

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Toxicologia

**Modulação da atividade encefálica pelo canabidiol em camundongos tratados  
com cocaína**

Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta

Tese para obtenção do título de Doutora

Orientadora: Profa. Dra. Tania Marcourakis

Coorientadora: Dra. Daniele de Paula Faria

São Paulo

2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Toxicologia

**Modulação da atividade encefálica pelo canabidiol em camundongos tratados  
com cocaína**

Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta

Versão original

Tese para obtenção do título de Doutora  
Orientadora: Profa. Dra. Tania Marcourakis  
Coorientadora: Dra. Daniele de Paula Faria

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

E743m      Emmanuela Wiazowski Spelta, Lidia  
Modulação da atividade encefálica pelo canabidiol  
em camundongos tratados com cocaína / Lidia  
Emmanuela Wiazowski Spelta. - São Paulo, 2022.  
200 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.  
Orientador: Marcourakis, Tania  
Coorientador: de Paula Faria, Daniele

1. Toxicologia experimental. 2. Transtorno por  
uso de substâncias. 3. Canabidiol. 4. Imagem PET. I.  
T. II. Marcourakis, Tania, orientador. III. de  
Paula Faria, Daniele, coorientador.

Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta

Modulação da atividade encefálica pelo canabidiol em camundongos tratados com  
cocaína

Comissão julgadora da Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências

**Profa. Dr. Tania Marcourakis**  
**Presidente/Orientador**

---

**1º Examinador**

---

**2º Examinador**

---

**3º Examinador**

---

**4º Examinador**

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2022.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E com apoio do Ministério da Justiça e Segurança Pública do Brasil, por meio da Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (Edital nº01 de 26/05/2015).

## DEDICATÓRIA

À minha mãe Tamara, minha alma gêmea. Sempre fez questão de estar ao meu lado em cada glória alcançada e em cada queda. Sempre me colocou em primeiro lugar, lutando para me dar o melhor. Tudo que sou, agradeço a você. Tudo que eu faço, dedico a você.

À minha filha Alice, que ilumina meus dias e preenche a minha vida tão intensamente.

Ao Lucas, que escolheu permanecer ao meu lado em todos esses anos. Minha base nos momentos difíceis e parte essencial dos momentos bons.

Aos meus avós maternos, Catarina e Mikolaj, que eu tanto amei.

Ao Milton e a Lúcia, que me acolheram na família com tanto carinho e amor, e tornaram-se tão especiais.

Ao meu pai Mario, por sempre ter prezado pela minha educação.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Profa. Dra. Tania Marcourakis, meu mais profundo agradecimento por ter me garantido algo muito valioso: a oportunidade. Agradeço por ter me aceitado como sua aluna, confiando no meu potencial. Agradeço por todo esforço e dedicação a mim nestes 7 anos de jornada. Agradeço por todos os ensinamentos, na pesquisa e na vida. Agradeço por cada conversa, cada troca de experiências, cada momento compartilhado; tudo fez com que você se tornasse mais do que apenas uma orientadora. Agradeço pelo vínculo que criamos. Obrigada por ser esse exemplo de mulher, de professora, de pesquisadora. Sou muito grata por nossos caminhos terem se cruzado e saio desta jornada muito mais evoluída, com plena convicção do quanto você foi responsável por isso!

À minha coorientadora, Dra. Daniele de Paula Faria. Agradeço por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa e ter feito com que eu me tornasse parte dele. Agradeço pela confiança no meu trabalho e pela sua dedicação, envolvimento e interesse genuíno em cada procedimento. Obrigada por tantos ensinamentos e pelo convívio agradável no dia-a-dia, dentro e fora do laboratório. Obrigada por acreditar no meu potencial. Obrigada por ter se tornado um grande exemplo de pessoa e pesquisadora. Com certeza esse doutorado não teria sido o mesmo sem você; você foi essencial em cada etapa. Espero ansiosamente por esse novo ciclo que iniciaremos juntas!

À Dra. Caroline Cristiano Real, essa pesquisadora tão acima dos dois desvios padrões da curva. Obrigada por tudo que você me ensinou, desde as imagens até as imunos, sempre sentando ao meu lado e me explicando tudo com paciência (mesmo com sua mesa lotada de coisas para fazer). Com certeza uma inspiração de pessoa e pesquisadora. Você foi essencial para o andamento deste doutorado e tornou meu início no LIM 43 muito mais fácil e feliz. Torço imensamente pelo seu sucesso!

À Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco e ao Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia. Agradeço não só pelo delineamento do projeto que permitiu que este doutorado fosse possível, mas também por toda troca de experiências. Obrigada por serem pessoas tão competentes e inspiradoras!

À Professora Dra. Rosana Camirini, por sempre enriquecer nossos trabalhos com seu conhecimento, principalmente, na parte comportamental e nas publicações. Obrigada por sempre ter me recebido com carinho em seu laboratório e confiado em mim para estar lá e analisar os dados.

À Monica Joana Golcman e ao Cleinando Vera, por todo auxílio experimental e pela aquisição das imagens. Obrigada também pela convivência e pelas experiências trocadas, tão necessárias para que o trabalho flua bem.

À Msc. Mara de Souza Junqueira por compartilhar todo seu conhecimento de pesquisa pré-clínica e por coordenar tão bem o biotério de experimentação do LIM 43, garantindo o bem-estar dos animais.

Aos meus colegas de pós-graduação da FCF, Vitor e Ana Carolina, que deixaram essa jornada mais leve e feliz! Obrigada por todo auxílio na pesquisa, pela presença no dia-a-dia e pelas experiências acadêmicas que vivemos juntos. Como é bom formar vínculos sinceros! Guardo vocês no coração e espero que ainda tenhamos muito para compartilhar juntos.

Às colegas de pós-graduação e iniciação científica da FMUSP, Laura, Larissa, Letícia, Manuela, Gabrielle, que me receberam tão bem nesse novo ambiente. Obrigada por toda ajuda no laboratório e por todas as conversas!

À Elaine, Edna e Samanta, e todos os demais funcionários da FCF e do LIM 43, que fornecem todo o suporte fora do laboratório, sem o qual não é possível resolver as questões burocráticas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



