

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

JADNA BOGADO LOPES

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES CANABINOIDES NA
SENSIBILIZAÇÃO E PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO
LUGAR INDUZIDAS POR COCAÍNA**

Belo Horizonte

2017

JADNA BOGADO LOPES

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES CANABINOIDES NA
SENSIBILIZAÇÃO E PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR
INDUZIDAS POR COCAÍNA**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo
Moreira

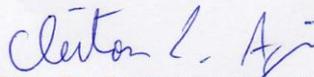
BELO HORIZONTE

2017

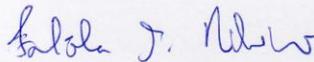
**"ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES CANABINOIDES NA
SENSIBILIZAÇÃO E PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR
INDUZIDAS POR COCAÍNA"**

JADNA BOGADO LOPES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **16 de agosto de 2017**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. CLEITON LOPES AGUIAR
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. FABÍOLA MARA RIBEIRO
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



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

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

Belo Horizonte, 16 de agosto de 2017

Aos meus pais que, incondicionalmente, sempre apoiaram as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Juçara e Huri, por todo o suporte e confiança, por apoiarem as minhas escolhas, apesar da distância geográfica.

Agradeço ao meu orientador, Fabrício, que esteve presente em todas as etapas desta caminhada, pelas conversas construtivas, pela paciência, por sempre procurar a melhor solução possível e por inspirar seus orientandos a terem uma visão crítica e mais profunda sobre vários aspectos da ciência (e fora dela).

Agradeço à Daniele pelas conversas, desabafos, companhia em inúmeras situações ao longo destes dois anos, além das imensas contribuições para a execução das técnicas de imunohistoquímica.

Às pessoas que fazem o Laboratório de Neuropsicofarmacologia: nós somos um reflexo de nossos orientadores e, muito por isso, temos uma convivência extremamente agradável e de companheirismo, não tão fácil de ser encontrada em outros lugares. Agradeço especialmente à Juliana e à Rayssa por toda a ajuda na realização dos experimentos, imprescindíveis para a melhor realização dos mesmos. Agradeço a todos os meus colegas de laboratório: Anna Paula, Felipe, Flávio, João, Lia, Luara, Nícia, Nicole, Rafaela, Rafael e Rita, além dos que já defenderam: Jivago, Júlia, Pedro e Thércia, por transformarem o meu dia-a-dia em algo muito melhor, pelas conversas e por todo o apoio concedido.

Aos colegas de outros laboratórios, principalmente dos professores Antônio, Helton e Luciene, pela parceria nas diferentes ocasiões que passamos na pós-graduação.

Às pessoas que fazem parte do PGFISFAR, por permitirem que o nível de excelência do programa seja mantido.

Aos técnicos Adriane, Simone e Rinaldo, por toda a simpatia e realização de um trabalho cuidadoso, sem o qual não seria possível a qualidade dos nossos experimentos.

A todos os meus amigos que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências financiadoras: CAPES, CNPq e FAPEMIG.

“As you know, in most areas of science, there are long periods of beginning before we really make progress”

Eric Kandel, 2012

RESUMO

As drogas de abuso, a exemplo da cocaína, exercem efeito recompensador e facilitam a neurotransmissão dopaminérgica na via mesolímbica. O sistema endocanabinoide, representado por receptores canabinoides (CB₁ e CB₂), endocanabinoides e as enzimas que os sintetizam e degradam, modula esta via de neurotransmissão e pode ser um importante alvo de terapias farmacológicas para o tratamento do transtorno por uso de substância. Neste trabalho, testamos a hipótese de que receptores canabinoides estão envolvidos nos efeitos de sensibilização motora, preferência condicionada ao lugar (PCL) e ativação de neurônios hipocampais induzidas por cocaína. Para tal, camundongos *Swiss* receberam injeções de AM251 (antagonista de receptor CB₁) ou JWH133 (agonista de receptor CB₂) durante as fases de aquisição ou expressão dos comportamentos citados. O AM251 inibiu a sensibilização, quando administrado nas fases de aquisição (0,3, 1 e 3 mg/kg) ou expressão (1 e 3 mg/kg), e a PCL, quando administrado na fase de aquisição (10 mg/kg). O JWH133 não impediu o efeito agudo da cocaína. Porém, atenuou a sensibilização quando administrado nas fases de aquisição (0,3 e 1 mg/kg) ou expressão (1 e 3 mg/kg). Além disso, a administração de JWH133 (10 mg/kg) preveniu a PCL por cocaína em ambas as fases. Os efeitos do JWH133 foram revertidos com a administração de AM630 (antagonista de receptores CB₂). A atenuação da memória contextual induzida por cocaína foi acompanhada por diminuição na ativação neuronal (células positivas para c-Fos) no hipocampo dos animais tratados com AM251 e JWH133. Assim, os efeitos comportamentais e celulares induzidos por cocaína parecem ser mediados pela ativação do receptor CB₁ e inibidos pela ativação do receptor CB₂. Considerando que ambos receptores são acoplados à proteína G_{i/o}, especulamos que estes receptores atuam em tipos distintos de neurônios, estando CB₁ e CB₂ localizados em neurônios GABAérgicos e dopaminérgicos, respectivamente.

Palavras-chave: CB₁, CB₂, psicoestimulante, memória, recompensa

ABSTRACT

Drugs of abuse, such as cocaine, induce a reward effect and facilitate dopaminergic neurotransmission on the mesolimbic pathway. The endocannabinoid system, represented by cannabinoid receptors (CB₁ e CB₂), endocannabinoids and enzymes responsible for their synthesis and degradation, modulates the neurotransmission pathway and can be an important pharmacological target for the treatment of addiction. Herein, we tested the hypothesis that cannabinoid receptors are implicated on motor sensitization effects, conditioned place preference (CPP) and hippocampal neuronal activation induced by cocaine. *Swiss* male mice received AM251 (CB₁ receptor antagonist) or JWH133 (CB₂ receptor agonist) injections during acquisition or expression phases of the above mentioned behavioural tasks. AM251 inhibited sensitization, when administered during the acquisition (0,3, 1 and 3 mg/kg) or expression. (1 and 3 mg/kg) phases, and CPP, when administered during acquisition phase (10 mg/kg). JWH133 did not prevent the acute cocaine-effect. However, it attenuated sensitization when administered during acquisition (0,3 and 1 mg/kg) or expression (1 and 3 mg/kg) phases. Moreover, administration of JWH133 (10 mg/kg) prevented cocaine-induced CPP on both phases. JWH133 effects were reverted by AM630 (CB₂ receptor antagonist) administration. The attenuation of the cocaine-induced contextual memory occurred along with a decrease on neuronal activation (c-Fos positive cells) on the hippocampus of animals treated with AM251 and JWH133. Therefore, behavioural and cellular effects induced by cocaine seem to be mediated by activation of CB₁ receptor and inhibited by activation of CB₂ receptor. As both receptors are G_{i/o} coupled receptors, we speculate that they act on different neuronal types, with CB₁ e CB₂ localized on GABAergic and dopaminergic neurons, respectively.

Keywords: CB₁, CB₂, psychostimulant, memory, reward

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos componentes envolvidos na transmissão retrógrada do Sistema Endocanabinoide.....	19
Figura 2. A sensibilização induzida por cocaína pode ser observada com a administração da mesma dose desta droga em dois dias consecutivos.....	26
Figura 3. Ilustração das três fases da PCL induzida por cocaína: pré-teste, condicionamento e teste..	28
Figura 4. Diagrama do plano representativo da região de análise das células positivas para c-Fos no hipocampo.....	30
Figura 5. Esquema representativo do delineamento experimental utilizando AM251 ou JWH133 nas fases de aquisição ou expressão da sensibilização induzida por cocaína.....	31
Figura 6. Esquema representativo do delineamento experimental utilizando AM630 para reverter o efeito do JWH133 nas fases de aquisição ou expressão da sensibilização induzida por cocaína.....	32
Figura 7. Esquema representativo do delineamento experimental utilizando AM251 ou JWH133 nas fases de aquisição ou expressão da PCL induzida por cocaína.....	33
Figura 8. Esquema representativo do delineamento experimental utilizando AM630 e JWH133 nas fases de aquisição ou expressão da PCL induzida por cocaína.....	35
Figura 9. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 1 previniu a sensibilização induzida por cocaína.....	38
Figura 10. O agonismo de receptores canabinoides do tipo 2 previniu a sensibilização induzida por cocaína.....	39
Figura 11. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 2 reverte o efeito observado do JWH133 na sensibilização.....	40
Figura 12. Controle das drogas utilizadas no modelo de PCL.....	41
Figura 13. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 1 previniu a PCL induzida por cocaína.....	42
Figura 14. O agonismo de receptores canabinoides do tipo 2 reduziu o efeito da cocaína na PCL.....	44
Figura 15. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 2 reverteu o efeito do JWH133 na PCL induzida por cocaína.....	45
Figura 16. O tratamento com AM251, na fase de aquisição da PCL, reverteu o aumento de expressão de c-Fos induzido por cocaína no hipocampo de camundongos.....	47
Figura 17. O tratamento com JWH133, na fase de aquisição da PCL, reverteu o aumento de expressão de c-Fos induzido por cocaína no hipocampo de camundongos.....	48
Figura 18. O tratamento com JWH133, na fase de expressão da PCL, reverteu o aumento de expressão de c-Fos induzido por cocaína no hipocampo de camundongos.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Controle de atividade locomotora.....	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-AG – 2-araquidonoilglicerol
- AMPC – Monofosfato Cíclico de Adenosina
- ATV – Área Tegmental Ventral
- BSA – Albumina de Soro Bovino
- CB₁ – Receptores Canabinoides do tipo 1
- CB₁^{-/-} – Animais nocautes para receptores CB₁
- CB₂ – Receptores Canabinoides do tipo 2
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CPFm – Córtex Pré-Frontal Medial
- D₁ a D₅ – Receptores Dopaminérgicos de 1 a 5
- DAB – 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloro
- DAGL – Diacilglicerol Lipase
- FAAH – Hidrolase de Amida de Ácido Graxo
- GABA – Ácido Gama-aminobutírico
- MAGL – Monoacilglicerol Lipase
- NaCl – Cloreto de Sódio
- PB – Tampão Fosfato
- PBS – Tampão Fosfato Salino
- PCL – Preferência Condicionada ao Lugar
- PFA – Paraformaldeído
- SNC – Sistema Nervoso Central
- TEP – Tomografia por Emissão de Pósitrons
- TUS – Transtorno por Uso de Substância
- Δ⁹ THC – Delta-9-Tetrahydrocannabinol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 COCAÍNA: HISTÓRIA E NEUROBIOLOGIA.....	13
1.2 O SISTEMA ENDOCANABINOIDE	17
1.3 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NOS EFEITOS DA COCAÍNA	20
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 ANIMAIS	25
4.2 DROGAS.....	25
4.3 MODELOS COMPORTAMENTAIS	25
4.3.1 Sensibilização	25
4.3.2 Preferência Condicionada ao Lugar	26
4.4. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA C-FOS NO HIPOCAMPO.....	28
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
4.5.1 Efeitos de agonistas e antagonistas canabinoides na locomoção basal	30
4.5.2 Envolvimento de receptores canabinoides na sensibilização induzida por cocaína	30
4.5.3 Envolvimento de receptores CB ₂ nos efeitos do JWH133 sobre a sensibilização induzida por cocaína.....	31
4.5.4 Efeitos de agonistas e antagonistas canabinoides na preferência ou aversão condicionadas ao lugar	32
4.5.5 Efeito do AM251 e do JWH133 na PCL induzida por cocaína e alterações na expressão de c-Fos no hipocampo	32

4.5.6 Envolvimento de receptores CB ₂ nos efeitos do JWH133 sobre a PCL induzida por cocaína.....	34
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 EFEITOS DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS CANABINOIDES SOBRE A LOCOMOÇÃO BASAL	36
5.2 EFEITOS DE ANTAGONISMO DE RECEPTORES CB ₁ E DE AGONISMO DE RECEPTORES CB ₂ SOBRE A SENSIBILIZAÇÃO MOTORA INDUZIDA POR COCAÍNA.....	36
5.3 EFEITOS DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS CANABINOIDES SOBRE A PCL.....	41
5.4 EFEITOS DE ANTAGONISMO DE RECEPTORES CB ₁ E DE AGONISMO DE RECEPTORES CB ₂ SOBRE A PCL INDUZIDA POR COCAÍNA	41
5.5 O TRATAMENTO COM AM251 OU JWH133 REVERTE O AUMENTO DE C-FOS INDUZIDO POR COCAÍNA NO HIPOCAMPO	46
6 DISCUSSÃO	50
6.1 ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES CANABINOIDES NA SENSIBILIZAÇÃO MOTORA	50
6.2 ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES CANABINOIDES NA PCL E EXPRESSÃO DE C-FOS NO HIPOCAMPO	53
REFERÊNCIAS.....	58

1 Introdução

1.1 Cocaína: História e Neurobiologia

A cocaína é uma droga psicoestimulante alcaloide, que exibe um núcleo tropano. Ela é extraída das folhas de plantas que pertencem à família Erythroxylaceae, principalmente as espécies *Erythroxylum coca* e *E. novogranatense*, encontradas em países da América do Sul. O uso destas plantas por civilizações andinas em rituais, com propósitos sociais e fisiológicos, é relatado arqueologicamente há pelo menos 3000 anos (RIVERA et al., 2005). Já no século XVI, um médico e botânico espanhol, Nicolás Monardes, publicou um estudo descrevendo as propriedades das folhas de coca em suprimir a fadiga, a fome e a sede, bem como o “grande contentamento” experienciado pelos usuários andinos (MORTIMER, 1901; RIVERA et al., 2005). Em 1859, Albert Niemann isolou o princípio ativo das folhas de coca, denominado “cocaína”, notando que esta substância era cristalizada e com o gosto amargo característico de alcaloides. Embora de considerável importância, esta descoberta atraiu pouca atenção na época e a cocaína foi parar no catálogo da farmacêutica Merck, junto com vários outros alcaloides extraídos de plantas que poderiam ser alvo de pesquisa. Por outro lado, as folhas de coca começaram a ser adicionadas a tônicos e vinhos, vendidos em lojas e farmácias como estimulantes milagrosos na Europa e Estados Unidos (JAY, 2015).

Ainda na segunda metade do século XIX, apesar da grande popularização comercial de coca, a comunidade científica permanecia cética quanto a real eficácia da cocaína. Um dos médicos a defender imensamente o uso desta pra fins terapêuticos foi Sigmund Freud que, em 1885, publicou uma monografia chamada “Über Coca” (Sobre Coca) (FREUD, 1885). Ele a recomendava, por seus efeitos estimulantes, para aqueles que sofriam de neurastenia, bem como para o tratamento de indigestão e em casos de adicção à morfina (JAY, 2015). Além disso, concluía que outros usos, baseando-se nas propriedades anestésicas da cocaína, provavelmente seriam desenvolvidos no futuro. Mas foi Carl Koller, colega de Freud, quem investiu na cocaína como anestésico local, comprovando uma importante aplicação médica (MARKEL, 2011). Por outro lado, começaram a surgir indicações de que a cocaína poderia causar adicção e sintomas de abstinência.

O uso e comercialização de determinadas drogas, como a cocaína, foram limitados e/ou proibidos a partir do início de século XX em vários países. No Brasil, a primeira lei de tóxicos data de 1921 (Lei nº 4.294), permitindo somente o uso médico para substâncias

entorpecentes. No mesmo século, estudos demonstrando os mecanismos de ação destas drogas no sistema nervoso central (SNC) começaram a surgir. As alterações neurológicas causadas por uso prolongado de cocaína, em determinadas situações de uso contínuo a despeito das consequências negativas para o indivíduo, evidenciam a existência de uma doença crônica. Esta doença é denominada “Transtorno por Uso de Substância” (TUS)* no “Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais V” (APA, 2013) que lista os critérios de diagnóstico. Há mais de 18 milhões de usuários de cocaína no mundo, dos quais cerca de 16% podem desenvolver o TUS (UNITED NATIONS, 2016). A cocaína é utilizada nas formas de hidrocloreto (por via intranasal ou intravenosa) ou base livre (“crack”, fumada). As principais variáveis envolvidas no início e contínuo uso de drogas dependem da própria droga (disponibilidade, pureza, forma de administração), do usuário (fatores genéticos e experiências prévias) bem como do ambiente (características sociais, educacionais, contexto, entre outros). Dentre os sintomas de abstinência observa-se depressão, fadiga, fissura pela droga e bradicardia. A abstinência é uma reação fisiologicamente esperada em casos de exposição crônica à cocaína (e outras drogas de abuso), não necessariamente um sintoma de TUS, muito embora possa dificultar o tratamento inicial (AHMED, 2012; O'BRIEN et al., 2006). Infelizmente, não há tratamentos farmacológicos de grande efetividade.

O mecanismo de ação da cocaína consiste, principalmente, na inibição dos transportadores de membrana de monoaminas, particularmente dopamina no sistema mesolímbico cerebral (GOODMAN et al., 2011). Como consequência, os níveis de dopamina disponíveis na fenda sináptica aumentam imensamente e disfunções em vias dopaminérgicas parecem ser responsáveis pelos principais efeitos da cocaína. Arvid Carlsson, pesquisador sueco agraciado com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina no ano 2000, foi um dos primeiros a demonstrar que a dopamina tinha ações próprias e não era apenas um precursor de adrenalina e noradrenalina (CARLSSON et al., 1957; CARLSSON et al., 1958), ainda que desacreditado na época (HORNYKIEWICZ, 2002). Ao longo das últimas décadas, estudos apontaram evidências do envolvimento da dopamina em diferentes processos fisiológicos, tais como recompensa, emoção, cognição, memória e atividade locomotora. Os neurônios dopaminérgicos, onde a síntese de dopamina ocorre, projetam-se de três regiões do SNC: substância negra, área tegmental ventral (ATV) e núcleo arqueado do hipotálamo, dando origem a quatro vias principais: mesocortical, mesolímbica, nigrostriatal e tuberoinfundibular (GOODMAN et al., 2011). As vias que partem da ATV (mesocortical e mesolímbica)

* O termo “adição” é utilizado como sinônimo de “Transtorno por Uso de Substância” na presente dissertação.

regulam o sistema de recompensa cerebral, cuja função evolutiva é de manutenção da vida e da espécie, estimulando comportamentos como alimentação e cópula, essenciais para tal fim (DI CHIARA e IMPERATO, 1988). Interessantemente, as drogas de abuso direta ou indiretamente atuam nestas vias dopaminérgicas e estimulam este sistema de forma mais intensa que os estímulos naturais (KOOB e VOLKOW, 2010).

Os efeitos da dopamina são mediados por receptores acoplados à proteína G que estão divididos em duas grandes famílias: D₁ e D₂. A família D₁ é composta por receptores D₁ e D₅ e estes são acoplados à proteína G α_s , ou seja, estimulam a atividade da enzima adenilato ciclase, amplificando a síntese de AMP cíclico (AMPC), resultando em uma série de eventos que culminam na transcrição de genes. Os receptores D₂, D₃ e D₄, por sua vez, fazem parte da família D₂ de receptores acoplados à proteína G $\alpha_{i/o}$ e, assim, inibem a adenilato ciclase (BEAULIEU e GAINETDINOV, 2011). Os receptores de dopamina exibem um padrão amplo de expressão no SNC e na periferia. Por exemplo, os receptores D₁ são expressos em alta densidade no estriado, núcleo acumbente, substância negra, amígdala e córtex frontal, bem como em menor densidade em áreas como o hipocampo. No estriado dorsal, núcleo acumbente e tubérculo olfatório encontram-se os maiores níveis de receptores D₂, os quais também são expressos em outras áreas (SEEMAN, 2006; VALLONE et al., 2000). Embora atuando diretamente na recaptção de dopamina, a cocaína interfere em longo prazo na expressão de receptores dopaminérgicos. Estudos em humanos demonstraram que o abuso de cocaína diminui os níveis de receptores D₂ no estriado em cerca de 20% (VOLKOW et al., 1990) e esta diminuição pode durar de 3 a 4 meses (VOLKOW et al., 1993). Ainda com o uso de tomografia por emissão de pósitrons (TEP ou “Positron Emission Tomography” - PET em inglês) constatam-se alterações de outros receptores dopaminérgicos em usuários de substâncias psicoestimulantes. Payer e colaboradores (PAYER et al., 2014) sugerem que o aumento de receptores D₃, observado em estudos clínicos com usuários de drogas estimulantes (BOILEAU et al., 2012; MATUSKEY et al., 2014), pode ser encarada como uma característica geral nestas condições e um possível biomarcador em casos de adicção. Apesar de relevante, estas e outras descobertas não explicam o quadro geral de atuação da cocaína no SNC. Ao longo das últimas décadas, o uso de modelos animais possibilitou o melhor entendimento de processos neurobiológicos envolvidos em inúmeras situações psiquiátricas ou não-psiquiátricas, como o uso e transtorno por uso de cocaína.

