiva × 40).

3.3. PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA

Todos os animais foram tratados com reserpina (Millipore, Sigma-Aldrich Brasil; CAS 50-55-5), um agente depletor de monoaminas. A reserpina foi inicialmente dissolvida em 50 µL de ácido acético glacial e posteriormente diluída em NaCl estéril a 0,9% (solução salina) até a concentração final, resultando em um volume de injeção de 1 mL/kg de peso corporal, conforme descrito previamente (Aguiar et al., 2009). A reserpina foi administrada na dose de 1 mg/kg (subcutânea), em duas aplicações realizadas 48 horas e 24 horas antes dos testes comportamentais (Fernandes et al., 2012; de Bem Alves; Aguiar, 2024).

Para confirmar a eficácia do modelo farmacológico, a catalepsia foi avaliada 24 horas após a segunda e última injeção de reserpina utilizando um teste de barra (3 mm de diâmetro, 4,5 cm de altura). A imobilidade foi pontuada de 0 a 5 de acordo com a gravidade (Shiozaki et al., 1999). Os animais foram avaliados em três

tentativas para determinar tanto a gravidade quanto a incidência do comportamento cataléptico. O tempo limite foi estabelecido em 3 minutos.

Tabela 1 – Intensidade cataléptica

Pontuação	Comportamento cataléptico
0	Postura cataléptica < 5 s em ambas as patas dianteiras e traseiras;
1	Postura cataléptica das patas dianteiras 5-10 s, e das patas traseiras < 5 s, ou vice-versa;
2	Postura cataléptica das patas dianteiras > 10 s, e das patas traseiras < 5 s
3	Postura cataléptica das patas dianteiras e traseiras 5-10 s, ou postura das patas dianteiras < 5 s e das patas traseiras > 10 s;
4	Postura cataléptica das patas dianteiras > 10 s, e traseiras 5-10 s, ou postura cataléptica de patas dianteiras 5-10 s, e traseiras > 10 s;
5	Postura cataléptica de patas dianteiras e traseiras > 10 s.

Fonte: Elaborado pela autora

Essa abordagem experimental baseia-se em estudos anteriores que demonstraram que a depleção monoaminérgica induzida por reserpina produz alterações motoras e cognitivas, bem como fenótipos relacionados à fadiga relevantes para a doença de Parkinson (Fernandes et al., 2012; de Bem Alves; Aguiar, 2024).

3.4. TESTE DE FORÇA DE PREENSÃO

O desempenho neuromuscular foi avaliado 24 horas após a segunda e última injeção de reserpina utilizando um medidor de força de preensão (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brasil; capacidade de 5 kgf; REF: CHHQBQ0215). Os animais foram posicionados em uma grade horizontal e autorizados a segurar o aparelho com os quatro membros para garantir engajamento estável sob comprometimento motor parkinsoniano (Scheffer et al., 2021; Fernandes et al., 2012; de Bem Alves; Aguiar, 2024).

Os animais foram gentilmente puxados pela cauda na direção oposta à grade até soltarem. Quatro tentativas de 10 segundos foram realizadas com intervalos de 1 minuto entre elas, e as três melhores tentativas foram consideradas para análise, seguindo procedimentos previamente estabelecidos (de Bem Alves et al., 2023; de Bem Alves; Aguiar, 2024). Curvas de força-tempo foram registradas continuamente, permitindo a extração da força máxima, do tempo de preensão e dos parâmetros de decaimento da força, possibilitando a caracterização tanto do desempenho máximo quanto da performance motora sustentada (de Bem Alves et al., 2023; de Bem Alves; Aguiar, 2024). O decaimento da força foi calculado como a redução percentual da força ao longo do tempo em relação à força máxima.

Figura 3 – Teste de força de preensão



Fonte: Autora

3.5. ATIVIDADE LOCOMOTORA - CAMPO ABERTO

A atividade locomotora dos animais foi avaliada por meio do teste de campo aberto após 24 horas da última aplicação de reserpina. Os animais foram posicionados durante um período de 5 min em uma arena circular com livre exploração, com diâmetro de 60 cm e altura de 50 cm, de material acrílico transparente, sob uma plataforma de 70 x 70 cm (FABRO, 2025). Uma câmera posicionada acima do aparato foi utilizada para registrar o movimento do animal dentro e ao redor das áreas centrais e periféricas. A distância total percorrida foi avaliada através da plataforma ANY-maze™ (Stoelting Co ®Wood Dale, IL, EUA)

Figura 4 – Campo aberto



Fonte: Autora

3.6. ANÁLISE DE DADOS

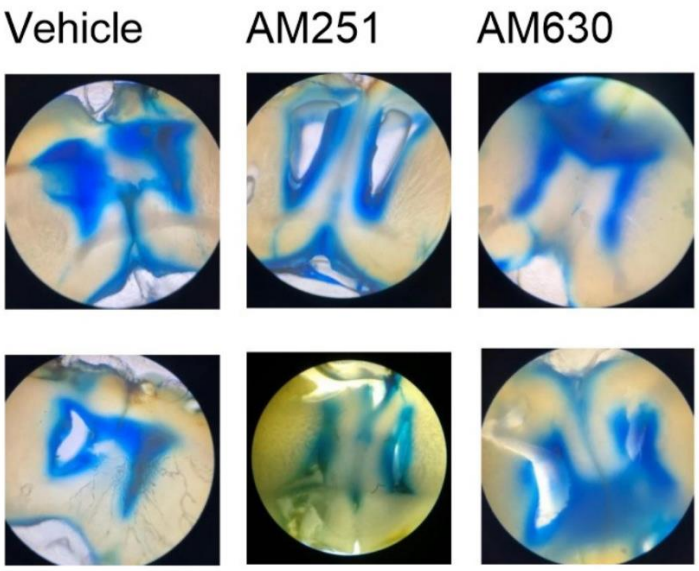
Os dados foram obtidos a partir de 4–5 experimentos independentes, n = 10 (Veículo), n = 9 (AM251) e n = 9 (AM630). A gravidade da catalepsia foi analisada utilizando o teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn; a incidência da catalepsia com o teste exato de Fisher. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk. Devido à natureza não normal e ordinal dos escores de catalepsia, foram utilizadas análises não paramétricas. Para os desfechos da tarefa de força de preensão com uma única medida, os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA one-way), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett em relação ao grupo veículo. Os dados de força de preensão obtidos em medidas repetidas foram analisados por um modelo de efeitos mistos (REML), considerando o tratamento como fator entre os sujeitos e o tempo como medida repetida, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Sidak, quando apropriado. Os tamanhos de efeito foram estimados utilizando o g de Hedges e interpretados como pequenos (g ≈ 0,2), moderados (g ≈

