

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE SOBRE OS EFEITOS
COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES
INDUZIDOS PELA COCAÍNA**

PEDRO HENRIQUE GOBIRA NUNES

BELO HORIZONTE – 2016

PEDRO HENRIQUE GOBIRA NUNES

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE SOBRE OS EFEITOS
COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES
INDUZIDOS PELA COCAÍNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

BELO HORIZONTE – 2016

**"ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE SOBRE OS
EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES INDUZIDOS
PELA COCAÍNA"**

PEDRO HENRIQUE GOBIRA NUNES

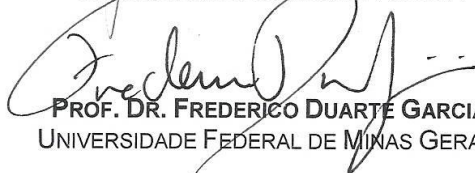
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 19 de abril de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



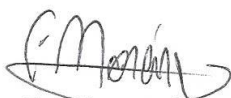
PROFA. DR.ª. CLEÓPATRA DA SILVA PLANETA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



PROF. DR. FREDERICO DUARTE GARCIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. RODRIGO CUNHA ALVIM DE MENEZES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO



PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 19 de abril de 2016



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 256 DE PEDRO HENRIQUE GOBIRA NUNES

Às 08:30 horas do dia 19 do mês de abril de 2016, na Sala Prof. Nello de Moura Rangel (K3 - 163), realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Pedro Henrique Gobira Nunes**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Fabrício de Araujo Moreira**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. André Ricardo Massensini**, Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Drª. Cleópatra da Silva Planeta**, Universidade Estadual Paulista, **Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia**, Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes**, Universidade Federal de Ouro Preto, e **Prof. Dr. Fabrício de Araujo Moreira**, Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE SOBRE OS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES INDUZIDOS PELA COCAÍNA". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar *aprovada* a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 19 de abril de 2016.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Cleópatra da Silva Planeta
Fabrício de Araujo Moreira
André Ricardo Massensini
Fred. Duarte Garcia
Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá certificado de conclusão do doutorado.

Dedicatória:

*Para Nívia Neyde,
meu grande exemplo de
dedicação, força e sabedoria .*

Agradecimentos:

A Deus, por seu amor e misericórdia incomparáveis.

Ao Professor Dr. Fabrício Moreira, pela orientação, incentivo, respeito e amizade.

A Professora Dra. Daniele Aguiar, pelo exemplo de liderança.

A banca examinadora, pela disponibilidade e empenho na leitura deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, por compartilharem comigo as alegrias e angústias do mundo acadêmico.

Aos amigos e colaboradores: Carol Issy, Bright Okine, Edleusa, Flávia, Vivian e Júlia, por abraçarem este trabalho, e aos professores: Elaine Del Bel (Faculdade de Odontologia–USP/Ribeirão Preto), Fabíola Ribeiro (Departamento de Bioquímica I.C.B./UFMG) e David Finn (National University of Ireland-Galway) por propiciarem a realização de parte destes experimentos.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento de Farmacologia-ICB/UFMG

Ao meu pai pela renúncia amorosa.

Aos meus irmãos pela amizade, carinho e incentivo.

Aos meus sobrinhos por me ensinarem o que é o amor sem limites

A Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO.....	15
OBJETIVOS.....	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS.....	44
DISCUSSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática da sinapse canabinoide

Figura 2: Bloqueio dos receptores CB₁, induzido pelo rimonabanto, atenua a hiperlocomoção promovida pela cocaína

Figura 3: Ativação de receptores CB₂, induzida pelo JWH-133, atenua a hiperlocomoção promovida pela cocaína

Figura 4: Bloqueio dos receptores CB₂, induzido pelo AM630, reverte o efeito do rimonabanto sobre a modulação da hiperlocomoção promovida pela cocaína

Figuras 5 e 6: Bloqueio dos receptores CB₂, induzido pelo AM630, reverte o efeito do rimonabanto sobre a modulação do aumento da expressão de c-Fos promovido pela cocaína na porção core do NAcc

Figuras 7 e 8: Bloqueio dos receptores CB₂, induzido pelo AM630, reverte o efeito do rimonabanto sobre a modulação do aumento da expressão de c-Fos promovido pela cocaína na porção shell do NAcc

Figura 9: Bloqueio dos receptores CB₂, induzido pelo AM630, reverte o efeito do rimonabanto sobre o aumento da fosforilação da proteína ERK promovido pela cocaína no estriado

Figura 10: Bloqueio dos receptores CB₁ e CB₂, induzido respectivamente, pelo rimonabanto e pelo AM630, não altera por si só, os níveis de fosforilação das proteínas ERK e AKT no estriado

Figura 11: O tratamento combinado de doses inefetivas do antagonista CB₁, rimonabanto, e do agonista CB₂, JWH-133, inibe a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Figura 12: Inibição da hidrólise da anandamida, promovida pelo URB-597, não altera a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Figura 13: Inibição da hidrólise do 2-AG, promovida pelo JZL-184, não altera a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Figura 14: O tratamento combinado de doses inefetivas do antagonista CB₁, rimonabanto, e do URB-597, não altera a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Figura 15: O tratamento combinado de doses inefetiva do antagonista CB₁, rimonabanto, e do inibidor da hidrólise do 2-AG, JZL-184 inibe a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Figura 16: O tratamento com cocaína não altera os níveis de 2-AG em distintas áreas do sistema mesolímbico

Figura 17: O tratamento com cocaína não altera os níveis de anandamida em distintas áreas do sistema mesolímbico

Figura 18: Bloqueio dos receptores CB₂, induzido pelo AM-630, reverte o efeito do rimonabanto sobre a modulação do condicionamento ao lugar promovido pela cocaína

Figura 19: Bloqueio dos receptores CB₁, induzido pelo rimonabanto, não atenua o prejuízo no teste de PPI promovido pela cocaína

Figura 20: Figura representativa da conclusão do estudo

Tabela 1: Bloqueio e a ativação farmacológica dos receptores CB₂, bem como o bloqueio de CB₁ não alteram a locomoção basal

Tabela 2: O bloqueio dos receptores CB₁ e CB₂ não altera o número de células c-Fos positivas no NAcc

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-aracdonoilglicerol

AEA: Aracdonoil etanolamida (Anandamida)

AMPC: Monofosfato Cíclico de Adenosina

ATP: Trifosfato de Adenosina

ATV: Área Tegumentar Ventral

CB₁: Receptores canabinóides do tipo 1

CB₂: Receptores canabinóides do tipo 2

ERK: Quinase regulada por sinais extracelulares

FAAH: Hidrolase de amidas de ácidos graxos

GABA: Ácido gama-aminobutírico

MGL: Monoacilglicerol lipase

NAcc: Núcleo Acumbente

PKA: Proteína Quinase A

PCL: Preferência condicionada por lugar

PPI: Pre-pulse inhibition

TUS: Transtorno do uso de substâncias

Δ^9 -THC : Δ^9 -tetrahydrocannabinol

RESUMO

Os endocanabinoides anandamida e 2-aracidoilglicerol (2-AG) atuam em receptores canabinoides tipo 1 (CB₁) e tipo 2 (CB₂), por meio dos quais modulam a via dopaminérgica mesolímbica. Esta via é um importante alvo de atuação de drogas de abuso, a exemplo da cocaína. De fato, o antagonismo de CB₁ e a ativação de CB₂ inibem diversos efeitos deste psicoestimulante. A interação recíproca entre esses receptores, entretanto, ainda não foi investigada. Nesse contexto, testamos a hipótese de que o bloqueio CB₁ deslocaria as ações dos endocanabinoides (anandamida e 2-AG) para os receptores CB₂, inibindo as ações da cocaína. Observamos, inicialmente, que o antagonista CB₁, rimonabanto, preveniu a hiperlocomoção, o aumento da expressão da proteína c-Fos no núcleo acumbente e a fosforilação da ERK no estriado induzidos pela cocaína. Dando suporte à hipótese inicial, o tratamento prévio com um antagonista CB₂ (AM-630), reverteu o efeito inibitório do rimonabanto sobre essas repostas. Além disso, a combinação de doses subefetivas de rimonabanto e de um agonista CB₂ (JWH-133) também preveniu a resposta motora à cocaína. Os inibidores da hidrólise da anandamida (URB-597) e do 2-AG (JZL184) não alteraram este efeito. Entretanto, quando combinado com uma dose subefetiva de rimonabanto, o JZL184 (mas não URB597) preveniu a hiperlocomoção. Este resultado sugere o envolvimento do 2-AG na modulação da resposta à cocaína, embora os níveis de endocanabinoides em regiões límbicas não tenham sido alterados por esta droga. Por fim, em acordo com a hipótese testada, o antagonismo de CB₂ reverteu o efeito inibitório do rimonabanto sobre a aquisição da preferência condicionada ao lugar induzida pela cocaína. Portanto, nossos dados apontam

um possível mecanismo através do qual o sistema endocanabinoide modula os efeitos desta droga. Nossos achados propiciam, assim, um melhor entendimento de como a modulação desse sistema pode regular a neurobiologia do transtorno do uso da cocaína.

Palavras-chave: cocaína, receptores canabinoides, interação CB1 e CB₂, anandamida e 2-AG.

ABSTRACT

Endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2AG) act on cannabinoid receptors type 1 (CB₁) and type 2 (CB₂), through which they modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. This neurocircuitry is an important target for abuse drugs, including cocaine. Accordingly, antagonism of CB₁ receptor as well as activation of CB₂ inhibit several effects of this psychostimulant. However, a reciprocal interaction between these cannabinoid receptors has not been investigated. In this context, we tested the hypothesis that blockade of CB₁ would displace the actions of endocannabinoids (anandamide and 2-AG) towards CB₂ receptors, inhibiting the actions of cocaine. Initially we observed that rimonabant, a CB₁ antagonist, prevented hyperlocomotion, increase in c-Fos protein expression in the nucleus accumbens and the ERK phosphorylation in striatum induced by cocaine. Supporting our hypothesis, pretreatment with a CB₂ antagonist (AM-630), reversed this inhibitory effect of rimonabant on these responses. Furthermore, combination of a sub-effective dose of rimonabant and a CB₂ agonist (JWH-133) also prevented cocaine-induced hyperlocomotion. Inhibitors of anandamide hydrolysis (URB-597) and 2-AG (JZL184) did not change this effect. However, when combined with a sub-effective dose of rimonabant, JZL184 (but not URB597) prevented hyperlocomotion. This result suggests the involvement of 2-AG in modulation of cocaine-response, although the endocannabinoid levels in limbic regions have not been modified by this drug. Finally, also in accordance with the tested hypothesis, CB₂ blockade reversed the inhibitory effect of rimonabant on the acquisition of cocaine-induced conditioned place preference. In conclusion, our data suggest a possible

mechanism through which modulation in the endocannabinoid system regulates cocaine-responses.

Keywords: Cocaine, endocannabinoid system, CB1 and CB2 interaction, anandamide and 2-AG.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cocaína: História e implicações sociais

A cocaína é um estimulante do sistema nervoso central (SNC) extraído da planta *Erythroxylum coca* (Goldstein, DesLauriers et al. 2009). Evidências históricas e arqueológicas apontam que ancestrais das populações andinas, que habitavam regiões montanhosas no oeste da América do Sul, cultivavam e consumiam as folhas dessa planta há milhares de anos (Karch 1999, Goldstein, DesLauriers et al. 2009). Além dos relatos históricos apontarem o uso dessa planta em rituais religiosos, o ato de mascar essas folhas amenizava sensações desagradáveis, tais como tontura e náuseas, comumente relacionados a vida em altitudes elevadas (Karch 1999, Goldstein, DesLauriers et al. 2009).

Apesar da longa utilização humana, os conhecimentos acerca dos aspectos fitoquímicos da *Erythroxylum coca* só foram elucidados alguns séculos depois. Especificamente a cocaína somente foi identificada e isolada quimicamente em 1850 (Nathanson, Hunnicutt et al. 1993, Dackis e O'Brien 2001). Após esse achado, e diante do conhecido potencial terapêutico da planta, essa substância passou a ser adicionada a tônicos e elixires e seu uso medicinal foi recomendado para o tratamento de patologias como a depressão e o alcoolismo, além de ser utilizada também como agente anestésico (Dackis e O'Brien 2001) .

Nesse contexto, a utilização da cocaína se difundiu na Europa e nos Estados Unidos, e associado a esse uso disseminado surgiram as evidências de que se tratava de uma substância com potencial de abuso capaz de promover sérias complicações médicas (Goldstein, DesLauriers et al. 2009).

Diante disso, no início do século XIX, o uso da droga foi praticamente banido em diversos países do ocidente. Entretanto, nos anos 1970 a cocaína recuperou a popularidade e seu consumo, inclusive, passou a ser visto como uma prática glamorosa (Karch 1999, Dackis e O'Brien 2001). Esta percepção encorajou indivíduos a experimentá-la, especialmente pela administração por via intranasal e intravenosa, caracterizando o primeiro período de intensificação do uso abusivo dessa droga (Goldstein, DesLauriers et al. 2009). No final da década de 80, um novo crescimento exponencial se iniciou, principalmente através do uso da base livre da cocaína, chamado popularmente de “crack” (Guindalini, Vallada et al. 2006, Falck, Wang et al. 2007).

Dados epidemiológicos recentes sugerem que o consumo dessa substância ainda segue aumentando, sobretudo entre adolescentes (NIDA 2013). O cenário é particularmente mais grave no Brasil onde, ao contrário do padrão de estabilização observado em outros países, o consumo vem se expandindo entre os adultos jovens (Gowing, Ali et al. 2015). Atualmente, a cocaína é a droga de abuso que resulta em índices mais elevados de procura por atendimento médico de emergência, caracterizando graves riscos a vida do paciente, além dos danos sociais e econômicos que o abuso dessa droga podem causar (Penberthy, Ait-Daoud et al. 2010).

1.2. Neurobiologia do transtorno do uso da cocaína

O transtorno do uso de substâncias (TUS), é uma desordem psiquiátrica crônica e recidivante caracterizada por complexos fenômenos comportamentais e neurobiológicos que promovem uma compulsão pelo uso de uma determinada droga, a despeito de consequências deletérias para

diferentes aspectos da vida do indivíduo (Cami e Farre 2003, Volkow e Li 2005).

Diversas teorias têm sido propostas acerca de suas bases biológicas. Acredita-se que no início do uso, a substância atue sobre redes neurais que estão associadas com o reforço positivo, promovendo sensações agradáveis como diminuição do estresse, aumento da euforia e das inter-relações sociais (Koob 2000, Volkow e Li 2005). Nesse sentido, as sensações hedônicas, as quais estão relacionadas com aspectos de impulsividade como a excitação antes e a sensação de prazer durante o consumo, são os estímulos para utilização inicial da droga (Everitt e Robbins 2005).

Entretanto, uso ocasional de uma substância com potencial abusivo difere do estado emocional que promove a compulsão pelo uso (Volkow e Li 2005, Koob e Le Moal 2008). Diante de exposições repetidas o organismo tenta contrabalancear os efeitos da droga, em um ciclo no qual o limiar das sensações prazerosas é continuamente alterado em resposta a reexposição (Koob e Le Moal 2008). Assim, em resposta ao uso continuado da droga, ocorrem modificações celulares e moleculares nas redes neurais que compõem a via de recompensa, eventualmente, culminando em alterações como tolerância e sensibilização (Cami e Farre 2003, Justinova, Panlilio et al. 2009). Essas desregulações neurais contribuem para o surgimento de disforia, ansiedade e irritação, o que leva à compulsão pelo uso contínuo da droga, a fim de se evitar esses sintomas, num mecanismo de reforço negativo (Koob e Le Moal 2008, Koob 2013).

A dopamina se configura como o principal neurotransmissor envolvido nos processos relacionados ao uso inapropriado de substâncias (Di Chiara e Imperato 1988, Volkow, Fowler et al. 2004). Esse neurotransmissor é sintetizado em um processo com distintas etapas, o que favorece a regulação da quantidade de dopamina a ser liberada (Carlsson 1993). O aminoácido tirosina é o precursor da síntese, sendo convertido em L-DOPA (3,4 dihidroxifenilalanina) após a ação da enzima tirosina hidroxilase. Na etapa seguinte a L-DOPA é, então, descarboxilada pela enzima L-amino descarboxilase e convertida em dopamina. Após sintetizada, a dopamina é transportada para o interior de vesículas sinápticas de onde será liberada mediante um estímulo (Carlsson 1993). Uma vez liberada na fenda sináptica, a etapa limitante nos efeitos induzidos pela dopamina consiste na recaptação desse neurotransmissor por uma proteína específica (Hitri, Hurd et al. 1994).

Um aumento na transmissão dopaminérgica na via mesolímbica é responsável por mediar os efeitos recompensadores induzidos pelas drogas de abuso (Di Chiara e Imperato 1988, Wise 2004). De modo análogo essa circuitaria também está envolvida nos efeitos motivacionais de reforçadores fisiológicos, como o sexo e a alimentação. A via mesolímbica caracteriza-se por projeções dopaminérgicas oriundas de corpos celulares localizados na área tegumentar ventral (ATV) os quais fazem conexões com diversas estruturas límbicas como núcleo acumbente (NAcc), hipocampo e córtex pré-frontal (Koob e Volkow 2010).

A cocaína modula essa circuitaria, sobretudo através da inibição da proteína responsável por recaptar a dopamina da fenda sináptica (Kalivas 2007, Jonkman e Kenny 2013), o que resulta em aumento dos níveis desse

neurotransmissor na fenda sináptica (Dackis e O'Brien 2001, Kalivas 2007). Estudos com a neurotoxina 6-hydroxidopamine (6-OHDA), a qual promove a lesão de terminais dopaminérgicos, certificaram o papel desse neurotransmissor nas respostas induzidas pela cocaína. Injeções de 6-OHDA no NAcc causaram a inibição de uma série de repostas induzidas por esse psicoestimulante, inclusive os efeitos reforçadores (Roberts, Koob et al. 1980, Koob e Volkow 2010).

Uma vez presente na fenda, a dopamina exerce seus efeitos através da ativação de receptores específicos, os quais pertencem a superfamília de receptores acoplados a proteína G (Boyd e Mailman 2012, Beaulieu, Espinoza et al. 2015). Os receptores dopaminérgicos são classificados de acordo com a capacidade de ativação ou inibição da enzima adenilato ciclase, induzindo, assim, aumento ou diminuição da formação do cAMP. Receptores pertencentes a classe D₁ (D₁ e D₅) elevam a atividade da enzima, enquanto os receptores da classe D₂ (D₂, D₃ e D₄) inibem a síntese de cAMP (Beaulieu e Gainetdinov 2011, Beaulieu, Espinoza et al. 2015). Recentes evidências sugerem, entretanto, que a sinalização através da modulação da adenilato ciclase é apenas uma das formas pelas quais os receptores dopaminérgicos regulam a função celular (Brami-Cherrier, Valjent et al. 2002, Cahill, Salery et al. 2014, Beaulieu, Espinoza et al. 2015). Outras formas já descritas consistem na modulação das vias de sinalização da quinase extracelular regulada por sinal (ERK, na sigla em inglês) bem como da proteína quinase B, também denominada AKT (Beaulieu, Espinoza et al. 2015).

Neste contexto, modulações dessas vias ocorrem em resposta ao tratamento com agonistas seletivos D₁ e D₂ (Brami-Cherrier, Valjent et al.

2002). A fosforilação dessas proteínas também é modulada em distintas regiões cerebrais, inclusive na região mesolímbica, após o tratamento com cocaína (Collo, Bono et al. 2012, Miller, Barr et al. 2014). No mesmo sentido, as respostas comportamentais induzidas por esse psicoestimulante podem ser mediadas por alterações na cascata de sinalização que envolvem a AKT e a ERK (Lu, Koya et al. 2006, Shi, Miller et al. 2014).

Independentemente da via de transdução de sinal ativada, a exposição repetida à cocaína e a consequente estimulação dos receptores dopaminérgicos no prosencéfalo, especialmente no NAcc, modula a síntese e a transcrição de diversos genes. Este processos induzem uma plasticidade neural mal adaptativa culminando em respostas relacionadas ao TUS (Luscher e Malenka 2011). Embora se tenha avançado no entendimento acerca das alterações neurobiológicas associadas ao transtorno do uso da cocaína, não existe ainda um tratamento farmacológico eficaz contra esse distúrbio.