Os modelos animais devem respeitar as validades de constructo teórico, de face e preditiva. Neste sentido, avalia-se se os aspectos fisiopatológicos da doença são reproduzidos

no modelo (constructo), o quão bem os sintomas de uma condição psiquiátrica são mimetizados (face) e a capacidade de fármacos utilizados para a determinada condição em humanos induzirem resposta similar no modelo animal (preditiva) (NUNES e HALLAK, 2014). Para estudar o TUS, o principal modelo existente é o de autoadministração, por mimetizar a administração voluntária de uma determinada droga e até mesmo a parcela de indivíduos que tornam-se adictos (16% no caso da cocaína) (DEROCHE-GAMONET et al., 2004). Com base no comportamento operante e utilizando a droga como um agente reforçador, normalmente os animais são treinados a realizar uma tarefa (apertar uma barra, por exemplo) a fim de receber uma quantidade de reforço (droga) pré-estabelecida que pode ou não mudar ao longo do tempo (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006). Ainda que a motivação e a obtenção de droga variem significativamente entre humanos e animais não-humanos, assume-se que a circuitaria química e anatômica cerebral seja similar em ambas situações (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006).

Outros modelos são amplamente utilizados no estudo dos efeitos da cocaína. É o caso da Preferência Condicionada ao Lugar (PCL ou “Conditioned Place Preference” – CPP, em inglês) (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006). A PCL é realizada em uma caixa com dois ou três compartimentos distintos entre si. Um dos compartimentos é pareado com a droga (estímulo incondicionado) e o outro com veículo. Após repetidas administrações durante a fase de condicionamento, o animal poderá escolher livremente entre os lados da caixa no dia do teste. A medida de preferência condicionada é obtida no teste quando o animal gasta mais tempo no compartimento que foi anteriormente pareado com a droga. Este mesmo procedimento pode ser utilizado tanto para avaliar a capacidade recompensadora de uma droga quanto a aversiva (CUNNINGHAM et al., 2006; HUSTON et al., 2013). Embora exista uma simplificação de que a PCL é baseada no condicionamento clássico (Pavloviano) (BARDO e BEVINS, 2000), ao contrário deste, que depende da amígdala e núcleo acumbente, a PCL parece estar mais intimamente relacionada com o hipocampo (WHITE et al., 2005).

Agudamente, quando a cocaína é administrada em animais, um dos efeitos observados, e passível de quantificação, é a hiperlocomoção (WISE e BOZARTH, 1987). A partir da análise da atividade locomotora dos animais, pode-se observar outra resposta induzida por cocaína: a sensibilização comportamental. O termo sensibilização é utilizado para definir um aumento de uma determinada resposta após a repetição de um estímulo que originou a primeira resposta (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006). Este fenômeno

ocorre quando a mesma dose de cocaína é administrada repetidamente e induz o aumento exacerbado da locomoção motora em relação àquela hiperlocomoção observada inicialmente. Dentro de teorias que tentam explicar a adicção, a teoria de sensibilização do incentivo de Robinson e Berridge defende que o núcleo acumbente medeia as funções básicas, mais especificamente a hipersensibilidade induzida pela droga, levando a um “querer” patológico que é diferente de “gostar” (ROBINSON e BERRIDGE, 1993). Este fenômeno de sensibilização estaria então no limite entre o uso não patológico e patológico de drogas (BERRIDGE e ROBINSON, 2016). Por outro lado, a administração contínua de drogas resulta em alterações neuroplásticas não relacionadas à sensibilização, demonstrando a necessidade de mais estudos a respeito destes processos que também podem levar à adicção (KALIVAS, 2005).

Apesar das limitações exibidas por todos os modelos disponíveis para o estudo da neurobiologia dos efeitos da cocaína, muito sobre as vias, sistemas e mecanismos envolvidos na etiologia do TUS podem ser esclarecidos experimentalmente. As vias dopaminérgicas estão primariamente alteradas com o uso de cocaína, porém é importante notar que outros sistemas modulam e participam destas alterações. Por exemplo, aferências GABAérgicas e glutamatérgicas estão presentes em vias dopaminérgicas e intimamente relacionadas com o sistema mesocorticolímbico (MORALES e MARGOLIS, 2017). Além disso, evidências apontam para o envolvimento do sistema endocanabinoide na modulação das ações de drogas de abuso, incluindo a cocaína (DE VRIES et al., 2001). Particularmente, este sistema está no foco de interesse do presente trabalho, portanto faz-se necessário sua descrição a partir de informações disponíveis até o momento.

1.2 O Sistema Endocanabinoide

O sistema endocanabinoide é peculiar por sua história e aspectos fisiológicos. Historicamente, a descoberta do sistema endocanabinoide ocorreu a partir de estudos com plantas de maconha, principalmente da espécie *Cannabis sativa*. Esta planta é utilizada de forma "terapêutica" e recreacional pela humanidade há centenas de anos, mas foi a partir do século XX que descobertas importantes possibilitaram o esclarecimento dos constituintes da maconha (KANO, 2014). Em 1964, o pesquisador israelense Rafael Mechoulam conseguiu isolar a principal substância ativa da maconha, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), sendo este, portanto, um fitocanabinoide (GAONI e MECHOULAM, 1964). Restava, porém,

identificar o seu mecanismo de ação. Havia a hipótese de que, devido à natureza hidrofóbica dos canabinoides, estes teriam ações similares a anestésicos, causando alterações na membrana celular de forma não-específica. Contrariando esta possibilidade, receptores canabinoides foram identificados no SNC (DEVANE et al., 1988; MATSUDA et al., 1990). A partir desta descoberta, pôde-se especular a existência de ligantes endógenos para estes receptores. Interessantemente, sabia-se que o tipo de receptores clonados, posteriormente denominados receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁), contribuía para as ações psicoativas da maconha, sem tanta relação com os componentes não-psycoativos da planta. Em 1993 descobriu-se a existência de um segundo tipo de receptores canabinoides (CB₂) em células do sistema imune e tecidos da periferia (MUNRO et al., 1993). A hipótese da existência de ligantes endógenos para receptores canabinoides foi confirmada com o isolamento de anandamida (araquidoniletanolamina) (DEVANE et al., 1992) e de 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (MECHOULAM et al., 1995).

Ao longo das últimas décadas tornou-se evidente a existência do chamado sistema endocanabinoide. Este sistema engloba os receptores canabinoides (principalmente CB₁ e CB₂), seus ligantes endógenos (endocanabinoides), e as enzimas que sintetizam e degradam estes ligantes (Fig. 1) (BATISTA et al., 2014). Os dois principais endocanabinoides, anandamida e 2-AG, são sintetizados sob demanda a partir de lipídeos da membrana plasmática do terminal pós-sináptico e desempenham uma sinalização retrógrada ligando-se aos seus receptores no terminal pré-sináptico (DI MARZO et al., 1998; KATONA e FREUND, 2012). Ao contrário de neurotransmissores clássicos, os endocanabinoides não são armazenados em vesículas. Embora não completamente elucidados, os mecanismos de síntese destes ligantes dependem da enzima fosfolipase-D e da diacilglicerol lipase- α (DAGL) para a anadamina e o 2-AG, respectivamente (CADAS et al., 1996; REISENBERG et al., 2012). Enquanto o influxo de cálcio é necessário para a síntese de anandamida, o 2-AG é sintetizado em resposta a ativação de receptores metabotrópicos que estimulam a via da fosfolipase C (ARAQUE et al., 2017). Após a recaptação, a degradação da anandamida ocorre por ação da hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH) (CRAVATT et al., 1996), enquanto que a monoacilglicerol lipase (MAGL) é responsável por hidrolisar o 2-AG (DINH et al., 2002). Os receptores canabinoides são receptores acoplados à proteína G_{i/o} e, uma vez ativados, induzem a depressão de curta ou longa duração, por modulação de diversos mecanismos, incluindo a inibição do influxo de cálcio pré-sináptico e sinalização via AMPc (CHEVALEYRE e CASTILLO, 2003; OHNO-SHOSAKU et al., 2001). Os receptores CB₁ estão amplamente

distribuídos em todo o cérebro (ARAQUE et al., 2017). Por outro lado, a presença de receptores CB₂ no SNC não está tão bem caracterizada, uma vez que os primeiros estudos abordando esta questão tenham falhado em detectar CB₂ em cérebros de indivíduos saudáveis (IBRAHIM et al., 2003; ONAIVI et al., 2006).

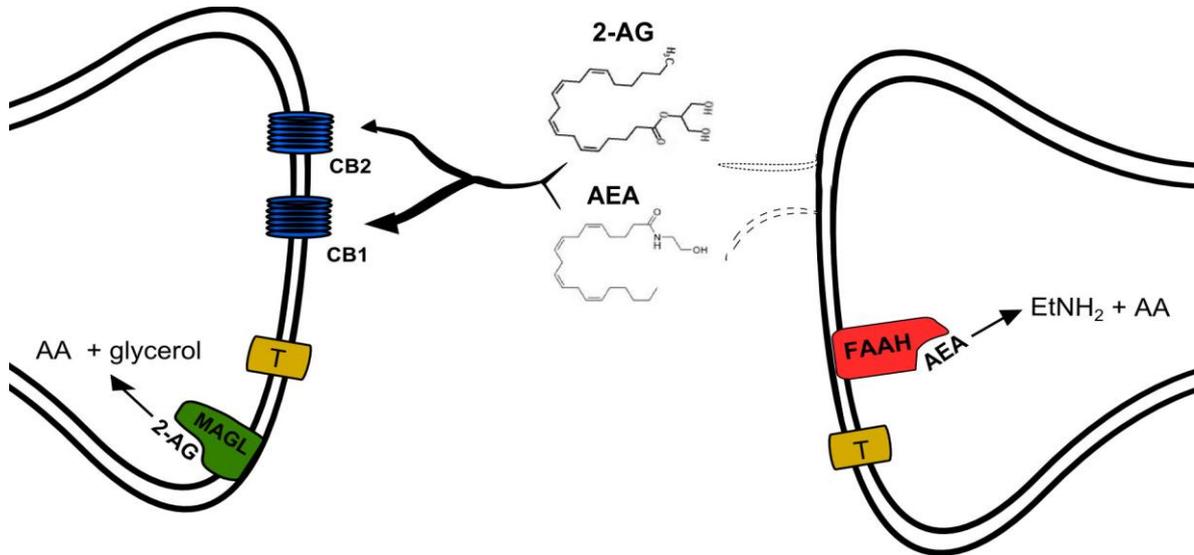


Figura 1. Esquema representativo dos componentes envolvidos na transmissão retrógrada do Sistema Endocanabinoide. 2-AG = 2-araquidonoil glicerol, AEA = Anandamida, CB1 = Receptor canabinoide do tipo 1, CB2 = Receptor canabinoide do tipo 2, FAAH = Hidrolase de admissão de ácidos graxos, MAGL = Monoacilglicerol lipase, T = Transportadores. (Modificado de Batista et al., 2014).

Ao longo dos últimos anos, inúmeras descobertas evidenciaram o fato de o sistema endocanabinoide ser mais complexo e diverso do que se imaginava inicialmente (CASTILLO et al., 2012). A sinalização retrógrada é a principal forma pela qual os endocanabinoides medeiam alterações plásticas de curta e longa duração em sinapses excitatórias e inibitórias. Porém evidências demonstram que endocanabinoides podem ativar receptores em neurônios localizados pós-sinápticamente, de uma forma não retrógrada (BACCI et al., 2004; CASTILLO et al., 2012). A sinalização por endocanabinoides regula circuitos neurais importantes como os relacionados com a modulação de ansiedade (KATHURIA et al., 2003), analgesia (HOHMANN et al., 2005) e situações de recompensa por estímulos naturais e drogas de abuso (MECHOULAM e PARKER, 2013; PARSONS e HURD, 2015). Coletivamente, estes estudos sugerem que o sistema endocanabinoide pode representar um novo alvo terapêutico para diversas doenças neurológicas e psiquiátricas,

incluindo o TUS. Para tal, faz-se necessário o esclarecimento dos mecanismos específicos de modulação por endocanabinoides no SNC.

1.3 Envolvimento do Sistema Endocanabinoide nos Efeitos da Cocaína

Como descrito anteriormente, é na via dopaminérgica mesocorticolímbica que o sistema de recompensa cerebral ocorre (COOPER et al., 2017). Apesar de ser uma via dopaminérgica, outros neurotransmissores (sintetizados em diferentes tipos neuronais) de outras vias estão intimamente envolvidos, modulando a liberação de dopamina. O glutamato, como exemplo de neurotransmissor excitatório, e o GABA, inibitório, são mais bem caracterizados neste sentido. Entretanto, sabe-se que o sistema endocanabinoide também modula esta via. Embora a localização destes receptores não esteja completamente elucidada, demonstrou-se a presença de receptores CB₁ em neurônios tanto GABAérgicos, quanto glutamatérgicos (MARTIN-GARCIA et al., 2016). Os receptores CB₂, por sua vez, aparecem expressos em neurônios dopaminérgicos da ATV de camundongos (ZHANG et al., 2014) e ratos (ZHANG et al., 2017). Deste modo, sugere-se que seria possível reverter e/ou inibir efeitos de drogas que estimulam o sistema de recompensa ao utilizar o sistema endocanabinoide como alvo.

Embora ainda não exista nenhum fármaco que interage com o sistema endocanabinoide aprovado para o tratamento do TUS, estudos clínicos estão em andamento (SLOAN et al., 2017). Neste sentido, evidências sugerem que agonistas não específicos de receptores CB₁ como dronabinol (VANDREY et al., 2013) e nabiximols (TRIGO et al., 2016) são efetivos no tratamento da recaída ao uso de maconha. Além disso, o uso do rimonabanto, um agonista inverso de receptores CB₁, parece promissor para o tratamento da adicção ao tabaco em humanos (CAHILL e USSHER, 2011), muito embora os efeitos adversos de ordem psiquiátrica desencorajem o seu uso (MOREIRA e CRIPPA, 2009; SLOAN et al., 2017).

Os modelos citados anteriormente de autoadministração, PCL e sensibilização aparecem como abordagens importantes para elucidar as possíveis interações entre cocaína e sistema endocanabinoide (AHMED, 2012). Não obstante, a utilização de outros testes com cocaína contribui para a compreensão das vias cerebrais alteradas aguda ou cronicamente após o uso deste psicoestimulante. A maioria dos estudos publicados até o momento sobre o envolvimento do sistema endocanabinoide nos efeitos da cocaína focam no papel dos receptores CB₁, por serem mais bem caracterizados no SNC e também pela falta de

marcadores específicos e confiáveis para receptores CB₂. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o antagonismo de receptores CB₁, com rimonabanto, previne efeitos de hiperlocomoção e ativação neuronal no núcleo acumbente de camundongos que receberam cocaína (GOBIRA, 2016). Quando os animais foram pré-tratados com um antagonista de receptores CB₂, reverteu-se o efeito do rimonabanto, indicando que o efeito deste era mediado por ativação de receptores CB₂ (GOBIRA, 2016).

O agonismo farmacológico de receptores CB₁, com HU210, em ratos que passaram por autoadministração de cocaína, promove o relapso à procura da droga após longos períodos de abstinência (DE VRIES et al., 2001). Neste mesmo estudo demonstrou-se que antagonizar o receptor CB₁ resulta na atenuação do relapso induzido por re-exposição às pistas associadas ao consumo de cocaína, ou mesmo à própria cocaína, sem efeito quando o relapso era induzido por estresse (DE VRIES et al., 2001). Camundongos nocautes para o receptor CB₁ não demonstram uma resposta operante confiável de autoadministração de cocaína quando comparados com animais selvagens (SORIA et al., 2005). Por outro lado, os animais que não expressam receptores CB₁ desenvolvem PCL induzida por cocaína, indicando que estes receptores não são essenciais para determinados efeitos desta droga (MARTIN et al., 2000). Curiosamente, a administração de JWH133, um agonista de receptores CB₂, significativamente e de forma dose-dependente, inibe a autoadministração de cocaína em camundongos, mas não em ratos (ZHANG et al., 2015). Os resultados controversos podem ser explicados por diferenças na expressão de receptores CB₂ entre espécies (ZHANG et al., 2015).

A sensibilização locomotora induzida por cocaína também pode ser modulada por intervenções farmacológicas em receptores canabinoides. Observa-se a diminuição da sensibilização induzida por esta droga em camundongos CB₁^{-/-} ou camundongos selvagens tratados com AM251, um antagonista/agonista inverso de receptores CB₁ (CORBILLE et al., 2007). Corroborando dados prévios, a administração de rimonabanto é capaz de atenuar esta resposta de sensibilização locomotora (MARINHO et al., 2015; MEREU et al., 2015). Além disso, o tratamento com rimonabanto reverte o aumento da proteína c-Fos (codificada pelo gene de ativação imediata) induzido por sensibilização crônica à cocaína (MARINHO et al., 2017). Interessantemente, animais transgênicos que superexpressam receptores CB₂ apresentam uma menor resposta locomotora após a administração aguda de cocaína, bem como diminuição na sensibilização locomotora, além de desenvolverem aversão condicionada ao lugar induzida e se autoadministrarem menos droga (ARACIL-FERNANDEZ et al., 2012).

No âmbito molecular, a sensibilização locomotora induzida por cocaína é associada com o aumento na expressão do gene e proteína de receptores CB₁, ao passo que a expressão das enzimas que sintetizam endocanabinoides é atenuada no hipocampo de camundongos (BLANCO et al., 2016).

O uso de rimonabanto, que antes de se descobrir seu papel como agonista inverso era descrito como antagonista de receptores CB₁, indicou que estes receptores desempenham um papel importante na memória de recompensa avaliada na PCL induzida por cocaína. Quando administrado sistematicamente em camundongos durante o condicionamento, o rimonabanto previne a aquisição da PCL nas doses de 1 e 3 mg/kg (YU et al., 2011). Além disso, administrações intracerebrais de rimonabanto na região do córtex pré-frontal medial (CPFm), durante o condicionamento, reduz a preferência de camundongos ao contexto pareado com cocaína (HU et al., 2015). Outra intervenção eficaz em bloquear a PCL induzida por cocaína é a partir do agonismo de receptores CB₂ com a droga sintética O-1966, enquanto animais nocautes para o receptor CB₂ condicionam normalmente à cocaína (IGNATOWSKA-JANKOWSKA et al., 2013).

De maneira geral, apesar de algumas contradições, independente do modelo/teste utilizado para avaliar o envolvimento do sistema endocanabinoide nos efeitos da cocaína, há uma forte indicação de que os receptores canabinoides CB₁ e CB₂ modulam de forma oposta o sistema de recompensa cerebral. Ainda há muitas perguntas em aberto e a necessidade de corroborar dados utilizando diferentes espécies e ferramentas farmacológicas, genéticas, entre outras. O presente trabalho surgiu desta necessidade e visa contribuir para a construção do conhecimento sobre o envolvimento do sistema endocanabinoide nos efeitos comportamentais e neurobiológicos da cocaína.

2 Justificativa

A dopamina é um neurotransmissor envolvido em processos de cognição, memória, emoção e comportamentos de recompensa. Alterações na neurotransmissão dopaminérgica podem causar inúmeros transtornos psiquiátricos, como o transtorno por uso de cocaína, uma droga psicoestimulante da qual mais de 18 milhões de pessoas fazem uso. O transtorno por uso de cocaína é caracterizada pelo uso continuado desta droga apesar das diversas consequências deletérias, sendo uma relevante questão de saúde pública para a qual ainda não há tratamento farmacológico adequado.