## RESUMO

SPELTA, L. E. W. S. **Modulação da atividade encefálica pelo canabidiol em camundongos tratados com cocaína**. 2022. 200f. Tese (Doutorado em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Os dados epidemiológicos referentes ao consumo de cocaína mostram aumento do consumo dessa droga de abuso nas Américas, na Europa Ocidental e na Oceania, sendo ela a segunda droga ilícita mais consumida no Brasil. O plantio da *Erythroxylum coca*, a produção de cocaína e a quantidade da droga apreendida bateram todos os recordes no ano de 2020. Um dos principais problemas de saúde crônicos associados ao uso recreativo da cocaína é a adicção, uma doença ainda sem tratamento efetivo. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial do canabidiol (CBD) como possível agente terapêutico do transtorno de uso de cocaína em um modelo animal de sensibilização psicomotora, sob as perspectivas comportamental e de neuroimagem. Para tanto, camundongos machos adultos C57Bl/6 foram submetidos a um estudo longitudinal que consiste na indução da sensibilização psicomotora à cocaína durante 10 dias, em dias alternados, totalizando 5 administrações da droga; seguida por 8 dias consecutivos de tratamento com CBD, e dois desafios, 24 e 48h após o último dia de tratamento, sendo o primeiro com salina e o segundo com cocaína, para verificar a expressão da sensibilização. Durante cada uma destas etapas os animais foram submetidos ao campo aberto por 30 minutos para quantificação da atividade locomotora e pareamento entre droga e ambiente. Dois dias antes do início do protocolo comportamental, no último dia de sensibilização e de tratamento e após o desafio da expressão, os animais foram submetidos à tomografia por emissão de pósitrons (PET) a fim de mensurar a atividade encefálica, via captação do radiofármaco [<sup>18</sup>F]fluorodesoxiglicose ([<sup>18</sup>F]FDG). Os animais foram eutanasiados após o último dia de neuroimagem e os encéfalos removidos para a realização de imunohistoquímica. Primeiramente (capítulo 5) avaliou-se se o canabidiol (5, 15, 30, 60 e 120 mg/kg), seria efetivo para inibir a expressão da sensibilização psicomotora induzida pela cocaína. Em seguida, o protocolo de neuroimagem foi padronizado (capítulo 6) para evidenciar o efeito agudo e o efeito de sensibilização da cocaína na atividade encefálica. Por fim, o efeito do canabidiol sobre

as alterações induzidas pela cocaína (capítulo 7) foi verificado por imagem PET com [<sup>18</sup>F]FDG e por imuno-histoquímica, na qual avaliou-se o número de neurônios (anti-NeuN), células da microglia (anti-Iba1, e de astrócitos (anti-GFAP), bem como a densidade óptica do receptor CB1 e da enzima FAAH. Observou-se na avaliação comportamental que nenhuma das doses de CBD foi eficaz em prevenir a expressão da sensibilização psicomotora induzida pela cocaína. O protocolo de neuroimagem foi padronizado de forma que, após indução da anestesia e injeção do [<sup>18</sup>F]FDG, os animais fossem imediatamente encaminhados para aquisição de imagens dinâmicas de 75 minutos e mantidos anestesiados durante todo esse período para evitar que os efeitos estimulantes periféricos consequentes da cocaína reduzissem a captação encefálica do radiofármaco. A cocaína aumentou a captação do [<sup>18</sup>F]FDG, porém, quando os animais foram reexpostos à droga após 8 dias de tratamento com canabidiol, o efeito de aumento metabólico gerado pela cocaína não foi evidenciado na maioria dos VOIs avaliados, tanto em animais sensibilizados e desafiados com cocaína quanto em animais que receberam apenas uma injeção aguda de cocaína no desafio. Além disso, o canabidiol alterou o perfil celular do encéfalo, bem como a expressão dos receptores CB1 e da enzima FAAH. Portanto, os resultados indicam um efeito benéfico do canabidiol frente às alterações induzidas pela cocaína, sugerindo que ele pode ser um interessante adjuvante no tratamento de indivíduos com transtorno por uso de cocaína.

**Palavras-chave:** adicção; cocaína; neuroplasticidade; imagem PET; [<sup>18</sup>F]-fluorodeoxiglicose; metabolismo de glicose.

## ABSTRACT

SPELTA, L. E. W. S. **Modulation of brain activity by cannabidiol in cocaine-treated mice**. 2022. 200p. Thesis (Doctorate in Pharmacy: Physiopathology and Toxicology) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Epidemiological data on cocaine use show an increase in the consumption of this drug of abuse in the Americas, Western Europe, and Oceania, being it the second most consumed illicit drug in Brazil. The cultivation of *Erythroxylum coca*, as well as the production of cocaine and the amount of the drug seized broke all the records in 2020. One of the main chronic health problems associated with the recreational use of cocaine is addiction, a disease still without effective treatment. The objective of the present study was to verify if cannabidiol (CBD) could be a possible therapeutic agent for cocaine use disorder in an animal model of psychomotor sensitization, from the behavioral and neuroimaging perspectives. Therefore, adult male C57Bl/6 mice were submitted to a longitudinal study that consisted of inducing psychomotor sensitization to cocaine every other day for 10 days, followed by 8 consecutive days of treatment with cannabidiol, and two challenges, 24 and 48 h after the last day of treatment, the first one with saline and the second one with cocaine, to verify the expression of sensitization. During each of these stages, the animals were submitted to the open field for 30 minutes for quantification of locomotor activity and pairing between drug and environment. Two days before the beginning of the behavioral protocol, on the last day of sensitization, last day of treatment and after the expression challenge, the animals were submitted to brain positron emission tomography (PET) using [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG) to measure the metabolic activity. The animals were euthanized after the last day of PET imaging and the brains were removed for immunohistochemistry. First (chapter 5) it was evaluated whether cannabidiol (5, 15, 30, 60 and 120 mg/kg) would be effective in inhibiting the expression of cocaine-induced psychomotor sensitization. Then, the neuroimaging protocol was standardized (chapter 6) to evidence the acute effect and the sensitization effect of cocaine on brain metabolic activity. Finally, the effect of cannabidiol on cocaine-induced changes (chapter 7) was verified by PET imaging with [<sup>18</sup>F]FDG and immunohistochemistry, in which the number of neurons (anti-NeuN), activated microglial cells (anti-Iba1), and astrocytes (anti-GFAP), as well as the optical density of the CB1 receptor and the

FAAH enzyme were semi-quantified. It was observed in the behavioral evaluation that none of the CBD doses was effective in preventing the expression of cocaine-induced psychomotor sensitization. The neuroimaging protocol was standardized so that, after induction of anesthesia and injection of [<sup>18</sup>F]FDG, scanned a 75 minutes dynamic images were started immediately after tracer injection, and the animals kept anesthetized throughout this period to prevent the peripheral stimulant effects of cocaine from reducing the [<sup>18</sup>F]FDG brain uptake. Cocaine increased [<sup>18</sup>F]FDG uptake, however, when animals were exposed to cocaine after 8 days of cannabidiol treatment, the cocaine-induced metabolic increase was no longer seen in most of the analyzed VOIs, either in animals sensitized and challenged with cocaine or in animals that received only an acute injection of cocaine in the challenge. In addition, cannabidiol altered the cellular profile of the brain, as well as the densities of CB1 receptors and the FAAH enzyme. Therefore, the results indicate a beneficial effect of cannabidiol on cocaine-induced changes, suggesting that it may be an interesting adjunct in the treatment of individuals with cocaine use disorder.