1.3. Modelos animais utilizados no estudo dos efeitos da cocaína

Grande parte dos avanços no entendimento dos efeitos comportamentais e neuroquímicos da cocaína foram alcançados por estudos envolvendo animais experimentais. O tratamento agudo e crônico com esse psicoestimulante induz uma grande diversidade de repostas. Entretanto, diante do escopo do presente estudo, nós iremos focar nos modelos animais utilizados para avaliar os comportamentos relacionados aos efeitos estimulantes e sensório-motores.

Apesar das dificuldades de se reproduzir estas condições em um contexto experimental (Leshner 1997, O'Brien e Gardner 2005), algumas das

repostas comportamentais induzidas pela cocaína, e também por outras drogas de abuso, podem ser satisfatoriamente modelados em experimentos com animais de laboratório (O'Brien e Gardner 2005). Uma dessas repostas é a autoadministração. Este é um paradigma extensamente utilizado no ambiente laboratorial a fim de se avaliar os efeitos reforçadores da cocaína (Panlilio e Goldberg 2007). Neste modelo os animais são treinados a executar uma tarefa, normalmente pressionar uma barra, e recebem a cocaína mediante a execução da mesma. Consiste, portanto, de um condicionamento operante no qual a administração da droga é o componente reforçador (Sanchis-Segura e Spanagel 2006, Panlilio e Goldberg 2007). É importante reiterar que embora os motivos pelos quais os animais busquem a cocaína sejam distintos das causas que levam o ser humano a consumir essa substância no âmbito social, esse método apresenta uma excelente validade de face (Gardner 2000, Sanchis-Segura e Spanagel 2006).

A preferência condicionada por lugar (PCL) é um outro procedimento usado para avaliar os aspectos hedônicos da cocaína (Tzschentke 2007). Neste teste os efeitos da droga (os quais atuam como estímulo incondicionado) são pareados repetidamente com um estímulo neutro (Bardo e Bevins 2000, Tzschentke 2007). Após múltiplos pareamentos, esse contexto outrora neutro, passa a ser associado com as propriedades recompensadoras da droga adquirindo a capacidade de atuar como estímulo condicionado (Bardo e Bevins 2000).

Normalmente, o teste da PCL é realizado em uma caixa de acrílico, que apresenta dois compartimentos, os quais apresentam distintas características sensoriais tais como cor, iluminação e textura do assoalho. Na fase inicial do

teste o animal recebe o tratamento com a cocaína e é confinado em um dos lados do aparelho, e assim experimenta as sensações da droga ao mesmo tempo que percebe os estímulos ambientais (Tzschentke 1998, Sanchis-Segura e Spanagel 2006). Posteriormente, após receber uma injeção de salina ele permanece restrito, pelo mesmo tempo, no lado oposto ao que recebeu a droga (Tzschentke 1998, Sanchis-Segura e Spanagel 2006). Ao fim dos tratamentos, quando lhes é permitido mover-se livremente pela caixa, os animais demonstram uma preferência na exploração do ambiente onde eles experimentaram o efeito da droga (Bardo e Bevins 2000).

Os dois modelos citados constituem, ainda, importantes ferramentas no estudo das recaídas, que se caracterizam pelo desejo e utilização da droga mesmo após longos períodos de abstinência (Aguilar, Rodriguez-Arias et al. 2009, Bossert, Marchant et al. 2013). De modo a avaliar esse importante aspecto do uso das drogas, no primeiro momento os protocolos são análogos ao que foi descrito. Entretanto, após adquirem os comportamentos de autoadministração ou da preferência ao lugar, os animais são reexpostos continuamente aos aparelhos experimentais na ausência da cocaína, de modo a extinguir os comportamentos condicionados (Sanchis-Segura e Spanagel 2006). Assim durante as sessões de extinção, no modelo da autoadministração, o animal pressiona a barra e não recebe a droga como recompensa, enquanto no teste da PCL o animal é confinado várias vezes ao lado no qual fora condicionado também sem receber a cocaína (Weiss 2010). A extinção é definida como uma diminuição da frequência ou intensidade da resposta outrora aprendida (pressionamento da barra e preferência por um lado da caixa no protocolo da autoadministração e do teste da PCL

respectivamente) (Weiss 2010). Após essa etapa, diversos estímulos tais como: uma única injeção da droga, ou mesmo a exposição a dicas ambientais e ao estresse reinstalam a resposta condicionada (Weiss, Ciccocioppo et al. 2001). A recaída, nestes casos, é evidenciada pela recuperação da resposta aprendida, ou seja, o animal volta a pressionar a barra na busca pela cocaína, ou no caso do teste da PCL permanece mais tempo no lado da caixa que havia sido pareado com a droga (Bossert, Marchant et al. 2013).

No que se refere às propriedades psicoestimulantes induzidas pela cocaína, essas respostas podem ser avaliadas em estudos pré-clínicos através da avaliação da atividade locomotora (Swerdlow et al. 1986). Nesse contexto, os animais que recebem tratamento com a droga, normalmente injeções intraperitoneais, são submetidos a uma arena, na qual é possível observar que o tratamento promove o aumento da atividade locomotora (Wise e Bozarth 1987, Sanchis-Segura e Spanagel 2006). A hiperlocomoção pode ser também utilizada para avaliar uma outra propriedade dos psicoestimulantes: a sensibilização, (Vanderschuren e Kalivas 2000). Esse termo se refere ao aumento de uma resposta após a exposição repetida ao estímulo que a desencadeou (Vanderschuren e Kalivas 2000). Apesar de ser observada em distintos parâmetros, os estudos desse fenômeno têm focado principalmente na atividade locomotora (Sanchis-Segura e Spanagel 2006, Witkin, Levant et al. 2008). Nesse contexto, a habilidade da cocaína de elevar a locomoção após uma administração aguda é aumentada quando a exposição é repetida (Vezina e Leyton 2009). A sensibilização é um relevante parâmetro no que se refere aos processos correlacionados a adicção à cocaína, sendo considerado por

alguns autores como a etapa determinante na transição entre o uso esporádico e o uso abusivo da droga (Robinson e Berridge 1993).

Uma outra resposta inerente a drogas psicoestimulantes, e que se estende por distintas espécies de mamíferos, é o déficit na inibição pré-pulso da resposta de sobressalto (PPI - *pre-pulse inhibition*) (Gobira, Ropke et al. 2013). Estímulos sonoros inesperados provocam uma resposta típica denominada reflexo de sobressalto. No entanto, se este estímulo (pulso) é precedido por um estímulo sensorial mais fraco e previsível (pré-pulso), a resposta de sobressalto é inibida em um mecanismo denominado inibição pré pulso (Koch 1999, Gobira, Ropke et al. 2013). Déficits nessa resposta são observados em transtornos psicóticos como a esquizofrenia, e estão associados com desregulação na transmissão dopaminérgica (Koch 1999, Geyer, Krebs-Thomson et al. 2001). Condição semelhante pode ser farmacologicamente induzida por agonistas dopaminérgicos ou inibidores do transportador de dopamina, a exemplo da cocaína (Geyer, Krebs-Thomson et al. 2001). Em um contexto experimental, os animais são expostos a uma plataforma que detecta movimentos, a qual está situada em uma caixa com isolamento acústico livre do ruído externo e acoplada a um aparelho capaz de gerar estímulos sonoros de intensidades controladas (Swerdlow, Braff et al. 2000). Assim, após receberem drogas psicotomiméticas, os animais são submetidos ao aparelho e recebem distintos estímulos sonoros de menor e maior intensidade gerando a resposta de sobressalto e sua inibição, e o prejuízo da mesma (Doherty, Masten et al. 2008, Gobira, Ropke et al. 2013).

Apesar das limitações dos modelos animais, já foi demonstrado que os sítios neuroanatômicos e as respostas neuroquímicas envolvidos na

modulação desses comportamentos são compartilhados entre os animais de laboratório e os humanos, tornando esses protocolos adequados para desvendar mecanismos neurais comuns e, portanto, ajudar a identificar estratégias úteis na intervenção dos efeitos da cocaína.

1.4. Sistema Endocanabinoide

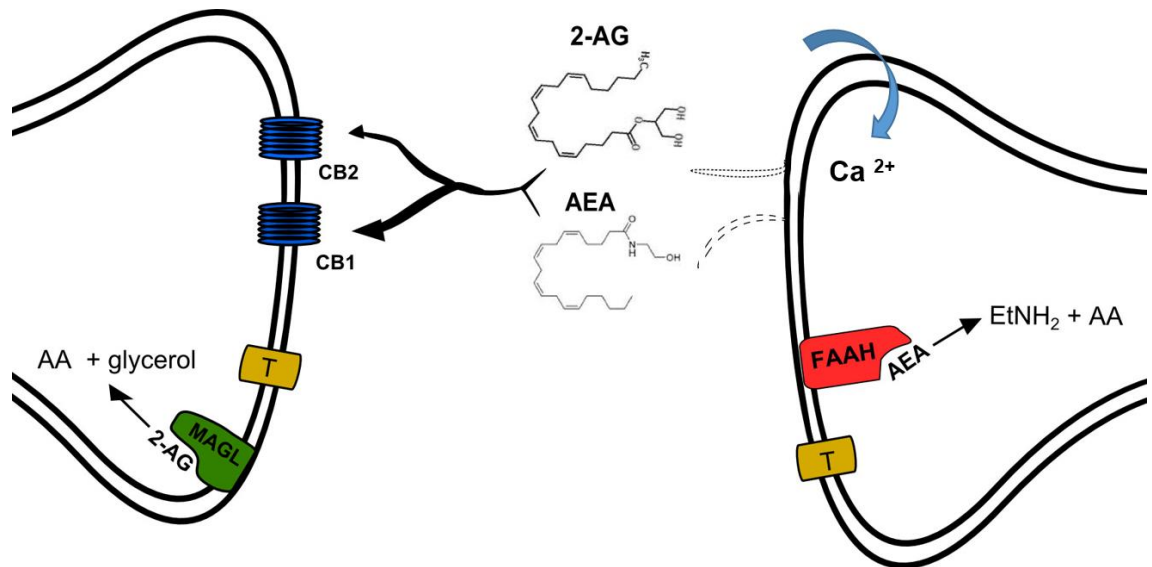
O sistema endocanabinoide tem sido implicado na regulação de uma variedade de processos fisiológicos, incluindo as reações de recompensa (Solinas, Yasar et al. 2007). O estudo da fisiologia e da farmacologia desse sistema teve seu marco inicial com a identificação e caracterização do composto Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), o principal responsável pelos efeitos psicoativos da planta *Cannabis sativa* (Mechoulam e Gaoni 1965, Pamplona e Takahashi 2012). Atualmente já se sabe que as respostas induzidas pelo Δ^9 -THC são mediadas pelos receptores canabinoides CB₁ e CB₂ (Devane, Dysarz et al. 1988, Munro, Thomas et al. 1993). Inicialmente acreditava-se que os receptores CB₁ eram expressos em tecidos periféricos e no cérebro, enquanto os receptores CB₂ estavam restritos a células e tecidos periféricos relacionados ao sistema imune (Matsuda 1997). Recentemente esse panorama tem sido alterado, já que os receptores CB₂ também têm sido encontrados no sistema nervoso central, tanto em neurônios quanto em células da glia (Onaivi, Ishiguro et al. 2012, Yang, Wang et al. 2012, Panagis, Mackey et al. 2014).

Os receptores canabinoides, juntamente com seus ligantes endógenos (denominados endocanabinoides, eCBs) e com as enzimas envolvidas no metabolismo desses ligantes, compõem o sistema endocanabinoide (Di Marzo

2009, Batista, Gobira et al. 2014). Os principais eCBs propostos são a aracdonoil etanolamida (também denominada anandamida) e o 2-aracdonoil glicerol (2-AG). De modo simplificado, esses agonistas endógenos são liberados de neurônios pós-sinápticos, após despolarização, e ativam receptores canabinoides pré-sinápticos, atuando como mensageiros retrógrados (Howlett, Barth et al. 2002, Piomelli 2003, Fitzgerald, Shobin et al. 2012). Deste modo, os endocanabinoides promovem uma regulação na ação de outros neurotransmissores, usualmente inibindo a liberação dos mesmos (Wilson e Nicoll 2002, Justinova, Panlilio et al. 2009, Maldonado, Berrendero et al. 2011, Atwood, Straiker et al. 2012, Fitzgerald, Shobin et al. 2012).

Ao contrário dos neurotransmissores clássicos, que são sintetizados e estocados em vesículas, a síntese dos endocanabinoides é feita sob demanda, mediante um influxo de cálcio (Piomelli 2003). Já a degradação desses ligantes é realizada por enzimas específicas, sendo a monoalcilglicerol lípase (MGL) responsável por hidrolisar o 2-AG e a hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH) por degradar a anandamida. Manipulações farmacológicas dos níveis dos endocanabinoides podem ser feitas por meio da inibição destas enzimas (Cravatt, Giang et al. 1996, Moreira, Kaiser et al. 2008, Nomura, Hudak et al. 2008, Straiker, Hu et al. 2009).

Recentes pesquisas têm propiciado o melhor entendimento acerca do sistema endocanabinoide e suas funções no sistema nervoso central. Compostos que modulam esse sistema parecem apresentar um potencial terapêutico considerável para o tratamento de transtornos psiquiátricos tais como ansiedade, depressão e o abuso de substâncias (Moreira e Lutz 2008, Di Marzo 2009).



Modificado de Batista et. al. 2014

Figura 1: Representação esquemática da sinapse canabinoide. Anandamida (AEA) e 2- araquidonoilglicerol (2-AG) são sintetizados em neurônios pós-sinápticos, após influxo de cálcio. Estes exercem suas ações ao se ligar a receptores CB₁ e CB₂ expressos em neurônios pré-sinápticos. O término da ação destes endocanabinoides ocorre após recaptação e metabolização pela Hidrolase Amida de ácidos graxos (FAAH) e pela Monoacil Monoacilglicerol Lipase (MGL), que hidrolisam AEA e 2-AG respectivamente.

1.5. O sistema endocanabinoide e os efeitos comportamentais e neuroquímicos da cocaína

O sistema endocanabinoide tem sido implicado na regulação de várias respostas relacionadas às drogas de abuso (Vlachou e Panagis 2014). Tanto o tratamento agudo quanto a exposição repetida a substâncias com potencial de

abuso promovem modulações nesse sistema, tais como alterações nos níveis de endocanabinoides, e a expressão dos receptores para esses ligantes (Patel, Rademacher et al. 2003, Solinas, Yasar et al. 2007). De fato, a distribuição dos receptores canabinoides é condizente com tais observações. Os receptores CB₁ são expressos tanto em neurônios que liberam glutamato, quanto nos que liberam ácido gamma-aminobutírico (GABA), presentes na via dopaminérgica mesolímbica (Maldonado, Valverde et al. 2006, Fitzgerald, Shobin et al. 2012). Os receptores CB₂, por sua vez, predominam em neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica (Onaivi, Ishiguro et al. 2012, Panagis, Mackey et al. 2014). Endocanabinoides liberados nessa região podem se ligar aos subtipos de receptores canabinoides e promover uma modulação direta e indireta dos neurônios dopaminérgicos envolvidos nas respostas relacionadas à adicção (Maldonado, Valverde et al. 2006).

Corroborando essa hipótese, compostos que atuam sobre o sistema endocanabinoide regulam as ações induzidas por drogas de abuso (Lopez-Moreno, Gonzalez-Cuevas et al. 2008). Respostas semelhantes são também observadas após manipulações genéticas de componentes desse sistema (Maldonado, Robledo et al. 2013). Com relação às repostas promovidas pela cocaína, os estudos comportamentais e neuroquímicos demonstram que tanto uma maior ativação quanto o bloqueio dos receptores CB₁ e CB₂, bem como alterações dos níveis de endocanabinoides, podem regular as ações da droga (Tanda 2007). Cabe ressaltar que as repostas mais consistentes são obtidas pelo antagonismo dos receptores CB₁ e pela ativação de CB₂ (Vlachou e Panagis 2014).

O tratamento com o antagonista dos receptores CB₁, rimonabanto, inibe o aumento da atividade locomotora induzido pela cocaína (Poncelet, Barnouin et al. 1999). Além disso, animais geneticamente modificados, que não expressam esses receptores, também apresentaram resposta motora reduzida à injeção da droga (Li, Hoffman et al. 2009). O bloqueio farmacológico e genético de CB₁ também atenuou os comportamentos de sensibilização locomotora (Corbille, Valjent et al. 2007, Li, Hoffman et al. 2009) e a autoadministração deste psicoestimulante (Soria, Mendizabal et al. 2005, Li, Hoffman et al. 2009). Foi demonstrado, ainda, que a aquisição e a expressão do condicionamento ao lugar, induzido por essa droga, são inibidos pelo antagonismo de CB₁ (Yu, Zhou et al. 2011). Além da modulação das reações de recompensa, o bloqueio desses receptores inibe tanto o comportamento de recaída induzido por estresse quanto o induzido pela re-exposição à droga (Xi, Gilbert et al. 2006, Vaughn, Mantsch et al. 2012). Esses dados indicam a participação dos receptores CB₁ na modulação dos distintos processos relacionados ao transtorno do uso da cocaína (Vaughn, Mantsch et al. 2012).

Quanto aos receptores CB₂, sua presença no cérebro foi durante muito tempo contestada (Onaivi, Ishiguro et al. 2012). Estudos iniciais falharam na detecção desses receptores no sistema nervoso central (Munro, Thomas et al. 1993, Griffin, Wray et al. 1999). Entretanto, trabalhos utilizando ligantes marcados radioativamente ("binding"), bem como ensaios imunohistoquímicos, demonstraram a presença de CB₂ em distintas regiões encefálicas, inclusive a ATV e regiões límbicas como NAcc, CPF e Hip, sugerindo um potencial envolvimento desses receptores na regulação de comportamentos

relacionados à adicção (Van Sickle, Duncan et al. 2005, Onaivi, Ishiguro et al. 2012, Zhang, Gao et al. 2014).

Recentemente, tem sido demonstrada a participação de receptores CB₂ na regulação de respostas relacionadas a distintas drogas de abuso (Yang, Wang et al. 2012). A ativação desses receptores por agonistas seletivos, portanto o contrário do que se observa com os receptores CB₁, inibe respostas psicoestimulantes e recompensadoras induzidas pela cocaína (Al Mansouri, Ojha et al. 2014, Zhang, Gao et al. 2014). No mesmo sentido, animais com aumento na expressão dos receptores CB₂ se mostram menos susceptíveis aos efeitos dessa droga, enquanto animais nocautes para esses receptores apresentam maior susceptibilidade (Ortega-Alvaro, Aracil-Fernandez et al. 2011, Xi, Peng et al. 2011, Aracil-Fernandez, Trigo et al. 2012).

Essas evidências sugerem, do ponto de vista farmacológico e genético, que tanto a ativação dos receptores CB₂, quanto o silenciamento dos receptores CB₁, inibe os comportamentos induzidos pela cocaína. Semelhante padrão de resposta foi observado com parâmetros neuroquímicos. Administração de um agonista CB₂ reduz a elevação nos níveis mesolímbicos de dopamina induzida pela cocaína, sendo que tais efeitos não foram observados em animais nocautes para esses receptores. Analogamente, o tratamento com antagonistas CB₁ inibe o aumento de dopamina no Nacc (Corbille, Valjent et al. 2007, Xi, Peng et al. 2011, Zhang, Gao et al. 2014). Embora essas evidências demonstrem que o bloqueio dos receptores CB₁ e a ativação dos receptores CB₂ atenuam os efeitos da cocaína, uma possível interação entre esses receptores na regulação de tais respostas ainda não foi estudada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Testar a hipótese de que o bloqueio dos receptores CB₁ desloca as ações dos endocanabinoides para os receptores CB₂ e a maior ativação dos mesmos inibe os efeitos da cocaína.

