

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

Rayssa Briânis de Oliveira Costa

**EFEITOS DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINOIDE TIPO 1, AM4113,
EM RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E CELULARES INDUZIDAS POR
COCAÍNA**

Belo Horizonte

2025

RAYSSA BRIÂNIS DE OLIVEIRA COSTA

TESE DE DOUTORADO

EFEITOS DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINOIDE TIPO 1, AM4113, EM
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E CELULARES INDUZIDAS POR COCAÍNA

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia da Universidade
Federal de Minas Gerais, como
parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Doutora em
Farmacologia sob a supervisão do
Prof. Dr. Fabrício de Araújo
Moreira.

Belo Horizonte

2025

043

Costa, Rayssa Briânis de Oliveira.

Efeitos do antagonista do receptor canabinoide tipo 1, AM4113, em respostas comportamentais e celulares induzidas por cocaína [manuscrito] / Rayssa Briânis de Oliveira Costa. – 2025.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Canabinoides. 3. Cocaína. 4. Receptor CB1 de Canabinoide. 5. Plasticidade Neuronal. I. Moreira, Fabrício de Araújo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"EFEITOS DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINOIDE TIPO 1, AM4113, EM RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E CELULARES INDUZIDAS POR COCAÍNA"

RAYSSA BRIANIS DE OLIVEIRA COSTA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **04 de dezembro de 2025**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROFA. DRA. GILDA ÂNGELA NEVES - UFRJ

PROFA. DRA. LÍVEA DORNELA GODOY - USP

PROF. DR. VICTOR RODRIGUES SANTOS - ICB/UFMG

PROF. DR. FLÁVIO AFONSO GONÇALVES MOURÃO - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2025



Documento assinado eletronicamente por **Lívea Dornéla Godoy, Usuário Externo**, em 11/12/2025, às 09:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor(a)**, em 11/12/2025, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Flávio Afonso Gonçalves Mourão, Usuário Externo**, em 11/12/2025, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Fabricio de Araujo Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 11/12/2025, às 09:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Gilda Angela Neves, Usuária Externa**, em 16/12/2025, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4811825** e o código CRC **4B3C85A9**.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente, a banca examinadora por disponibilizarem tempo para leitura e discussão deste trabalho.

Ao Prof. Fabrício Moreira por ter me recebido, assim como a Profa. Daniele Aguiar, com tanta paciência e me acolhido junto ao grupo LNP desde o início. Agradeço por todo aprendizado e oportunidade que trabalhar neste laboratório já me proporcionou e me proporcionará, obrigada pelos 10 anos da maior reviravolta da minha vida que aconteceram nesse lugar tão especial com cheiro de café.

Aos alunos egressos Dayane, Luara, Rita, Jadna, Laila, Lia, Nícia, Gobira, dentre tantos outros que me ensinaram com tanta paciência a realizar os comportamentos e viver um laboratório. Aos tantos outros que passaram desde então, mas principalmente a que estive comigo do início ao fim, Anna Paula, essa caminhada sem você não seria a mesma, obrigada por crescer comigo, me ajudar sempre e me fazer rir tanto no processo. Também ao César, Bruno divo, Lucas IC, Júlia, aos neuroamigos, a todo pessoal do Neurofar, Dani Bona e suas alunas, principalmente Nai e Jaque, ao Neurovictor e seus alunos, principalmente Rúbia, a profa. Anna Lúcia e Renato, ao lab nano, principalmente meu amigo e companheiro Marco Túllio. E a tantos outros presentes nesse caminho.

Aos técnicos e trabalhadores do ICB, principalmente Rinaldo e Cida.

Ao pessoal da Universidade de Aarhus, onde estive durante o doutorado sanduíche, e todos os além do networking que tive o prazer de conhecer durante esse tempo tão importante. Principalmente ao prof. Rodrigo Grassi-Oliveira e aos pós-docs Pedro Gobira e Lia Iglesias que me ensinaram tanto.

Agradeço imensamente a toda minha família, minha mãe Fânia por tudo, meu pai Jaime e meu irmão Jamerson, minhas avós, minhas tias e tios, meus padrinhos, minhas primas e primos. Aos meus amigos de toda a vida Tatita, Gabi, Marília, Júlio, Pimenta, Ciça, Rayani, Meninas do RJ, Golfinhas e tantos outros que me apoiaram nesse processo. Assim como meu cachorrinho Barney.

Obrigada!

Resumo

O Transtorno por Uso de Substâncias é caracterizado pela busca compulsiva por drogas, alta vulnerabilidade à recaída e prejuízos funcionais. O sistema endocanabinoide modula o circuito de recompensa e representa um alvo terapêutico promissor. Estudos anteriores demonstraram que agonistas inversos do receptor canabinoide do tipo 1 (CB₁R), como o Rimonabanto, reduzem a busca e a recaída induzidas pela cocaína, embora seu uso clínico tenha sido descontinuado devido a efeitos ansiosos e depressivos. Nesse contexto, o presente estudo investigou se o AM4113, um antagonista seletivo do CB₁R, poderia atenuar as alterações neurocomportamentais induzidas pela cocaína sem provocar efeitos psiquiátricos adversos.

Camundongos C57BL/6J machos e fêmeas receberam AM4113 (0,3; 1; 3 ou 10 mg/kg, i.p.) antes da administração de cocaína (15 mg/kg, i.p.) para avaliar: a atividade locomotora aguda e a liberação de glutamato em preparações sinaptossomais do hipocampo (HPC) e corpo estriado (STR); a sensibilização comportamental e hiperlocomoção condicionada, bem como a expressão de genes relacionados à via de recompensa no STR; e a preferência condicionada por lugar (PCL) e a densidade de espinhos dendríticos por coloração Golgi-Cox no córtex pré-frontal (PFC), HPC e STR. Efeitos ansiosos ou depressivos foram avaliados nos testes do labirinto em cruz elevado (LCE), suspensão pela cauda (*Tail Suspension Test*, TST) e nado forçado (*Forced Swim Test*, FST). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (Protocolo nº 262/2023).

O AM4113 (10 mg/kg) reduziu a hiperlocomoção e a liberação de glutamato induzidas por cocaína; atenuou a sensibilização comportamental (3 mg/kg) e normalizou a maior parte das alterações gênicas; além de prevenir a indução da PCL (10 mg/kg) e o aumento da densidade de espinhos dendríticos no HPC. Importante destacar que o AM4113 não promoveu comportamentos relacionados à ansiedade ou depressão nos testes LCE, TST e FST em relação ao grupo controle.

Em conclusão, o AM4113 mostrou-se eficaz em mitigar os efeitos induzidos pela cocaína, sem provocar comportamentos ansiosos ou depressivos. Esses resultados destacam o papel do CB₁R na modulação das respostas maladaptativas à cocaína, com um perfil melhorado para antagonistas em relação aos agonistas inversos.

Palavras-chave: canabinoides, cocaína, CB₁R, circuito de recompensa, neuroplasticidade.

Abstract

Substance Use Disorder is characterized by compulsive drug-seeking behavior, high vulnerability to relapse, and functional impairments. The endocannabinoid system modulates the reward circuitry and represents a promising therapeutic target. Previous studies have shown that inverse agonists of the cannabinoid type 1 receptor (CB₁R), such as Rimonabant, reduce cocaine-seeking and relapse, although their clinical use was discontinued due to anxiety- and depression-related effects. In this context, the present study investigated whether AM4113, a selective CB₁R antagonist, could attenuate cocaine-induced neurobehavioral alterations without producing adverse psychiatric effects.

Male and female C57BL/6J mice received AM4113 (0.3, 1, 3, or 10 mg/kg, i.p.) prior to cocaine administration (15 mg/kg, i.p.) to evaluate: acute locomotor activity and glutamate release in synaptosomal preparations from the hippocampus (HPC) and striatum (STR); behavioral sensitization and conditioned hyperlocomotion, as well as the expression of genes related to the reward pathway in the striatum (STR); and Conditioned Place Preference (CPP) paradigm and dendritic spine density was assessed using Golgi-Cox staining in the prefrontal cortex (PFC), HPC, and STR. Anxiety- and depression-like behaviors were assessed using the Elevated Plus Maze (EPM), Tail Suspension Test (TST), and Forced Swim Test (FST). All experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee (Protocol No. 262/2023).

AM4113 (10 mg/kg) reduced cocaine-induced hyperlocomotion and glutamate release induced by cocaine; attenuated behavioral sensitization (3 mg/kg) and normalized most of gene expression changes; and prevented CPP induction (10 mg/kg) and cocaine-induced increase in dendritic spine density in the HPC. Importantly, AM4113 did not promote anxiety- or depression-like behaviors in the EPM, TST, or FST compared to the control group.

In conclusion, AM4113 effectively mitigated cocaine-induced neurobehavior effects without producing anxiety- or depressive-like behaviors. These findings highlight the role of CB₁R in modulating maladaptive responses to cocaine, with an improved profile for antagonists compared to inverse agonists.

Key-words: cannabinoids, cocaine, CB₁R, reward system, neuroplasticity.

Lista de abreviaturas e siglas

ATV = Área Tegmental Ventral

CB₁R= Receptor canabinoide do tipo 1

CB₂R= Receptor canabinoide do tipo 2

Coca = cocaína

CPF = Córtex pré-frontal

DA = Dopamina

ELS = *Early Life Stress* (Estresse Precoce)

LBMS = *Limited bedding and Maternal Separation* (limitação do ninho e separação maternal)

LCE = Labirinto em Cruz Elevado

NAc = Núcleo Accumbens

PCL = Preferência Condicionada ao Lugar

PND = Pós-natal day (dia após nascimento)

RD1 = Receptor dopaminérgico do tipo 1

RD2 = Receptor dopaminérgico do tipo 2

RIM = Rimonabanto

SE = Sistema endocanabinoide

STR = Corpo Estriado

TST = Teste de Suspensão pela Cauda

TUS = Transtorno por Uso de Substâncias

Sumário

1.	Revisão da literatura.....	11
1.1	Transtorno por Uso de Substâncias (TUS).....	11
1.2	Neurobiologia do TUS	12
1.3	Transtorno por uso de cocaína (TUC).....	16
1.4	Estudo do TUS em animais experimentais	18
1.5	Envolvimento do Sistema Endocanabinoide com o TUS	19
1.6	Papel do receptor canabinoide do tipo 1 (CB ₁ R) no TUS	21
2.	Justificativa	23
3.	Objetivos	26
4.	Material e métodos.....	27
4.1.	Animais	27
4.2.	Drogas	27
4.3.	Testes comportamentais:	27
a.	Hiperatividade motora na Arena	28
b.	Sensibilização comportamental.....	28
c.	Hiperlocomoção condicionada.....	28
d.	Preferência Condicionada ao Lugar (PCL)	29
e.	Labirinto em cruz elevado (LCE).....	29
f.	Teste de suspensão pela cauda (TST).....	30
g.	Teste de nado forçado (FST)	30
4.4.	Análises celulares.....	30
a.	Sinaptosoma	30
b.	Quantificação relativa por PCR em tempo real (RT-qPCR)	31
c.	Técnica de impregnação de Golgi-Cox:.....	32
4.5.	Análises estatísticas.....	32
5.	Resultados:	34
5.1.	AM4113 (10 mg/kg) inibiu a hiperlocomoção aguda induzida por cocaína no campo aberto, porém induziu hipolocomoção basal.....	34
5.2.	AM4113 reverte o aumento da liberação de glutamato induzido por cocaína na sinapse no STR e HPC.....	35
5.3.	AM4113 (3 mg/kg) atenua a sensibilização comportamental induzida por cocaína.....	36
5.4.	AM4113 restaura parcialmente a alteração de genes avaliados por RT-PCR no STR.....	38
5.5.	AM4113 (10 mg/kg) inibiu aquisição da memória contextual recompensadora no Teste de Preferência Condicionada ao Lugar.	41
5.6.	AM4113 não inibiu expressão da memória contextual recompensadora no Teste de Preferência Condicionada ao Lugar.	42

5.7. AM4113 reverte o aumento dos espinhos dendríticos induzido por cocaína no hipocampo, mas não no estriado e córtex pré-frontal.	43
5.8. AM4113 não induziu comportamento tipo-ansioso no teste de LCE.....	45
5.9. AM4113 não induziu o comportamento tipo-depressivo no TST.	46
5.10. AM4113 não induziu o comportamento tipo-depressivo no FST.	46
6. Discussão.....	48
7. Conclusão	56
8. Referências	57
9. Apêndice I: Aumento da vulnerabilidade à cocaína na vida adulta após exposição ao estresse na infância de animas experimentais e modificações na expressão gênica.....	68
i. Revisão da literatura.....	68
ii. Material e métodos	70
iii. Resultados	74
iv. Discussão	79
v. Conclusão	81

1. Revisão da literatura

1.1 Transtorno por Uso de Substâncias (TUS)

O TUS é uma condição patológica caracterizada pelo uso prolongado de uma ou mais substâncias, a despeito de consequências deletérias em longo prazo para o indivíduo e terceiros (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Em 2019, aproximadamente meio milhão de óbitos foram atribuídos ao consumo de substâncias psicoativas em escala global, evidenciando um aumento de 22% em relação aos números registrados em 2010. Projeções indicam um acréscimo de 11% até o ano de 2030 (CITARISTI, 2022).

No Brasil, o cenário que mais preocupa é o relacionado ao consumo de cocaína ou sua forma em pasta, o crack, sendo uma das drogas mais consumidas no país de acordo com o III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas realizado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) (BASTOS et al., 2017; MIRAGLIA, 2016), além de ser uma das substâncias de abuso que mais causam danos tanto para o indivíduo quanto para terceiros, atrás somente do álcool e heroína (NUTT; KING; PHILLIPS, 2010). Apesar disso, não existe farmacoterapia aprovada para o tratamento, sendo possível somente reverter casos de overdose para algumas delas ou atenuar os sintomas.

A cocaína, é um psicoestimulante, extraído das folhas da planta *Erythoxylum coca*, nativa das regiões dos Andes e de parte do norte da Amazônia. Apresenta alto potencial de abuso, sendo amplamente consumida em todo o mundo. Historicamente, povos indígenas, como os Incas, utilizavam suas folhas secas ou em infusões para o preparo de chás, frequentemente em contextos rituais e religiosos (DRAKE; SCOTT, 2018). O hábito de mascar as folhas é comum até hoje na América do Sul para combater os efeitos do ar rarefeito. Apesar disso, a substância só foi identificada e isolada pela primeira vez em 1860 pelo químico alemão Albert Niemann em sua tese de doutorado (NIEMANN, 1860). A partir de então, seus efeitos começaram a ser elucidados pela comunidade científica, inclusive pelo seu potencial terapêutico para tratamento de depressão e alcoolismo, além de ser amplamente utilizada como anestésico para cirurgias dentárias pequenas. De fato, a partir da cocaína foram desenvolvidos os fármacos hoje conhecidos como anestésicos locais (BEZERRA et al., 2020).

Com o início da chamada “guerra às drogas”, a proibição da cocaína e de outras substâncias consideradas nocivas teve início nos Estados Unidos em 1914, sendo implementada no Brasil em 1921 (DRAKE; SCOTT, 2018). Contudo, a ausência de estratégias terapêuticas

eficazes para o tratamento do transtorno por uso de cocaína contribuiu para o aumento progressivo do número de indivíduos dependentes, resultando em agravamento dos quadros clínicos, marginalização social e dificuldades diagnósticas decorrentes do estigma associado ao uso dessa substância. Atualmente, as opções terapêuticas disponíveis permanecem limitadas e de eficácia restrita, o que reforça a necessidade de desenvolver e investigar novas abordagens de tratamento (KAMPMAN, 2019).

1.2 Neurobiologia do TUS

O TUS apresenta diversos estágios que afetam diferentes níveis funcionais e anatômicos do cérebro, desregulando vias de saliência de incentivo, ou seja, motivação para recompensa, associadas a padrões habituais patológicos, estresse neuronal e funções executivas (KOOB; VOLKOW, 2016). É caracterizado por neuroadaptações maladaptativas, isto é, mudanças plásticas do cérebro que, embora sejam respostas à droga, terminam por prejudicar a função normal (KALIVAS; O'BRIEN, 2008), principalmente nas vias relacionadas à recompensa e reforço positivo, processos nos quais um estímulo aumenta a probabilidade de uma resposta. O diagnóstico é estabelecido a partir de um conjunto de critérios específicos relacionados ao uso da substância, como a frequência de uso, busca compulsiva, uso apesar de consequências negativas e efeitos indesejados ao interromper abruptamente o uso, o que a longo prazo caracteriza a abstinência (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Apesar dos inúmeros malefícios associados ao TUS, até o momento não existem farmacoterapias específicas para essa condição, e as opções de intervenção são limitadas e frequentemente enfrentam desafios de adesão por parte dos indivíduos afetados (KAMPMAN, 2019).

Embora possuam diferentes mecanismos de ação, as substâncias consideradas de abuso têm a capacidade de causar hiperestimulação e "sequestro" de circuitos cerebrais, resultando em uma variedade de alterações comportamentais que podem ser utilizadas como critérios diagnósticos (APA, 2014; Strain, 2022). A via neural primariamente associada aos efeitos reforçadores e recompensadores, especialmente no início do consumo, é a via dopaminérgica mesocorticolímbica. Esta via compreende neurônios dopaminérgicos originados da área tegmental ventral (ATV) que projetam seus axônios para outras áreas liberando a dopamina (DA), como o núcleo accumbens (NAc), região chave do estriado ventral relacionada a regulação do comportamento motivado, o CPF, relacionado ao controle cognitivo e executivo (WANAT et al., 2009). Conhecido antes como "circuito de recompensa", este sistema desempenha um papel fundamental no reforço de comportamentos essenciais para a

sobrevivência e reprodução, como alimentação, hidratação, interação social e comportamento sexual e é regulado por outras neurotransmissões, como a GABAérgica, mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) importante no controle inibitório basal, assim como os neurônios glutamatérgicos e dopaminérgicos, como pode ser visto na Figura 1 (Fig. 1).

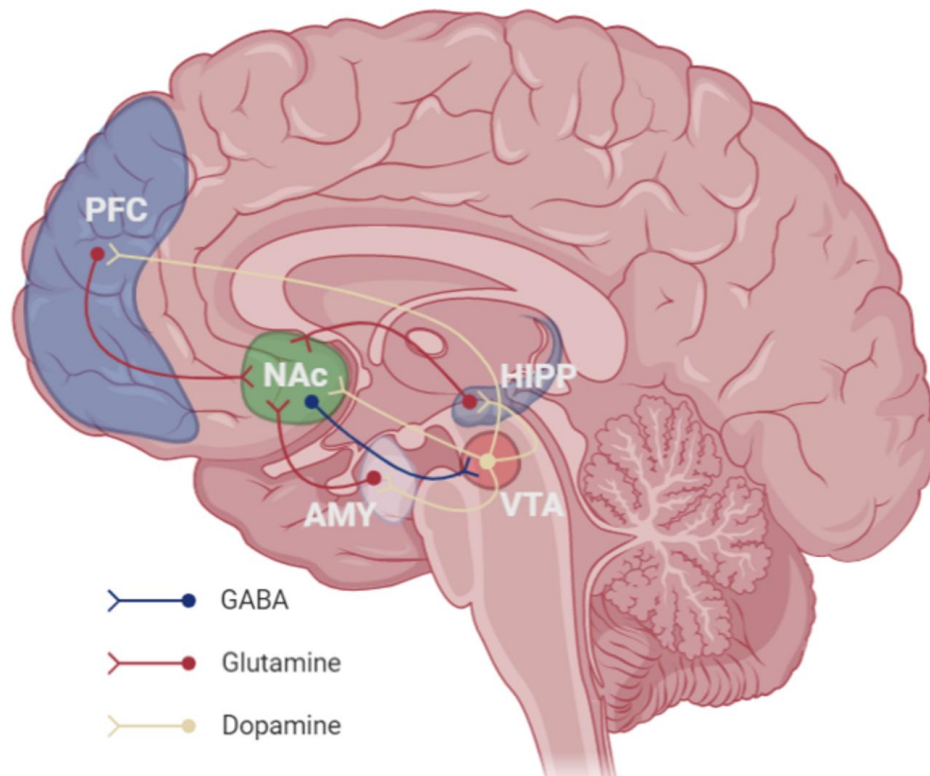


Fig. 1: Via de recompensa envolvida no TUS. PFC = córtex pré-frontal, NAc = Núcleo Accumbens, VTA = Área Tegmental Ventral, AMY = Amígdala, HIPP= Hipocampo. Em azul os neurônios GABAérgicos, em vermelho glutamatérgicos, e amarelo dopaminérgicos (criada no BioRender).

Não entendida mais como relacionada somente à comportamentos recompensadores, tem sido chamada de via de saliência motivacional, uma vez que esse reforço é mediado pela liberação de DA no NAc frente a comportamentos que devem ser priorizados e aprendidos. As drogas de abuso interferem “capturando” esse circuito, tornando o consumo percebido como essencial para o organismo, possivelmente superando a prioridade de comportamentos mencionados anteriormente (EVERITT; ROBBINS, 2005) e induzindo uma maior e mais rápida liberação de DA (Fig.2) (CAMERON; WIGHTMAN; CARELLI, 2014).

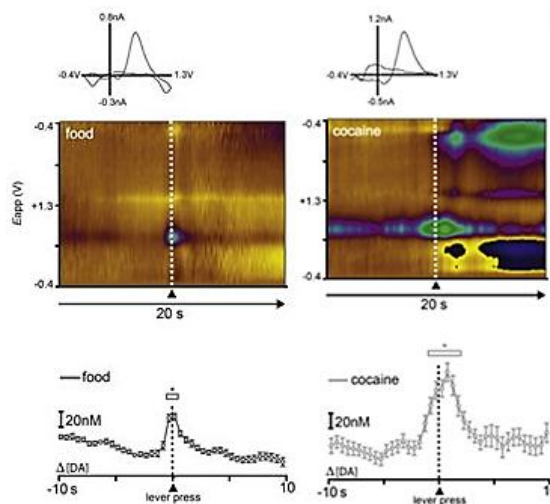


Fig. 2: Dinâmica da liberação de DA durante respostas operantes para comida ou cocaína. Representação bidimensional dos dados de voltametria cíclica obtidos 20 s antes e depois do pressionamento da alavanca (linha pontilhada) para comida (esquerda) ou cocaína (direita). As variações de corrente no eletrodo de fibra de carbono são indicadas por cores, e os voltamogramas correspondentes estão mostrados nos painéis superiores. Abaixo, as mudanças diferenciais na concentração de dopamina ([DA]) (Adaptado de CAMERON; WIGHTMAN; CARELLI, 2014).

Além do circuito principal, outras regiões são intimamente envolvidas no desenvolvimento do transtorno, como o hipocampo (HPC) relacionado às associações pavlovianas entre droga e estímulos ambientais que se tornam condicionados e são capazes de induzir a liberação de DA mesmo na ausência da droga (Fig.3) (WANAT et al., 2009).

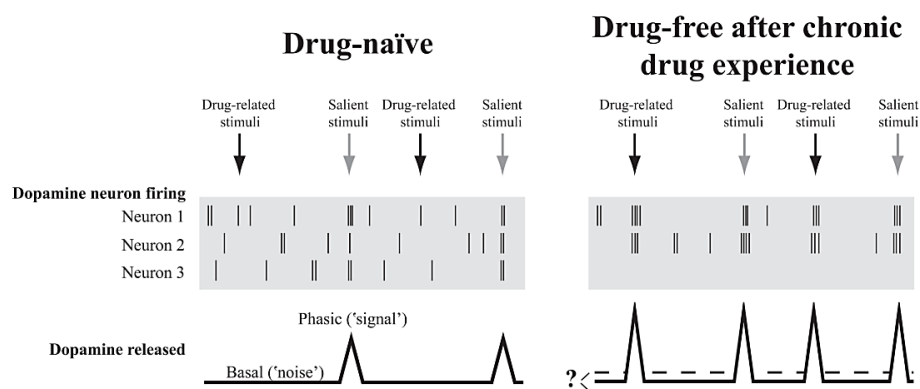


Fig. 3: Representação esquemática das alterações na atividade dopaminérgica após exposição crônica a drogas. À esquerda, em animais não expostos (*drug-naïve*), estímulos salientes, mas não relacionados à droga, induzem disparos coordenados de neurônios dopaminérgicos e liberação fásica de dopamina. À direita, após experiência crônica com drogas, estímulos associados à droga passam a evocar respostas dopaminérgicas aumentadas (WANAT et al., 2009).