0,5), grandes (g ≈ 0,8) e muito grandes (g ≥ 1,2). O poder estatístico (1−β) foi calculado para os efeitos principais e para as comparações pareadas. Os gráficos foram construídos no software GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, EUA). Os dados são apresentados como mediana ± intervalo interquartil para a catalepsia e média ± EPM (erro padrão da média) para os desfechos de força de preensão, com os pontos de dados individuais exibidos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O direcionamento intracerebroventricular correto foi confirmado em todos os animais incluídos por meio da visualização da distribuição do corante Azul Brilhante no sistema ventricular (Figura 5). A depleção de monoaminas induzida por reserpina produziu de forma consistente um fenótipo motor semelhante ao parkinsoniano, conforme evidenciado pelo comportamento cataléptico nos animais tratados com veículo. Esse modelo permite a investigação de mecanismos neuromodulatórios nos circuitos córtico–núcleos da base e tem sido amplamente utilizado para estudar disfunção motora e fenótipos relacionados à fadiga (Davis; Bailey, 1997; Enoka; Duchateau, 2008; DeLong, 1990; Chaudhuri; Behan, 2004). Dentro desse contexto, o antagonismo dos receptores canabinoides revelou uma clara dissociação funcional entre domínios motores, afetando de forma diferencial a inibição motora, a geração de força e a produção motora sustentada.

Figura 5 – Confirmação do direcionamento ventricular correto



Imagens representativas mostrando a distribuição intracerebroventricular do corante Azul Brilhante, confirmando o direcionamento ventricular correto.

Fonte: Elaborado pelos autores

Não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto, incluindo a distância total percorrida ($P > 0,05$; Figura 6A). As doses utilizadas foram baixas, correspondendo às concentrações iniciais previamente

descritas na literatura, o que pode ter contribuído para a ausência de significância estatística. Dessa forma, não foram observadas alterações no comportamento locomotor dos grupos tratados com AM251 e AM630 em comparação ao grupo veículo durante o teste de campo aberto.

A gravidade da catalepsia diferiu entre os grupos (Kruskal–Wallis: $H = 7{,}568$, $P < 0{,}05$; Figura 6B). O grupo AM251 apresentou supressão completa da inibição motora, enquanto o AM630 aumentou significativamente a gravidade da catalepsia em comparação ao veículo (mediana: 5,0 vs 1,0; $\Delta = 4$; Hodges–Lehmann = 2; $r \approx 0{,}62$; $1-\beta \approx 0{,}80–0{,}85$). Do ponto de vista mecanístico, a catalepsia reflete prejuízo na iniciação do movimento e excesso de tônus inibitório nos circuitos dos núcleos da base, particularmente envolvendo vias corticostriatais e estriatopalidais (Scheffer et al., 2021; Aguiar et al., 2020). Nesse contexto, a sinalização do receptor CB1 desempenha um papel central na restrição da produção motora por meio da inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores (de Bem Alves et al., 2023; de Bem Alves et al., 2024). A supressão completa da catalepsia após o bloqueio dos receptores CB1 indica que a atividade de CB1 contribui para a inibição motora central, enquanto o aumento da gravidade após o antagonismo de CB2 sugere um papel modulador da sinalização CB2 na manutenção da estabilidade dos circuitos motores.

A incidência de catalepsia reforçou essa dissociação (teste exato de Fisher, $P < 0{,}05$; Figura 6C). A proporção de respostas positivas ao longo das tentativas foi reduzida no grupo AM251, mas permaneceu inalterada no AM630, indicando que a sinalização CB1 regula consistentemente tanto a probabilidade quanto a intensidade da inibição motora. Em contraste, o antagonismo do receptor CB2 aumentou a gravidade da catalepsia sem afetar sua incidência, indicando um papel modulador distinto na dinâmica dos circuitos motores. Considerando a associação dos receptores CB2 com a sinalização glial e neuroimune, esse efeito provavelmente é mediado indiretamente por meio da modulação da excitabilidade da rede, em vez de controle sináptico direto (Lovinger, 2010; Busquets-Garcia; Bains; Marsicano, 2018; Cabral et al., 2008).

Em conjunto, esses achados demonstram uma dissociação funcional no sistema endocanabinoide, na qual os receptores CB1 regulam principalmente a inibição motora central e processos relacionados à fadiga, enquanto os receptores

CB2 contribuem para a modulação e estabilização da função dos circuitos motores sob depleção monoaminérgica.

O desempenho neuromuscular foi avaliado utilizando a tarefa de força de preensão, que permite a avaliação simultânea da força máxima e de parâmetros relacionados à fadiga e tem sido utilizada para caracterizar a disfunção motora sob condições depleção dopaminérgica (Scheffer et al., 2021; de Bem Alves et al., 2023). Nesse contexto, a força máxima reflete o recrutamento rápido de unidades motoras, enquanto o tempo de preensão e o decaimento da força capturam a produção motora sustentada, permitindo a dissociação entre componentes de fadiga central e periférica.

A força máxima diferiu entre os grupos ($F(2,25) = 6,441$, $P < 0,05$; $\eta^2 = 0,340$; Figura 6D), com o AM630 aumentando seletivamente a força máxima. Como a força máxima depende principalmente do recrutamento, e não permite sustentação do impulso neural, esse achado indica que a sinalização do receptor CB2 modula a expressão de força. Consistente com essa interpretação, os receptores CB2 estão predominantemente associados a elementos gliais e neuroimunes e são regulados positivamente em condições patológicas (Busquets-Garcia; Bains; Marsicano, 2018; Cabral et al., 2008; Stella, 2004); sustentando uma modulação indireta da excitabilidade neuronal. Em contraste, o decaimento da força não foi afetado ($F(2,25) = 0,5882$, $P > 0,05$; Figura 6E), indicando função contrátil periférica preservada. Isso está de acordo com o modelo de reserpina, que induz depleção de monoaminas sem comprometimento muscular primário (Enoka; Duchateau, 2008), reforçando uma origem central para os efeitos observados.

O tempo de preensão diferiu entre os grupos ($F(2,25) = 7,221$, $P < 0,05$; $\eta^2 = 0,36$; $1-\beta \approx 0,90$; Figura 6F), com o AM251 aumentando seletivamente o desempenho sustentado. Como medida da capacidade de manter a produção motora, o tempo de preensão fornece uma leitura funcional da fadiga central. Receptores CB1 são altamente expressos em terminais pré-sinápticos, onde inibem a liberação de neurotransmissores por meio da sinalização Gi/o (Lovinger, 2010; Busquets-Garcia; Bains; Marsicano, 2018), restringindo assim o impulso neural efetivo nos circuitos córtico–gânglios da base (Lovinger, 2010). Seu bloqueio provavelmente aumenta a produção motora sustentada ao desinibir a transmissão excitatória. Essa interpretação é ainda apoiada pelo papel da sinalização endocanabinoide na plasticidade sináptica estriatal, particularmente na depressão de