2.2 Objetivos Específicos:

- A) Reproduzir dados da literatura que demonstram que o antagonismo de receptores CB₁ ou a ativação de receptores CB₂ inibe o aumento da atividade locomotora induzido pela cocaína.
- B) Testar a hipótese de que há uma interação entre tais receptores na mediação dessa resposta.
- C) Testar a hipótese de que o bloqueio de CB₁ e a ativação de CB₂ atenuam a indução na expressão da proteína c-Fos induzida pela cocaína.
- D) Testar a hipótese de que o bloqueio de CB₁ e a ativação de CB₂ atenuam o aumento da fosforilação das proteínas ERK e AKT induzido pela cocaína.
- E) Identificar qual endocanabinoide está envolvido na modulação das respostas à cocaína.
- F) Avaliar se o bloqueio dos receptores CB₁ altera o déficit da inibição pré-pulso induzido pela cocaína
- G) Testar a hipótese de que o antagonismo de CB₁ inibe a aquisição do condicionamento ao lugar induzido pela cocaína e por interação com receptores CB₂.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais:

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, pesando entre 25 e 30 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Experimentação Animal (protocolo 242/2013). Os animais foram mantidos em grupos de dez por gaiola, com livre acesso à água e comida, sob ciclo claro-escuro de 12 h (início às 7:00 h) e temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.2 Drogas:

- ✓ Rimonabanto - Agonista inverso/Antagonista seletivo dos receptores CB₁ (Sigma Aldrich)
- ✓ AM-630 - Antagonista seletivo dos receptores CB₂ (Tocris)
- ✓ JWH-133 - Agonista seletivo dos receptores CB₂ (Tocris)
- ✓ URB-597 - Inibidor da enzima FAAH, que hidrolisa a anandamida (Cayman Chemical)
- ✓ JZL-184 - Inibidor da enzima MGL, que hidrolisa o 2-AG (Cayman Chemical)
- ✓ Cocaína (Merck)

As injeções foram feitas pela via intraperitoneal em um volume de 10 ml/kg. As drogas que atuam sobre o sistema endocanabinoide foram diluídas em solução veículo constituída de 5% de Cremophor; 5% de Etanol Absoluto e 90% de salina. A cocaína foi diluída diretamente em salina.

3.3 Aparelhos experimentais e estudos comportamentais:

➤ **Arena:**

Esse aparelho consiste em uma caixa quadrada (40cm x 40cm e 50cm de altura), aberta na extremidade superior. A arena foi utilizada para avaliação da atividade locomotora. Os animais foram habituados à caixa por dez minutos e, em seguida, receberam injeção de cocaína ou salina e foram imediatamente reexpostos ao aparelho. A distância total percorrida por cada animal durante o teste foi avaliada com auxílio do software ANY-MAZE.

➤ **Caixa de condicionamento ao lugar:**

Esse aparelho consiste em uma caixa de acrílico com três câmaras, duas delas com iguais dimensões (20 cm de comprimento e 15cm de largura) conectadas por um compartimento central (6 x 15cm). Elas são equipadas com portas que separam cada uma das câmaras. A câmara central tem um piso liso e paredes acinzentadas, enquanto as câmaras de “preferência” são distintas, sendo que uma apresenta listras brancas e pretas verticais intercaladas e piso de grade metálica, e a outra é dotada de listras pretas e brancas horizontais também intercaladas e piso feito por barras de metal igualmente espaçadas.

No primeiro dia (pré-teste) os animais foram colocados na caixa, com as portas abertas permitindo exploração livre por todos os compartimentos, durante um período de 15 minutos. O tempo de permanência em cada compartimento foi registrado, com auxílio do software ANY-MAZE. Os animais foram então separados aleatoriamente em grupos cocaína e salina. No dia 2 (condicionamento) os camundongos receberam uma injeção de cocaína e foram confinados em uma das câmaras de “preferência”, onde permaneceram por 30 minutos. No terceiro dia, receberam injeção de salina e foram

confinados na câmara oposta àquela em que havia recebido cocaína no dia anterior. Nos dias 4, 5, 6 e 7 este procedimento foi repetido, e a exposição refeita à mesma câmara/tratamento do dia correspondente.

No dia final (teste) os animais foram colocados no compartimento central, com as portas levantadas, e então se locomoveram livremente por todas as câmaras. Nessa etapa também foi avaliado, com auxílio do software ANY-MAZE, o tempo que cada um deles permaneceu em cada uma das câmaras de “preferência”. A análise dos dados foi feita com base na diferença entre o tempo que os animais permaneceram no lado em que receberam cocaína e o tempo em que eles permaneceram no lado salina.

➤ **Teste de inibição pré-pulso (PPI):**

O teste de PPI é realizado em 3 etapas consecutivas. A primeira consiste em um período de aclimatação durante o qual nenhum estímulo é apresentado, existindo apenas o ruído de fundo (65 dB \pm 1). Na etapa subsequente, denominada de habituação, somente o estímulo que desencadeia o sobressalto (pulso) é apresentado. A terceira fase do teste é a responsável por avaliar a inibição da resposta de sobressalto ao pulso (PPI). Essa etapa é composta por 64 apresentações aleatórias dos diferentes estímulos: (I) pulso (ruído branco) de 105 dB com 20 ms de duração, (II) pré-pulso (tom puro, frequência de 7000 Hz) nas intensidades de 80, 85 ou 90 dB com 10 ms de duração, (III) pré-pulso seguido de pulso com 100 ms de intervalo entre eles e (IV) nulo (sem nenhum estímulo). Durante essa sessão, os estímulos são apresentados em intervalos regulares de 30 segundos, sendo 8 apresentações de cada estímulo. A porcentagem de PPI é expressa como a porcentagem de

inibição da amplitude do sobressalto em resposta a múltiplas apresentações do pulso (P) precedido pelo pré-pulso (PP), em função da amplitude da resposta apenas ao pulso (P), conforme demonstrado na fórmula: $\%PPI=[100-(PP+P/P)*100]$.

➤ **Western Blot para avaliação da fosforilação das proteínas AKT e ERK**

Imediatamente após o teste comportamental de hiperlocomoção, os animais foram sacrificados e os cérebros foram retirados e o estriado foi dissecado, para investigação dos efeitos dos tratamentos sobre a fosforilação das proteínas AKT e ERK. Os tecidos foram então lisados em um tampão Triton (1% Triton X-100, 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2) contendo inibidores de protease e de fosfatase. Após quantificação proteica, uma alíquota de 100.0 µg do lisado total foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) seguida de eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. Ao final da transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau S (1% (p/v) e ácido acético 10% (v/v)) sob agitação constante para verificar a presença de bandas proteicas. Para avaliação da fosforilação da ERK e AKT, as respectivas membranas foram bloqueadas com 5% BSA em tampão de lavagem (150.0 mM NaCl, 10.0 mM Tris-HCl, pH 7.0 and 0.05% Tween 20) por 1 h e então incubadas com os anticorpos de coelho (anti-fosfo Akt S473 e anti-fosfo ERK 1/2, ambos na proporção 1:1000) em uma solução contendo 3% de leite desnatado por duas horas (AKT) e overnight (ERK) em temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas 3 vezes por 5 min com tampão de lavagem (TBS Tween 0,1%). Em seguida, incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase anti-IgG diluído

1:5000 em tampão de lavagem contendo 3% de leite desnatado durante 1h. Após lavagens com tampão específico, a presença da proteína de interesse foi detectada por quimioluminescência, utilizando o kit *Imobilon Western* (Millipore). As membranas foram incubadas por 5 minutos e posteriormente expostas ao Image Quant LAS 400 (GE Healthcare), e posteriormente submetidas ao procedimento de stripping em tampão de stripping (TRIS pH 6,8 65 mM, SDS 2% e 2-mercaptoetanol 100 mM, adicionado fresco) e foram novamente bloqueadas. Em seguida, incubadas com anticorpo primário anti-ERK e anti-AKT ambos na diluição de 1:1000 overnight para detecção da ERK e AKT totais. As membranas foram então lavadas e colocadas em anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase anti-IgG diluído 1:5000 em tampão de lavagem contendo 3% de leite desnatado durante 1h. Após lavagem, a presença da proteína de interesse foi detectada por quimioluminescência, utilizando o kit *Imobilon Western* (Millipore).

➤ **Imunohistoquímica para detecção da proteína c-Fos:**

Duas horas após o teste de avaliação da atividade locomotora, os animais foram perfundidos transcardialmente com salina e paraformaldeído 4% fosfatado e tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e processados para obtenção de cortes representativos e foram obtidas secções (30 µm) em triplicata do NAcc. As secções foram inicialmente lavadas por 30 min (3 lavagens de 10 min) em PBS 0,1M e em seguida incubadas em solução de PBS + glicina 0,1M por 10min, para bloqueio de sítios aldeídos formados pelo PFA. Após 2 lavagens de 5 min cada em PBS 0,1M, as secções foram incubadas com soro albumina bovina (BSA) 5% em PBS 0,1M acrescido de Triton-X 0,4%, durante 1h para bloqueio dos sítios inespecíficos, evitando

marcações inespecíficas e para aumentar a permeabilidade da membrana celular. Em seguida as secções foram incubadas em solução contendo PBS + BSA 5% + Triton 0,4% e os anticorpo primário: antic-Fos policlonal produzido em coelho (1:1000, Santa Cruz®) por 24 horas. Após esse tempo as secções foram novamente lavadas com PBS (3 lavagens de 5 minutos cada), antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (1:1000), em uma solução PBS + BSA 5% + Triton 0,4%, por uma hora. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente com agitação constante. Uma vez removido o anticorpo secundário (3 lavagens de 5 minutos), os cortes foram incubados com o complexo AB avidina-biotina (1:1500) por 90 minutos. A atividade da peroxidase foi revelada usando tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB). Finalmente os cortes foram distendidos em lâminas previamente gelatinizadas. A imunoreatividade para c-Fos (c-Fos-IR) foi visualizada como um produto castanho depositado no interior dos núcleus neuronais. Quantificou-se a expressão da proteína nas porções core e shell do NAcc.

➤ **Avaliação dos Níveis de endocanabinoides:**

Um aparelho de cromatografia líquida acoplado a um espectrofotômetro de massa foi utilizado para determinar os níveis dos endocanabinoides anandamida e 2-AG nos seguintes sítios neuronanatômicos: estriado, córtex pré-frontal e hipocampo. Após receber salina ou cocaína e serem submetidos a arena, conforme protocolo descrito anteriormente, os animais foram sacrificados por decapitação e as regiões de interesse foram imediatamente dissecadas, armazenadas em gelo seco, e estocadas no freezer a -80 °C. As amostras foram, então, homogeneizadas em 400 µl de uma solução de 100%

acetonitrila na qual estavam contidas concentrações específicas de padrões internos (0.014 nmol AEA-d8, 0.48 nmol 2-AG-d8). Posteriormente os homogenatos foram centrifugados (14 000 rpm) por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e evaporado até a secagem em uma centrífuga de evaporação. O conteúdo remanescente nos tubos foi re-suspenso em 40µl de acetonitrila 65% e separados em uma coluna Zorbax® C18 (150x0.5mm de diâmetro interno; Agilent Technologies Ltd, Cork, Ireland) pela eluição em um gradiente de fase reversa (Jennings, Okine et al. 2016). A detecção dos analitos foi conduzida em ionização por eletrospray positiva e o monitoramento foi realizado em um sistema de HPLC acoplado a um espectrofotômetro de massa (Agilent Technologies Ltd). A quantificação de cada analito foi expressa em pmol/g de tecido com limite de quantificação de 1.32 para a AEA, e em nmol/g de tecido com limite de quantificação de 12.1 para o 2-AG.

3.4. Delineamento Experimental:

Experimento 1: Os animais receberam injeção de rimonabanto (1, 3 e 10 mg/kg) e, 30 min depois, de cocaína (20 mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min.

Experimento 2: Os animais receberam injeção de JWH-133 (5, 10 e 20 mg/Kg). e, 30 min depois, de cocaína (20 mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min.

Experimento 3: Os animais receberam injeção de AM-630 (5.0 e 10 mg/Kg), 5 min antes da injeção de rimonabanto (10 mg/Kg), e 35 min depois, receberam a injeção de cocaína (20 mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min.

Experimento 4: O protocolo experimental 3 foi repetido e os cérebros dos animais foram retirados e processados para detecção da proteína c-Fos.

Experimento 5: O protocolo experimental 3 foi repetido e os cérebros dos animais foram retirados e processados para análise dos níveis de fosforilação das proteínas ERK e AKT.

Experimento 6: Os animais receberam injeção do rimonabanto (3 mg/Kg), 5 min antes da injeção do JWH-188 (10mg/Kg), e 35 min depois, receberam a injeção de cocaína (20 mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min.

Experimento 7: Os animais receberam injeção de URB-597 (0.1, 0.3 e 1 mg/Kg) e, 30 min depois, de cocaína (20 mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min.

Experimento 8: Os animais receberam injeção de JZL-184 (1, 3 e 10 mg/Kg) e, 30 min depois, de cocaína (20 mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min.

Experimento 9: Os animais receberam injeção do rimonabanto (3 mg/Kg), 5 min antes da injeção do URB-597 (1 mg/Kg), e 35 min depois, receberam a injeção de cocaína (20 mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min.

Experimento 10: Os animais receberam injeção do rimonabanto (3 mg/Kg), 5 min antes da injeção do JZL-184 (10 mg/Kg), e 35 min depois, receberam a injeção de cocaína (20 mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min.

Experimento 11: Os animais receberam injeção de cocaína (20mg/kg) e foram imediatamente expostos à arena por 10 min, e imediatamente após o

teste os cérebros foram retirados e processados para detecção dos níveis de anandamida e 2-AG nas regiões cerebrais do estriado, córtex pré-frontal e hipocampo.

Experimento 12: Os animais receberam injeção de rimonabanto (10 mg/kg) e, 30 min depois, de cocaína (40mg/kg) e foram imediatamente submetidos ao teste do PPI.

Experimento 13: Durante dias alternados (segundo, quarto e sexto) os animais receberam injeção de AM-630 (5.0 e 10 mg/Kg), 5 min antes da injeção de rimonabanto (10 mg/Kg), e 35 min depois, receberam a injeção de cocaína (15 mg/kg) e foram imediatamente expostos sempre ao mesmo lado do aparelho do CPP por 30 min. Durante o terceiro, quinto e sétimo dia os animais recebem a injeção dos veículos e foram confinados no lado oposto do aparelho por 30 min.

4.5. Análise Estatística:

Os dados referentes a distância percorrida na arena, número de células positivas para c-Fos e intensidade de fosforilação da AKT e da ERK foram comparados por análise de variância, ANOVA, seguida de teste de Newman-Keuls. Os dados da quantificação dos níveis de endocanabinoides foram comparados pelo teste t de Student. O índice de inibição pré-pulso (PPI) e do condicionamento ao lugar, foram comparados por análise de variância de duas vias (two way ANOVA), considerando os fatores droga e sessão, seguida de teste de Duncan. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do pré-tratamento com Rimonabanto sobre a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Como esperado, a injeção de cocaína (20 mg/Kg) promoveu um aumento da atividade locomotora. O tratamento com a maior dose do antagonista dos receptores CB₁, Rimonabanto (1, 3 e 10 mg/Kg), atenuou a hiperlocomoção induzida por esse psicoestimulante ($F_{(4,39)}=5,96$, $p=0.016$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 2). Esse efeito foi independente de um comprometimento motor, visto que a maior dose do Rimonabanto por si só não promoveu alteração na locomoção basal (Tabela 1).

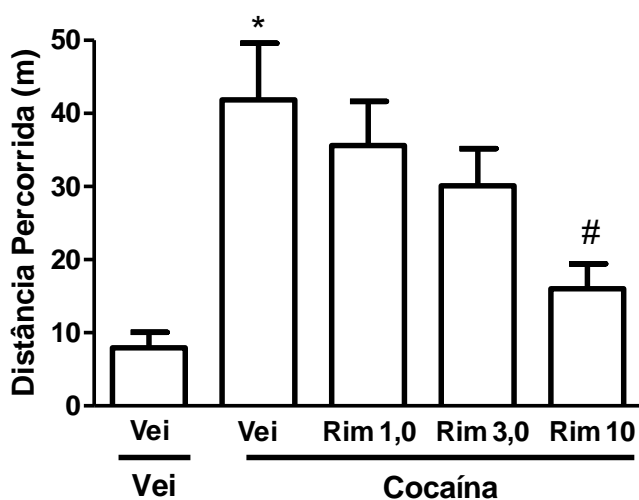


Figura 2: Bloqueio dos receptores CB₁, induzido pelo rimonabanto (1, 3 e 10mg/kg), atenua a hiperlocomoção promovida pela cocaína (20 mg/Kg). As barras representam a média ± E.P.M. (* $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-veículo; # $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-cocaína; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=7-11$ /grupo).

4.2. Efeito do pré-tratamento com doses crescentes do JWH-133 sobre a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Os dados demonstram novamente que a injeção de cocaína (20 mg/Kg) promoveu um aumento da atividade locomotora. A maior dose do agonista seletivo dos receptores CB₂, JWH-133 (5, 10 e 20 mg/Kg), atenuou a hiperlocomoção induzida por esse psicoestimulante ($F_{(4,33)}=7,24$, $p=0.004$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 3). O efeito do JWH-133, também, foi independente de um comprometimento motor, visto que a droga por si só não alterou a locomoção basal (Tabela 1).

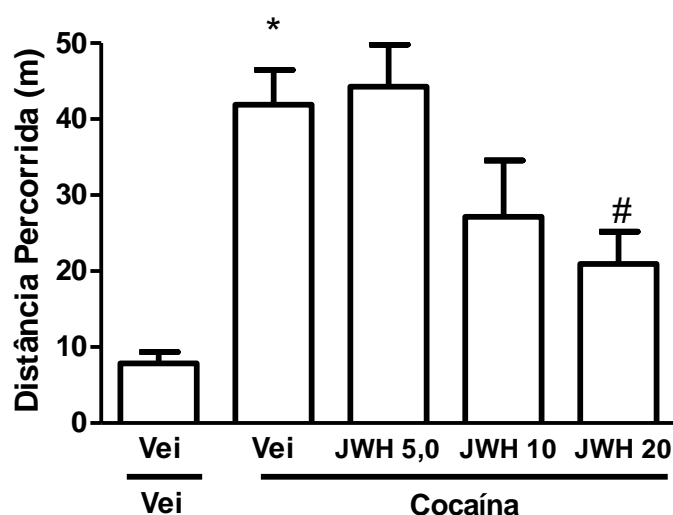


Figura 3: Ativação de receptores CB₂, induzida pelo JWH-133 (5, 10 e 20 mg/Kg), atenua a hiperlocomoção promovida pela cocaína. As barras representam a média \pm S.E.M. (* $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-veículo; # $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-cocaína; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=8-10$ /grupo).

4.3. Antagonismo dos receptores CB₂ reverte o efeito inibitório do rimonabanto sobre a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Este experimento testou se o bloqueio dos receptores CB₁ deslocaria os endocanabinoides para uma ativação predominante de CB₂ e a consequente inibição da ação hiperlocomotora da cocaína. Previamente à dose efetiva do rimonabanto (10 mg/Kg), os animais foram tratados com AM630 (3,0 e 10 mg/Kg), um antagonista seletivo dos receptores CB₂. O Rimonabanto, como esperado, atenuou a resposta à cocaína. Esse efeito foi revertido pela maior dose do AM630 ($F_{(4,42)}=5,43$, $p=0.0013$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 4)

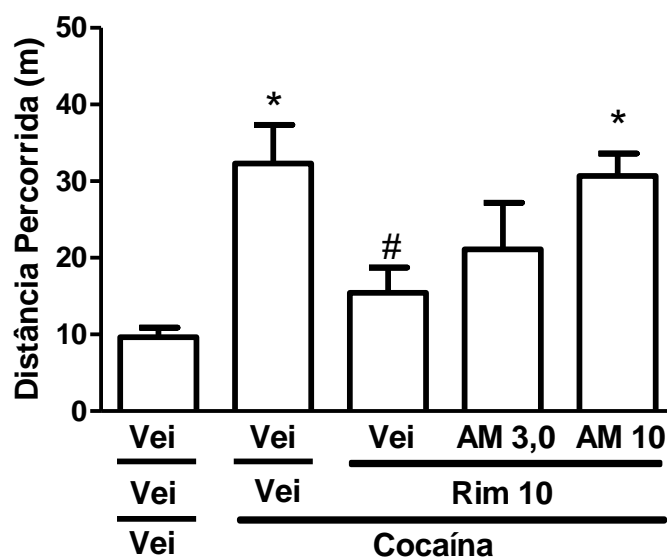


Figura 4: Bloqueio dos receptores CB₂, induzido pelo AM630 (3,0 e 10 mg/Kg), reverte o efeito do rimonabanto sobre a modulação da hiperlocomoção promovida pela cocaína (20 mg/Kg). As barras representam a média \pm E.P.M. (* $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-veículo; # $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-cocaína; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=9-10$ /grupo).

4.4. Manipulação farmacológica dos receptores canabinoides não altera a atividade locomotora basal

A injeção do antagonista CB₁, rimonabanto (10 mg/kg), do antagonista CB₂, AM630 (10 mg/kg), e do agonista CB₂, JWH-133 (20 mg/kg), não altera a atividade locomotora basal ($F_{(3,25)}=0,61$, $p=0.0013$, teste de Newman-Keuls $p>0.05$; Tabela 1) .

