

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

Janete Higino Alves

**EFEITO DE DIFERENTES LIGANTES DO RECEPTOR CANABINOIDE CB₂
NA HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA POR COCAÍNA OU QUETAMINA**

Belo Horizonte

2025

Janete Higino Alves

**EFEITO DE DIFERENTES LIGANTES DO RECEPTOR CANABINOIDE CB₂
NA HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA POR COCAÍNA OU QUETAMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo
Moreira

Belo Horizonte

2025

043

Alves, Janete Higino.

Efeito de diferentes ligantes do receptor canabinoide CB2 na hiperlocomoção induzida por cocaína ou quetamina [manuscrito] / Janete Higino Alves. – 2025. 51 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira.

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

1. Fisiologia. 2. Endocanabinoides. 3. Transtornos Relacionados ao Uso de Substâncias. 4. Receptor CB2 de Canabinoide. I. Moreira, Fabrício de Araújo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 599 DE JANETE HIGINO ALVES

Às 14:00 horas do dia 05 do mês de fevereiro de 2025, na Sala Wilson Beraldo, A4 175 - ICB/UFMG, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Janete Higino Alves**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais e a **Profa. Dra. Maria Carolina Machado da Silva**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: **"EFEITO DE DIFERENTES LIGANTES DO RECEPTOR CANABINOIDE CB2 NA HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA POR COCAÍNA OU QUETAMINA"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 05 de fevereiro de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Igor Dimitri Gama Duarte**, Professor do Magistério Superior, em 13/03/2025, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Carolina Machado da Silva**, Usuário Externo, em 14/03/2025, às 06:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício de Araújo Moreira**, Professor do Magistério Superior, em 14/03/2025, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4039591** e o código CRC **F33F4854**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido, Carlos, por todo o suporte, confiança e por apoiar minhas escolhas. Agradeço ao orientador, Fabrício, pelo acolhimento. Agradeço às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG.

RESUMO

A ativação do receptor CB₂ inibe a liberação de dopamina, representando uma possível abordagem para o tratamento de transtornos por uso de substâncias. Diante disso, esse trabalho teve objetivo testar a hipótese de que fármaco que ativa ou modula o receptor canabinoide CB₂ inibe a hiperlocomoção induzida por cocaína ou quetamina. Foram testados camundongos machos e fêmeas C57BL/6J no modelo de hiperlocomoção induzida por cocaína (15 mg/kg) ou quetamina (30 mg/kg), tratados com JWH-133 (0,3; 1 ou 3 mg/kg) ou β -CF (25, 50 ou 100 mg/kg) ou EC21a (1, 3 ou 10 mg/kg) por via i.p. 30 minutos antes da administração de cocaína ou quetamina. Nenhum ligante do receptor CB₂ reverteu o efeito de hiperlocomoção induzido por cocaína ou quetamina em camundongos, sendo nosso trabalho o primeiro a testar os efeitos do JWH-133, β -CF ou EC21a na hiperlocomoção induzida por quetamina e o primeiro a testar o EC21a no protocolo de hiperlocomoção induzida por cocaína. Os resultados não necessariamente refutam a hipótese de que o receptor CB₂ possa ser um alvo terapêutico para o tratamento do transtorno por uso de substância. Mais estudos são necessários para investigar os efeitos dos diversos ligantes desse receptor em protocolos de tratamento crônico nas diferentes linhagens.

Palavras-chave: sistema endocanabinoide, transtorno por uso de substâncias, receptor CB₂.

ABSTRACT

Activation of the CB₂ receptor inhibits the release of dopamine, representing a possible approach to the treatment of substance use disorders. This study aimed to test the hypothesis that a drug that activates or modulates the CB₂ cannabinoid receptor inhibits hyperlocomotion induced by cocaine or ketamine. Male and female C57BL/6J mice were tested in the hyperlocomotion model induced by cocaine (15 mg/kg) or ketamine (30 mg/kg), treated with JWH-133 (0.3, 1 or 3 mg/kg) or β -CF (25, 50 or 100 mg/kg) or EC21a (1, 3 or 10 mg/kg) i.p. 30 minutes before cocaine or ketamine administration. No CB₂ receptor ligand reversed the hyperlocomotion effect induced by cocaine or ketamine in mice. Our study was the first to test the effects of JWH-133, β -CF or EC21a on ketamine-induced hyperlocomotion and the first to test EC21a in the cocaine-induced hyperlocomotion protocol. The results do not necessarily refute the hypothesis that the CB₂ receptor could be a therapeutic target for the treatment of substance use disorders. Further studies are needed to investigate the effects of different ligands of this receptor in chronic treatment protocols in different strains.

Keywords: endocannabinoid system, substance use disorder, CB₂ receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo simplificado da cocaína que resulta em aumento da atividade dopaminérgica no NAcc.....	14
Figura 2. Mecanismo simplificado da quetamina que resulta em liberação de dopamina no NAcc.....	17
Figura 3. Esquema representativo dos componentes do Sistema Endocanabinoide.....	20
Figura 4. Diferentes ligantes do receptor CB2.....	21
Figura 5. Esquema do protocolo experimental.....	26
Figura 6. Efeito do agonista total seletivo CB2, JWH-133, na hiperlocomoção induzida por cocaína.....	28
Figura 7. Efeito do agonista não seletivo CB2, β -CF, na hiperlocomoção induzida por cocaína.....	30
Figura 8. Efeito do MAP do CB2, EC21a, na hiperlocomoção induzida por cocaína.....	32
Figura 9. Efeito do agonista total seletivo CB2, JWH-133, na hiperlocomoção induzida por quetamina.....	34
Figura 10. Efeito do agonista não seletivo CB2, β -CF, na hiperlocomoção induzida por quetamina.....	36
Figura 11. Efeito do MAP do CB2, EC21a, na hiperlocomoção induzida por quetamina.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Controle de atividade locomotora em camundongos machos e fêmeas.....	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

AMPC – Adenosina Monofosfato Cíclica

ATV – Área Tegmental Ventral

CB₁ – Receptores Canabinoides do tipo 1

CB₂ – Receptores Canabinoides do tipo 2

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Coca – Cocaína

CPP – Preferência condicionada ao lugar

DAT – Transportador de Dopamina

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPM – Erro Padrão da Média

GABA – Ácido γ -aminobutírico

Gi/o – Proteína G Inibitória

GPR55 – Receptor acoplado à proteína G 55

i.p. – Intraperitoneal

JWH – JWH-133

MAP – Modulador Alostérico Positivo

NAcc – Núcleo Accumbens

NaCl – Cloreto de Sódio

NMDA – N-metil-D-aspartato

PI – Fosfatidilinositol

PPAR α/γ – Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos α e γ

Queta – Quetamina

SNC – Sistema Nervoso Central

TUS – Transtornos por Uso de Substâncias

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

Vei – Veículo

β -CF – β -cariofileno

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Transtornos por uso de substâncias.....	11
1.2	Cocaína.....	13
1.3	Quetamina	16
1.4	Sistema Endocanabinoide.....	19
2.	JUSTIFICATIVA	22
3.	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral.....	23
3.2	Objetivos específicos	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Animais	24
4.2	Drogas	24
4.3	Modelo comportamental.....	24
4.4	Delineamento experimental.....	25
4.4.1	Efeitos dos ligantes do receptor canabinoide CB ₂ na locomoção basal	25
4.4.2	Efeito do JWH-133 na hiperlocomoção induzida por cocaína	25
4.4.3	Efeito do β -cariofileno na hiperlocomoção induzida por cocaína.....	26
4.4.4	Efeito do EC21a na hiperlocomoção induzida por cocaína	26
4.4.5	Efeito do JWH-133 na hiperlocomoção induzida por quetamina	26
4.4.6	Efeito do β -cariofileno na hiperlocomoção induzida por quetamina.....	27
4.4.7	Efeito do EC21a na hiperlocomoção induzida por quetamina	27
4.5	Análise estatística	27
5.	RESULTADOS	28
5.1	Efeito dos ligantes do receptor canabinoide CB ₂ na locomoção basal de camundongos machos e fêmeas	28
5.2	Efeito do JWH-133 na hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos machos e fêmeas	29
5.3	Efeito do β -cariofileno na hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos machos e fêmeas	31
5.4	Efeito do EC21a na hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos machos e fêmeas	33
5.5	Efeito do JWH-133 na hiperlocomoção induzida por quetamina em camundongos machos e fêmeas	35
5.6	Efeito do β -cariofileno na hiperlocomoção induzida por quetamina em camundongos machos e fêmeas	37
5.7	Efeito do EC21a na hiperlocomoção induzida por quetamina em camundongos machos e fêmeas	39
6.	DISCUSSÃO.....	41
7.	CONCLUSÃO	45
8.	REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos por uso de substâncias

O uso de substâncias com potencial de adicção é considerado um problema social e de saúde pública, gerador de elevado custo médico e econômico (Buck *et al.*, 2021; Jensen, Jensen e Madsen, 2022). Em 2019, essa prática levou a óbito quase meio milhão de pessoas em todo mundo, e em 2022 aproximadamente 292 milhões de pessoas, com idade entre 15 e 64 anos, fizeram uso de drogas, refletindo um aumento de 20% em comparação com o ano de 2012. As projeções são de que para 2030 haverá um aumento de 11% no número de pessoas vivendo nessa condição, em todo o mundo (United Nations Office on Drugs and Crime, 2021; 2024).

A alta influência das drogas na mortalidade prematura se dá pelos seus efeitos diretos em um quadro de *overdose* e também pelos seus efeitos negativos em longo prazo na saúde do indivíduo (Volkow e Blanco, 2023). Seu uso pode levar ao desenvolvimento de transtornos por uso de substâncias (TUS), o que no ano de 2019 resultaram na perda de 18 milhões de anos de vida saudável (United Nations Office on Drugs and Crime, 2021). Esses transtornos são multifatoriais e considerados condições crônicas de saúde, que surgem a partir de alterações nos circuitos cerebrais, resultando em sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos (American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2022).

Dados atuais do United Nations Office on Drugs and Crime (Agência das Nações Unidas sobre Drogas e Crime) (2024) estimam que 64 milhões, ou seja, 1 em 81 pessoas no mundo, foram acometidas por TUS no ano de 2022. Estes números representam um aumento de 3% em relação a 2018. Os TUS se manifestam em um ciclo repetitivo envolvendo uso abusivo, abstinência e fissura. Esses três estágios são resultados da ruptura das redes neurais envolvidas na recompensa, motivação, função executiva e humor (Volkow e Blanco, 2023).

Os comportamentos relacionados aos TUS envolvem o sistema mesolímbico e o córtex pré-frontal. Modificações nestas áreas são responsáveis principalmente pela dificuldade em controlar ou cessar o uso da droga (Volkow e Boyle, 2018;

Gobira, Joca e Moreira, 2022; Asth *et al.*, 2023). De acordo com o *American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (2022) o diagnóstico dos TUS, em geral, é fundamentado pelo padrão de comportamentos pertinentes ao uso da droga e é organizado por grupos de critérios que abrangem o baixo controle, a deterioração social, o uso arriscado e os aspectos farmacológicos.

O primeiro grupo de critérios se refere ao baixo controle do uso da substância, no qual o indivíduo pode consumir maiores quantidades da droga ou utilizá-la por um tempo mais longo do que havia planejado. Embora possa haver a vontade de controlar ou cessar o uso da substância, o sujeito fracassa ao tentar. Muito tempo pode ser investido na obtenção e consumo da droga como também na recuperação de seus efeitos. A fissura que se apresenta pelo desejo intenso de usar a droga pode ocorrer principalmente quando exposto a estímulos a ela relacionados (American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2022).

O segundo grupo de critérios concerne ao prejuízo social. O indivíduo falha nas obrigações do trabalho, do estudo ou do ambiente familiar e, mesmo assim, pode continuar com o uso da substância. As atividades relacionadas ao social, ao profissional ou ao lazer são deixadas de lado enquanto o uso da substância é favoritado (American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2022).

O uso arriscado da substância é o terceiro grupo de critérios. O consumo da droga pelo indivíduo pode ocorrer em situações que colocam até mesmo sua integridade física em risco. A pessoa pode se frustrar em privar-se do uso da substância apesar de estar ciente do risco físico ou psicológico que ela o pode causar (American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2022).

O quarto e último dos critérios compreende os farmacológicos. O indivíduo pode apresentar tolerância, ou seja, precisará de uma dose maior da substância para alcançar o efeito desejado, que antes era obtido por uma dose menor. Além disso, quando a ação da droga cessa após o uso intenso, o indivíduo é

acometido pela síndrome de abstinência. Diante dos sintomas negativos na abstinência, o sujeito volta a consumir a substância para suavizá-los (American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2022).

Em geral, toda droga com potencial de adicção aumenta a concentração de dopamina no núcleo accumbens (NAcc), seja por ativar ou desinibir neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (ATV), seja por ativar mecanismos sinápticos que resulta em mais dopamina nos terminais desses neurônios no NAcc. Em outros termos, o mecanismo pelo qual cada classe de substância atua pode ser diferente (American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2022; Volkow e Blanco, 2023).

1.2 Cocaína

A cocaína é uma droga psicoestimulante extraída das folhas de plantas que pertencem à família *Erythroxylaceae*, das principais espécies *Erythroxylum coca* e *Erythroxylum novogranatense*. Há evidências de que essa planta seja conhecida desde 500 a.C. Além disso, estudos arqueológicos revelaram que há 3000 a.C os povos originários no Peru mascavam suas folhas. Estes fatos indicam o quão antigo é o acesso do homem às substâncias à base de cocaína (Muakad, 2012).

Por volta do ano de 1860, o principal alcaloide dessa planta foi isolado a partir de suas folhas pelo químico alemão Albert Niemann. Na época, a substância recebeu o nome de cocaína, cujas características de gosto amargo e capacidade de anestesiar a língua foram observadas (Ferigolo e Signor, 2007; Muakad, 2012).

A fórmula molecular da cocaína foi determinada por outro químico alemão W. Lossen em 1862. Dois anos depois, o austríaco Sigmund Freud publicou um artigo exaltando o uso da cocaína para tratar depressão e cólicas, além de seu emprego como anestésico local (Muakad, 2012). Em continuidade, no mesmo ano o médico oftalmologista austríaco Karl Köller realizou experiências com a cocaína na córnea, descobrindo que seu efeito anestésico permitia até mesmo a realização de cirurgia naquele local (Ferigolo e Signor, 2007; Muakad, 2012).

No entanto, em 1892 Sigmund Freud publicou uma atualização para se retratar do que havia informado na primeira publicação (Ferigolo e Signor, 2007).