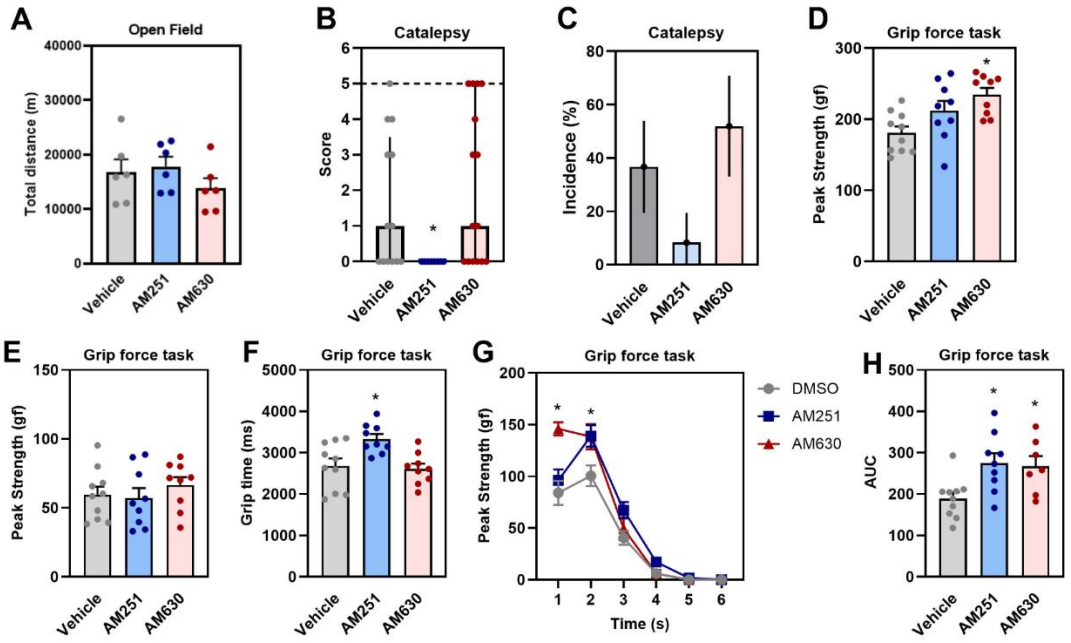
longa duração em neurônios da via indireta (Kreitzer; Malenka, 2007), um mecanismo criticamente envolvido no controle motor.

A análise temporal revelou um efeito robusto das medidas repetidas (tempo), refletindo o declínio progressivo da força ao longo das tentativas (fadiga) ($F(5,115) = 186,09$, $P < 0,05$; $\eta^2 \approx 0,89$; $1-\beta > 0,99$; Figura 6G). Importante, foi observada uma interação significativa tempo × tratamento ($F(10,115) = 4,72$, $P < 0,05$; $\eta^2 \approx 0,29$; $1-\beta \approx 0,90–0,95$; Figura 6G), indicando que os tratamentos modularam diferencialmente a dinâmica temporal do decaimento da força. O AM630 apresentou valores de força mais altos em momentos iniciais, enquanto o AM251 preservou melhor a força nas fases posteriores, sustentando uma dissociação funcional na qual mecanismos relacionados ao CB2 influenciam preferencialmente o recrutamento motor inicial, enquanto a sinalização CB1 regula a persistência motora.

De forma consistente, ambos os tratamentos aumentaram a força de preensão ($F(2,23) = 5,496$, $P < 0,05$; $\eta^2 = 0,32$; $1-\beta \approx 0,75–0,80$; Figura 6H), com grandes tamanhos de efeito para AM251 e AM630, indicando aumento da produção motora global por meio de mecanismos distintos.

Em conjunto, esses achados sustentam um modelo no qual o sistema endocanabinoide dissocia a persistência motora da geração de força por meio de mecanismos neuromodulatórios distintos. A sinalização do receptor CB1 restringe o impulso neural sustentado por meio da inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores nos circuitos córtico–gânglios da base (Lovinger, 2010; Busquets-Garcia; Bains; Marsicano, 2018), enquanto a sinalização do receptor CB2 modula a expressão de força por meio da regulação indireta da excitabilidade neuronal, provavelmente envolvendo vias gliais e neuroimunes (Cabral et al., 2008; Stella, 2004). Essa especialização funcional é consistente com a distribuição e as propriedades de sinalização distintas dos receptores canabinoides no sistema nervoso central (Lovinger, 2010; Busquets-Garcia; Bains) e estabelece o sistema endocanabinoide como um importante regulador neuromodulatório da produção motora sob depleção monoaminérgica.

Figura 6 – Resultados



Resultados: (A) Imagens representativas mostrando a distribuição intracerebroventricular do corante Azul de Brilhante, confirmando o correto direcionamento ao ventrículo cerebral. (B) Escores de gravidade da catalepsia, demonstrando supressão completa da inibição motora no grupo AM251 e aumento da gravidade no grupo AM630 em comparação ao grupo veículo. (C) Incidência de catalepsia ao longo de três tentativas, reduzida no grupo AM251, mas inalterada no grupo AM630. (D) Pico de força, aumentado pelo AM630, sem efeito do AM251. (E) Tempo de preensão, aumentado pelo AM251, mas não afetado pelo AM630. (F) Decaimento da força, sem alterações entre os grupos. (G) Área sob a curva (AUC) da força de preensão, aumentada tanto pelo AM251 quanto pelo AM630.

Fonte: Elaborado pelos autores

5. CONCLUSÃO

A sinalização dos receptores canabinoides exerce efeitos distintos e dissociáveis sobre o desempenho motor. A sinalização do receptor CB1 restringe o impulso neural sustentado e a persistência motora, enquanto a sinalização do receptor CB2 modula a produção máxima de força. Esses achados identificam o sistema endocanabinoide como um importante regulador neuromodulatório do controle motor e revelam especialização funcional entre subtipos de receptores canabinoides nos circuitos córtico–gânglios da base.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, Aderbal Silva Jr et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain research bulletin**, v. 79, p. 452–457, 2009.

AGUIAR, Aderbal Silva Jr. et al. Neuronal adenosine A2A receptors signal ergogenic effects of caffeine. **Scientific reports**, v. 10, p. 13414, 2020.

BAUL, Himadri Shekhaar; MANIKANDAN, Ceera; SEN, Dwaipayan. Cannabinoid receptor as a potential therapeutic target for Parkinson's Disease. **Brain research bulletin**, v. 146, p. 244–252, mar. 2019.

BINDA, Karina Henrique et al. Treadmill exercise modulates nigral and hippocampal cannabinoid receptor type 1 in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Brain research**, v. 1814, p. 148436, 1 set. 2023.

BRAAK, Heiko et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and tissue research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, out. 2004.

BUSQUETS-GARCIA, Andoni; BAINS, J. S.; MARSICANO, Giovanni. CB1 receptor signaling in the brain: extracting specificity from ubiquity. **Neuropsychopharmacology,** v. 43, p. 4–20, 2018.