Um dos moduladores da neurotransmissão dopaminérgica é o sistema endocanabinoide. Receptores canabinoides CB₁ estão amplamente expressos por todo o sistema nervoso central (SNC), predominantemente em neurônios GABAérgicos. Além deles, os receptores canabinoides CB₂ são expressos nos próprios neurônios dopaminérgicos. Portanto, é de enorme relevância a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na atuação de endocanabinoides na circuitaria dopaminérgica de recompensa cerebral. A compreensão de tais mecanismos pode dar suporte para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas para o transtorno do uso de substâncias.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Testar a hipótese de que o antagonismo de receptores CB₁ e o agonismo de receptores CB₂ inibem sensibilização motora, PCL e ativação neuronal hipocampal induzidas pela administração de cocaína em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

→ Avaliar os efeitos do AM251 (antagonista / agonista inverso de receptores CB₁) e do JWH133 (agonista de receptores CB₂) sobre a sensibilização comportamental induzida por cocaína, quando administrados previamente às fases de aquisição ou expressão;

→ Testar os efeitos do AM251 e do JWH133 sobre a PCL induzida por cocaína tanto na fase de aquisição quanto na fase de expressão;

→ Verificar se os possíveis efeitos do JWH133 são realmente mediados por receptores CB₂, fazendo uso de um antagonista destes receptores, o AM630, em ambos os testes citados anteriormente;

→ Quantificar a ativação de neurônios no hipocampo após o tratamento com AM251 e JWH133 em animais que passaram pela PCL induzida por cocaína.

4 Material e Métodos

4.1 Animais

Camundongos da linhagem *Swiss*, machos, pesando cerca de 25 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram utilizados em todos os protocolos experimentais deste trabalho. Gaiolas plásticas foram utilizadas para alojar estes animais em uma sala com temperatura ambiente controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas (início às 7 horas) e livre acesso à água e comida. O protocolo realizado foi previamente submetido à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sendo aprovado sob o número 55/2016.

4.2 Drogas

Os comportamentos de sensibilização e PCL foram induzidos com 20 mg/kg de cocaína (© Merck & Co., Inc.) diluída em solução salina (NaCl 0,9%). Além disso, drogas que atuam nos receptores canabinoides foram administradas antes das fases de aquisição ou expressão tanto da sensibilização quanto da PCL induzidas por cocaína. Administrou-se o AM251, um antagonista/agonista inverso de receptores CB_1 , nas doses de 0,3, 1 e 3 mg/kg nas fases de sensibilização e nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg nas fases de PCL. Um agonista de receptor CB_2 , o JWH133, também foi utilizado nas mesmas doses descritas para o AM251 antes das fases de aquisição ou expressão de sensibilização ou PCL. Já o AM630, um antagonista de receptores CB_2 , foi utilizado nas doses de 5 mg/kg (sensibilização) ou 10 mg/kg (PCL) para confirmar o envolvimento de receptores CB_2 nos efeitos do JWH133. A solução veículo utilizada para diluir as drogas que modulam o sistema endocanabinoide é preparada com 5% de Cremophor®, 5% de etanol absoluto e 90% de salina. Todas as administrações foram realizadas via intraperitoneal.

4.3 Modelos comportamentais

4.3.1 Sensibilização

A sensibilização induzida por cocaína em roedores é observada quando uma mesma dose de cocaína é administrada repetidas vezes e, como consequência, há um aumento

progressivo na atividade locomotora destes animais (Fig. 2). Este comportamento foi avaliado utilizando-se de uma arena cilíndrica de acrílico transparente (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), aberta na extremidade superior e base inferior encaixada em um plano geométrico quadrado. O protocolo experimental foi adaptado de Marinho e colaboradores (MARINHO et al., 2015). Em dois dias consecutivos os animais passaram por uma ambientação inicial à arena com duração de 10 minutos. Após a ambientação, alguns grupos específicos receberam doses idênticas de cocaína em ambos os dias e, imediatamente após a injeção desta droga, foram alocados novamente na arena e filmados durante outros 10 minutos (teste), totalizando 20 minutos na arena. A filmagem foi realizada com uma câmera de vídeo (Microsoft LifeCam®) localizada 2,0 metros acima da arena. Durante o teste, com o emprego do software ANY-maze (versão 4.5), a distância total percorrida por cada animal foi registrada. Os dados estão apresentados como distância percorrida em metros durante o teste tanto no primeiro (aquisição) quanto no segundo (expressão) dia de protocolo experimental.



Figura 2. A sensibilização induzida por cocaína pode ser observada com a administração da mesma dose desta droga em dois dias consecutivos. Adaptado de: (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006).

4.3.2 Preferência Condicionada ao Lugar

A PCL induzida por cocaína foi avaliada em uma caixa de acrílico contendo dois lados de dimensões iguais (15 cm de comprimento, 12 cm de largura e 12 cm de altura), conectados por um corredor central (9,5 x 5 x 12 cm) e separados entre si por portas removíveis. As paredes e os assoalhos diferem entre os lados em cor e textura. A intensidade da luz é similar por toda a caixa. Os animais foram filmados com uma câmera (Microsoft LifeCam®) e o tempo gasto individualmente dentro de cada lado foi analisado com o software ANY-maze (versão 4.5).

Os animais passaram por três fases distintas: pré-teste, condicionamento e teste (Fig. 3). O protocolo de PCL utilizado é contrabalanceado (cada animal recebe cocaína de um

lado da caixa), randomizado (os animais são alocados aleatoriamente em um grupo experimental) e não enviesado (nenhum grupo experimental tem preferência por um lado da caixa) (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014; CUNNINGHAM et al., 2006). No pré-teste cada animal foi colocado no corredor central da caixa, com as portas que levam aos dois lados abertas, sendo então permitida a livre exploração por toda a caixa durante 15 minutos. Os camundongos que gastaram mais que 70% do tempo explorando um dos lados foram excluídos das próximas fases. Nos seis dias seguintes (2 – 7), na chamada fase de condicionamento, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os diferentes grupos. Eles então receberam injeções, em dias alternados, de cocaína (20 mg/kg) ou veículo imediatamente antes do confinamento de 30 minutos ao lado da caixa correspondente. O grupo controle recebeu apenas veículo em todos os dias de condicionamento. As demais drogas utilizadas durante a “aquisição” foram administradas 30 minutos antes e, caso houvesse mais de uma, 40 minutos antes das injeções de cocaína. Por fim, o teste foi realizado no dia 8, da mesma forma que o procedimento de pré-teste fora realizado. Quando o objetivo era avaliar o efeito das drogas que atuam sob o sistema endocanabinoide na expressão do condicionamento, estas foram administradas somente no dia do teste, 30 minutos antes de iniciar esta fase e 40 minutos antes (se fosse o caso de duas administrações no mesmo dia). O resultado final está apresentado como “taxa de preferência (s)” e foi calculado subtraindo-se do tempo que cada animal dispendeu no lado pareado com a droga no dia do teste, o tempo dispendido neste mesmo lado no dia do pré-teste.

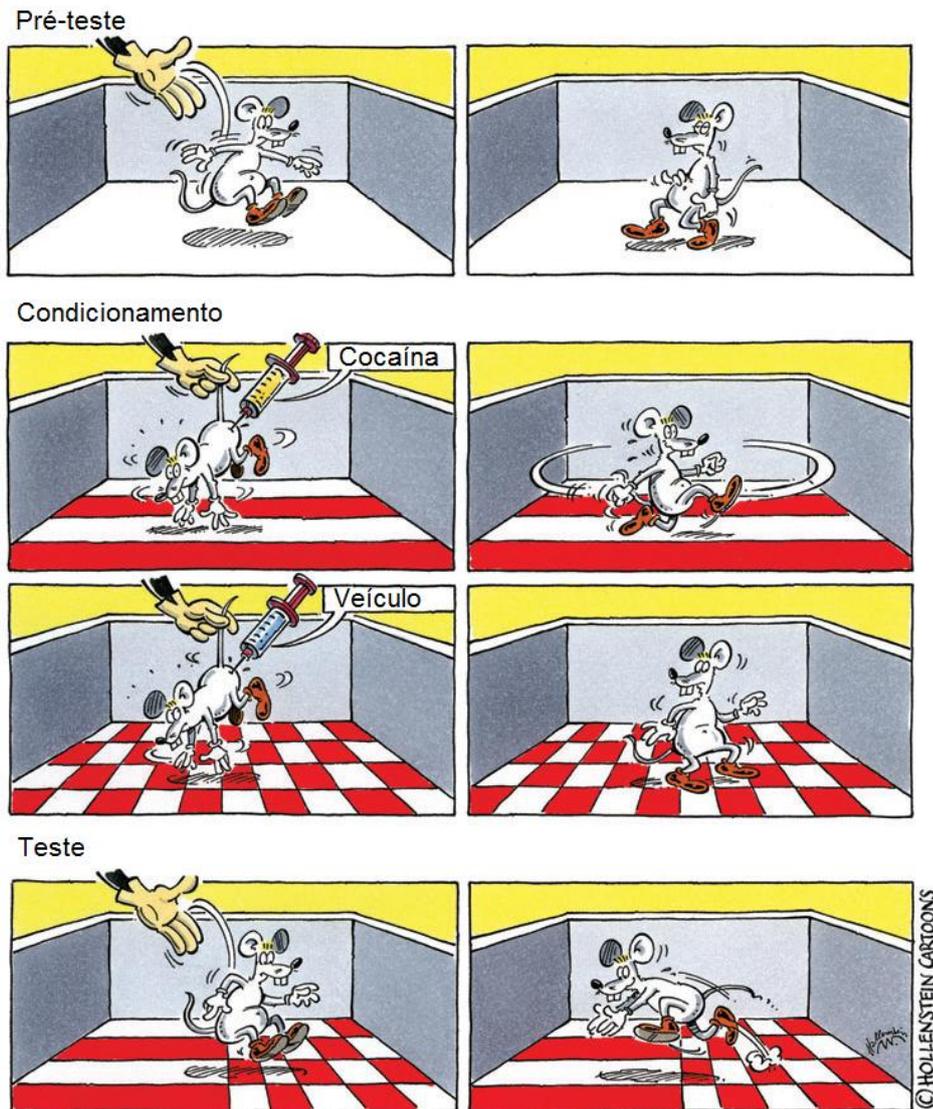


Figura 3. Ilustração das três fases da PCL induzida por cocaína: pré-teste, condicionamento e teste. Adaptado de: (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006).

4.4. Determinação da expressão de proteína c-Fos no hipocampo

Duas horas após o fim do teste de PCL, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e perfundidos transcordialmente com salina (NaCl 0,9%) e paraformaldeído 4% (PFA 4%) diluído em tampão fosfato 0,1M (PB, pH 7,4). Em seguida, os cérebros dissecados foram fixados em PFA 4% durante 2 horas, crioprotetidos em sacarose 30% por 48 horas, congelados em isopentano e armazenados à 80°C. Os cortes coronais de 25 µm foram realizados em triplicatas com o criostato (Leica CM1850) e imediatamente reservados em tampão fosfato de sódio 0,01M (PBS, pH 7,4). Os cortes que

ficaram reservados por um período maior de tempo foram transferidos para uma solução anticongelante contendo 150ml de etilenoglicol, 150 ml de glicerol e 200ml de PB 0,1M.

Para quantificar as células que expressam proteína c-Fos no hipocampo dos camundongos expostos à PCL, seguiu-se o protocolo descrito anteriormente por Batista e colaboradores (BATISTA et al., 2016), com algumas alterações. As fatias de cérebros foram incubadas em 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diluído em PBS 0,01M, utilizado para bloquear a atividade da peroxidase endógena, durante trinta minutos. Antes de incubar os cortes com o anticorpo primário, os epítomos nas amostras de tecido foram bloqueados durante uma hora com 1% de soro bovino (BSA) em PBS 0,01M contendo 0,4% Triton X-100 para prevenir ligações não específicas. O anticorpo primário anti-c-Fos (sc-52, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) foi diluído em 1:500 na mesma solução utilizada para bloqueio de epítomos. Após 44 horas de incubação com o anticorpo primário, os cortes de tecido foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado (goat anti-rabbit IgG 1:1000 em PBS contendo 1% BSA, 0,4% Triton X-100). Os cortes foram então processados pelo método da avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC kit, Vector Lab). A imunorreatividade à c-Fos foi revelada com o uso de 3,3' diaminobenzidina tetrahydrocloroeto (DAB). A contagem de células positivas para c-Fos foi realizada em cortes entre 1,82 e 2,06 mm após o bregma (PAXINOS e FRANKLIN, 2001) (Fig. 4). As fotos foram realizadas em um microscópio de luz (Zeiss, Oberkochen, Germany) utilizando a objetiva de 10x (quatro fotos por hipocampo). A contagem das células positivas para c-Fos foi realizada manualmente com o software ImageJ 1.51j8. Os resultados estão representados como número de células positivas por fatia de hipocampo.

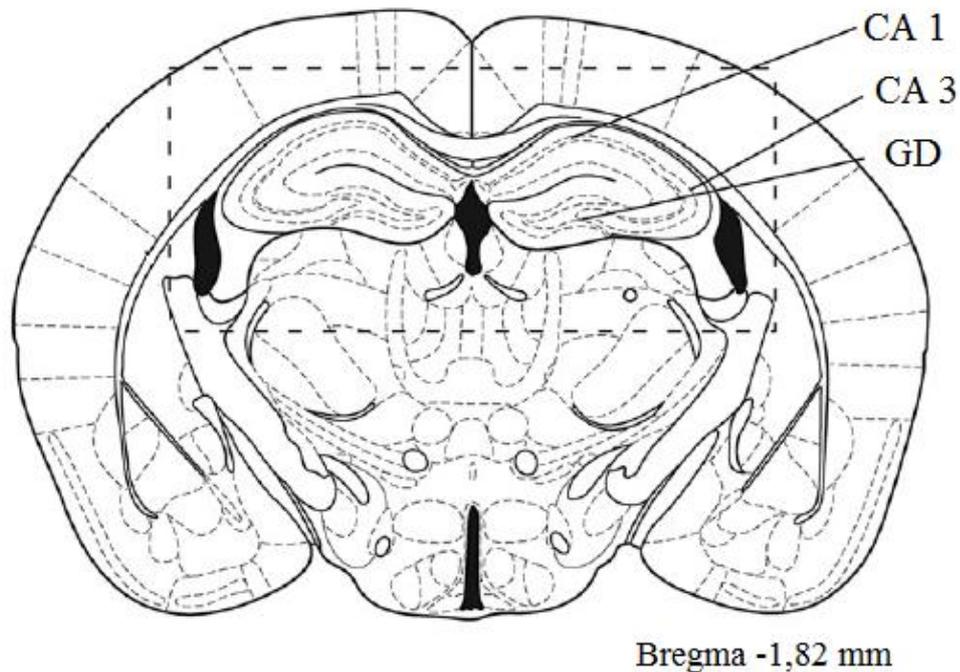


Figura 4. Diagrama do plano representativo da região de análise das células positivas para c-Fos no hipocampo. A análise foi realizada em todas as sub-regiões neste plano do hipocampo, bilateralmente. CA 1 = Cornu Ammonis 1, CA 3 = Cornu Ammonis 3 e GD = Giro Denteado. Modificado de PAXINOS e FRANKLIN 2001.

4.5 Delineamento Experimental

4.5.1 Efeitos de agonistas e antagonistas canabinoides na locomoção basal

Para o controle de efeito sobre a locomoção basal, diferentes grupos receberam doses crescentes de AM251 (0,1, 0,3, 1, 3 ou 10 mg/kg), JWH133 (0,3, 1 ou 3 mg/kg), AM630 (5 mg/kg) ou veículo e tiveram sua atividade locomotora avaliada na arena. O AM251 foi administrado 20min antes da habituação na arena por 10min e a distância percorrida foi analisada imediatamente após a habituação, também durante 10min (teste). Este controle é essencial para demonstrar que os possíveis efeitos do AM251, do JWH133 e do AM630 na sensibilização induzida por cocaína não estão relacionados com uma diminuição da atividade locomotora basal dos animais. Os resultados estão expressos como distância total percorrida em metros durante os 10min de teste.

4.5.2 Envolvimento de receptores canabinoides na sensibilização induzida por cocaína

Os efeitos do antagonista CB₁, AM251, e do agonista CB₂, JWH133, foram avaliados em um modelo de sensibilização locomotora com a administração de cocaína. Para

tal, AM251 (0,3, 1 e 3 mg/kg) ou JWH133 (0,3, 1 e 3 mg/kg) foram injetados trinta minutos antes da administração de cocaína no primeiro (aquisição) ou no segundo (expressão) dia de protocolo em grupos independentes de animais (Fig. 5). Por fim, cinco grupos de animais foram utilizados em cada fase, uma para cada dose de AM251 ou JWH133 e os controles: i) veículo-cocaína (dia1-dia2), ii) cocaína-cocaína (dia1-dia2).

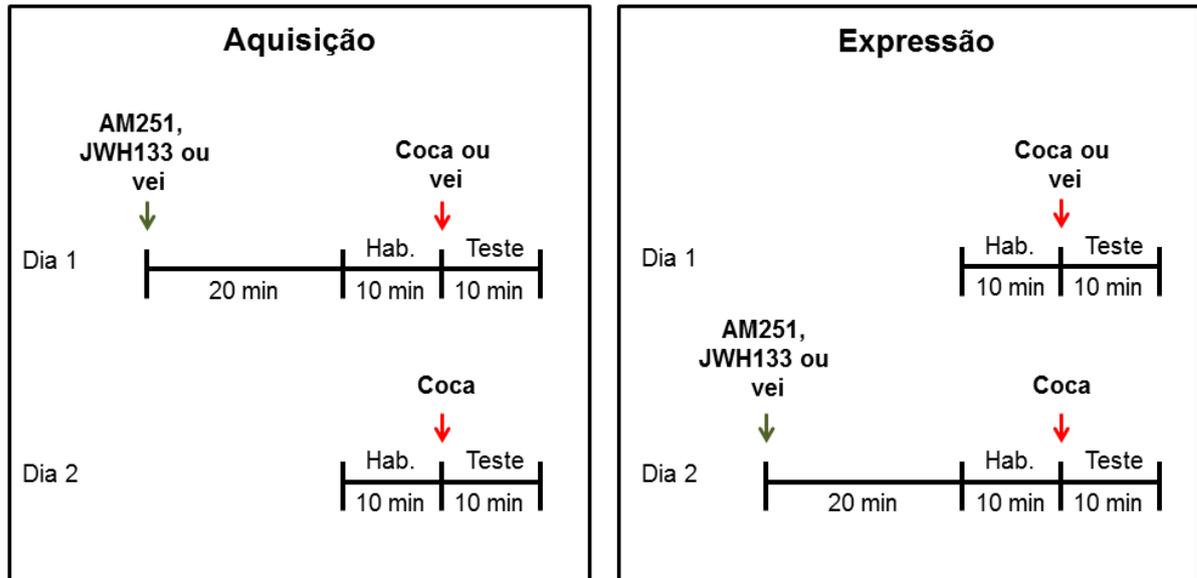


Figura 5. Esquema representativo do delineamento experimental utilizando AM251 ou JWH133 nas fases de aquisição ou expressão da sensibilização induzida por cocaína. Veí = veículo, Coca = cocaína, Hab. = habituação.

4.5.3 Envolvimento de receptores CB₂ nos efeitos do JWH133 sobre a sensibilização induzida por cocaína

Para verificar o envolvimento dos receptores CB₂ nos efeitos do JWH133 na sensibilização induzida por cocaína, administrou-se um antagonista destes receptores, o AM630 (5 mg/kg), antes das injeções de JWH133 (1 mg/kg). Repetiu-se o delineamento experimental anterior agora com o acréscimo de uma injeção 10 min antes do JWH133 (Fig. 6).

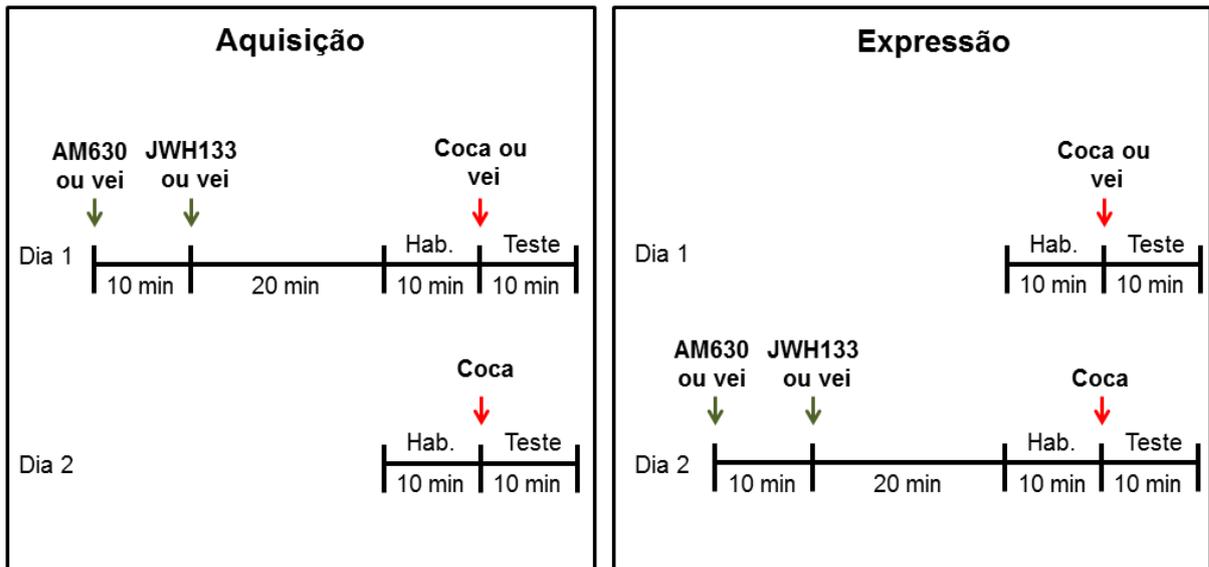


Figura 6. Esquema representativo do delineamento experimental utilizando AM630 para reverter o efeito do JWH133 nas fases de aquisição ou expressão da sensibilização induzida por cocaína. Vei = veículo, Coca = cocaína, Hab. = habituação.