Os achados de Karl Köller impulsionaram o emprego da cocaína como anestésico local na área da oftalmologia e também na odontologia. Além do seu uso como substância anestésica, era utilizada em preparo de remédios, cigarros, gomas de mascar, doces e bebidas, embora nem sempre fosse declarada nos rótulos. Devido seus efeitos deletérios, em 1914 a cocaína foi classificada como droga perigosa, e seu uso restringido à anestesia tópica. No entanto, devido seus efeitos colaterais, foi substituída por derivados sintéticos mais seguros como lidocaína e outros (Muakad, 2012).

Dados mais recentes revelam que a produção de cocaína em todo o mundo atingiu mais de 2.700 toneladas no ano de 2022, representando 20% a mais do que no ano anterior. Seu uso tem aumentado globalmente, sendo a quarta droga mais consumida no ano de 2021, com uma população de 23 milhões de usuários (United Nations Office on Drugs and Crime, 2024).

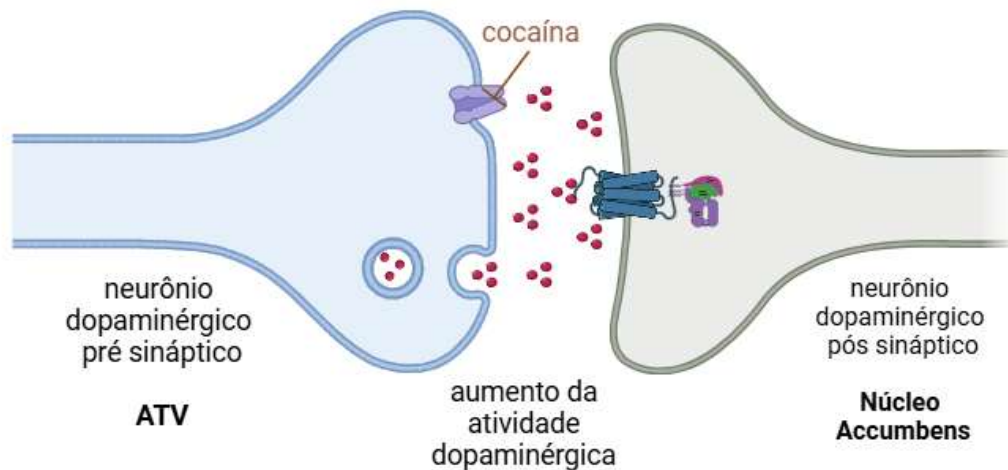
A cocaína pode ser encontrada sob diversas formas e, portanto, administrada por diferentes vias. Por via oral, a substância pode ser consumida através da mastigação das folhas ou chá. Na forma de pó, ou seja, o cloridrato de cocaína, pode ser dissolvido e injetado por via endovenosa ou subcutânea, embora a via mais comum de administração seja tópica intranasal, por meio da aspiração do pó. Além disso, gera o subproduto crack na forma de base livre transformada em pedra. O crack volatiliza quando aquecido podendo ser fumado ou inalado. Devido seu efeito rápido e de pouca duração, o crack causa adicção mais rápida quando comparado a outras formas da cocaína (Ferigolo e Signor, 2007; Muakad, 2012).

Uma vez absorvida, a cocaína alcança o cérebro e impede a recaptação de dopamina ao interagir com o transportador de dopamina (DAT) e bloqueá-lo (Figura 1). Este mecanismo resulta em maior concentração de dopamina nas sinapses em todas as regiões do cérebro que possuem DAT (Niedzielska-Andres *et al.*, 2021). O sistema dopaminérgico no Sistema Nervoso Central (SNC) possui quatro vias principais: mesocortical, mesolímbica, nigrostriatal e tuberoinfundibular. As vias mesocortical e mesolímbica partem da ATV e se

projetam para o córtex pré-frontal e Nacc, respectivamente, regulando a recompensa (Buck *et al.*, 2021). As drogas de abuso ao hiper ativarem o sistema dopaminérgico que regula a recompensa, causam prazer que excede aos naturais produzidos no ato alimentar ou sexual, por exemplo (Nestler, 2005; Baler e Volkow, 2006; Ferigolo e Signor, 2007).

A dopamina age em seus receptores acoplados à proteína G transmembrana, desempenhando diversas funções (Mishra, Singh e Shukla, 2018). Os receptores de dopamina são classificados como receptor tipo D1 e receptor tipo D2. O tipo D1 compreende D1 e D5, ambos acoplados à proteína G estimulatória/Gs que ativa a adenilato ciclase, levando à produção do segundo mensageiro AMPc, resultando em uma cascata de sinalização que culmina em transcrição celular. O tipo D2 inclui os receptores D2, D3 e D4 acoplados à proteína G inibitória (Gi/o), que quando ativados inibem a adenilato ciclase (Bhatia, Lenchner e Saadabadi, 2023).

O uso constante de cocaína parece aumentar o número de receptores D1 e reduzir o de receptores D2 (Ferigolo e Signor, 2007). Os receptores D1 desempenham função importante na regulação do sistema de recompensa, atividade locomotora, aprendizagem e memória; enquanto os receptores D2 exercem ação na locomoção, memória e aprendizagem (Mishra, Singh e Shukla, 2018; Bhatia, Lenchner e Saadabadi, 2023). Portanto, o desbalanço de receptores D1 e D2 pela exposição à cocaína favorece o desenvolvimento da adicção. Estudos com modelo animal sugerem que a redução do receptor D2 parece estar relacionada à atividade prejudicada do córtex pré-frontal e ao aumento da ingestão de cocaína (Caine *et al.*, 2002; Volkow e Blanco, 2023).



Created in BioRender.com 

Figura 1. Mecanismo simplificado da cocaína que resulta em aumento da disponibilidade de dopamina na fenda.

1.3 Quetamina

Diferentemente da cocaína, a quetamina é um fármaco que atua bloqueando os receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), induzindo uma anestesia dissociativa (Tan *et al.*, 2012). Sintetizada pela primeira vez pelo químico americano Calvin Stevens da Parke-Davis em 1962 teve seu primeiro uso como anestésico durante a guerra do Vietnã, em soldados americanos (Liu *et al.*, 2016; Savić *et al.*, 2024).

Sendo o glutamato o principal neurotransmissor excitatório do SNC, os efeitos produzidos pela quetamina são complexos (Niedzielska-Andres *et al.*, 2021). Nos cornos dorsais da medula espinhal, o bloqueio dos receptores NMDA interrompe a transmissão da dor, causando analgesia intensa. No cérebro, a quetamina dissocia o controle cortical e o controle do tálamo, interferindo na transmissão de estímulos perceptivos aos córtices sensoriais (Volkow e Blanco, 2023). Através desses mecanismos a quetamina exerce seus principais efeitos: anestésico dissociativo e analgésico (Savić *et al.*, 2024).

Utilizada há muito tempo como um fármaco anestésico em humanos e na medicina veterinária, a quetamina atualmente é aplicada principalmente na indução e na manutenção anestésica para procedimentos cirúrgicos em animais

(Liu *et al.*, 2016). Além dessas aplicações clínicas, tem sido estudada como fármaco potencial para tratamento da depressão e asma (Savić *et al.*, 2024).

Seu emprego na anestesia geral em humanos foi descontinuado devido aos efeitos adversos. Era comum que ao se recuperar da anestesia pacientes relatassem sintomas como alucinações, experiências “fora do corpo” e sensação de “fusão com o ambiente” (Savić *et al.*, 2024). Por provocar tais sintomas a quetamina se tornou uma droga recreativa e seu uso não médico tem aumentado em muitas partes do mundo, mesmo sendo uma substância controlada (Liu *et al.*, 2016).

Além de anestésico e analgésico, a quetamina é um psicoestimulante que produz efeitos recompensadores e reforçadores. Os primeiros relatos de abuso da quetamina datam do final da década de 1960. Seu uso recreativo tornou-se generalizado na América do Norte, Europa e Ásia durante as décadas de 1970 e 1980 (Savić *et al.*, 2024). Dados atuais revelam que o mercado ilegal de quetamina está ampliando para novas áreas geográficas (United Nations Office on Drugs and Crime, 2024).

Na América do Norte, Caribe, Oriente Médio, África Austral, Sudoeste Asiático e Europa ocorreu aumento nas apreensões de quetamina. Em 2022, no Leste e Sudeste Asiático essas apreensões aumentaram 70% em comparação com 2021, atingindo seu recorde (United Nations Office on Drugs and Crime, 2024). Aumento de quetamina residual foi identificado em águas de 12 das 15 cidades monitoradas nos anos de 2022 e 2023, em países ocidentais e Europa Central (United Nations Office on Drugs and Crime, 2024).

No Reino Unido e na Austrália, o monitoramento do uso não médico da quetamina revelou aumento nos últimos anos, principalmente entre os jovens (United Nations Office on Drugs and Crime, 2024). No Brasil, foi realizado um estudo com objetivo de identificar o abuso de novas substâncias psicoativas. Nesse foram analisadas amostras de fluido oral coletadas em festas ao longo dos anos 2018, 2019 e 2020. Foi identificado que dentre as 462 amostras coletadas, 39,2% foram positivas para pelo menos uma substância psicoativa, sendo a quetamina a mais prevalente representando 29,4% (Cunha *et al.*, 2021).

Geralmente a quetamina, no contexto do abuso, é administrada por injeção intravenosa ou intramuscular, inalação ou fumo (Liu *et al.*, 2016; Savić *et al.*, 2024). Uma vez absorvida e distribuída, a quetamina age bloqueando os receptores de glutamato NMDA. Esses receptores são do tipo ionotrópicos, ou seja, são canais catiônicos assim como os receptores do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e kainato, nos quais o glutamato também atua (Tomita, 2016). O bloqueio do receptor NMDA pela quetamina resulta na liberação excessiva de glutamato. Ligando-se a outros receptores pré e pós sinápticos, o glutamato induz a ocorrência de complexos mecanismos em diferentes circuitos neurais, que influenciam na liberação de dopamina no NAcc (Niedzielska-Andres *et al.*, 2021; Savić *et al.*, 2024).

No mesencéfalo, os neurônios dopaminérgicos que se projetam para o NAcc são regulados por projeções glutamatérgicas corticais através de uma via facilitatória e uma via inibitória. Os receptores NMDA e AMPA/kainato participam da via facilitadora enquanto os receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos controlam a via inibitória (Tan *et al.*, 2012). A quetamina bloqueia os receptores NMDA presentes em neurônios GABAérgicos dentro do núcleo reticular talâmico, inibindo a liberação do ácido γ -aminobutírico (GABA) (Figura 2). Esse mecanismo resulta na desinibição dos neurônios dopaminérgicos e no aumento da liberação de dopamina (Liu *et al.*, 2016). Já a liberação excessiva de glutamato ativa a via excitatória. Portanto, a ação da quetamina não só influencia o sistema glutamatérgico, como também o sistema GABAérgico e o sistema dopaminérgico (Tan *et al.*, 2012). Portanto, quando usada de forma abusiva a quetamina pode causar transtornos semelhantes aos TUS, não existindo até o presente momento tratamento eficaz para essa condição (Liu *et al.*, 2016; United Nations Office on Drugs and Crime, 2021; 2024; Savić *et al.*, 2024).

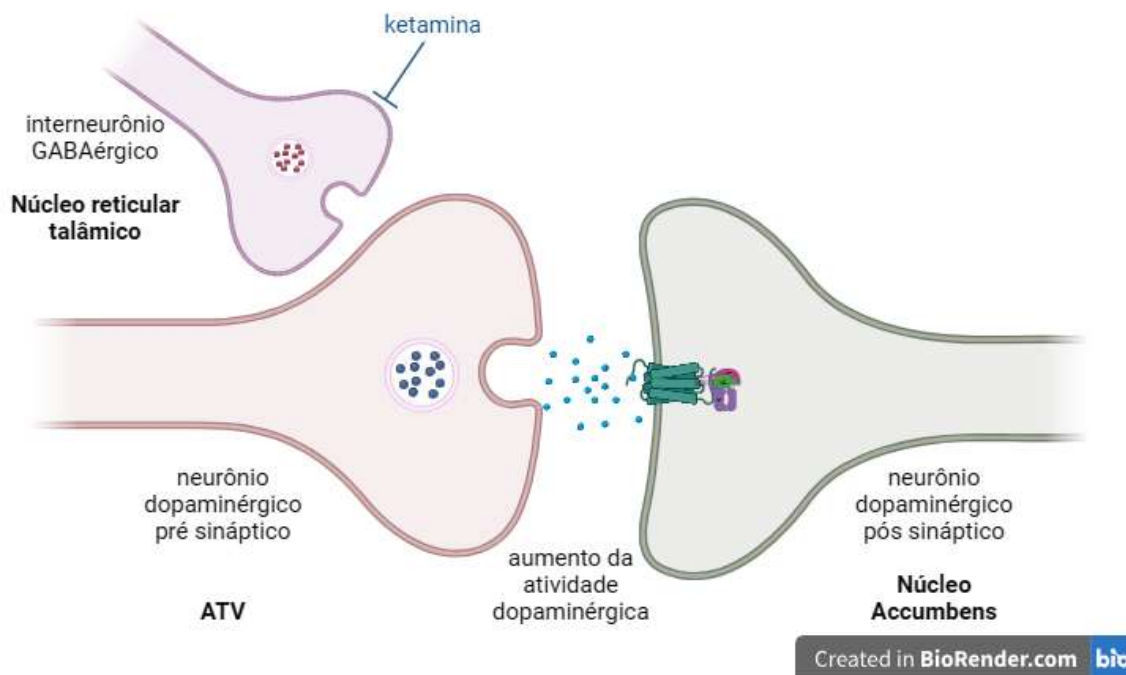


Figura 2. Mecanismo da ketamina simplificado que resulta em liberação de dopamina no NAcc. Adaptado de Liu, *et al.*, 2016.

1.4 Sistema Endocanabinoide

Apesar dos avanços no conhecimento sobre as alterações nos circuitos cerebrais relacionados ao abuso de drogas, não existe ainda tratamento eficaz para essa condição (Jensen, Jensen e Madsen, 2022). Dados atuais indicam que em 2022 apenas 1 em cada 11 pessoas com TUS recebeu tratamento. Nos países da América os tipos de tratamento mais comuns são os psicossociais e comportamentais (United Nations Office on Drugs and Crime, 2024). No entanto, diversos estudos têm sido realizados para melhor compreender a complexidade molecular acerca dos TUS, no intuito de desenvolver tratamento medicamentoso eficaz (Volkow e Boyle, 2018; Buck *et al.*, 2021; Aracil-Fernández *et al.*, 2012).