**Keywords:** addiction; cocaine; neuroplasticity; PET imaging; [<sup>18</sup>F]-fluorodeoxyglucose; glucose metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Estimativa da tendência global do número de usuários (milhões) de drogas e de usuários com transtorno por uso de substâncias no período de 2010-2022; faixa etária 14 a 65 anos.	<b>26</b>
<b>Figura 2</b>	Tendência da busca por tratamento de transtorno por uso de substâncias por região em 2010, 2015 e 2020.	<b>27</b>
<b>Figura 3</b>	Principais classes de substâncias utilizadas em 2020.	<b>27</b>
<b>Figura 4</b>	Cultivo e produção globais de cocaína no período de 1998-2020.	<b>28</b>
<b>Figura 5</b>	Prevalência do uso de substâncias ilícitas pela população brasileira de 12 a 65, na vida, nos 12 meses e nos 20 dias anteriores à coleta de dados.	<b>29</b>
<b>Figura 6</b>	Concentração plasmática de cocaína em função do tempo conforme a via de administração em humanos (A) e ratos (B).	<b>32</b>
<b>Figura 7</b>	Mecanismo de ação da cocaína no SNC.	<b>32</b>
<b>Figura 8</b>	Projeções dopaminérgicas.	<b>34</b>
<b>Figura 9</b>	Modelo da interação entre os principais circuitos neuronais relacionados à neurobiologia da adicção.	<b>35</b>
<b>Figura 10</b>	Modelo da Sensibilização do Incentivo como explicação neurobiológica da adicção.	<b>38</b>
<b>Figura 11</b>	Controle encefálico do “gostar” e “necessitar”.	<b>39</b>
<b>Figura 12</b>	Modulações da neurotransmissão mediada pelos endocanabinoides.	<b>44</b>
<b>Figura 13</b>	Distribuição dos receptores CB1 nas estruturas do sistema límbico	<b>45</b>
<b>Figura 14</b>	Controle do sistema endocanabinoide sob a transmissão dopaminérgica da VTA e do NAc.	<b>46</b>
<b>Figura 15</b>	Alvos moleculares do CBD.	<b>49</b>
<b>Figura 16</b>	Delineamento experimental.	<b>58</b>
<b>Figura 17</b>	Representação dos cortes coronal, sagital e axial utilizados nos <i>templates</i> de MRI e nos VOIs delimitados pelo atlas T2 <i>weighted</i> Ma-Benveniste-Mirrione de camundongos.	<b>61</b>
<b>Figura 18</b>	Delineamento experimental da avaliação da dose de CBD.	<b>66</b>
<b>Figura 19</b>	Análise da atividade locomotora em campo aberto.	<b>67</b>
<b>Figura 20</b>	Análise da sensibilização psicomotora.	<b>69</b>
<b>Figura 21</b>	Avaliação da frequência de entradas nas zonas central e periférica do campo aberto.	<b>71</b>
<b>Figura 22</b>	Avaliação do tempo de permanência nas zonas central e periférica do campo aberto.	<b>72</b>

---

---

<b>Figura 23</b>	Delineamento experimental da avaliação da resposta à cocaína na imagem PET.	<b>80</b>
<b>Figura 24</b>	Delineamento experimental do teste dos momentos de injeção de cocaína e [ <sup>18</sup> F]FDG.	<b>81</b>
<b>Figura 25</b>	Delineamento experimental da avaliação da interferência do metabolismo periférico na captação encefálica de [ <sup>18</sup> F]FDG.	<b>82</b>
<b>Figura 26</b>	Delineamento experimental para validação do protocolo.	<b>83</b>
<b>Figura 27</b>	Análise da atividade locomotora da dose de 20 mg/kg de cocaína na aquisição da sensibilização.	<b>84</b>
<b>Figura 28</b>	Imagens encefálicas de PET fusionadas com <i>template</i> de MRI representativas da avaliação da resposta à cocaína na imagem PET.	<b>84</b>
<b>Figura 29</b>	Resultados da imagem PET no teste de avaliação da resposta à cocaína.	<b>85</b>
<b>Figura 30</b>	Análise da atividade locomotora no teste dos momentos de injeção de cocaína e [ <sup>18</sup> F]FDG.	<b>86</b>
<b>Figura 31</b>	Efeito da pré-anestesia com isoflurano na atividade locomotora.	<b>86</b>
<b>Figura 32</b>	Análise da sensibilização psicomotora do teste dos momentos de injeção de cocaína e [ <sup>18</sup> F]FDG.	<b>87</b>
<b>Figura 33</b>	Imagens encefálicas de PET fusionadas com <i>template</i> de MRI representativas do teste dos momentos de injeção de cocaína e [ <sup>18</sup> F]FDG.	<b>88</b>
<b>Figura 34</b>	Resultados da imagem PET no teste dos momentos de injeção de cocaína e [ <sup>18</sup> F]FDG.	<b>89</b>
<b>Figura 35</b>	Imagens encefálicas de PET fusionadas com <i>template</i> de MRI representativas dos diferentes grupos avaliados.	<b>90</b>
<b>Figura 36</b>	Resultados da imagem PET na avaliação da influência do metabolismo periférico na captação encefálica de [ <sup>18</sup> F]FDG.	<b>92</b>
<b>Figura 37</b>	Avaliação do encéfalo total.	<b>93</b>
<b>Figura 38</b>	Análise da atividade locomotora dos animais expostos ao campo aberto durante a captação de [ <sup>18</sup> F]FDG.	<b>94</b>
<b>Figura 39</b>	Captação de [ <sup>18</sup> F]FDG em animais controle e sensibilizados.	<b>96</b>
<b>Figura 40</b>	Atividade locomotora de animais controle e animais sensibilizados com cocaína e sua correlação com o metabolismo encefálico de glicose.	<b>97</b>
<b>Figura 41</b>	Delineamento experimental da avaliação do efeito do canabidiol sobre as alterações de imagem induzidas pela cocaína.	<b>106</b>
<b>Figura 42</b>	Efeito do CBD sobre as alterações no metabolismo de glicose induzidas pela cocaína.	<b>107</b>

---

---

<b>Figura 43</b>	Avaliação intra e intergrupo do efeito do CBD sobre as alterações no metabolismo de glicose induzidas pela cocaína no encéfalo total.	<b>116</b>
<b>Figura 44</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de CB1 no hipocampo.	<b>118</b>
<b>Figura 45</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de CB1 no globo pálido.	<b>119</b>
<b>Figura 46</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de CB1 na amígdala basolateral.	<b>121</b>
<b>Figura 47</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de CB1 na substância negra reticular.	<b>122</b>
<b>Figura 48</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de FAAH no hipocampo.	<b>123</b>
<b>Figura 49</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de neurônios no hipocampo.	<b>125</b>
<b>Figura 50</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios na amígdala.	<b>126</b>
<b>Figura 51</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios no córtex cingulado.	<b>128</b>
<b>Figura 52</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios no córtex pré-límbico.	<b>129</b>
<b>Figura 53</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios no caudado-putâmen dorsomedial.	<b>130</b>
<b>Figura 54</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios no caudado-putâmen dorsolateral.	<b>131</b>
<b>Figura 55</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios na substância cinzenta periaquedutal.	<b>132</b>
<b>Figura 56</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios no núcleo accumbens.	<b>132</b>
<b>Figura 57</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de células da microglia ativadas no hipocampo.	<b>134</b>
<b>Figura 58</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de células da microglia ativadas na amígdala.	<b>135</b>
<b>Figura 59</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de células da microglia ativadas no córtex cingulado.	<b>136</b>
<b>Figura 60</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de células da microglia ativadas no córtex pré-límbico.	<b>137</b>
<b>Figura 61</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de células da microglia ativadas no núcleo accumbens.	<b>138</b>