4.5.4 Efeitos de agonistas e antagonistas canabinoides na preferência ou aversão condicionadas ao lugar

Previamente à realização do PCL induzida por cocaína testou-se a possibilidade das drogas AM251, JWH133 e AM630 induzirem preferência ou aversão quando pareadas com um contexto (um dos lados da caixa utilizada no paradigma de PCL). Para este fim, os animais foram separados em três grupos independentes que receberam uma das três drogas na dose de 10 mg/kg. Seguiu-se o mesmo protocolo descrito no item 4.3.2, substituindo-se a cocaína pelas drogas supracitadas.

4.5.5 Efeito do AM251 e do JWH133 na PCL induzida por cocaína e alterações na expressão de c-Fos no hipocampo

Testou-se a hipótese de que a PCL induzida por cocaína poderia ser revertida pelo antagonismo de receptores CB₁ ou pelo agonismo de receptores CB₂ com as drogas AM251 e JWH133, respectivamente. Estas drogas foram administradas nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg nas fases de aquisição (três dias alternados durante os seis dias de condicionamento) ou expressão (no último dia, teste) previamente à exposição dos animais ao lado pareado com a cocaína (aquisição) ou ao centro da caixa (livre escolha durante a expressão) (Fig. 7). Cada conjunto de dados (AM251 ou JWH133 durante aquisição ou expressão) foi obtido a partir de

cinco grupos distintos, sendo estes: um para cada dose de AM251 ou JWH133, controle que apenas recebeu veículo e controle que recebeu cocaína nos dias de pareamento com o contexto.

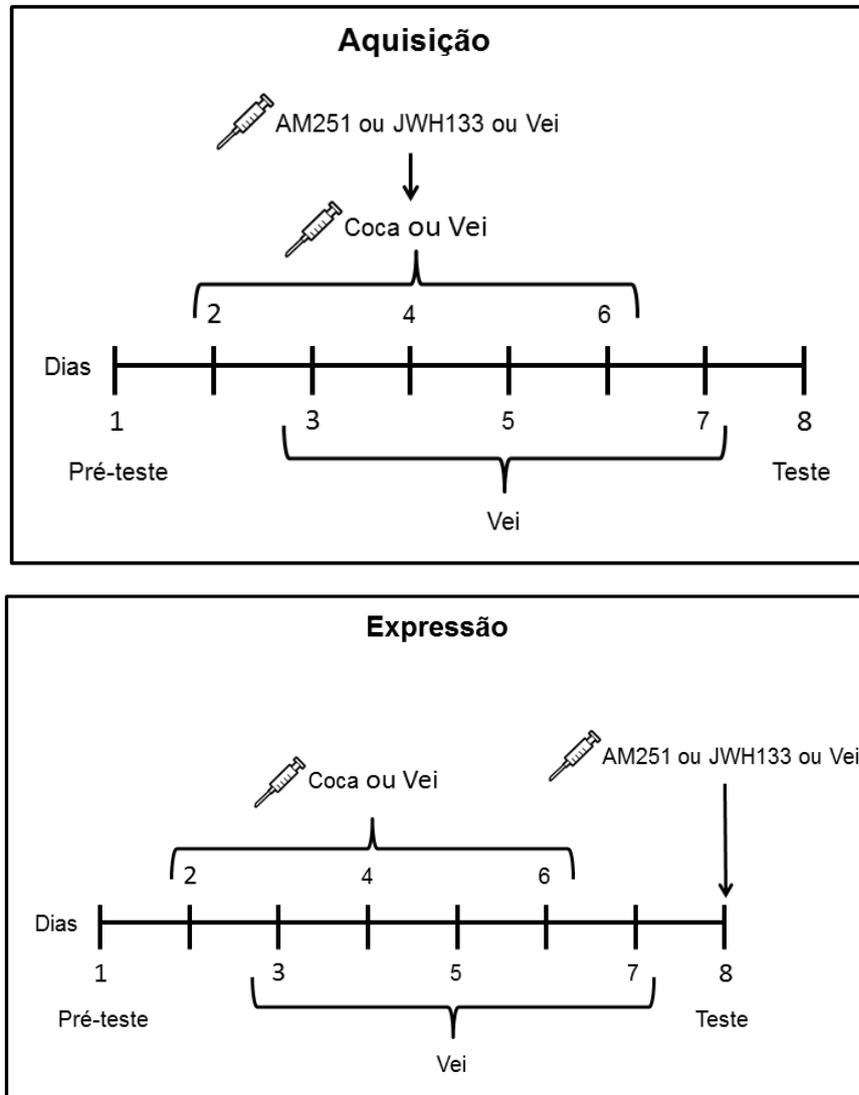


Figura 7. Esquema representativo do delineamento experimental utilizando AM251 ou JWH133 nas fases de aquisição ou expressão da PCL induzida por cocaína. Vei = veículo, Coca = cocaína.

Após a realização deste paradigma comportamental, os cérebros dos animais que passaram por perfusão foram então utilizados para a realização de imunohistoquímica para a detecção de proteína c-Fos no hipocampo destes animais, como descrito anteriormente. Ao final de tudo, somente os grupos tratados com AM251 ou JWH133 que diferiram significativamente do grupo controle de cocaína passaram por análise histológica.

4.5.6 Envolvimento de receptores CB₂ nos efeitos do JWH133 sobre a PCL induzida por cocaína

Com o intuito de comprovar que o efeito do JWH133 sobre a PCL induzida por cocaína é realmente mediado por receptores CB₂, administrou-se um antagonista destes receptores, o AM630 (10 mg/kg), antes das injeções de JWH133 (10 mg/kg). Repetiu-se o delineamento experimental anterior agora com o acréscimo de uma injeção antes do JWH133 (Fig. 8). Os grupos obtidos receberam: i) veículo durante todo o condicionamento; ii) cocaína nos dias especificados; iii) JWH133 antes das injeções de cocaína (aquisição) ou antes do teste (expressão); iv) AM630 antes das injeções de JWH133 (aquisição ou expressão) e v) AM630 antes das injeções de cocaína (aquisição) ou antes do teste (expressão).

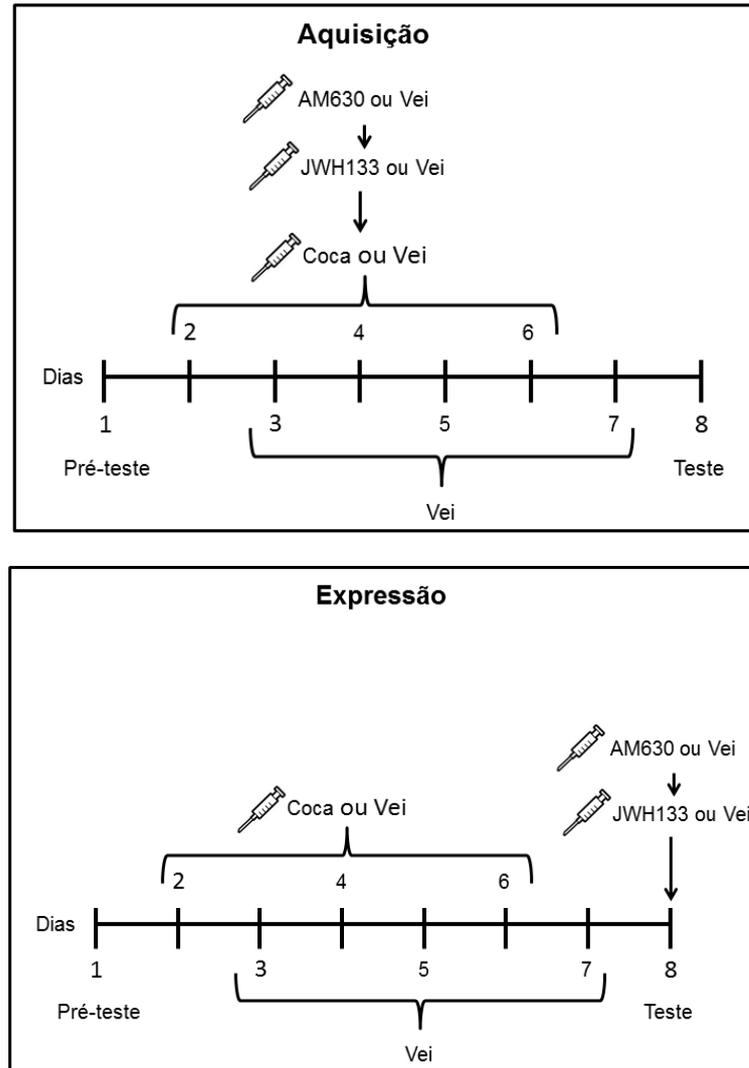


Figura 8. Esquema representativo do delineamento experimental utilizando AM630 e JWH133 nas fases de aquisição ou expressão da PCL induzida por cocaína. Veí = veículo, Coca = cocaína.

4.6 Análise estatística

Os dados comportamentais foram submetidos ao teste t de uma amostra ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido de teste post-hoc de Bonferroni ou Newman-Keuls, conforme apropriado. Para os dados obtidos por imunohistoquímica, utilizou-se ANOVA de uma via seguido de teste post-hoc de Newman-Keuls. O nível mínimo de significância considerado é de $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como a média \pm E.P.M. (erro padrão da média). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism.

5 Resultados

5.1 Efeitos de agonistas e antagonistas canabinoides sobre a locomoção basal

As administrações de antagonista CB₂ AM630 (5 mg/kg), agonista CB₂ JWH133 (0,3, 1 e 3 mg/kg) e antagonista CB₁ AM251 (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 mg/kg) não modificaram a locomoção basal de camundongos ($F_{9,49} = 0,7124$, $p = 0,6948$) (Tabela 1).

Tabela 1. O AM630 (5 mg/kg), o JWH133 (0,3, 1 e 3 mg/kg) e o AM251 (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 mg/kg) não alteram a locomoção basal de camundongos expostos à arena após 10 minutos de habituação. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 6$ animais/grupo). Não há diferença estatística entre os grupos (ANOVA de uma via e teste *post-hoc* de Newman Keuls).

Tratamento	Dose	Distância Percorrida (m)
Veículo	-	8,25 \pm 1,14
AM630	5 mg/kg	8,49 \pm 1,47
JWH133	0,3 mg/kg	9,85 \pm 1,17
	1 mg/kg	8,40 \pm 0,84
	3 mg/kg	10,29 \pm 0,68
	0,1 mg/kg	9,24 \pm 1,96
AM251	0,3 mg/kg	8,90 \pm 2,18
	1 mg/kg	8,24 \pm 0,37
	3 mg/kg	6,44 \pm 0,99
	10 mg/kg	7,07 \pm 1,48

5.2 Efeitos de antagonismo de receptores CB₁ e de agonismo de receptores CB₂ sobre a sensibilização motora induzida por cocaína

Com a administração do antagonista de receptores CB₁ (AM251) previamente à fase de aquisição da sensibilização induzida por cocaína observa-se que o AM251, na menor dose utilizada (0,3 mg/kg), previniu a hiperlocomoção por cocaína no primeiro dia (Fig. 9A). Os animais que receberam AM251 no primeiro dia não sofreram a sensibilização por cocaína observada no segundo dia (droga: $F_{4,70} = 9,444$, $p < 0,0001$; tempo: $F_{1,70} = 24,03$, $p < 0,0001$; interação: $F_{4,70} = 1,350$, $p = 0,2623$) (Fig. 9A). Quando administrado no segundo dia de

protocolo, isto é, previamente à expressão da sensibilização, o AM251 nas doses de 1 e 3 mg/kg diminuiu este efeito da cocaína (droga: $F_{4,66} = 12,19$, $p < 0,0001$; tempo: $F_{1,66} = 45,93$, $p < 0,0001$; interação: $F_{4,66} = 3,024$, $p = 0,0237$) (Fig. 9B).

Além disso, o agonismo de receptores CB_2 com JWH133 impediu o efeito de sensibilização, sem alterar agudamente a hiperlocomoção induzida por cocaína (droga: $F_{4,54} = 6,609$, $p = 0,0002$; tempo: $F_{1,54} = 9,965$, $p = 0,0026$; interação: $F_{4,54} = 2,124$, $p = 0,0904$) quando administrado previamente à aquisição da sensibilização (Fig. 10A). Similarmente ao que ocorreu com a administração de AM251, JWH133 nas doses de 1 e 3 mg/kg atenuou a sensibilização induzida por cocaína (droga: $F_{4,49} = 4,385$, $p = 0,0041$; tempo: $F_{1,49} = 5,583$, $p = 0,0221$; interação: $F_{4,49} = 1,290$, $p = 0,2869$) quando administrado previamente à análise da expressão da sensibilização (Fig. 10B). O antagonismo de receptores CB_2 com AM630 (5 mg/kg) reverteu o efeito do JWH133 tanto na aquisição (droga: $F_{4,50} = 12,21$, $p < 0,0001$; tempo: $F_{1,50} = 50,05$, $p < 0,0001$; interação: $F_{4,50} = 4,034$, $p = 0,0065$) (Fig. 11A) quanto na expressão (droga: $F_{4,50} = 7,136$, $p = 0,0001$; tempo: $F_{1,50} = 21,11$, $p < 0,0001$; interação: $F_{4,50} = 2,185$, $p = 0,0841$) (Fig. 11B) da sensibilização. Como o esperado, a administração de AM630 não alterou por si só o efeito da cocaína na sensibilização em ambas as fases (Fig. 11).

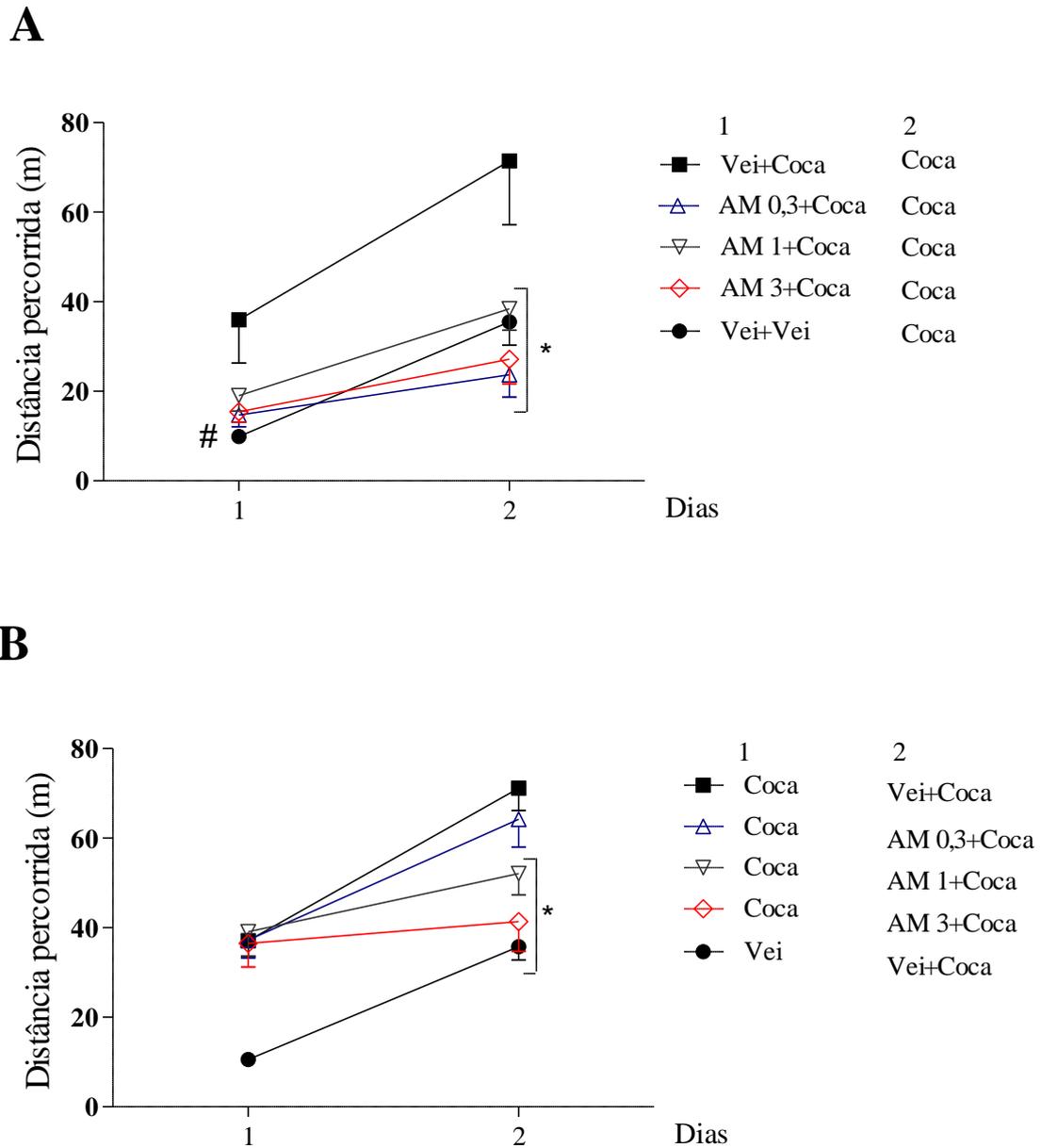


Figura 9. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁) com AM251 previniu a sensibilização induzida por cocaína quando administrado previamente a fase de aquisição (A) ou expressão (B), 30 minutos antes da administração de 20 mg/kg de cocaína no dia 1 (A) ou no dia 2 (B). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA de duas vias e por teste *post-hoc* de Bonferroni (n = 7-8 animais/grupo). # p < 0,05 entre os grupos vei+vei (dia1) ou AM 0,3+coca (dia1) comparado com vei+coca (dia 1) *p < 0,05 comparado com o grupo vei+coca/coca (dia1/dia2) no dia 2. Vei = veículo, Coca = cocaína, AM = AM251

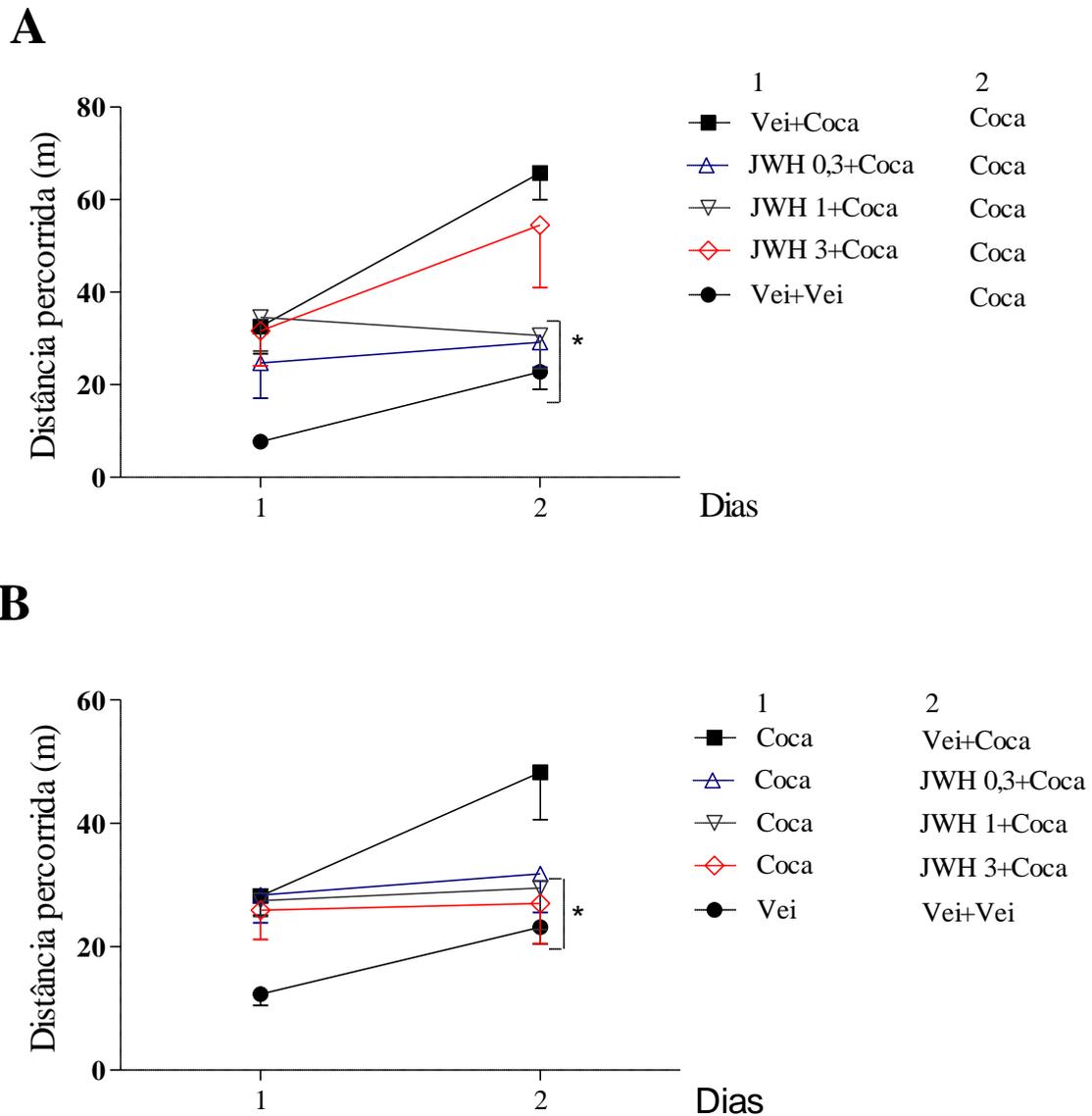


Figura 10. O agonismo de receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂) com JWH133 previniu a sensibilização induzida por cocaína quando administrado previamente a fase de aquisição (A) nas doses de 0,3 e 1 mg/kg ou expressão (B) nas doses de 1 e 3 mg/kg, 30 minutos antes da administração de 20 mg/kg de cocaína no dia 1 (A) ou no dia 2 (B). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA de duas vias e por teste *post-hoc* de Bonferroni (n = 6 animais/grupo). *p < 0,05 comparado com o grupo vei+coca/coca (dia 1/2) no dia 2. Vei = veículo, Coca = cocaína, JWH = JWH133.