Nesta perspectiva, o Sistema Endocanabinoide tem se destacado na busca de tratamento dos TUS sendo este, promissor no campo da pesquisa (Aracil-Fernández *et al.*, 2012; Canseco-Alba *et al.*, 2019). O Sistema Endocanabinoide é composto pelos receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁) e do tipo 2 (CB₂), seus agonistas endógenos (endocanabinoides) e as suas enzimas de síntese e degradação (Figura 3) (Schurman *et al.*, 2020).

Os endocanabinoides mais bem estudados são a anandamida e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), sintetizados a partir de fosfolipídeos de membrana e liberados sob demanda, que agem retrogradamente (Spanagel, 2020; Schurman *et al.*, 2020). O influxo de cálcio secundário à despolarização neuronal é o fator que leva à síntese de anandamida que ocorre pela ação das enzimas N-aciltransferase e fosfolipase D. Já o 2-AG é sintetizado em resposta à ativação de receptores metabotrópicos, envolvendo a participação da fosfolipase C e da diacilglicerol lipase. Após liberação na fenda sináptica e ação nos receptores canabinoides, a anandamida sofre hidrólise pela hidrolase de amida de ácido graxo e o 2-AG é degradado pela monoacilglicerol lipase. A degradação de ambos ocorre no interior da célula (Brunt e Bossong, 2020; Schurman *et al.*, 2020).

Os receptores canabinoides mais bem estudados até o momento são o CB₁ e CB₂ acoplados a Gi/O. A ativação deles em neurônios pré-sinápticos resulta na inibição da liberação de neurotransmissores por mecanismos que envolvem: inibição da adenilato ciclase, redução da produção da adenosina monofosfato cíclica (AMPC), inibição da proteína quinase A, ativação dos canais retificadores internos de potássio e inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem (Svíženská, Dubový e Šulcová, 2008; Gobira, Joca e Moreira, 2022).

Portanto, o Sistema Endocanabinoide é um sistema neuromodulador da transmissão sináptica de neurotransmissores como dopamina, glutamato e GABA. Esse sistema exerce efeito em muitas funções fisiológicas, como no processamento de recompensa (Schurman *et al.*, 2020; Spanagel, 2020; Brunt e Bossong, 2020).

A função dos receptores CB₂ nas vias mesocorticolímbicas tem sido investigada, havendo evidências de que sua ativação modula a liberação de dopamina pelos neurônios dopaminérgicos da ATV. Esse achado indica que os receptores CB₂ exercem função importante no cérebro sendo, portanto, um alvo promissor para o tratamento de TUS (Jordan e Xi, 2019; Gobira, Joca e Moreira, 2022; Asth *et al.*, 2023).

Estudos com modelo animal têm investigado o papel do Sistema Endocanabinoide, principalmente dos receptores CB₂, quanto aos efeitos da cocaína, anfetamina, metanfetamina e nicotina (Aracil-Fernández *et al.*, 2012; Canseco-Alba *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2020). Nesse modelo, o protocolo de hiperlocomoção induzida por drogas tem sido explorado no intuito de investigar as respostas agudas de agonistas naturais e sintéticos dos receptores CB₂ (Delis *et al.*, 2017; Canseco-Alba *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020).

O potencial farmacológico de ligantes sintéticos dos receptores CB₂ para tratar os TUS também tem sido avaliado. Estudos realizados com o *agonista total seletivo* sintético do CB₂, JWH-133, identificaram que este ligante foi capaz de inibir os neurônios dopaminérgicos da ATV (Zhang *et al.*, 2017). Além disso, identificou-se que o JWH-133 diminuiu a aquisição e a expressão de preferência condicionada ao lugar (CPP) e preveniu também a aquisição e a expressão da sensibilização, ambas induzidas por cocaína em modelo animal (Delis *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2020).

O β-cariofileno (β-CF) é um ligante natural dos CB₂ presente na *Cannabis* e em outros vegetais. Utilizado como aditivo alimentar, aprovado pela *Food and Drug Administration* e considerado seguro, suas propriedades farmacológicas como *agonista não seletivo* do CB₂, têm sido exploradas sobre os efeitos das drogas de abuso como metanfetamina, cocaína, nicotina e álcool (He *et al.*, 2021; Asth *et al.*, 2023).

Um dos mais recentes ligantes é o EC21a, primeiro *modulador alostérico positivo* (MAP) do CB₂ (Ferrisi *et al.*, 2023). O EC21a foi empregado em estudos com modelo animal para dor neuropática e para epilepsia, tendo tido resultados positivos (Gado *et al.*, 2019; Shapiro *et al.*, 2021).

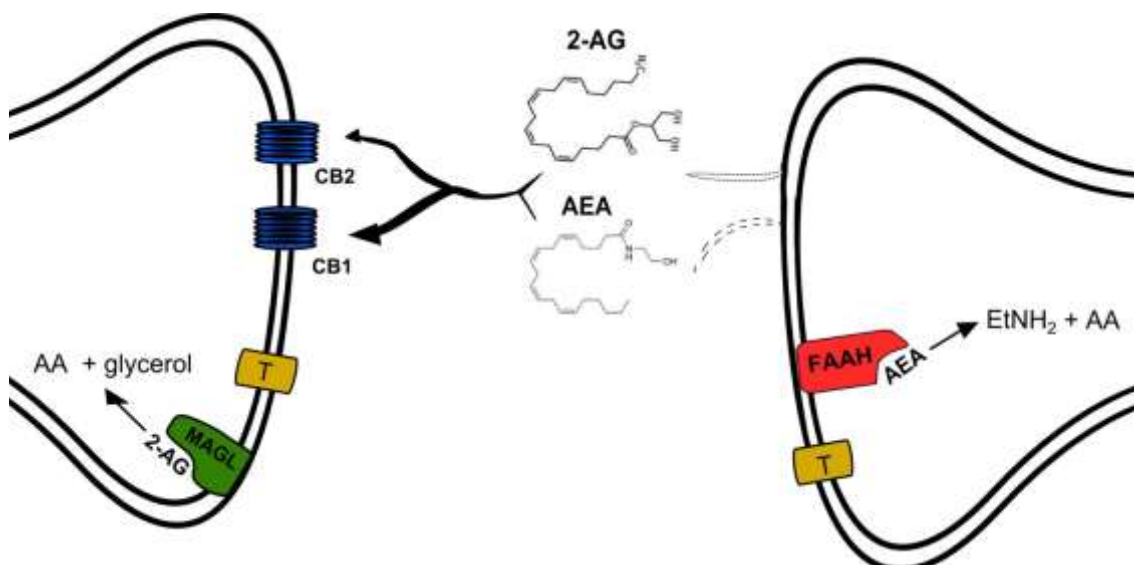


Figura 3. Esquema representativo dos componentes do Sistema Endocanabinoide. 2-AG: 2-araquidonoil glicerol, AEA: Anandamida, CB₁: Receptor canabinoide do tipo 1, CB₂: Receptor canabinoide do tipo 2, FAAH: Hidrolase de amida de ácidos graxos, MAGL: Monoacilglicerol lipase, T: Transportadores.

Fonte: Lopes, 2017.

2. JUSTIFICATIVA

Como destacado, o uso de drogas constitui-se um problema de saúde pública, que resulta em incapacidade laboral e comprometimento da saúde levando à morte de indivíduos. Considerando as projeções de significativo aumento no número de pessoas vivendo nesta condição, faz-se necessária a realização de pesquisas em busca de tratamentos capazes de reduzir a dependência às drogas, visando melhores prognósticos (United Nations Office on Drugs and Crime, 2024).

Já se sabe que o Sistema Endocanabinoide atua como modulador de vias envolvidas no processamento de recompensa, e que existem ligantes com diferentes mecanismos de ação dos receptores CB₂ (Figura 4). No entanto, existe a necessidade de mais estudos que avaliem as respostas de novos ligantes dos receptores CB₂ na dependência às diferentes drogas (Gobira, Joca e Moreira, 2022; Ferrisi *et al.*, 2023).

Considerando as distintas vias de ação da cocaína e quetamina, dopaminérgica e glutamatérgica, respectivamente, a questão que orientou o presente estudo é: *o β -CF, o JWH-133 e o EC21a se diferenciam na resposta sobre a hiperlocomção induzida pela cocaína e quetamina?*

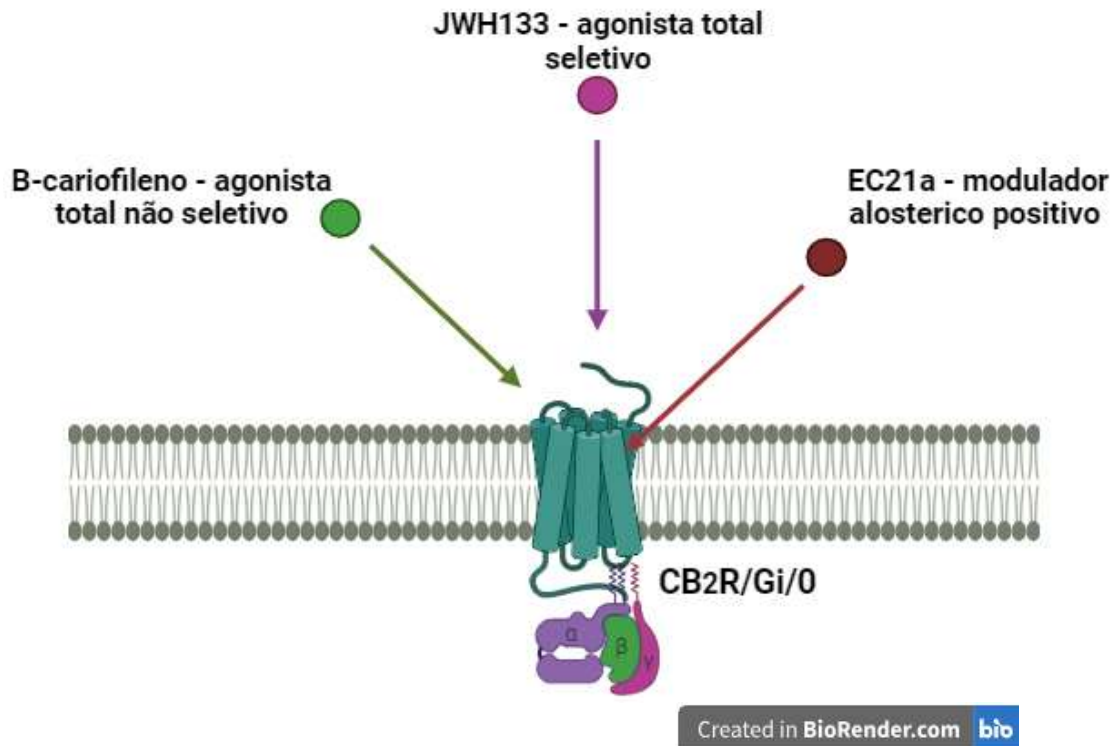


Figura 4. Diferentes ligantes do receptor CB₂.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Testar a hipótese de que fármacos que ativam ou modulam os receptores canabinoides CB₂ inibem a hiperlocomoção induzida por cocaína ou quetamina.

3.2 Objetivos específicos

- Testar a hipótese de que o agonista total seletivo do receptor canabinoide CB₂, JWH-133, inibe a hiperlocomoção induzida por cocaína.
- Testar a hipótese de que o agonista não seletivo do receptor canabinoide CB₂, β-cariofileno, inibe a hiperlocomoção induzida por cocaína.
- Testar a hipótese de que o modulador alostérico positivo do receptor canabinoide CB₂, EC21a, inibe a hiperlocomoção induzida por cocaína.
- Testar a hipótese de que o agonista total seletivo do receptor canabinoide CB₂, JWH-133, inibe a hiperlocomoção induzida por quetamina.

- e) Testar a hipótese de que o agonista não seletivo do receptor canabinoide CB₂, β -cariofileno, inibe a hiperlocomoção induzida por quetamina.
- f) Testar a hipótese de que o modulador alostérico positivo do receptor canabinoide CB₂, EC21a, inibe a hiperlocomoção induzida por quetamina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J, machos (n = 6/grupo) e fêmeas (n = 6/grupo), pesando cerca de 25 gramas, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas e mantidos em temperatura ambiente controlada de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12h (7h00-19h00) e livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número 139/2023.

4.2 Drogas

A hiperlocomoção foi induzida por cocaína (©Merck & Co., Inc.) (15 mg/kg) ou por quetamina (©Syntec) (30 mg/kg). Tanto a cocaína quanto a quetamina foram diluídas em solução de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl 0,9%). As drogas testadas que interagem com receptor CB₂ foram o agonista pleno seletivo, JWH-133 (©Cayman Chemical), nas doses de 0,3; 1 e 3 mg/kg; o agonista não seletivo, β -cariofileno (Sigma-Aldrich®), nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg; e o modulador alostérico positivo, EC21a (©Tocris Bioscience), nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg. O JWH-133 foi solubilizado em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução de NaCl 0,9%, o β -cariofileno foi diluído em óleo de oliva e o EC21a foi solubilizado em 5% de DMSO, 5% de Tween 20 e solução de NaCl 0,9%. Todas as drogas citadas foram administradas no volume de 10 mL/kg por via intraperitoneal (i.p.).

4.3 Modelo comportamental

O protocolo experimental adotado nesse estudo foi o campo aberto, que consiste em uma arena circular com parede de acrílico (30 cm de diâmetro e 50 cm de

altura) aberta na extremidade superior e inferior. Sendo a base inferior encaixada em uma base de acrílico branca. A distância percorrida é o parâmetro mais frequentemente estudado neste protocolo que permite uma avaliação fácil do comportamento motor (Seibenhener e Wooten, 2015). Antes de iniciar o experimento, os animais passaram por habituação na sala de experimentação por cerca de uma hora.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Efeitos dos ligantes do receptor canabinoide CB₂ na locomoção basal

Para o controle de efeito sobre a locomoção basal, diferentes grupos receberam 10 mL/kg de doses crescentes de JWH-133 (0,3; 1 e 3 mg/kg), β -CF (25, 50 e 100 mg/kg), EC21a (1, 3 e 10 mg/kg) ou veículo e tiveram sua atividade locomotora avaliada na arena. Após 20 minutos os animais foram habituados na arena por 10 minutos. Após o período de habituação, foram administrados 10 mL/kg de solução salina e imediatamente após a injeção, os animais foram alocados novamente na arena por 20 minutos. Os camundongos foram filmados durante os 30 minutos com uma câmera LG720p acoplada ao software de análise comportamental Any-Maze®.