Tratamento	Distância Percorrida (média ± E.P.M)
Veículo	10.3 ± 2.1
Rimonabanto 10 mg/Kg	12.1 ± 3.4
AM630 10 mg/Kg	10.3 ± 1.3
JWH-133 20 mg/Kg	12.9 ± 4.7

Tabela 1: O bloqueio e a ativação farmacológica dos receptores CB₂ (AM630 10 mg/Kg e JWH-133 20 mg/Kg, respectivamente), bem como o bloqueio de CB₁ (rimonabanto 10 mg/Kg) não alteram a locomoção basal. Os dados estão representados como média ± E.P.M. ($p>0,05$, comparado com o grupo veículo; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=6-8$ /grupo).

4.4. Antagonismo dos receptores CB₂ reverte o efeito inibitório do rimonabanto sobre o aumento da expressão de c-Fos induzida pela cocaína na porção core do NAcc

Em consonância com as respostas comportamentais, o tratamento com Rimonabanto (10mg/Kg) atenuou o aumento da expressão de c-Fos induzida pela cocaína (20mg/Kg) na porção core do Nacc. O pré-tratamento com AM-630 (10mg/Kg) reverteu o efeito induzido pelo Rimonabanto ($F_{(3,23)}=5,91$, $p=0.0046$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figuras 5 e 6)

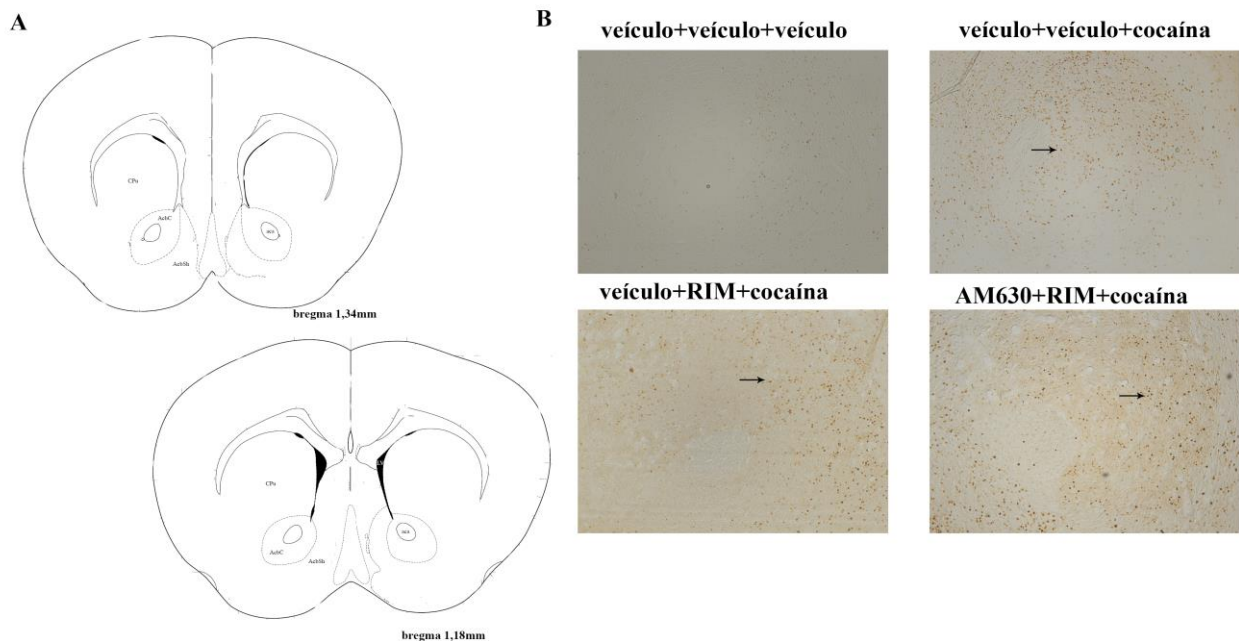


Figura 5: Em A, observa-se o diagrama do plano representativo dos sítios analisados na contagem de células c-Fos do NAcc (Modificado de Paxinos & Watson, 1997). Em B estão demonstradas as fotomicrografias representativas de seções coronais (30 micrômetros) da porção core do Nacc. As setas indicam células positivas para c-Fos. Aumento = 10x.

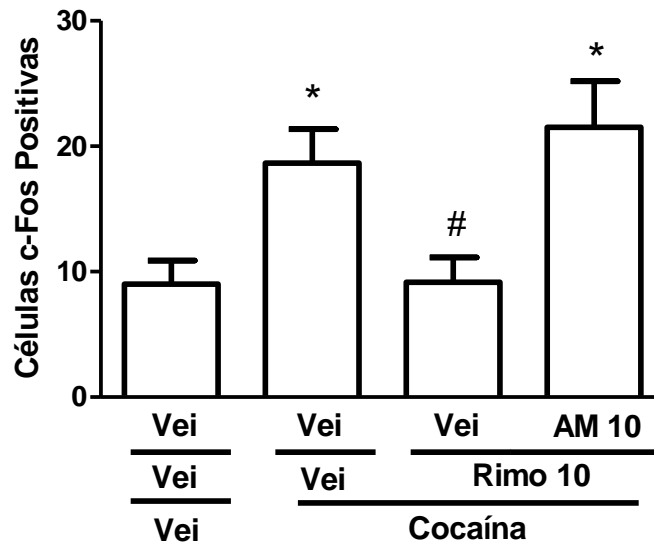


Figura 6: Bloqueio dos receptores CB₂, induzido pelo AM630 (10 mg/Kg), reverte o efeito do rimonabanto (10 mg/Kg) sobre a modulação do aumento da expressão de c-Fos promovido pela cocaína (20 mg/Kg) na porção core do NAcc. As barras representam a média ± E.P.M. (*p<0,05, comparado com o grupo veículo-veículo; # p<0,05, comparado com o grupo veículo-cocaína; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; n=7-11/grupo).

4.5. Antagonismo dos receptores CB₂ reverte o efeito inibitório do rimonabanto sobre o aumento da expressão de c-Fos induzida pela cocaína na porção shell do NAcc

A ANOVA demonstrou que o tratamento com rimonabanto (10mg/Kg) atenua o aumento da expressão de c-Fos induzida pela cocaína (20mg/Kg) na porção shell do Nacc. Esse efeito foi revertido nos animais pré-tratados com AM-630 (10mg/Kg) ($F_{(3,23)}=8,11$, $p=0.001$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figuras 7 e 8).

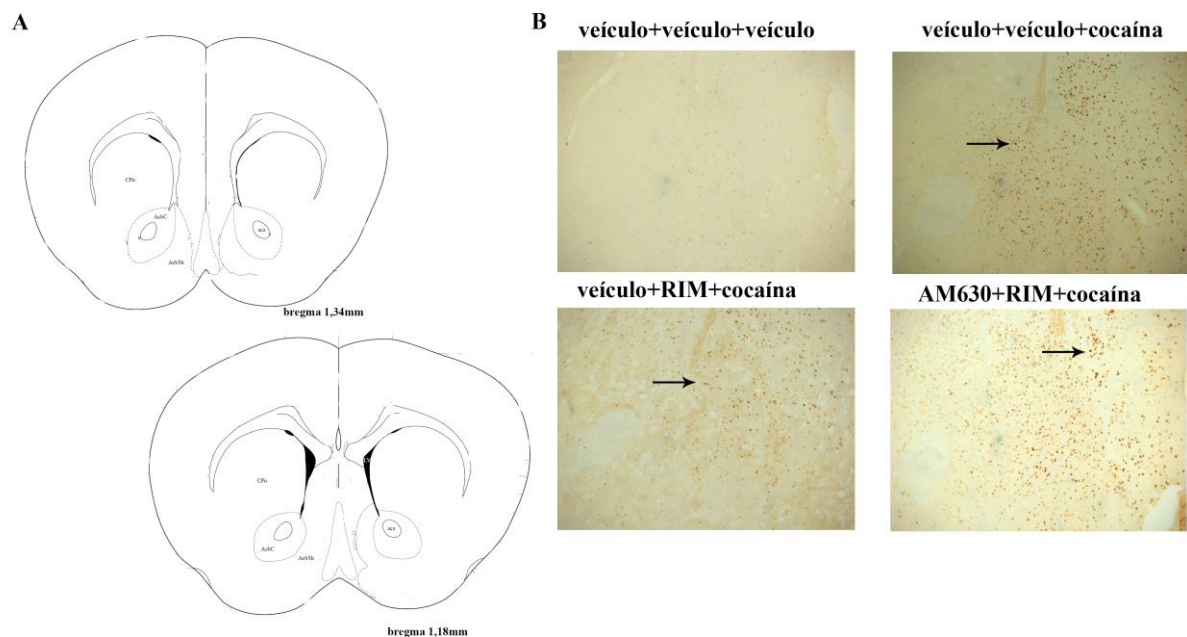


Figura 7: Em A é demonstrado o diagrama do plano representativo dos sítios analisados na contagem de células c-Fos do NAcc (Modificado de Paxinos & Watson, 1997). Em B estão demonstradas as fotomicrografias representativas de seções coronais (30 micrômetros) da porção shell do Nacc. As setas indicam células positivas para c-Fos. Aumento = 10x.

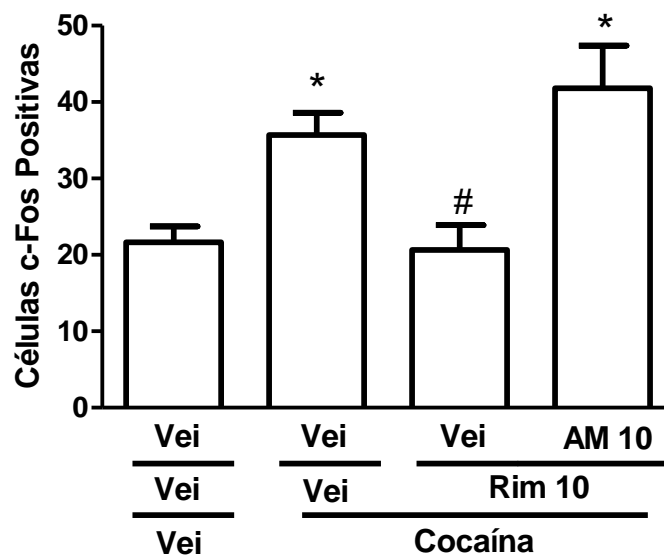


Figura 8: Bloqueio dos receptores CB₂, induzido pelo AM630 (10mg/Kg), reverte o efeito do rimonabanto (10mg/Kg) sobre a modulação do aumento da expressão de c-Fos promovido pela cocaína (20mg/Kg) na porção shell do NAcc. As barras representam a média ± E.P.M. (*p<0,05, comparado com o grupo veículo-veículo; #p<0,05, comparado com o grupo veículo-cocaína; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; n=7-11/grupo).

4.6. Manipulação farmacológica dos receptores canabinoides não altera o número de células c-Fos positivas no NAcc

O tratamento tanto com o Rimonabanto (10mg/kg) quanto com AM630 (10mg/kg), nas doses envolvidas na modulação das resposta locomotora induzida pela cocaína, não altera o número de células c-Fos positivas nas porções core ($F_{(2,15)}=1.21$, $p=0.33$, teste de Newman-Keuls $p>0.05$; Tabela 2) e shel do NAcc ($F_{(2,15)}=0.88$, $p=0.43$, teste de Newman-Keuls $p>0.05$; Tabela 2) .

Tratamento	Número de Células cFos positivas NAcc core (média ± E.P.M)	Número de Células cFos positivas NAcc shell (média ± E.P.M)
Veículo	18.4 ± 3.1	32 ± 4.7
Rimonabanto 10 mg/Kg	22.2 ± 4.2	39.5 ± 3.8
AM630 10 mg/Kg	17.1 ± 3.3	30.5 ± 5.6

Tabela 2: O bloqueio farmacológico dos receptores CB₂ (AM630 10 mg/Kg), bem como o bloqueio de CB₁ (rimonabanto 10 mg/Kg) não altera o número de células c-Fos positivas no NAcc. Os dados estão representados como média ± E.P.M. ($p>0,05$, comparado com o grupo veículo; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=6$ /grupo).

4.7. Bloqueio dos receptores CB₂ reverte o efeito inibitório do rimonabanto sobre o aumento da fosforilação da proteína ERK induzido pela cocaína no estriado

O tratamento com cocaína (20mg/Kg) induziu aumento da fosforilação das proteínas ERK e AKT no estriado. Esse efeito foi inibido pelo tratamento prévio com o rimonabanto (10mg/Kg). A ação do rimonabanto sobre a fosforilação da proteína ERK foi revertida pelo tratamento prévio com AM630(10mg/Kg) ($F_{(3,12)}=21,3$, $p<0.001$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 9A). Todavia, com relação a AKT, o efeito do rimonabanto não foi revertido pelo bloqueio dos receptores CB₂ ($F_{(3,23)}=8,11$, $p=0,001$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 9B) .

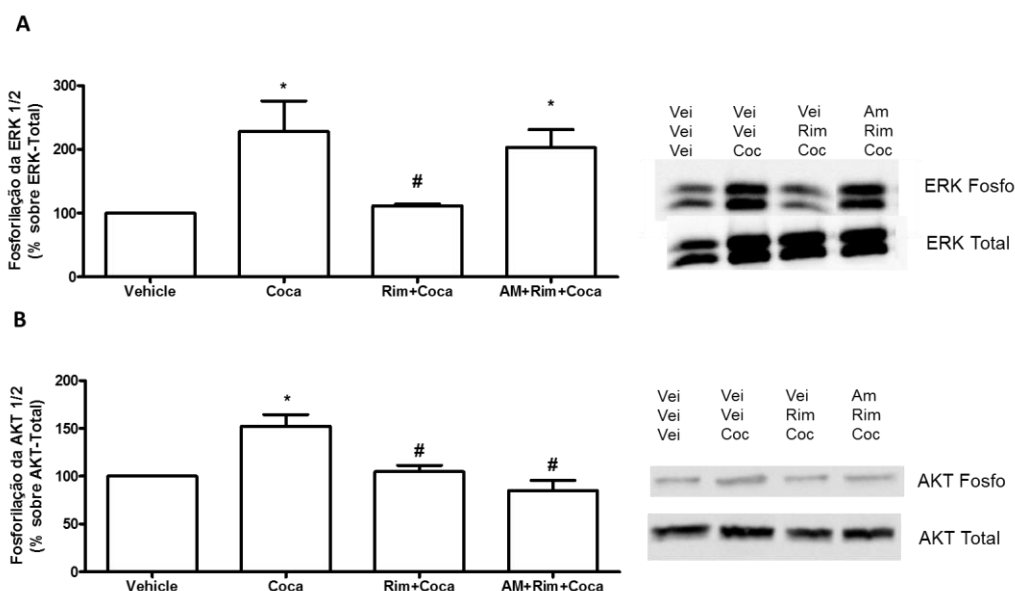


Figura 9: Injeção de rimonabanto (10mg/Kg) inibe o aumento da proporção da fosforilação das proteínas ERK e AKT induzido pela cocaína (20mg/Kg) no estriado. Esse efeito foi revertido pelo pré-tratamento com o AM-630 (10 mg/Kg) apenas na fosforilação da ERK. As barras representam a média \pm E.P.M. (* $p<0,05$, comparado com vei-vei-vei; # $p<0,05$, comparado com vei-vei-cocaína; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=4-6$ /grupo).

4.8. Bloqueio dos receptores canabinoides não altera os níveis de fosforilação basais das proteínas ERK e AKT no estriado

O tratamento com rimonabanto e com AM630 nas mesmas doses envolvidas na modulação das respostas induzidas pela cocaína não promovem, por si só, alteração dos níveis de fosforilação das proteínas AKT ($F_{(2,10)}=3,52$, $p=0.065$, teste de Newman-Keuls $p>0.05$; Figura 10A) e ERK ($F_{(2,10)}=0,60$, $p=0,53$ teste de Newman-Keuls $p>0.05$; Figura 10B) no estriado .

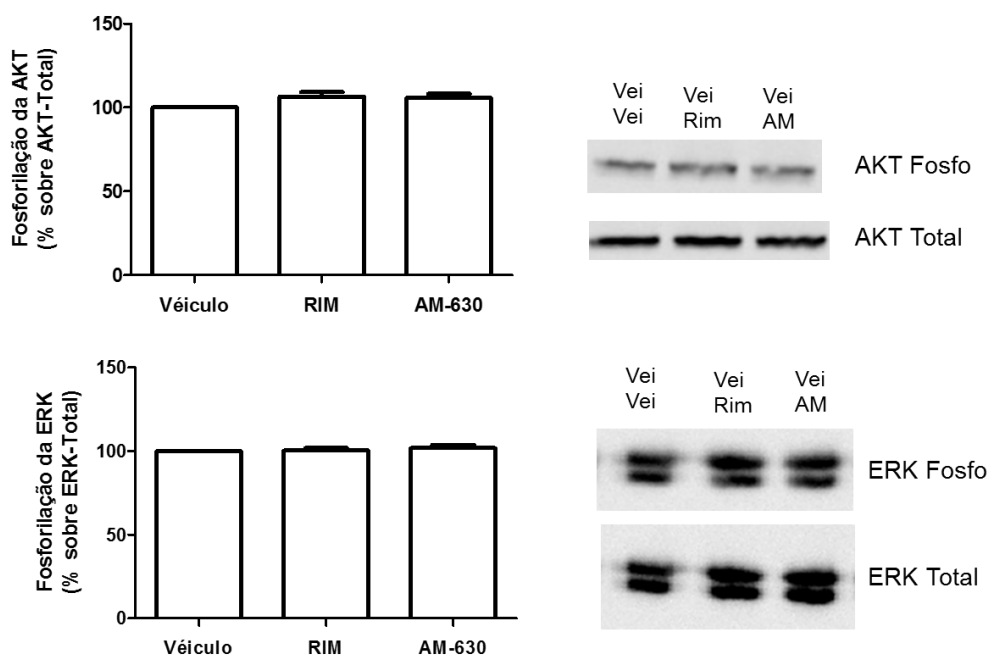


Figura 10: O antagonismo dos receptores CB₂ (AM630 10 mg/Kg), bem como o bloqueio de CB₁ (rimonabanto 10 mg/Kg) não altera a fosforilação basal das proteínas ERK e AKT no estriado. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ($p>0,05$, comparado com o grupo veículo; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=6-8$ /grupo).

4.9. O tratamento combinado de uma dose inefetiva do rimonabanto associado a uma dose também inefetiva do JWH inibe a hiperlocomoção induzida pela cocaína

Em acordo com a hipótese de interação entre o bloqueio de CB₁ e a ativação de CB₂, o tratamento com uma subdose do rimonabanto (3 mg/Kg), associado a uma dose inefetiva do agonista CB₂, JWH (10 mg/Kg), atenuou o aumento da atividade locomotora promovido pela cocaína ($F_{(4,34)}=5,28$, $p=0.024$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 11).

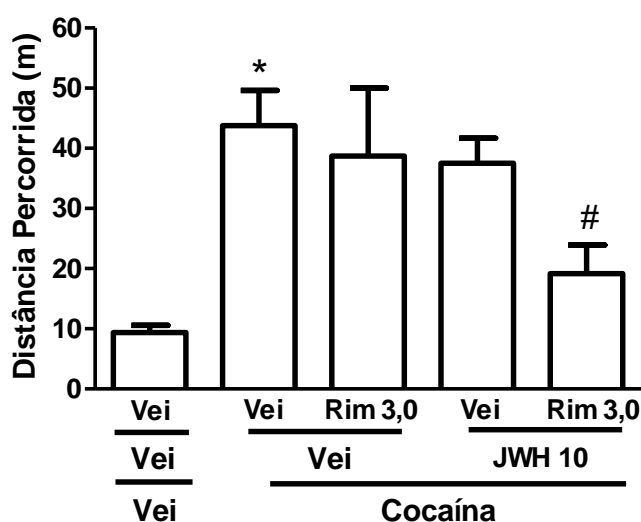


Figura 11: Tratamento combinado de uma dose inefetiva do rimonabanto (3,0 mg/Kg) com uma dose inefetiva do JWH (10 mg/Kg) atenua a hiperlocomoção induzida pela cocaína. As barras representam a média \pm E.P.M. (* $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-veículo; # $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-cocaína; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=7-9$ /grupo).