---

---

<b>Figura 62</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de células da microglia ativadas na substância cinzenta periaquedutal.	<b>139</b>
<b>Figura 63</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de células da microglia ativadas no caudado-putâmen dorsomedial.	<b>140</b>
<b>Figura 64</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de células da microglia ativadas no caudado-putâmen dorsolateral.	<b>140</b>
<b>Figura 65</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de astrócitos GFAP positivos na amígdala.	<b>142</b>
<b>Figura 66</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de astrócitos GFAP positivos no hipocampo	<b>143</b>
<b>Figura 67</b>	Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de astrócitos GFAP positivos na substância cinzenta periaquedutal.	<b>144</b>

---



## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b>	Dados estatísticos das comparações em pares da captação de [ <sup>18</sup> F]FDG após a administração de cocaína no grupo anestesia comparado aos grupos caixa moradia e campo aberto.	<b>93</b>
<b>Tabela 2</b>	Grupos experimentais avaliados e substância administrada em cada etapa do protocolo.	<b>105</b>
<b>Tabela 3</b>	Valores de p do grupo SCBDS, comparando-se a imagem do tratamento com as demais.	<b>112</b>
<b>Tabela 4</b>	Valores de p do grupo CCBDS, comparando-se as imagens de sensibilização e tratamento com as imagens basal e do desafio.	<b>113</b>
<b>Tabela 5</b>	Valores de p do grupo SCBDC, comparando a imagem do tratamento com as demais.	<b>114</b>
<b>Tabela 6</b>	Valores de p do grupo SCBDC, comparando-se as imagens de sensibilização, tratamento e desafio com a imagem basal.	<b>115</b>

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

### Unidades de medida

°C	Graus <i>Celsius</i>
cm	Centímetro
M	Molar
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
kBq	Quilo Bequerel
µm	Micrômetro

### Abreviaturas

[ <sup>18</sup> F]FDG	[18F]-fluorodeoxiglicose
Δ <sup>9</sup> -THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
2-AG	2-aracdonoilglicerol
AEA	Anandamida
AKT	Proteína quinase B
BDNF	Fator neurotrópico derivado do cérebro
CBD	Canabidiol
CCBDC	Grupo sensibilizado com cocaína, tratado com canabidiol e desafiado com cocaína
CCBDS	Grupo sensibilizado com cocaína, tratado com canabidiol e desafiado com salina
CPF	Córtex pré frontal
CPP	Preferência condicionada por lugar
CSC	Grupo sensibilizado com cocaína, tratado com veículo e desafiado com cocaína
CSS	Grupo sensibilizado com cocaína, tratado com veículo e desafiado com salina

CYP450	Citocromo P450
D <sub>1</sub> R	Receptor dopaminérgico do tipo 1
D <sub>2</sub> R	Receptor dopaminérgico do tipo 2
DAGL	Diacilglicerol-lipase
DSE	Supressão da excitação glutamatérgica induzida pela despolarização
DSI	Supressão da inibição GABAérgica induzida pela despolarização
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FAAH	Amina hidrolase de ácidos graxos
FLC $\beta$	Fosfolipase C-beta
GFAP	Proteína glial fribilar ácida
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
Iba1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAGL	Monoacilglicerol lipase
MAPK	Proteína quinase ativa por mitógenos
MRI	Imagem de ressonância magnética
NAPE	N-araquidonilfosfatidiletanolamina
NAc	Núcleo accumbens
NAPE-PLD	N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina-fosfolipase-D
NAT	N-aciltransferase
NeuN	Proteína nuclear neuronal
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PPAR $\gamma$	Receptores protetores gama ativados por proliferadores de peroxissoma
SCBDC	Grupo sensibilizado com salina, tratado com canabidiol e desafiado com cocaína

SCBDS	Grupo sensibilizado com salina, tratado com canabidiol e desafiado com salina
SNC	Sistema nervoso central
SNc	Substância negra <i>pars compacta</i>
SNr	Substância negra reticular
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
SSC	Grupo sensibilizado com salina, tratado com veículo e desafiado com salina
SSS	Grupo sensibilizado com salina, tratado com veículo e desafiado com salina
SUV	<i>Standardized Uptake Value</i>
VOI	Região de interesse
VTA	Área ventral do tegmento mesencefálico

## SUMÁRIO

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO.....	22
Capítulo 2 – REVISÃO DE LITERATURA .....	25
2.1. Epidemiologia.....	26
2.2. Cocaína .....	30
2.3. Adicção .....	33
2.3.1. Teoria da Sensibilização do Incentivo .....	37
2.4. Sistema endocanabinoide .....	41
2.5. Canabidiol.....	47
2.6. Imagem de Tomografia por Emissão de Pósitrons.....	51
CAPÍTULO 3 - OBJETIVO.....	54
3.1. Estratégias experimentais.....	55
CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1. Animais .....	57
4.2. Substâncias .....	57
4.2.1. Cocaína.....	57
4.2.2. CBD .....	58
4.3. Desenho experimental.....	58
4.4. Avaliação comportamental.....	59
4.5. Imagem PET.....	60
4.6. Imuno-Histoquímica.....	61
4.7. Análise estatística.....	63
CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	65
5.1. Desenho experimental.....	66
5.2. Resultados.....	67
5.3. Discussão .....	73
5.4. Conclusão.....	77
CAPÍTULO 6 – PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE IMAGEM PET COM [ <sup>18</sup> F]FDG E VERIFICAÇÃO DO EFEITO DA COCAÍNA NO METABOLISMO ENCEFÁLICO DE GLICOSE .....	78
6.1. Delineamentos experimentais.....	79
6.1.1. Avaliação da resposta à cocaína por imagem PET.....	79
6.1.2. Teste dos momentos de injeção de cocaína e [ <sup>18</sup> F]FDG .....	80

6.1.3. Avaliação da interferência do metabolismo periférico na captação encefálica de [ <sup>18</sup> F]FDG .....	81
6.2. Resultados.....	83
6.2.1. Teste da avaliação da resposta à cocaína na imagem PET .....	83
6.2.3. Teste dos momentos de injeção de cocaína e [ <sup>18</sup> F]FDG .....	85
6.2.4. Avaliação da interferência do metabolismo periférico na captação encefálica de cocaína.....	89
6.3. Discussão .....	98
6.4. Conclusão.....	103
<b>CAPÍTULO 7 – EFEITO DO CANABIDIOL NAS ALTERAÇÕES DO METABOLISMO ENCEFÁLICO DE GLICOSE INDUZIDAS PELA COCAÍNA .....</b>	<b>104</b>
7.1. Desenho experimental.....	105
7.2. Resultados.....	106
7.2.1. Imagem PET com [ <sup>18</sup> F]FDG .....	106
7.2.2. Imuno-histoquímica.....	117
7.3. Discussão .....	144
7.4. Conclusão.....	156
<b>CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>157</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>159</b>
Anexo 1 .....	184
Anexo 2 .....	185
Anexo 3 .....	186
Anexo 4 .....	187

## *Capítulo 1 - Introdução*

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Substâncias psicoativas são assim denominadas por sua capacidade de alterar o estado homeostático da mente. A utilização dessas substâncias faz parte da natureza humana, desde os primórdios das civilizações. As civilizações antigas utilizavam plantas e fungos enteógenos, sobretudo para fins místicos, religiosos e curativos. Com o passar do tempo e o desenvolvimento científico-tecnológico, moléculas psicoativas passaram a ser isoladas de suas fontes naturais e tornaram-se base para a síntese de compostos semissintéticos e sintéticos, utilizados principalmente para fins recreativos.