4.4.2 Efeito do JWH-133 na hiperlocomoção induzida por cocaína

Para avaliar o efeito do agonista total seletivo do receptor CB₂, JWH-133, na hiperlocomoção induzida por cocaína, diferentes grupos receberam 10 mL/kg de doses crescentes de JHW-133 (0,3; 1 ou 3 mg/kg) ou veículo. Após 20 minutos os animais foram habituados na arena por 10 minutos.

Após o período de habituação, foram administrados 10 mL/kg de cocaína na dose de 15 mg/kg ou solução salina e imediatamente após a injeção, os animais foram alocados novamente na arena por 20 minutos. Os camundongos foram filmados durante os 30 minutos com uma câmera LG720p acoplada ao software de análise comportamental Any-Maze® (Figura 5).

4.4.3 Efeito do β -cariofileno na hiperlocomoção induzida por cocaína

Para testar o efeito do agonista não seletivo do receptor CB₂, β -CF, na hiperlocomoção induzida por cocaína, diferentes grupos receberam 10 mL/kg de doses crescentes de β -CF (25; 50 ou 100 mg/kg) ou veículo. Após 20 minutos os animais foram colocados na arena para habituação de 10 minutos.

Após o período de habituação, foram administrados 10 mL/kg de cocaína na dose de 15 mg/kg ou solução salina e imediatamente após a injeção, os animais foram alocados novamente na arena por 20 minutos. Os camundongos foram filmados durante os 30 minutos com uma câmera LG720p acoplada ao software de análise comportamental Any-Maze® (Figura 5).

4.4.4 Efeito do EC21a na hiperlocomoção induzida por cocaína

Para avaliar o efeito do MAP do receptor CB₂, EC21a, na hiperlocomoção induzida por cocaína, foram injetados, em diferentes grupos, 10 mL/kg de doses crescentes de EC21a (1, 3 ou 10 mg/kg) ou veículo. Após 20 minutos os animais foram habituados na arena durante 10 minutos.

Após o tempo de habituação, foi administrado nos animais 10 mL/kg de cocaína na dose de 15 mg/kg ou solução salina. Após a injeção, os animais foram colocados novamente na arena por 20 minutos. Os camundongos foram filmados durante os 30 minutos com uma câmera LG720p acoplada ao software de análise comportamental Any-Maze® (Figura 5).

4.4.5 Efeito do JWH-133 na hiperlocomoção induzida por quetamina

Para avaliar o efeito do agonista total seletivo do receptor CB₂, JWH-133, na hiperlocomoção induzida por quetamina, diferentes grupos receberam 10 mL/kg de doses crescentes de JHW-133 (0,3; 1 ou 3 mg/kg) ou veículo. Após 20 minutos os animais foram colocados na arena para se habitarem por 10 minutos.

Após o período de habituação, foram administrados 10 mL/kg de quetamina na dose de 30 mg/kg ou solução salina e, imediatamente após a injeção, os animais foram colocados novamente na arena por 20 minutos. Os camundongos foram

filmados durante os 30 minutos com uma câmera LG720p acoplada ao software de análise comportamental Any-Maze® (Figura 5).

4.4.6 Efeito do β -cariofileno na hiperlocomoção induzida por quetamina

Para testar o efeito do agonista não seletivo do receptor CB₂, β -CF, na hiperlocomoção induzida por quetamina, diferentes grupos receberam 10 mL/kg de doses crescentes de β -CF (25; 50 ou 100 mg/kg) ou veículo. Após 20 minutos os animais foram colocados na arena para habituação de 10 minutos.

Após o período de habituação, foram administrados 10 mL/kg de quetamina na dose de 30 mg/kg ou solução salina e imediatamente após a injeção, os animais foram alocados novamente na arena por 20 minutos. Os camundongos foram filmados durante os 30 minutos com uma câmera LG720p acoplada ao software de análise comportamental Any-Maze® (Figura 5).

4.4.7 Efeito do EC21a na hiperlocomoção induzida por quetamina

Para avaliar o efeito do MAP do receptor CB₂, EC21a, na hiperlocomoção induzida por quetamina, diferentes grupos receberam 10 mL/kg de doses crescentes de EC21a (1, 3 ou 10 mg/kg) ou veículo. Após 20 minutos os animais foram colocados na arena para habituação de 10 minutos.

Após o período de habituação, foram administrados 10 mL/kg de quetamina na dose de 30 mg/kg ou solução salina e imediatamente após a injeção, os animais foram colocados novamente na arena por 20 minutos. Os camundongos foram filmados durante os 30 minutos com uma câmera LG720p acoplada ao software de análise comportamental Any-Maze® (Figura 5).

4.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas e elaborações gráficas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8. A variável dependente quantificada foi a distância percorrida. Os dados foram analisados por ANOVA unidirecional e bidirecional, seguido de teste post-hoc de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Os dados estão apresentados em gráficos com os valores individuais sobrepostos às médias e erro padrão da média (EPM).

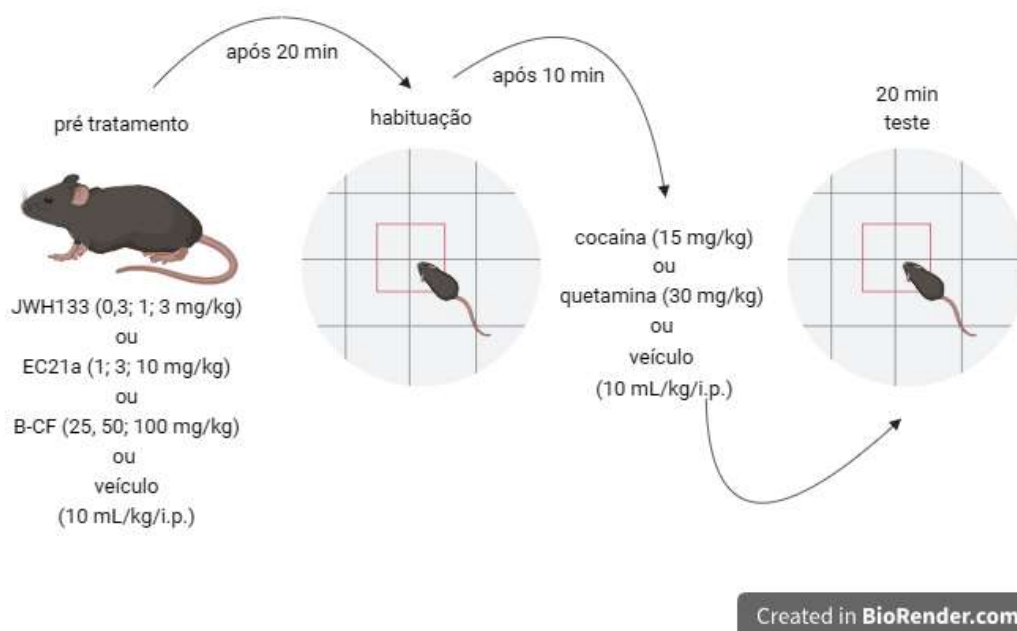


Figura 5. Esquema do protocolo experimental.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito dos ligantes do receptor canabinoide CB₂ na locomoção basal de camundongos machos e fêmeas

As administrações de JWH-133 e β -CF (agonistas do receptor CB₂) e EC21a (MAP do receptor CB₂) não modificaram a locomoção basal de camundongos machos (JWH-133 F (3, 20) = 1,283; p = 0,3075; β -CF F (3, 20) = 0,3936; p = 0,7590; EC21a F (3, 20) = 1,725; p = 0,1941) e fêmeas (JWH-133 F (3, 20) = 1,008; p = 0,4100; β -CF F (3, 20) = 1,344; p = 0,2883; EC21a F (3, 20) = 2,021; p = 0,1433). 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 Tukey) (Tabela 1).

Tabela 1. Distância percorrida por camundongos machos e fêmeas

Tratamento	Dose (mg/kg)	Distância Percorrida (m)	
		Machos	Fêmeas
Veículo	-	14,35 ± 1,188	19,49 ± 1,781
JWH-133	0,3	14,74 ± 1,596	23,64 ± 2,621
	1	12,97 ± 1,296	18,69 ± 2,123
	3	16,98 ± 1,736	19,82 ± 2,185
Veículo	-	28,19 ± 3,603	17,48 ± 3,076
β-CF	25	28,19 ± 2,182	24,81 ± 2,544
	50	31,08 ± 2,564	21,87 ± 2,031
	100	32,01 ± 3,919	21,73 ± 2,65
Veículo	-	20,56 ± 2,202	20,1 ± 2,413
EC21a	1	23,35 ± 0,6532	23,32 ± 1,264
	3	22,36 ± 3,007	16,01 ± 2,028
	10	17,40 ± 1,245	19,96 ± 2,486

5.2 Efeito do JWH-133 na hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos machos e fêmeas

O agonista total seletivo do receptor CB₂, JWH-133, foi testado tanto em camundongos machos quanto em fêmeas (n = 6/grupo). Os animais receberam 0,3; 1 ou 3 mg/kg de JWH-133 por via i.p. 30 minutos antes de receber 15 mg/kg de cocaína. JWH-133 não apresentou efeito significativo em reduzir a hiperlocomoção causada pela cocaína em camundongos machos (fig. 6A e 6C) e fêmeas (fig. 6B e 6D).

A figura 6A representa a distância total dos 20 minutos de teste de camundongos machos sob efeito do JWH-133 e cocaína na arena [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 8,299; p = 0,0002)]. Teste post-hoc de Tukey: *p = 0,0173 para os grupos vei + vei *versus* vei + coca; **p = 0,0023 para os grupos vei + vei *versus* JWH0,3 + coca; ^{ns}p = 0,4662 para os grupos vei + vei *versus* JWH1 + coca; *** = 0,0003 para os grupos vei + vei *versus* JWH3 + coca.

A figura 6B representa a distância total de camundongos fêmeas [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 14,94; p < 0,0001)]. Teste post-hoc de Tukey: ***p = 0,0002 para o grupo vei + vei *versus* vei + coca; ***p = 0,0002 para o grupo vei

+ vei *versus* JWH0,3 + coca; **** $p < 0,0001$ para o grupo vei + vei *versus* JWH1 + coca; **** $p < 0,0001$ para o grupo vei + vei *versus* JWH3 + coca.

A figura 6C representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos machos [ANOVA bidirecional (droga: $F(4,25) = 7,849$; $p = 0,0003$; tempo: $F(3,109, 77,71) = 12,62$; $p < 0,0001$; interação: $F(116,725) = 4,358$; $p < 0,0001$]. A figura 6D representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos fêmeas [ANOVA bidirecional (droga: $F(4,25) = 13,31$; $p < 0,0001$; tempo: $F(3,573, 89,31) = 47,13$; $p < 0,0001$; interação: $F(116,725) = 5,907$; $p < 0,0001$].

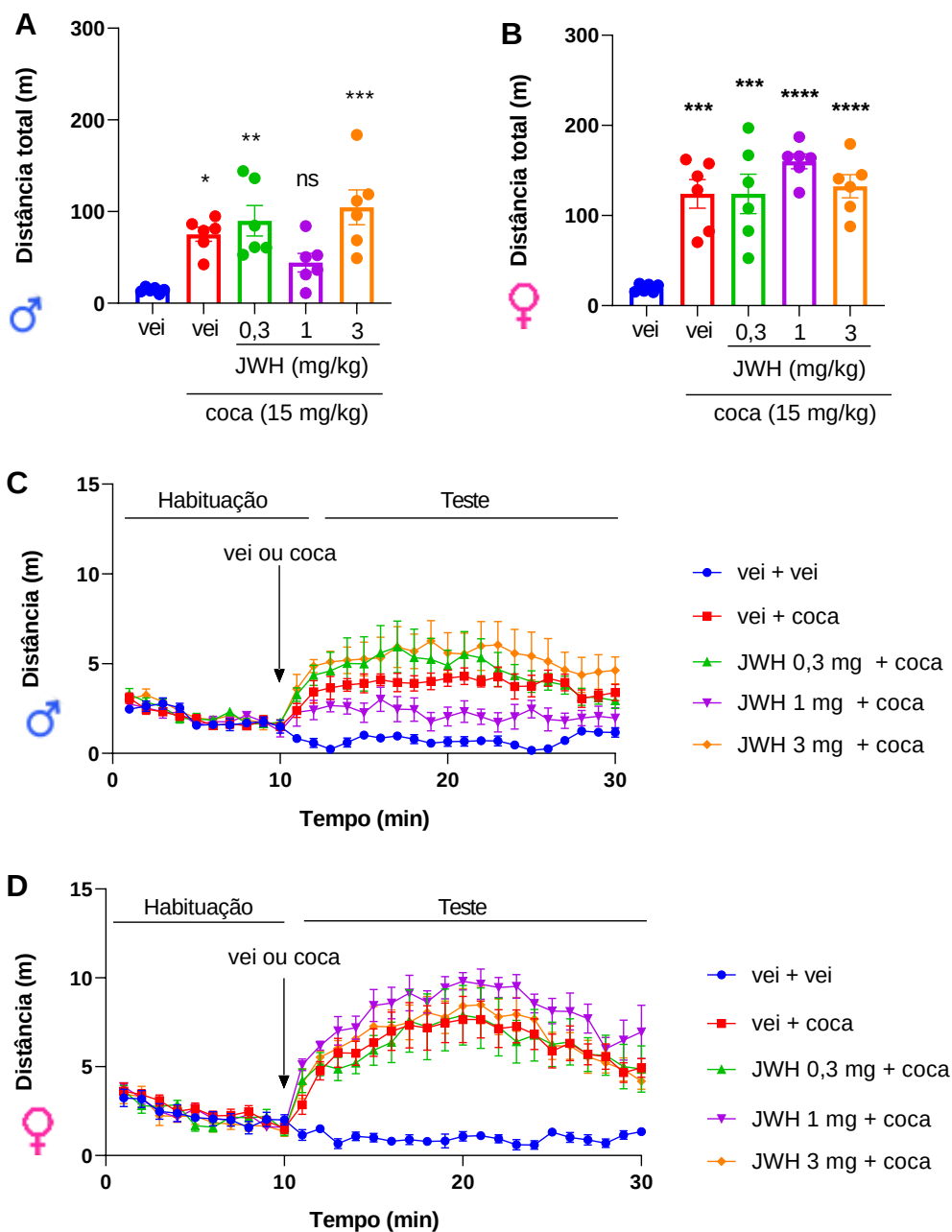


Figura 6. Efeito do agonista total seletivo CB₂, JWH-133, na hiperlocomoção induzida por cocaína. JWH-133 não alterou a hiperlocomoção de camundongos machos (A e C) e fêmeas (B e D) em campo aberto. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 6/grupo). Não há diferença estatística significativa entre os grupos tratados com JWH-133 e o grupo tratado com cocaína (ANOVA unidirecional e teste post-hoc de Tukey). Vei = veículo, JWH = JWH-133, coca = cocaína.