O STR, principalmente dorsal, por outro lado, tem se mostrado importante para a formação do hábito (FOUYSSAC; EVERITT; BELIN, 2017) e também para motivação para busca da droga (ou “*seeking*”) (BELIN; EVERITT, 2008; SINGER et al., 2018), além de possuir relação com o comportamento de compulsividade e impulsividade (BELIN et al., 2008), também aumentado nesses indivíduos. A amígdala em conjunto com o HPC, também participa nos processos tardios de associação negativa a esses estímulos (KOOB; VOLKOW, 2010, 2016). Ativada em indivíduos durante as fases de retirada e abstinência.

Essas diferentes alterações moleculares e celulares culminaram em diversas teorias para explicar o TUS e caracterizar as distintas fases observadas no transtorno, o que justifica sua complexidade (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Alterações no perfil da expressão de genes que culminam na produção de receptores e enzimas e reorganizações neurais após uso crônico são capazes de explicar, por exemplo, a facilitação do sistema inicial relacionado ao reforço positivo da substância e a sensibilização, reduzindo os sinais inibitórios e aumentando os sinais excitatórios em regiões específicas do cérebro (Fig. 4), assim como, caracterizam a tolerância, fases de abstinência, recaída e o reforço negativo em fases tardias (KOOB, 2021).

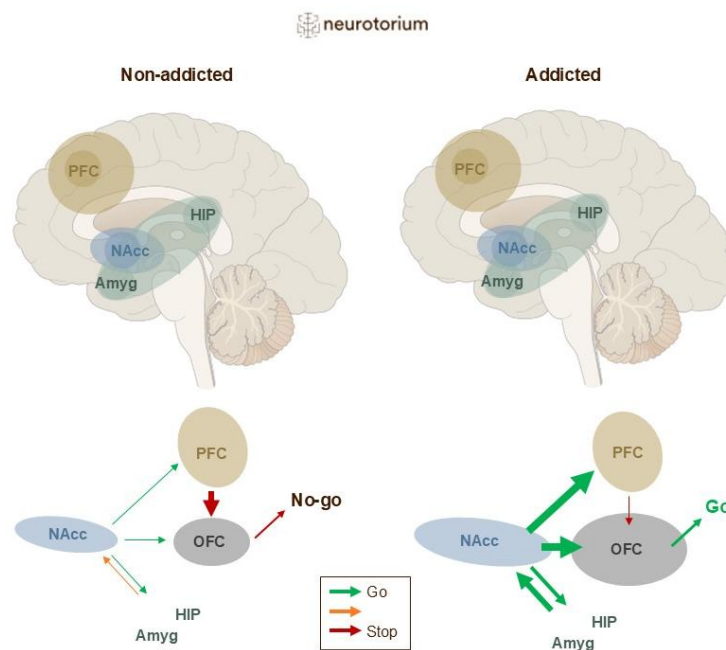


Fig. 4: Representação das modificações das vias de recompensa em um indivíduo não adicto (*Non-addicted*) e um indivíduo adicto (*Addicted*). Evidenciando as disfunções nos circuitos de motivação do cérebro que podem reduzir os sinais inibitórios (*Stop*) e aumentar os sinais excitatórios (*Go*). PFC = córtex pré-frontal; Nacc = Núcleo Accumbens; OFC = Córtex Orbitofrontal; HIP = Hipocampo; Amyg = Amígdala (Adaptado de Neurotorium.org).

1.3 Transtorno por uso de cocaína (TUC)

A cocaína, especificamente, atua por meio do bloqueio do transportador de DA, o DAT, ou seja, inibe a recaptação de DA e aumenta a concentração sináptica desse neurotransmissor que atua por mais tempo em seus receptores, associado ao reforço positivo inicial, promovendo sensações agradáveis, diminuição do estresse e aumento da euforia (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Isso foi demonstrado através do uso de animais transgênicos que expressam a proteína fluorescente vermelha *tdTomato* sob o promotor do DAT, permitindo a visualização de botões sinápticos de neurônios que expressavam DAT no STR. Após administrações repetidas de cocaína, capazes de induzir a sensibilização locomotora, foi observado um aumento do número e da densidade de botões dopaminérgicos no NAc, bem como um aumento de espinhos dendríticos em contato com esses terminais. Indicando uma plasticidade estrutural do sistema dopaminérgico e uma potencial intensificação das conexões sinápticas associadas aos processos de neuroadaptação (DOS SANTOS et al., 2018). Esse aumento substancial na liberação de DA no NAc induz uma sensação de prazer intensa que diminui com o tempo devido ao desenvolvimento da tolerância. Esse processo torna difícil tanto reexperimentar a sensação inicial quanto interromper o uso, devido aos efeitos da abstinência.

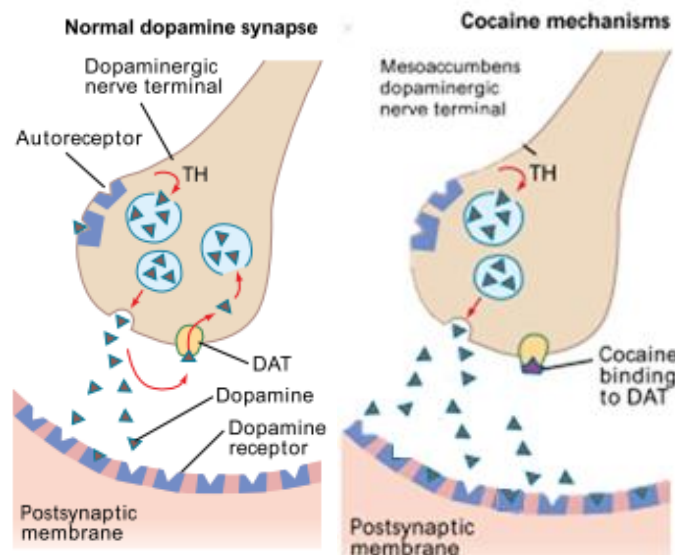


Fig. 5: Representação de uma sinapse dopaminérgica fisiológica a esquerda e a direita o mecanismo da cocaína ao boquear o DAT e induzir aumento de DA no NAc.(adaptada de CAINE, 1998).

Essas mudanças significativas na sinalização dopaminérgica, também alteram a expressão de receptores dopaminérgicos do tipo 1 e 2 (D1R e D2R), os quais exercem efeitos

intracelulares opostos. Os D1R, acoplados à proteína G excitatória (Gs), promovem o aumento dos níveis de AMPc e ativam a proteína quinase A (PKA), estimulando a expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica e ao aprendizado de recompensas, como CREB e Δ FosB (KOOB; VOLKOW, 2016). Já os D2R, acoplados à proteína Gi/o, reduzem a atividade da adenilato ciclase e exercem papel inibitório sobre a excitabilidade neuronal, incluindo a regulação negativa da liberação de dopamina. O uso repetido de drogas leva a uma hiperativação da via D1R e a uma diminuição da expressão e sensibilidade dos D2R, resultando em desequilíbrio entre as vias direta e indireta do STR (KOOB; VOLKOW, 2016). Essa alteração favorece a atribuição exagerada de saliência às pistas associadas à droga, ao mesmo tempo em que reduz o controle inibitório e a sensibilidade às recompensas naturais, contribuindo para o desenvolvimento da busca compulsiva e da recaída durante a abstinência.

Além de promover modificações na liberação de DA e em seus receptores, a cocaína também altera a liberação de outros neurotransmissores como serotonina, catecolaminas (norepinefrina e epinefrina), além de alterar a regulação promovida por GABA e glutamato (MARTÍN-GARCÍA et al., 2016). Sabendo que o cérebro é majoritariamente controlado por essas duas últimas neurotransmissões, uma vez que possuem uma alta densidade em todas as regiões cerebrais, a inibição promovida pela cocaína da liberação de GABA e a consequente intensificação da liberação de glutamato caracterizam esse transtorno por uma hiperativação do sistema – pelo menos inicial – que explica diversos comportamentos como hiperlocomoção, sensibilização comportamental e aumento dos processos mnemônicos (TZSCHENTKE; SCHMIDT, 2003).

Assim como, a adicção envolve a formação de memórias associativas entre os efeitos da droga e os estímulos ambientais, essas memórias dependem de plasticidade sináptica, como long term potential e long term depression (LTP e LTD), relacionadas ao fortalecimento ou enfraquecimento daquelas conexões, respectivamente. Nesses processos o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido. Durante a exposição repetida de drogas de abuso ocorre um aumento da liberação do glutamato em regiões do circuito de recompensa (ATV, NAc e PFC), assim como mudanças nos receptores glutamatérgicos e na maquinaria relacionada à essa neurotransmissão, com os transportados vesiculares (VGLUTs).

Um exemplo dessas adaptações é a alteração dos espinhos dendríticos, estruturas presentes nos dendritos associados à neuroplasticidade, que facilitam a comunicação entre esses neurônios (NESTLER, 2013; SEGAL, 2017). A cocaína parece aumentar a conectividade dopaminérgica no NAc por meio do incremento dos espinhos dendríticos (DOS SANTOS et

al., 2018), o que poderia explicar a facilitação dessa via. Relacionado à formação de espinhos está o fator neutrófico derivado do cérebro (BDNF), implicado na neurogênese, neuroplasticidade e funcionamento cognitivo (NAMBA et al., 2021). O BDNF está envolvido em alterações neuroadaptativas nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, liberado no consumo e manutenção da dependência de cocaína (PITTS; TAYLOR; GOURLEY, 2016)

Os fatores de transcrição também indicam essa regulação da expressão de genes após a exposição repetida às drogas. Esses fatores possuem distintos padrões de expressão dependentes das fases do TUS. Especificamente formada por cFos, FosB e Δ FosB, são marcadores de ativação de neural, indicando as regiões recrutadas e suas modificações. Injeções agudas de cocaína aumentam cFos e FosB (RNAm e proteína) no estriado, ao contrário do Δ FosB que não sofre variação em seus níveis durante exposições agudas, já em resposta a injeções crônicas ocorre a elevação desse marcador, além dele ter sido considerado um componente crítico na recaída (ARJMAND et al., 2024). Esses fatores diminuem durante as fases de retirada, porém também aumentam frente a pistas contextuais relacionadas à substância, se mostrando mais uma vez importantes no entendimento das diferentes fases da adicção.

Todas essas adaptações neurais mal adaptativas frente a exposições repetidas à droga contribuem para o reforço negativo, em que o uso passa a se relacionar não mais ao sentimento de prazer e sim à necessidade de não sentir os efeitos negativos ou de abstinência da substância, mudando do cenário inicial para comportamentos de compulsão, ansiedade, irritabilidade e agressividade, que levam o indivíduo a querer parar o uso, caracterizando o TUC (KOOB, 2021).

1.4 Estudo do TUS em animais experimentais

Modelos experimentais em roedores são fundamentais para compreender os mecanismos do TUS. Entre as alterações comportamentais mais investigadas estão o aumento da atividade locomotora, a sensibilização ao efeito da droga, a ativação do sistema de recompensa em contextos associados ao uso e comportamentos de busca ou abstinência (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). O modelo de autoadministração permite estudar a motivação e o controle do uso, já que o próprio animal aprende a obter a droga ao realizar uma resposta operante. Esse modelo revelou comportamentos análogos aos critérios diagnósticos de dependência em humanos, como dificuldade de cessar o uso, alta motivação e persistência diante de punição, além de ter apresentado resultados em porcentagem parecidos com os

reconhecidos para humanos em relação aos níveis de adicção (DEROCHE-GAMONET, VÉRONIQUE; BELIN; PIAZZA, 2004).

A atividade locomotora é frequentemente avaliada no teste de campo aberto (Arena), que permite observar o aumento agudo da locomoção induzido por estimulantes ou as alterações após uso repetido, como a sensibilização comportamental – importante no estudo de neuroadaptações. A influência de estímulos contextuais associados à droga é investigada pelo modelo de Preferência Condicionada ao Lugar (PCL), que avalia a memória contextual e o valor recompensador atribuído ao ambiente relacionado ao uso (BARDO; BEVINS, 2000; HUSTON et al., 2013).

1.5 Envolvimento do Sistema Endocanabinoide com o TUS

Nesse sentido, o Sistema Endocanabinoide (SE) tem sido alvo de estudo uma vez que é um dos principais sistemas reguladores do cérebro, assim como da via de recompensa. Ele foi descoberto a partir da planta *Cannabis sativa* e o isolamento dos seus principais constituintes, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD) (MECHOULAM; PARKER, 2013). A partir disso, a neurotransmissão dos ligantes endógenos, os endocanabinoides Anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) começou a ser investigada. Sintetizados sob-demanda a partir de fosfolipídios de membrana nos neurônios pós-sinápticos, após o influxo de cálcio, interagem com os CB₁R e CB₂R de forma retrógrada nos terminais pré-sinápticos. AEA também ativa os canais do tipo 1 do potencial receptor transitório vaniloide (TRPV1) e é metabolizada pela hidrolase de amida de ácido graxo (FAAH), já o 2-AG é decomposto pela monoacilglicerol lipase (MAGL) em ácido araquidônico e glicerol (Fig. 6) (BATISTA et al., 2014). Essa disposição anatômica e funcional confere ao SE a capacidade de modular a atividade neuronal e desempenhar papel essencial na regulação de processos emocionais, de aprendizagem e mecanismos relacionados ao TUS (MOREIRA; LUTZ, 2008).

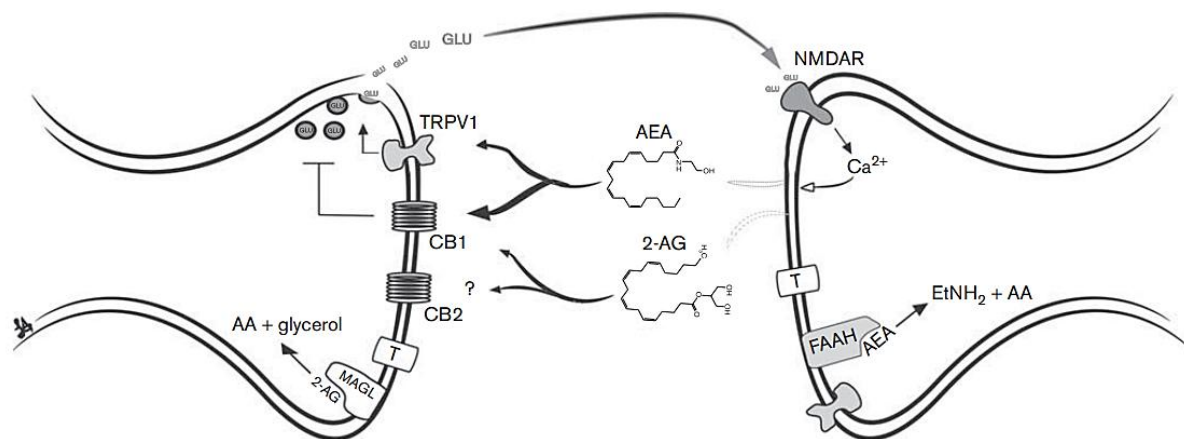


Fig. 6: Representação simplificada do sistema endocanabinoide e seus principais componentes. AEA = anandamida, 2-AG = 2-araquidonoilglicerol, CB1 = receptor canabinoide do tipo 1, CB2 = receptor canabinoide do tipo 2, FAAH = hidrolase de amida de ácido graxo, MAGL = monoacilglicerol lipase, AA = ácido araquidônico, GLU = glutamato, NMDAR = receptor de N-metil-D-aspartato, TRPV1 = receptor transitório vaniloide (BATISTA et al., 2014).

O SE está amplamente distribuído pelo encéfalo, o que lhe permite exercer influência moduladora sobre diferentes sistemas de neurotransmissão, incluindo o sistema dopaminérgico, ainda que os receptores canabinoides não estejam diretamente expressos nos terminais pré-sinápticos dopaminérgicos presentes no NAc. Nessa região, os endocanabinoides podem ser liberados por neurônios pós-sinápticos e atuar retrogradamente sobre receptores localizados em terminais glutamatérgicos e gabaérgicos, modulando indiretamente a liberação de dopamina (MONORY; DE AZUA; LUTZ, 2025; ROBBINS; ERSCHKE; EVERITT, 2008).

De forma mais ampla, o SE exerce um papel crucial na regulação dos circuitos neurobiológicos subjacentes à adicção, configurando-se como um alvo promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas ao tratamento dos TUS (LEE et al., 2017; MALDONADO; VALVERDE; BERRENDERO, 2006; MANZANARES et al., 2018; MOREIRA; LUTZ, 2008) o que tem sido amplamente estudado pelo nosso grupo de pesquisa (ASTH; SANTOS; MOREIRA, 2022; GOBIRA et al., 2015; LOPES et al., 2020; MOREIRA; LUTZ, 2008).

Variações nos níveis de endocanabinoides foram observadas em indivíduos com uso crônico de cocaína. Elevações nas concentrações de 2-AG, bem como uma correlação positiva entre esse endocanabinoide e o receptor metabotrópico do glutamato tipo 5 (mGluR5), foram associadas aos processos de LTD (KROLL et al., 2023). O envolvimento dos endocanabinoides não se restringe à regulação de curto prazo da força sináptica e à autorregulação neuronal, mas

estende-se também à modulação de formas duradouras de plasticidade sináptica, como a LTD da liberação de glutamato em regiões encefálicas como o NAc e o STR dorsal — fenômeno amplamente consolidado na literatura (LUPICA; RIEGEL, 2005).

Adicionalmente, comportamentos motivacionais recrutam a mobilização do 2-AG na ATV (ENGI et al., 2021), endocanabinoide que também desempenha um papel central na modulação da liberação dopaminérgica durante o uso de cocaína, uma vez que sua liberação e a consequente ativação dos CB₁R são necessárias para a transição dos disparos dopaminérgicos de um padrão tônico (basal) para um padrão fásico — caracterizado por rajadas de liberação associadas à presença de drogas de abuso (ENGI et al., 2021; PETERS; OLESON; CHEER, 2021).

1.6 Papel do receptor canabinoide do tipo 1 (CB₁R) no TUS

Especificamente, o CB₁R, até o momento o mais amplamente estudado, encontra-se expresso em praticamente todas as regiões e tipos celulares do encéfalo, incluindo o corpo estriado, hipocampo, cerebelo, córtex e bulbo olfatório. Sua principal função consiste na regulação da neurotransmissão sináptica (MONORY; DE AZUA; LUTZ, 2025). O CB₁R é um receptor acoplado à proteína G inibitória (Gi/o) que, quando ativado, desencadeia uma cascata intracelular que reduz a excitabilidade neuronal, promovendo inibição da atividade sináptica. Essa sinalização retrógrada constitui um mecanismo de retroalimentação negativa e desempenha papel fundamental na plasticidade sináptica de curto e longo prazo (“short- e long-term plasticity”), sendo capaz de modular a liberação de diversos neurotransmissores, como glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina e noradrenalina, entre outros (MONORY; DE AZUA; LUTZ, 2025).

Estudos com camundongos com a deleção específica para o CB₁R evidenciam a importância desse receptor na modulação da plasticidade sináptica, quando feita em neurônios GABAérgicos (GABA-CB₁R-KO) esses animais apresentaram redução LTP no hipocampo, diminuição da ramificação dendrítica e redução da densidade de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais da região CA1. Em contraste, camundongos com deleção do CB₁R em neurônios glutamatérgicos (Glu-CB₁R-KO) exibiram aumento da LTP hipocampal, maior complexidade da arborização dendrítica e incremento na densidade de espinhos dos neurônios piramidais CA1 (MONORY et al., 2015).

Animais com deleção não específica do CB₁R demonstraram que a administração de cocaína não induz o efeito de hiperlocomção nem promove o aumento expressivo na liberação de DA extracelular no núcleo accumbens (NAc), quando comparados a animais que expressam esse receptor (LI et al., 2009). De maneira consistente, o uso de agonistas inversos do CB₁R, como o rimonabanto (SR141716A ou RIM) e o AM251, reduz as respostas motoras e contextuais induzidas pela cocaína, além de atenuar a ativação neuronal medida pela expressão do marcador c-Fos no NAc (GOBIRA et al., 2019; LOPES et al., 2020). Esses compostos também demonstraram capacidade de atenuar efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos por outras drogas de abuso, como nicotina (GAMALEDDIN et al., 2015; SCHINDLER et al., 2016), heroína e metanfetamina (HE et al., 2019) em estudos pré-clínicos.

Apesar de o RIM ter sido aprovado pela Comissão Europeia para o tratamento da obesidade e reconhecido por sua capacidade de mitigar os sintomas de abstinência de nicotina e outras substâncias (LE FOLL; GOLDBERG, 2005), seu uso clínico foi suspenso devido à ocorrência de efeitos adversos significativos, incluindo ansiedade, depressão e aumento da ideação suicida (CHRISTENSEN et al., 2007). Tais manifestações comportamentais também foram observadas em modelos animais com deleção do CB₁R (BADDENHAUSEN; LUTZ; HOFMANN, 2024). Esses achados sustentam a hipótese de que o bloqueio do CB₁R reduz a motivação para a busca de recompensas, incluindo as naturais, podendo induzir estados de anedonia e aumentar a sensibilidade a estímulos aversivos, o que agrava quadros psiquiátricos em indivíduos vulneráveis (HORDER et al., 2010).

Atualmente, sabe-se que os efeitos adversos induzidos pelos agonistas inversos do CB₁R decorrem de sua interferência na atividade constitutiva desses receptores. Mesmo na ausência de ligantes endógenos, o CB₁R exerce regulação tônica sobre diferentes sistemas de neurotransmissão, incluindo os GABAérgicos e glutamatérgicos, em regiões cerebrais associadas ao controle da motivação e das emoções, como a área tegmental ventral (ATV) e a amígdala basolateral (CANALS; MILLIGAN, 2008). Os agonistas inversos, ao se ligarem ao receptor, não apenas bloqueiam a ligação de agonistas endógenos, mas também estabilizam o CB₁R em seu estado inativo, suprimindo sua atividade constitutiva. Essa supressão resulta em efeitos colaterais relevantes, como aumento da ansiedade e redução da motivação por recompensas.

Dessa forma, o presente estudo foi delineado para testar a hipótese de trabalho de que a administração de um antagonista do CB₁R — que bloqueia seletivamente a interação de ligantes endógenos sem comprometer a atividade constitutiva do receptor — pode apresentar maior

eficácia e segurança em atenuar os efeitos da cocaína, minimizando os efeitos adversos observados com o uso de agonistas inversos.

2. Justificativa

Para testar a hipótese do presente estudo, o fármaco de escolha foi o AM4113, um antagonista do CB₁R estruturalmente análogo ao RIM, pertencente à classe das pirazol-3-carboxamidas (SINK et al., 2008). Esse composto apresenta afinidade elevada pelo CB₁R, com valor de K_i de $0,89 \pm 0,44$ nM, e exibe seletividade aproximadamente 100 vezes maior para esse receptor em comparação ao CB₂R. Além disso, o AM4113 é cerca de dez vezes mais potente que o RIM (Fig. 7) (CHAMBERS et al., 2007; JÄRBE et al., 2008; SINK et al., 2008).

Assay	AM4113	AM251	SR141716A
<i>CB1 binding K_i</i>	0.89±0.44	3.43±1.5	10.00±0.79
95% confidence intervals	(0.64, 1.2)	(2.67, 4.45)	(7.15, 14.08)
<i>r-Value</i>	0.936	0.953	0.944
<i>hCB2 binding K_i</i>	92±6.9	124±10	931
95% confidence intervals	(54, 160)	(94, 1622)	(671, 1291)
<i>r-Value</i>	0.931	0.964	0.956

Fig. 7: Tabela com dados de ligação CB₁R e CB₂R para AM4113, AM251 e SR141716A. Os valores de K_i estão em nM +- SD de 2 a 7 ensaios realizados em duplicata (mostrados com intervalos de confiança de 95% e valor de r^2) (SINK et al., 2008).

Diferentemente do RIM, o AM4113 não alterou o acúmulo de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) estimulado por forskolina em células HEK-293 (Sink *et al.*, 2008). Considerando que a ativação do CB₁R por agonistas normalmente inibe a formação de AMPC — em virtude de seu acoplamento à proteína G inibitória (Gi/o) —, o aumento dos níveis de AMPC induzido pelo RIM evidencia sua ação como agonista inverso. Tal propriedade está associada à estabilização preferencial do receptor em seu estado inativo e à consequente redução da atividade constitutiva, mecanismos relacionados aos efeitos adversos sobre o humor descritos para os agonistas inversos do CB₁R.