A utilização de substâncias psicoestimulantes, sobretudo cocaína, está em expansão nas Américas, na Europa Ocidental e na Oceania, sendo um preocupante problema de saúde pública. Dentre as principais consequências do uso indiscriminado dessa substância, está o transtorno por uso de cocaína, no qual a droga é utilizada mesmo que isto esteja sendo danoso ao bem-estar do indivíduo. Os principais fatores associados à cronicidade desta doença são as alterações neuroquímicas e de plasticidade induzidas no sistema nervoso central (SNC) pela droga.

Apesar de diversos fármacos serem utilizados para o tratamento do transtorno por uso de cocaína, não há nenhuma substância específica aprovada para esta finalidade, sendo o tratamento farmacológico apenas sintomático. Assim, na busca por novos alvos farmacológicos surgiu grande interesse científico em substâncias que atuam no sistema endocanabinoide, o qual participa dos mecanismos de plasticidade subjacentes ao uso abusivo de diferentes substâncias, devido à sua ação neuromoduladora.

O canabidiol (CBD), o segundo canabinoide mais abundante da *Cannabis sativa*, possui propriedades ansiolíticas, antidepressivas, antipsicóticas e neuroprotetoras sem a presença de efeitos psicoativos. Em função disso, o CBD passou a ser estudado como uma alternativa terapêutica para diferentes doenças neuropsiquiátricas, dentre elas, os transtornos por uso de substâncias. Estudos recentes mostraram que o CBD é eficaz em atenuar ou inibir fatores neurobiológicos associados à motivação, condicionamento, recaídas e manutenção do uso descontrolado de drogas de abuso, tanto psicoestimulantes quanto depressoras do SNC.



A presente tese será apresentada na forma de 8 capítulos, sendo os quatro primeiros relativos, à introdução, revisão de literatura, objetivo, e materiais e métodos. Os três capítulos seguintes (5, 6 e 7) contemplarão as três partes experimentais executadas ao longo do doutorado e cada um contará com o delineamento experimental correspondente, resultados, discussão e conclusões. Por fim, o último capítulo refere-se às considerações finais do trabalho.

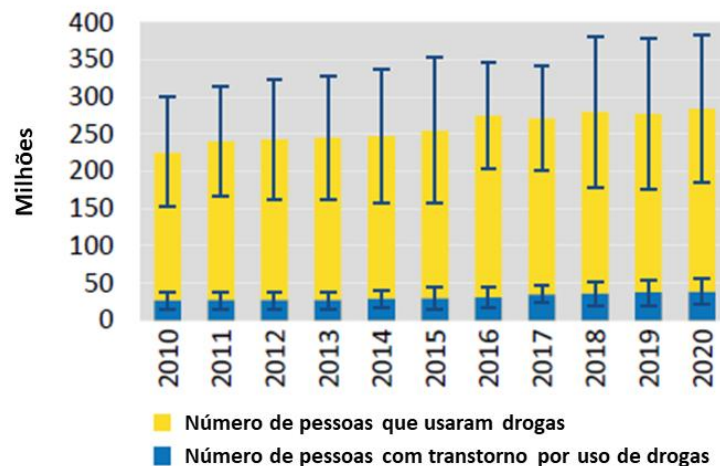
*Capítulo 2 - Revisão de  
Literatura*

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Epidemiologia

De acordo com o último Relatório Mundial sobre Drogas (*World Drug Report*) publicado pelas Nações Unidas sobre o consumo de drogas de abuso (Figura 1), 5,6% da população mundial entre 15 e 64 anos, ou seja, aproximadamente 284 milhões de pessoas, utilizaram alguma droga ilícita em 2020, representando um aumento de 26% em 10 anos. Deste total, mais de 36 milhões de pessoas, apresentam transtorno por uso de substâncias, ou seja, utilizam drogas de forma descontrolada e prejudicial, necessitando de intervenção terapêutica (UNODC, 2022).

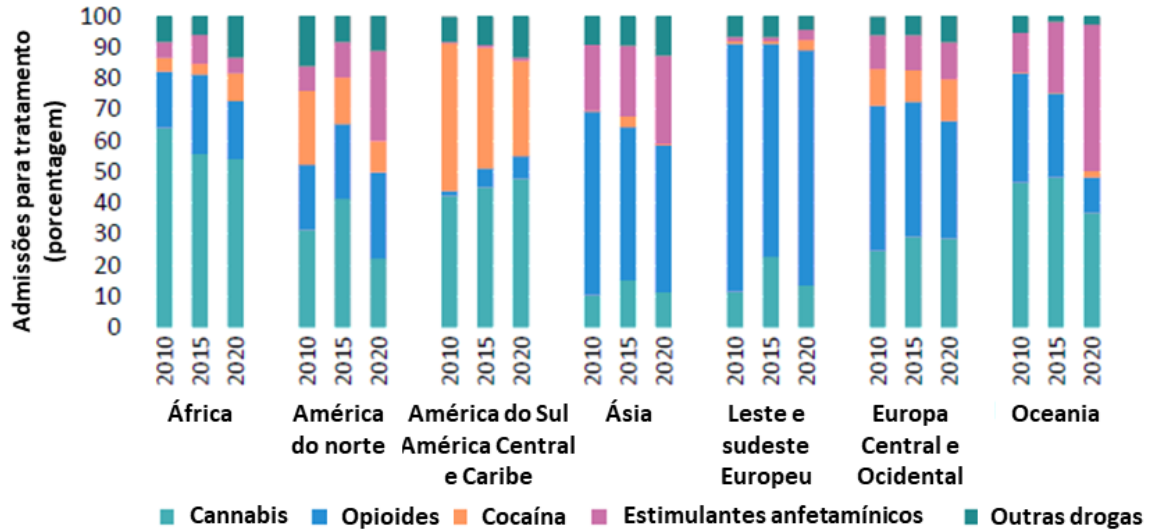
Figura 1. Estimativa da tendência global do número de usuários (milhões) de drogas e de usuários com transtorno por uso de substâncias no período de 2010-2022.



Fonte: Adaptado de UNODC (2022).

Ao analisar a proporção de indivíduos admitidos para o tratamento dos transtornos por uso de substâncias, observa-se que a Cannabis permanece um problema comum a todos os continentes, enquanto opioides são um fator mais relevante para os continentes Asiático e Europeu, e em menor escala na Oceania e na América do Norte, nas quais há também a problemática dos psicoestimulantes derivados de anfetamina. Na América Latina e no Caribe há um padrão distinto, no qual a grande problemática é a cocaína. Segundo o *Global Burden of Disease Study* realizado em 2019, 42 milhões de anos de vida e 585 mil vidas foram perdidos em decorrência do uso de drogas.