4.10. Efeito do inibidor da hidrólise da anandamida sobre a hiperlocomoção induzida pela cocaína

O inibidor da hidrólise da anandamida, URB-597, não foi capaz de inibir o aumento da atividade locomotora induzida pela cocaína ($F_{(4,33)}=8,28$, $p=0.0014$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 12).

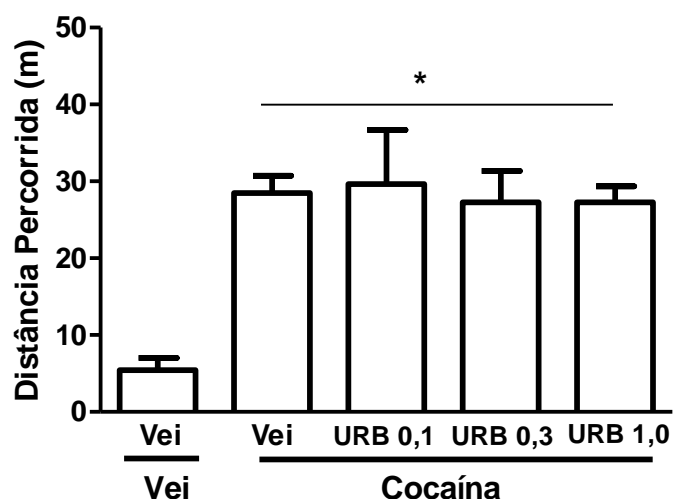


Figura 12: Inibição da hidrólise da anandamida, promovida pelo URB-597(0,1, 0,3 e 1,0 mg/Kg), não altera a hiperlocomoção induzida pela cocaína (20mg/kg). As barras representam a média \pm E.P.M. (* $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-veículo; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=6-7$ /grupo).

4.11. Efeito do inibidor da hidrólise do 2-AG sobre a hiperlocomoção induzida pela cocaína

A administração do inibidor da hidrólise do 2-AG, JZL-184 (1, 3 e 10 mg/Kg), não atenuou o aumento da atividade locomotora induzido pela cocaína (20mg/Kg) ($F_{(4,28)}=3,35$ $p=0.023$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 13).

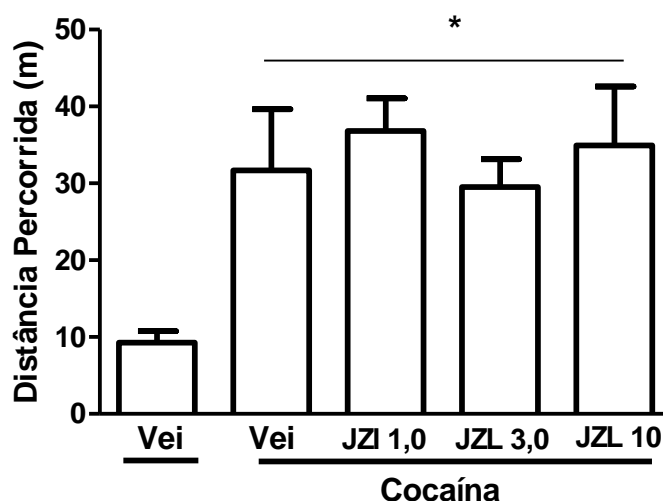


Figura 13: Inibição da hidrólise do 2-AG, promovida pelo JZL-184(1.0, 3.0 e 10 mg/Kg) não altera a hiperlocomoção induzida pela cocaína. As barras representam a média \pm E.P.M. (* $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-veículo; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=6-7$ /grupo).

4.12. O tratamento combinado de doses inefetivas do rimonabanto e do URB-597 não altera a hiperlocomoção induzida pela cocaína

O tratamento combinado de uma injeção da maior dose do URB-597 (1,0mg/Kg), associada com uma dose inefetiva do rimonabanto (3 mg/Kg), não promoveu alteração da hiperlocomoção induzida pela cocaína ($F_{(4,28)}= 4,15$, $p=0.010$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 14).

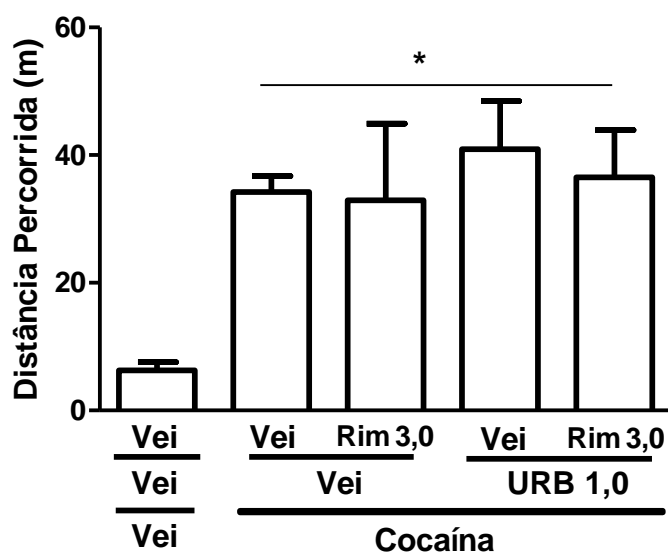


Figura 14: Tratamento combinado de doses inefetivas do rimonabanto (3,0 mg/Kg) e do URB-597 (1.0 mg/Kg) não atenua a hiperlocomoção induzida pela cocaína. As barras representam a média \pm E.P.M. (* $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-veículo; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=7-8$ /grupo).

4.13. O tratamento combinado de doses inefetivas do rimonabanto e do JZL-184 inibe a hiperlocomoção induzida pela cocaína

De modo distinto ao observado com URB 597, o tratamento combinado de uma injeção da maior dose do JZL-184 (10mg/Kg), associada com uma subdose do rimonabanto (3 mg/Kg), atenuou o aumento da atividade locomotora induzido pela cocaína ($F_{(4,28)}= 5,75$, $p=0.0011$, teste de Newman-Keuls $p<0.05$; Figura 15).

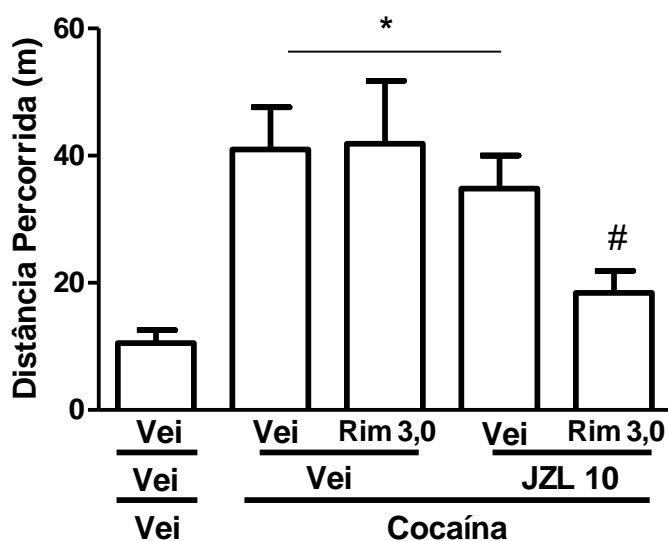


Figura 15: Tratamento combinado de doses inefetivas do rimonabanto (3,0 mg/Kg) e do JZL-184(10 mg/Kg) atenua a hiperlocomoção induzida pela cocaína. As barras representam a média \pm E.P.M. (* $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-veículo; # $p<0,05$, comparado com o grupo veículo-cocaína; ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls; $n=7-8$ /grupo).

4.14. Efeito do tratamento com cocaína sobre os níveis de 2-AG em distintas áreas do sistema mesolímbico

A administração de cocaína, (20 mg/Kg) não alterou os níveis do endocanabinoide 2-AG. As regiões encefálicas analisadas foram: o estriado ($F_{(1,7)} = 1,04$; teste t de Student $p=0,27$; Figura 16A), o córtex pré-frontal ($F_{(1,7)} = 1,49$; teste t de Student $p=0,33$; Figura 16B) e o hipocampo ($F_{(1,7)} = 16,8$; teste t de Student $p=0,50$; Figura 16C).

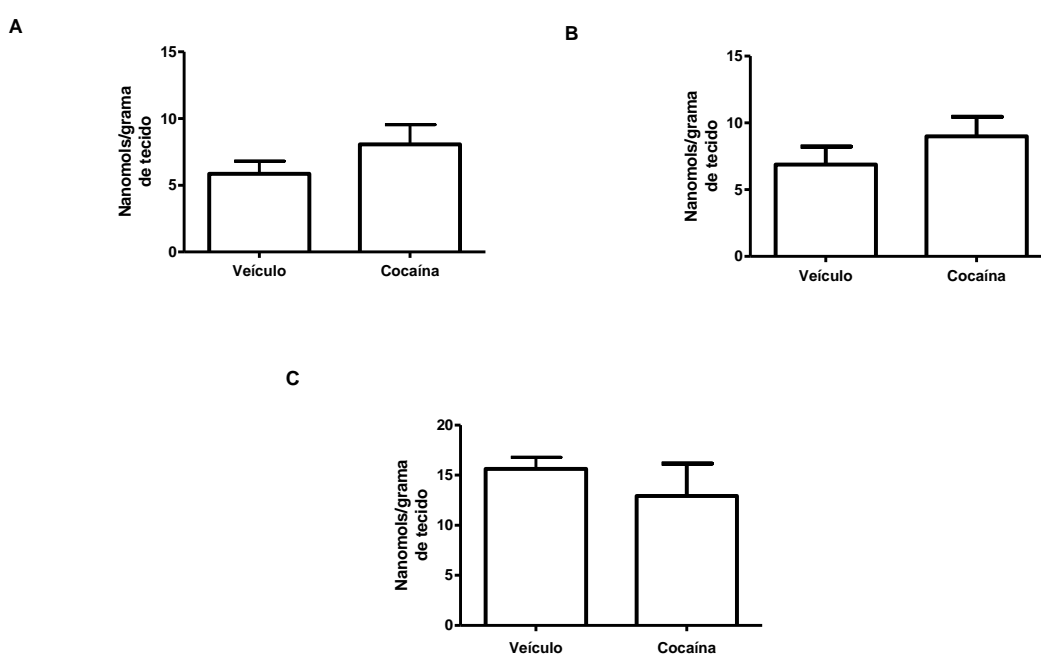


Figura 16: Tratamento com cocaína (20 mg/Kg) não altera os níveis do 2-AG nos sítios neuroanatômicos analisados: estriado, córtex pré-frontal e hipocampo (respectivamente A, B e C). As barras representam a média \pm E.P.M. ($p > 0,05$, comparado com o grupo veículo; Teste t de Student; $n = 4-5$ /grupo).

4.15. Efeito do tratamento com cocaína sobre os níveis de anandamida em distintas áreas do sistema mesolímbico

A administração de cocaína, (20 mg/Kg) não alterou os níveis do endocanabinoide anandamida. As regiões encefálicas analisadas foram: o estriado ($F_{(1,7)} = 2,96$; teste t de Student $p = 0,11$; Figura 17A), o córtex pré-frontal ($F_{(1,7)} = 1,47$; teste t de Student $p = 0,53$; Figura 17B) e o hipocampo ($F_{(1,7)} = 9,46$; teste t de Student $p = 0,68$; Figura 17C).

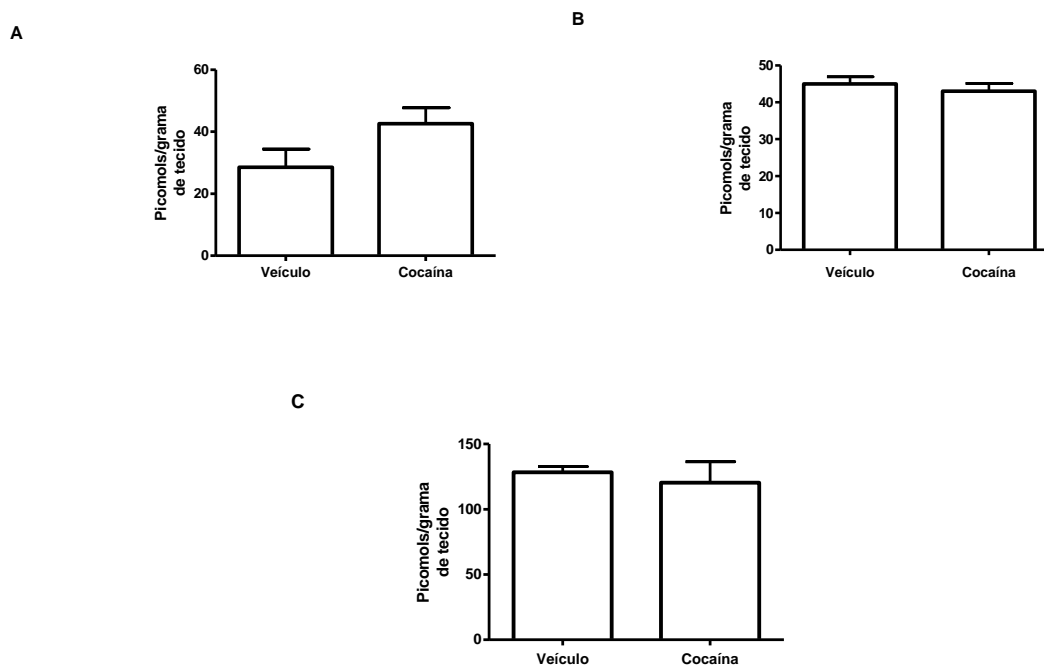


Figura 17: Tratamento com cocaína (20 mg/Kg) não altera os níveis de anandamida nos sítios neuroanatômicos analisados: estriado, córtex pré-frontal e hipocampo (respectivamente A, B e C). As barras representam a média \pm E.P.M. ($p > 0,05$, comparado com o grupo veículo; Teste t de Student; $n = 4-5$ /grupo).

4.16. Bloqueio dos receptores CB₂ reverte o efeito inibitório do rimonabanto sobre a modulação do condicionamento ao lugar induzido pela cocaína

O tratamento com rimonabanto (10 mg/Kg) inibiu a aquisição do condicionamento ao lugar induzida pela cocaína. A ANOVA de duas vias demonstrou que bloqueio dos receptores CB₂, pelo AM-630(10 mg/Kg), realizado previamente à injeção do Rimonabanto, reverteu essa resposta (Fator interação: $F_{(2,42)}=4,67$ $p=0,02$; teste de Bonferroni $p<0.05$; Figura 18A). Esse efeito não foi secundário a uma possível resposta de aversão ao lugar induzida pelo bloqueio dos subtipos de receptores canabinoides, visto que não houve diferença na comparação entre os animais tratados com esses antagonistas e os animais que receberão somente o veículo (Fator interação: $F_{(2,42)}=0,10$ $p=0,9$; teste de Bonferroni $p>0.05$; Figura 18B).

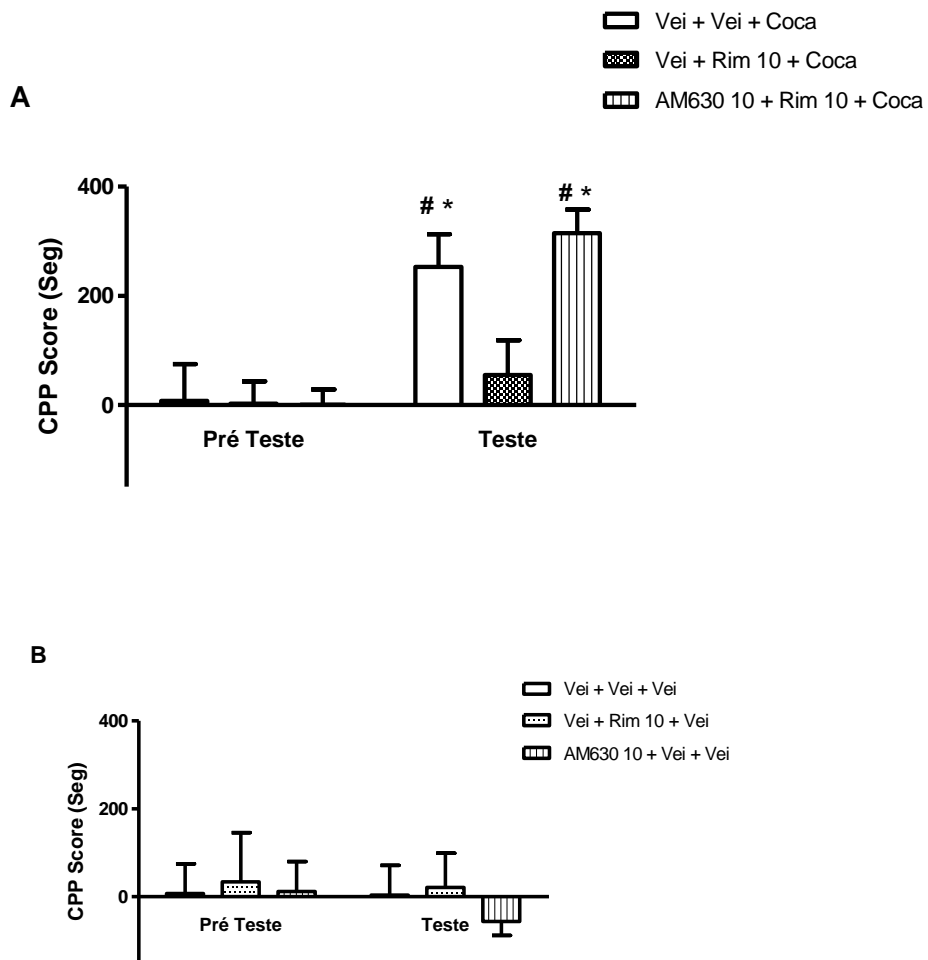


Figura 18: O gráfico A demonstra que o pré-tratamento com o AM630 (10 mg/Kg) reverte a inibição do condicionamento ao lugar induzido pelo rimonabanto(10 mg/Kg). Em B observa-se que o bloqueio de CB₁ e CB₂, por si só, não induz preferência nem aversão. As barras representam a média ± E.P.M. (#p<0,05, comparado com o pré-teste dentro do mesmo grupo experimental; * p<0,05, comparado com o grupo veículo-Rim-Coca no momento teste; ANOVA de duas vias seguido por teste de Bonferroni; n=7-9/grupo).

4.17. Efeito da administração de rimonabanto sobre o prejuízo induzido pela cocaína no teste de PPI

O tratamento agudo com a maior dose de cocaína (40mg/Kg) promoveu diminuição significativa na porcentagem de PPI em todas as intensidades de pré-pulso analisadas (Figura 19A). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito geral significativo da intensidade do pré-pulso ($F_{(2,23)}=12.47$; $p<0,001$), do tratamento ($F_{(2,23)}=6,35$; $p=0,0064$), não houve efeito da interação ($F_{(2,23)}=0,68$; $p=0,60$).

Interessantemente o tratamento prévio com rimonabanto (10 mg/kg) não inibiu o efeito da cocaína no teste de PPI na intensidade de pré-pulso de 80 dB, e apesar de uma clara tendência, não houve diferença estatisticamente significativa nas intensidades de 85 e 90 dB (Figura 19B). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito geral significativo da intensidade do pré-pulso ($F_{(2,26)}=3,36$; $p=0,042$), e do tratamento ($F_{(2,26)}=10,76$; $p=0,0004$) não ocorreu efeito da interação ($F_{(2,26)}=0,84$; $p=0,51$).

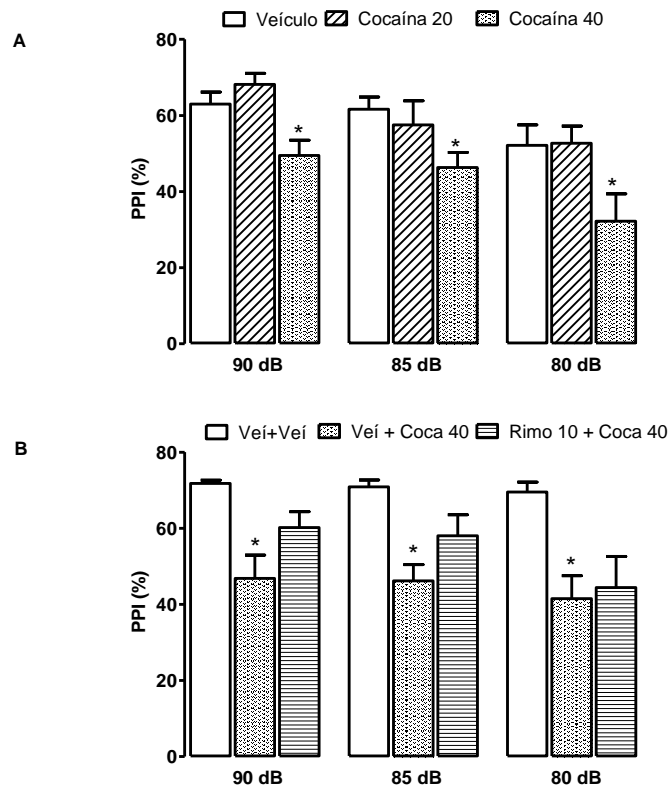


Figura 19: A figura 19 A representa a curva concentração efeito da cocaína (20 e 40 mg/Kg) no teste do PPI. A maior dose da droga promoveu déficit no teste de PPI (* $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo; ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan; $n = 8-10$ /grupo). Em B observa-se que o pré tratamento com Rimonabanto (10 mg/Kg) não atenuou o prejuízo no PPI induzido pela cocaína (* $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo + veículo; ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan; $n = 8-10$ /grupo). As barras representam a média \pm E.P.M. .