Embora ambos os compostos se liguem ao mesmo sítio ortostérico do CB₁R — o mesmo local de ligação do Δ^9 -THC e da AEA — e, portanto, atuem como antagonistas competitivos, a

natureza das interações químicas entre cada ligante e os resíduos de aminoácidos do receptor difere significativamente. O RIM, em virtude de sua estrutura química, induz uma torção conformacional no CB₁R que estabiliza sua forma inativa ($\uparrow R^*$), “travando” o receptor e reduzindo sua atividade constitutiva (Fig. 8). Em contraste, o AM4113 apenas ocupa o sítio de ligação sem promover alterações conformacionais relevantes, não modificando, portanto, o equilíbrio entre os estados ativo e inativo do receptor (R/R^*).

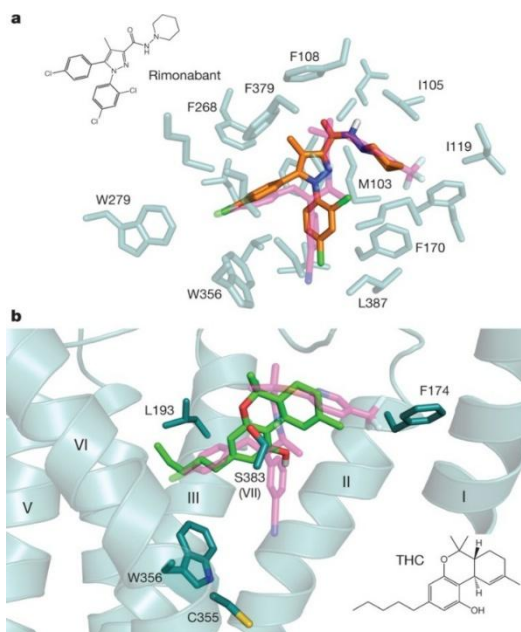


Fig. 8: Diferenças do efeito conformacional do receptor após interação com ligantes. THC = agonista CB₁R, Rimonabant = RIM, agonista inverso CB₁R (SHAO et al., 2016).

Em estudos pré-clínicos com AM4113, não foram observados efeitos colaterais significativos, como náusea, mal-estar ou comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão, sugerindo um perfil de segurança aprimorado em comparação aos agonistas inversos (CHAMBERS et al., 2007; JÄRBE et al., 2008; SINK et al., 2008). Além disso, o AM4113 atenuou a autoadministração de nicotina e Δ^9 -THC (GUEYE et al., 2016; SCHINDLER et al., 2016), bem como de heroína, sem induzir efeitos do tipo depressivo (HE et al., 2019). E também demonstrou eficácia na redução dos efeitos do álcool (BALLA et al., 2018; DULMAN et al., 2021).

Em relação aos efeitos secundários, não foram observados efeitos do tipo-ansioso (JÄRBE et al., 2008; SINK et al., 2010a). E contrariamente, foram observados efeitos semelhantes aos dos antidepressivos (GUEYE et al., 2016). Recentemente, outro antagonista do CB₁R, o PIMSR, também demonstrou eficácia na redução da autoadministração de cocaína, sem produzir efeitos recompensadores, aversivos ou adversos significativos per si (GALAJ et

al., 2022). Assim como o AM6527 foi capaz de diminuir a auto-administração de cocaína e heroína (SOLER-CEDENO et al., 2024; SOLER-CEDENO; XI, 2022) sem alterar recompensa induzida por estimulação elétrica cerebral em ratos ou induzir PCL ou aversão condicionada ao lugar em camundongos, indicando não possuir efeito recompensador ou aversivo e, portanto, não produzir efeitos depressivos semelhantes aos do RIM.

Neste sentido, avaliamos os efeitos do AM4113 em animais experimentais a partir de testes comportamentais relacionados aos efeitos da cocaína como o aumento da atividade locomotora, e sensibilização comportamental, condicionamento ao contexto, bem como os efeitos plásticos induzidos pela cocaína e alterações na expressão gênica de alvos relacionados ao TUS. Além disso, avaliamos os possíveis efeitos secundários em testes que avaliam comportamentos relacionados a ansiedade e depressão.

3. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo geral testar a hipótese de que o antagonismo do CB₁R resulta na atenuação das respostas comportamentais, celulares e moleculares induzidas pela cocaína em camundongos machos e fêmeas, sem a indução de efeitos secundários adversos relacionados a ansiedade e depressão.

Como objetivos específicos:

- 1) Avaliar a indução dos efeitos locomotores agudos e prolongados, bem como os efeitos relacionados à memória associados ao uso de cocaína, por meio da aplicação de testes comportamentais em camundongos machos e fêmeas.
- 2) Investigar se o pré-tratamento com o antagonista do receptor canabinoide do tipo 1 (CB₁R), o AM4113, é capaz de reduzir os efeitos comportamentais induzidos pela administração de cocaína.
- 3) Quantificar a liberação do neurotransmissor glutamato no HPC e STR utilizando a técnica de sinaptossoma, com o intuito de verificar se o AM4113 reverte os efeitos neuroquímicos decorrentes da administração aguda de cocaína.
- 4) Analisar a densidade e morfologia de espinhos dendríticos em regiões cerebrais relacionadas à plasticidade sináptica — HPC, CPF e STR — após o teste de preferência condicionada ao lugar (PCL).
- 5) Avaliar a expressão de genes-alvo relacionados ao transtorno e ao tratamento no STR de animais submetidos ao protocolo de sensibilização comportamental, a fim de caracterizar as neuroadaptações induzidas pela cocaína, com e sem o pré-tratamento com AM4113.

4. Material e métodos

4.1. Animais

Camundongos C57BL/6J, machos e fêmeas (20–25 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram alojados em grupos de dez animais por caixa em uma sala a uma temperatura constante de $24 \pm 2^\circ \text{C}$ e um ciclo claro/escuro de doze horas, com livre acesso à água e comida. Quando completaram de 8-9 semanas, os animais foram alocados na sala de experimentação pelo menos 1 hora antes dos procedimentos para habituação. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA: 200/2022 e 262/2023).

4.2. Drogas

O antagonista do CB₁R, AM4113 (Fig.9 - Cayman Chemical Co.) foi utilizado nas doses de 0,3, 1, 3, e 10 mg/kg, a diluição foi feita em cremophor, etanol e solução fisiológica na proporção de 1:1:18 e administrado trinta minutos antes da cocaína (BALLA et al., 2018; DULMAN et al., 2021; JÄRBE et al., 2008). A dose utilizada de cocaína (Merck & Co., Inc.) foi de 15 mg/kg, diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e administrada sempre imediatamente antes da exposição ao teste. Todas as substâncias foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 ml/kg de animal.

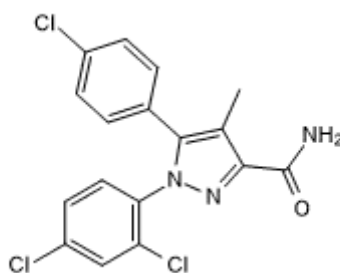


Fig. 9: Estrutura química do composto AM4113 (N-[(1S)-1-(2,4-diclorofenil)-2-(1-metil-1H-indol-3-il)etil]carboxamida), antagonista seletivo do CB₁R.

4.3. Testes comportamentais:

a. Hiperatividade motora na Arena

A hiperlocomoção induzida por cocaína foi avaliada por 20 minutos (min) após 10 min de exploração livre em uma arena circular (ASTH et al., 2021). Os animais foram tratados com AM4113 (0,3, 1, 3 e 10 mg/kg) ou veículo 30 min antes da cocaína, que foi administrada com 10 min de teste. A atividade motora foi gravada com uma câmera de vídeo e analisada pelo software Anymaze (versão 8.0), assim como nos seguintes testes.

b. Sensibilização comportamental

A sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento progressivo da atividade locomotora, após administrações repetidas de uma mesma dose de uma substância. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e foi avaliada a distância total percorrida por 30 min. Nos dias um e dois os animais foram habituados no aparato, sem nenhuma administração de droga, e sua exploração basal foi registrada. Dos dias 3 ao 7, foram administrados AM4113 (0,3, 1 e 3 mg/kg) ou veículo, trinta minutos antes da cocaína (15 mg/kg i.p.) ou veículo, e imediatamente após os animais foram expostos ao aparato e a locomoção foi registrada e quantificada (ASTH et al., 2021; LOPES et al., 2020).

c. Hiperlocomoção condicionada

Outra forma de avaliar as mudanças plásticas induzidas por uma droga de abuso é através da hiperlocomoção condicionada, uma vez que o animal é capaz de apresentar alterações locomotoras ao ser exposto ao contexto associado à droga mesmo após alguns dias. Logo após a sensibilização, os animais permaneceram em suas caixas de origem sem administração de droga durante os dias 8 e 9. No 10º dia todos os animais receberam solução salina e foram reexpostos ao aparato para avaliação da atividade locomotora condicionada ao contexto (arena) por 30 minutos (ASTH et al., 2021).

d. Preferência Condicionada ao Lugar (PCL)

A PCL induzida por cocaína é utilizada para avaliar a capacidade recompensadora de uma droga e sua associação com pistas contextuais, paradigma baseado no condicionamento Pavloviano (BARDO; BEVINS, 2000; HUSTON et al., 2013). Foi utilizada uma caixa de acrílico com dois compartimentos conectados por um corredor central, com características distintas nas paredes (listras verticais ou horizontais) e pisos (grade ou bolinha). Nos dias 1 e 5, cada animal foi colocado no corredor central com acesso livre aos compartimentos da caixa por 15 min e a preferência basal do animal por cada compartimento foi analisada. Durante a fase de condicionamento (2 a 4), eles receberam injeções de veículo pela manhã e cocaína a tarde (do lado de menor preferência) imediatamente antes da exposição ao compartimento específico da caixa, onde permaneceram por 30 min. Para verificar efeitos durante a aquisição e expressão da PCL, o AM4113 foi administrado 30 minutos antes de cada injeção de cocaína ou do teste, respectivamente. O tempo gasto em cada compartimento foi analisado e os dados foram expressos como pontuações em porcentagem, definido como o tempo gasto no compartimento pareado com a cocaína menos o tempo gasto no compartimento pareado ao veículo, multiplicado por cem, dividido pela soma dos tempos gastos nos dois compartimentos, tanto do dia do teste quanto do dia do pré-teste (BRIÂNIS et al., 2023).

e. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE foi conduzido conforme descrito anteriormente (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Este aparato é utilizado para avaliar comportamento tipo-ansioso, uma vez que roedores naturalmente evitam espaços abertos ao mesmo tempo que possuem comportamento explorador, compostos ansiolíticos aumentam a exploração desses braços e ansiogênicos diminuem, sem alterar o número de entradas nos braços fechados. Consiste em dois braços abertos opostos cruzados em por dois braços fechados por paredes, elevados a 50 cm acima do nível do chão. Cada animal pode explorar livremente por 5 min. Neste teste somente o efeito do AM4113 foi avaliado 30 min antes da exposição. Foram avaliados os parâmetros: porcentagem de tempo nos braços abertos, de entrada nos braços abertos e nos braços fechados, além do valor absoluto de entradas no braço fechado.

f. Teste de suspensão pela cauda (TST)

Utilizado para avaliação de comportamento do tipo-depressivo, esse teste avalia a imobilidade do animal após ser suspenso pela cauda com uma fita adesiva em uma superfície a 50 cm do chão (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). O teste foi filmado por uma câmera de vídeo por seis minutos e somente durante os quatro minutos finais a imobilidade do animal foi avaliada manualmente por um avaliador cego em relação aos grupos, quanto maior o tempo de imobilidade maior o comportamento tipo-depressivo, comparado com o grupo controle.

g. Teste de nado forçado (FST)

Semelhante ao teste anterior e, também, utilizado para avaliação de comportamento do tipo-depressivo, esse teste avalia a imobilidade do animal forçado a nadar. Composto por um béquer de vidro redondo (18cm de diâmetro) 5L com água morna ($25 \pm 0,5$ °C), o teste foi filmado por uma câmera de vídeo por seis minutos e somente durante os quatro minutos finais da imobilidade do animal foi avaliada manualmente, por um avaliador cego em relação aos grupos. Quanto maior o tempo de imobilidade maior o comportamento tipo-depressivo, comparado com o grupo controle, compostos antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade e os depressiogênicos aumentam esse tempo (HÄRING et al., 2013).

4.4. Análises celulares

a. Sinaptosoma

Para avaliação imediata dos níveis de glutamato e de cálcio, por meio de um ensaio com sinaptossomas, os animais foram eutanasiados após administração de veículo ou cocaína, e pré-tratamentos, veículo ou AM4113, realizados 30 minutos antes - assim como nos testes comportamentais, com tamanho amostral variando de 5-6 animais por grupo/sexo. O hipocampo e o corpo estriado foram removidos e homogeneizados em uma solução gradiente contendo 320 mM de sacarose, 0,25 mM de ditiotritol e 1 mM de EDTA. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 1000 g por 10 minutos. Os sinaptossomas foram isolados do

sobrenadante por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll. Os terminais neuroniais isolados (10 mg/mL) foram ressuspensos em solução de Krebs-Ringer-HEPES (KRH) (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM glicose, 25 mM HEPES, pH 7,4), sem adição de CaCl₂. Aliquotas de 30 µL foram preparadas e mantidas em gelo até o momento do uso.

Para quantificar a liberação contínua de glutamato, foi realizado um ensaio fluorimétrico contínuo utilizando um fluorímetro (Synergy TM2, Biotek®). A emissão de fluorescência foi registrada em comprimento de onda de excitação de 360 nm e emissão de 450 nm. A liberação de glutamato foi medida indiretamente, acompanhando o aumento da fluorescência devido à formação de NADPH na presença de glutamato desidrogenase tipo II e NADP⁺. Brevemente, os sinaptossomos foram incubados em meio KRH contendo 1 mM de CaCl₂ e 1 mM de NADP⁺ por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionadas 50 unidades de glutamato desidrogenase por poço. A despolarização foi induzida pela adição de 33 mM de KCl. A curva de calibração foi obtida pela adição de 5 unidades de glutamato (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ao meio de reação. Os níveis de glutamato foram normalizados em relação à quantidade total de proteína por poço (LIMA et al., 2024).

b. Quantificação relativa por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os estriados dos animais submetidos ao protocolo de sensibilização comportamental e ao teste subsequente hiperlocomoção condicionada foram dissecados e o RNA total foi extraído conforme descrito (JÚNIOR et al., 2025a). A concentração e pureza do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop. A transcrição reversa foi realizada utilizando primers oligo (dt)\ (20) (Prodimol Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil), mistura de dNTP mix (10mM), Reaction Buffer 5x (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) e M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Biotecnologia, São Paulo, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. As quantificações relativas de expressão gênica foram calculadas pelo método delta-delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$). O gene de referência utilizado foi GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase). A tabela 1 descreve as sequências (5'→ 3') dos primers dos genes-alvo utilizados nesse estudo (JÚNIOR et al., 2025b; MARTINS DE CARVALHO et al., 2019).

Tabela 1: Primers usados para RT-qPCR:

GENE	FORWARD	REVERSE
<i>GAPDH</i>	AGGAGCGAGACCCCACTAAC	GTGGTTCACACCCATCACAA
<i>Drd1</i>	GAGTCGGGGAGTGGTCT	CAATCTCAGTCACTTTTCGGGG
<i>Drd2</i>	GCCAACCTGAAGACACCACTCA	CTTGACAGCATCTCCATTTCCAG
<i>BDNF</i>	AGTGGAGCCGAACAACTGATT	CGTTTACTTCTTTCATGGGCG
<i>Cnr1</i>	AGGTGAAGATTAAGCCCACAAC	CCGGTGTAGACAACCTCTCTCC
<i>Cnr2</i>	ACGGTGGCTTGGAGTTCAAC	GCCGGGAGGACAGGATAAT
<i>Gabbr1</i>	TCCACCAACAACAATGAGGA	GATGGCGCAGTTCAGAGAC
<i>Gabbr2</i>	GAGGACATCAACTCCCCAGA	CTGGCTGTAGGGCTGACAC
<i>COMT</i>	GTGCTTTGAAGATGCCGGAG	GTGTGCTTTGCATTTAGGACA
<i>DAT</i>	GGTGCTGATTGCCTTCTCCAGT	GACAACGAAGCCAGAGGAGAAG

c. Técnica de impregnação de Golgi-Cox:

Imediatamente após PCL, realizamos a perfusão transcardíaca nos animais anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina. A cavidade torácica foi aberta a fim de expor o coração, uma agulha acoplada a uma bomba peristáltica foi inserida no ventrículo esquerdo e a veia cava foi seccionada. O animal foi perfundido com 20 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 15 ml de paraformaldeído (PFA) 4%. Concluída a perfusão, o encéfalo foi retirado e mantido em PFA 4% durante a noite. Após esses procedimentos, os encéfalos foram submersos em PBS novamente por 48h e mantidos a 4°C até a realização da a técnica de impregnação de Golgi-Cox de acordo com as recomendações do kir (Bioenno Tech), para avaliação dos espinhos dendríticos em neurônios piramidais do CPF e da área CA3 do HPC ventral e em neurônios espinhosos médios (MSNs) do STR conforme descrito (FERNANDES et al., 2025; SANTOS et al., 2011).

4.5. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste Shapiro–Wilk para se determinar o perfil de distribuição do tipo gaussiana (distribuição normal). Os resultados dos testes de RT-PCR foram submetidos à análise de Student’s t-test (two-tailed). Para outras análises a variância (ANOVA) de uma ou duas vias, de acordo com o número de fatores analisados, seguidos do teste post-hoc de acordo

com as comparações entre os grupos, de Tukey (comparação entre todos os grupos – quando tivemos grupos controle e cocaína para comparações) ou Dunnett (comparação somente com o grupo cocaína). O nível de significância foi considerado de 5% ($p < 0,05$) e os dados são apresentados como média e erro padrão da média (S.E.M.). Todas as análises estatísticas e elaborações gráficas foram realizadas com o software GraphPad Prism 9.

Uma visão geral dos experimentos realizados e dos grupos experimentais pode ser observada na Fig. 10 a seguir:

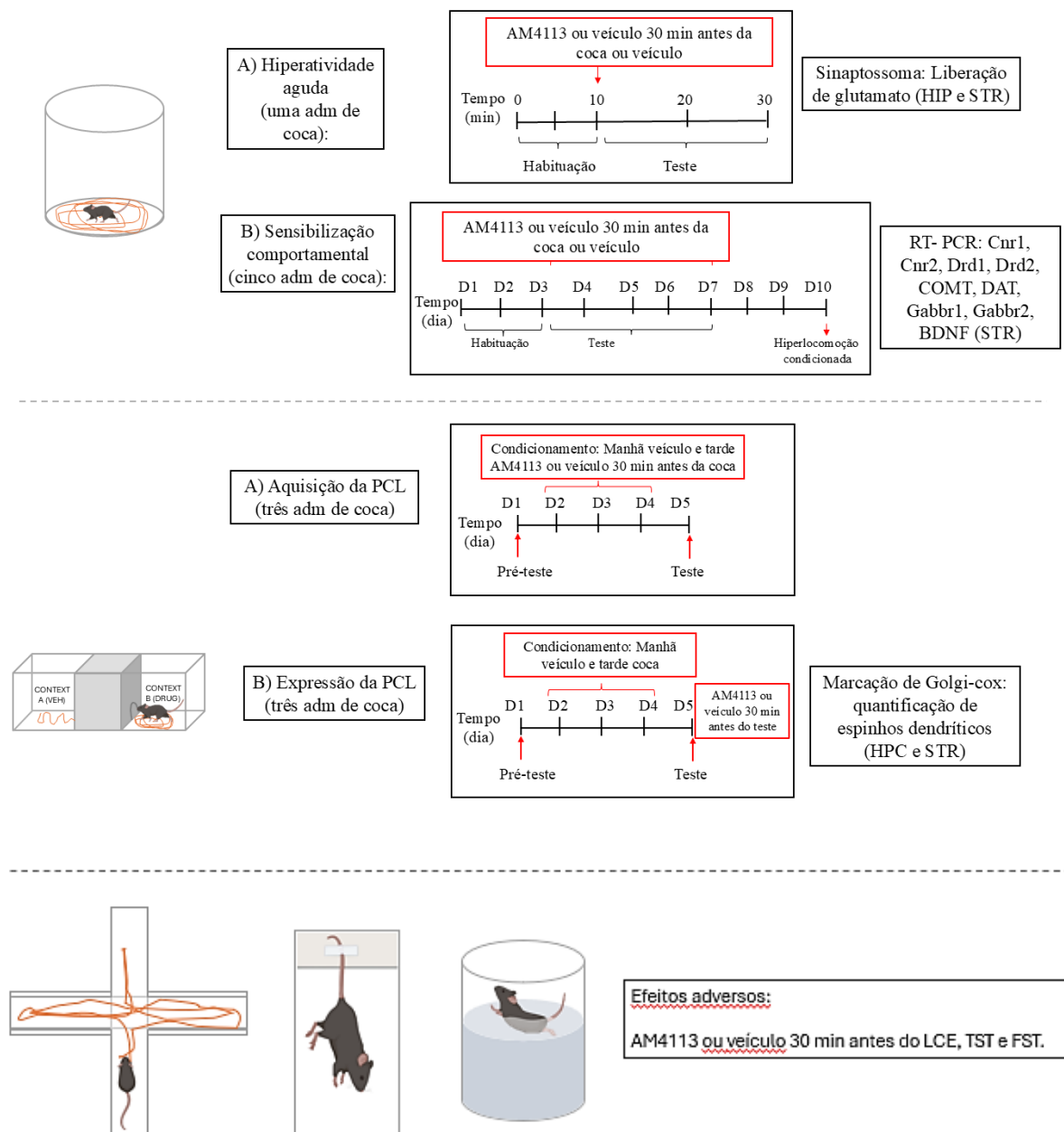


Fig.10: Desenho experimental.

5. Resultados:

5.1. AM4113 (10 mg/kg) inibiu a hiperlocomoção aguda induzida por cocaína no campo aberto, porém induziu hipolocomoção basal.

Primeiramente, avaliamos os efeitos do AM4113 (0,3; 1; 3 e 10 mg/kg via i.p.) na hiperlocomoção aguda induzida por cocaína, todos os grupos diminuíram a distância percorrida durante a habituação, como esperado. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de pós teste Tukey revelaram diferença entre os grupos fator tempo [$F(3,651, 284,8) = 78,40$, $p < 0,0001$], tratamento [$F(5, 78) = 10,22$, $p < 0,0001$] e interação entre eles [$F(145, 2262) = 7,714$, $p < 0,0001$]. A hiperlocomoção foi induzida em todos os grupos que receberam cocaína, comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$). E o pré-tratamento com AM4113 (10 mg/kg) reduziu esse efeito ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo cocaína (Fig. 11A) na análise geral de comparação do efeito entre as médias das colunas, com efeito ressaltado dos minutos 10 ao 16.

A distância total percorrida (gráfico em barras), somente dos 20 min finais, também revelou hiperlocomoção em todos os grupos que receberam cocaína [ANOVA de uma via, $F(5, 76) = 16,31$; $p < 0,0001$], exceto para AM4113 (10 mg/kg) em relação ao grupo cocaína [$F(5, 109) = 10,50$, $p < 0,0001$; Fig. 11B].

Apesar disso, quando realizamos os experimentos controle desses compostos sem cocaína em um grupo experimental extra e avaliamos somente os 20 últimos minutos, foi verificada diferença significativa para o AM4113 (10 mg/kg) sugerindo hipolocomoção basal [$F(4,45) = 10,4$, $p < 0,0001$; Fig. 11C].