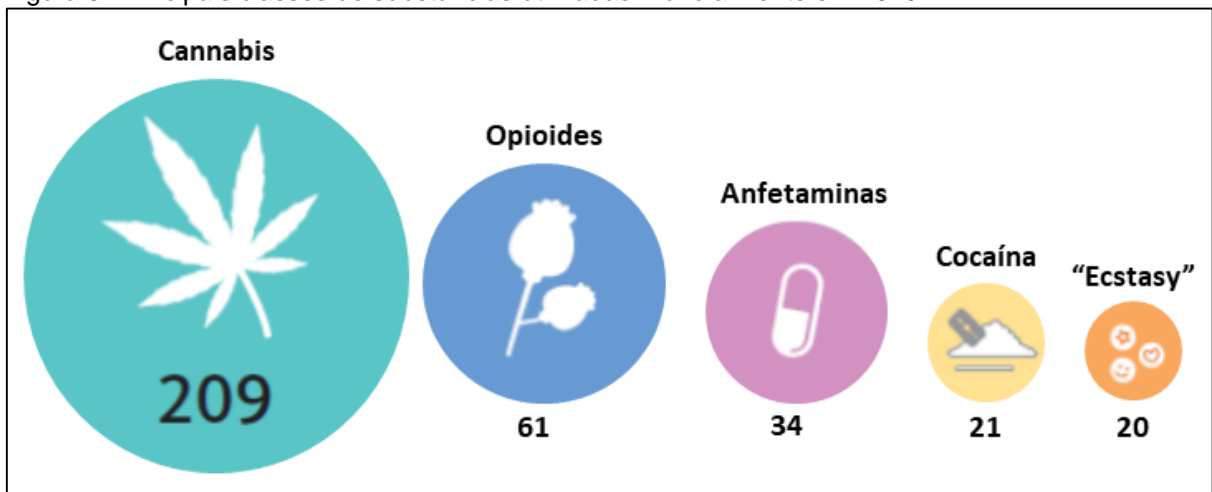
Figura 2: Tendência da busca por tratamento de transtorno por uso de substâncias por região em 2010, 2015 e 2020.



Fonte: adaptado de UNODC (2022).

Os números absolutos das principais substâncias ou classes de substâncias utilizadas em 2020 estão apresentados na Figura 3. A *Cannabis sativa* permaneceu em 2022 como a droga mais utilizada, contando com 209 milhões de usuários. Em seguida vieram os opioides, os quais permanecem sendo a classe de drogas mais letais dentre as avaliadas pelo relatório, tendo sido utilizados por 61 milhões de pessoas. Em seguida, estão os psicoestimulantes, com predomínio de anfetaminas e derivados anfetamínicos (34 milhões de usuários), seguidos pela cocaína (21 milhões de usuários) e pelo ecstasy (20 milhões de usuários).

Figura 3: Principais classes de substâncias utilizadas mundialmente em 2020.

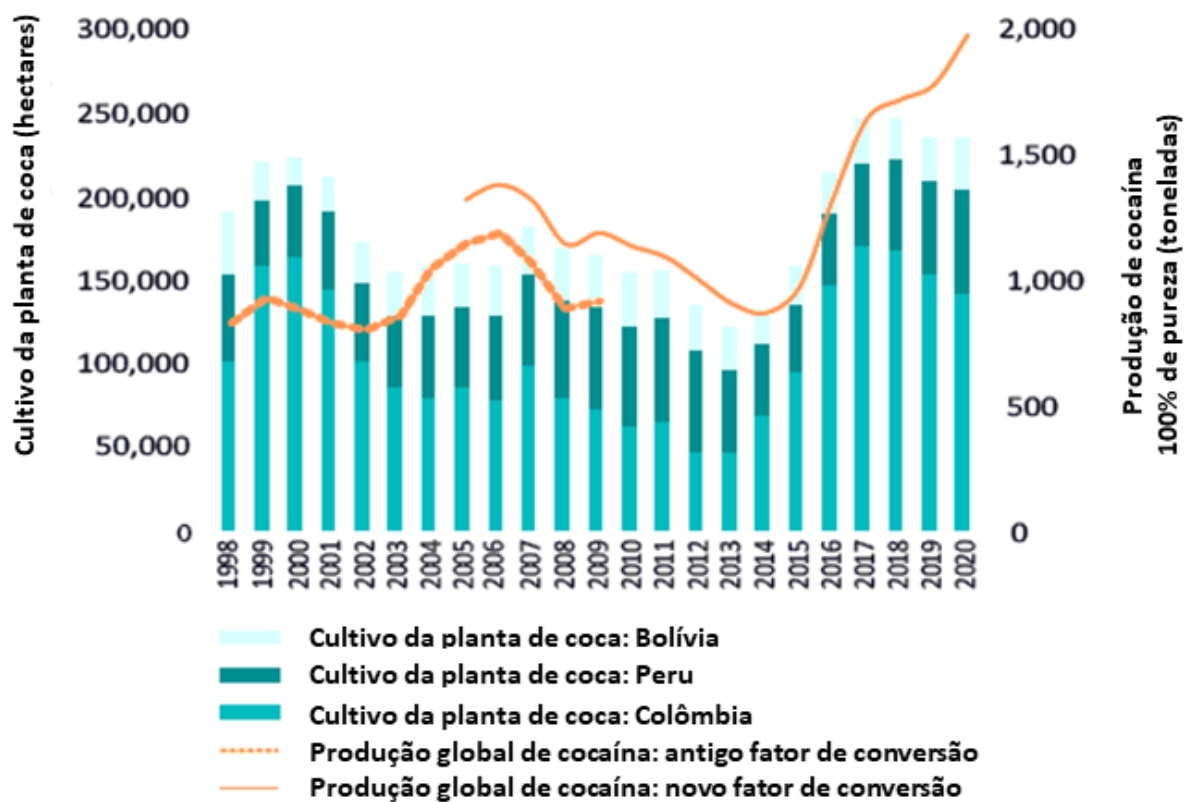


Número mundial de usuários de Cannabis (209 milhões), opioides (61 milhões), anfetaminas (34 milhões), cocaína (21 milhões) e ecstasy (20 milhões) no ano de 2020, considerando a faixa etária de 15 a 64 anos.

Adaptado de UNODC (2022).

Considerando a cocaína, a tendência observada nos últimos 10 anos é a expansão do mercado mundial dessa substância inclusive nos continentes africano e asiático, mercados não tradicionais da droga (UNODC, 2022). Cocaína é a droga de escolha, depois da Cannabis, nos países da América Central, do Sul e Caribe, além de apresentar grandes mercados na América do Norte, Europa Ocidental e Oceania (UNODC, 2022). Em relação às Américas, a América do Sul concentra os principais países produtores da droga, e conta com 2,7 milhões de usuários, sendo Argentina, Brasil e Chile os principais consumidores (UNOOC, 2019). Além disso, é nesta região onde as maiores quantidades de cocaína foram apreendidas em 2020. Conforme observado na Figura 4, apesar de não ter havido um aumento absoluto da área de cultivo da planta de coca, a quantidade de cocaína apreendida em 2020 foi a mais alta já reportada e correlacionou-se ao aumento da produção da droga, a qual aumentou 11% em relação ao ano anterior e mais do que dobrou em relação a 2014, alcançando um novo recorde (UNODC, 2022).