5. DISCUSSÃO

No presente estudo investigou-se a participação do sistema endocanabinoide na modulação de respostas induzidas pela cocaína. Nossos resultados evidenciaram a existência de uma interação entre os receptores canabinoides na regulação das respostas promovidas por esse psicoestimulante. Os dados obtidos sustentam a hipótese de que o bloqueio de CB₁ favorece uma maior ativação dos receptores CB₂ pelo endocanabinoide 2-AG, resultando na atenuação de diversos efeitos induzidos pela cocaína. Assim, nós propomos aqui um possível mecanismo através do qual o sistema endocanabinoide modula as respostas induzidas pela droga.

5.1. Envolvimento dos receptores canabinoides na modulação dos efeitos motores induzidos pela cocaína

Em um primeiro momento nós avaliamos os efeitos individuais do antagonismo do receptor CB₁ e da ativação de CB₂ sobre o aumento da atividade locomotora promovido pela cocaína. Esse é um parâmetro relevante que é proposto como um modelo da euforia inicial induzida por essa droga, a qual pode conduzir ao uso excessivo e ou compulsivo dessa substância (Swerdlow, Vaccarino et al. 1986). Tanto o tratamento com agonista CB₂ quanto com o antagonista CB₁ atenuaram a hiperlocomoção induzida pela injeção de cocaína, corroborando dados prévios (Poncelet, Barnouin et al. 1999, Li, Hoffman et al. 2009, Xi, Peng et al. 2011).

Uma aparente relação paradoxal pode ser sugerida quando respostas semelhantes são observadas pelo antagonismo e ativação dos dois subtipos de receptores canabinoides. Esse panorama se mostra ainda mais complexo considerando-se o fato de que CB₁ e CB₂ compartilham o mesmo mecanismo de transdução de sinal (Howlett e Mukhopadhyay 2000). De fato, a ativação

desses receptores resulta na ativação de proteína Gi e subsequente inibição da adenilato ciclase, com diminuição da formação monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), redução da atividade da proteína quinase A (PKA) e dos efeitos por ela mediados (Howlett e Fleming 1984, Pertwee 2005). O tratamento com agonistas CB₁ e CB₂ pode, ainda, aumentar a condutância de canais de potássio e inibir canais de cálcio (Pertwee 2005). Nesse contexto os dois subtipos de receptores compartilham a propriedade de regular a liberação de outros neurotransmissores, promovendo a modulação da atividade neural (Di Marzo, Melck et al. 1998, Wilson e Nicoll 2002).

Embora possa parecer contraditório, o antagonismo de receptores CB₁ e a ativação de CB₂ induzem respostas semelhantes também sobre a regulação de respostas induzidas pelo álcool e nicotina (Thanos, Dimitrakakis et al. 2005, Al Mansouri, Ojha et al. 2014). Analogamente, os mesmos tratamentos inibiram déficits da resposta de sobressalto no modelo do PPI induzidos pelos agentes psicotomiméticos MK-801 e pela apomorfina, respectivamente (Malone, Long et al. 2004, Khella, Short et al. 2014).

Os subtipos de receptores canabinoides exercem, ainda, funções distintas sobre a regulação da ingesta alimentar. Enquanto o bloqueio de CB₁ promove diminuição do consumo de alimentos, o tratamento com antagonistas CB₂ induz o aumento na ingestão (Wiley, Burston et al. 2005, Ting, Chi et al. 2015). No mesmo sentido, utilizando um agonista com similar afinidade para CB₁ e CB₂ e animais nocautes seletivos para cada um desses receptores foi demonstrado que os efeitos de hipotermia e tolerância são observados somente nos animais selvagens e nos nocautes para CB₂, sugerindo ser um efeito mediado especificamente por CB₁ (Deng, Cornett et al. 2015). Esses

dados demonstram que, apesar de compartilharem os mesmos ligantes endógenos e os mesmos mecanismos de transdução de sinal, o padrão de respostas mediado por receptores CB₁ e CB₂ pode divergir.

No que se refere aos efeitos da cocaína, uma possível explicação para essa distinção consiste no padrão diferenciado da expressão desses receptores. Enquanto os primeiros são reconhecidamente expressos em neurônios, os últimos foram descritos primariamente como sendo expressos majoritariamente nas células da glia (Herkenham, Lynn et al. 1991, Atwood e Mackie 2010). Micróglia e astrócitos são os principais representantes dessa classe de células, as quais através da modulação da liberação de citocinas e neurotransmissores regulam distintos processos neuronais, inclusive repostas relacionadas a drogas de abuso (Volterra e Meldolesi 2005, Haydon e Carmignoto 2006, Miguel-Hidalgo 2009).

O tratamento com cocaína, por exemplo, induz a ativação das células da glia, e essa estimulação parece ser importante para os processos que acarretam as alterações locomotoras induzidas por essa droga (Fattore, Puddu et al. 2002, Chen, Uz et al. 2009, Cooper, Jones et al. 2012). Nesse contexto, é possível especular que a ativação de receptores CB₂ expressos nas células gliais, presentes na via mesolímbica, podem regular as ações dessas células e modular os níveis dopaminérgicos e conseqüentemente as ações da cocaína (Russo, Wilkinson et al. 2009, Kenny 2011, Rodrigues, Gobira et al. 2014).

Conforme já mencionado, os receptores CB₂, assim como CB₁, também estão presentes em neurônios. Nesse contexto, uma explicação para a ativação de CB₂ promover a mesma resposta do bloqueio CB₁, seria o fato de esses receptores serem expressos em distintas subpopulações neuronais.

Com efeito, evidências demonstram que receptores CB₂ estão presentes principalmente em subpopulações de neurônios dopaminérgicos da ATV (Brusco, Tagliaferro et al. 2008, Xi, Peng et al. 2011). Funcionalmente o disparo desses neurônios é inibido pelo tratamento com agonistas seletivos CB₂, o que culmina com diminuição dos níveis de dopamina no NAcc e atenuação dos efeitos da cocaína (Zhang, Gao et al. 2014, Zhang, Gao et al. 2016).

Diferentemente de CB₂, os receptores CB₁ não são expressos em neurônios dopaminérgicos da ATV, sendo encontrados principalmente em interneurônios, os quais podem regular indiretamente o disparo dos primeiros (Riegel e Lupica 2004, Lupica e Riegel 2005). Curiosamente, a ativação de receptores CB₁ favorece o disparo de neurônios do VTA aumentando os níveis de dopamina nas áreas límbicas (Lupica e Riegel 2005, Fitzgerald, Shobin et al. 2012). Em virtude desse efeito, o tratamento com agonistas CB₁, ao contrário do observado com agonistas CB₂, facilita as ações da cocaína (Cheer, Wassum et al. 2007). Por outro lado, o bloqueio de CB₂ diminui a elevação dos níveis de dopamina no Nacc em resposta à cocaína (Li, Hoffman et al. 2009).

Esses achados dão suporte à hipótese de que ativação de CB₂, e o bloqueio de CB₁ atenuam as ações da cocaína, através de alterações semelhantes da neurotransmissão mesolímbica. Diante disso e do fato de que drogas de abuso modulam os níveis de endocanabinoides na VTA (Lupica e Riegel 2005, Maldonado, Valverde et al. 2006), uma hipótese complementar à distinta expressão dos subtipos de receptores canabinoides foi levantada no presente trabalho. Nós sugerimos a existência de uma interação entre esses receptores na regulação das respostas medidas pela cocaína. Possivelmente o

bloqueio de CB₁ deslocaria as ações dos endocanabinoides para CB₂, sendo o aumento na ativação desses receptores a etapa responsável por modular os efeitos da droga.

De modo a testar essa hipótese, previamente à injeção da dose do rimonabanto que atenuou o aumento da locomoção induzido pela cocaína os animais receberam um antagonista CB₂. Nossos resultados evidenciaram que o bloqueio prévio desses receptores inibe a resposta ao rimonabanto, sugerindo que o bloqueio de CB₁ facilita a ativação de CB₂ e atenua ação da cocaína. Sustentando a hipótese de interação entre os receptores canabinoides, nós demonstramos, ainda, que o tratamento combinado com doses inefetivas do antagonista CB₁ e do agonista CB₂ também previne a hiperlocomoção promovida pela cocaína.

Apesar de esse ser o primeiro estudo que evidencia a existência de uma interação entre o bloqueio dos receptores CB₁ e a ativação dos receptores CB₂, outros trabalhos observaram padrões similares de respostas envolvendo outros sistemas de neurotransmissão, como o serotoninérgico e o purinérgico (Cunha 2005, Pockros, Pentkowski et al. 2012).

5.2. Envolvimento dos receptores canabinoides na modulação das alterações moleculares induzidas pela cocaína

Na etapa subsequente do trabalho, nós testamos se a hipótese da existência de interação entre os subtipos de receptores canabinoides se estenderia às respostas neuroquímicas induzidas pela cocaína.

Conforme mencionado anteriormente a ativação de receptores dopaminérgicos, facilitada pelo o aumento das concentrações de dopamina induzido pela cocaína, pode ativar a via de sinalização da ERK (Lu, Koya et al.

2006). A ativação dessa via exerce um papel crítico nos processos moleculares que culminam com as repostas comportamentais induzidas pela cocaína (Valjent, Corvol et al. 2000, Zhai, Li et al. 2008).

Estudos prévios demonstraram que receptores CB₁ podem regular essas sinalizações recrutadas por psicoestimulantes no estriado (Corbille, Valjent et al. 2007). Corroborando esses achados, nós demonstramos que o aumento da fosforilação da proteína ERK, em resposta a injeção de cocaína, foi revertido pelo tratamento com rimonabanto. Índices mais baixos de fosforilação da ERK em resposta a esse psicoestimulante, também são observados em animais que não expressam CB₁ (Corbille, Valjent et al. 2007). Possivelmente após o silenciamento desses receptores, os endocanabinoides podem promover uma ativação mais pronunciada dos receptores CB₂ inibindo a cascata de sinalização da ERK que seria ativada pela cocaína. Nós mostramos que essa hipótese é verdadeira, uma vez que ao bloquearmos previamente os receptores CB₂ a inibição da fosforilação induzida pelo rimonabanto foi revertida.

Além de repostas comportamentais, a ativação da via de sinalização da ERK em resposta a cocaína, também controla a indução de genes de expressão imediata, como a proteína c-Fos (Valjent, Corvol et al. 2000, Lu, Koya et al. 2006). No presente estudo nós reproduzimos dados prévios que apontam que a injeção da droga aumenta a expressão desse marcador de atividade neuronal nas porções shell e core do NAcc (Graybiel, Moratalla et al. 1990, Cathala, Devroye et al. 2014). Nós demonstramos, ainda, que o tratamento com rimonabanto atenua esse efeito. Corroborando esse dado, o bloqueio de CB₁ também inibe o aumento de c-Fos em resposta a injeção de

morfina (Singh, Verty et al. 2004). Em consonância com as respostas comportamentais obtidas previamente, e com a hipótese testada, o bloqueio dos receptores CB₂ reverteu o efeito inibitório do rimonabanto sobre o aumento da expressão de c-Fos induzido pela cocaína.

O NAcc é uma sítio anatômico importante na regulação das repostas psicomotoras e reforçadoras promovidas por essa droga (Wise 2004). Nossos resultados sugerem que a interação entre o bloqueio dos receptores CB₁ e a ativação dos receptores CB₂ modula a atividade neuronal nessa região. Conforme já citado, receptores canabinoides regulam os disparos de neurônios da ATV, os quais, através de projeções para o NAcc podem modular a atividade neuronal dessa região (Xi, Peng et al. 2011, Zhang, Gao et al. 2014). Ao inibir o disparo de neurônios do VTA a ativação de CB₂ atenua a elevação dos níveis da dopamina no NAcc induzida pela cocaína, conforme evidenciado por técnicas de microdiálise (Xi, Peng et al. 2011, Zhang, Gao et al. 2014). Um efeito semelhante foi observado tanto com o silenciamento genético quanto pelo bloqueio farmacológico de CB₁ (Li, Hoffman et al. 2009).

Esses achados em conjunto, reforçam o papel funcional de interação dos subtipos de receptores canabinoides na modulação das respostas à cocaína na via mesolímbica. Nesse contexto, a diminuição da expressão de c-Fos pode estar relacionada com uma diminuição da ativação da cascata de sinalização da ERK, secundária a uma redução da neurotransmissão dopaminérgica no NAcc (Cagniard, Sotnikova et al. 2014). Possivelmente, o bloqueio dos receptores CB₁ favorece a ativação dos receptores CB₂ levando a uma queda na liberação de dopamina, e conseqüente diminuição da expressão

da proteína c-Fos. Entretanto, mais investigações devem ser conduzidas nesse sentido.

Os processos de sinalização da proteína AKT também parecem participar das respostas comportamentais e celulares induzidas pela cocaína (Brami-Cherrier, Valjent et al. 2002, Beaulieu, Espinoza et al. 2015). Entretanto, ainda não existe um consenso da forma como essa resposta se processa após o tratamento com essa droga. Enquanto alguns estudos sugerem um aumento na fosforilação dessa proteína, outros demonstram que pode haver uma redução da fosforilação da AKT em resposta ao tratamento com esse psicoestimulante (Brami-Cherrier, Valjent et al. 2002, Miller, Barr et al. 2014). Em acordo com a primeira possibilidade, nós observamos que o tratamento com a cocaína aumenta os níveis de fosforilação da AKT no estriado. Fatores como o regime de tratamento, ou o tempo após a injeção da droga utilizado para avaliação da fosforilação podem ajudar a explicar essas divergências entre os estudos (Collo, Bono et al. 2012, Miller, Barr et al. 2014, Zhang, Zhu et al. 2015). Ademais, respostas contrastantes também são observadas quando se avalia o perfil de fosforilação em sítios anatômicos distintos (Perrine, Miller et al. 2008). Por exemplo, o tratamento com cocaína reduziu a fosforilação da AKT no NAcc, mas induziu um aumento deste processo na amígdala (Perrine, Miller et al. 2008).

Em consonância com a complexidade das respostas relacionadas a fosforilação da AKT e cocaína, nós demonstramos que o tratamento com o rimonabanto inibiu o aumento da fosforilação, mas o bloqueio de CB₂ não reverteu esse efeito. Tal dado indica que, apesar de o aumento da fosforilação da AKT, gerado pela cocaína, ser regulado pelo rimonabanto, esse processo

parece não envolver a participação de receptores CB₂. Entretanto, considerando que os estudos envolvendo a participação da AKT na mediação das repostas induzidas pela cocaína ainda são recentes e tem se mostrado controversos, essa possibilidade não pode ser descartada.

5.3. Endocanabinoides envolvidos na modulação da resposta motora induzida pela cocaína

Após sustentar a hipótese de que uma interação entre o bloqueio CB₁ e ativação de CB₂ regula as repostas comportamentais e neuroquímicas induzidas pela cocaína, a próxima etapa do presente estudo consistiu na investigação de qual endocannabinoide estaria envolvido nesse processo. Para responder essa pergunta nós optamos por utilizar o comportamento de elevação da atividade motora induzida pela cocaína. Assim, previamente à injeção da droga, os animais foram tratados com inibidores da FAAH e MGL, enzimas responsáveis pela hidrólise dos endocanabinoides. Observou-se que a elevação seletiva dos níveis de anandamida ou de 2-AG não altera a hiperlocomoção. Resultados semelhantes já foram observados frente ao aumento da atividade motora ou sensibilização (Luque-Rojas, Galeano et al. 2013).

Apesar da proposta de que ambos subtipos de receptores canabinoides sejam expressos no sistema nervoso central, seus níveis de expressão podem diferir sendo a expressão de CB₁ cerca de 100 vezes maior (Yang, Wang et al. 2012). Essa diferença pode ser um dos motivos pelos quais o aumento dos níveis de endocanabinoides, por si só, não alterou a ação da cocaína. Diante da maior disponibilidade dos receptores CB₁, a interação dos endocanabinoides com os receptores CB₂ pode ser insuficiente para atenuar a

hiperatividade induzida pelo psicoestimulante. De fato, camundongos geneticamente modificados que expressam níveis mais altos de CB₂, respondem menos ao tratamento com cocaína, sugerindo que uma maior ativação endógena de CB₂ é capaz de atenuar as respostas a essa droga (Aracil-Fernandez, Trigo et al. 2012).

Utilizando uma abordagem farmacológica, nós observamos resultados similares. De modo a favorecer o aumento da ativação de CB₂ por endocanabinoides, os animais receberam previamente ao tratamento com os inibidores de hidrólise a injeção de uma dose ineficaz do rimonabanto. Nesse contexto, nós encontramos que o tratamento combinado do inibidor da MGL associado a uma subdose do rimonabanto atenuou a hiperlocomoção. Esse dado sugere que o bloqueio de CB₁ associado a um aumento dos níveis do 2-AG permitiu uma maior ativação de receptores CB₂, levando a uma atenuação do efeito da cocaína.

Entretanto, o tratamento combinado do inibidor da FAAH com a subdose do rimonabanto não atenuou o aumento da atividade motora induzido pela cocaína, indicando que a anandamida não participa da modulação dessa resposta. Diferenças em aspectos bioquímicos correlacionados a anandamida e ao 2-AG podem explicar esses achados. Existe por exemplo, uma distinção entre a afinidade entre os endocanabinoides e os receptores CB₁ e CB₂. Enquanto a anandamida apresenta alta afinidade para o primeiro e baixa nos receptores CB₂, o 2-AG apresenta atividade moderada como agonista CB₁ e apresenta alta afinidade para CB₂ (Ligresti, Petrosino et al. 2009). No mesmo sentido, foi observado através da avaliação da inibição do AMP cíclico, que o 2-AG atua como agonista pleno dos receptores CB₂ enquanto a anandamida é

um agonista parcial, sugerindo assim uma diferença no parâmetro farmacológico relacionado a eficácia intrínseca desses ligantes (Gonsiorek, Lunn et al. 2000). Utilizando abordagens metodológicas semelhantes Sugiura e colaboradores encontraram respostas análogas, esses autores, inclusive, sugerem que o 2-AG é o ligante fisiológico dos receptores CB₂ (Sugiura, Kondo et al. 2000).

É importante salientar que essa distinção nos aspectos bioquímicos e farmacológicos, de fato, reflete-se na modulação das respostas comportamentais. O efeito tipo-ansiolítico induzido pelo 2-AG em camundongos, por exemplo, é desencadeado pela ativação de receptores CB₂, enquanto a diminuição de comportamentos relacionados a ansiedade induzido pela anandamida é mediado por CB₁ (Busquets-Garcia, Puighermanal et al. 2011). Esses fatores ajudam a explicar as diferenças observadas entre a inibição da FAAH e da MGL sobre o aumento da atividade locomotora induzido pela cocaína. Em conjunto, tais dados corroboram nosso achado de que o 2-AG é o endocanabinoide responsável por mediar a ativação de CB₂, após o bloqueio de CB₁.

Outro aspecto bioquímico divergente entre os endocanabinoides envolve a biossíntese desses compostos. As enzimas envolvidas na produção da anandamida e do 2-AG são distintas e não dependem uma da outra (Di Marzo 2008, Lovinger 2008). Este fato indica que os níveis dos endocanabinoide podem ser regulados de modo independente um do outro (Di Marzo 2008, Ligresti, Petrosino et al. 2009). Assim, a depender do estímulo fornecido a síntese dessas substâncias pode ser diferenciada (Ligresti, Petrosino et al. 2009).