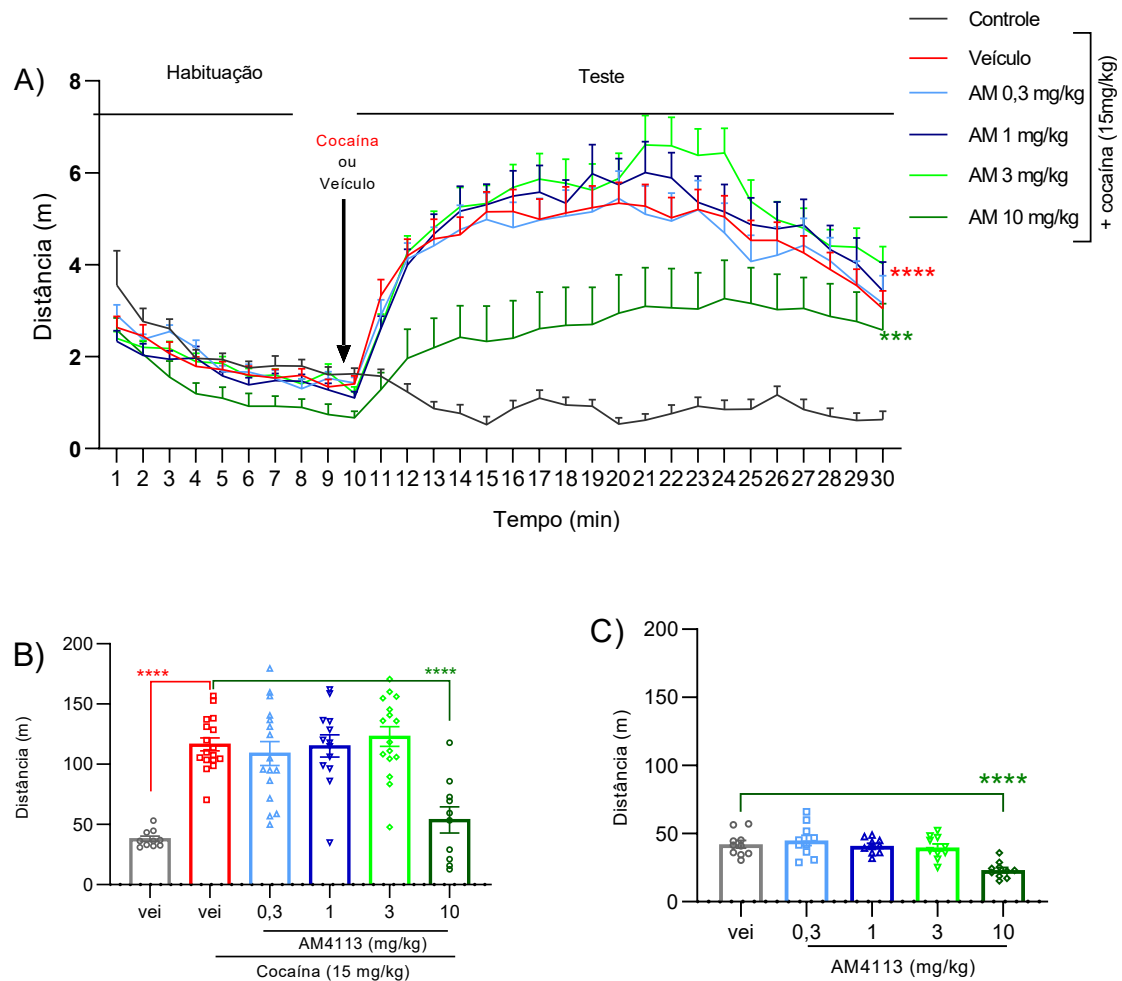


Fig. 11: Efeito do AM4113 (0,3; 1; 3 e 10 mg/kg) na hiperlocomoção induzida por cocaína (15 mg/kg) em fêmeas e machos. A) Distância percorrida por minuto revelando a hiperlocomoção induzida por cocaína e o AM4113 atenuando essa resposta na dose de 10 mg/kg (ANOVA de duas vias seguida de Tukey; $n=10,18,16,13,16,11$ animais/grupo). B) Distância total percorrida. C) Controle da distância total percorrida somente do AM4113 indicando hipolocomoção na dose de 10 mg/kg ($n=10$ animais/grupo). Dados analisados por ANOVA uma via seguida de pós teste Tukey. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p<0.05$ em relação ao grupo controle.

5.2. AM4113 reverte o aumento da liberação de glutamato induzido por cocaína na sinapse no STR e HPC.

Para avaliarmos a participação do sistema glutamatérgico na excitação induzida pela cocaína durante seu efeito agudo, utilizamos um grupo extra de animais e quantificamos a partir de análises de sinaptossoma a liberação do neurotransmissor glutamato na sinapse nas regiões

do A) HPC e B) STR, sem ou com o pré-tratamento com o AM4113 em todas as doses (0,3, 1, 3 e 10 mg/kg).

A ANOVA de uma via seguida de pós teste Tukey revelou diferença no fator tratamento no HPC [$F(5, 67) = 21,05$; $p < 0,0001$], com diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo cocaína ($p < 0,0001$) e entre os grupos tratados em todas as doses comparados ao grupo cocaína ($p < 0,0001$) mostrando que esse efeito foi revertido após o pré-tratamento por todas as doses utilizadas (Fig. 12A). Observou-se resultado semelhante para o STR [$F(5, 62) = 33,22$; $p < 0,0001$] (Fig. 12B).

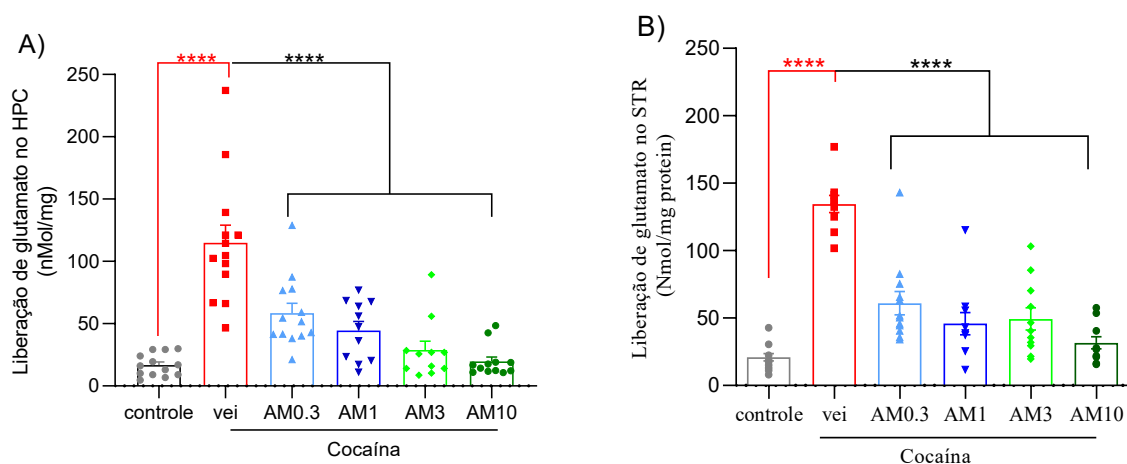


Fig. 12: AM4113 em todas as doses testadas reverte aumento da liberação de glutamato induzido por cocaína A) no HPC (n= 11-12 animais por grupo); e B) no STR (n= 11-13 animais por grupo), de machos e fêmeas. Dados analisados por ANOVA uma via seguida de pós teste Tukey. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle ou cocaína.

5.3. AM4113 (3 mg/kg) atenua a sensibilização comportamental induzida por cocaína.

Para avaliar o efeito prolongado induzido pela cocaína ainda em relação a locomoção, induzimos a sensibilização comportamental e verificamos se o pré-tratamento seria capaz de atenuar esse efeito. Considerando que a maior dose testada induziu hipolocomoção, optamos por excluí-la dessa análise.

A sensibilização foi induzida no grupo cocaína conforme indicado por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste Tukey (fator tempo [$F(3,564, 187,7) = 92,66$]; fator tratamento [$F(4, 54) = 18,55$]; interação tempo x tratamento [$F(24, 316) = 9,648$]). Observou-se aumento

significativo da locomoção nos dias 3 ($p=0,0048$) e 4 ($p= 0,0312$) do grupo coca significativamente maiores comparados ao dia 1 (Fig.13A). O AM4113 (3 mg/kg) atenuou essa resposta no dia 3 ($p=0,0189$) inibindo o desenvolvimento da sensibilização. Além disso, houve indução de hiperlocomoção condicionada para todos os grupos [$F(4, 54) = 9,477$, $p<0,0001$], efeito não revertido AM4113 em nenhuma das doses testadas (Fig.13B).

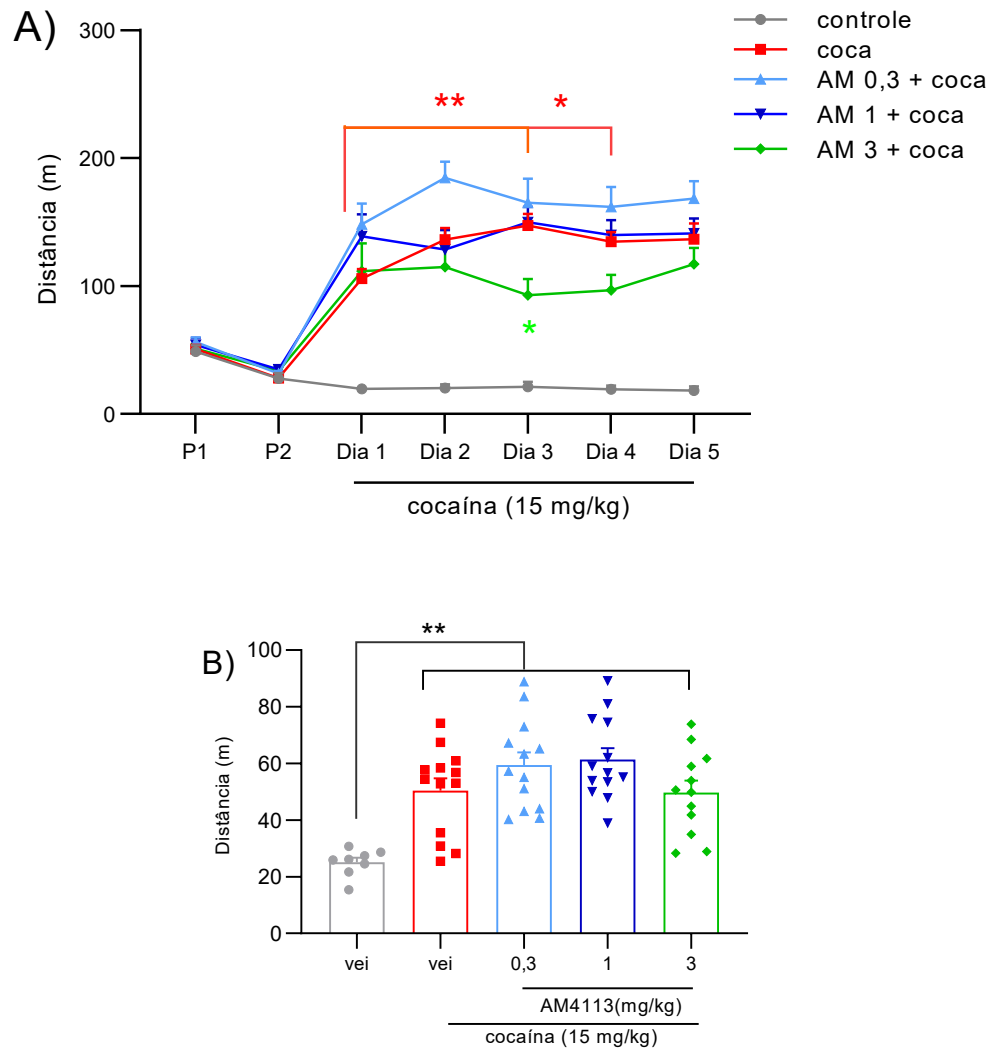


Fig. 13: Efeito do AM4113 (0,3; 1; 3 mg/kg) na sensibilização comportamental induzida por cocaína (15 mg/kg) em fêmeas e machos. A) Distância percorrida por dia revelando aumento de resposta nos dias 3 e 4 e o AM4113 atenuando essa resposta na dose de 3 mg/kg no dia 3 (ANOVA de duas vias seguida de Tukey) $n= 8,13,13,13$ animais/grupo. B) Hiperlocomoção condicionada induzida em todos os grupos que receberam cocaína durante a sensibilização (ANOVA de uma via seguida de Tukey). As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle cocaína, $n= 8-13$ animais/grupo.

5.4. AM4113 restaura parcialmente a alteração de genes avaliados por RT-PCR no STR.

Uma vez que a sensibilização é o nosso maior protocolo de exposição à cocaína, utilizamos os cérebros retirados após a hiperlocomoção condicionada para análises de RT-PCR do estriado desses animais. A fim de verificar a ocorrência de neuroadaptações na via relacionada à recompensa avaliamos os seguintes genes: *Cnr1*, *Cnr2*, *Drd1*, *Drd2*, *COMT*, *DAT*, *Gabbr1*, *Gabrr2*, *BDNF*, Δ FosB (Fig. 14). Todos os gráficos a seguir foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós teste de Tukey para identificação do grupo que obteve diferença em relação ao fator tratamento. Os grupos analisados foram controle, cocaína ou o grupo tratado com AM4113 na dose de 3 mg/kg.

Houve diferença no fator tratamento [$F(2, 13) = 7,264$; $p=0,0076$] para A) *Cnr1* que teve uma diminuição não significativa em relação ao grupo controle, porém que diferiu significativamente do grupo tratado por AM4113 na dose de 3 mg/kg ($p=0,0057$) (Fig. 14A). Assim como para o gene B) *Cnr2* [$F(2, 13) = 7,795$; $p=0,0060$], indicado para um aumento significativo do grupo tratado com AM4113 na dose de 3 mg/kg em relação ao controle ($p=0,0047$), apesar de um aparente aumento no grupo cocaína em relação ao grupo controle (Fig. 14B). Indicando um possível recrutamento desse gene após o bloqueio do CB₁R.

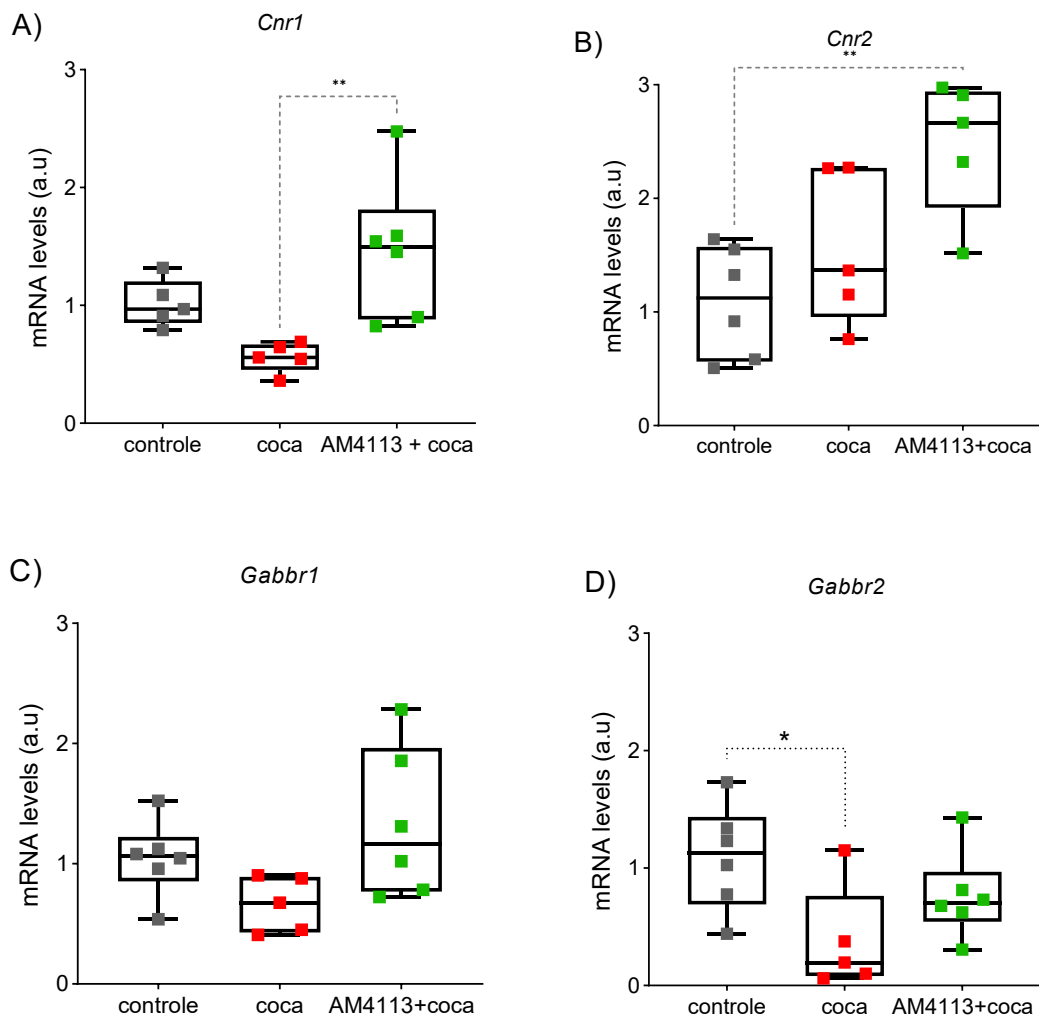
Já em relação aos genes relacionados aos receptores dopaminérgicos *Drd1* e *Drd2* houve indicação de diferença para os dois [$F(2, 13) = 6,633$; $p=0,0103$] e [$F(2, 14) = 12,53$; $p=0,0008$]. Para C) *Drd1*, ocorreu um aumento do grupo cocaína em relação ao controle ($p=0,0392$) e essa diferença foi normalizada no grupo tratado ($p=0,0110$) (Fig. 14C). O contrário foi verificado para D) *Drd2*, em que houve uma diminuição no grupo coca em relação ao grupo controle ($p=0,0140$), efeito também normalizado no grupo tratado ($p=0,0006$) (Fig. 14D).

A expressão gênica das enzimas relacionadas a via dopaminérgica, Catecol-O-Metil Transferase (COMT), responsável pela metabolização da DA e o transportador da DA (DAT), responsável pela recaptação da DA da fenda sináptica, também foram mensuradas. Houve diferença detectada para E) COMT [$F(2, 14) = 6,318$; $p=0,0111$] indicando o aumento do grupo coca para o grupo tratado ($p=0,0088$) (Fig. 14E). Não foi encontrada diferença para nenhum dos grupos para F) DAT [$F(2, 12) = 0,7121$; $p=0,5102$] (Fig. 14F).

Também avaliamos os efeitos nos genes relacionados aos receptores GABAérgicos e apesar de não termos verificada diferença para o G) *Gabbr1* [$F(2, 14) = 3,184$; $p=0,0725$] (Fig.

14G). Para H) *Gabbr2* houve diferença [$F(2, 14) = 3,863$; $p=0,0461$] indicado na uma diminuição significativa do grupo coca em relação ao controle ($p=0,0369$) (Fig. 14H).

Por último, avaliamos genes relacionados a neuroplasticidade como o I) BDNF, em que verificamos diferença [$F(2, 14) = 14,43$; $p=0,0004$] redução significativa no grupo coca em relação ao controle ($p=0,0221$), e um aumento significativo no grupo tratado em relação ao grupo coca, indicando uma normalização dos processos plásticos implicados (Fig. 14I).



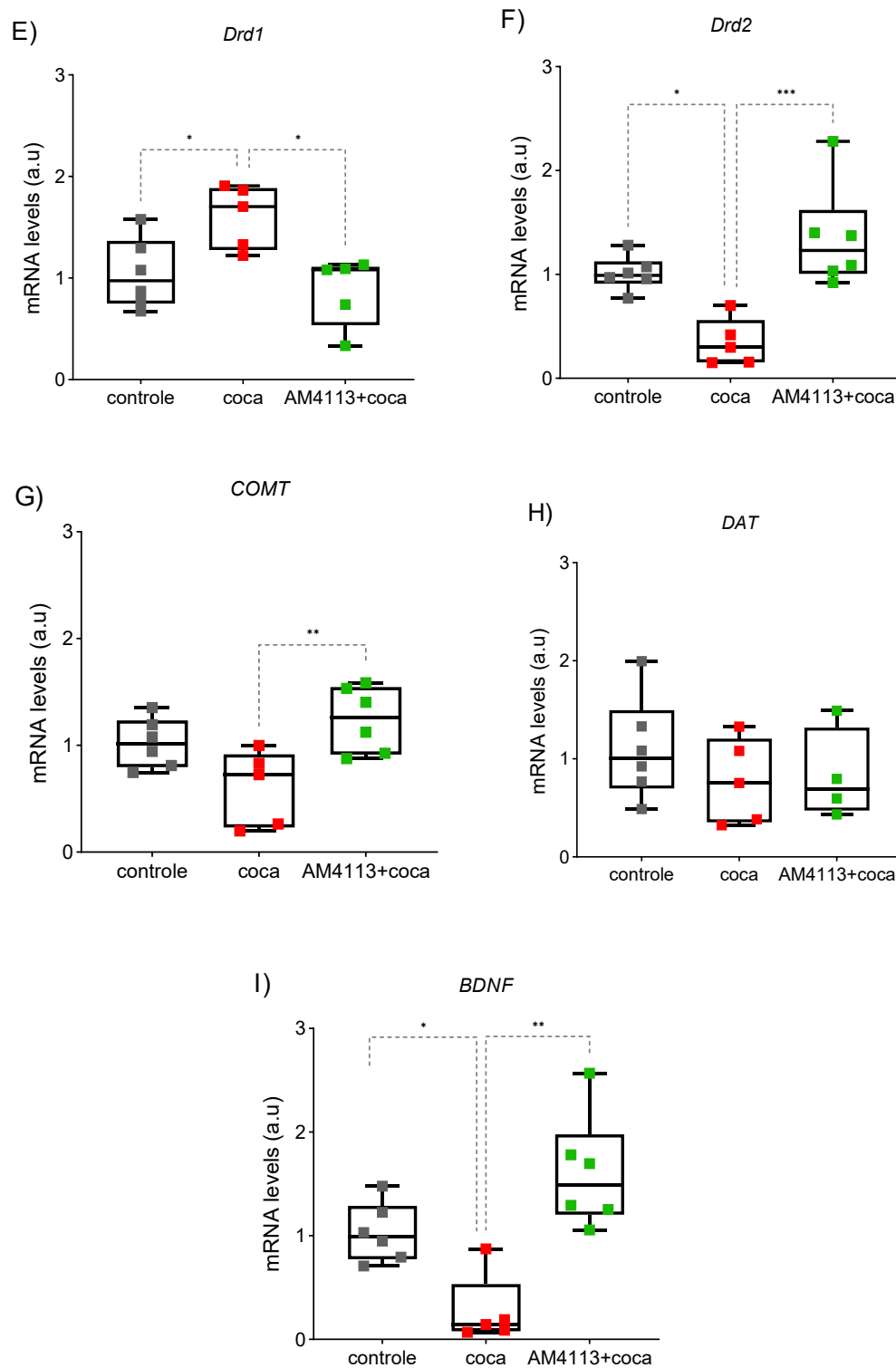
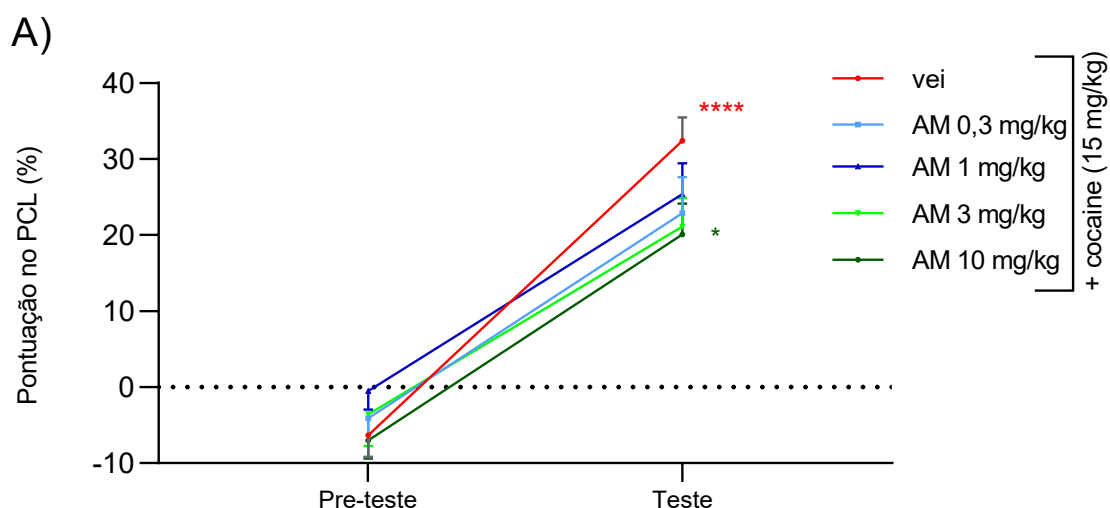


Fig. 14: Quantificações dos níveis de RNAm de genes relacionados a via de recompensa para os diferentes grupos. Sendo os genes: A) *Cnr1* B) *Cnr2* C) *Gabbr1* D) *Gabbr2* E) *Drd1* F) *Drd2* G) *COMT* H) *DAT* e I) *BDNF*. ANOVA de uma via, seguida de Tukey, $n=5-6$ animais/grupo. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p<0.05$.

5.5. AM4113 (10 mg/kg) inibiu aquisição da memória contextual recompensadora no Teste de Preferência Condicionada ao Lugar.