CABRAL, Guy A et al. Francesca. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. **British journal of pharmacology**, v. 153, p. 240–251, 2008.

CHAUDHURI, Abhijit; BEHAN, Peter O. Fatigue in neurological disorders. **Lancet**, v. 363, p. 978–988, 2004.

DAVIS, J. M.; BAILEY, S. P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 29, p. 45–57, 1997.

DE BEM ALVES, Ana Cristina; AGUIAR, Aderbal Silva, Jr. Caffeine plus haloperidol reduces fatigue in an experimental model of Parkinson's disease: a prospective to A2AR–D2R heterodimer antagonism. **Purinergic signalling**, v. 20, p. 29–34, 2024.

DE BEM ALVES, Ana Cristina et al. Adenosine A2A and dopamine D2 receptor interaction controls fatigue resistance. **Frontiers in pharmacology**, v. 15, p. 1390187, 2024.

DE BEM ALVES, Ana Cristina. et al. The striatum drives the ergogenic effects of caffeine. **Purinergic signalling**, v. 19, p. 673–683, 2023.

DELONG, Mahlon R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. **Trends in neurosciences**, v. 13, p. 281–285, 1990.

ENOKA, Roger M.; DUCHATEAU, Jacques. Muscle fatigue: what, why and how it influences muscle function. **Journal of physiology**, v. 586, p. 11–23, 2008.

FERNANDES, Valéria S. et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behavioural brain research**, v. 231, n. 1, p. 154–163, maio 2012.

GARCÍA, Concepción et al. Cannabinoid-dopamine interactions in the physiology and physiopathology of the basal ganglia. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 13, p. 2069–2079, jul. 2016.

GOETZ, Christopher G. The history of Parkinson’s disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a008862, set. 2011.

FABRO, Izabel Feltrin. **Os efeitos ergogênicos do canabigerol em um modelo de sarcopenia induzido pela administração de dexametasona em camundongos**. 2025. Dissertação – Universidade Federal de Santa Catarina, 2025.

KLEMANN, Cornelius J. H. M. et al. Physical Exercise Modulates L-DOPA-Regulated Molecular Pathways in the MPTP Mouse Model of Parkinson’s Disease. **Molecular neurobiology**, v. 55, n. 7, p. 5639–5657, jul. 2018.

KREITZER, Anatol C.; MALENKA, Robert C. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. **Nature**, v. 445, p. 643–647, 2007.

LEÃO, Anderson H. F. F. et al. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson’s Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain pathology**, v. 25, n. 4, p. 377–390, jul. 2015.

LOVINGER, David M. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 951–961, 2010.

MECHOULAM, Raphael; PARKER, Linda A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual review of psychology,** v. 64, p. 21–47, 2013.

PATRICIO, Felipe et al. Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson’s Disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 595635, 2020.

PAXINOS, George; FRANKLIN, Keith B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 2012.

SCHEFFER, Débora. D. L et al, A. Impaired dopamine metabolism is linked to fatigability in mice and fatigue in Parkinson's disease patients. **Brain communications,** v. 3, p. fcab116, 2021.

SHIOZAKI, Shizuo. et al. Actions of adenosine A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. **Psychopharmacology,** v. 147, p. 90–95, 1999.

STELLA, Nephi. Cannabinoid signaling in glial cells. **Glia**, v. 48, p. 267–277, 2004.

SVEINBJORNSDOTTIR, Sigurlaug. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 139, n. S1, p. 318–324, 1 out. 2016.

7. ANEXO A – APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CEUA

Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no Uso de Animais

Florianópolis, 24 de março de 2025
CEUA N 1069240325

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF:	952.396.009-10		
Título da proposta:	O efeito do Sistema Endocanabinóide na fadiga induzida pela reserpina em um modelo animal da doença de Parkinson		
Responsável:	Aderbal Silva Aguiar Junior		
Equipe:	Amanda Leite Bastos Pereira, Ana Paula Pinto de Araújo , Beatriz Carminati dos Santos, Naiara de Souza Santos		
Telefone:	99868070	e-mail:	aderbal.aguiar@ufsc.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema ("https://ceua.sites.ufsc.br") por meio da sua senha de acesso.

Juliano Ferreira

Juliano Ferreira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

VF

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

8. ANEXO B - NORMAS DA REVISTA ACS PHARMACOLOGY & TRANSLATIONAL SCIENCE

Template for Submission of Manuscripts to American Chemical Society Journals

Word 2010, single-column, double-spaced (2013)

This template is a guide to be used to prepare manuscripts for submission. Please consult the Instructions to Authors or a recent issue of the journal for detailed guidelines and procedures for submission. This template is intended to benefit to the author in that the entire manuscript (text, tables, and graphics) may be submitted in one file. Inserting graphics and tables close to the point at which they are discussed in the text of the manuscript can also be a benefit for the reviewer.

When you submit a manuscript using this template, you will not actually see the page formatting that appears in the printed journal. This will occur as part of the editorial production process. Abbreviated instructions for using the template follow. Consult the documentation for your specific application and version for more information. Additional instructions can be found in the readme file at the web page where you downloaded this template.

Using the template

In ACS publications there are many different components of a manuscript (i.e., title, abstract, main text, figure captions, etc.) that are represented in the template. See the Guide, Notes, Notice, or Instructions for Authors on the journal's homepage to determine which parts should be included for the manuscript that you are preparing

1. If typing your manuscript directly into the template, select (highlight) the text of the template that you want to replace and begin typing your manuscript (i.e., select the Title section for typing in your title).
2. If you have already prepared your document in a Word file, you will need to attach the template to your working document in order to apply the Word Style tags. Further instructions can be found in the readme file at the web page where you downloaded this template.
    a. Go to the Add-Ins tab and you will see all the Word Styles from the template that has now been imported into the current document. A Styles toolbar has been generated that will display the different Styles for you to choose from. If this is not present, type in the following command (Alt+Ctrl+Shift+S) and it

should appear. You can close this at any time and then reopen it when needed.

b. Click in the sentence or paragraph and then go to the Add-Ins tab and select the relevant Word Style. This will apply the Word Style to the entire text (sentence or paragraph). Do this for all sections of the manuscript.

3. To insert graphics within the text or as a figure, chart, scheme, or table, create a new line and insert the graphic where desired. If your graphic is not visible, ensure that the Word Style is “Normal” with an automatic height adjustment. If the size of the artwork needs to be adjusted, re-size the artwork in your graphics program and re-paste the artwork into the template (maximum width for single-column artwork, 3.3 in. (8.5 cm); maximum width for double-column artwork, 7 in. (17.8 cm)). **NOTE**: If you are submitting a Table of Contents graphic, please insert the graphic at the end of the file.
4. Ensure that page numbers are present on all pages before submitting your manuscript.
5. Delete these instructions and any sections that are not needed.
6. Save the file with the graphics in place: select **Save As** (**File** menu) and save it as a document file (not a .dot template file).
7. Proof the manuscript to ensure that all parts of the manuscript are present and clearly legible.