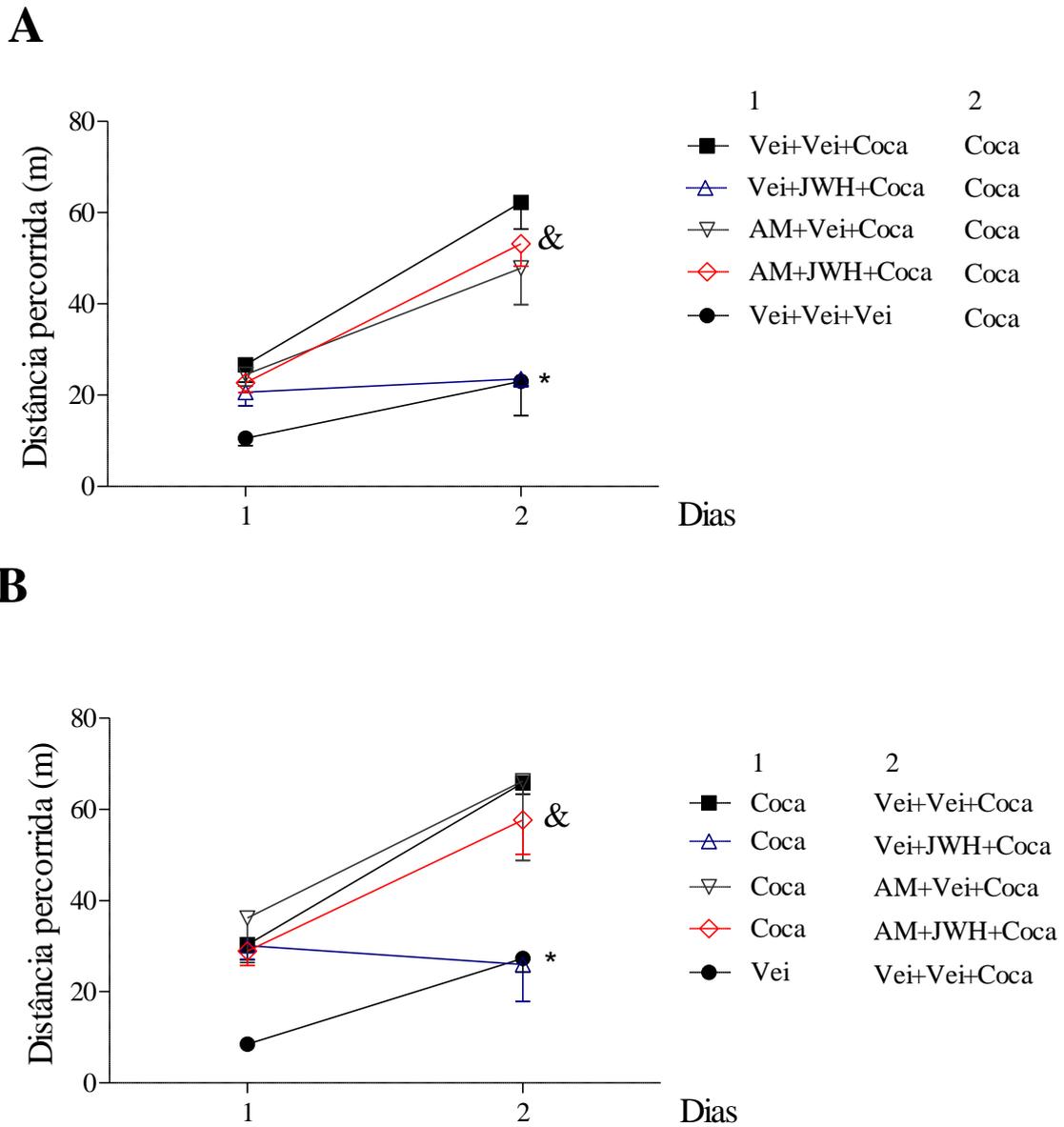


Figura 11. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂) com AM630 (10 mg/kg) reverte o efeito observado do JWH133 (10 mg/kg) nas fases de aquisição (A) e expressão (B) da sensibilização induzida por cocaína. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA de duas vias e por teste *post-hoc* de Bonferroni (n = 6 animais/grupo). *p < 0,05 comparado com o grupo V-V-V/Coca ou Coca/V-V-C (dia 1/2) no dia 2. &p < 0,05 comparado com o grupo V-J-C/Coca ou Coca/V-J-C (dia1/dia2) no dia 2. V = veículo, C = cocaína, J = JWH133 e A = AM630.

5.3 Efeitos de agonistas e antagonistas canabinoides sobre a PCL

Primeiramente, constatou-se que as drogas que modulam o sistema endocanabinoide não induzem preferência nem aversão condicionada ao lugar (teste t de uma amostra, AM251: $t_{(8)} = 0,4825$, $p = 0,6424$; AM630: $t_{(8)} = 1,341$, $p = 0,2168$; JWH133: $t_{(8)} = 0,9380$, $p = 0,9380$) (Fig. 12).

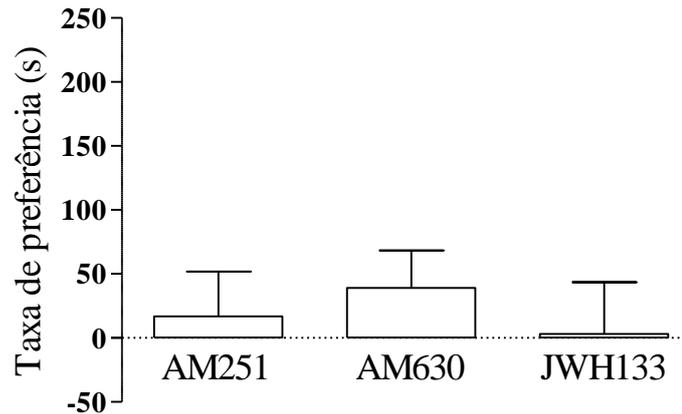


Figura 12. Controle das drogas utilizadas. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁) e do tipo 2 (CB₂) com AM251 (10 mg/kg) e AM630 (10 mg/kg), respectivamente, bem como o agonismo de receptores CB₂ com JWH133 (10 mg/kg) não induziram preferência ou aversão condicionada ao lugar. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média, analisados por teste t em comparação com um valor teórico de zero ($n = 9$ animais/grupo).

5.4 Efeitos de antagonismo de receptores CB₁ e de agonismo de receptores CB₂ sobre a PCL induzida por cocaína

Em seguida, testou-se o efeito do AM251 na PCL induzida por cocaína quando administrado na fase de aquisição (durante o condicionamento) ou expressão (no teste). A dose mais alta de AM251, 10 mg/kg, impediu o condicionamento por cocaína quando as injeções deste antagonista ocorreram previamente às injeções de cocaína ($F_{4,47} = 7,741$, $p < 0,0001$) (Fig. 13A). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com AM251 na expressão da preferência e o grupo controle cocaína ($F_{4,44} = 4,956$, $p = 0,0022$) (Fig. 13B). Portanto, o antagonismo de receptores CB₁ previniu o condicionamento à cocaína, porém, uma vez consolidada a memória, a busca pela recompensa acontece mesmo com a administração de AM251.

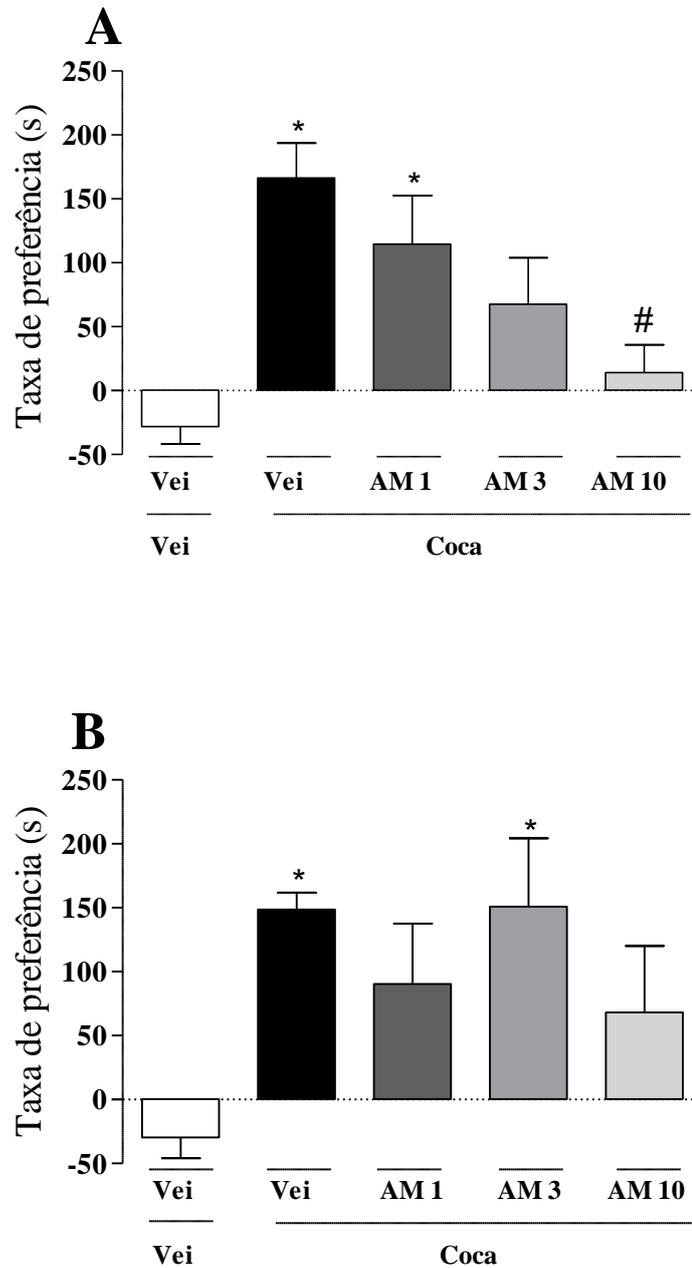


Figura 13. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 1 (CB_1) com AM251 (10 mg/kg) previniu a PCL induzida por cocaína (20 mg/kg) quando administrado durante a fase de aquisição (A), mas não quando administrado na fase de expressão (B). Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média, analisados por ANOVA de uma via e por teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 8-12$ animais/grupo). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo tratado com veículo, ## $p < 0,01$ comparado com o grupo que recebeu somente cocaína. Vei = veículo, Coca = cocaína, AM = AM251.

Outra hipótese testada neste modelo de PCL foi a de que o agonismo de receptores CB₂ com JWH133 seria capaz de prevenir e/ou reverter o condicionamento ao qual os animais foram submetidos com cocaína. Quando administrado durante a aquisição, o JWH133 reduziu a PCL por cocaína, ainda que na maior dose utilizada (10 mg/kg) não há diferença significativa com o grupo controle veículo ($F_{4,46} = 4,168$, $p = 0,0058$) (Fig. 14A). Ao contrário do observado com o AM251, o JWH133 (10 mg/kg) administrado no dia do teste impediu a expressão da PCL induzida por cocaína ($F_{4,44} = 4,843$, $P = 0,0025$) (Fig. 14B).

O JWH133 foi novamente testado, na dose de 10 mg/kg, em animais previamente tratados com veículo ou com AM630, um antagonista de receptores CB₂, previamente às injeções de JWH133 em ambas as fases da PCL por cocaína. Interessantemente, foi detectado efeito do JWH133 (10 mg/kg) quando administrado na aquisição (Fig. 15A). De acordo com o esperado, o AM630 (10 mg/kg) foi capaz de reverter o efeito do JWH133 nas duas fases distintas de administração (Fig. 15). Além disso, a administração de AM630 não alterou por si só o efeito da cocaína na PCL quando da aquisição ($F_{4,42} = 7,650$, $p = 0,0001$) (Fig. 15A). Todavia, quando administrado no dia do teste o grupo tratado com AM630 não diferiu do grupo veículo nem do grupo cocaína ($F_{4,49} = 6,222$, $p = 0,0004$) (Fig. 15B).

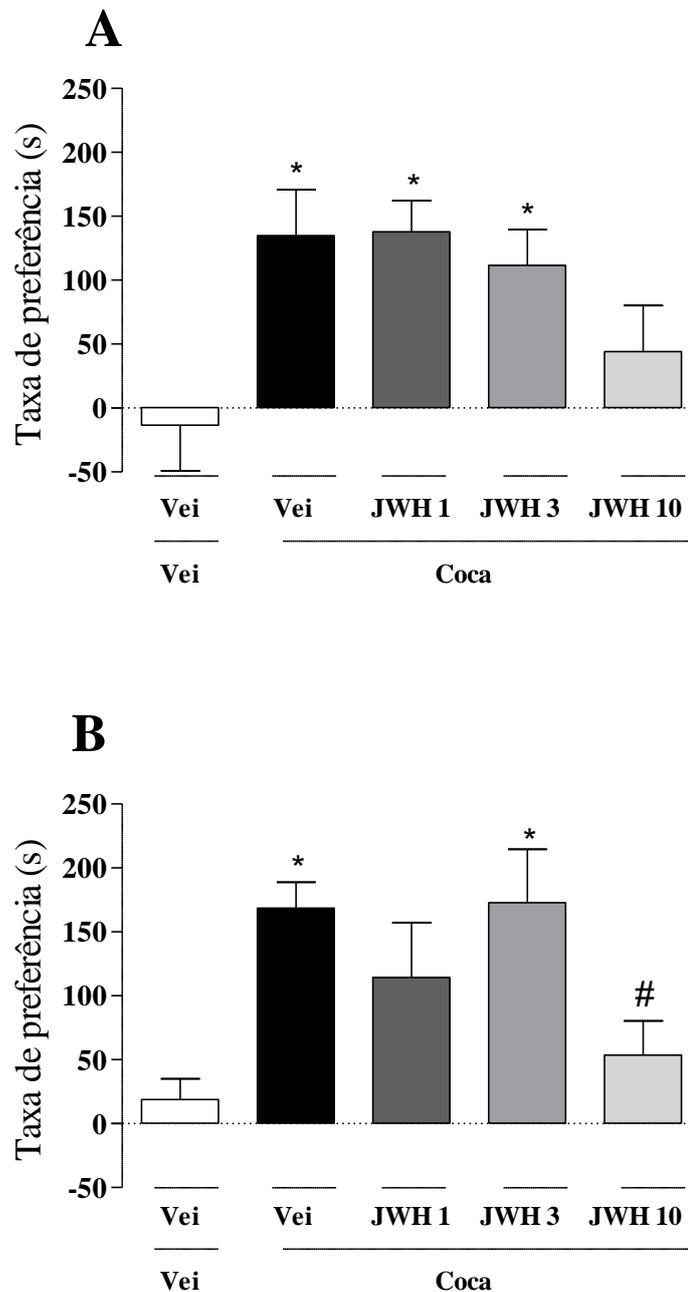


Figura 14. O agonismo de receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂) com JWH133 reduziu o efeito da cocaína quando administrado durante a fase de aquisição (A), e aboliu a preferência induzida por cocaína quando administrado na expressão (B) da PCL. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA de uma via e por teste *post-hoc* de Newman-Keuls (n = 9-11 animais/grupo). * p < 0,05 e **p < 0,01 comparado com o grupo tratado com veículo, #p < 0,05 comparado com o grupo que recebeu somente cocaína. Vei = veículo, Coca = cocaína, JWH = JWH133.

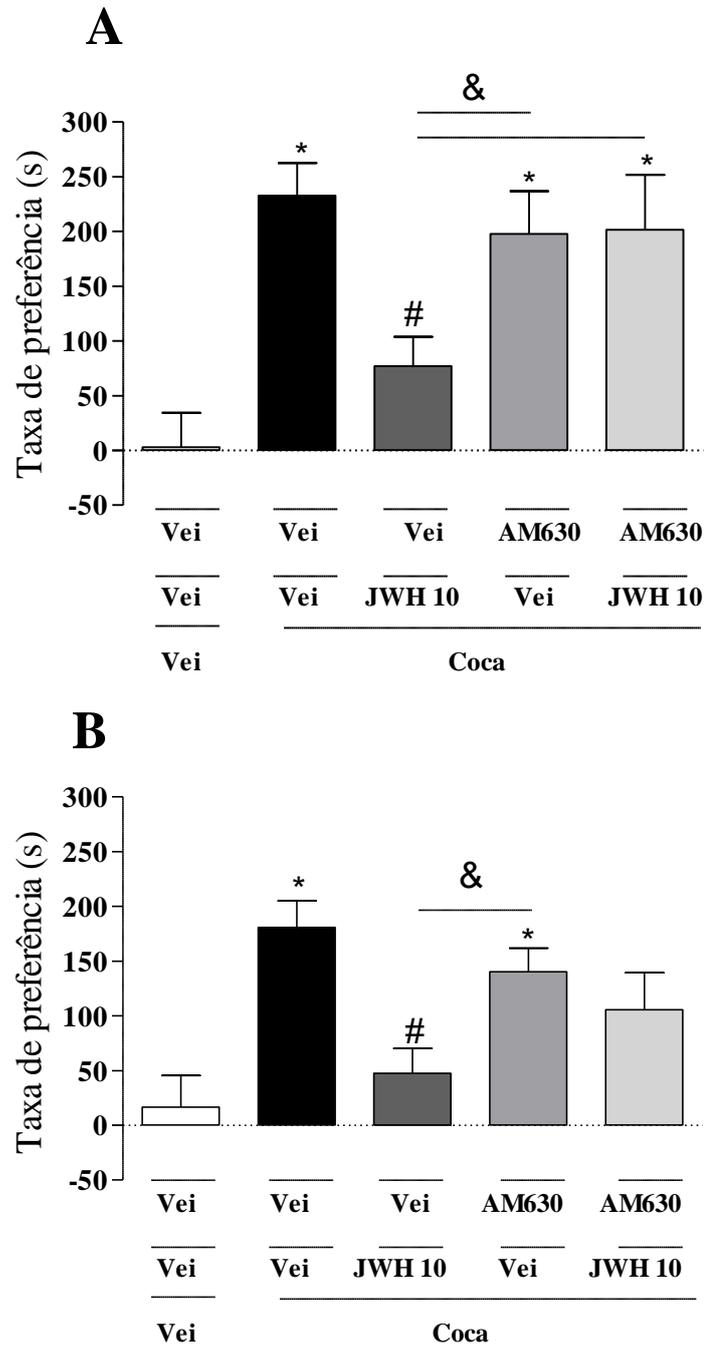


Figura 15. O antagonismo de receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂) com AM630 (10 mg/kg) reverteu o efeito do JWH133 (10 mg/kg) nas fases de aquisição (A) e expressão (B) da PCL induzidas por cocaína. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA de uma via e por teste *post-hoc* de Newman-Keuls (n = 9-11 animais/grupo). * p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 comparado com o grupo tratado com veículo, #p < 0,05 comparado com o grupo que recebeu somente cocaína. V = veículo, C = cocaína, J = JWH133, AM = AM630.