A fim de avaliar o papel do CB₁R nas memórias recompensadoras induzidas por cocaína, utilizamos a PLC com pré-tratamentos em diferentes fases da memória. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou diferença para o fator tempo [$F(1, 103) = 206,7$; $p < 0,0001$] revelada em todos os grupos em relação a indução de preferência do pré-teste para o teste, sem diferença para o fator tratamento [$F(3, 71) = 0,1734$; $p = 0,9141$] ou interação entre os fatores [$F(3, 71) = 0,6853$; $p = 0,5640$].

Além disso, na análise dos dados individuais somente no dia teste a ANOVA de uma via seguida de Dunnett indicou diferença significativa [$F(4, 101) = 2,183$; $p^* = 0,0763$] entre o AM4113 10 mg/kg e o grupo cocaína ($p = 0,0378$) (Fig.15B).



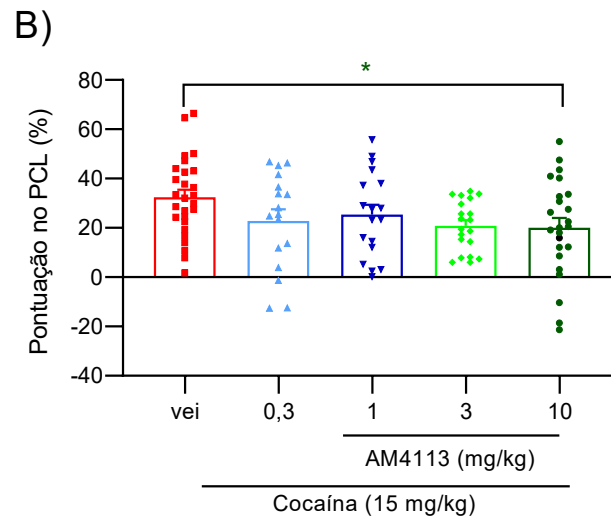


Fig. 15: Efeito do AM4113 (0,3; 1; 3 e 10 mg/kg) na aquisição da PCL induzida por cocaína (15 mg/kg) A) Pré-teste e pós-teste (fêmeas, n= 13,9,9,10,13 e machos, n= 14,8,9,12,13 animais/grupo). ANOVA de duas vias. B) Dados individuais dia teste. ANOVA de uma via seguida de Dunnett. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$ em relação ao pré-teste.

5.6. AM4113 não inibiu expressão da memória contextual recompensadora no Teste de Preferência Condicionada ao Lugar.

Avaliação do tratamento durante a expressão da memória revelou indução de preferência do pré-teste para o teste, indicada para o fator tempo [$F(1, 71) = 33,38$; $p < 0,0001$] para todos os grupos exceto para dose de 0,3 e 3 mg/kg, sem diferença para o fator tratamento [$F(3, 71) = 0,1734$; $p = 0,9141$] ou interação entre os fatores [$F(3, 71) = 0,6853$; $p = 0,5640$] revelada pela ANOVA de duas vias (Fig.16A).

Apesar disso, quando o dia teste foi avaliado separadamente por pontos individuais, não houve diferença em relação ao tratamento e o grupo cocaína [$F(3, 68) = 0,6147$; $p = 0,6079$] revelado pela ANOVA de uma via (Fig. 16B).

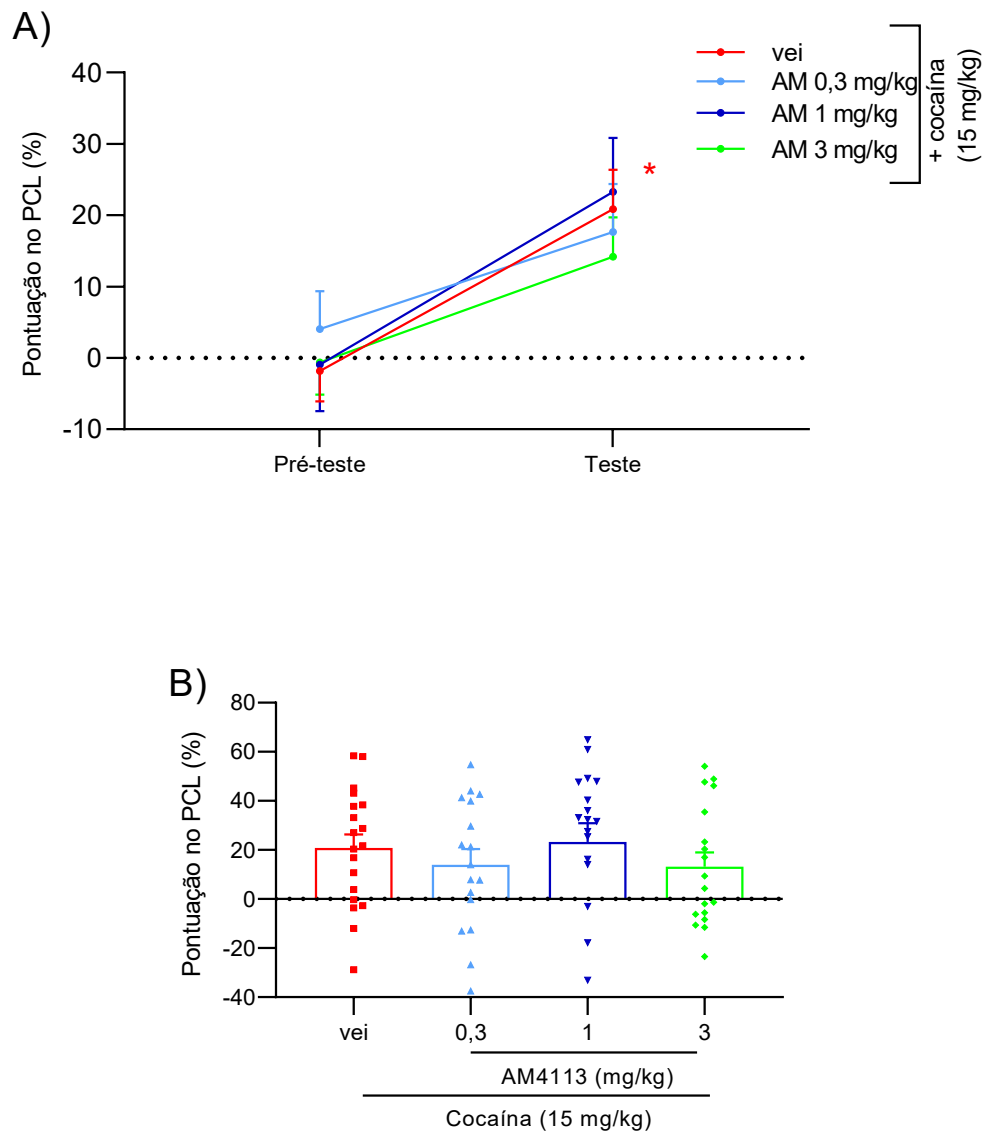


Fig. 16: Efeito do AM4113 (0,3; 1; 3 mg/kg) na expressão da PCL induzida por cocaína (15 mg/kg) A) Pré-teste e teste (fêmeas, $n=9,9,8,9$ e machos, $n=10,8,10,9$ animais/grupo). ANOVA de duas vias. B) Dados individuais dia teste. ANOVA de uma via seguida de Dunnet. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p<0.05$.

5.7. AM4113 reverte o aumento dos espinhos dendríticos induzido por cocaína no hipocampo, mas não no estriado e córtex pré-frontal.

A fim de avaliar se os efeitos relacionados à memória contextual estavam acontecendo a nível neuronal, quantificamos os espinhos dendríticos relacionados a plasticidade sináptica dos animais submetidos ao PCL e tratados durante a expressão/dia teste.

Houve diferença entre os grupos [$F(2, 15) = 5,015$; $p=0,0215$] indicando um aumento do número de espinhos por neurônio no grupo cocaína em relação ao grupo controle ($p=0,0457$) na região do A) HPC, efeito normalizado no grupo tratado com a dose de 3 mg/kg do AM4113 ($p=0,0325$) (Fig. 17A). ANOVA de uma via, seguida de pós teste Tukey foi utilizada para as análises. Essas alterações não foram observadas para o STR [$F(4, 18) = 0,6588$; $p=0,6285$] (Fig. 17B) ou CPF [$F(4, 17) = 0,8661$; $p=0,5041$] (Fig. 17C).

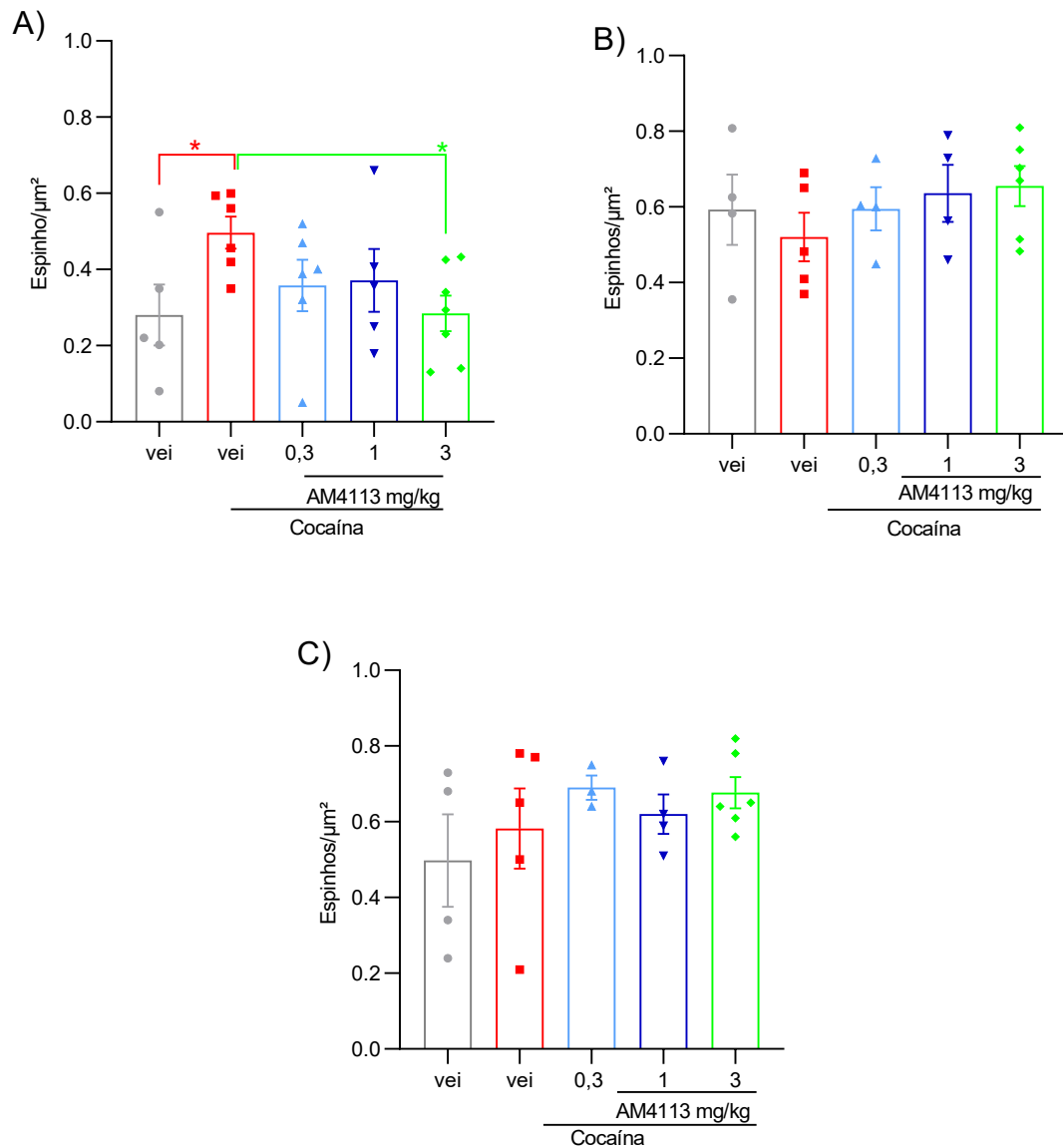


Figura 17: Densidade de espinhos por μm^2 de neurônio no A) HPC, B) STR e C) CPF. ANOVA de uma via seguida de Tukey, $n=4-5$ animais por grupo. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p<0.05$.

5.8. AM4113 não induziu comportamento tipo-ansioso no teste de LCE.

A fim de avaliar os efeitos adversos desse composto, verificamos se o AM4113 (0,3; 1; 3 mg/kg via i.p.) aumentava a porcentagem de tempo nos braços abertos dos animais, relacionado a um aumento de comportamento tipo-ansioso no teste de LCE. Mais uma vez a maior dose provocou hipolocomoção e por isso foi desconsiderada. Já as outras doses foram administradas 30 min antes do teste e não provocaram uma resposta diferente do grupo controle, indicando uma ausência de perfil tipo-ansioso nesses animais [$F(3, 52) = 0,9619$, $p=0,4178$]. Também foram analisados outros parâmetros como porcentagem de entradas nos braços abertos e tempo nos braços fechados, além do número de entradas absolutas nos braços fechados e, mais uma vez, não foram encontradas diferenças (Fig. 18).

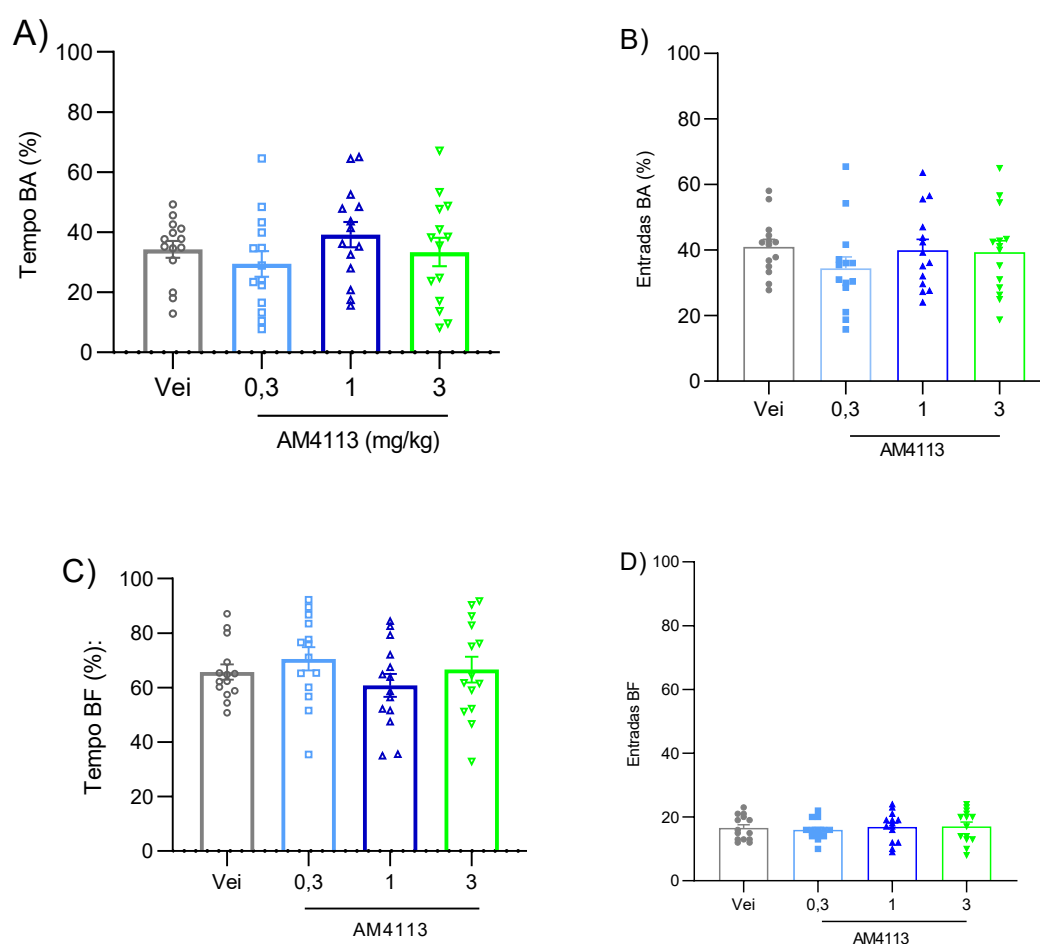


Fig. 18: Efeito do AM4113 (0,3; 1; 3 mg/kg) no LCE em fêmeas e machos. A) AM4113 não alterou a porcentagem de tempo nos braços abertos (BA) em nenhuma dose comparado ao grupo controle. Assim como para: B) % de entradas no BA C) % tempo nos braços fechados (BF) e D) entradas absolutas nos

BF. ANOVA de uma via, $n=14$ animais/grupo. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. $*p<0.05$ em relação ao grupo controle.

5.9. AM4113 não induziu o comportamento tipo-depressivo no TST.

O mesmo desfecho foi observado para o TST para animais tratados com AM4113 (0,3; 1; 3 mg/kg via i.p.), em que o aumento da imobilidade indicaria um maior perfil tipo-depressivo desses animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas nas doses citadas em relação ao grupo controle para AM4113 [$F(3, 52) = 2,223$, $p=0,0964$]

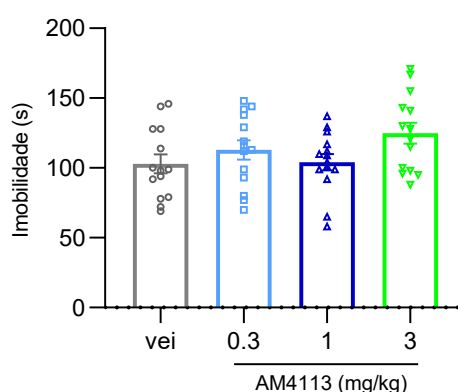


Fig. 19: AM4113 não alterou imobilidade no TST em nenhuma dose comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via, $n=14$ animais/grupo. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. $*p<0.05$ em relação ao grupo controle.

5.10. AM4113 não induziu o comportamento tipo-depressivo no FST.

O mesmo desfecho foi observado para o FST para animais tratados com AM4113 (0,3; 1; 3 mg/kg via i.p.), em que o aumento da imobilidade indicaria um maior perfil tipo-depressivo desses animais. ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas nas doses citadas em relação ao grupo controle [$F(3, 32) = 0,4548$; $p=0,7158$].

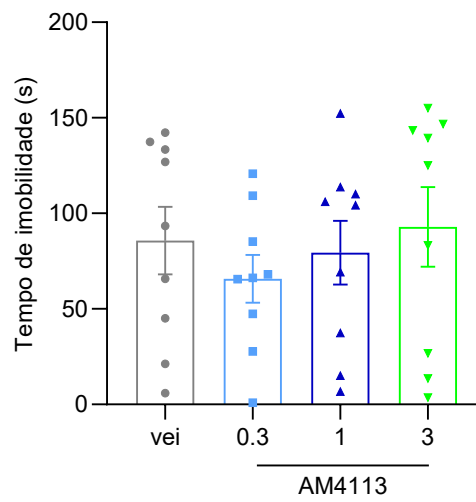


Fig. 20: AM4113 não alterou imobilidade no FST em nenhuma dose comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via, n=9 animais/grupo. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle.

6. Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese de que o antagonismo do CB₁R é capaz de inibir alguns dos efeitos da cocaína em animais experimentais. A utilização de uma abordagem farmacológica combinada a análises comportamentais e moleculares permitiu demonstrar que o AM4113 atenua as respostas associadas à exposição a esta droga (Fig. 11-17), sem induzir efeitos do tipo ansioso ou depressivo (Fig. 18-20). Esses achados reforçam a ideia de que a modulação do SE pode representar uma estratégia promissora para o controle de alterações relacionadas ao uso de cocaína.

Embora o AM4113 na dose de 10 mg/kg tenha reduzido a hiperlocomoção aguda induzida por cocaína (Figura 11A), tal intervenção também provocou hipolocomoção, ou seja, reduziu a locomoção basal, no grupo controle (Figura 11D), indicando um possível efeito dose-dependente que merece investigação mais aprofundada. Apesar disso, quando administrado durante a fase de aquisição da PCL, este antagonista foi capaz de reduzir a associação contextual à droga (Fig. 15A), sugerindo uma interferência no processo de recompensa associado à cocaína. De forma semelhante, durante o protocolo de sensibilização comportamental, a dose de 3 mg/kg atenuou o aumento progressivo da locomoção observado nos animais expostos à cocaína (Fig. 13A). Em conjunto, esses resultados indicam que a modulação farmacológica do SE, por meio do bloqueio do CB₁R, pode reduzir tanto os efeitos agudos quanto os adaptativos da exposição à cocaína, atuando potencialmente sobre mecanismos de plasticidade sináptica.

Para além disso, neste trabalho, confirmamos o perfil melhorado do antagonista CB₁R em relação aos agonistas inversos como o RIM e AM251, em não induzir efeitos adversos como ansiedade e depressão, nos testes avaliados LCE, TST e FST. Essa resposta já era esperada de acordo com outros trabalhos que também mostraram efeitos qualitativamente semelhantes aos do RIM porém sem efeitos indicativos de náusea, sugestivo de um potencial benéfico para respostas aversivas (CHAMBERS et al., 2007; JÄRBE et al., 2008; SINK et al., 2008). Outros trabalhos não observaram aumento do comportamento ansioso no LCE (GUEYE et al., 2016) nem elevação da expressão de c-Fos após o tratamento com AM4113, em contraste com o AM251, que induziu ativação neuronal na amígdala e no STR (SINK et al., 2010a). O AM4113 também mostrou não aumentar a resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto comparado ao AM251 (SINK et al., 2010b), ou no tempo de imobilidade no FST, mostrando inclusive efeito antidepressivo em um dos trabalhos (GUEYE et al., 2016) e ansiolítico ao aumentar no tempo gasto do lado claro no teste da caixa claro-escuro (DULMAN et al., 2021).

Poucos são os trabalhos que testaram o AM4113 nos efeitos da cocaína (HE et al., 2019; LUJÁN et al., 2022; SCHINDLER et al., 2016), este parece ser o primeiro a mostrar seus efeitos na hiperatividade e sensibilização, assim como nas alterações moleculares e de expressão gênica. Em relação a outras drogas de abuso, o AM4113 (3 e 10 mg/kg) se mostrou eficaz em diminuir a resposta de autoadministração à heroína sem induzir efeitos tipo-depressivo e sem aumentar a resposta no paradigma de recompensa por estimulação cerebral elétrica (BSR), diferentemente do RIM, indicativo de efeito aversivo (HE et al., 2019). Assim, como ambos bloquearam a autoadministração de nicotina e THC, mas não para comida e cocaína, apesar de terem inibido a reativação induzida por estímulo em macacos-esquilo, indicando um maior papel na associação contextual (SCHINDLER et al., 2016). O AM4113 também atenuou respostas relacionadas à nicotina acompanhados por uma diminuição das taxas de disparos em rajadas dos neurônios dopaminérgicos da ATV (GUEYE et al., 2016).

Embora alterações na resposta locomotora na arena já tenham sido descritas para o AM4113, ele não havia mostrado diferenças significativas no LCE ou na imunorreatividade de c-Fos (SINK et al., 2010a). Vale ressaltar que a hipolocomoção observada com administração sistêmica do AM4113 foi revertida quando o composto foi administrado por via intracerebroventricular (SINK et al., 2009), sugerindo que esse efeito não é central (mesolímbico) e provavelmente está relacionado ao desequilíbrio entre as vias direta (D1) e indireta (D2) do estriado dorsal, de circuitos motores dependentes da via nigroestriatal, principal circuito dopaminérgico envolvido no controle motor (XU; YANG, 2022). Outros antagonistas do CB₁R também foram associados à hipolocomoção (GARDNER; MALLETT, 2006; MCLAUGHLIN et al., 2006; SALAMONE et al., 2007). Embora o efeito do AM4113 não seja equivalente ao observado em modelos de deleção desse receptor, essa hipolocomoção também já foi associada à aversão condicionada ao lugar, oposto à PLC investigada neste trabalho, em animais indicando um efeito aversivo, coerente também com um perfil de menor ativação locomotora (LI et al., 2020). Outra possibilidade é que o bloqueio do CB₁R cause um desbalanço nas ações da AEA, redirecionando as suas ações predominantemente para TRPV1. Essa ativação poderia desencadear os efeitos hipolocomotores já descritos para o sistema vaniloide (DI MARZO et al., 2001).