TITLE (Word Style “BA_Title”). The title should accurately, clearly, and concisely reflect the emphasis and content of the paper. The title must be brief and grammatically correct

AUTHOR NAMES (Word Style “BB_Author_Name”). Include in the byline all those who have made substantial contributions to the work, even if the paper was actually written by only one person. Use first names, initials, and surnames (e.g., John R. Smith) or first initials, second names, and surnames (e.g., J. Robert Smith). Do not use only initials with surnames (e.g., J. R. Smith) because this causes indexing and retrieval difficulties and interferes with unique identification of an author. Do not include professional or official titles or academic degrees. At least one author must be designated with an asterisk as the author to whom correspondence should be addressed.

AUTHOR ADDRESS (Word Style “BC_Author_Address”). The affiliation should be the institution where the work was conducted. If the present address of an author differs from that at which the work was done, indicate with a symbol and give the Present Address under Author Information. If more than one address, use symbols to match author names to address(es).

KEYWORDS (Word Style “BG_Keywords”). If you are submitting your paper to a journal that requires keywords, provide significant keywords to aid the reader in literature retrieval.

ABSTRACT (Word Style “BD_Abstract”). All manuscripts must be accompanied by an abstract. The abstract should briefly state the problem or purpose of the research, indicate the theoretical or experimental plan used, summarize the principal findings, and point out major conclusions. Abstract length is one paragraph.

a)

TEXT (Word Style “TA_Main_Text”). For full instructions, please see the journal’s Instructions for Authors. Depending on the journal, the manuscript may include sections such as an introduction, experimental details (sections titled Experimental Methods, Experimental Section, or Materials and Methods), theoretical basis (sections titled Theoretical Basis or Theoretical Calculations), results, discussion, and conclusions.

FIGURES (Word Style “VA_Figure_Caption”). Each figure must have a caption that includes the figure number and a brief description, preferably one or two sentences.

The caption should immediately follow the figure with the format “**Figure 1.** Figure caption.” All figures must be mentioned in the text consecutively and numbered with Arabic numerals. The caption should be understandable without reference to the text. It is preferable to place the keys to symbols used in the figure in the caption, not in the artwork. Ensure that the symbols and abbreviations in the caption agree with those in the figure itself and in the text and that the figure is already sized appropriately.

SCHEMES (Word Style “VC_Scheme_Title”). Chemical reactions and flow diagrams may be called schemes. Schemes may have brief titles describing their contents. The artwork for each scheme should immediately follow the scheme title. The title should follow the format “**Scheme 1.** Scheme Title”. All schemes must be mentioned in the text consecutively and numbered with Arabic numerals. Schemes may also have footnotes (use Word Style “FD_Scheme_Footnote”), inserted after the artwork.

CHARTS (Word Style “VB_Chart_Title”). Lists of structures may be called charts. Charts may have brief titles describing their contents. The title should follow the format “**Chart 1.** Chart Title”. Charts may also have footnotes (use Word Style “FC_Chart_Footnote”). To insert the chart into the template, be sure it is already sized appropriately and paste it immediately after the chart title.

TABLES. Each table must have a brief (one phrase or sentence) title that describes its contents. The title should follow the format “**Table 1.** Table Title” (Word Style “VD_Table_Title”). The title should be understandable without reference to the text. Put details in footnotes, not in the title (use Word Style “FE_Table_Footnote”). Define nonstandard abbreviations in footnotes.

Use tables (Word Style “TC_Table_Body”) when the data cannot be presented clearly as narrative, when many precise numbers must be presented, or when more meaningful interrelationships can be conveyed by the tabular format. Do not use Word Style “TC_Table_Body” for tables containing artwork. Tables should supplement, not duplicate, text and figures. Tables should be simple and concise. It is preferable to use the Table Tool in your word-processing package, placing one entry per cell, to generate tables.

Displayed equations can be inserted where desired making sure they are assigned Word Style "Normal". Displayed equations can only be one column wide. If the artwork needs to be two columns wide, it must be relabeled as a figure, chart, or scheme and mentioned as such in the text.

ASSOCIATED CONTENT

(Word Style “TE_Supporting_Information”). **Supporting Information**. A listing of the contents of each file supplied as Supporting Information should be included. For instructions on what should be included in the Supporting Information as well as how to prepare this material for publications, refer to the journal’s Instructions for Authors.

The following files are available free of charge.

brief description (file type, i.e., PDF)

brief description (file type, i.e., PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(Word Style “FA_Corresponding_Author_Footnote”). * (Word Style “FA_Corresponding_Author_Footnote”). Give contact information for the author(s) to whom correspondence should be addressed.

Present Addresses

1 †If an author’s address is different than the one given in the affiliation line, this information may be included here.

Author Contributions

2 The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡These authors contributed equally. (match statement to author names with a symbol)

Funding Sources

3 Any funds used to support the research of the manuscript should be placed here (per journal style).

Notes

4 Any additional relevant notes should be placed here.

ACKNOWLEDGMENT

(Word Style “TD_Acknowledgments”). Generally the last paragraph of the paper is the place to acknowledge people, organizations, and financing (you may state grant numbers and sponsors here). Follow the journal’s guidelines on what to include in the Acknowledgments section.

ABBREVIATIONS

CCR2, CC chemokine receptor 2; CCL2, CC chemokine ligand 2; CCR5, CC chemokine receptor 5; TLC, thin layer chromatography.

REFERENCES

(Word Style “TF_References_Section”). References are placed at the end of the manuscript. Authors are responsible for the accuracy and completeness of all references. Examples of the recommended format for the various reference types can be found at http://pubs.acs.org/page/4authors/index.html. Detailed information on reference style can be found in *The ACS Style Guide,* available from Oxford Press.

BRIEFS (Word Style “BH_Briefs”). If you are submitting your paper to a journal that requires a brief, provide a one-sentence synopsis for inclusion in the Table of Contents.

SYNOPSIS (Word Style “SN_Synopsis_TOC”). If you are submitting your paper to a journal that requires a synopsis, see the journal’s Instructions for Authors for details.