5.5 O tratamento com AM251 ou JWH133 reverte o aumento de c-Fos induzido por cocaína no hipocampo

Os animais que passaram pelo teste de PCL foram perfundidos e seus cérebros dissecados para análise imunohistoquímica de ativação neuronal (células positivas para c-Fos). Esta marcação foi realizada somente em animais tratados com as doses que atenuaram a PCL induzida por cocaína, isto é, AM251 (10 mg/kg) na aquisição (Fig. 13A), JWH133 (10mg/kg) na aquisição (Fig. 14A) e expressão (Fig. 14B).

O tratamento com cocaína induziu o aumento de proteína c-Fos no hipocampo (Fig. 16, 17 e 18). O antagonismo de receptores CB₁ com AM251 na aquisição (Fig. 16), e o agonismo de receptores CB₂ com JWH133 na aquisição (Fig. 17) e na expressão (Fig. 18) da PCL induzida por cocaína reverteram o aumento de c-Fos evidenciado na região hipocampal.

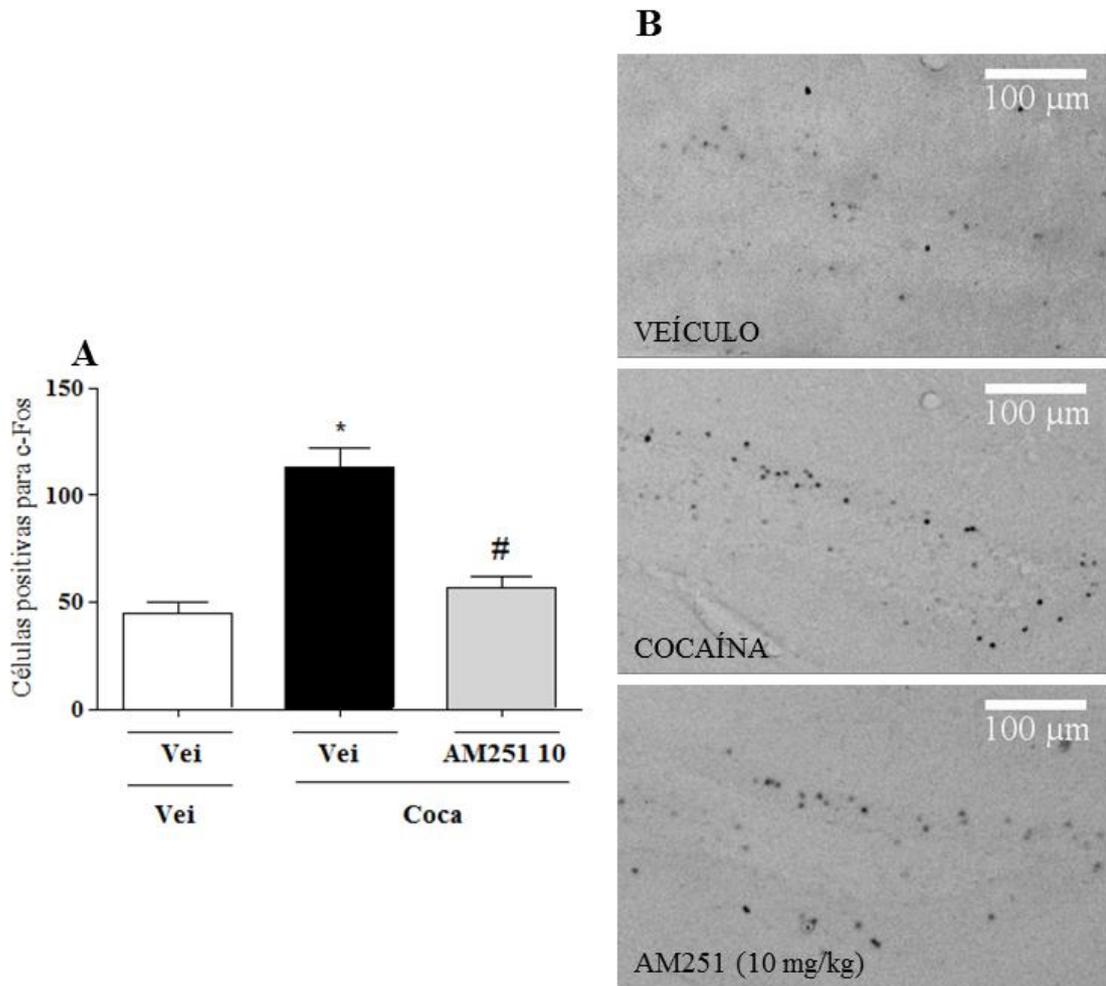


Figura 16. O tratamento com AM251, na fase de aquisição da PCL, reverteu o aumento de expressão de c-Fos induzido por cocaína no hipocampo de camundongos. (A) Número de células positivas para c-Fos por fatia de hipocampo e (B) Foto representativa de marcação imunohistoquímica para c-Fos em um dos lados de hipocampo (aumento 5x). Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média, analisados por ANOVA de uma via e por teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 4$ animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com veículo, # $p < 0,05$ comparado com o grupo que recebeu somente cocaína. Zoom na região do giro denteado. Vei = veículo, Coca = cocaína.

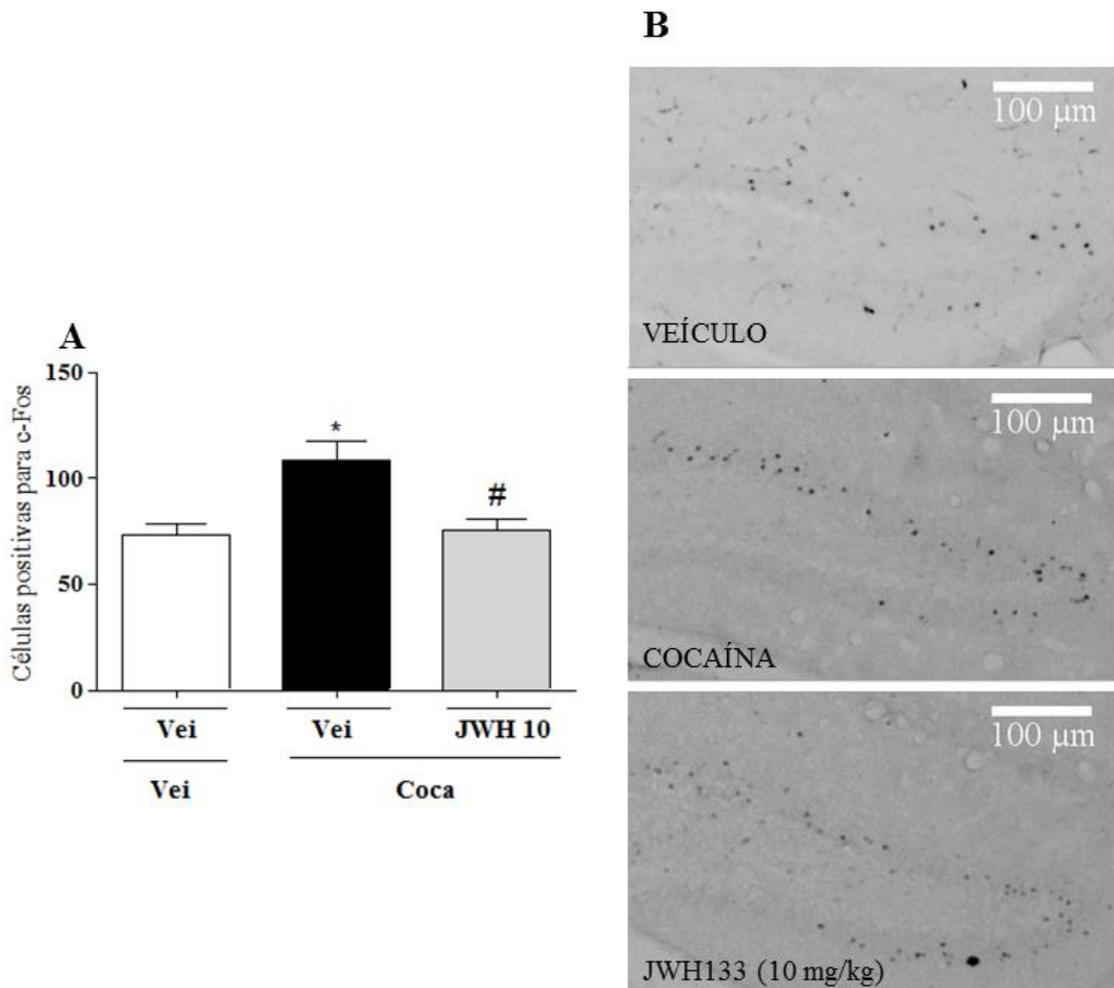


Figura 17. O tratamento com JWH133, na fase de aquisição da PCL, reverteu o aumento de expressão de c-Fos induzido por cocaína no hipocampo de camundongos. (A) Número de células positivas para c-Fos por fatia de hipocampo e (B) Foto representativa de marcação imunohistoquímica para c-Fos em um dos lados de hipocampo (aumento 5x). Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média, analisados por ANOVA de uma via e por teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 4$ animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com veículo, # $p < 0,05$ comparado com o grupo que recebeu somente cocaína. Zoom na região do giro dentado. Vei = veículo, Coca = cocaína.

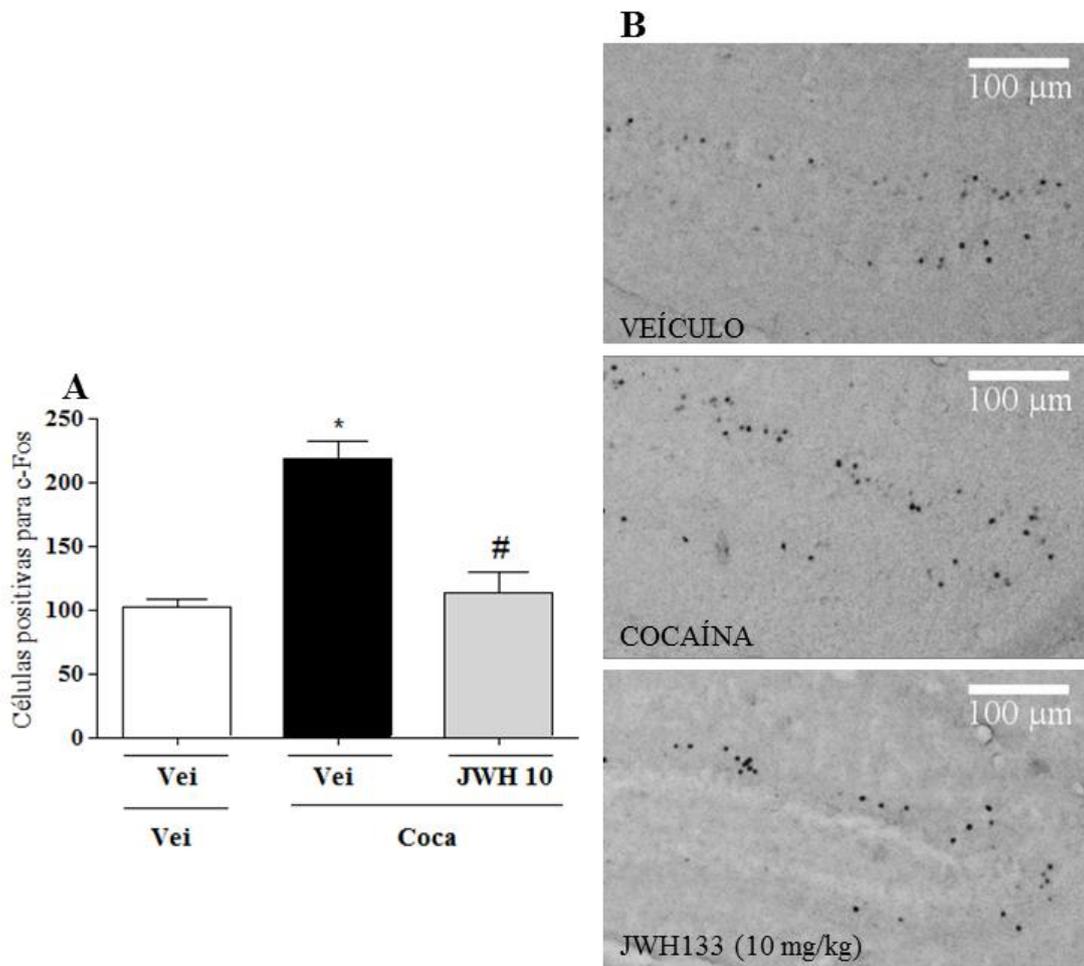


Figura 18. O tratamento com JWH133, na fase de expressão da PCL, reverteu o aumento de expressão de c-Fos induzido por cocaína no hipocampo de camundongos. (A) Número de células positivas para c-Fos por fatia de hipocampo e (B) Foto representativa de marcação imunohistoquímica para c-Fos em um dos lados de hipocampo (aumento 5x). Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média, analisados por ANOVA de uma via e por teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 4$ animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com veículo, # $p < 0,05$ comparado com o grupo que recebeu somente cocaína. Zoom na região do giro denteado. Vei = veículo, Coca = cocaína.

6 Discussão

Coletivamente, os resultados apresentados neste trabalho indicam que o antagonismo de receptores canabinoides CB₁ e o agonismo de receptores canabinoides CB₂ alteram, prevenindo e revertendo, efeitos de sensibilização e PCL induzidos por cocaína em camundongos. Além disso, estas intervenções farmacológicas inibem a ativação neuronal no hipocampo, uma estrutura relacionada à memória contextual, em animais que passaram por condicionamento com a cocaína. Portanto, o sistema endocanabinoide pode estar envolvido nos efeitos induzidos por cocaína, sendo assim um possível alvo terapêutico para o tratamento do transtorno do uso desta substância.

6.1 Envolvimento de receptores canabinoides na sensibilização motora

O aumento de resposta a um estímulo, após repetidas exposições, é denominado sensibilização. Em relação às drogas de abuso, a sensibilização comportamental é observada por aumento na resposta locomotora que ocorre com a repetida e intermitente administração de uma determinada droga. Esta sensibilização locomotora demonstra o enorme potencial de indução de plasticidade cerebral por psicoestimulantes e pode participar nas alterações que facilitam o desenvolvimento de adicção (ROBINSON e BERRIDGE, 1993). Os protocolos de avaliação da sensibilização induzida por cocaína em animais variam principalmente em relação ao tempo entre a aquisição e a expressão da sensibilização. O intervalo entre a aquisição e a expressão da sensibilização é importante, uma vez que a administração repetida de cocaína em um espaço curto de tempo gera tolerância. Em todos os experimentos de sensibilização comportamental realizados neste trabalho, a cocaína induziu o aumento significativo na resposta locomotora quando administrada repetidamente em uma dose fixa (20 mg/kg), indicando que este intervalo de tempo foi suficiente para a indução da sensibilização comportamental nos camundongos.

Há poucos e controversos trabalhos demonstrando o papel de receptores CB₁ na sensibilização induzida por cocaína. O AM251 (0,3 mg/kg), agonista inverso de receptores CB₁, inibe agudamente a hiperlocomoção induzida por cocaína observada no primeiro dia de protocolo, quando administrado antes da injeção de cocaína. Além disso, os animais que receberam AM251 no primeiro dia não desenvolveram sensibilização, mas apresentaram hiperlocomoção no segundo dia, não diferindo significativamente do grupo que recebeu

cocaína apenas no segundo dia de protocolo. Estes resultados corroboram dados obtidos com o uso de rimonabanto, também agonista inverso de receptores CB₁ (MARINHO et al., 2015; MEREU et al., 2015). Entretanto, outros estudos falharam em observar este efeito agudo do AM251 (CORBILLE et al., 2007; KUPFERSCHMIDT et al., 2012) ou do rimonabanto (FILIP et al., 2006) na fase de aquisição da sensibilização por cocaína. Provavelmente, esta aparente controvérsia é devido às diferenças entre espécies e linhagens utilizadas. Assim como outros autores (MARINHO et al., 2015; MEREU et al., 2015), nós utilizamos camundongos *Swiss*, enquanto outros trabalharam com camundongos C57BL/6J (CORBILLE et al., 2007) ou ratos (FILIP et al., 2006; KUPFERSCHMIDT et al., 2012). Até o presente momento, este é o único estudo que avalia o efeito do AM251 na sensibilização induzida por cocaína em camundongos *Swiss*.

Além disso, o AM251 (1 e 3 mg/kg) administrado previamente à fase da expressão diminuiu a sensibilização por cocaína. Este resultado contradiz resultados anteriores obtidos com camundongos nocautes para CB₁ (MARTIN et al., 2000) ou tratados com rimonabanto (LESSCHER et al., 2005), onde o efeito de sensibilização por cocaína foi observado independente da intervenção genética ou farmacológica. Estas diferenças podem ser consequência de protocolos distintos: sensibilização por autoadministração (LESSCHER et al., 2005) e um período longo (19 dias) entre a aquisição e a expressão da sensibilização (MARTIN et al., 2000). Por outro lado, corroboramos dados dos estudos citados anteriormente (CORBILLE et al., 2007; FILIP et al., 2006; KUPFERSCHMIDT et al., 2012; MARINHO et al., 2015; MEREU et al., 2015) evidenciando a participação de receptores CB₁ na expressão da sensibilização, independentemente da espécie ou linhagem.

Os mecanismos pelos quais os receptores CB₁ modulam a sensibilização induzida por cocaína ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, Corbillé e colaboradores demonstraram que a deleção genética do receptor CB₁ previne a fosforilação de receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 1 (mGluR1) induzida por cocaína no estriado dorsal e núcleo acumbente (CORBILLE et al., 2007). Os mGluR1 são receptores que induzem a síntese de 2-AG (HASHIMOTODANI et al., 2007). O uso de cocaína estimula estes receptores que, conseqüentemente, facilitarão a atuação de 2-AG em receptores CB₁ localizados em neurônios GABAérgicos do mesencéfalo. A inibição de GABA, por fim, desinibe neurônios dopaminérgicos, resultando no aumento de dopamina na região do núcleo acumbente (WANG et al., 2015). Portanto, a desinibição de neurônios dopaminérgicos por

ação de 2-AG mobilizada por cocaína pode explicar o efeito de antagonistas/agonistas inverso de CB₁ na sensibilização comportamental.

Em seguida, o papel do receptor CB₂ na sensibilização induzida por cocaína foi avaliado. Nós demonstramos que o JWH133, agonista CB₂, nas doses utilizadas (0,3, 1 e 3 mg/kg) não altera agudamente a hiperlocomoção por cocaína observada na aquisição da sensibilização. Em contrapartida, a administração de JWH133 (20 mg/kg) inibe a hiperlocomoção por cocaína em camundongos C57BL/6J selvagens, mas não em camundongos nocautes para CB₂ (XI et al., 2011). Delis e colaboradores corroboraram este dado em ratos tratados com JWH133 (10 mg/kg) antes da injeção aguda de cocaína (DELIS et al., 2016). Portanto, é razoável assumir que se tivéssemos utilizados uma dose maior de JWH133 teríamos observado efeito semelhante. Apesar de não reverter o efeito agudo da cocaína, doses não tão altas de JW133, quando administradas na aquisição, foram eficazes em reduzir a sensibilização induzida por cocaína. Similarmente ao efeito do AM251, o JWH133 administrado no dia da expressão da sensibilização, previamente à injeção de cocaína, atenua a sensibilização induzida por cocaína. Este é a primeira demonstração de efeito do JWH133 utilizado em um modelo de sensibilização por cocaína. Nossos dados corroboram os resultados obtidos em camundongos transgênicos que superexpressam CB₂ (ARACIL-FERNANDEZ et al., 2012), indicando que estes receptores canabinoides modulam a sensibilização por cocaína. Além disso, o tratamento prévio com AM630, antagonista CB₂, reverte o efeito do JWH133 em ambas as fases de aquisição e expressão da sensibilização, evidenciando que o efeito observado é realmente por ação de receptores CB₂. O antagonismo de receptores CB₂ não altera a sensibilização, como demonstrado anteriormente (BLANCO-CALVO et al., 2014).