5.3 Efeito do β -cariofileno na hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos machos e fêmeas

O β -CF, agonista não seletivo do receptor CB₂, foi testado em camundongos machos e fêmeas (n = 6/grupo) nas doses de 25; 50 ou 100 mg/kg via i.p. 30 minutos antes de receber 15 mg/kg de cocaína. O β -CF não reverteu a hiperlocomoção induzida pela cocaína em machos (fig. 7A e 7C) e fêmeas (fig. 7B e 7D).

A distância total (20 minutos de teste na arena) de camundongos machos sob efeito do β -CF e cocaína está demonstrada na figura 7A [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 5,989; p = 0,0016)]. Teste post-hoc de Tukey: *p = 0,0299 para o grupo vei + vei *versus* vei + coca; &p = 0,0259 para o grupo vei + vei *versus* β -CF25 + coca; #p = 0,0130 para o grupo vei + vei *versus* β -CF50 + coca; ***p = 0,0008 para o grupo vei + vei *versus* β -CF100 + coca.

A distância total de camundongos fêmeas está representada na figura 7B [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 22,28; p < 0,0001)]. Teste post-hoc de Tukey: ****p < 0,0001 para o grupo vei + vei *versus* vei + coca; ***p = 0,0005 para o grupo vei + vei *versus* β -CF25 + coca; ****p < 0,0001 para o grupo vei + vei *versus* β -CF50 + coca; ****p < 0,0001 para o grupo vei + vei *versus* β -CF100 + coca.

A figura 7C representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos machos [ANOVA bidirecional (droga: F (4,25) = 6,064; p = 0,0015; tempo: F (1,728, 43,21) = 23,15; p < 0,0001; interação: F (116,725) = 3,816; p < 0,0001]. A figura 7D representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos fêmeas [ANOVA bidirecional (droga: F (4,25) = 18,53; p < 0,0001; tempo: F (4,252, 106,3) = 50,95; p < 0,0001; interação: F (116,725) = 7,508; p < 0,0001].

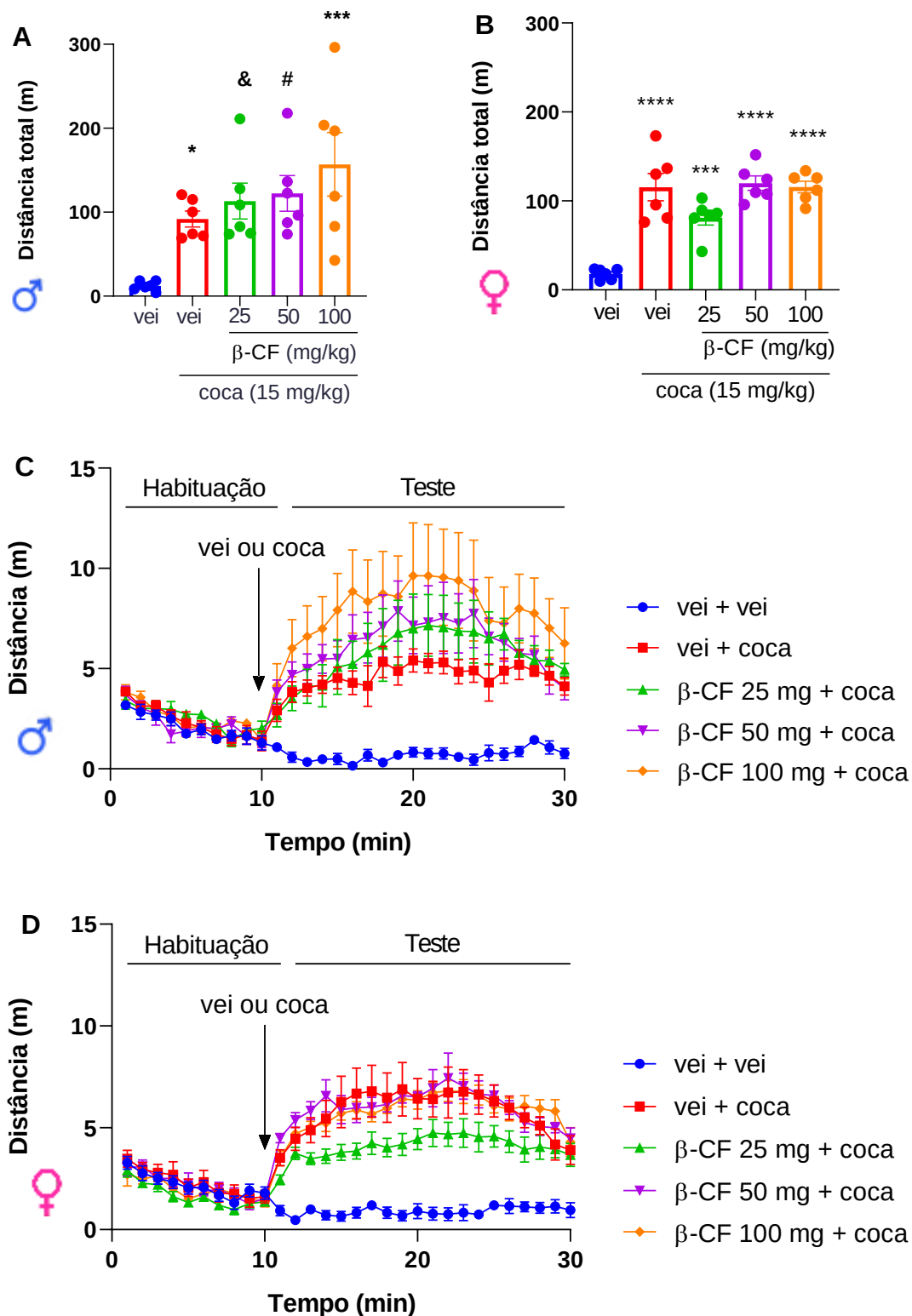


Figura 7. Efeito do agonista não seletivo CB₂, β -CF, na hiperlocomoção induzida por cocaína. β -CF não alterou a hiperlocomoção de camundongos machos (A e C) e fêmeas (B e D) em campo aberto. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 6/grupo). Não há diferença estatística significativa entre os grupos tratados com β -CF e o grupo tratado com cocaína (ANOVA unidirecional e teste post-hoc de Tukey). Vei = veículo, β -CF = β -cariofileno, coca = cocaína.

5.4 Efeito do EC21a na hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos machos e fêmeas

O EC21a, MAP do receptor CB₂, foi testado tanto em camundongos machos e fêmeas (n = 6/grupo) nas doses de 1; 3 ou 10 mg/kg via i.p. 30 minutos antes de serem tratados com 15 mg/kg de cocaína. O EC21a não reverteu a hiperlocomoção induzida pela cocaína em machos (fig. 8A e 8C) e fêmeas (fig. 8B e 8D).

A distância total (20 minutos de teste na arena) de camundongos machos sob efeito do EC21a e cocaína está demonstrada na figura 8A [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 5,217; p = 0,0034)]. Teste post-hoc de Tukey: **p = 0,0097 para o grupo *vei + vei versus vei + coca*; #p = 0,0079 para o grupo *vei + vei versus EC21a1 + coca*; ^{ns}p = 0,0579 para o grupo *vei + vei versus EC21a3 + coca*; &p = 0,0068 para o grupo *vei + vei versus EC21a10 + coca*.

A distância total de camundongos fêmeas está representada na figura 8B [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 9,551; p < 0,0001)]. Teste post-hoc de Tukey: **p = 0,0029 para o grupo *vei + vei versus vei + coca*; #p = 0,0013 para o grupo *vei + vei versus EC21a1 + coca*; ****p = <0,0001 para o grupo *vei + vei versus EC21a3 + coca*; *p = 0,0329 para o grupo *vei + vei versus EC21a10 + coca*.

A figura 8C representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos machos [ANOVA bidirecional (droga: F (4,25) = 4,420; p = 0,0077; tempo: F (2,412, 60,30) = 22,55; < 0,0001; interação: F (116,725) = 3,966; p < 0,0001)]. A figura 8D representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos fêmeas [ANOVA bidirecional (droga: F (4,25) = 8,247; p = 0,0002; tempo: F (3,560, 88,99) = 35,80; p < 0,0001; interação: F (4,25) = 8,247; p = 0,0002)].

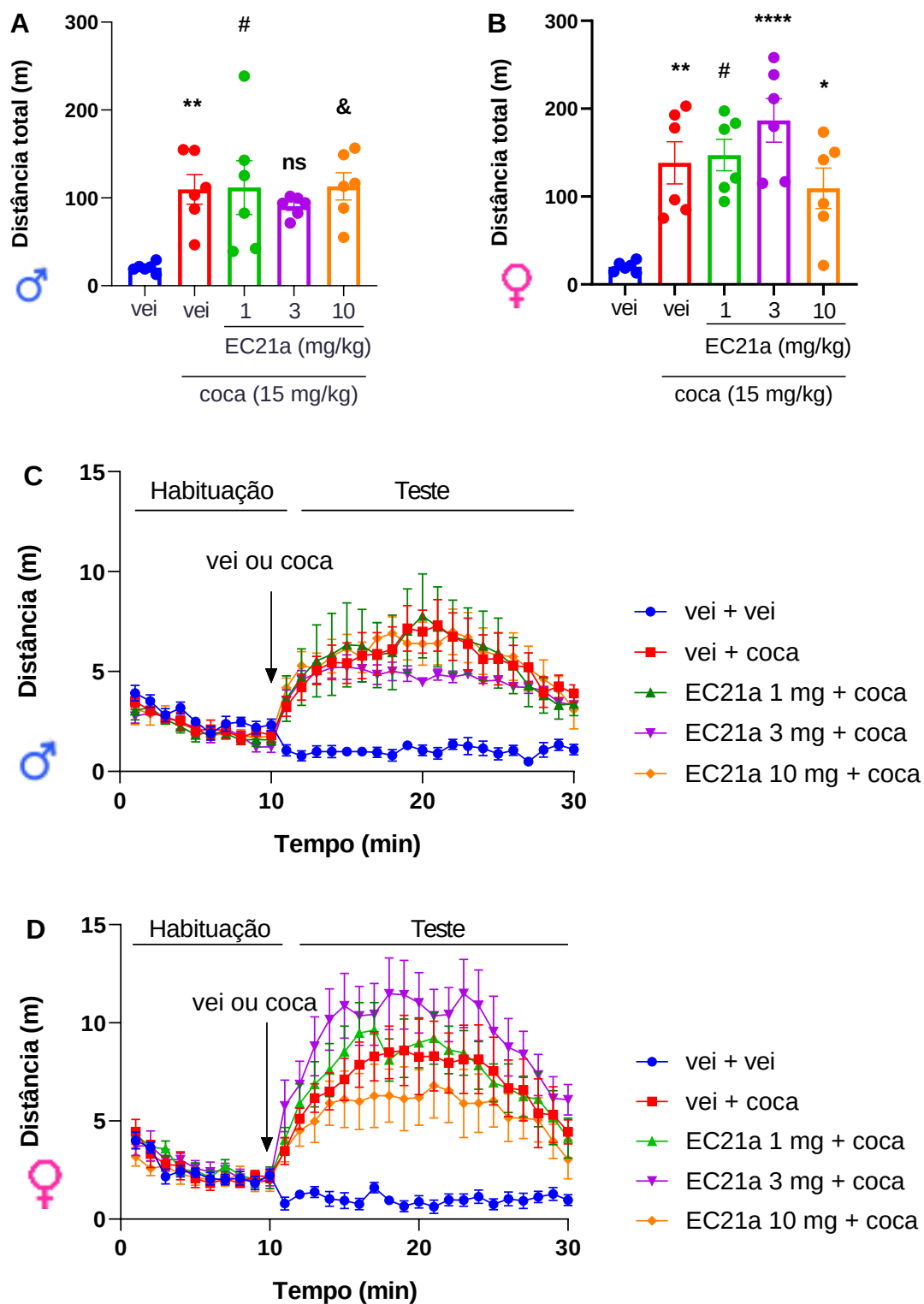


Figura 8. Efeito do MAP do CB₂, EC21a, na hiperlocomção induzida por cocaína. EC21a não alterou a hiperlocomção de camundongos machos (A e C) e fêmeas (B e D) em campo aberto. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 6/grupo). Não há diferença estatística significativa entre os grupos tratados com EC21a e o grupo tratado com cocaína (ANOVA unidirecional e teste post-hoc de Tukey). Vei = veículo, coca = cocaína.

5.5 Efeito do JWH-133 na hiperlocomoção induzida por quetamina em camundongos machos e fêmeas

Para avaliar o efeito do agonismo do receptor CB₂ na hiperlocomoção induzida pela quetamina, camundongos machos e fêmeas (n = 6/grupo) receberam JWH-133 nas doses de 0,3; 1 ou 3 mg/kg por via i.p. Os animais foram tratados com 30 mg/kg de quetamina 30 minutos após a injeção de JWH-133. O JWH-133 não reduziu a hiperlocomoção induzida pela quetamina em camundongos machos (fig. 9A e 9C) e fêmeas (fig. 9B e 9D).

A figura 9A representa a distância total dos 20 minutos de teste na arena de camundongos machos sob efeito do JWH-133 e quetamina [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 17,78; p < 0,0001)]. Teste post-hoc de Tukey: ****p < 0,0001 para o grupo vei + vei *versus* vei + queta; ****p < 0,0001 para o grupo vei + vei *versus* JWH0,3 + queta; ****p < 0,0001 para o grupo vei + vei *versus* JWH1+ queta; ****p < 0,0001 para o grupo vei + vei *versus* JWH3 + queta.

A figura 9B representa a distância total de camundongos fêmeas [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 8,693; p = 0,0002)]. Teste post-hoc de Tukey: **p = 0,0070 para o grupo vei + vei *versus* vei + queta; *p = 0,0446 para o grupo vei + vei *versus* JWH0,3 + queta; ****p = < 0,0001 para o grupo vei + vei *versus* JWH1+ queta; #p = 0,0118 para o grupo vei + vei *versus* JWH3 + queta.