9. ANEXO C – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA ACS PHARMACOLOGY & TRANSLATIONAL SCIENCE

Cannabinoid receptor antagonism dissociates central fatigue and force in reserpine-induced parkinsonism

Beatriz Carminati dos Santos[1], Izabely Guedes da Rosa[1], Laíze de Freitas Mazzardo[1], Naiara de Souza Santos[1], Izabel Feltrin Fabro[1], Tatyana Nery[1], Amanda Leite Bastos Pereira[1], Aderbal S Aguiar Jr[1,2*]

1. Biology of Exercise Lab (Labioex), Department of Physical Therapy, UFSC-Federal University of Santa Catarina, Araranguá, SC, Brazil
2. Institute for Education and Research (IEP) Remederi, São Paulo, SP, Brazil

* Correspondence: Aderbal S. Aguiar Jr., Laboratory of Exercise Biology (LABIOEX), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Araranguá, SC, 88905-120, Brazil. Phone: 55-48-3721-6956. Email: aderbal.aguiar@ufsc.br

ABSTRACT

Motor impairment in parkinsonism extends beyond classical symptoms to include deficits in motor inhibition, force generation, and the ability to sustain neural drive. The mechanisms underlying this dissociation remain poorly understood. Here, we investigated whether cannabinoid receptor signaling differentially regulates these components using a reserpine-induced model of monoamine depletion. Catalepsy and neuromuscular performance were assessed using a grip force task. CB1 receptor antagonism abolished catalepsy and increased grip time, indicating reduced motor inhibition and enhanced motor persistence. In contrast, CB2 receptor antagonism increased peak force without affecting grip time, indicating selective modulation of force expression. Force decay was unchanged, excluding peripheral fatigue mechanisms and supporting a central origin of the observed effects. Time-resolved analysis further revealed that CB2-related effects predominated during early phases of motor output, whereas CB1-related effects emerged during sustained performance. These findings demonstrate a functional dissociation within the endocannabinoid system, in which CB1 receptor signaling constrains sustained neural drive, whereas CB2 receptor signaling modulates force expression through distinct neuromodulatory mechanisms. This work identifies the endocannabinoid system as a key regulator of central motor control in parkinsonism.

Key words

endocannabinoid system; basal ganglia; monoamine depletion; neuromodulation; motor performance; reserpine model

INTRODUCTION

Motor impairment in parkinsonism extends beyond classical symptoms such as tremor and rigidity to include weakness and fatigue that markedly limit functional capacity. Central fatigue, defined as a reduced ability to generate or sustain neural drive during voluntary effort, is increasingly recognized as a major contributor to disability and is often dissociated from peripheral muscle failure (1,2). These deficits arise from dysfunction within cortico–basal ganglia circuits, where altered monoaminergic signaling disrupts the balance between excitatory and inhibitory inputs required for sustained motor output (3,4). Despite its clinical relevance, the mechanisms underlying central fatigue in parkinsonism remain poorly understood.

Experimental models based on monoamine depletion have provided critical insight into the neurobiology of fatigue. In particular, reserpine-induced parkinsonism produces a robust fatigability phenotype that is not explained by peripheral or metabolic impairments, supporting a central origin of motor limitation (5). This model has been instrumental in demonstrating that fatigue emerges independently of changes in nociception, cardiovascular function, or muscle bioenergetics, reinforcing the concept that central mechanisms govern the decline in motor performance.

Recent evidence supports a neuromodulatory framework in which central fatigue emerges from the interaction between neurotransmitter systems within basal ganglia circuits. In this context, our previous work demonstrated that adenosine A2A receptor signaling critically regulates fatigue resistance through interaction with dopaminergic pathways, particularly involving A2A–D2 receptor interactions (6–8). These findings establish neuromodulation as a key determinant of motor persistence and effort-related behavior, suggesting that distinct neuromodulatory systems may differentially control components of motor output.

The endocannabinoid system is a major regulator of synaptic transmission in motor circuits and represents a strong candidate for such modulation. CB1 receptors are highly expressed in cortical and basal ganglia networks and act as presynaptic inhibitors of neurotransmitter release, thereby constraining excitatory drive and circuit excitability (9,10). In contrast, CB2 receptors are less abundant in neurons and are primarily associated with glial and neuroimmune signaling, suggesting a more indirect influence on neuronal function (11,12).

Based on this framework, we hypothesized that cannabinoid receptor signaling differentially regulates distinct components of motor performance in parkinsonism, dissociating motor inhibition, force generation, and the ability to sustain neural drive. To test this, we used a reserpine-induced model of monoamine depletion and assessed motor inhibition (catalepsy) together with neuromuscular performance using a grip force task, which allows simultaneous evaluation of maximal force and motor persistence.

METHODS

Animals

Adult female Swiss mice (outbred; 8–10 weeks old, weighing 25–45 g) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Santa Catarina (UFSC, Brazil). Animals were housed in groups (up to eight animals per cage) under controlled conditions (12 h light/dark cycle, lights on at 07:00 h; ambient temperature of 21 ± 1 °C) with *ad libitum* access to food and water. Cages were enriched with nesting material and polypropylene shelters. Shelters were temporarily removed after stereotaxic surgery to prevent interference with cannula positioning. Animals were regularly monitored to ensure welfare throughout the experimental period.

All experimental procedures were conducted in accordance with Brazilian guidelines for animal experimentation (Law 11.794/2008 and CONCEA regulations) and were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC; protocol number 1069240325).

Reserpine-induced parkinsonism

All animals received reserpine (Millipore, Sigma-Aldrich Brasil; CAS 50-55-5), a monoamine-depleting agent. Reserpine was initially dissolved in 50 µL of glacial acetic acid and subsequently diluted in sterile 0.9% NaCl (saline) to the final concentration, yielding an injection volume of 1 mL/kg of body weight, as previously described (13). Reserpine was administered at 1 mg/kg (subcutaneous), in two doses given 48 h and 24 h prior to behavioral testing (15,16).

To confirm the effectiveness of the pharmacological model, catalepsy was assessed 24 h after the second and final reserpine injection using a bar test (3 mm diameter, 4.5 cm height). Immobility was scored from 0 to 5 according to severity (14). Animals were evaluated across three trials to determine both severity and

incidence of cataleptic behavior. The cut-off time was set at 3 min. Catalepsy scoring followed predefined criteria and was applied consistently across all experimental groups.

This experimental approach is based on our previous studies demonstrating that reserpine-induced monoaminergic depletion produces motor and cognitive alterations, as well as fatigue-related phenotypes relevant to Parkinson's disease (15,16).

Stereotaxic surgery and CB1/CB2 receptor antagonism

Mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, intraperitoneal) and xylazine (7.5 mg/kg, intraperitoneal), followed by local lidocaine (0.2%, up to 0.1 mL). A guide cannula was stereotaxically implanted into the lateral ventricle using the following coordinates relative to bregma: AP −0.5 mm, ML ±1.0 mm, DV −2.3 mm (17).

Mice were randomly assigned to experimental groups using simple randomization to receive vehicle (0.5% DMSO in 0.9% saline), the CB1 receptor antagonist AM251 (Cayman Chemical; CAS 183232-66-8), or the CB2 receptor antagonist AM630 (Cayman Chemical; CAS 164178-33-0). AM251 (0.5 µg/µL, i.c.v.) and AM630 (0.1 µg/µL, i.c.v.) were dissolved in DMSO and diluted in sterile 0.9% NaCl (saline) to yield a final DMSO concentration of 0.5%. The vehicle group received the same solution without active compounds. Intracerebroventricular infusions were performed at a rate of 1 µL/min, with a total volume of 2 µL per animal. After infusion, the injection needle was left in place for 3 min to allow diffusion and minimize reflux.