Essa distinção é observada após abordagens farmacológicas. Tanto agonistas quanto antagonistas dopaminérgicos modulam de forma divergente os níveis cerebrais da anandamida e do 2-AG (Justinova, Panlilio et al. 2009). Com relação a cocaína, Patel e colaboradores observaram uma elevação somente dos níveis de 2-AG no sistema límbico após o tratamento agudo com esse psicoestimulante (Patel, Rademacher et al. 2003). Contrariando esse estudo, nós não observamos alterações nos níveis de endocanabinoides nessa estrutura bem como no hipocampo e no córtex pré-frontal após o tratamento com a cocaína.

Alguns fatores metodológicos podem explicar esses efeitos distintos. Conforme mencionado, a síntese de endocanabinoides acontece imediatamente após o estímulo, o que justificou, no nosso estudo, os cérebros terem sido retirados e dissecados dez minutos após a injeção de cocaína. Todavia, no trabalho de Patel e colaboradores, os animais foram sacrificados trinta minutos após o tratamento com a droga. O tempo maior após a injeção da droga para o sacrifício, nesse caso, pode ter permitido que respostas secundárias induzissem o aumento dos níveis do 2-AG (Di Marzo 2008, Muccioli 2010). O sítio neuroanatômico analisado constitui outra diferença, enquanto nós avaliamos os níveis de endocanabinoides em regiões específicas, o trabalho citado analisou o conteúdo presente em todo o prozencéfalo, o que pode ter propiciado uma análise inespecífica de estruturas que não se relacionam as respostas promovidas pela cocaína, dificultando a interpretação dos dados.

Estudos envolvendo o tratamento crônico com cocaína apresentaram respostas semelhantes às do nosso estudo. Essa abordagem também não

induziu diferenças nos níveis de anandamida e 2-AG após análise dos mesmos sítios neuroanatômicos avaliados no nosso estudo (Gonzalez, Cascio et al. 2002). Avaliação da quantidade dos endocanabinoides pelo método de microdialise no núcleo acumbente também não exibiram alterações nas concentrações dessas substâncias após o tratamento crônico com a cocaína (Caille, Alvarez-Jaimes et al. 2007). Apesar de não termos observado diferença nos níveis de endocanabinoides é importante ressaltar que existem níveis basais circulantes dos mesmos, os quais, provavelmente, são os responsáveis por interagir com CB₂ e modular a ação da cocaína, conforme sugerido em nosso estudo (Di Marzo e Petrosino 2007).

5.4. Envolvimento dos receptores canabinoides na modulação dos efeitos reforçador e sensório-motor induzidos pela cocaína

As repostas comportamentais avaliadas no presente trabalho, até então, focaram no efeito do sistema endocanabinoides sobre o aumento da atividade locomotora. Na etapa final do estudo nós investigamos se o sistema endocanabinoides regularia também as repostas de aquisição do condicionamento ao lugar e o déficit do PPI induzidos pela cocaína. Tais repostas são correlacionadas respectivamente ao perfil de abuso e pró psicótico induzido pela droga (Swerdlow, Braff et al. 2000, Sanchis-Segura e Spanagel 2006).

Além da hiperlocomoção, o aumento da transmissão dopaminérgica no NAcc pode induzir efeitos psicotomiméticos em pacientes esquizofrênicos e em indivíduos saudáveis (Kapur, Mizrahi et al. 2005). A elevação dos níveis de dopamina nessa região também se correlaciona com sintomas de déficits no PPI observados em pacientes esquizofrênicos e usuários de cocaína, bem

como nos animais tratados com essa droga (Geyer, Krebs-Thomson et al. 2001). Esse prejuízo de PPI consiste na diminuição da resposta de sobressalto a um estímulo intenso (pulso) quando este é precedido imediatamente por um estímulo mais fraco (pré-pulso) (Swerdlow, Braff et al. 1994, Geyer, Krebs-Thomson et al. 2001). Em nosso estudo, conforme esperado, o tratamento com cocaína induz, de modo dose-dependente, diminuição significativa na porcentagem de PPI.

Nós observamos, ainda, que o tratamento com o rimonabanto, na mesma concentração eficaz na atenuação da hipelocomoção, não inibiu o déficit no PPI. Este resultado contrasta com os achados de Malone e colaboradores, que observaram que o bloqueio de CB₁ inibe o prejuízo no PPI (Malone, Long et al. 2004). O referido estudo utilizou a apomorfina como indutor do prejuízo na resposta de sobressalto. Por outro lado, outro trabalho, demonstrou que o rimonabanto não reverte o déficit no PPI induzido pela d-anfetamina (Martin, Secchi et al. 2003). Apomorfina e d-anfetamina apresentam mecanismos de ação distintos, sendo o primeiro um agonista direto dos receptores de dopamina e o segundo um agonista indireto, que aumenta a liberação desse neurotransmissor (Hooks, Jones et al. 1994). Esses dois compostos, em virtude das diferenças na forma de atuação, podem induzir respostas comportamentais distintas, o que eventualmente poderia explicar os resultados distintos do bloqueio de CB₁ no teste do PPI (Motles, Martinez et al. 1989, Hooks, Jones et al. 1994)

Além disso, é importante considerar, conforme nós demonstramos na curva dose resposta, que a concentração de cocaína necessária para induzir prejuízo na resposta no teste do PPI foi muito maior que a utilizada para induzir

a hiperlocomoção. Provavelmente, o aumento dos níveis de dopamina foi muito mais pronunciado com esta dose, e o bloqueio CB₁ não foi efetivo em contrapor essa ação (Di Chiara and Imperato 1988). Nesse caso a estratégia de aumento de dose do rimonabanto não foi considerada, uma vez que doses mais altas desse composto podem induzir comportamentos estereotipados e interferir na resposta comportamental avaliada (Ferrer, Gorriti et al. 2007, Gamble-George, Conger et al. 2013).

Por fim, utilizando o paradigma do condicionamento ao lugar, nós avaliamos se a nossa hipótese de interação entre o bloqueio dos receptores CB₁ e a ativação de CB₂ também se estenderia a parâmetros correlacionados às reações de recompensa. Em acordo com outros estudos, o tratamento com rimonabanto inibiu a aquisição do condicionamento ao lugar promovido pela cocaína (Yu, Zhou et al. 2011). Interessantemente, nós mostramos que essa resposta, assim como observado em outros parâmetros, é dependente da ativação de CB₂, visto que o bloqueio prévio desses receptores reverteu o efeito induzido pelo rimonabanto.

Corroborando nossos achados, tanto o bloqueio farmacológico de receptores CB₁, como o tratamento com agonistas CB₂ também atenua o efeito da cocaína em repostas analisadas no paradigma da autoadministração, o qual também está correlacionado a uma resposta de condicionamento obtida em detrimento dos efeitos de recompensa da droga (Soria, Mendizabal et al. 2005, Orio, Edwards et al. 2009, Zhang, Gao et al. 2014). Ainda em concordância com nossa hipótese camundongos que não expressam os receptores CB₁ apresentam taxas menores de autoadministração a cocaína (Xi, Peng et al. 2011). Esse trabalho sugere que, possivelmente, o antagonismo de receptores

CB₁ favorece uma maior ativação dos receptores CB₂ pelos endocanabinoides, culminando com a redução no consumo da cocaína. De fato, animais que superexpressam CB₂, além de apresentarem níveis menos pronunciados de autoadministração a esse psicoestimulante, também são menos responsivos ao teste do condicionamento ao lugar (Aracil-Fernandez, Trigo et al. 2012). Assim em concordância com outros achados, nossos dados fornecem evidências de que uma interação entre os receptores canabinoides pode regular o potencial reforçador da cocaína.

5.5. Conclusão

O presente trabalho é o primeiro a demonstrar que o bloqueio dos receptores CB₁ e ativação de CB₂ interagem para prevenir as respostas comportamentais e neuroquímicas induzidas pela cocaína. Foi demonstrado, também, que o 2-AG pode ser o endocanabinoide responsável por mediar esse processo. Tais dados dão suporte à hipótese de que o bloqueio dos receptores CB₁ redireciona a ação do 2-AG para o receptor CB₂, cuja ativação atenua os efeitos da cocaína (Figura 20). Esse é um possível mecanismo através do qual o sistema endocanabinoide modula os efeitos deste psicoestimulante. É importante salientar que uma limitação do estudo é o fato de terem sido avaliadas somente as respostas induzidas por injeções agudas da cocaína. Assim, em um primeiro momento, não se pode extrapolar nossos achados para aspectos relacionados ao transtorno do uso dessa substância os quais estão relacionados com respostas obtidas após exposições repetidas à droga. Apesar disso o presente trabalho pode ser importante para o entendimento da

neurobiologia do transtorno do uso da cocaína, bem como para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas para o tratamento.

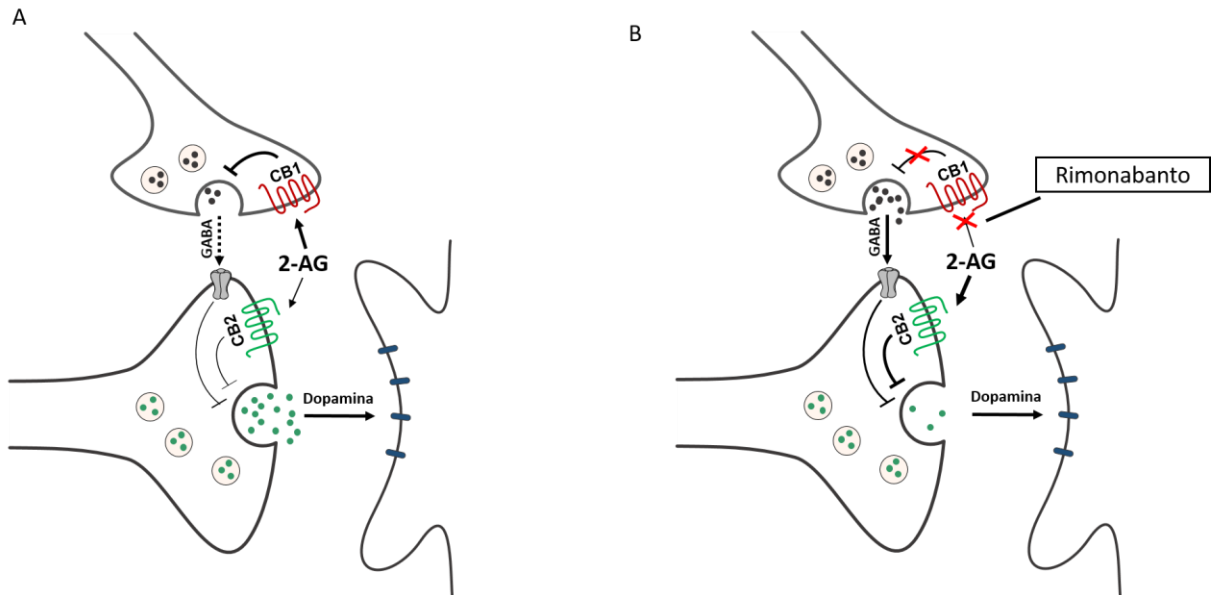


Figura 20: Representação esquemática da conclusão do estudo. Em A está demonstrada a expressão, em subpopulações neuronais distintas, dos subtipos de receptores canabinoides no Nacc. CB₁ está presente em interneurônios gabaérgicos e sua ativação inibe a liberação de GABA, favorecendo um aumento da liberação de dopamina. Em contrapartida, a ativação dos receptores CB₂ expressos no neurônio dopaminérgico, atenua a liberação desse neurotransmissor. O bloqueio de CB₁ induzido pelo rimonabanto, facilita a ativação de CB₂ pelo endocanabinoide 2-AG. Essa ação culmina com a diminuição dos níveis de dopamina e inibição das repostas induzidas pela cocaína, conforme demonstrado na figura B.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, M. A., M. Rodriguez-Arias and J. Minarro (2009). "Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference." Brain Res Rev **59**(2): 253-277.

Al Mansouri, S., S. Ojha, E. Al Maamari, M. Al Ameri, S. M. Nurulain and A. Bahi (2014). "The cannabinoid receptor 2 agonist, beta-caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice." Pharmacol Biochem Behav **124**: 260-268.

Aracil-Fernandez, A., J. M. Trigo, M. S. Garcia-Gutierrez, A. Ortega-Alvaro, A. Ternianov, D. Navarro, P. Robledo, P. Berbel, R. Maldonado and J. Manzanares (2012). "Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors." Neuropsychopharmacology **37**(7): 1749-1763.

Atwood, B. K. and K. Mackie (2010). "CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis." Br J Pharmacol **160**(3): 467-479.

Atwood, B. K., A. Straiker and K. Mackie (2012). "CB(2) cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons." Neuropharmacology **63**(4): 514-523.

Bardo, M. T. and R. A. Bevins (2000). "Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward?" Psychopharmacology (Berl) **153**(1): 31-43.

Batista, L. A., P. H. Gobira, T. G. Viana, D. C. Aguiar and F. A. Moreira (2014). "Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs." Behav Pharmacol **25**(5-6): 425-433.

Beaulieu, J. M., S. Espinoza and R. R. Gainetdinov (2015). "Dopamine receptors - IUPHAR Review 13." Br J Pharmacol **172**(1): 1-23.

Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacol Rev **63**(1): 182-217.

Bossert, J. M., N. J. Marchant, D. J. Calu and Y. Shaham (2013). "The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research." Psychopharmacology (Berl) **229**(3): 453-476.

Boyd, K. N. and R. B. Mailman (2012). "Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs." Handb Exp Pharmacol(212): 53-86.

Brami-Cherrier, K., E. Valjent, M. Garcia, C. Pages, R. A. Hipskind and J. Caboche (2002). "Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation." J Neurosci **22**(20): 8911-8921.

Brusco, A., P. A. Tagliaferro, T. Saez and E. S. Onaivi (2008). "Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors." Ann N Y Acad Sci **1139**: 450-457.

Busquets-Garcia, A., E. Puighermanal, A. Pastor, R. de la Torre, R. Maldonado and A. Ozaita (2011). "Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses." Biol Psychiatry **70**(5): 479-486.

Cagniard, B., T. D. Sotnikova, R. R. Gainetdinov and X. Zhuang (2014). "The dopamine transporter expression level differentially affects responses to cocaine and amphetamine." J Neurogenet **28**(1-2): 112-121.

Cahill, E., M. Salery, P. Vanhoutte and J. Caboche (2014). "Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse." Front Pharmacol **4**: 172.

Caille, S., L. Alvarez-Jaimes, I. Polis, D. G. Stouffer and L. H. Parsons (2007). "Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration." J Neurosci **27**(14): 3695-3702.

Cami, J. and M. Farre (2003). "Drug addiction." N Engl J Med **349**(10): 975-986.

Carlsson, A. (1993). "Thirty years of dopamine research." Adv Neurol **60**: 1-10.

Cathala, A., C. Devroye, M. Maitre, P. V. Piazza, D. N. Abrous, J. M. Revest and U. Spampinato (2014). "Serotonin receptors modulate dopamine transmission in the nucleus accumbens independently of dopamine release: behavioral, neurochemical and molecular studies with cocaine." Addict Biol.

Cheer, J. F., K. M. Wassum, L. A. Sombers, M. L. Heien, J. L. Ariansen, B. J. Aragona, P. E. Phillips and R. M. Wightman (2007). "Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation." J Neurosci **27**(4): 791-795.

Chen, H., T. Uz and H. Manev (2009). "Minocycline affects cocaine sensitization in mice." Neurosci Lett **452**(3): 258-261.

Collo, G., F. Bono, L. Cavalleri, L. Plebani, E. Merlo Pich, M. J. Millan, P. F. Spano and C. Missale (2012). "Pre-synaptic dopamine D(3) receptor mediates cocaine-induced structural plasticity in mesencephalic dopaminergic neurons via ERK and Akt pathways." J Neurochem **120**(5): 765-778.

Cooper, Z. D., J. D. Jones and S. D. Comer (2012). "Glial modulators: a novel pharmacological approach to altering the behavioral effects of abused substances." Expert Opin Investig Drugs **21**(2): 169-178.

Corbille, A. G., E. Valjent, G. Marsicano, C. Ledent, B. Lutz, D. Herve and J. A. Girault (2007). "Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and

striatal signaling in response to psychostimulants." J Neurosci **27**(26): 6937-6947.

Cravatt, B. F., D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner and N. B. Gilula (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." Nature **384**(6604): 83-87.

Cunha, R. A. (2005). "Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade." Purinergic Signalling **1**(2): 111-134.

Dackis, C. A. and C. P. O'Brien (2001). "Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers." J Subst Abuse Treat **21**(3): 111-117.

Deng, L., B. L. Cornett, K. Mackie and A. G. Hohmann (2015). "CB1 Knockout Mice Unveil Sustained CB2-Mediated Antiallodynic Effects of the Mixed CB1/CB2 Agonist CP55,940 in a Mouse Model of Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain." Mol Pharmacol **88**(1): 64-74.

Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, M. R. Johnson, L. S. Melvin and A. C. Howlett (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." Mol Pharmacol **34**(5): 605-613.

Di Chiara, G. and A. Imperato (1988). "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5274-5278.

Di Marzo, V. (2008). "Endocannabinoids: synthesis and degradation." Rev Physiol Biochem Pharmacol **160**: 1-24.

Di Marzo, V. (2009). "The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation." Pharmacol Res **60**(2): 77-84.

- Di Marzo, V., D. Melck, T. Bisogno and L. De Petrocellis (1998). "Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action." Trends Neurosci **21**(12): 521-528.
- Di Marzo, V. and S. Petrosino (2007). "Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease." Curr Opin Lipidol **18**(2): 129-140.
- Doherty, J. M., V. L. Masten, S. B. Powell, R. J. Ralph, D. Klamer, M. J. Low and M. A. Geyer (2008). "Contributions of dopamine D1, D2, and D3 receptor subtypes to the disruptive effects of cocaine on prepulse inhibition in mice." Neuropsychopharmacology **33**(11): 2648-2656.
- Everitt, B. J. and T. W. Robbins (2005). "Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion." Nat Neurosci **8**(11): 1481-1489.
- Falck, R. S., J. Wang and R. G. Carlson (2007). "Crack cocaine trajectories among users in a midwestern American city." Addiction **102**(9): 1421-1431.
- Fattore, L., M. C. Puddu, S. Picciau, A. Cappai, W. Fratta, G. P. Serra and S. Spiga (2002). "Astroglial in vivo response to cocaine in mouse dentate gyrus: a quantitative and qualitative analysis by confocal microscopy." Neuroscience **110**(1): 1-6.
- Ferrer, B., M. A. Gorriti, A. Palomino, I. Gornemann, Y. de Diego, F. J. Bermudez-Silva, A. Bilbao, E. Fernandez-Espejo, R. Moratalla, M. Navarro and F. Rodriguez de Fonseca (2007). "Cannabinoid CB1 receptor antagonism markedly increases dopamine receptor-mediated stereotypies." Eur J Pharmacol **559**(2-3): 180-183.

Fitzgerald, M. L., E. Shobin and V. M. Pickel (2012). "Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: Implications for limbic and striatal output." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.

Fitzgerald, M. L., E. Shobin and V. M. Pickel (2012). "Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: implications for limbic and striatal output." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **38**(1): 21-29.

Gamble-George, J. C., J. R. Conger, N. D. Hartley, P. Gupta, J. J. Sumislawski and S. Patel (2013). "Dissociable effects of CB1 receptor blockade on anxiety-like and consummatory behaviors in the novelty-induced hypophagia test in mice." Psychopharmacology (Berl) **228**(3): 401-409.

Gardner, E. L. (2000). "What we have learned about addiction from animal models of drug self-administration." Am J Addict **9**(4): 285-313.

Geyer, M. A., K. Krebs-Thomson, D. L. Braff and N. R. Swerdlow (2001). "Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review." Psychopharmacology (Berl) **156**(2-3): 117-154.

Gobira, P. H., J. Ropke, D. C. Aguiar, J. A. Crippa and F. A. Moreira (2013). "Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs." Rev Bras Psiquiatr **35 Suppl 2**: S132-139.

Goldstein, R. A., C. DesLauriers and A. M. Burda (2009). "Cocaine: history, social implications, and toxicity--a review." Dis Mon **55**(1): 6-38.

Gonsiorek, W., C. Lunn, X. Fan, S. Narula, D. Lundell and R. W. Hipkin (2000). "Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide." Mol Pharmacol **57**(5): 1045-1050.

Gonzalez, S., M. G. Cascio, J. Fernandez-Ruiz, F. Fezza, V. Di Marzo and J. A. Ramos (2002). "Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine." Brain Res **954**(1): 73-81.