A figura 9C representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos machos [ANOVA bidirecional (droga: F (4, 25) = 17,54; p < 0,0001; tempo: F (5,395, 134,9) = 17,70; p < 0,0001; interação: F (116, 725) = 4,072; p < 0,0001)]. A figura 9D representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos fêmeas [ANOVA bidirecional (droga: F (4, 25) = 5,599; p = 0,0023; tempo: F (5,539, 138,5) = 6,749; p < 0,0001; interação: F (116, 725) = 3,085; p < 0,0001)].

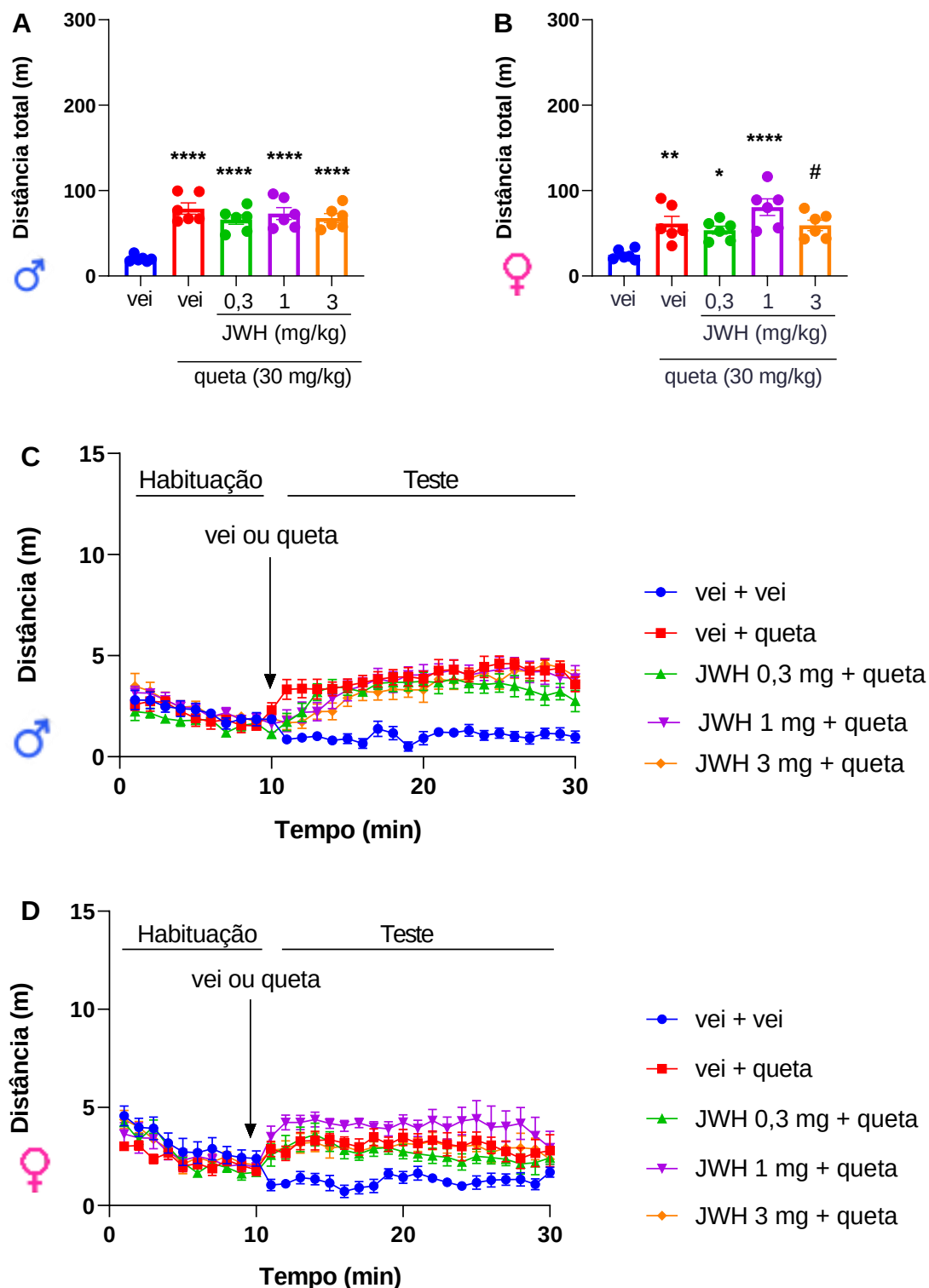


Figura 9. Efeito do agonista total seletivo CB₂, JWH-133, na hiperlocomção induzida por quetamina. JWH-133 não alterou a hiperlocomção de camundongos machos (A e C) e fêmeas (B e D) em campo aberto. Os dados estão expressos como média ± EPM (n = 6/grupo). Não há diferença estatística significativa entre os grupos tratados com JWH-133 e o grupo tratado com quetamina (ANOVA unidirecional e teste post-hoc de Tukey). Vei = veículo, JWH = JWH-133, queta = quetamina.

5.6 Efeito do β -cariofileno na hiperlocomoção induzida por quetamina em camundongos machos e fêmeas

O β -CF, agonista não seletivo do receptor CB₂, foi testado em camundongos machos e fêmeas (n = 6/grupo) nas doses de 25; 50 ou 100 mg/kg via i.p. 30 minutos antes de receber 30 mg/kg de quetamina. O β -CF não reverteu a hiperlocomoção induzida pela quetamina em machos (fig. 10A e 10C) e fêmeas (fig. 10B e 10D).

A distância total (20 minutos de teste na arena) de camundongos machos sob efeito do β -CF e quetamina está demonstrada na figura 10A [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 18,77; p = < 0,0001)]. Teste post-hoc de Tukey: ****p < 0,0001 para o grupo *vei + vei versus vei + queta*; ****p < 0,0001 para o grupo *vei + vei versus β -CF25 + queta*; ****p < 0,0001 para o grupo *vei + vei versus β -CF50 + queta*; ****p < 0,0001 para o grupo *vei + vei versus β -CF100 + queta*.

A distância total de camundongos fêmeas está representada na figura 10B [ANOVA unidirecional (F (4,25) = 15,77; p < 0,0001)]. Teste post-hoc de Tukey: ****p < 0,0001 para o grupo *vei + vei versus vei + queta*; ****p < 0,0001 para o grupo *vei + vei versus β -CF25 + queta*; ****p < 0,0001 para o grupo *vei + vei versus β -CF50 + queta*; **p = 0,0016 para o grupo *vei + vei versus β -CF100 + queta*.

A figura 10C representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos machos [ANOVA bidirecional (droga: F (4, 25) = 11,30; p < 0,0001; tempo: F (4,753, 118,8) = 13,03; p < 0,0001; interação: F (116, 725) = 4,009; p < 0,0001)]. A figura 10D representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos fêmeas [ANOVA bidirecional (droga: F (4, 25) = 12,03; p < 0,0001; tempo: F (5,761, 144,0) = 20,76; p < 0,0001; interação: F (116, 725) = 4,630; p < 0,0001)].

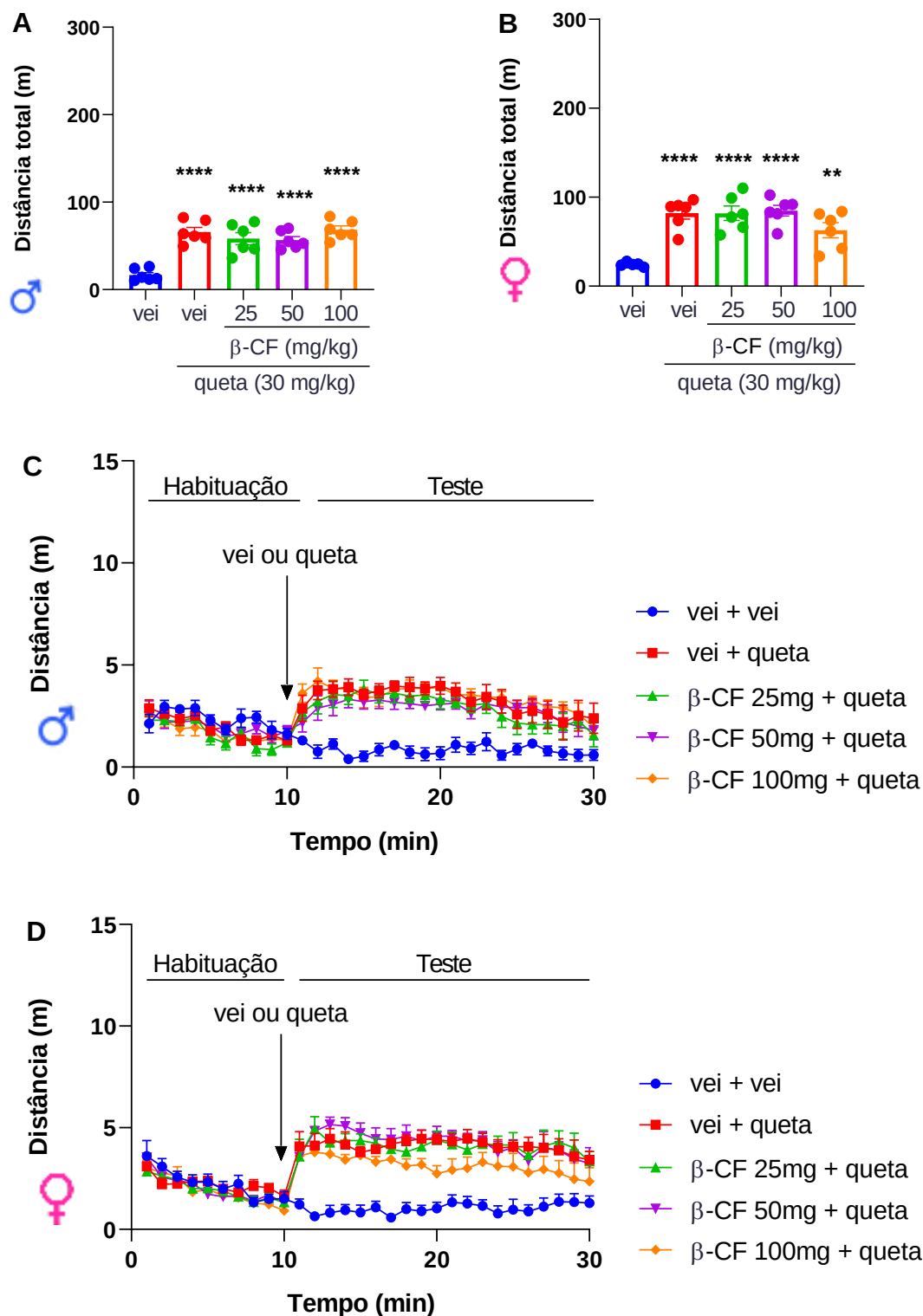


Figura 10. Efeito do agonista não seletivo CB₂, β-CF, na hiperlocomção induzida por quetamina. β-CF não alterou a hiperlocomção de camundongos machos (A e C) e fêmeas (B e D) em campo aberto. Os dados estão expressos como média ± EPM (n=6/grupo). Não há diferença estatística significativa entre os grupos tratados com β-CF e o grupo tratado com quetamina (ANOVA unidirecional e teste post-hoc de Tukey). Vei = veículo, β-CF = β-cariofileno, queta = quetamina.

5.7 Efeito do EC21a na hiperlocomoção induzida por quetamina em camundongos machos e fêmeas

O EC21a, MAP do receptor CB₂, foi testado tanto em camundongos machos e fêmeas (n = 6/grupo) nas doses de 1; 3 ou 10 mg/kg via i.p. 30 minutos antes de serem tratados com 30 mg/kg de quetamina. O EC21a não apresentou efetividade sobre a hiperlocomoção induzida pela quetamina em machos (fig. 11A e 11C) e fêmeas (fig. 11B e 11D).

A distância total (20 minutos de teste na arena) de camundongos machos sob efeito do EC21a e quetamina está demonstrada na figura 11A [ANOVA unidirecional ($F(4,25) = 5,733$; $p = 0,0020$)]. Teste post-hoc de Tukey: ** $p = 0,0097$ para o grupo *vei + vei versus vei + queta*; # $p = 0,0040$ para o grupo *vei + vei versus EC21a1 + queta*; * $p = 0,0288$ para o grupo *vei + vei versus EC21a3 + queta*; *** $p = 0,0010$ para o grupo *vei + vei versus EC21a10 + queta*.

A distância total de camundongos fêmeas está representada na figura 11B [ANOVA unidirecional ($F(4,25) = 7,363$; $p = 0,0005$)]. Teste post-hoc de Tukey: ** $p = 0,0029$ para o grupo *vei + vei versus vei + queta*; # $p = 0,0036$ para o grupo *vei + vei versus EC21a1 + queta*; *** $p = 0,0009$ para o grupo *vei + vei versus EC21a3 + queta*; & $p = 0,0022$ para o grupo *vei + vei versus EC21a10 + queta*.

A figura 11C representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos machos [ANOVA bidirecional (droga: $F(4, 25) = 4,431$; $p = 0,0076$; tempo: $F(4,644, 116,1) = 8,837$; $p < 0,0001$; interação: $F(116, 725) = 2,746$; $p < 0,0001$]. A figura 11D representa a distância dos 30 minutos de teste na arena de camundongos fêmeas [ANOVA bidirecional (droga: $F(4, 25) = 7,090$; $p = 0,0006$; tempo: $F(4,429, 110,7) = 9,665$; $p < 0,0001$; interação: $F(4, 25) = 7,090$; $p = 0,0006$].