Correct ventricular targeting and drug delivery were confirmed in all animals by intracerebroventricular infusion of Brilliant Blue dye under the same experimental conditions, followed by brain dissection and visual verification of dye distribution within the ventricular system using a stereomicroscope (Firstlab, FL21-BA, objective ×40).

Exclusion criteria were defined a priori as incorrect cannula placement or technical issues during experimental procedures (e.g., instability of the recording setup or protocol deviations). Accordingly, 16 of the 45 animals initially allocated were excluded, resulting in a final sample of 27 animals (Vehicle: n = 10; AM251: n = 9; AM630: n = 9).

Grip force task

Neuromuscular performance was assessed 24 h after the second and final reserpine injection using a grip strength meter (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brazil; 5 kgf capacity; REF: CHHQBQ0215). Animals were positioned on a horizontal grid and allowed to grasp the apparatus with all four limbs to ensure stable engagement under parkinsonian motor impairment (5,15,16).

Animals were gently pulled by the tail in the opposite direction of the grid until release. Four trials of 10 s were performed with 1 min intervals between trials, and the three best trials were considered for analysis, following procedures previously established by our group (7,16). Force–time curves were continuously recorded, allowing extraction of peak force, grip time, and force decay parameters, enabling the characterization of both maximal output and sustained motor performance (7,16).

The area under the curve (AUC) was calculated as the integral of force over time, providing an estimate of impulse and overall neuromuscular performance, a metric previously validated as a sensitive readout of fatigue-related decline in motor performance (7,16).

Statistical analysis

The experimental unit was a single animal. Given the automated nature of grip force measurements and the use of outbred animals, outcome assessment was not subject to observer-dependent bias. Data analysis was performed without prior knowledge of group-specific hypotheses.

Data are presented as median ± interquartile range for catalepsy and mean ± SEM for grip force outcomes, with individual data points shown.

Normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. Due to the non-normal and ordinal nature of catalepsy scores, nonparametric analyses were applied. Catalepsy severity was compared using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparisons test versus the vehicle group. In cases of zero variance, statistical comparison was not performed.

Catalepsy incidence was analyzed as the proportion of positive responses across repeated trials and compared among groups using Fisher’s exact test.

For grip force task outcomes with a single measurement, data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons test versus the

vehicle group. Repeated-measures grip force data were analyzed using a mixed-effects model (REML), with treatment as a between-subject factor and time as a repeated measure, followed by Sidak's multiple comparisons test when appropriate.

Effect sizes were estimated using Hedges' g and interpreted as small ($g \approx 0.2$), moderate ($g \approx 0.5$), large ($g \approx 0.8$), and very large ($g \geq 1.2$). Statistical power ($1-\beta$) was calculated for main effects and pairwise comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Analyses were performed using GraphPad Prism for Windows, version 11.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Data Availability

All data supporting this study are available at the Open Science Framework (OSF): 10.17605/OSF.IO/QYGCS. The dataset is provided in tidy format under a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license, enabling full reproducibility.

RESULTS AND DISCUSSION

Correct intracerebroventricular targeting was confirmed in all included animals by visualization of Brilliant Blue dye distribution within the ventricular system (Figure 1A). Reserpine-induced monoamine depletion reliably produced a parkinsonian-like motor phenotype, as evidenced by cataleptic behavior in vehicle-treated animals. This model enables the investigation of neuromodulatory mechanisms within cortico–basal ganglia circuits and has been extensively used to study motor dysfunction and fatigue-related phenotypes (1–4). Within this framework, cannabinoid receptor antagonism revealed a clear functional dissociation across motor domains, differentially affecting motor inhibition, force generation, and sustained motor output.

Catalepsy severity differed among groups (Kruskal–Wallis: $H = 7.568$, $P < 0.05$; Figure 1B). The AM251 group showed complete suppression of motor inhibition, whereas AM630 significantly increased catalepsy severity compared to vehicle (median: 5.0 vs 1.0; $\Delta = 4$; Hodges–Lehmann = 2; $r \approx 0.62$; $1-\beta \approx 0.80–0.85$). From a mechanistic perspective, catalepsy reflects impaired motor initiation and excessive inhibitory tone within basal ganglia circuits, particularly involving corticostriatal and striatopallidal pathways (5,6). Within this framework, CB1 receptor

signaling plays a central role in constraining motor output through presynaptic inhibition of neurotransmitter release (7,8). The complete suppression of catalepsy following CB1 receptor blockade indicates that CB1 activity contributes to central motor inhibition, whereas the increase in severity following CB2 receptor antagonism suggests a modulatory role of CB2 signaling in maintaining motor circuit stability.

Catalepsy incidence further supported this dissociation (Fisher's exact test, $P < 0.05$; Figure 1C). The proportion of positive responses across trials was reduced in the AM251 group but unchanged in AM630, indicating that CB1 signaling consistently regulates both the probability and intensity of motor inhibition. In contrast, CB2 receptor antagonism increased catalepsy severity without affecting incidence, indicating a distinct modulatory role in motor circuit dynamics. Given the association of CB2 receptors with glial and neuroimmune signaling, this effect is likely mediated indirectly through modulation of network excitability rather than direct synaptic control (9–11).

Together, these findings demonstrate a functional dissociation within the endocannabinoid system, in which CB1 receptors primarily regulate central motor inhibition and fatigue-related processes, whereas CB2 receptors contribute to the modulation and stabilization of motor circuit function under monoaminergic depletion.

Neuromuscular performance was assessed using the grip force task, which enables simultaneous evaluation of maximal force and fatigue-related parameters and has been used to characterize motor dysfunction under dopaminergic depletion (5,7). In this framework, peak force reflects rapid motor unit recruitment, whereas grip time and force decay capture sustained motor output, allowing dissociation between central and peripheral fatigue components.

Peak force differed among groups ($F(2,25) = 6.441$, $P < 0.05$; $\eta^2 = 0.340$), with AM630 selectively increasing maximal force. Because peak force depends primarily on recruitment rather than sustained neural drive, this finding indicates that CB2 receptor signaling modulates force expression. Consistent with this interpretation, CB2 receptors are predominantly associated with glial and neuroimmune elements and are upregulated under pathological conditions (10–12), supporting an indirect modulation of neuronal excitability. In contrast, force decay was unaffected ($F(2,25) = 0.5882$, $P > 0.05$), indicating preserved peripheral contractile function. This aligns with the reserpine model, which induces monoamine

depletion without primary muscle impairment (2), reinforcing a central origin for the observed effects.