Gowing, L. R., R. L. Ali, S. Allsop, J. Marsden, E. E. Turf, R. West and J. Witton (2015). "Global statistics on addictive behaviours: 2014 status report." Addiction **110**(6): 904-919.

Graybiel, A. M., R. Moratalla and H. A. Robertson (1990). "Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6912-6916.

Griffin, G., E. J. Wray, Q. Tao, S. D. McAllister, W. K. Rorrer, M. M. Aung, B. R. Martin and M. E. Abood (1999). "Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system." Eur J Pharmacol **377**(1): 117-125.

Guindalini, C., H. Vallada, G. Breen and R. Laranjeira (2006). "Concurrent crack and powder cocaine users from Sao Paulo: do they represent a different group?" BMC Public Health **6**: 10.

Haydon, P. G. and G. Carmignoto (2006). "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling." Physiol Rev **86**(3): 1009-1031.

Herkenham, M., A. B. Lynn, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. de Costa and K. C. Rice (1991). "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study." J Neurosci **11**(2): 563-583.

Hitri, A., Y. L. Hurd, R. J. Wyatt and S. I. Deutsch (1994). "Molecular, functional and biochemical characteristics of the dopamine transporter: regional differences and clinical relevance." Clin Neuropharmacol **17**(1): 1-22.

Hooks, M. S., D. N. Jones, S. G. Holtzman, J. L. Juncos, P. W. Kalivas and J. B. Justice, Jr. (1994). "Individual differences in behavior following amphetamine, GBR-12909, or apomorphine but not SKF-38393 or quinpirole." Psychopharmacology (Berl) **116**(2): 217-225.

Howlett, A. C., F. Barth, T. I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W. A. Devane, C. C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B. R. Martin, R. Mechoulam and R. G. Pertwee (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.

Howlett, A. C. and R. M. Fleming (1984). "Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes." Mol Pharmacol **26**(3): 532-538.

Howlett, A. C. and S. Mukhopadhyay (2000). "Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol." Chem Phys Lipids **108**(1-2): 53-70.

Jennings, E. M., B. N. Okine, W. M. Olango, M. Roche and D. P. Finn (2016). "Repeated forced swim stress differentially affects formalin-evoked nociceptive behaviour and the endocannabinoid system in stress normo-responsive and stress hyper-responsive rat strains." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **64**: 181-189.

Jonkman, S. and P. J. Kenny (2013). "Molecular, cellular, and structural mechanisms of cocaine addiction: a key role for microRNAs." Neuropsychopharmacology **38**(1): 198-211.

- Justinova, Z., L. V. Panlilio and S. R. Goldberg (2009). "Drug addiction." Curr Top Behav Neurosci **1**: 309-346.
- Kalivas, P. W. (2007). "Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy." Am J Addict **16**(2): 71-78.
- Kapur, S., R. Mizrahi and M. Li (2005). "From dopamine to salience to psychosis--linking biology, pharmacology and phenomenology of psychosis." Schizophr Res **79**(1): 59-68.
- Karch, S. B. (1999). "Cocaine: history, use, abuse." J R Soc Med **92**(8): 393-397.
- Kenny, P. J. (2011). "'Macrophage' cannabinoid receptor goes up in smoke." Nat Neurosci **14**(9): 1100-1102.
- Khella, R., J. L. Short and D. T. Malone (2014). "CB2 receptor agonism reverses MK-801-induced disruptions of prepulse inhibition in mice." Psychopharmacology (Berl) **231**(16): 3071-3087.
- Koch, M. (1999). "The neurobiology of startle." Prog Neurobiol **59**(2): 107-128.
- Koob, G. F. (2000). "Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies." Ann N Y Acad Sci **909**: 170-185.
- Koob, G. F. (2013). "Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within." Curr Opin Neurobiol **23**(4): 559-563.
- Koob, G. F. and M. Le Moal (2008). "Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **363**(1507): 3113-3123.
- Koob, G. F. and N. D. Volkow (2010). "Neurocircuitry of addiction." Neuropsychopharmacology **35**(1): 217-238.

Leshner, A. I. (1997). "Addiction is a brain disease, and it matters." Science **278**(5335): 45-47.

Li, X., A. F. Hoffman, X. Q. Peng, C. R. Lupica, E. L. Gardner and Z. X. Xi (2009). "Attenuation of basal and cocaine-enhanced locomotion and nucleus accumbens dopamine in cannabinoid CB1-receptor-knockout mice." Psychopharmacology (Berl) **204**(1): 1-11.

Ligresti, A., S. Petrosino and V. Di Marzo (2009). "From endocannabinoid profiling to 'endocannabinoid therapeutics'." Curr Opin Chem Biol **13**(3): 321-331.

Lopez-Moreno, J. A., G. Gonzalez-Cuevas, G. Moreno and M. Navarro (2008). "The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction." Addict Biol **13**(2): 160-187.

Lovinger, D. M. (2008). "Presynaptic modulation by endocannabinoids." Handb Exp Pharmacol(184): 435-477.

Lu, L., E. Koya, H. Zhai, B. T. Hope and Y. Shaham (2006). "Role of ERK in cocaine addiction." Trends Neurosci **29**(12): 695-703.

Lupica, C. R. and A. C. Riegel (2005). "Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction." Neuropharmacology **48**(8): 1105-1116.

Luque-Rojas, M. J., P. Galeano, J. Suarez, P. Araos, L. J. Santin, F. R. de Fonseca and E. B. Calvo (2013). "Hyperactivity induced by the dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole is attenuated by inhibitors of endocannabinoid degradation in mice." Int J Neuropsychopharmacol **16**(3): 661-676.

Luscher, C. and R. C. Malenka (2011). "Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling." Neuron **69**(4): 650-663.

Maldonado, R., F. Berrendero, A. Ozaita and P. Robledo (2011). "Neurochemical basis of cannabis addiction." Neuroscience **181**: 1-17.

Maldonado, R., P. Robledo and F. Berrendero (2013). "Endocannabinoid system and drug addiction: new insights from mutant mice approaches." Curr Opin Neurobiol **23**(4): 480-486.

Maldonado, R., O. Valverde and F. Berrendero (2006). "Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction." Trends Neurosci **29**(4): 225-232.

Malone, D. T., L. E. Long and D. A. Taylor (2004). "The effect of SR 141716 and apomorphine on sensorimotor gating in Swiss mice." Pharmacol Biochem Behav **77**(4): 839-845.

Martin, R. S., R. L. Secchi, E. Sung, M. Lemaire, D. W. Bonhaus, L. R. Hedley and D. A. Lowe (2003). "Effects of cannabinoid receptor ligands on psychosis-relevant behavior models in the rat." Psychopharmacology (Berl) **165**(2): 128-135.

Matsuda, L. A. (1997). "Molecular aspects of cannabinoid receptors." Crit Rev Neurobiol **11**(2-3): 143-166.

Mechoulam, R. and Y. Gaoni (1965). "A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish." J Am Chem Soc **87**: 3273-3275.

Miguel-Hidalgo, J. J. (2009). "The Role of Glial Cells in Drug Abuse." Curr Drug Abuse Rev **2**(1): 76-82.

Miller, J. S., J. L. Barr, L. J. Harper, R. L. Poole, T. J. Gould and E. M. Unterwald (2014). "The GSK3 signaling pathway is activated by cocaine and is critical for cocaine conditioned reward in mice." PLoS One **9**(2): e88026.

Moreira, F. A., N. Kaiser, K. Monory and B. Lutz (2008). "Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors." Neuropharmacology **54**(1): 141-150.

Moreira, F. A. and B. Lutz (2008). "The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction." Addict Biol **13**(2): 196-212.

Motles, E., I. Martinez, E. Concha, B. Mejias and P. Torres (1989). "Comparative study of the behavioral changes evoked by d-amphetamine and apomorphine in adult cats. Dose-response relationship." Pharmacol Biochem Behav **33**(1): 115-121.

Muccioli, G. G. (2010). "Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex." Drug Discov Today **15**(11-12): 474-483.

Munro, S., K. L. Thomas and M. Abu-Shaar (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." Nature **365**(6441): 61-65.

Nathanson, J. A., E. J. Hunnicutt, L. Kantham and C. Scavone (1993). "Cocaine as a naturally occurring insecticide." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9645-9648.

NIDA (2013). "NIDA Info Facts: Crack and cocaine. Bethesda, MD: NIDA [updated 2013 Apr; cited 2015 Aug]. Available from <http://www.nida.nih.gov/Infofacts/cocaine.html>."

Nomura, D. K., C. S. Hudak, A. M. Ward, J. J. Burston, R. S. Issa, K. J. Fisher, M. E. Abood, J. L. Wiley, A. H. Lichtman and J. E. Casida (2008).

"Monoacylglycerol lipase regulates 2-arachidonoylglycerol action and arachidonic acid levels." Bioorg Med Chem Lett **18**(22): 5875-5878.

O'Brien, C. P. and E. L. Gardner (2005). "Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models." Pharmacol Ther **108**(1): 18-58.

Onaivi, E. S., H. Ishiguro, S. Gu and Q. R. Liu (2012). "CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity." J Psychopharmacol **26**(1): 92-103.

Orio, L., S. Edwards, O. George, L. H. Parsons and G. F. Koob (2009). "A role for the endocannabinoid system in the increased motivation for cocaine in extended-access conditions." J Neurosci **29**(15): 4846-4857.

Ortega-Alvaro, A., A. Aracil-Fernandez, M. S. Garcia-Gutierrez, F. Navarrete and J. Manzanares (2011). "Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice." Neuropsychopharmacology **36**(7): 1489-1504.

Pamplona, F. A. and R. N. Takahashi (2012). "Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide." J Psychopharmacol **26**(1): 7-22.

Panagis, G., B. Mackey and S. Vlachou (2014). "Cannabinoid Regulation of Brain Reward Processing with an Emphasis on the Role of CB1 Receptors: A Step Back into the Future." Front Psychiatry **5**: 92.

Panlilio, L. V. and S. R. Goldberg (2007). "Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool." Addiction **102**(12): 1863-1870.

Patel, S., D. J. Rademacher and C. J. Hillard (2003). "Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol within the limbic

forebrain by dopamine receptor activity." J Pharmacol Exp Ther **306**(3): 880-888.

Penberthy, J. K., N. Ait-Daoud, M. Vaughan and T. Fanning (2010). "Review of treatment for cocaine dependence." Curr Drug Abuse Rev **3**(1): 49-62.

Perrine, S. A., J. S. Miller and E. M. Unterwald (2008). "Cocaine regulates protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 activity in selective regions of rat brain." J Neurochem **107**(2): 570-577.

Pertwee, R. G. (2005). "Pharmacological actions of cannabinoids." Handb Exp Pharmacol(168): 1-51.

Piomelli, D. (2003). "The molecular logic of endocannabinoid signalling." Nat Rev Neurosci **4**(11): 873-884.

Pockros, L. A., N. S. Pentkowski, S. M. Conway, T. E. Ullman, K. R. Zwick and J. L. Neisewander (2012). "5-HT(2A) receptor blockade and 5-HT(2C) receptor activation interact to reduce cocaine hyperlocomotion and Fos protein expression in the caudate-putamen." Synapse **66**(12): 989-1001.

Poncelet, M., M. C. Barnouin, J. C. Breliere, G. Le Fur and P. Soubrie (1999). "Blockade of cannabinoid (CB1) receptors by 141716 selectively antagonizes drug-induced reinstatement of exploratory behaviour in gerbils." Psychopharmacology (Berl) **144**(2): 144-150.

Riegel, A. C. and C. R. Lupica (2004). "Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area." J Neurosci **24**(49): 11070-11078.

Roberts, D. C., G. F. Koob, P. Klonoff and H. C. Fibiger (1980). "Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens." Pharmacol Biochem Behav **12**(5): 781-787.

Robinson, T. E. and K. C. Berridge (1993). "The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction." Brain Res Brain Res Rev **18**(3): 247-291.

Rodrigues, L. C., P. H. Gobira, A. C. de Oliveira, R. Pelicao, A. L. Teixeira, F. A. Moreira and A. C. Campos (2014). "Neuroinflammation as a possible link between cannabinoids and addiction." Acta Neuropsychiatr **26**(6): 334-346.

Russo, S. J., M. B. Wilkinson, M. S. Mazei-Robison, D. M. Dietz, I. Maze, V. Krishnan, W. Renthal, A. Graham, S. G. Birnbaum, T. A. Green, B. Robison, A. Lesselyong, L. I. Perrotti, C. A. Bolanos, A. Kumar, M. S. Clark, J. F. Neumaier, R. L. Neve, A. L. Bhakar, P. A. Barker and E. J. Nestler (2009). "Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward." J Neurosci **29**(11): 3529-3537.

Sanchis-Segura, C. and R. Spanagel (2006). "Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview." Addict Biol **11**(1): 2-38.

Shi, X., J. S. Miller, L. J. Harper, R. L. Poole, T. J. Gould and E. M. Unterwald (2014). "Reactivation of cocaine reward memory engages the Akt/GSK3/mTOR signaling pathway and can be disrupted by GSK3 inhibition." Psychopharmacology (Berl) **231**(16): 3109-3118.

Singh, M. E., A. N. Verty, I. Price, I. S. McGregor and P. E. Mallet (2004). "Modulation of morphine-induced Fos-immunoreactivity by the cannabinoid receptor antagonist SR 141716." Neuropharmacology **47**(8): 1157-1169.

Solinas, M., S. Yasar and S. R. Goldberg (2007). "Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse." Pharmacol Res **56**(5): 393-405.

Soria, G., V. Mendizabal, C. Tourino, P. Robledo, C. Ledent, M. Parmentier, R. Maldonado and O. Valverde (2005). "Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration." Neuropsychopharmacology **30**(9): 1670-1680.

Straiker, A., S. S. Hu, J. Z. Long, A. Arnold, J. Wager-Miller, B. F. Cravatt and K. Mackie (2009). "Monoacylglycerol lipase limits the duration of endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of excitation in autaptic hippocampal neurons." Mol Pharmacol **76**(6): 1220-1227.

Sugiura, T., S. Kondo, S. Kishimoto, T. Miyashita, S. Nakane, T. Kodaka, Y. Suhara, H. Takayama and K. Waku (2000). "Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells." J Biol Chem **275**(1): 605-612.

Swerdlow, N. R., D. L. Braff and M. A. Geyer (2000). "Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon." Behav Pharmacol **11**(3-4): 185-204.

Swerdlow, N. R., D. L. Braff, N. Taaid and M. A. Geyer (1994). "Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients." Arch Gen Psychiatry **51**(2): 139-154.

Swerdlow, N. R., F. J. Vaccarino, M. Amalric and G. F. Koob (1986). "The neural substrates for the motor-activating properties of psychostimulants: a review of recent findings." Pharmacol Biochem Behav **25**(1): 233-248.

Tanda, G. (2007). "Modulation of the endocannabinoid system: therapeutic potential against cocaine dependence." Pharmacol Res **56**(5): 406-417.

Thanos, P. K., E. S. Dimitrakakis, O. Rice, A. Gifford and N. D. Volkow (2005). "Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors." Behav Brain Res **164**(2): 206-213.

Ting, C. H., C. W. Chi, C. P. Li and C. Y. Chen (2015). "Differential modulation of endogenous cannabinoid CB1 and CB2 receptors in spontaneous and splice variants of ghrelin-induced food intake in conscious rats." Nutrition **31**(1): 230-235.

Tzschentke, T. M. (1998). "Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues." Prog Neurobiol **56**(6): 613-672.

Tzschentke, T. M. (2007). "Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade." Addict Biol **12**(3-4): 227-462.

Valjent, E., J. C. Corvol, C. Pages, M. J. Besson, R. Maldonado and J. Caboche (2000). "Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties." J Neurosci **20**(23): 8701-8709.

Van Sickle, M. D., M. Duncan, P. J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J. S. Davison, L. J. Marnett, V. Di Marzo, Q. J. Pittman, K. D. Patel and K. A. Sharkey (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." Science **310**(5746): 329-332.

Vanderschuren, L. J. and P. W. Kalivas (2000). "Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral

sensitization: a critical review of preclinical studies." Psychopharmacology (Berl) **151**(2-3): 99-120.

Vaughn, L. K., J. R. Mantsch, O. Vranjkovic, G. Stroh, M. Lacourt, M. Kreutter and C. J. Hillard (2012). "Cannabinoid receptor involvement in stress-induced cocaine reinstatement: potential interaction with noradrenergic pathways." Neuroscience **204**: 117-124.

Vezina, P. and M. Leyton (2009). "Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans." Neuropharmacology **56 Suppl 1**: 160-168.

Vlachou, S. and G. Panagis (2014). "Regulation of brain reward by the endocannabinoid system: a critical review of behavioral studies in animals." Curr Pharm Des **20**(13): 2072-2088.

Volkow, N. and T. K. Li (2005). "The neuroscience of addiction." Nat Neurosci **8**(11): 1429-1430.

Volkow, N. D., J. S. Fowler, G. J. Wang and J. M. Swanson (2004). "Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications." Mol Psychiatry **9**(6): 557-569.

Volterra, A. and J. Meldolesi (2005). "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues." Nat Rev Neurosci **6**(8): 626-640.

Weiss, F. (2010). *Advances in Animal Models of Relapse for Addiction Research*. Advances in the Neuroscience of Addiction. C. M. Kuhn and G. F. Koob. Boca Raton (FL).

Weiss, F., R. Ciccocioppo, L. H. Parsons, S. Katner, X. Liu, E. P. Zorrilla, G. R. Valdez, O. Ben-Shahar, S. Angeletti and R. R. Richter (2001). "Compulsive

drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors." Ann N Y Acad Sci **937**: 1-26.

Wiley, J. L., J. J. Burston, D. C. Leggett, O. O. Alekseeva, R. K. Razdan, A. Mahadevan and B. R. Martin (2005). "CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice." Br J Pharmacol **145**(3): 293-300.

Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2002). "Endocannabinoid signaling in the brain." Science **296**(5568): 678-682.

Wise, R. A. (2004). "Dopamine, learning and motivation." Nat Rev Neurosci **5**(6): 483-494.

Wise, R. A. and M. A. Bozarth (1987). "A psychomotor stimulant theory of addiction." Psychol Rev **94**(4): 469-492.

Witkin, J. M., B. Levant, A. Zapata, R. Kaminski and M. Gasior (2008). "The dopamine D3/D2 agonist (+)-PD-128,907 [(R-(+)-trans-3,4a,10b-tetrahydro-4-propyl-2H,5H-[1]benzopyrano[4,3-b]-1,4-oxazin -9-ol)] protects against acute and cocaine-kindled seizures in mice: further evidence for the involvement of D3 receptors." J Pharmacol Exp Ther **326**(3): 930-938.

Xi, Z. X., J. G. Gilbert, X. Q. Peng, A. C. Pak, X. Li and E. L. Gardner (2006). "Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens." J Neurosci **26**(33): 8531-8536.

Xi, Z. X., X. Q. Peng, X. Li, R. Song, H. Y. Zhang, Q. R. Liu, H. J. Yang, G. H. Bi, J. Li and E. L. Gardner (2011). "Brain cannabinoid CB(2) receptors modulate cocaine's actions in mice." Nat Neurosci **14**(9): 1160-1166.

Yang, P., L. Wang and X. Q. Xie (2012). "Latest advances in novel cannabinoid CB(2) ligands for drug abuse and their therapeutic potential." Future Med Chem **4**(2): 187-204.

Yu, L. L., S. J. Zhou, X. Y. Wang, J. F. Liu, Y. X. Xue, W. Jiang and L. Lu (2011). "Effects of cannabinoid CB(1) receptor antagonist rimonabant on acquisition and reinstatement of psychostimulant reward memory in mice." Behav Brain Res **217**(1): 111-116.

Zhai, H., Y. Li, X. Wang and L. Lu (2008). "Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling pathway: implications for reinforcement and reinstatement." Cell Mol Neurobiol **28**(2): 157-172.

Zhang, H. Y., M. Gao, Q. R. Liu, G. H. Bi, X. Li, H. J. Yang, E. L. Gardner, J. Wu and Z. X. Xi (2014). "Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(46): E5007-5015.

Zhang, H. Y., M. Gao, H. Shen, G. H. Bi, H. J. Yang, Q. R. Liu, J. Wu, E. L. Gardner, A. Bonci and Z. X. Xi (2016). "Expression of functional cannabinoid CB receptor in VTA dopamine neurons in rats." Addict Biol.

Zhang, Y., X. Zhu, C. Huang and X. Zhang (2015). "Molecular changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens are associated with blocking the behavioral sensitization to cocaine." Sci Rep **5**: 16172.