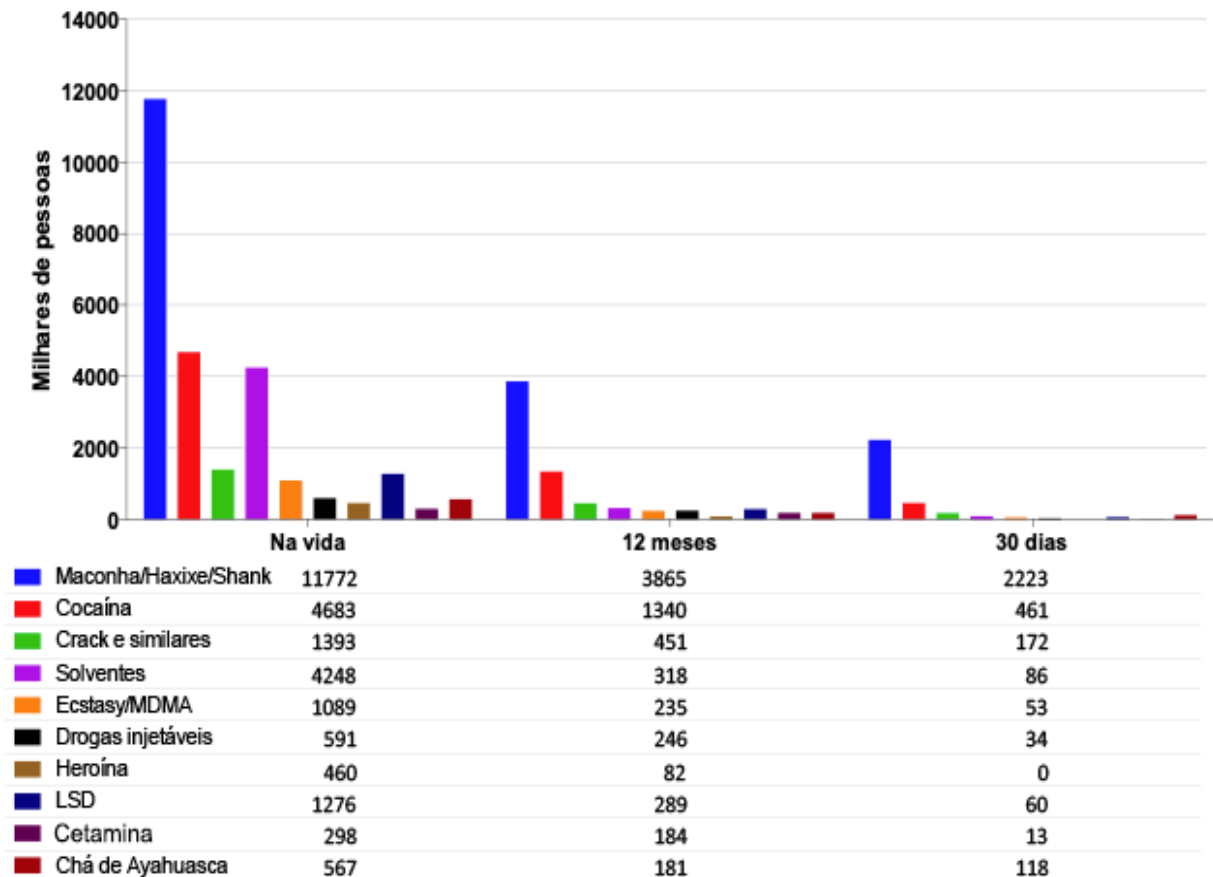
Figura 4: Cultivo e produção globais de cocaína no período de 1998-2020.



Adaptado de UNODC (2022).

No Brasil, os dados do III Levantamento Nacional sobre Uso de Drogas publicado pela Fundação Oswaldo Cruz em 2017 (BASTOS et al., 2017) indicam que a cocaína na forma de cloridrato foi a segunda droga ilícita mais utilizada pela população brasileira, e, seguindo a tendência mundial, a *Cannabis* foi a droga predominante (Figura 5). Conforme descrito na Figura 6, verificou-se que 3,1% dos brasileiros de 12 a 65 anos, ou seja, mais de 2 milhões de pessoas utilizaram cocaína em pó alguma vez na vida. Além disso, 1,3 milhões de indivíduos consumiram a droga nos 12 meses anteriores à pesquisa e mais 461 mil indivíduos utilizaram nos 30 dias anteriores. A cocaína na forma de *crack*, por sua vez, foi utilizada por 1,4 milhões de brasileiros alguma vez na vida; por aproximadamente 451 mil nos 12 meses anteriores à pesquisa; e por 172 mil nos 30 dias anteriores. É preciso ressaltar que estes dados, sobretudo para o *crack* são subestimados, uma vez que a base de coleta de dados utilizada foi questionário domiciliar, o qual não atingiu o grande número de usuários que se encontram em situação de rua.

Figura 5: Prevalência do uso de substâncias ilícitas na vida pela população brasileira de 12 a 65 anos, nos 12 meses e nos 30 dias anteriores à coleta de dados.



Adaptado de III LENUD (2017).

## 2.2. Cocaína

A benzoilmetilecgonina ou cocaína é um alcaloide psicoestimulante presente em plantas do gênero *Erythroxylum*, sobretudo da espécie *Erythroxylum coca*. A planta de coca possui aproximadamente 18 alcaloides classificados como terpenos, pirolidinas e piridinas, todos consideravelmente menos tóxicos do que a cocaína e sem propriedades euforizantes. Estas resultam das propriedades simpatomiméticas indiretas da cocaína, as quais lhe conferem a capacidade de estimular o sistema nervoso simpático via inibição dos transportadores de monoaminas (KOOB; LE MOAL, 2006).

Nas civilizações centro e sulamericanas pré-colombianas a coca foi utilizada culturalmente ao longo de muitas gerações em rituais místicos, religiosos e na medicina popular. De fato, essa foi a planta mais utilizada por tais populações com intuito curativo, seja por meio do consumo das folhas (mastigação), em pó, ou na forma de chás e sucos (GRINSPOON; BAKALAR, 1981). Na Europa e nos Estados Unidos o interesse nas propriedades da folha de coca emergiu na primeira metade do século XIX, porém declinou rapidamente após o isolamento da cocaína em 1859, por Albert Niemann, a qual tornou-se uma molécula de grande interesse sócio-econômico (BIONDICH; JOSLIN, 2016).

Em 1884 dois eventos alteraram significativamente o padrão de uso da cocaína. O primeiro foi a publicação “on Coca” de Sigmund Freud em 1888, recomendando o uso da cocaína para o alívio de diferentes condições, incluindo doenças neuropsiquiátricas (SILVA et al., 2010). O segundo, foi a introdução da substância em cirurgias oculares como anestésico local, por Karl Koller (GAY et al., 1975). Assim, entre os anos de 1890 e 1914 a cocaína passou a integrar a indústria de consumo e inseriu-se na sociedade como uma droga de abuso (GAY et al., 1975). O declínio do uso da cocaína ocorreu em 1914, após o *Harrison Narcotic Act*, o qual proibiu a posse e a venda da substância e com contribuição da popularização das anfetaminas. Apenas na década de 1970, o uso de cocaína tornou-se recorrente, sobretudo devido ao advento do *crack* (KOOB; LE MOAL, 2006).