Grip time differed among groups ($F(2,25) = 7.221$, $P < 0.05$), with AM251 selectively increasing sustained performance. As a measure of the capacity to maintain motor output, grip time provides a functional readout of central fatigue. CB1 receptors are highly expressed in presynaptic terminals, where they inhibit neurotransmitter release via Gi/o signaling (9,10), thereby constraining effective neural drive within cortico–basal ganglia circuits (9). Their blockade likely enhances sustained motor output by disinhibiting excitatory transmission. This interpretation is further supported by the role of endocannabinoid signaling in striatal synaptic plasticity, particularly long-term depression in indirect pathway neurons (18), a mechanism critically involved in motor control.

Temporal analysis reinforces this dissociation, with AM630 effects predominating at early phases and AM251 effects emerging during sustained output, indicating that CB2-related mechanisms influence initial motor recruitment, whereas CB1 signaling regulates motor persistence. Consistently, both treatments increased grip force AUC ($F(2,23) = 5.496$, $P < 0.05$), indicating enhanced overall motor output through distinct mechanisms.

Taken together, these findings support a model in which the endocannabinoid system dissociates motor persistence from force generation through distinct neuromodulatory mechanisms. CB1 receptor signaling constrains sustained neural drive through presynaptic inhibition of neurotransmitter release within cortico–basal ganglia circuits (9,10), whereas CB2 receptor signaling modulates force expression through indirect regulation of neuronal excitability, likely involving glial and neuroimmune pathways (11,12). This functional specialization is consistent with the differential distribution and signaling properties of cannabinoid receptors in the central nervous system (9) and highlights the endocannabinoid system as a key regulator of central motor control under monoaminergic depletion.

CONCLUSION

Cannabinoid receptor signaling exerts distinct and dissociable effects on motor performance. CB1 receptor signaling constrains sustained neural drive and motor persistence, whereas CB2 receptor signaling modulates maximal force output.

These findings identify the endocannabinoid system as a key neuromodulatory regulator of central motor control and reveal functional specialization between cannabinoid receptor subtypes within motor circuits.

Author Contributions

B.C.S. performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. I.G.R., L.F.M., N.S.S., I.F.G., and T.N. contributed to the experimental procedures. A.L.B.P. also contributed to animal handling and ethical procedures. A.S.A.J. conceived and supervised the study and revised the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest

A.S.A.J. is a partner in Remederi Cannabis Medicinal. The other authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

The authors thank the Federal University of Santa Catarina (UFSC) for institutional support and the Central Animal Facility of UFSC for technical assistance. This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) under the PROEX program. B.C.S. was supported by a scientific initiation scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, PIBIC). I.G.R., T.N., and N.S.S. were supported by doctoral scholarships from Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC). A.S.A.J. was supported by a Research Productivity Fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant No. 304343/2023-4).

REFERENCES

1. Davis, J. M.; Bailey, S. P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1997, *29*, 45–57. DOI: 10.1097/00005768-199701000-00008.

2. Enoka, R. M.; Duchateau, J. Muscle fatigue: what, why and how it influences muscle function. *J. Physiol.* 2008, *586*, 11–23. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.139477.

3. DeLong, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 1990, 13, 281–285. DOI: 10.1016/0166-2236(90)90110-v.

4. Chaudhuri, A.; Behan, P. O. Fatigue in neurological disorders. *Lancet* 2004, 363, 978–988. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15794-2.

5. Scheffer, D. D. L.; Freitas, F. C.; Aguiar, A. S., Jr.; Ward, C.; Guglielmo, L. G. A.; Prediger, R. D.; Cronin, S. J. F.; Walz, R.; Andrews, N. A.; Latini, A. Impaired dopamine metabolism is linked to fatigability in mice and fatigue in Parkinson's disease patients. Brain Commun. 2021, 3, fcab116. DOI: 10.1093/braincomms/fcab116.

6. Aguiar, A. S., Jr.; Speck, A. E.; Canas, P. M.; Cunha, R. A. Neuronal adenosine A2A receptors signal ergogenic effects of caffeine. Sci. Rep. 2020, 10, 13414. DOI: 10.1038/s41598-020-69660-1.

7. de Bem Alves, A. C.; Speck, A. E.; Farias, H. R.; Martins, L. M.; dos Santos, N. S.; Pannata, G.; Tavares, A. P.; de Oliveira, J.; Tomé, Â. R.; Cunha, R. A.; Aguiar, A. S., Jr. The striatum drives the ergogenic effects of caffeine. *Purinergic Signal.* 2023, 19, 673–683. DOI: 10.1007/s11302-023-09922-5.

8. de Bem Alves, A. C.; Santos, N. S.; Santos, A. P. T.; Panatta, G.; Speck, A. E.; Cunha, R. A.; Aguiar, A. S., Jr. Adenosine A2A and dopamine D2 receptor interaction controls fatigue resistance. *Front. Pharmacol.* 2024, 15, 1390187. DOI: 10.3389/fphar.2024.1390187.

9. Lovinger, D. M. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 2010, 58, 951–961. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.01.008.

10. Busquets-Garcia, A.; Bains, J.; Marsicano, G. CB1 receptor signaling in the brain: extracting specificity from ubiquity. *Neuropsychopharmacology* 2018, 43, 4–20. DOI: 10.1038/npp.2017.206.

11. Cabral, G. A.; Raborn, E. S.; Griffin, L.; Dennis, J.; Marciano-Cabral, F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br. J. Pharmacol.* 2008, 153, 240–251. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707584.

12. Stella, N. Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 2004, 48, 267–277. DOI: 10.1002/glia.20084.

13. Aguiar, A. S., Jr.; Araújo, A. L.; da Cunha, T. R.; Speck, A. E.; Ignácio, Z. M.; de Mello, N.; Prediger, R. D. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. Brain Res. Bull. 2009, 79, 452–457. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.05.005.

14. Shiozaki, S.; Ichikawa, S.; Nakamura, J.; Kitamura, S.; Yamada, K.; Kuwana, Y. Actions of adenosine A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. *Psychopharmacology (Berl.)* 1999, 147, 90–95. DOI: 10.1007/s002130051146.

15. Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, Medeiros AM, Melo TG, Izídio GS, Cabral A, Ribeiro RA, Abílio VC, Ribeiro AM, Silva RH. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. Behav Brain Res. 2012 May 16;231(1):154-63. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.008. Epub 2012 Mar 16. PMID: 22446059.

16. de Bem Alves, A. C.; Aguiar, A. S., Jr. Caffeine plus haloperidol reduces fatigue in an experimental model of Parkinson’s disease: a prospective to A2AR–D2R heterodimer antagonism. *Purinergic Signal.* 2024, 20, 29–34. DOI: 10.1007/s11302-023-09933-2.

17. Paxinos, G.; Franklin, K. B. J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2012.

18. Kreitzer, A. C.; Malenka, R. C. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 2007, 445, 643–647. DOI: 10.1038/nature05506.