Importante destacar que nenhum dos agonistas ou antagonistas canabinoides alteraram a locomoção basal dos animais. Logo, os efeitos observados devem ser mediados por alterações no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, e não por efeitos adversos. Embora não se saiba ao certo quais são as modificações que ocorrem no SNC responsáveis pelo efeito comportamental de sensibilização induzida por cocaína, algumas regiões parecem estar intimamente relacionadas, como é o caso do núcleo acumbente, da área tegmental ventral e do córtex pré-frontal medial (STEKETEE e KALIVAS, 2011). É razoável assumir, levando em consideração estudos prévios (CORBILLE et al., 2007; WANG et al., 2015), que o efeito da cocaína é mediado por endocanabinoides que irão atuar primariamente em receptores CB₁ localizados em neurônios GABAérgicos. Enquanto que a ativação de

receptores CB₂, expressos em menor quantidade, produziria um efeito contrário, possivelmente por estes estarem localizados em neurônios dopaminérgicos (ZHANG et al., 2014). Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para melhor compreender os mecanismos envolvidos neste efeito.

6.2 Envolvimento de receptores canabinoides na PCL e expressão de c-Fos no hipocampo

Em seguida, demonstramos que o antagonismo de receptores CB₁ e o agonismo de receptores CB₂ atenuam a aquisição ou a expressão da PCL induzida por cocaína. Estes resultados corroboram os nossos dados de sensibilização locomotora, ainda que os circuitos neurais recrutados em cada modelo possam ser distintos. Apesar de algumas limitações, o modelo de PCL traz muitas vantagens: simplicidade metodológica, possibilidade de medir respostas de recompensa e aversão com o mesmo procedimento, possibilidade de testar a preferência condicionada na ausência da droga (evitando interpretações errôneas influenciadas por alterações locomotoras), entre outras (CUNNINGHAM et al., 2006). Há discussões sobre o verdadeiro significado da PCL. Enquanto alguns argumentam se tratar de um comportamento relacionado com incentivo, outros defendem que pode ser um comportamento de condicionamento operante (HUSTON et al., 2013). Independente da motivação do comportamento observado, para a PCL ocorrer o animal precisa ser capaz de lembrar da associação entre contexto e droga, ou seja, é dependente do hipocampo. Por isso, nós também quantificamos a expressão da proteína c-Fos no hipocampo dos animais cujo tratamento com as drogas canabinoides efetivamente atenuou a PCL induzida por cocaína. A proteína c-Fos é codificada por um gene de ativação imediata e é utilizada em marcações para análise de atividade neuronal. Sabe-se que a cocaína induz o aumento de c-Fos em regiões do sistema mesocorticolímbico, especialmente no núcleo acumbente (MARINHO et al., 2017), mas também no hipocampo (LADRON DE GUEVARA-MIRANDA et al., 2017). A nossa hipótese de que o AM251 e o JWH133 em doses que atenuaram a PCL induzida por cocaína reverteriam a ativação neuronal no hipocampo foi confirmada.

Corroborando estudos anteriores (DELIS et al., 2016; HU et al., 2015; MARTIN et al., 2000), a cocaína induziu de forma robusta a preferência pelo compartimento da caixa pareado previamente com a droga no paradigma de PCL utilizado no presente trabalho. Por outro lado, as drogas utilizadas que atuam em receptores canabinoides (AM251, JWH133 e AM630) não induziram preferência nem aversão condicionada ao lugar. Em seguida, para

testar a influência de receptores canabinoides na memória contextual à cocaína, nós administramos as drogas que atuam nestes receptores em diferentes fases do condicionamento: aquisição (antes de cada uma das três injeções de cocaína) ou expressão (antes do teste, quando o animal já havia sido condicionado ao lugar). As doses de AM251 e JWH133 que diminuíram o efeito da cocaína neste paradigma foram maiores que as necessárias para prevenir a sensibilização locomotora, indicando que repetidas administrações de cocaína alteram mais significativamente a circuitaria cerebral.

O antagonismo de receptores CB₁ com o AM251 (10 mg/kg) preveniu a PCL quando realizado na fase de aquisição da PCL, estando de acordo com resultados anteriores obtidos com o rimonabanto (DELIS et al., 2016; HU et al., 2015; YU et al., 2011). Interessantemente, nocautes para o receptor CB₁ condicionam normalmente à cocaína (HOUCHI et al., 2005; MARTIN et al., 2000), indicando que os receptores CB₁ não são essenciais para o desenvolvimento da memória contextual associada à cocaína. Ao contrário do resultado obtido com a administração de rimonabanto a ratos na fase da expressão da PCL (DELIS et al., 2016), nós não observamos efeito do AM251 nas doses utilizadas sobre a PCL induzida por cocaína quando administrado na expressão, assim como outros não observaram com o rimonabanto após o condicionamento ter ocorrido (CHAPERON e THIEBOT, 1999). Estas diferenças indicam a necessidade de mais estudos sobre o papel de receptores CB₁, principalmente após administrações repetidas de cocaína. Poderíamos supor que os receptores CB₁ participam da aquisição de memória contextual relacionada ao uso de cocaína e que a ativação destes facilita a ação da cocaína, porém, uma vez que a memória já esteja consolidada, a facilitação proporcionada por ativação de CB₁ não é mais necessária para a expressão do condicionamento.

A localização específica dos receptores CB₁ não foi investigada neste trabalho. Entretanto, a estimulação do sistema endocanabinoide, principalmente mediada por ativação de receptores CB₁, pode induzir efeitos tanto de recompensa quanto de aversão (AHMAD et al., 2016; ZANGEN et al., 2006). Os neurônios dopaminérgicos que se projetam da ATV parecem estar especialmente relacionados com o processamento comportamental das vias de recompensa e aversão (LAVIOLETTE e VAN DER KOOY, 2003). Recentemente, demonstrou-se que a ativação de receptores CB₁ na região posterior da ATV induz efeitos de recompensa avaliados com o uso do modelo de PCL (AHMAD e LAVIOLETTE, 2017). Além disso, esta é dependente de transmissão dopaminérgica na amígdala basolateral, indicando a via mesolímbica específica por onde estes receptores atuam promovendo efeitos

recompensatórios (AHMAD e LAVIOLETTE, 2017). Especulamos que o antagonismo sistêmico de receptores CB_1 com AM251 pode atuar especialmente em neurônios dopaminérgicos da ATV, bloqueando a transmissão de dopamina e alterando a PCL induzida por cocaína.

O envolvimento de receptores CB_2 na PCL induzida por cocaína foi avaliado com injeções sistêmicas de JWH133, e confirmado com o antagonismo destes receptores com AM630. Ao contrário do observado com a administração de AM251, o agonismo de receptores CB_2 foi capaz de reverter o efeito da cocaína mesmo após o condicionamento ter ocorrido neste modelo de PCL. Entretanto, quando administramos JWH133 antes das injeções de cocaína durante a fase de aquisição, a diminuição da PCL não foi significativamente diferente. Repetimos o tratamento com JWH133 (10 mg/kg) e acrescentamos um grupo com AM630 (10 mg/kg) previamente ao JWH133 e desta vez detectamos o efeito do agonismo de receptores CB_2 sobre a memória contextual induzida por cocaína. De forma muito similar, um estudo recente demonstrou que o JWH133 diminui a aquisição da PCL por cocaína em ratos (DELIS et al., 2016). Além disso, outros estudos demonstraram que a administração de O-1966, um agonista de receptores CB_2 , diminui PCL por cocaína (IGNATOWSKA-JANKOWSKA et al., 2013), que o JWH133 (XI et al., 2011) e a superexpressão de receptores CB_2 (ARACIL-FERNANDEZ et al., 2012) diminuem a auto-administração à cocaína.

A quantificação de proteína c-Fos no hipocampo destes animais evidenciou que o AM251 (10 mg/kg) na aquisição e o JWH133 (10 mg/kg) na aquisição e na expressão da PCL revertem o aumento da ativação neuronal induzida por cocaína. Este resultado evidencia a importância do hipocampo para a consolidação da memória ao contexto onde a droga foi administrada. As memórias associadas ao uso da cocaína são persistentes e de difícil extinção, indicando que a adicção à cocaína é, em grande parte, um transtorno de aprendizado e de memória (KUTLU e GOULD, 2016). O hipocampo pode ser responsável por desencadear o desejo por cocaína induzido por pistas (“cue-induced cocaine craving” em inglês) (KILTS et al., 2004; TOMASI et al., 2015) bem como a aquisição e processamento de memórias relacionadas ao uso de cocaína (CASTILLA-ORTEGA et al., 2016; OTIS et al., 2014). No sistema de recompensa cerebral, o hipocampo está integrado por projeções bi-direcionais com a ATV. Projeções dopaminérgicas da ATV regulam a plasticidade e função hipocampal (GHANBARIAN e MOTAMEDI, 2013) e, por sua vez, projeções hipocampais potencializam a atividade na ATV por vias polissinápticas que podem envolver o núcleo acumbente (KAHN e SHOHAMY, 2013; LUO et al., 2011). Ademais, a liberação de dopamina no hipocampo de

indivíduos com o transtorno do uso de cocaína, em resposta aos estímulos associados à droga, é mais proeminente nos pacientes que relataram um maior desejo por buscar a droga (FOTROS et al., 2013).

O uso de modelos comportamentais como o da PCL permite o estudo de componentes específicos relacionados com o uso de cocaína. Por exemplo, quando o hipocampo é lesado ou inativado os animais não condicionam com PCL por cocaína (HERNANDEZ-RABAZA et al., 2008; MEYERS et al., 2003; MEYERS et al., 2006). Além disso, mesmo após a consolidação da memória contextual a cocaína, o hipocampo ainda é necessário para a evocação desta (OTIS et al., 2014; RAYBUCK e LATTAL, 2014). Entretanto, não é possível determinar se os animais com hipocampo lesado deixam de procurar o contexto pareado com cocaína devido a um déficit cognitivo ou, ainda, por alterações em vias de recompensa. Ambas as opções são viáveis, uma vez que o hipocampo é responsável por memórias similares em testes não relacionados a drogas, mas também está relacionado com motivação e desejo por drogas. Nossos resultados, além de corroborar estudos que demonstram a participação do hipocampo na memória associada ao uso de cocaína, apontam para o papel de receptores canabinoídes na ativação de neurônios hipocámpais quando da expressão desta memória. De forma semelhante, o antagonismo de receptores CB₁ no hipocampo dorsal impede o restabelecimento da PCL induzida por morfina, sugerindo que a ativação de CB₁ no hipocampo facilita a memória contextual ao uso de morfina (ZHAO et al., 2017). Em relação aos receptores CB₂, este é o primeiro estudo a demonstrar o envolvimento destes na memória dependente de hipocampo na PCL induzida por cocaína. Ao contrário do que ocorre com a ativação de receptores CB₁, as ações desencadeadas por CB₂ atenuam os efeitos induzidos por cocaína.

Em suma, nossos resultados evidenciam que os receptores CB₁ e CB₂ regulam de forma oposta, facilitando ou atenuando, os efeitos comportamentais de sensibilização e PCL induzidos por cocaína. Além disso, a memória contextual, avaliada por meio do paradigma de PCL, é dependente de ativação de neurônios no hipocampo e pode ser revertida com o tratamento de antagonista CB₁ ou agonista CB₂, indicando a correlação entre efeitos celulares e comportamentais neste modelo. Por serem receptores acoplados à proteína G_i, poderia supor-se que ambos desencadeariam respostas similares frente a um mesmo estímulo. Entretanto, levando-se em consideração que estes apresentam localização distinta no SNC, podendo inibir a inibição (em neurônios GABAérgicos) ou inibir a excitação (em neurônios

glutamatérgicos ou dopaminérgicos), é possível justificar os efeitos do AM251 e do JWH133 obtidos neste trabalho (Fig. 19).

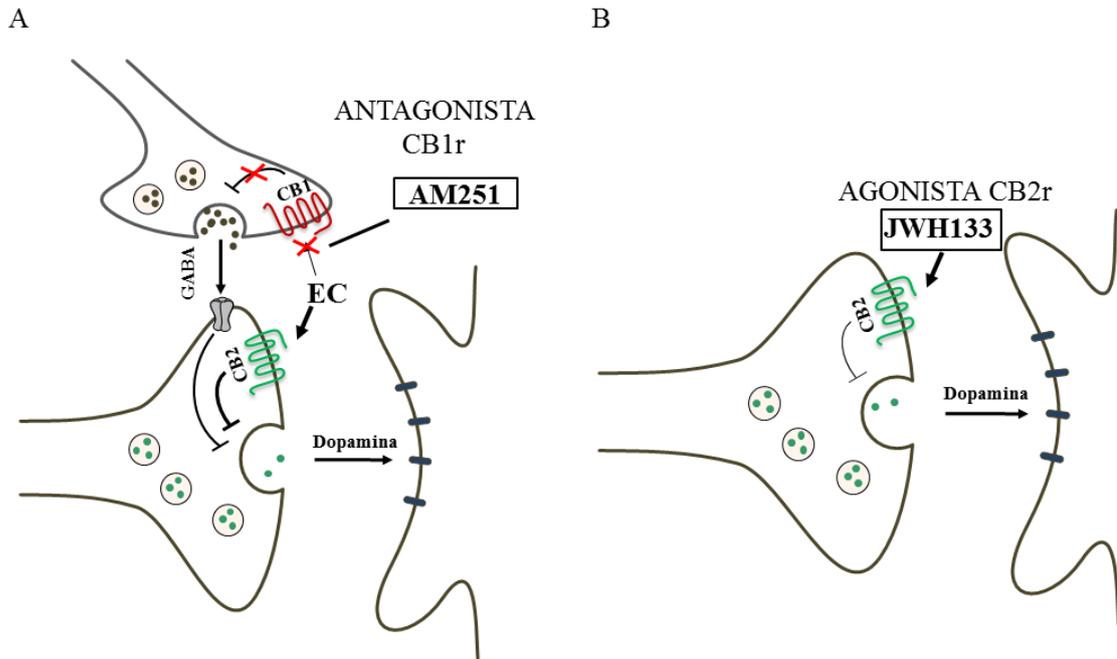


Figura 19. Esquema representativo da hipótese elaborada a partir dos resultados obtidos. (A) O efeito observado com a administração de AM251 é mediado por receptores CB_1 localizados em neurônios GABAérgicos que, desinibindo GABA, atuaria inibindo a liberação de dopamina. (B) O efeito observado com a administração de JWH133 é mediado por receptores CB_2 localizados em neurônios dopaminérgicos, inibindo diretamente a liberação de dopamina. Em ambos os casos, com a diminuição dos níveis de dopamina disponíveis na fenda sináptica, as ações centrais da cocaína seriam bloqueadas.

Embora os mecanismos particulares pelos quais o sistema endocanabinoide modula os efeitos da cocaína estejam pouco elucidados, este trabalho contribuiu para corroborar estudos anteriores que demonstram a eficácia do antagonismo de receptores CB_1 e do agonismo de receptores CB_2 em reverter diferentes efeitos comportamentais induzidos por cocaína. Além disso, exploramos o hipocampo, região geralmente negligenciada em estudos de recompensa e aversão, e demonstramos que a ativação deste por cocaína pode ser também revertida com a modulação de receptores canabinoide. Estratégias terapêuticas podem ser desenvolvidas com a compreensão dos mecanismos neurobiológicos relacionados ao TUS.

Referências

AHMAD, T. and LAVIOLETTE, S. R. Cannabinoid reward and aversion effects in the posterior ventral tegmental area are mediated through dissociable opiate receptor subtypes and separate amygdalar and accumbal dopamine receptor substrates. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 234, n. 15, p. 2325-2336, 2017.

AHMAD, T.; SUN, N.; LYONS, D. and LAVIOLETTE, S. R. Bi-directional cannabinoid signalling in the basolateral amygdala controls rewarding and aversive emotional processing via functional regulation of the nucleus accumbens. **Addict Biol**, 2016.

AHMED, S. H. The science of making drug-addicted animals. **Neuroscience**, v. 211, p. 107-25, 2012.

ALMEIDA-SANTOS, A. F.; GOBIRA, P. H.; SOUZA, D. P.; FERREIRA, R. C.; ROMERO, T. R.; DUARTE, I. D.; AGUIAR, D. C. and MOREIRA, F. A. The antipsychotic aripiprazole selectively prevents the stimulant and rewarding effects of morphine in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 742, p. 139-44, 2014.

ARACIL-FERNANDEZ, A.; TRIGO, J. M.; GARCIA-GUTIERREZ, M. S.; ORTEGA-ALVARO, A.; TERNIANOV, A.; NAVARRO, D.; ROBLEDO, P.; BERBEL, P.; MALDONADO, R. and MANZANARES, J. Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 7, p. 1749-63, 2012.

ARAQUE, A.; CASTILLO, P. E.; MANZONI, O. J. and TONINI, R. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. **Neuropharmacology**, 2017.

BACCI, A.; HUGUENARD, J. R. and PRINCE, D. A. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 312-6, 2004.

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

BATISTA, L. A.; GOBIRA, P. H.; VIANA, T. G.; AGUIAR, D. C. and MOREIRA, F. A. Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs. **Behav Pharmacol**, v. 25, n. 5-6, p. 425-33, 2014.

BATISTA, L. A.; VIANA, T. G.; SILVEIRA, V. T.; AGUIAR, D. C. and MOREIRA, F. A. Effects of aripiprazole on caffeine-induced hyperlocomotion and neural activation in the striatum. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 389, n. 1, p. 11-6, 2016.

BEAULIEU, J. M. and GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 1, p. 182-217, 2011.

BERRIDGE, K. C. and ROBINSON, T. E. Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. **Am Psychol**, v. 71, n. 8, p. 670-679, 2016.

BLANCO-CALVO, E.; RIVERA, P.; ARRABAL, S.; VARGAS, A.; PAVON, F. J.; SERRANO, A.; CASTILLA-ORTEGA, E.; GALEANO, P.; RUBIO, L.; SUAREZ, J. and RODRIGUEZ DE FONSECA, F. Pharmacological blockade of either cannabinoid CB1 or CB2 receptors prevents both cocaine-induced conditioned locomotion and cocaine-induced reduction of cell proliferation in the hippocampus of adult male rat. **Front Integr Neurosci**, v. 7, p. 106, 2014.

BLANCO, E.; GALEANO, P.; PALOMINO, A.; PAVON, F. J.; RIVERA, P.; SERRANO, A.; ALEN, F.; RUBIO, L.; VARGAS, A.; CASTILLA-ORTEGA, E.; DECARA, J.; BILBAO, A.; DE FONSECA, F. R. and SUAREZ, J. Cocaine-induced behavioral sensitization decreases the expression of endocannabinoid signaling-related proteins in the mouse hippocampus. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 26, n. 3, p. 477-92, 2016.

BOILEAU, I.; PAYER, D.; HOULE, S.; BEHZADI, A.; RUSJAN, P. M.; TONG, J.; WILKINS, D.; SELBY, P.; GEORGE, T. P.; ZACK, M.; FURUKAWA, Y.; MCCLUSKEY,

T.; WILSON, A. A. and KISH, S. J. Higher binding of the dopamine D3 receptor-preferring ligand [11C]-(+)-propyl-hexahydro-naphtho-oxazin in methamphetamine polydrug users: a positron emission tomography study. **J Neurosci**, v. 32, n. 4, p. 1353-9, 2012.

CADAS, H.; GAILLET, S.; BELTRAMO, M.; VENANCE, L. and PIOMELLI, D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. **J Neurosci**, v. 16, n. 12, p. 3934-42, 1996.

CAHILL, K. and USSHER, M. H. Cannabinoid type 1 receptor antagonists for smoking cessation. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD005353, 2011.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. and MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200, 1957.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. and WALDECK, B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. **Science**, v. 127, n. 3296, p. 471, 1958.

CASTILLA-ORTEGA, E.; SERRANO, A.; BLANCO, E.; ARAOS, P.; SUAREZ, J.; PAVON, F. J.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F. and SANTIN, L. J. A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult hippocampal neurogenesis. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 66, p. 15-32, 2016.

CASTILLO, P. E.; YOUNTS, T. J.; CHAVEZ, A. E. and HASHIMOTODANI, Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 70-81, 2012.

CHAPERON, F. and THIEBOT, M. H. Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. **Crit Rev Neurobiol**, v. 13, n. 3, p. 243-81, 1999.