Associado ao efeito agudo observado no primeiro experimento, também foi detectado um aumento da liberação pré-sináptica de glutamato logo após administração de cocaína, tanto no HPC quanto no STR, efeito que foi inibido por todas as doses do AM4113. Esses achados estão em consonância com a associação da restauração da homeostase glutamatérgica e a

redução dos efeitos comportamentais da cocaína (LIMA et al., 2024; ZHANG et al., 2021b), bem como à atenuação de efeitos neurotóxicos provocados por esta droga (GOBIRA et al., 2015). A sinalização glutamatérgica desempenha papel central na mediação dos efeitos da cocaína (TZSCHENTKE; SCHMIDT, 2003), sendo caracterizada por um estado de hiperatividade neuronal decorrente, em grande parte, do aumento da liberação desse neurotransmissor. Além disso, o aumento do glutamato está envolvido em processos de plasticidade sináptica e aprendizado, como a LTP, que contribuem para o fortalecimento das memórias associadas ao uso e para vulnerabilidade à recaída (FOUYSSAC; BELIN, 2019; FRENGUELLI, 2022). O aumento desse neurotransmissor coincide com a elevação da excitabilidade neuronal e parece ser modulável pelo endocanabinoide 2-AG no STR (ENGI et al., 2021; LIPUT et al., 2021), o que sugere uma possível via de interação entre o SE e o controle glutamatérgico dos efeitos da cocaína.

Na sequência foram avaliados os efeitos da exposição repetida à cocaína por meio do protocolo de sensibilização comportamental. A sensibilização é um fenômeno característico das drogas psicoestimulantes e possui grande relevância no entendimento da transição do uso agudo para o uso habitual ou compulsivo, bem como dos comportamentos de busca (“*seeking*”) pela droga (SINGER et al., 2018). Esse processo é conceitualmente definido pelo aumento progressivo da resposta locomotora após administrações repetidas de uma dose fixa da substância, refletindo modificações neuroadaptativas que favorecem o uso e reforçam as vias associadas (BEN-SHAHAR et al., 2004; SHUSTER; YU; BATES, 1977).

No presente estudo, observamos esse efeito no grupo que recebeu administração de cocaína, evidenciado pelo aumento da atividade motora ao longo das administrações repetidas. Em contrapartida, o grupo tratado com AM4113 na dose de 3 mg/kg apresentou atenuação ou mesmo inibição da sensibilização, uma vez que não houve aumento significativo do efeito locomotor dentre os dias, embora a hiperlocomoção tenha se mantido em relação ao grupo controle. Outros trabalhos do nosso grupo já haviam mostrado o papel dos CB₁R na sensibilização induzida por cocaína (GOBIRA; JOCA; MOREIRA, 2022; LOPES et al., 2020). Apesar disso, nenhum trabalho mostrou antagonistas seletivos, como o AM4113, diminuindo esse efeito.

Além disso, avaliamos a hiperlocomoção condicionada observada no terceiro dia de pausa após o protocolo de sensibilização comportamental — o experimento com o maior número de administrações consecutivas de cocaína (cinco dias). Após esse período, os animais permaneceram dois dias sem receber a droga e, em seguida, foram reexpostos ao contexto

experimental (arena) sem administração de cocaína. A hiperlocomoção condicionada foi observada em todos os grupos, exceto no grupo controle. Considerando as características específicas desse protocolo e a atenuação da sensibilização comportamental observada previamente, realizamos análises de expressão gênica de alvos selecionados, com o objetivo de investigar como a exposição repetida à cocaína e o bloqueio do CB₁R poderiam alterar a transcrição de genes associados à adicção.

Como descrito anteriormente, neuroadaptações ocorrem após repetida exposição à cocaína em diferentes regiões cerebrais. Nesse contexto, utilizamos a técnica de RT-qPCR para avaliar a expressão gênica de alvos relevantes para recompensa induzida pela cocaína no STR, com foco particular no envolvimento do SE e na possível modulação promovida pelo AM4113.

Nossos resultados mostram uma aparente redução na expressão do gene *Cnr1* (que codifica para o CB₁R) no grupo coca em comparação ao grupo controle. Esse efeito foi revertido de forma significativa no grupo tratado com AM4113, em relação ao grupo coca, reforçando a participação do CB₁R. A regulação negativa dos CB₁R está em acordo com a nossa hipótese e já havia sido mostrada para o STR, estando relacionada ao aumento de liberação de DA, podendo refletir um mecanismo homeostático para conter a hiperexcitabilidade do circuito (PARSONS; HURD, 2015) diferentemente do que parece acontecer no CPF, provavelmente devido a inibição do controle cognitivo (BYSTROWSKA et al., 2019). A normalização no grupo tratado com o antagonista, sugere um possível enfraquecimento dos mecanismos neurobiológicos associados ao desenvolvimento do abuso, uma vez que, conforme discutido anteriormente, a ativação desse receptor tem sido implicada no aumento da liberação de DA e na transição do uso recreativo para o uso compulsivo (ENGI et al., 2021; PETERS; OLESON; CHEER, 2021).

Outra alteração observada, em concordância com achados prévios da literatura, foi o aumento da transcrição de *Cnr2*, gene que codifica para o CB₂R, no grupo tratado em relação ao controle. Também aumentado em neurônios espinhosos médios (MSNs) que expressam RD1 no STR de animais após exposição repetida, mas não única, de cocaína (ZHANG et al., 2021a). Esse aumento pode refletir um recrutamento em resposta ao aumento da liberação de endocanabinoides (KROLL et al., 2023; LI et al., 2022; WANG et al., 2015). Essa atuação conjunta – antagonismo CB₁R e agonismo do CB₂R – já havia sido demonstrada pelo nosso grupo como uma estratégia eficaz para reduzir efeitos da cocaína (GOBIRA et al., 2019; LOPES et al., 2020). Aqui, apesar de não utilizarmos o agonista CB₂R, obtivemos um aumento da transcrição do gene que codifica para esse receptor, efeito ainda mais pronunciado no grupo

tratado com AM4113. Considerando que o CB₂R parece estar expresso em neurônios dopaminérgicos, ao contrário do CB₁R, seu agonismo pode contribuir para a redução dos efeitos da cocaína (ARACIL-FERNÁNDEZ et al., 2012).

A exposição à cocaína resultou em um aumento da expressão gênica de Drd1 e diminuição de Drd2, um padrão esperado associado ao estado hiperdopaminérgico, visto que os RD1 estão mais fortemente associados aos efeitos aditivos da cocaína do que os RD2. Interessantemente, esse desequilíbrio não foi observado nos grupos tratados com AM4113, nos quais a expressão gênica de Drd1 e Drd2 foi restabelecida a níveis próximos aos do grupo controle, sugerindo uma normalização da transmissão dopaminérgica no STR, crucial no reforço das propriedades da coca (DI CHIARA, 1998). O bloqueio da recaída induzida por cocaína, promovida pela Oleoylethanolamide, também estava associada à diminuição da expressão de Drd1 no HPC, além de revelarem uma correlação positiva entre a maior expressão desse gene e escores elevados de recaída (GONZÁLEZ-PORTILLA et al., 2023).

Os genes relacionados à sinalização dopaminérgica, incluindo a Catecol-O-Metil Transferase (COMT) — enzima responsável pela metabolização ou inibição da dopamina (MATSUMOTO et al., 2003)— e o transportador de dopamina (DAT) — encarregado pela recaptura desse neurotransmissor na fenda sináptica e principal alvo de bloqueio da cocaína — também foram avaliados. Observou-se uma redução na expressão gênica da COMT, efeito que foi normalizado nos animais tratados. Por outro lado, a expressão do gene DAT não apresentou alterações significativas entre os grupos, possivelmente em decorrência do intervalo de três dias entre a última exposição à cocaína e a coleta dos cérebros, período no qual alterações transitórias na expressão poderiam ter sido revertidas.

Diretamente relacionados aos mecanismos de neuroplasticidade, houve do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no grupo coca em relação ao controle. A redução de BDNF no grupo coca, embora já relatada em outros trabalhos (DA SILVA et al., 2021), permanece controversa, já que o aumento dessa neurotrofina tem sido mais consistentemente relatado no CPF, associado ao bloqueio de auto-administração de cocaína, para o STR as evidências ainda variam dependendo da região dorsal ou ventral (FUMAGALLI et al., 2007). O bloqueio do CB₁R parece não só reverter esse efeito, mas também potencialmente promover neuroplasticidade.

Por fim, ao investigar genes relacionados à transmissão GABAérgica não foram encontradas diferenças significativas na expressão do gene que codifica para subunidade

Gabbr1 do receptor GABAérgico do tipo B, apesar da aparente diminuição no grupo coca. Em contrapartida, houve uma redução significativa do gene que codifica para subunidade Gabbr2 no grupo coca em relação ao controle, sugerindo uma alteração do controle inibitório. Essa alteração não foi revertida pelo tratamento com AM4113, embora o grupo tratado não tenha diferido do controle, podendo indicar uma estabilização parcial. Os CB₁R estão em sua maioria expressos em terminais GABAérgicos, seu bloqueio parece restaurar a transmissão inibitória e normalizar a liberação dopaminérgica (MONORY et al., 2015).

Apesar de essas análises estarem limitadas ao momento de coleta dos cérebros — realizado após a fase de hiperlocomoção condicionada — e restritas ao STR, bem como refletirem apenas a expressão gênica (e não necessariamente a tradução ou ativação funcional das proteínas avaliadas), os resultados obtidos corroboram achados prévios e reforçam a evidência de que o SE está sendo recrutado e modulando ativamente a neurotransmissão no estriado. Essa região tem se mostrado crucial para o controle motor, o aprendizado de hábitos, a função executiva e os processos emocionais e motivacionais (FOUYSSAC; BELIN, 2019), sendo também um dos principais núcleos envolvidos na formação de memórias associadas à droga e na recaída, em estreita interação com o CPF. Os CB₁R apresentam alta densidade no STR, onde, juntamente com os endocanabinoides, exercem profunda influência sobre o processamento das informações sinápticas. Essa influência ocorre por meio da modulação da neurotransmissão dopaminérgica proveniente não apenas da ATV, mas também da substância nigra e de projeções corticoestriatais, integrando, assim, os circuitos motivacionais, motores e cognitivos alterados pela exposição à cocaína.

As substâncias de abuso promovem sensibilização de circuitos neurais relacionados à recompensa, conferindo saliência de incentivo a estímulos previamente neutros e fortalecendo associações contextuais ao uso da droga. Considerando esse mecanismo e a relevância da preferência condicionada por lugar (PCL) como modelo comportamental de adicção, realizamos o teste utilizando um protocolo de três pareamentos consecutivos, previamente validado (Briânis RC, 2023).

Verificamos que o bloqueio do CB₁R, atenuou a memória associada ao contexto apenas durante a fase de aquisição e na maior dose testada (10 mg/kg), conforme já descrito (GOBIRA et al., 2019; LOPES et al., 2020). Esse efeito não ocorreu quando o tratamento foi administrado apenas no dia do teste, o que está de acordo com relatos que indicam que os canabinoides modulam a memória contextual associada à droga de forma dependente do regime e da duração da administração (BRIÂNIS; MOREIRA; IGLESIAS, 2024).

A PCL é amplamente utilizada para investigar os componentes associativos do TUS, mas há grande variabilidade metodológica entre estudos, tanto em relação ao número de pareamentos quanto aos critérios de análise (HUSTON et al., 2013). Outra discussão relevante envolve as neuroadaptações induzidas pelo regime de administração da droga, que podem diferir conforme as exposições sejam consecutivas ou alternadas (CAMPBELL et al., 2021). No presente trabalho, utilizamos um protocolo de três administrações consecutivas, eficiente na indução de preferência sem que se observasse influência do sexo biológico.

Alterações morfológicas também foram avaliadas por meio da coloração de Golgi após a PCL, revelando aumento na densidade de espinhos dendríticos no HPC do grupo cocaína, em comparação aos grupos controle e tratados. Esse aumento sugere maior conectividade sináptica e está associado a processos de neuroplasticidade e aprendizado associativo característicos da PCL, reforçando o envolvimento do HPC na formação de memórias contextuais e de hábitos relacionados à droga (NESTLER, 2013; SEGAL, 2017). O bloqueio do CB₁R pelo AM4113 inibiu esse aumento, indicando que esse receptor participa ativamente dos mecanismos mnemônicos subjacentes ao uso de substâncias. Mesmo na ausência de efeito comportamental significativo em um único dia de tratamento, a observação de alterações estruturais precoces sugere que o antagonismo do CB₁R interfere na plasticidade sináptica de forma imediata.

O sistema endocanabinoide tem sido amplamente implicado na regulação das memórias associativas relacionadas ao uso de drogas. Estudos demonstram que a redução da FAAH, enzima responsável pela degradação da anandamida (AEA), assim como o aumento de AEA induzido pela cocaína, promovem remodelamento dendrítico no giro denteado do hipocampo, efeito mediado por CB₁R, uma vez que seu bloqueio reverte essa resposta (LI et al., 2022).

No PFC e STR, não foram observadas alterações significativas na densidade de espinhos dendríticos. Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que o uso repetido de cocaína promove um fortalecimento da conexão hipocampo–núcleo accumbens (NAc), paralelamente a um enfraquecimento do controle cognitivo exercido pelo PFC. Estudos prévios indicam que a auto-administração de cocaína pode causar redução de espinhos no córtex pré-límbico, refletindo a perda do controle inibitório cortical, concomitante ao aumento de espinhos do tipo thin em regiões estriatais (DOS SANTOS et al., 2018; SEQUEIRA et al., 2023). Outros trabalhos, por sua vez, relacionam o aumento de espinhos no NAc à facilitação da via dopaminérgica e à expressão da sensibilização comportamental (DOS SANTOS et al., 2018).

Embora os estudos sobre morfologia sináptica revelem resultados por vezes divergentes, essa variabilidade parece decorrer de diferenças nos protocolos de administração, nas regiões analisadas, no momento da coleta e na classificação dos tipos de espinho. Morfologicamente, os espinhos dendríticos podem ser classificados como *stubby*, *thin* ou *mushroom*, refletindo diferentes estados de maturação e estabilidade sináptica. A exposição repetida à cocaína, por exemplo, reduz a proporção *thin*/não-*thin* no PFC pré-límbico, indicando menor flexibilidade sináptica e maior rigidez comportamental, características compatíveis com a formação de hábitos e perda do controle sobre o uso (SEQUEIRA et al., 2023). Já no NAc, observa-se aumento de espinhos de longa duração nos neurônios dopaminérgicos D1, mais associados à fase compulsiva da adicção (OLIVA et al., 2024). Dessa forma, as adaptações estruturais induzidas pela cocaína parecem depender fortemente da região e da temporalidade analisada, mas convergem para o fortalecimento das vias subcorticais de reforço em detrimento do controle cortical.

Como limitação do estudo, destacamos que as análises moleculares foram realizadas apenas em um subconjunto de grupos e regiões, selecionados com base na relevância funcional para cada teste. Assim, os genes foram avaliados em animais submetidos à sensibilização comportamental, restrita ao estriado, protocolo que envolve maior exposição à cocaína e permite observar adaptações após três dias sem droga, refletindo alterações mais estáveis. Da mesma forma, a análise morfológica de espinhos dendríticos foi conduzida em animais submetidos ao teste de PCL, por sua estreita relação com memória contextual e plasticidade hipocampal.

Embora não tenha sido possível avaliar os espinhos no grupo tratado durante a aquisição da PCL — mesmo havendo efeito comportamental na maior dose — esses animais foram empregados em uma análise que não produziu resultados consistentes. Por fim, alguns testes demandaram amostras maiores para contemplar ambos os sexos, conforme recomendado (RADKE; SNEDDON; MONROE, 2021). Apesar do consequente aumento do número total de animais, os resultados obtidos foram consistentes e reprodutíveis, reforçando a robustez e confiabilidade dos achados deste estudo.

7. Conclusão

O antagonista CB₁R, AM4113, inibiu efeitos comportamentais, celulares e moleculares da cocaína. Além disso, exposição repetida a esta droga promoveu alterações na expressão de genes relacionados à sinalização canabinoide, dopaminérgica e à plasticidade sináptica no corpo estriado. Esses achados, em conjunto, sustentam a ideia de que o AM4113 atenua não apenas as respostas comportamentais da cocaína, mas também suas consequências celulares e moleculares, sem induzir os efeitos adversos observados com agonistas inversos do mesmo receptor. Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese de que o sistema endocanabinoide desempenha papel fundamental na modulação dos efeitos da cocaína. Além disso, nossos resultados reforçam o potencial terapêutico do AM4113 como uma estratégia para o tratamento dos transtornos por uso de cocaína.

8. Referências

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5**. [s.l: s.n.]. v. 11
- ANDERSEN, S. L.; TEICHER, M. H. Desperately driven and no brakes: Developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 4, p. 516–524, abr. 2009.
- ARACIL-FERNÁNDEZ, A. et al. Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB2receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 7, p. 1749–1763, 2012.
- ARJMAND, S. et al. Exploring the potential link between Δ fosB and N-acetylcysteine in craving/relapse dynamics: Can N-acetylcysteine stand out as a possible treatment candidate? **Acta Neuropsychiatrica**, v. 37, 2024.
- ASTH, L. et al. Effects of the monoamine stabilizer, (-)-OSU6162, on cocaine-induced locomotion and conditioned place preference in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, n. 6, p. 1143–1152, 20 jun. 2021.
- ASTH, L.; SANTOS, A. C.; MOREIRA, F. A. The endocannabinoid system and drug-associated contextual memories. **Behavioural Pharmacology**, v. 33, n. 2&3, p. 90–104, 8 abr. 2022.
- AVERY, S. N.; CLAUSS, J. A.; BLACKFORD, J. U. The Human BNST: Functional Role in Anxiety and Addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 126–141, 2016.
- BADDENHAUSEN, S.; LUTZ, B.; HOFMANN, C. Cannabinoid type-1 receptor signaling in dopaminergic Engrailed-1 expressing neurons modulates motivation and depressive-like behavior. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 17, n. April, p. 1–20, 4 abr. 2024.
- BALLA, A. et al. Cannabinoid-1 receptor neutral antagonist reduces binge-like alcohol consumption and alcohol-induced accumbal dopaminergic signaling. **Neuropharmacology**, v. 131, p. 200–208, 2018.
- BARDO, M. T.; BEVINS, R. A. Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 31–43, 2000.
- BASTOS, F. I. P. M. et al. III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. **Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, 2017. 528 p.**, 2017.
- BATISTA, L. A. et al. Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as

strategies for developing anxiolytic drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, n. 5–6, p. 425–433, 2014.

BELIN, D. et al. High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. **Science**, v. 320, n. 5881, p. 1352–1355, 2008.

BELIN, D.; EVERITT, B. J. Cocaine Seeking Habits Depend upon Dopamine-Dependent Serial Connectivity Linking the Ventral with the Dorsal Striatum. **Neuron**, v. 57, n. 3, p. 432–441, 2008.

BEN-SHAHAR, O. et al. The transition from controlled to compulsive drug use is associated with a loss of sensitization. **Brain Research**, v. 995, n. 1, p. 46–54, 2004.

BEZERRA, M. M. et al. A brief history behind the most used local anesthetics **Tetrahedron** Pergamon, , 20 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040402020308358>>. Acesso em: 3 nov. 2025

BRIÂNIS, R. C. et al. Effects of cannabidiol on reward contextual memories induced by cocaine in male and female mice. **Acta Neuropsychiatrica**, 2023.

BRIÂNIS, R. C.; MOREIRA, F. A.; IGLESIAS, L. P. **Cannabidiol and addiction**. [s.l.] Elsevier, 2024. v. 177

BYSTROWSKA, B. et al. Cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking provokes changes in the endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain structures. **Molecules**, v. 24, n. 6, 2019.

CAINE, S. B. Cocaine abuse: hard knocks for the dopamine hypothesis? **Nature Neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 90–92, jun. 1998.

CAMERON, C. M.; WIGHTMAN, R. M.; CARELLI, R. M. Dynamics of rapid dopamine release in the nucleus accumbens during goal-directed behaviors for cocaine versus natural rewards. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 319–328, 2014.

CAMPBELL, R. R. et al. Cocaine induces paradigm-specific changes to the transcriptome within the ventral tegmental area. **Neuropsychopharmacology**, v. 46, n. 10, p. 1768–1779, 2021.

CANALS, M.; MILLIGAN, G. Constitutive activity of the cannabinoid CB1 receptor regulates the function of co-expressed Mu opioid receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 17, p. 11424–11434, 2008.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral**

Reviews, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 2005.

CHAMBERS, A. P. et al. A neutral CB1 receptor antagonist reduces weight gain in rat. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 6, p. 2185–2193, 2007.

CHRISTENSEN, R. et al. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. **Lancet**, v. 370, n. 9600, p. 1706–1713, 2007.

CITARISTI, I. **United Nations Office on Drugs and Crime—UNODC**. Sales No. ed. [s.l: s.n.].

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 571–625, 2005.

DA SILVA, M. C. M. et al. Inhibition of CSF1R, a receptor involved in microglia viability, alters behavioral and molecular changes induced by cocaine. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021.

DEROCHE-GAMONET, VÉRONIQUE; BELIN, D.; PIAZZA, P. V. Evidence for Addiction-like Behavior in the Rat. v. 305, n. August, p. 1–4, 2004.

DI CHIARA, G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 12, n. 1, p. 54–67, 1998.

DI MARZO, V. et al. Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. **European Journal of Pharmacology**, v. 420, n. 2–3, p. 123–131, 2001.

DOS SANTOS, M. et al. Cocaine increases dopaminergic connectivity in the nucleus accumbens. **Brain Structure and Function**, v. 223, n. 2, p. 913–923, 2018.

DRAKE, L. R.; SCOTT, P. J. H. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Cocaine. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 2358–2372, 2018.

DULMAN, R. S. et al. CB1 receptor neutral antagonist treatment epigenetically increases neuropeptide Y expression and decreases alcohol drinking. **Neuropharmacology**, v. 195, n. April, p. 108623, 2021.

ELIWA, H. et al. Adult neurogenesis augmentation attenuates anhedonia and HPA axis dysregulation in a mouse model of chronic stress and depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 124, 2021.

ENGI, S. A. et al. Cocaine-induced increases in motivation require 2-arachidonoylglycerol

mobilization and CB1 receptor activation in the ventral tegmental area. **Neuropharmacology**, v. 193, n. May, p. 1–8, 2021.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 1481–1489, 2005.

FERNANDES, R. A. et al. Adult hippocampal neurogenesis and temporal lobe epilepsy: A potential key to understanding cognitive deficit. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 143, n. February, 2025.

FOUYSSAC, M.; BELIN, D. Beyond drug-induced alteration of glutamate homeostasis, astrocytes may contribute to dopamine-dependent intrastriatal functional shifts that underlie the development of drug addiction: A working hypothesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 50, n. 6, p. 3014–3027, 2019.

FOUYSSAC, M.; EVERITT, B. J.; BELIN, D. Cellular basis of the intrastriatal functional shifts that underlie the development of habits: relevance for drug addiction. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 13, p. 144–151, 2017.

FRENGUELLI, B. G. The glutamatergic synapse – A key hub in neuronal metabolism, signalling and plasticity. **Neuropharmacology**, v. 207, p. 2021–2023, 2022.

FUMAGALLI, F. et al. Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 10, p. 2756–2763, 2007.

GALAJ, E. et al. Therapeutic potential of PIMSR, a novel CB1 receptor neutral antagonist, for cocaine use disorder: evidence from preclinical research. **Translational psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 286, 18 jul. 2022.

GAMALEDDIN, I. H. et al. Role of the endogenous cannabinoid system in nicotine addiction: Novel insights. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, n. MAR, p. 1–12, 2015.

GARDNER, A.; MALLET, P. E. Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor “silent antagonist”. **European Journal of Pharmacology**, v. 530, n. 1–2, p. 103–106, 2006.

GOBIRA, P. H. et al. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **NeuroToxicology**, v. 50, p. 116–121, 2015.

GOBIRA, P. H. et al. Opposing roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the stimulant and rewarding effects of cocaine. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1541–1551, 2019.