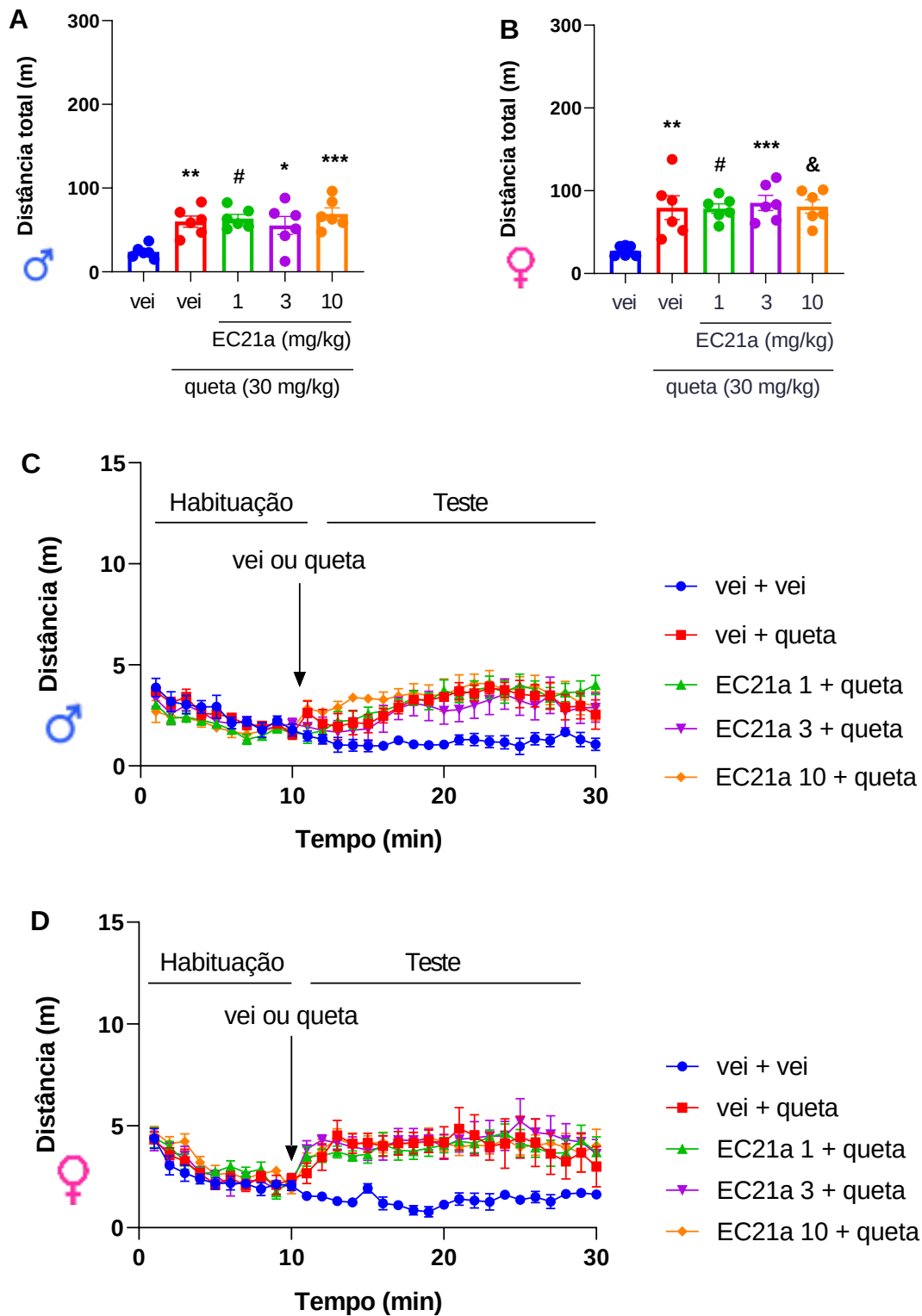


Figura 11. Efeito do MAP do CB₂, EC21a, na hiperlocomução induzida por quetamina. EC21a, não alterou a hiperlocomução de camundongos machos (A e C) e fêmeas (B e D) em campo aberto. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 6/\text{grupo}$). Não há diferença estatística significativa entre os grupos tratados com EC21a e o grupo tratado com quetamina (ANOVA unidirecional e teste post-hoc de Tukey). Vei = veículo, queta = quetamina.

6. DISCUSSÃO

As drogas de abuso exercem efeitos recompensadores facilitando a transmissão dopaminérgica no sistema límbico, especificamente no Nacc, embora possam atuar por diferentes mecanismos de ação. A cocaína por exemplo, age inibindo os transportadores de dopamina. Já a quetamina tem efeito mais complexo, envolvendo principalmente o antagonismo dos receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos dentro do núcleo reticular talâmico, inibindo a liberação do GABA, facilitando a liberação de dopamina (Nestler, 2005; Liu *et al.*, 2016).

O aumento da transmissão dopaminérgica no NAcc pode ser avaliado comportamentalmente pela hiperlocomoção, que pode refletir o estado da euforia causada pela droga. Diante do consumo repetido pode ocorrer neuroadaptações resultando em TUS. Nas Américas, as intervenções mais comuns para TUS é a abordagem psicossocial e comportamental, carecendo de tratamentos farmacológicos eficazes (United Nations Office on Drugs and Crime, 2024).

Nesse contexto, o Sistema Endocanabinoide tem sido estudado na busca de tratamento para TUS. O antagonismo do CB₁ localizado em sítio pré-sináptico inibe a liberação de dopamina, sendo que essa abordagem possui efeitos deletérios para o indivíduo como ansiedade, depressão e tendência suicida (King, 2010). Em contraposição, a ativação do receptor CB₂ também inibe a liberação de dopamina sem efeitos negativos conhecidos até o momento (Jordan e Xi, 2019; Gobira, Joca e Moreira, 2022; Asth *et al.*, 2023).

Diante disso, nosso trabalho buscou avaliar se a ativação ou modulação dos receptores CB₂ reverteria a hiperlocomoção induzida por cocaína ou quetamina. No entanto, nenhum dos ligantes do receptor CB₂ (JWH-133, β -CF ou EC21a) apresentou efeito significativo em reduzir a hiperlocomoção causado por essas drogas. Não identificamos estudos com JWH-133, β -CF ou EC21a no tratamento dos efeitos psicoestimulantes da quetamina, o que impediu a comparação entre resultados. Aparentemente esse trabalho é o primeiro a investigar os efeitos desses canabinoides no protocolo de hiperlocomoção induzida por quetamina.

O JWH-133 (agonista total, sintético e seletivo do receptor CB₂) parece ter sido o mais bem estudado sobre os efeitos da cocaína em diferentes protocolos (Hashiesh *et al.*, 2021). Em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em camundongos Swiss machos, o JWH-133 foi capaz de inibir a aquisição (0,3 e 1 mg/kg) e a expressão (1 e 3 mg/kg) de sensibilização e de CPP (10 mg/kg) (Lopes *et al.*, 2020). Além disso, preveniu a hiperlocomoção induzida por cocaína na mesma linhagem de camundongos machos na dose de 20 mg/kg (Gobira *et al.*, 2019). Outro estudo com JWH-133 apresentou resultado que diverge do nosso, uma vez que o pré-tratamento com 20 mg/kg reverteu a locomoção aumentada pela cocaína em camundongos C57BL/6J machos (Xi *et al.*, 2011). Apesar de nenhuma dose do JWH-133 ter reduzido significativamente a hiperlocomoção no presente trabalho, a dose de 1 mg/kg no grupo que recebeu cocaína não se diferenciou significativamente do grupo veículo (Figura 6A). Esse resultado indica que o JWH-133, nessa dose impediu, a hiperlocomoção exacerbada pela cocaína, conforme visto nos grupos que receberam a dose de 0,3 mg/kg e 3 mg/kg.

Em relação ao β -CF (agonista total não seletivo natural do receptor CB₂), até o momento apenas um estudo o havia testado no protocolo de hiperlocomoção induzida por cocaína, utilizando ratos Long-Evans machos. Nesse estudo o β -CF não alterou a hiperatividade induzida por cocaína nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg, assim como em nosso estudo. Além disso, o bloqueio farmacológico ou deleção genética dos receptores canabinóides [CB₁, CB₂ ou receptor acoplado à proteína G 55 (GPR55)] em camundongos C57BL/6J machos não alterou a ação de 100 mg/kg do β -CF na redução da autoadministração de cocaína, sugerindo o envolvimento de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos α e γ (PPAR α/γ) (Galaj *et al.*, 2021).

A escassez de estudos com β -CF e cocaína ou quetamina limita a comparação dos nossos resultados. No entanto, as divergências de outros estudos com o nosso, principalmente em relação ao JWH133 e cocaína, podem ser devidas a diferentes espécies e linhagens dos animais usados nos estudos; expressão dos receptores CB₂ nas diferentes regiões do cérebro; protocolos empregados e doses experimentadas.

Zhang *et al.* (2015) relataram em seus estudos que existe diferença significativa entre espécies (camundongos e ratos) no *splicing* e expressão do RNAm do receptor CB₂ e sequências de proteínas. Em outro estudo, a análise comparativa dos níveis de RNAm do receptor canabinoide em três linhagens de camundongos (C57BL/6J, Balb/c e Swiss) não encontrou diferença significativa na expressão de receptores CB₂ em 11 regiões do cérebro investigadas. No entanto, esse mesmo estudo identificou diferença significativa na expressão do RNAm do receptor CB₂ entre as regiões. Os níveis medidos na ATV foram significativamente menores do que aqueles do bulbo olfatório, do hipocampo, da região límbica ventral e da substância negra (Grabon *et al.*, 2024).

Além disso, diferenças podem também ser observadas devido ao protocolo empregado no experimento. No estudo de Lopes *et al.* (2020), o receptor CB₂ modulou a sensibilização e CPP induzidos por cocaína e preveniu ativação neuronal no hipocampo (expressão de c-Fos), região relacionada à memória contextual.

As doses testadas também podem explicar as diferenças observados entre os estudos. Nós usamos doses menores do JWH-133, enquanto Gobira *et al.* (2019) empregou a dose de 20 mg/kg, que preveniu a hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos Swiss machos. Aqui observamos dois fatores que diferem do nosso estudo, a dose e a linhagem.

Além de testar os agonistas de receptores CB₂, JWH-133 (seletivo) e β -CF (não-seletivo), testamos também a hipótese de que um modulador alostérico positivo do receptor CB₂, EC21a, poderia modular os efeitos da cocaína e da quetamina. O EC21a foi sintetizado e identificado em 2019, exibindo atividade antinociceptiva *in vivo* em um modelo experimental de dor neuropática em camundongos. Também apresentou mecanismos semelhantes ao de um modulador alostérico positivo *in vitro*, no qual a capacidade do ligante ortostérico CP55940 em ativar CB₂ foi significativamente melhorado na presença do EC21a, em ensaio de ligação com [³⁵S] GTP γ S. Além disso, o EC21a aumentou a ligação de [³H] CP55940 ao CB₂. Por outro lado, na ausência do ligante ortostérico, o EC21a não produziu qualquer efeito sobre CB₂ (Gado *et al.*, 2019).

Além desse estudo, o EC21a também foi experimentado em camundongos C57BL/6J expressando epilepsia, nos quais aumentou a resistência a convulsões induzidas (Shapiro *et al.*, 2021). Nosso trabalho foi o primeiro a investigar o efeito do EC21a no protocolo de hiperlocomoção induzida por cocaína ou quetamina, porém o EC21a falhou em reduzir esse efeito. No entanto, 3 mg/kg de EC21a nos animais que receberam cocaína não se diferenciou significativamente do grupo veículo (Figura 8A). Nessa dose o EC21a impediu a hiperlocomoção acentuada pela cocaína diferentemente dos grupos que receberam a dose de 1 mg/kg e 10 mg/kg.

Recentemente Qi *et al.* (2024) demonstram em ensaios *in vitro* que o EC21a se comporta semelhante a um modulador alostérico tendencioso, com mecanismos distintos a depender da via de sinalização investigada. Na avaliação da hidrólise de fosfatidilinositol (PI) e da abertura de canais de potássio retificadores internos acoplados à proteína G, o EC21a atuou como um agente alostérico agonista inverso em CB₂ em ambos os ensaios. Além disso, exibiu atividade agonista em CB₁ na avaliação de hidrólise de PI e atividade moduladora alostérica negativa em CB₁ na avaliação da abertura de canais de potássio.

Estes achados revelam que o EC21a exibe mecanismo de ação complexo que pode impactar na interpretação de estudos *in vivo*. Diante dessas descobertas podemos hipotetizar que a falha do EC21a em reduzir a hiperlocomoção induzida por cocaína ou quetamina pode ser devida a sua ação como modulador alostérico tendencioso, agindo como agonista inverso do CB₂ e/ou agonista do CB₁, a depender das distintas vias de sinalização.

Em relação aos nossos resultados em fêmeas, a comparação com outras pesquisas ficou limitada, uma vez que os estudos anteriores utilizaram somente animais machos. Um estudo recente analisou camundongos C57BL/6J machos e fêmeas na exploração livre em arena de campo aberto por 15 dias consecutivos. Foi observado que cada camundongo fêmea exibe padrão característico de exploração e que o ciclo estral não afeta significante o comportamento. Observaram ainda que o comportamento exploratório dos machos é significativamente mais variável do que nas fêmeas, tanto globalmente quanto individualmente (Graham, 2023; Levy *et al.*, 2023). Embora nesses

animais tenha sido estudados comportamentos espontâneos, ainda assim, dá suporte para a inclusão de ambos os sexos em experimentos comportamentais.

7. CONCLUSÃO

Coletivamente, os resultados apresentados nesse trabalho indicam que ativação ou modulação alostérica positiva do receptor canabinoide CB₂ não reverte o efeito de hiperlocomoção induzido por cocaína ou quetamina. Nossos resultados com JWH133 e a cocaína contrastam com os de outros estudos devido, possivelmente, pelas diferentes linhagens e pelas doses testadas. A escassez de dados com quetamina, EC21a e β -CF limitou a comparação com outros estudos.

Apesar disso, a literatura prévia sugere que o Sistema Endocanabinoide possa estar envolvido nos efeitos induzidos, principalmente, por cocaína em longo prazo. Diante disso, os presentes resultados não necessariamente refutam a hipótese de que o receptor CB₂ possa ser um alvo terapêutico para o tratamento do transtorno por uso de substância. Mais estudos seriam necessários para investigar os efeitos dos diversos ligantes deste receptor em protocolos de tratamento subcrônico ou crônico nas diferentes linhagens.