CHEVALEYRE, V. and CASTILLO, P. E. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. **Neuron**, v. 38, n. 3, p. 461-72, 2003.

COOPER, S.; ROBISON, A. J. and MAZEI-ROBISON, M. S. Reward Circuitry in Addiction. **Neurotherapeutics**, 2017.

CORBILLE, A. G.; VALJENT, E.; MARSICANO, G.; LEDENT, C.; LUTZ, B.; HERVE, D. and GIRAULT, J. A. Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants. **J Neurosci**, v. 27, n. 26, p. 6937-47, 2007.

CRAVATT, B. F.; GIANG, D. K.; MAYFIELD, S. P.; BOGER, D. L.; LERNER, R. A. and GILULA, N. B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 83-7, 1996.

CUNNINGHAM, C. L.; GREMEL, C. M. and GROBLEWSKI, P. A. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 1662-70, 2006.

DE VRIES, T. J.; SHAHAM, Y.; HOMBERG, J. R.; CROMBAG, H.; SCHUURMAN, K.; DIEBEN, J.; VANDERSCHUREN, L. J. and SCHOFFELMEER, A. N. A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. **Nat Med**, v. 7, n. 10, p. 1151-4, 2001.

DELIS, F.; POLISSIDIS, A.; POULIA, N.; JUSTINOVA, Z.; NOMIKOS, G. G.; GOLDBERG, S. R. and ANTONIOU, K. Attenuation of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference and Motor Activity via Cannabinoid CB2 Receptor Agonism and CB1 Receptor Antagonism in Rats. **Int J Neuropsychopharmacol**, 2016.

DEROCHE-GAMONET, V.; BELIN, D. and PIAZZA, P. V. Evidence for addiction-like behavior in the rat. **Science**, v. 305, n. 5686, p. 1014-7, 2004.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A., 3RD; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S. and HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 34, n. 5, p. 605-13, 1988.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A. and MECHOULAM, R.

Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-9, 1992.

DI CHIARA, G. and IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 14, p. 5274-8, 1988.

DI MARZO, V.; MELCK, D.; BISOGNO, T. and DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends Neurosci**, v. 21, n. 12, p. 521-8, 1998.

DINH, T. P.; FREUND, T. F. and PIOMELLI, D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. **Chem Phys Lipids**, v. 121, n. 1-2, p. 149-58, 2002.

FILIP, M.; GOLDA, A.; ZANIEWSKA, M.; MCCREARY, A. C.; NOWAK, E.; KOLASIEWICZ, W. and PRZEGALINSKI, E. Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine. **Pharmacol Rep**, v. 58, n. 6, p. 806-19, 2006.

FOTROS, A.; CASEY, K. F.; LARCHER, K.; VERHAEGHE, J. A.; COX, S. M.; GRAVEL, P.; READER, A. J.; DAGHER, A.; BENKELFAT, C. and LEYTON, M. Cocaine cue-induced dopamine release in amygdala and hippocampus: a high-resolution PET [(1)(8)F]fallypride study in cocaine dependent participants. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 9, p. 1780-8, 2013.

FREUD, S. **Über Coca**. Wien: M. Perles, 1885. 26 p.

GAONI, Y. and MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **J Am Chem Soc**, v. 86, n. 8, p. 1646-+, 1964.

GHANBARIAN, E. and MOTAMEDI, F. Ventral tegmental area inactivation suppresses the expression of CA1 long term potentiation in anesthetized rat. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58844, 2013.

GOBIRA, P. H. Envolvimento do sistema endocanabinoide sobre os efeitos comportamentais e moleculares induzidos pela cocaína. 2016. Tese – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

GOODMAN, L. S.; BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. and KNOLLMANN, B. R. C. **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**. 12th. New York: McGraw-Hill, 2011. 2084 p. ISBN 9780071624428 (hardcover alk. paper) 0071624422. Disponível em: < <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy1011/2010000236-b.html> <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy1011/2010000236-d.html> <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy1011/2010000236-t.html> >.

HASHIMOTODANI, Y.; OHNO-SHOSAKU, T. and KANO, M. Ca(2+)-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. **Curr Opin Neurobiol**, v. 17, n. 3, p. 360-5, 2007.

HERNANDEZ-RABAZA, V.; HONTECILLAS-PRIETO, L.; VELAZQUEZ-SANCHEZ, C.; FERRAGUD, A.; PEREZ-VILLABA, A.; ARCUSA, A.; BARCIA, J. A.; TREJO, J. L. and CANALES, J. J. The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. **Neurobiol Learn Mem**, v. 90, n. 3, p. 553-9, 2008.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L.; BOLTON, N. M.; NEELY, M. H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R.; KREY, J. F.; WALKER, J. M.; HOLMES, P. V.; CRYSTAL, J. D.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G. and PIOMELLI, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1108-12, 2005.

HORNYKIEWICZ, O. Brain Dopamine: A Historical Perspective. In: Di Chiara, G. (Ed.). **Dopamine in the CNS I**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. p.1-22. ISBN 978-3-642-56051-4.

HOUCHI, H.; BABOVIC, D.; PIERREFICHE, O.; LEDENT, C.; DAOUST, M. and NAASSILA, M. CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 339-49, 2005.

HU, S. S.; LIU, Y. W. and YU, L. Medial prefrontal cannabinoid CB1 receptors modulate consolidation and extinction of cocaine-associated memory in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 10, p. 1803-15, 2015.

HUSTON, J. P.; SILVA, M. A.; TOPIC, B. and MULLER, C. P. What's conditioned in conditioned place preference? **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, n. 3, p. 162-6, 2013.

IBRAHIM, M. M.; DENG, H.; ZVONOK, A.; COCKAYNE, D. A.; KWAN, J.; MATA, H. P.; VANDERAH, T. W.; LAI, J.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A. and MALAN, T. P., JR. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 18, p. 10529-33, 2003.

IGNATOWSKA-JANKOWSKA, B. M.; MULDOON, P. P.; LICHTMAN, A. H. and DAMAJ, M. I. The cannabinoid CB2 receptor is necessary for nicotine-conditioned place preference, but not other behavioral effects of nicotine in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 229, n. 4, p. 591-601, 2013.

JAY, M. Miracle or Menace? **International Review of Neurobiology**, v. 120, p. 27-39, 2015.

KAHN, I. and SHOHAMY, D. Intrinsic connectivity between the hippocampus, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in humans. **Hippocampus**, v. 23, n. 3, p. 187-92, 2013.

KALIVAS, P. W. How do we determine which drug-induced neuroplastic changes are important? **Nat Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 1440-1, 2005.

KANO, M. Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 90, n. 7, p. 235-50, 2014.

KATHURIA, S.; GAETANI, S.; FEGLEY, D.; VALINO, F.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; LA RANA, G.; CALIGNANO, A.; GIUSTINO, A.; TATTOLI, M.; PALMERY, M.; CUOMO, V. and PIOMELLI, D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. **Nat Med**, v. 9, n. 1, p. 76-81, 2003.

KATONA, I. and FREUND, T. F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 35, p. 529-58, 2012.

KILTS, C. D.; GROSS, R. E.; ELY, T. D. and DREXLER, K. P. The neural correlates of cue-induced craving in cocaine-dependent women. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 2, p. 233-41, 2004.

KOOB, G. F. and VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217-38, 2010.

KUPFERSCHMIDT, D. A.; KLAS, P. G. and ERB, S. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of corticotropin-releasing factor on the reinstatement of cocaine seeking and expression of cocaine-induced behavioural sensitization. **Br J Pharmacol**, v. 167, n. 1, p. 196-206, 2012.

KUTLU, M. G. and GOULD, T. J. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. **Learn Mem**, v. 23, n. 10, p. 515-33, 2016.

LADRON DE GUEVARA-MIRANDA, D.; MILLON, C.; ROSELL-VALLE, C.; PEREZ-FERNANDEZ, M.; MISSIROLI, M.; SERRANO, A.; PAVON, F. J.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F.; MARTINEZ-LOSA, M.; ALVAREZ-DOLADO, M.; SANTIN, L. J. and CASTILLA-ORTEGA, E. Long-lasting memory deficits in mice withdrawn from cocaine are concomitant with neuroadaptations in hippocampal basal activity, GABAergic interneurons and adult neurogenesis. **Dis Model Mech**, v. 10, n. 3, p. 323-336, 2017.

LAVIOLETTE, S. R. and VAN DER KOOY, D. Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area. **Mol Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 50-9, 9, 2003.

LESSCHER, H. M.; HOOGVELD, E.; BURBACH, J. P.; VAN REE, J. M. and GERRITS, M. A. Endogenous cannabinoids are not involved in cocaine reinforcement and development of cocaine-induced behavioural sensitization. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 15, n. 1, p. 31-7, 2005.

LUO, A. H.; TAHSILI-FAHADAN, P.; WISE, R. A.; LUPICA, C. R. and ASTON-JONES, G. Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. **Science**, v. 333, n. 6040, p. 353-7, 2011.

MARINHO, E. A.; OLIVEIRA-LIMA, A. J.; SANTOS, R.; HOLLAIS, A. W.; BALDAIA, M. A.; WUO-SILVA, R.; YOKOYAMA, T. S.; TAKATSU-COLEMAN, A. L.; PATTI, C. L.; LONGO, B. M.; BERRO, L. F. and FRUSSA-FILHO, R. Effects of rimonabant on the development of single dose-induced behavioral sensitization to ethanol, morphine and cocaine in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 58, p. 22-31, 2015.

MARINHO, E. A. V.; OLIVEIRA-LIMA, A. J.; YOKOYAMA, T. S.; SANTOS-BALDAIA, R.; RIBEIRO, L. T. C.; BALDAIA, M. A.; DA SILVA, R. W.; HOLLAIS, A. W.; TALHATI, F.; LONGO, B. M.; BERRO, L. F. and FRUSSA-FILHO, R. Post-sensitization treatment with rimonabant blocks the expression of cocaine-induced behavioral sensitization and c-Fos protein in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 156, p. 16-23, 2017.

MARKEL, H. Uber coca: Sigmund Freud, Carl Koller, and cocaine. **JAMA**, v. 305, n. 13, p. 1360-1, 2011.

MARTIN-GARCIA, E.; BOURGOIN, L.; CATHALA, A.; KASANETZ, F.; MONDESIR, M.; GUTIERREZ-RODRIGUEZ, A.; REGUERO, L.; FIANCETTE, J. F.; GRANDES, P.; SPAMPINATO, U.; MALDONADO, R.; PIAZZA, P. V.; MARSICANO, G. and DEROUCHE-GAMONET, V. Differential Control of Cocaine Self-Administration by

GABAergic and Glutamatergic CB1 Cannabinoid Receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 9, p. 2192-205, 2016.

MARTIN, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; MALDONADO, R. and VALVERDE, O. Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 11, p. 4038-46, 2000.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C. and BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-4, 1990.

MATUSKEY, D.; GALLEZOT, J. D.; PITTMAN, B.; WILLIAMS, W.; WANYIRI, J.; GAISER, E.; LEE, D. E.; HANNESTAD, J.; LIM, K.; ZHENG, M. Q.; LIN, S. F.; LABAREE, D.; POTENZA, M. N.; CARSON, R. E.; MALISON, R. T. and DING, Y. S. Dopamine D(3) receptor alterations in cocaine-dependent humans imaged with [(1)(1)C](+)-PHNO. **Drug Alcohol Depend**, v. 139, p. 100-5, 2014.

MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N. E.; SCHATZ, A. R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B. R.; COMPTON, D. R. and ET AL. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 50, n. 1, p. 83-90, 1995.

MECHOULAM, R. and PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. **Annu Rev Psychol**, v. 64, p. 21-47, 2013.

MEREU, M.; TRONCI, V.; CHUN, L. E.; THOMAS, A. M.; GREEN, J. L.; KATZ, J. L. and TANDA, G. Cocaine-induced endocannabinoid release modulates behavioral and neurochemical sensitization in mice. **Addict Biol**, v. 20, n. 1, p. 91-103, 2015.

MEYERS, R. A.; ZAVALA, A. R. and NEISEWANDER, J. L. Dorsal, but not ventral, hippocampal lesions disrupt cocaine place conditioning. **Neuroreport**, v. 14, n. 16, p. 2127-31, 2003.

MEYERS, R. A.; ZAVALA, A. R.; SPEER, C. M. and NEISEWANDER, J. L. Dorsal hippocampus inhibition disrupts acquisition and expression, but not consolidation, of cocaine conditioned place preference. **Behav Neurosci**, v. 120, n. 2, p. 401-12, 2006.

MORALES, M. and MARGOLIS, E. B. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. **Nat Rev Neurosci**, v. 18, n. 2, p. 73-85, 2017.

MOREIRA, F. A. and CRIPPA, J. A. The psychiatric side-effects of rimonabant. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 31, n. 2, p. 145-53, 2009.

MORTIMER, W. G. **Peru. History of coca, "the divine plant" of the Incas**. New York, : J. H. Vail & company, 1901. xxxi, 576 p.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L. and ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-5, 1993.

NUNES, E. A. and HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 17, p. 528-543, 2014.

O'BRIEN, C. P.; VOLKOW, N. and LI, T. K. What's in a word? Addiction versus dependence in DSM-V. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 5, p. 764-5, 2006.

OHNO-SHOSAKU, T.; MAEJIMA, T. and KANO, M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. **Neuron**, v. 29, n. 3, p. 729-38, 2001.

ONAIWI, E. S.; ISHIGURO, H.; GONG, J. P.; PATEL, S.; PERCHUK, A.; MEOZZI, P. A.; MYERS, L.; MORA, Z.; TAGLIAFERRO, P.; GARDNER, E.; BRUSCO, A.; AKINSHOLA, B. E.; LIU, Q. R.; HOPE, B.; IWASAKI, S.; ARINAMI, T.; TEASENFITZ, L. and UHL, G. R. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1074, p. 514-36, 2006.

OTIS, J. M.; FITZGERALD, M. K. and MUELLER, D. Inhibition of hippocampal beta-adrenergic receptors impairs retrieval but not reconsolidation of cocaine-associated memory and prevents subsequent reinstatement. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 303-10, 2014.

PARSONS, L. H. and HURD, Y. L. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 10, p. 579-94, 2015.

PAXINOS, G. and FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2nd. San Diego: Academic Press, 2001. ISBN 012547637X (deluxe ed. alk. paper) 0125476361 (spiral bound alk. paper). Disponível em: <
<http://www.loc.gov/catdir/description/els031/00107124.html> >.

PAYER, D.; BALASUBRAMANIAM, G. and BOILEAU, I. What is the role of the D3 receptor in addiction? A mini review of PET studies with [(11)C]-(+)-PHNO. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 52, p. 4-8, 2014.

RAYBUCK, J. D. and LATTAL, K. M. Differential effects of dorsal hippocampal inactivation on expression of recent and remote drug and fear memory. **Neurosci Lett**, v. 569, p. 1-5, 2014.

REISENBERG, M.; SINGH, P. K.; WILLIAMS, G. and DOHERTY, P. The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1607, p. 3264-75, 2012.

RIVERA, M. A.; AUFDERHEIDE, A. C.; CARTMELL, L. W.; TORRES, C. M. and LANGSJOEN, O. Antiquity of coca-leaf chewing in the south central Andes: a 3,000 year archaeological record of coca-leaf chewing from northern Chile. **J Psychoactive Drugs**, v. 37, n. 4, p. 455-8, 2005.

ROBINSON, T. E. and BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 18, n. 3, p. 247-91, 1993.

SANCHIS-SEGURA, C. and SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addict Biol**, v. 11, n. 1, p. 2-38, 2006.

SEEMAN, P. Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. **Expert Opin Ther Targets**, v. 10, n. 4, p. 515-31, 2006.

SLOAN, M. E.; GOWIN, J. L.; RAMCHANDANI, V. A.; HURD, Y. L. and LE FOLL, B. The endocannabinoid system as a target for addiction treatment: Trials and tribulations. **Neuropharmacology**, 2017.

SORIA, G.; MENDIZABAL, V.; TOURINO, C.; ROBLEDO, P.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; MALDONADO, R. and VALVERDE, O. Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 9, p. 1670-80, 2005.

STEKETEE, J. D. and KALIVAS, P. W. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 2, p. 348-65, 2011.

UNITED NATIONS Office on Drugs and Crime. World Drug Report, 2016 (Disponível em: <http://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD_DRUG_REPORT_2016_web.pdf>. Acesso em: 22/Jun/2017

TOMASI, D.; WANG, G. J.; WANG, R.; CAPARELLI, E. C.; LOGAN, J. and VOLKOW, N. D. Overlapping patterns of brain activation to food and cocaine cues in cocaine abusers: association to striatal D2/D3 receptors. **Hum Brain Mapp**, v. 36, n. 1, p. 120-36, 2015.

TRIGO, J. M.; LAGZDINS, D.; REHM, J.; SELBY, P.; GAMALEDDIN, I.; FISCHER, B.; BARNES, A. J.; HUESTIS, M. A. and LE FOLL, B. Effects of fixed or self-titrated dosages of Sativex on cannabis withdrawal and cravings. **Drug Alcohol Depend**, v. 161, p. 298-306, 2016.

VALLONE, D.; PICETTI, R. and BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 1, p. 125-32, 2000.

VANDREY, R.; STITZER, M. L.; MINTZER, M. Z.; HUESTIS, M. A.; MURRAY, J. A. and LEE, D. The dose effects of short-term dronabinol (oral THC) maintenance in daily cannabis users. **Drug Alcohol Depend**, v. 128, n. 1-2, p. 64-70, 2013.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J.; HITZEMANN, R.; LOGAN, J.; SCHLYER, D. J.; DEWEY, S. L. and WOLF, A. P. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. **Synapse**, v. 14, n. 2, p. 169-77, 1993.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WOLF, A. P.; SCHLYER, D.; SHIUE, C. Y.; ALPERT, R.; DEWEY, S. L.; LOGAN, J.; BENDRIEM, B.; CHRISTMAN, D. and ET AL. Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. **Am J Psychiatry**, v. 147, n. 6, p. 719-24, 1990.

WANG, H.; TREADWAY, T.; COVEY, D. P.; CHEER, J. F. and LUPICA, C. R. Cocaine-Induced Endocannabinoid Mobilization in the Ventral Tegmental Area. **Cell Rep**, v. 12, n. 12, p. 1997-2008, 2015.

WHITE, N. M.; CHAI, S. C. and HAMDANI, S. Learning the morphine conditioned cue preference: cue configuration determines effects of lesions. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 4, p. 786-96, 2005.

WISE, R. A. and BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol Rev**, v. 94, n. 4, p. 469-92, 1987.

XI, Z. X.; PENG, X. Q.; LI, X.; SONG, R.; ZHANG, H. Y.; LIU, Q. R.; YANG, H. J.; BI, G. H.; LI, J. and GARDNER, E. L. Brain cannabinoid CB(2) receptors modulate cocaine's actions in mice. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 1160-6, 2011.

YU, L. L.; ZHOU, S. J.; WANG, X. Y.; LIU, J. F.; XUE, Y. X.; JIANG, W. and LU, L. Effects of cannabinoid CB(1) receptor antagonist rimonabant on acquisition and reinstatement of psychostimulant reward memory in mice. **Behav Brain Res**, v. 217, n. 1, p. 111-6, 2011.

ZANGEN, A.; SOLINAS, M.; IKEMOTO, S.; GOLDBERG, S. R. and WISE, R. A. Two brain sites for cannabinoid reward. **J Neurosci**, v. 26, n. 18, p. 4901-7, 2006.

ZHANG, H. Y.; BI, G. H.; LI, X.; LI, J.; QU, H.; ZHANG, S. J.; LI, C. Y.; ONAIVI, E. S.; GARDNER, E. L.; XI, Z. X. and LIU, Q. R. Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice and rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 4, p. 1037-51, 2015.

ZHANG, H. Y.; GAO, M.; LIU, Q. R.; BI, G. H.; LI, X.; YANG, H. J.; GARDNER, E. L.; WU, J. and XI, Z. X. Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 46, p. E5007-15, 2014.

ZHANG, H. Y.; GAO, M.; SHEN, H.; BI, G. H.; YANG, H. J.; LIU, Q. R.; WU, J.; GARDNER, E. L.; BONCI, A. and XI, Z. X. Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. **Addict Biol**, v. 22, n. 3, p. 752-765, 2017.

ZHAO, X.; YAO, L.; WANG, F.; ZHANG, H. and WU, L. Cannabinoid 1 receptor blockade in the dorsal hippocampus prevents the reinstatement but not acquisition of morphine-induced conditioned place preference in rats. **Neuroreport**, v. 28, n. 10, p. 565-570, 2017.