- GOBIRA, P.; JOCA, S.; MOREIRA, F. Roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the modulation of psychostimulant responses. **Acta Neuropsychiatrica**, p. 1–34, 22 ago. 2022.
- GONZÁLEZ-PORTILLA, M. et al. Oleoylethanolamide attenuates cocaine-primed reinstatement and alters dopaminergic gene expression in the striatum. **Behavioral and Brain Functions**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2023.
- GORKA, A. X. et al. Reduced hippocampal and medial prefrontal gray matter mediate the association between reported childhood maltreatment and trait anxiety in adulthood and predict sensitivity to future life stress. **Biology of Mood and Anxiety Disorders**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2014.
- GUEYE, A. B. et al. The CB1 neutral antagonist AM4113 retains the therapeutic efficacy of the inverse agonist Rimonabant for nicotine dependence and weight loss with better psychiatric tolerability. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 12, p. 1–11, 2016.
- HÄRING, M. et al. Cannabinoid CB1 receptor in the modulation of stress coping behavior in mice: The role of serotonin and different forebrain neuronal subpopulations. **Neuropharmacology**, v. 65, p. 83–89, 2013.
- HE, X. HU et al. Cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 inhibits heroin self-administration without depressive side effects in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 365–373, 2019.
- HORDER, J. et al. Reduced neural response to reward following 7 days treatment with the cannabinoid CB 1 antagonist rimonabant in healthy volunteers. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 8, p. 1103–1113, 2010.
- HUSTON, J. P. et al. What's conditioned in conditioned place preference? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 162–166, 2013.
- JÄRBE, T. U. C. et al. Intrinsic effects of AM4113, a putative neutral CB1 receptor selective antagonist, on open-field behaviors in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 1, p. 84–90, 2008.
- JÚNIOR, R. E. M. et al. Behavioral changes and transcriptional regulation of mesolimbic dopaminergic genes in a mouse model of binge eating disorder by diet intermittent access. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 135, 2025a.
- JÚNIOR, R. E. M. et al. Transition From a High-Sugar and Butter to a Standard Diet Leads to Cecal Dysbiosis, Disrupts Intestinal Homeostasis, and Favors Increased Ethanol Consumption and Preference. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 39, n. 19, p. e71105, 15 out. 2025b.

- KALIVAS, P. W.; O'BRIEN, C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 166–180, 2008.
- KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1403–1413, 2005.
- KAMPMAN, K. M. The treatment of cocaine use disorder. **Science Advances**, v. 5, n. 10, p. 1–9, 2019.
- KOOB, G. F. Drug addiction: Hyperkatifeia/negative reinforcement as a framework for medications development. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 1, p. 163–201, 2021.
- KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010.
- KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. **Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis**The **Lancet Psychiatry**Elsevier Ltd, , 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)>
- KROLL, S. L. et al. Plasma endocannabinoids in cocaine dependence and their relation to cerebral metabotropic glutamate receptor 5 density. n. June, 2023.
- LE FOLL, B.; GOLDBERG, S. R. **Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence****Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2005.
- LEE, J. L. C. et al. Cannabidiol regulation of emotion and emotional memory processing: relevance for treating anxiety-related and substance abuse disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 19, p. 3242–3256, 2017.
- LI, H. et al. Endocannabinoids regulate cocaine-associated memory through brain AEA–CB1R signalling activation. **Molecular Metabolism**, v. 65, n. September, p. 1–13, 2022.
- LI, X. et al. Attenuation of basal and cocaine-enhanced locomotion and nucleus accumbens dopamine in cannabinoid CB1-receptor-knockout mice. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 1, p. 1–11, 2009.
- LI, X. et al. Dissecting the role of CB1 and CB2 receptors in cannabinoid reward versus aversion using transgenic CB1- and CB2-knockout mice. **European Neuropsychopharmacology**, p. 1–14, 2020.
- LIMA, A. L. D. et al. Isradipine, an L-type calcium channel blocker, attenuates cocaine effects in mice by reducing central glutamate release. **European Journal of Pharmacology**, v. 971, n. February, 2024.

- LIPUT, D. J. et al. 2-Arachidonoylglycerol mobilization following brief synaptic stimulation in the dorsal lateral striatum requires glutamatergic and cholinergic neurotransmission. **Neuropharmacology**, v. 205, p. 108916, 2021.
- LOPES, J. B. et al. The roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 2, p. 385–394, fev. 2020.
- LUJÁN, M. et al. CB1 receptor antagonist AM4113 reverts the effects of cannabidiol on cue and stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behaviour in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 113, 2022.
- LUPICA, C. R.; RIEGEL, A. C. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: A potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 8 SPEC. ISS., p. 1105–1116, 2005.
- LÜSCHER, C.; MALENKA, R. C. Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 650–663, 2011.
- MALDONADO, R.; VALVERDE, O.; BERRENDERO, F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 4, p. 225–232, 2006.
- MANZANARES, J. et al. Role of the endocannabinoid system in drug addiction. **Biochemical Pharmacology**, v. 157, n. September, p. 108–121, 2018.
- MARTÍN-GARCÍA, E. et al. Differential control of cocaine self-administration by GABAergic and glutamatergic CB1 cannabinoid receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 9, p. 2192–2205, 2016.
- MARTINS DE CARVALHO, L. et al. High-fat diet withdrawal modifies alcohol preference and transcription of dopaminergic and GABAergic receptors. **Journal of Neurogenetics**, v. 33, n. 1, p. 10–20, 2019.
- MATSUMOTO, M. et al. Catechol O-methyltransferase (COMT) mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 8, p. 1521–1530, ago. 2003.
- MCLAUGHLIN, P. J. et al. Suppression of food intake and food-reinforced behavior produced by the novel CB1 receptor antagonist/inverse agonist AM 1387. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 3, p. 396–402, 2006.
- MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual Review of Psychology**, v. 64, p. 21–47, 2013.

- MIRAGLIA, P. Drugs and drug trafficking in Brazil: trends and policies. **Improving Global Drug Policy: Comparative Perspectives and UNGASS 2016**, p. 1–16, 2016.
- MONORY, K. et al. Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 9, p. 3842–3850, 2015.
- MONORY, K.; DE AZUA, I. R.; LUTZ, B. Genetic Tools in Rodents to Study Cannabinoid Functions. In: [s.l: s.n.].
- MOREIRA, F. A.; LUTZ, B. The endocannabinoid system: Emotion, learning and addiction. **Addiction Biology**, v. 13, n. 2, p. 196–212, 2008.
- NAMBA, M. D. et al. Neuroimmune Mechanisms as Novel Treatment Targets for Substance Use Disorders and Associated Comorbidities. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, n. April, p. 1–27, 2021.
- NESTLER, E. J. Cellular basis of memory for addiction. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 431–443, 2013.
- NIEMANN, A. Ueber eine neue organische Base in den Cocablättern. **Archiv der Pharmazie**, v. 153, n. 2, p. 129–155, 17 jan. 1860.
- NIKBAKHTZADEH, M. et al. Cross-talk between the HPA axis and addiction-related regions in stressful situations. **Heliyon**, v. 9, n. 4, 2023.
- NORMAN, R. E. et al. The Long-Term Health Consequences of Child Physical Abuse, Emotional Abuse, and Neglect: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 11, nov. 2012.
- NOVICK, A. M. et al. The effects of early life stress on reward processing. **Journal of Psychiatric Research**, v. 101, n. January, p. 80–103, 2018.
- NUTT, D. J.; KING, L. A.; PHILLIPS, L. D. Drug harms in the UK: A multicriteria decision analysis. **The Lancet**, v. 376, n. 9752, p. 1558–1565, 2010.
- OLIVA, H. N. P. et al. Substance use and spine density: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. **Molecular psychiatry**, v. 29, n. 9, p. 2873–2885, 1 set. 2024.
- ORSO, R. et al. NFκB1 and NFκB2 gene expression in the prefrontal cortex and hippocampus of early life stressed mice exposed to cocaine-induced conditioned place preference during adolescence. **Neuroscience Letters**, v. 658, p. 27–31, 29 set. 2017.
- ORSO, R. et al. Early environmental enrichment rescues memory impairments provoked by mild neonatal hypoxia-ischemia in adolescent mice. **Behavioural Brain Research**, v. 407, n. January, p. 113237, 2021.

- ORSO, R. et al. Sex-Specific Effects of Early-Life Stress Exposure on Memory Performance and the Medial Prefrontal Cortex Transcriptomic Pattern in Adolescent Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 62, n. 7, p. 8728–8737, 4 jul. 2025.
- PARSONS, L. H.; HURD, Y. L. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 579–594, 2015.
- PEÑA, C. J. et al. Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. **Science**, v. 356, n. 6343, p. 1185–1188, 16 jun. 2017.
- PERRY, C. J. et al. Adolescent male and female rats show enhanced latent inhibition of conditioned fear compared to adult rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 19, n. October, p. 1636674, 2025.
- PETERS, K. Z.; OLESON, E. B.; CHEER, J. F. A brain on cannabinoids: The role of dopamine release in reward seeking and addiction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021.
- PHILLIPS, R. D. Neural and immune interactions linking early life stress and anhedonia. **Brain, Behavior, and Immunity - Health**, v. 42, n. February, p. 100881, 2024.
- PITTS, E. G.; TAYLOR, J. R.; GOURLEY, S. L. Prefrontal cortical BDNF: A regulatory key in cocaine- and food-reinforced behaviors. **Neurobiology of Disease**, v. 91, p. 326–335, 2016.
- PORTUGALOV, A.; MAROUN, M. Early life stress induces decreased expression of CB1R and FAAH and epigenetic changes in the medial prefrontal cortex of male rats. n. October, p. 1–15, 2024.
- PREMACHANDRAN, H.; ZHAO, M.; ARRUDA-CARVALHO, M. Sex Differences in the Development of the Rodent Corticolimbic System. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. September, 2020.
- RADKE, A. K.; SNEDDON, E. A.; MONROE, S. C. Studying Sex Differences in Rodent Models of Addictive Behavior. **Current Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1–18, 2021.
- ROBBINS, T. W.; ERSCHKE, K. D.; EVERITT, B. J. Drug addiction and the memory systems of the brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1141, p. 1–21, 2008.
- SALAMONE, J. D. et al. Cannabinoid CB1 receptor inverse agonists and neutral antagonists: Effects on food intake, food-reinforced behavior and food aversions. **Physiology & Behavior**, v. 91, n. 4, p. 383–388, jul. 2007.
- SANCHEZ, E. O.; BANGASSER, D. A. The effects of early life stress on impulsivity. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 137, n. January, 2022.

- SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: An overview. **Addiction Biology**, v. 11, n. 1, p. 2–38, 2006.
- SANTOS, V. R. et al. Contributions of mature granule cells to structural plasticity in temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, v. 197, p. 348–357, 2011.
- SCHINDLER, C. W. et al. Blockade of nicotine and cannabinoid reinforcement and relapse by a cannabinoid CB1-receptor neutral antagonist AM4113 and inverse agonist rimonabant in squirrel monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 9, p. 2283–2293, 2016.
- SEGAL, M. Dendritic spines: Morphological building blocks of memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 138, p. 3–9, 2017.
- SEQUEIRA, M. K. et al. Cocaine and habit training cause dendritic spine rearrangement in the prelimbic cortex. **iScience**, v. 26, n. 4, 2023.
- SHAO, Z. et al. High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. **Nature**, v. 540, n. 7634, p. 602–606, 16 dez. 2016.
- SHUSTER, L.; YU, G.; BATES, A. Sensitization to cocaine stimulation in mice. **Psychopharmacology**, v. 52, n. 2, p. 185–190, 1977.
- SINGER, B. F. et al. Are cocaine-seeking “habits” necessary for the development of addiction-like behavior in rats? **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 1, p. 60–73, 2018.
- SINK, K. S. et al. The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behavior but does not induce signs of nausea in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 4, p. 946–955, 2008.
- SINK, K. S. et al. Intracerebroventricular administration of cannabinoid CB1 receptor antagonists AM251 and AM4113 fails to alter food-reinforced behavior in rats. **Psychopharmacology**, v. 206, n. 2, p. 223–232, 2009.
- SINK, K. S. et al. Potential anxiogenic effects of cannabinoid CB1 receptor antagonists/inverse agonists in rats: Comparisons between AM4113, AM251, and the benzodiazepine inverse agonist FG-7142. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 112–122, 2010a.
- SINK, K. S. et al. The CB1 inverse agonist AM251, but not the CB1 antagonist AM4113, enhances retention of contextual fear conditioning in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 4, p. 479–484, 2010b.
- SOLER-CEDENO, O. et al. AM6527, a neutral CB1 receptor antagonist, suppresses opioid taking and seeking, as well as cocaine seeking in rodents without aversive effects. **Neuropsychopharmacology**, n. April, p. 1–11, 2024.

- SOLER-CEDENO, O.; XI, Z. X. **Neutral CB1 Receptor Antagonists as Pharmacotherapies for Substance Use Disorders: Rationale, Evidence, and Challenge** *Cells*, 17 out. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/11/20/3262>>
- STRAIN, E. C. The defining characteristic of substance use disorders. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 230, p. 109207, 2022.
- TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Glutamatergic mechanisms in addiction. **Molecular Psychiatry**, v. 8, n. 4, p. 373–382, 2003.
- VIOLA, T. W. et al. Increased cocaine-induced conditioned place preference during periadolescence in maternally separated male BALB/c mice: the role of cortical BDNF, microRNA-212, and MeCP2. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 17, p. 3279–3288, 2016.
- WANAT, M. et al. Phasic Dopamine Release in Appetitive Behaviors and Drug Addiction. **Current Drug Abuse Review**, v. 2, n. 2, p. 195–213, 1 maio 2009.
- WANG, H. et al. Cocaine-Induced Endocannabinoid Mobilization in the Ventral Tegmental Area. **Cell Reports**, v. 12, n. 12, p. 1997–2008, 2015.
- XU, H.; YANG, F. The interplay of dopamine metabolism abnormalities and mitochondrial defects in the pathogenesis of schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022.
- ZHANG, H. Y. et al. Repeated cocaine administration upregulates CB2 receptor expression in striatal medium-spiny neurons that express dopamine D1 receptors in mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, n. June, p. 1–13, 2021a.
- ZHANG, L. Y. et al. Restoring glutamate homeostasis in the nucleus accumbens via endocannabinoid-mimetic drug prevents relapse to cocaine seeking behavior in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 46, n. 5, p. 970–981, 2021b.

9. Apêndice I: Aumento da vulnerabilidade à cocaína na vida adulta após exposição ao estresse na infância de animas experimentais e modificações na expressão gênica.

Trabalho realizado durante o período sanduíche do doutorado na Universidade de Aarhus supervisionado pelo Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira, financiado pelo programa CAPES PDSE (edital nº06/2024 no período de Nov/2024 a abril/2025).

i. Revisão da literatura

As experiências adversas vividas durante o início da vida (ELS) promovem impactos de longa duração em processos relacionados à recompensa e no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na vida adulta (NORMAN et al., 2012). Esse período da vida é um período crítico do neurodesenvolvimento, em que eventos plásticos estão vulneráveis aos fatores externos, sendo uma janela crítica às adaptações a condições estressantes que são levadas para toda a vida. Essas alterações no sistema de recompensa têm sido relacionadas aos transtornos como o do espectro autista (TEA), assim como, o transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), e de depressão maior (MDD) (PEÑA et al., 2017). Além desses, ainda sobre o processamento de recompensas estão os aspectos motivacionais e respostas hedônicas a estímulos gratificantes, também alterados após episódios de ELS (NOVICK et al., 2018). Os protocolos experimentais capazes de simular o ELS em animais têm sido imprescindíveis no melhor entendimento dessas alterações e em como atuar para minimizar seus efeitos. Apesar disso, pouco ainda se sabe sobre as consequências para vulnerabilidade às drogas de abuso.

O transtorno por uso de substâncias, portanto, entra como possível consequência à vulnerabilidade do sistema após o estresse precoce (ANDERSEN; TEICHER, 2009; NIKBAKHTZADEH et al., 2023). O desenvolvimento do sistema de recompensa inicia-se no período pré-natal, e as associações relacionadas a recompensas são aprendidas principalmente durante a infância, sendo um período crucial e vulnerável à fatores externos. O ELS pode alterar a maturação das vias implicadas, como a dopaminérgica, com consequências duradouras para os estados motivacionais, podendo aumentar a vulnerabilidade às drogas aditivas em comparação às recompensas naturais (SANCHEZ; BANGASSER, 2022).

Trabalhos anteriores divergem entre dois desfechos, uma parte dos estudos mostram um aumento do comportamento de anedonia relacionado à depressão após ELS, seja na infância ou na adolescência (PHILLIPS, 2024), associados a redução da sensibilidade a recompensa, alterações no eixo HPA ou elevados níveis de citocinas inflamatórias. Um segundo grupo, tem observado um aumento da vulnerabilidade às substâncias aditivas na vida adulta, como aumento da resposta no teste de PCL induzido por cocaína, visto para machos, associado à modificações gênicas após serem expostos ao modelo de separação materna na infância (ORSO et al., 2017).

Aqui, utilizamos o modelo combinado proposto por Peña de dois clássicos modelos de ELS, composto pela separação materna (*Maternal Separation - MS*) associada à limitação do ninho (*Limited bedding and LB*). Esse modelo parece induzir maiores alterações e ser mais translacional para o estudo de estresse precoce (PEÑA et al., 2017). Esse modelo combinado proposto (MS + LB) já tem sido utilizado e mostrou induzir alterações cognitivas na adolescência de machos e fêmeas. Com destaque para piora maior em fêmeas, também observada na memória de trabalho através do labirinto em Y, essa alteração foi relacionada com disfunções no dobramento de proteínas mediadas por chaperonas (ORSO et al., 2025).

Conectando a primeira parte com a do apêndice, o SE parece estar diretamente relacionado com essas respostas, como já discutido, esse sistema é recrutado para manter a homeostase do organismo como em situações de estresse (MOREIRA; LUTZ, 2008). A diminuição da expressão gênica dos CB₁R e da enzima de degradação da AEA, FAAH, na porção medial do CPF (CPFm) já foram relacionados a prejuízos no sistema de recompensa e no comportamento social de machos expostos a ELS (PORTUGALOV; MAROUN, 2024).

Embora exista uma relação clara entre o estresse precoce e os comportamentos relacionados à recompensa mais tarde na vida, os estudos variam em termos de tempo de exposição, sexo e função cognitiva avaliada. Visto isso, mais estudos são cruciais para a compreensão do impacto geral e dos potenciais mecanismos biológicos envolvidos.

A partir da discussão acima, esse trabalho tem o objetivo de verificar a hipótese de que eventos adversos na infância, através de um modelo combinado de MS e LB (chamado aqui de LBMS) em machos e fêmeas, ocasionaria em uma resposta alterada na vida adulta à recompensa, avaliada aqui pelo PCL induzido por cocaína. Também buscamos entender melhor as alterações de expressão gênica utilizando um painel de Neuropatologias contendo 770 relacionados, para melhor classificar esses alvos de acordo com a importância de suas modificações.

ii. Material e métodos

Animais: Camundongos C57BL6Rj, machos e fêmeas (20–25 g), provenientes da *Animal Facility* da Universidade de Aarhus, foram alojados em grupos de cinco animais por caixa (xx) em uma sala a uma temperatura constante de 24 ± 2 °C e um ciclo claro/escuro de doze horas, com livre acesso à água e comida. Os animais foram alocados na sala de experimentação pelo menos uma hora antes dos procedimentos para habituação. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Aarhus (nº 2023-15-0201-01528).

Drogas: A dose utilizada de cocaína (Merck & Co., Inc.) foi de 10 mg/kg, diluída em solução salina (NaCl 0,9%), administrada por via intraperitoneal em um volume de 10 ml/kg de animal. A dose foi escolhida a partir de trabalhos prévios com o objetivo de induzir o condicionamento com uma dose menor do que a geralmente utilizada, para que os efeitos do estresse fossem detectados.

Protocolos de estresse na infância ou protocolo LBMS: exposição simultânea dos animais a MS e LB. Protocolo ELS combinado, adaptado do modelo proposto anteriormente, visa impor múltiplas experiências adversas durante o desenvolvimento inicial (PEÑA et al., 2017).

Limited bedding and nesting (LB)

A restrição da maravalha do ninho nos primeiros dias de vida de um animal é um protocolo de estresse validado por diversos estudos. Do 2º ao 14º dia do desenvolvimento (PND2 – PND14), os animais do grupo ELS foram mantidos em gaiolas LB com quantidade reduzida de material de nidificação (1 g de algodão), o piso da gaiola foi coberto com uma plataforma de malha de alumínio com maravalha por baixo. As mães não conseguiam alcançar a maravalha para usá-las como material de nidificação, mas os excrementos dos camundongos caíam abaixo da plataforma. As mães e ninhadas do grupo CT foram colocadas em gaiolas com quantidade padrão de maravalha e 5g de algodão para serem usadas como material de nidificação. Após o 14º dia do desenvolvimento, os animais do grupo ELS retornaram às condições normais de criação. A limpeza das gaiolas ocorreu uma vez por semana para ambos os grupos.

Separação Materna (MS)

Simultaneamente, o protocolo de MS foi realizado separando os filhotes por 3 horas por dia (das 15h às 18h) do PND2 ao PND14. Para iniciar o protocolo, as mães eram retiradas da gaiola e mantidas em uma sala separada para evitar qualquer vocalização ultrassônica entre mãe e o filhote. Os filhotes eram então separados individualmente em pequenos recipientes plásticos. Uma almofada térmica com regulagem digital ($32^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) era colocada sob os recipientes para controlar a temperatura e evitar possível hipotermia. Após o período de MS, os filhotes eram devolvidos à gaiola, e somente em seguida a mãe era devolvida. O grupo CT não foi perturbado durante o protocolo.

Testes comportamentais:

Labirinto em Y:

Para avaliação cognitiva dos animais que passaram pelo estresse, utilizamos o teste de labirinto em Y, muito utilizado como teste de memória, aqui com um protocolo mais curto para o estudo da memória de trabalho (ORSO et al., 2021). Nele o animal foi exposto por cinco minutos aos dois braços A e B, por exemplo, enquanto o braço C permanecia fechado. O animal então era retirado do labirinto e permanecia por um minuto em uma caixa limpa sozinho e depois era re-exposto ao labirinto agora com o braço C aberto por dois minutos. A ideia do teste é verificar se ocorre uma maior exploração do “novo braço”, no exemplo o braço C, uma vez que o animal já reconheceria os outros braços e tende a explorar mais o braço novo (Fig. 21). Para análise o parâmetro latência foi utilizado sendo a porcentagem da razão do tempo no braço “novo” ou C do exemplo pelo tempo total de análise final de dois minutos ou 120 segundos. Com o objetivo de quantificar quanto do tempo de teste o animal passou mais no novo braço.

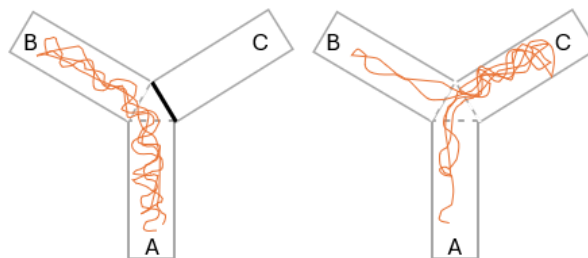


Fig 21: Imagem ilustrativa exemplificando o labirinto em Y, mostrando a primeira exposição ao aparato com o braço novo fechado (C) e depois com ele aberto.

Novelty suppressed feeding (NSF) ou teste de alimentação suprimida por novidade:

Nesse segundo teste buscamos avaliar a resposta a uma recompensa natural (a comida), assim como o comportamento ansioso do animal (ELIWA et al., 2021). Para isso, após o teste de labirinto em Y, os animais retornaram ao biotério e 12h antes do teste sua ração foi retirada e eles permaneceram em jejum até momento do teste. A análise foi feita por dez minutos e o parâmetro avaliado foi o tempo para primeira mordida no pellet de comida localizado no meio da caixa vazia em cima de um papel (Fig.22).

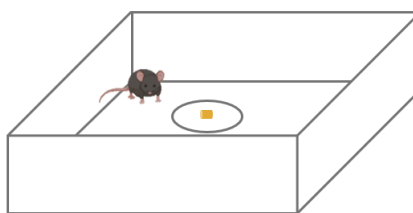


Fig. 22: Imagem representativa do teste de alimentação suprimida por novidade.

Preferência condicionada ao lugar:

Assim como anteriormente, o PCL foi utilizado para avaliar a memória contextual associada ao estímulo prazeroso, a cocaína nesse caso, aqui utilizamos o protocolo clássico de oito dias, sendo o primeiro dia o pré-teste, em que o animal podia explorar todos os compartimentos da caixa (Fig. 23), nos seis seguintes eles foram condicionados por trinta minutos alternando em um dos lados à cocaína (dias 2,4,6) e do outro salina (dias 3,5,7) e, finalmente, no dia do teste os animais foram re-expostos a toda a caixa por quinze minutos. A porcentagem do tempo do lado pareado a cocaína em relação ao total foi avaliada para entender se o animal foi condicionado.



Fig. 23: Imagem representativa do teste de preferência condicionada ao lugar, indicando os dois contextos diferentes: contexto A em que o animal recebeu veículo (*context A – veh*) e o contexto B associado à substância (*context B – drug*).

Os testes descritos foram realizados a partir do PND55 em bateria, sendo que os animais permaneceram no biotério sem manipulação desde o desmame ocorrido no PND21. O labirinto em Y foi o primeiro a ser realizado, seguido do NSF e por último o PCL (Fig. 24). Os aparatos foram limpos entre cada animal com álcool 30%. Logo ao sair do teste do PCL os animais foram perfundidos e seus cérebros foram retirados divididos em dois sendo uma metade congelada e na outra as regiões CPFm, HPC e STR foram dissecadas e mantidas a -80°C até o dia das análises moleculares.