8. REFERÊNCIAS

- ARACIL-FERNÁNDEZ, A.; TRIGO, J. M.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; ORTEGA-ÁLVARO, A.; TERNIANOV, A.; NAVARRO, D.; ROBLEDO, P.; BERBEL, P.; MALDONADO, R.; MANZANARES, J. Decreased Cocaine Motor Sensitization and Self Administration in Mice Overexpressing Cannabinoid CB₂ Receptors. *Neuropsychopharmacology*. 37(7), 1749-1763, 2012. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.22>
- ASTH, L.; CRUZ, L. C.; SOYOMBO, N.; RIGO, P.; MOREIRA, F. A. Effects of β -caryophyllene, A Dietary Cannabinoid, in Animal Models of Drug Addiction. *Curr Neuropsychopharmacol*. 21 (2): 213-218, 2023. Doi: 10.2174/1570159X20666220927115811
- BALER, R.D.; VOLKOW, N. D. Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control. *Trends Mol Med*. 2006 Dec;12(12):559-66. DOI: 10.1016/j.molmed.2006.10.005
- BHATIA, A.; LENCHNER, J. R.; SAADABADI, A. Biochemistry, Dopamine Receptors. [Updated 2023 Jun 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island

(FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538242/>

BRUNT, T. M.; BOSSONG, M. G. The neuropharmacology of cannabinoid receptor ligands in central signaling pathways. *Eur J Neurosci.* 55(4): 909-921, 2020. <https://doi.org/10.1111/ejn.14982>

BUCK, S. A.; TORREGROSSA, M. M.; LOGAN, R. W.; FREYBERG, Z. Roles of dopamine and glutamate co-release in the nucleus accumbens in mediating the actions of drugs of abuse. *FEBS J.* 288 (5): 1462-1474, 2021. Doi: 10.1111/febs.15496

CAINE, S. B.; NEGUS, S. S.; MELLO, N. K.; PATEL, S.; BRISTOW, L.; KULAGOWSKI, J.; VALLONE, D.; SAIARDI, A.; BORRELLI, E. Role of Dopamine D2-like Receptors in Cocaine Self-Administration: Studies with D2 Receptor Mutant Mice and Novel D2 Receptor Antagonists. *Journal of Neuroscience* 1 April 2002, 22 (7) 2977-2988; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-07-02977.2002

CANSECO-ALBA, A.; SCHANZ, N.; SANABRIA, B.; ZHAO, J.; LIN, Z.; LIU, Q-R.; ONAIVI, E. S. Behavioral effects of psychostimulants in mutant mice with cell-type specific deletion of CB2 cannabinoid receptors in dopamine neurons. *Behav Brain Res.* 360:286-297, 2019. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.11.043

CUNHA, K. F.; OLIVEIRA, K. D.; CARDOSO, M. S.; ARANTES, A. C. F.; COSER, P. H. P.; LIMA, L. N.; MALUF, A. C. S.; COMIS, M. N. C.; HUESTIS, M. A.; COSTA, J. L. Prevalence of new psychoactive substances (NPS) in Brazil based on oral fluid analysis of samples collected at electronic music festivals and parties. *Drug and Alcohol Dependence.* volume 227, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108962>.

LEVY, D. R.; HUNTER, N.; LIN, S.; ROBINSON, E. M.; GILLIS, W.; CONLIN, E. B.; ANYOHA, R.; SHANSKY, R. M.; DATTA, S. R. Mouse spontaneous behavior reflects individual variation rather than estrous state. *Current Biology*, Volume 33, Issue 7, 1358 - 1364.e4. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.02.035>

DELIS, F.; POLISSIDIS, A.; POULIA, N.; JUSTINOVA, Z.; NOMIKOS, G. G.; GOLDBERG, S. R.; ANTONIOU, K. Attenuation of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference and Motor Activity via Cannabinoid CB2 Receptor Agonism and CB1 Receptor Antagonism in Rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 20(3): 269-278, 2017. Doi: 10.1093/ijnp/pyw102

FERIGOLO, M.; SIGNOR, L. Cocaína. Versão 1.0: 30/08. 2007. Disponível em: <https://www1.ibb.unesp.br/Home/UnidadesAuxiliares/CentrodeAssistenciaToxicologica-CEATOX/cocaina.pdf>

FERRISI, R.; POLINI, B.; RICARDI, C.; GADO, F.; MOHAMED, KA.; BARON, G.; FAIELLA, S.; POLI, G.; RAPPOSELLI, S.; SACCOMANNI, G.; ALDINI, G.; CHIELLINI, G.; LAPRAIRIE, RB.; MANERA, C.; ORTORE, G. New Insights into Bitopic Orthosteric/Allosteric Ligands of Cannabinoid Receptor Type 2. *Int J Mol Sci.* 21;24(3):2135, 2023. Doi: 10.3390/ijms24032135

GADO, F.; DI CESARE, M. L.; LUCARINI, E.; BERTINI, S.; CAPPELLI, E.; DIGIACOMO, M.; STEVENSON, LA.; MACCHIA, M.; TUCCINARDI, T.; GHELARDINI, C.; PERTWEE, RG.; MANERA, C. Identification of the First Synthetic Allosteric Modulator of the CB2 Receptors and Evidence of Its Efficacy for Neuropathic Pain Relief. *J Med Chem.* 10;62(1):276-287, 2019. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00368

GALAJ, E.; BI, G.H.; MOORE, A.; CHEN, K.; HE, Y.; GARDNER, E.; XI, Z. X. Beta-caryophyllene inhibits cocaine addiction-related behavior by activation of PPAR α and PPAR γ : repurposing a FDA-approved food additive for cocaine use disorder. *Neuropsychopharmacol.* 46, 860–870 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00885-4>

GOBIRA, P. H.; JOCA, S. R.; MOREIRA, F. A. Roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the modulation of psychostimulant responses. *Acta Neuropsychiatrica.* 1-11, 2022. Doi: 10.1017/neu.2022.23

GOBIRA, P. H.; OLIVEIRA, A. C.; GOMES, J. S.; SILVEIRA, V. T.; ASMA, L.; BASTOS, J. R.; BATISTA, E. M.; ISSY, A. C.; OKINE, B. N.; OLIVEIRA, A. C.; RIBEIRO, F. M.; BEL, E. A. D.; AGUIAR, D. C.; FINN, D. P.; MOREIRA, F. A. Opposing roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the stimulant and rewarding effects of cocaine. *British Journal of Pharmacology.* 1541-1551 (2019) 176. <https://doi.org/10.1111/bph.14473>

GRABON, W.; RUIZ, A.; GASMI, N.; DEGLETAGNE, C.; GEORGES, B.; BELMEGUENAI, A.; BODENNEC, J.; RHEIMS, S.; MARCY, G.; BEZIN, L. CB2 expression in mouse brain: from mapping to regulation in microglia under inflammatory conditions. *Journal of Neuroinflammation.* 21, 206 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12974-024-03202-8>

GRAHAM, B. M. Battle of the sexes: who is more variable, and does it really matter?. *Lab Animal.* 52, 107–108 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41684-023-01164-7>

HASHIESH, H. M.; SHARMA, C.; GOYAL, S. N.; JHA, N. K.; OJHA S.. Pharmacological Properties, Therapeutic Potential and Molecular Mechanisms of JWH133, a CB2 Receptor-Selective Agonist. *Frontiers in Pharmacology.* volume 12, 2021. DOI 10.3389/fphar.2021.702675

HE, X-H.; GALAJ, E.; BI, G-H.; HE, Y.; HEMPEL, B.; WANG, Y-L.; GARDNER, E. L.; XI, Z-X. β -caryophyllene, an FDA-Approved Food Additive, Inhibits Methamphetamine-Taking and Methamphetamine-Seeking Behaviors Possibly via CB2 and Non-CB2 Receptor Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology.* 12:722476. 2021. Doi: 10.3389/fphar.2021.722476

HE, Y.; GALAJ, E.; BI, G-H.; WANG, X-F.; GARDNER E.; XI, Z-X. β -Caryophyllene, a dietary terpenoid, inhibits nicotine taking and nicotine seeking in rodents. *Br J Pharmacol.* 177: 2058-2072, 2020. <https://doi.org/10.1111/bph.14969>

JENSEN, K. L.; JENSEN, S. B.; MADSEN, K. L. A mechanistic overview of approaches for the treatment of psychostimulant dependence. *Front. Pharmacol.* 13: 854176. 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.854176>

JORDAN, C. J.; XI, Z-X. Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: From genes to behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. v. 98, 2019, 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.02>

KING, A. Neuropsychiatric adverse effects signal the end of the line for rimonabant. *Nature Reviews Cardiology*. 7, 602 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.148>

ASTH, L.; CRUZ, L. C.; SOYOMBO, N.; RIGO, P.; MOREIRA, F. A. Effects of β -caryophyllene, A Dietary Cannabinoid, in Animal Models of Drug Addiction. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2023; 21 (2): 213-218. doi: 10.2174/1570159X20666220927115811.

LIU, Y.; LIN, D.; WU, B.; ZHOU, W. Ketamine abuse potential and use disorder. *Brain Research Bulletin*. volume 126, part 1, 2016, pages 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.05.016>.

LOPES, J. B. 2017. Envolvimento de receptores canabinoides na sensibilização e preferência condicionada ao lugar induzidas por cocaína. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

LOPES, J. B.; BASTOS, J. R.; COSTA, R. B.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A. The roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology*. 237, 385-394, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05370-5>

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fifth Edition. Text Revision. Washington, DC, American Psychiatric Association, 2022.

MISHRA, A.; SINGH, S.; SHUKLA, S. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *Journal of Experimental Neuroscience*. 2018;12. doi:10.1177/1179069518779829

MUAKAD, I. B. A Cocaína e o Crack: As Drogas da Morte. *Revista da Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo*, v. 106/107, p. 465-494, 2012. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/bitstream/handle/BDPI/43703/70562.pdf?sequence=1>

NESTLER, E. J. The neurobiology of cocaine addiction. *Science and Practice Perspectives*. 3(1):4-10. 2005. doi: 10.1151/spp05314.

NIEDZIELSKA-ANDRES, E.; POMIERNY-CHAMIOŁO, L.; ANDRES M.; WALCZAK, M.; KNACKSTEDT, L. A.; FILIP, M.; PRZEGALIŃSKI E. Cocaine use disorder: A look at metabotropic glutamate receptors and glutamate

transporters. *Pharmacology & Therapeutics*. v 221, 2021, 107797.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107797>

QI, A.; HAN, X.; QUITALIG, M.; WU, J.; CHRISTOV, P. P.; JEON, K.; JANA, S.; KIM, K.; ENGERS, D. W.; LINDSLEY, C. W.; RODRIGUEZ, A. L.; NISWENDER, C. M. The cannabinoid CB₂ receptor positive allosteric modulator EC21a exhibits complicated pharmacology in vitro. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 44(4), 151–159, 2024.
<https://doi.org/10.1080/10799893.2024.2431986>

SAVIĆ, V. K.; JOTIĆ, A.; MEDIĆ, B.; SREBRO, D.; VUJOVIĆ, A.; ŽUJOVIĆ, J.; OPANKOVIĆ, A.; VUČKOVIĆ, S. Ketamine, an Old–New Drug: uses and abuses. *Pharmaceuticals*. 2024, 17, 16. <https://doi.org/10.3390/ph17010016>

SCHURMAN, L. D.; LU, D.; KENDALL, D. A.; HOWLETT, A. C.; LICHTMAN, A. H. Molecular Mechanism and Cannabinoid Pharmacology. *Handb Exp Pharmacol*. 258: 323-353, 2020. Doi: 10.1007/164_2019_298

SEIBENHENER, M.L., WOOTEN, M.C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015 Feb 6;(96):e52434. doi: 10.3791/52434. PMID: 25742564; PMCID: PMC4354627.

SHAPIRO, L.; GADO, F.; MANERA, C.; ESCAYG, A. Allosteric modulation of the cannabinoid 2 receptor confers seizure resistance in mice. *Neuropharmacology*. 188, 108448, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108448>

SPANAGEL, R. Cannabinoids and the endocannabinoid system in reward processing and addiction: from mechanisms to interventions. *Dialogues Clin Neurosci*. 22(3): 241-250. 2020. Doi: 10.31887/DCNS.2020.22.3/rspanagel

SVÍŽENSKÁ, I.; DUBOVÝ, P.; ŠULCOVÁ, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. volume 90, issue 4, 2008, pages 501-511.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.05.010>.

TAN S.; LAM, W. P.; WAI, M. S. M.; YU, W-HÁ.; YEW, D. T. Chronic Ketamine Administration Modulates Midbrain Dopamine System in Mice. *PLoS ONE*. 2012, 7(8): e43947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043947>

TOMITA, S. Vias e receptores glutamatérgicos. Em: Gruol, D., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmähmann, J., Shen, Y. (eds) *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer, Cham. 2016.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-24551-5_29

United Nations Office on Drugs and Crime. Contemporary Issues on Drugs. World Drug Report 2024 (United Nations publication, 2024). Disponível em: https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR_2024/WDR24_Contemporary_issues.pdf

United Nations Office on Drugs and Crime. Executive Summary Policy Implications. World Drug Report 2021 (United Nations publication, Sales No. E.21.XI.8). Disponível em: www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html

United Nations Office on Drugs and Crime. Key Findings and Conclusions. World Drug Report 2024 (United Nations publication, 2024). Disponível em: https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR_2024/WDR24_Key_findings_and_conclusions.pdf

VOLKOW, N. D.; BOYLE, M. Neuroscience of Addiction: Relevance to Prevention and Treatment. *Am J Psychiatry*. 175: 729-740, 2018. Doi: 10.1176/appi.ajp.2018.17101174

VOLKOW, N. D.; C., BLANCO. Substance use disorders: a comprehensive update of classification, epidemiology, neurobiology, clinical aspects, treatment and prevention. *World Psychiatry*. 2023; 22(2):203–229. <https://doi.org/10.1002/wps.21073>

WANG, H.; TREADWAY, T.; COVEY, D. P.; CHEER, J. F.; LUPICA, C. R. Cocaine-Induced Endocannabinoid Mobilization in the Ventral Tegmental Area. *Cell Reports*, Volume 12, Issue 12, 1997 – 2008, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.041>

XI, Z. X.; PENG, X. Q.; LI, X.; SONG, R. ; ZHANG, H-Y. ; LIU, Q-R. ; YANG, H-J. ; BI, G-H. ; LI, J. ; GARDNER, E. L. Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci* 14, 1160–1166 (2011). <https://doi.org/10.1038/nn.2874>

XU, W.; LI, H.; WANG, L.; ZHANG, J.; LIU, C.; WAN, X.; LIU, X.; HU, Y.; FANG, Q.; XIAO, Y.; BU, Q.; WANG, H.; TIAN, J.; ZHAO, Y.; CEN, X. Endocannabinoid signaling regulates the reinforcing and psychostimulant effects of ketamine in mice. *Nat Commun* 11, 5962. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19780-z>

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.; QING-RONG, L. Species Differences in Cannabinoid Receptor 2 and Receptor Responses to Cocaine Self-Administration in Mice and Rats. *Neuropsychopharmacol* 40, 1037–1051 (2015). <https://doi.org/10.1038/npp.2014.297>

ZHANG, H-Y.; GAO, M.; SHEN, H.; BI, G-H.; YANG, H-J.; LIU, Q-R.; WU, J.; GARDNER, E. L.; BONCI, A.; XI, Z-X. Expression of Functional Cannabinoid CB2 Receptor in VTA Dopamine Neurons in Rats. *Addict Biol*. 22(3): 752–765, 2017. Doi: 10.1111/adb.12367