Análise molecular:

A expressão gênica foi avaliada utilizando a tecnologia *NanoString nCounter*, que permite a quantificação direta de transcritos sem amplificação. Foram analisados genes presentes no painel de *Neuropathology*, contendo 770 genes relacionados associados à plasticidade sináptica e estrutura neuronal e sinalização celular. O RNA total foi extraído do córtex pré-frontal medial (CPFm), HPC e NAc dos animais após os comportamentos de acordo com as recomendações do kit utilizado e submetido à hibridização com sondas específicas para cada alvo. A quantificação foi realizada diretamente, sem necessidade de amplificação, permitindo a detecção absoluta do número de cópias de mRNA. Os dados foram normalizados com base nos controles endógenos e exógenos fornecidos pelo sistema, e analisados quanto à expressão diferencial entre os grupos experimentais (CT vs. LBMS). Os resultados foram expressos em valores de $\log_2(\text{fold change})$ e p-ajustado, sendo visualizados por meio de volcano plots.

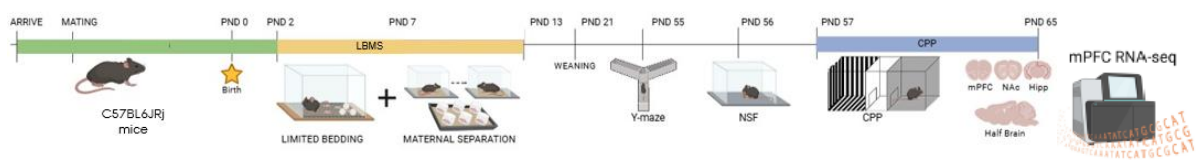


Fig. 24: Desenho experimental.

Análise estatística

Os testes comportamentais foram analisados para normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk e através do Teste T de Student não pareado. Para a análise da PCL comparando o pré-

teste e o pós-teste a ANOVA de uma via. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. E o valor considerado foi de 5% ($p < 0.05$).

iii. Resultados

A) LBMS não alterou parâmetros relacionados à memória de trabalho/cognição avaliados no labirinto em Y.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa no desempenho na percepção do novo braço no labirinto em Y, entre os grupos CNTR e LBMS ($t(49) = 1,51$; $p = 0,14$), indicando não haver piora da cognição dos animais submetidos ao LBMS (Fig.25a). Assim como somente para fêmeas ($t(22) = 1,18$, $p = 0,25$; Fig.25b) e para machos ($t(25) = 0,8617$, $p = 0,40$; Fig.25c).

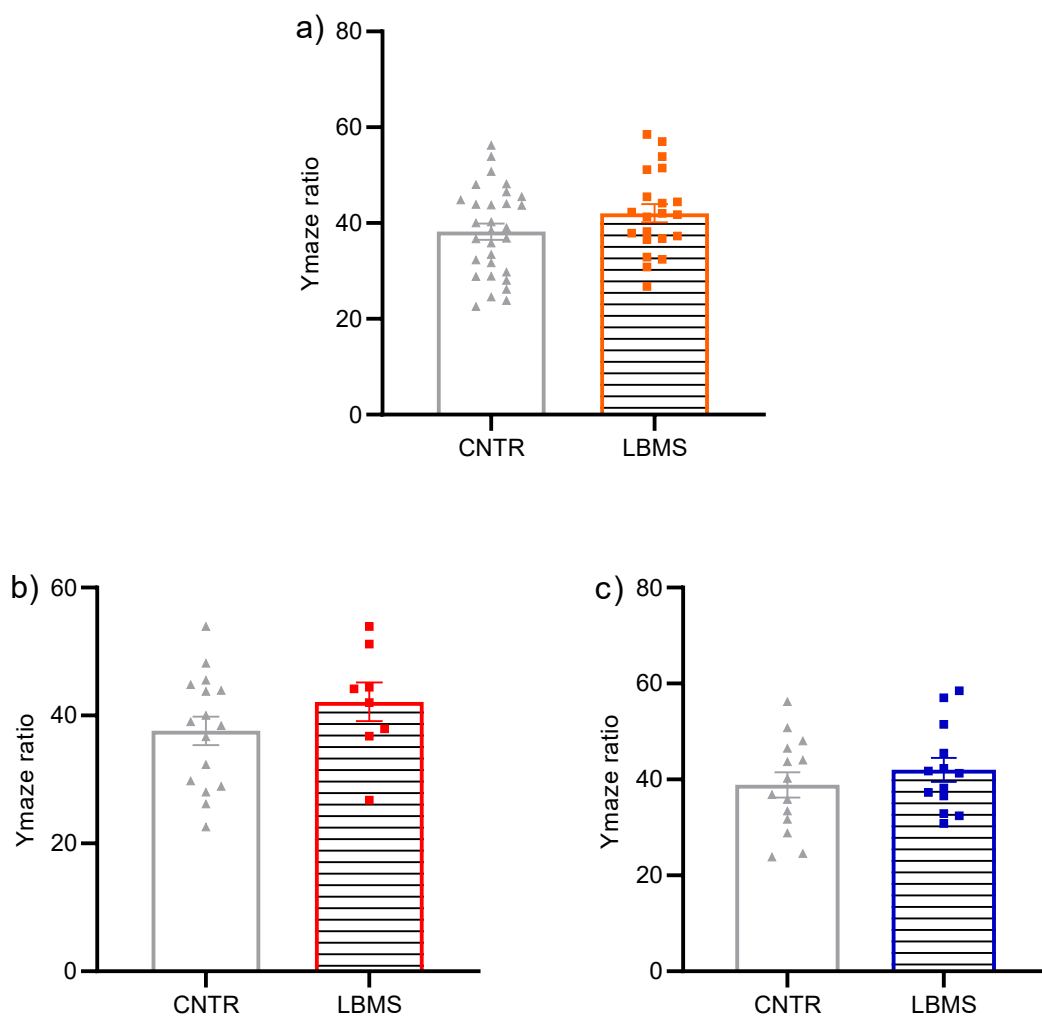


Fig. 25: LBMS não alterou parâmetros relacionados a memória de trabalho no labirinto em Y a) total, $n=29,21$ animais/grupo b) em fêmeas, $n=15,11$ animais/grupo e c) em machos, $n=14,13$ animais/grupo. Teste T de Student foi utilizado para análise dos grupos. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p<0.05$ em relação ao controle.

B) LBMS diminuiu a latência para primeira mordida no NSF somente de machos.

Em relação aos efeitos do tipo ansioso, não foi observada diferença do grupo LBMS em relação ao controle quando analisamos fêmeas e machos em conjunto ($t(47) = 0,7284$, $p = 0,4700$; Fig.26a]. Apesar disso, ao avaliarmos separadamente os sexos, continuamos não observando efeito nas fêmeas ($t(22) = 0,8639$, $p = 0,40$; Fig.26b), mas uma diminuição da latência para os machos que passaram pelo LBMS ($t(21) = 2,029$, $p=0,0553$; Fig. 26c).

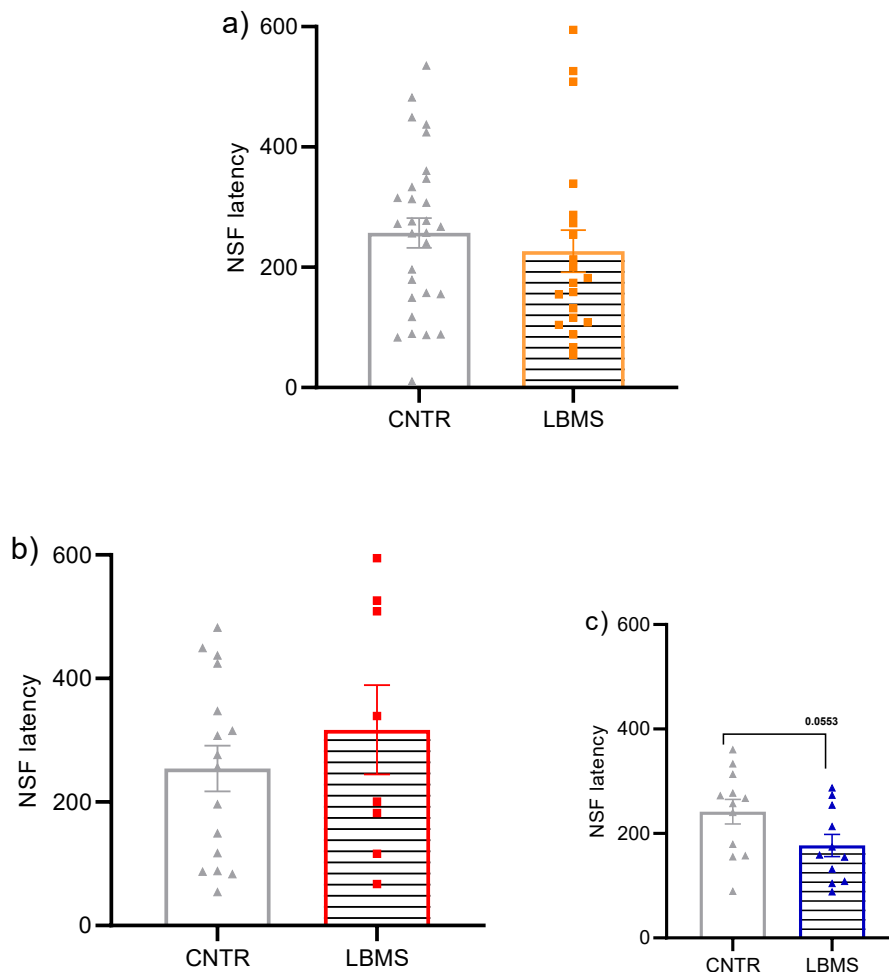
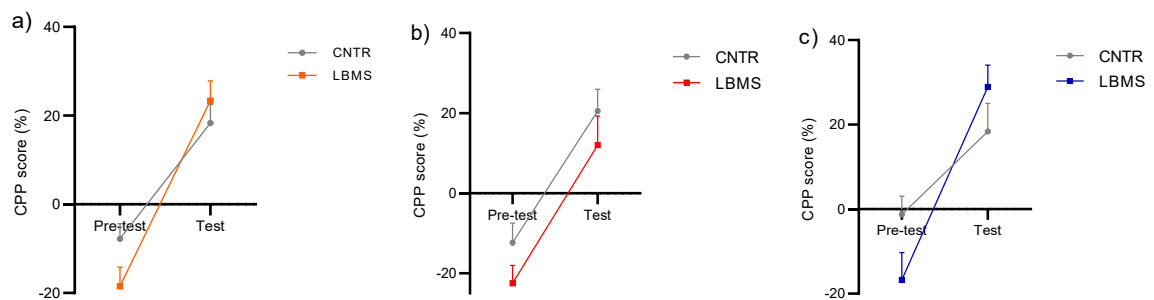


Fig. 26: Efeito do LBMS no NSF a) total $n= 29,20$ animais/grupo, b) em fêmeas, $n= 16,8$ animais/grupo e, em c) em machos, $n= 12,11$ animais/grupo. Teste T de Student foi utilizado para análise dos grupos. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p<0.05$ em relação ao controle.

C) LBMS aumentou a vulnerabilidade de machos na resposta contextual induzida por cocaína na PCL.

Para avaliar a resposta a recompensa induzida por cocaína nos animais que passaram pelo LBMS, realizamos a PCL e, apesar de observarmos indução de preferência pelo lado associado à droga em todos os grupos, indicado por ANOVA de duas vias com medidas repetidas para o fator tempo [$F(1, 47) = 104,9$, $p^* < 0,0001$], não observamos diferença para o fator tratamento [$F(1, 47) = 0,3417$, $p = 0,5616$], apesar de haver diferença para interação entre eles [$F(1, 47) = 5,644$, $p^* = 0,0216$; Fig. 26c].

Ao analisarmos separadamente por sexo, verificamos a mesma resposta, com diferença no fator tempo [$F(1, 21) = 48,11$, $p^* < 0,0001$], sem diferença para tratamento [$F(1, 21) = 2,128$, $p = 0,1594$] e interação entre eles [$F(1, 21) = 0,03165$, $p = 0,8605$] para fêmeas e para machos: tempo [$F(1, 24) = 54,52$, $p^* < 0,0001$], tratamento [$F(1, 24) = 0,1297$, $p = 0,7219$], com interação entre os fatores [$F(1, 24) = 8,645$, $p^* = 0,0071$].



Assim como, quando analisamos os resultados somente do dia do teste, o teste T de Student não pareado não indicou diferença entre os grupos para fêmeas ($t(21) = 0,9498$, $p = 0,35$) e para machos ($t(25) = 1,458$, $p = 0,16$).

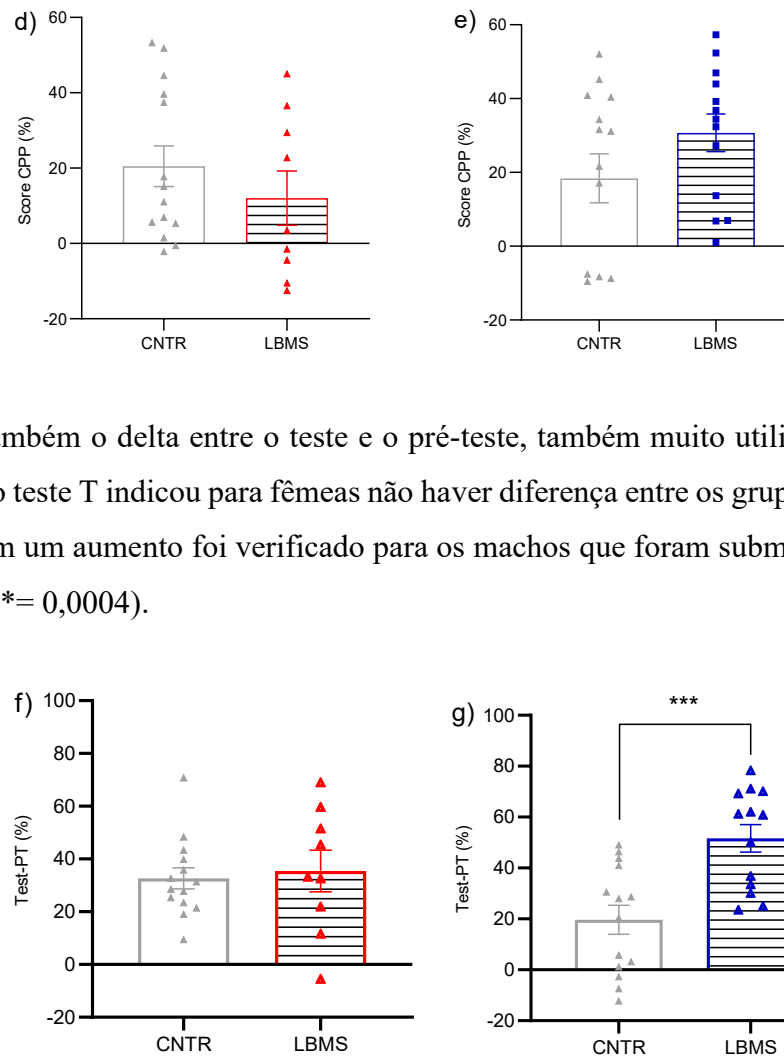


Fig. 27: LBMS na PCL induzida por cocaína (10 mg/kg) a) Pré-teste e teste total $n = 29,20$ animais/grupo, b) em fêmeas, $n = 14,9$ animais/grupo e c) em machos, $n = 14,12$ animais/grupo em que a ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para análise. d) Dados individuais da porcentagem do dia teste em fêmeas, $n = 14,9$ e e) em machos, $n = 14,13$ animais por grupo. Dados individuais do delta do teste para o pré-teste f) para fêmeas, $n = 14,9$ e g) para machos, $n = 14,13$. Teste T de Student foi utilizado para detectar as diferenças dos dados. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$ em relação ao pré-teste ou ao controle.

D) Alterações de expressão gênica

A análise do mPFC revelou alterações significativas na expressão de genes relacionados à estrutura axonal e dendrítica no grupo LBMS em comparação ao grupo controle (CT). O volcano plot mostra os transcritos diferencialmente expressos entre o grupo LBMS e o baseline

do grupo CT. As linhas tracejadas representam diferentes limiares de p-valor ajustado (FDR), utilizados para controlar o erro tipo I em múltiplas comparações. Genes acima dessas linhas apresentam significância estatística crescente conforme o nível de FDR indicado. Observa-se um predomínio de genes up-regulated, com destaque para *Tpm1*, *L1cam*, *Rgs4*, *Pdgfrb* e *Smn1*. Poucos transcritos apresentaram down-regulation, sendo *Sox10* o principal.

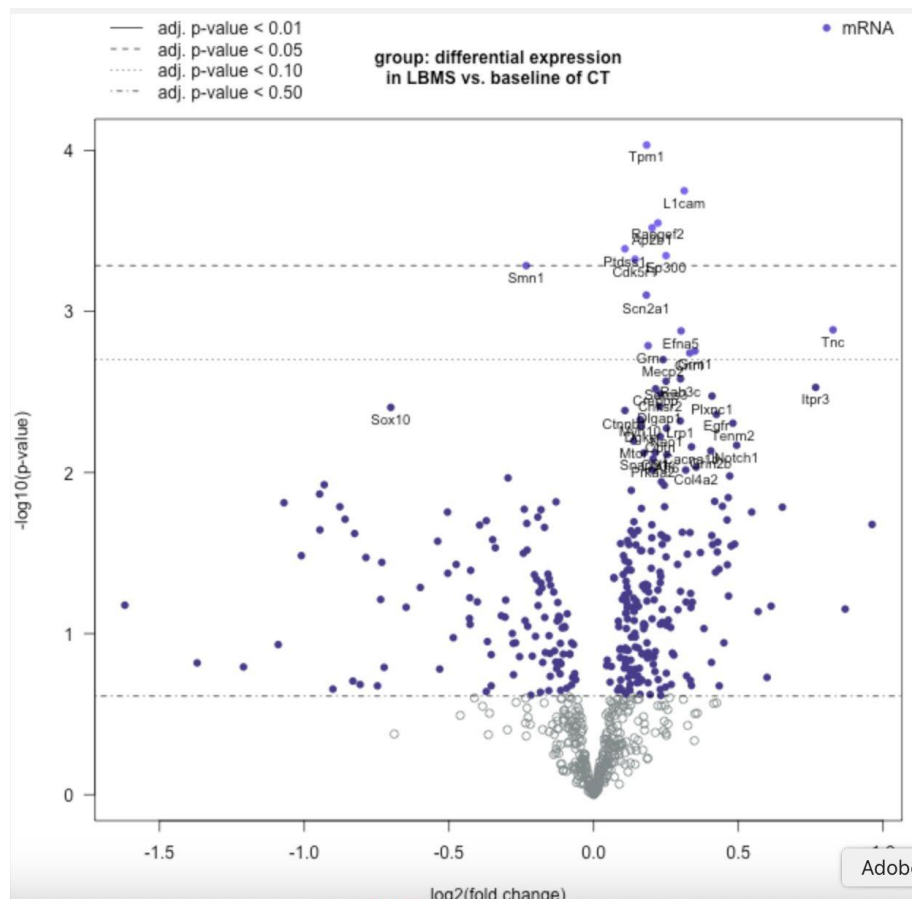


Fig. 28: Gráfico em forma de Vulcano, indicando quais genes sofreram alteração positiva ou negativa em relação ao grupo controle e LBMS.

Também foi possível investigar as vias relacionadas aos genes identificados acima, mostrando que eles estão relacionados a alterações na estrutura de axônios e dendritos.



Fig. 29: Vias relacionadas aos genes identificados com alta ou baixa expressão.

iv. Discussão

Neste trabalho mostramos que o estresse durante o início da vida aumenta a vulnerabilidade à cocaína na vida adulta de camundongos machos, através do aumento da indução do condicionamento às pistas contextuais associadas a droga no teste PCL. Também identificamos 9 genes que tiveram sua expressão modificada positiva ou negativamente frente ao estresse e à cocaína, com destaque para genes relacionados a função neural e plasticidade no córtex pré-frontal medial.

Nos testes comportamentais não observamos diferenças no labirinto em Y, relacionado a memória de trabalho desses animais. Para o teste de alimentação suprimida por novidade, observamos uma diminuição da latência para primeira mordida no pellet somente nos machos, indicando um comportamento do tipo ansioso desses animais após o LBMS. Interessantemente, na PCL, somente verificamos um aumento da resposta de condicionamento do grupo LBMS em relação ao controle também nos machos, o que pode estar relacionado ao comportamento mais ansioso que já tem mostrado ser um comportamento que aumenta a vulnerabilidade à busca por substâncias de abuso. A comorbidade, ansiedade e adicção, apesar de não possuírem os mesmos circuitos neurais, sofrem grande influência do ELS e são comumente presentes na vida adulta desses indivíduos (AVERY; CLAUSS; BLACKFORD, 2016).

Os dados aqui apresentados corroboram com os trabalhos de base do grupo, uma vez que mostram um maior condicionamento de animais que passaram pela MS ou LBMS durante a infância (ORSO et al., 2017; VIOLA et al., 2016).

O aumento da expressão de *L1cam*, *Cdk5r1* e *Scn2a1* observado no grupo LBMS sugere um reforço de mecanismos de plasticidade estrutural e sináptica, possivelmente relacionados a processos adaptativos induzidos pelo tratamento ou condição experimental. O gene *L1cam* codifica uma molécula de adesão neuronal essencial para o crescimento axonal e a formação de circuitos funcionais, enquanto *Cdk5r1* regula a atividade da quinase CDK5, fundamental para a dinâmica do citoesqueleto e a estabilidade sináptica. Já *Scn2a1* está envolvido na geração e propagação de potenciais de ação, refletindo ajustes na excitabilidade neuronal.

Essas alterações no CPFm podem refletir adaptações moleculares que sustentam o aumento da vulnerabilidade comportamental observada, visto que o grupo submetido ao LBMS apresentou maior escore no teste de PCL induzido por cocaína. Modificações no CPFm já foram reportadas em humanos, com diminuição dessa estrutura e do HPC associadas a maus tratos na infância, além serem relacionadas à ansiedade na vida adulta (GORKA et al., 2014). É uma região altamente implicada no funcionamento executivo e cognitivo, assim como na flexibilidade cognitiva. Interessantemente, as fêmeas demonstram uma maturação precoce dessa região em comparação aos machos (PREMACHANDRAN; ZHAO; ARRUDA-CARVALHO, 2020), o que pode explicar em parte as maiores consequências em machos. Em animais, as fêmeas demonstraram recuperação espontânea após extinção do paradigma de medo já em PN18, resposta não verificada em machos (PERRY et al., 2025).

Por último, apesar de não ser um dos genes significativamente alterados, o gene que codifica para o CB₁R, o *Cnr1*, também mostrou uma regulação aumentada na análise de expressão gênica, com um $p < 0,10$ nesses casos também evidenciados para análise exploratória.

Assim, os resultados de expressão gênica reforçam a hipótese de que o estresse precoce modula circuitos corticais envolvidos na recompensa e no controle inibitório, aumentando a propensão à sensibilização e à aprendizagem associada a estímulos reforçadores na vida adulta. Em conjunto, essas alterações apontam para uma modulação coordenada de genes associados à estrutura e função neuronal, o que pode contribuir para compreender os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados comportamentais ou fisiologicamente no grupo LBMS.

v. Conclusão

O estresse no início da vida aumenta a vulnerabilidade ao condicionamento contextual induzido por cocaína em camundongos machos. Apesar de ainda precisar de mais análises essa alteração comportamental parece se relacionar com o aumento da expressão de genes ligados a estrutura e função neuronal, neuroplasticidade, e respostas adaptativas cerebrais. O modelo de estudo LBMS, mostrou-se consistente e robusto para o estudo dessas alterações, assim como o emprego do teste de preferência condicionada, mesmo em uma dose menor do que a geralmente utilizada. Esses achados acrescentam a uma literatura ainda pequena sobre as consequências do ELS para as respostas motivadas e evidenciam diferenças sexuais em mais um estudo.

Esses dados conversam com os dados anteriores uma vez que mostram mais uma variável importante no estudo dos transtornos por uso de substâncias. Apesar disso, infelizmente não foi possível avaliar a intervenção desses animais com o bloqueador do CB₁R. Apesar de, mais uma vez, confirmamos o recrutamento do gene *Cnr1* com esses comportamentos tanto de estresse como de desenvolvimento da adicção por cocaína, o que integra as duas partes e fortalece nossas hipóteses.