A cocaína utilizada como droga de abuso deriva da pasta de coca, e está presente em duas formas químicas principais, cujas propriedades físico-químicas e toxicodinâmicas são distintas e relacionadas às diferentes vias de administração da droga. Há o cloridrato de cocaína, um pó branco, cristalino, solúvel em água e com

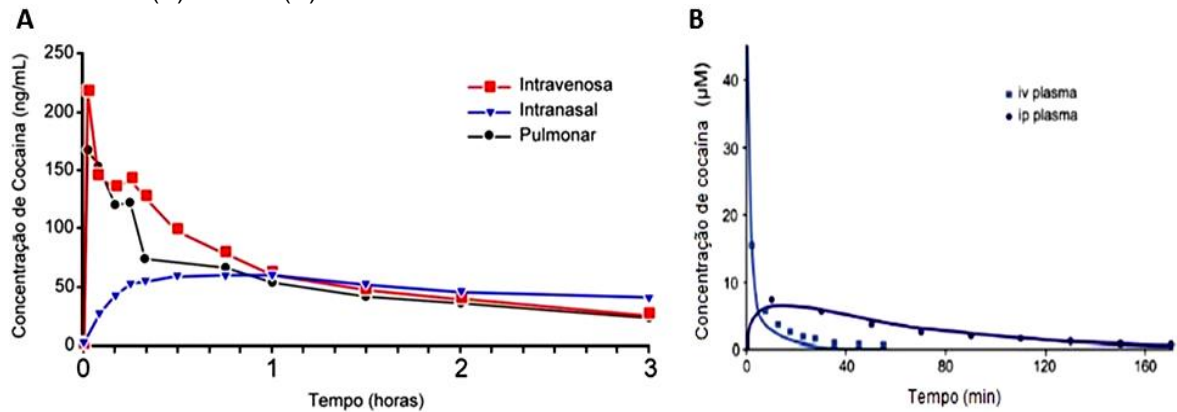
elevado ponto de fusão, o que favorece as administrações intranasal e intravenosa. É a cocaína base, a qual se apresenta como base livre ou *crack*. O *crack* é formado pela adição de água e bicarbonato de sódio ou amônia ao cloridrato de cocaína e extração utilizando solvente, geralmente éter. Originam-se massas sólidas com baixo ponto de fusão, o que propicia o aquecimento e a administração da droga pela via pulmonar (FARRAR; KEARNS, 1989; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

A absorção da cocaína ocorre pelas mucosas nasal, oral e intestinal e pelos pulmões e, uma vez absorvida, a molécula é biotransformada por hidrólise enzimática e não enzimática. A hidrólise pela enzima colinesterase hepática origina a benzoilecgonidina, o metabólito mais abundante; enquanto a hidrólise plasmática pela bunitilcolinesterase origina a metilecgonina (WHITE; LAMBE, 2003). Os parâmetros farmacocinéticos da droga variam conforme diferentes cenários clínicos, como quantidade de droga consumida, via de administração utilizada, uso concomitante de diferentes drogas/fármacos e polimorfismos genéticos. Em geral, os picos plasmáticos ocorrem de 2 a 5 segundos após a aplicação intravenosa ou pela via pulmonar, enquanto na intranasal há um aumento lento e gradual na concentração plasmática ao longo de 30 a 60 minutos (CONE, 1995). O uso recreacional associa-se, geralmente, às concentrações plasmáticas de 0,5 a 5  $\mu\text{M}$ , porém 120  $\mu\text{M}$  já foram relatados (GUHA; HARRAZ; SNYDER, 2016). A meia vida de eliminação varia em torno de 0,7 a 1,5h; porém a droga pode ser detectada no fluído ocular, no encéfalo e no fígado até 8 horas após a administração (BOGHDADI; HENNING, 1997).

Os parâmetros farmacocinéticos da droga e o intervalo entre as administrações determinarão o quanto da dose administrada chegará ao SNC para gerar os efeitos neurológicos. Assim, as diferentes vias de administração associam-se a um perfil toxicocinético particular, uma vez que determinam o quanto da dose administrada será absorvida (Figura 6) e o quanto e quão rápido a substância alcançará o encéfalo (ALLAIN et al., 2015). Quanto mais rápido a droga alcança o SNC, maior é o pico plasmático gerado, maior o grau de euforia relatado pelos usuários e maior a capacidade de induzir dano cognitivo e gerar transtornos de uso (CONE, 1995; OLIVEIRA et al., 2018; VOLKOW et al., 2000). Assim, indivíduos que utilizam vias que promovem picos plasmáticos mais rapidamente utilizam a droga com maior frequência e por maiores períodos.



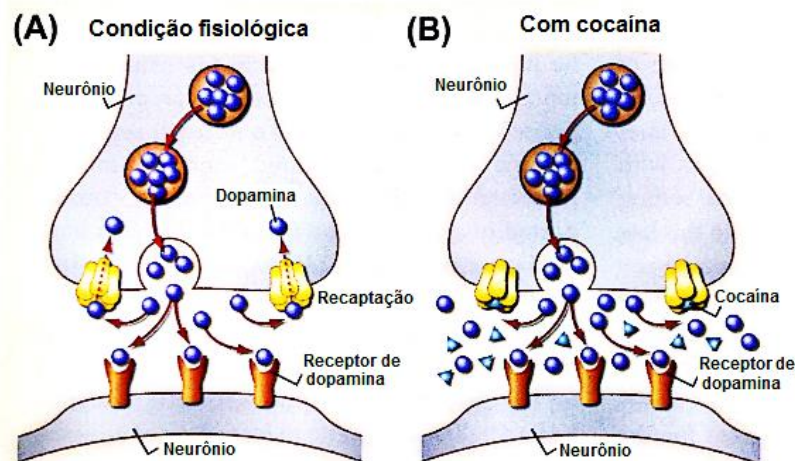
Figura 6: Concentração plasmática de cocaína em função do tempo conforme a via de administração em humanos (A) e ratos (B).



A: administrações intravenosa, intranasal e pulmonar. B: administrações intravenosa e intraperitoneal. Fonte: adaptado de Cone et al (1995) e Alain et al (2015).

A cocaína possui duas ações farmacológicas. É anestésico local, devido à inibição de canais de sódio dependentes de voltagem, efeito cuja duração varia de 20 a 40 minutos (GAY et al., 1975). Contudo, a principal ação farmacológica, responsável por seus efeitos no SNC, é o bloqueio dos transportadores de dopamina, serotonina e noradrenalina, aumentando a quantidade extracelular destas moléculas e promovendo os efeitos psicoestimulantes de euforia buscados pelos usuários (DI CHIARA; IMPERATO, 1988), conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7: Mecanismo de ação da cocaína no SNC.



A cocaína bloqueia a recaptação de monoaminas, como a dopamina, aumentando sua concentração na fenda sináptica. (A) Funcionamento fisiológico da sinapse dopaminérgica. (B) Bloqueio do transportador de dopamina (DAT) pela cocaína, aumentando as concentrações de dopamina. Fonte: adaptado de KOOB (2014).

Apesar do bloqueio da recaptação ser equipotente para as três monoaminas, sabe-se que é o bloqueio do transportador de dopamina (DAT) o fator primordial para o transtorno por uso de cocaína (ZEHRÁ et al., 2018). A interação da cocaína com o

sistema noradrenérgico é responsável pelos efeitos simpatomiméticos de aumento da pressão arterial, aumento da frequência cardiorrespiratória e da temperatura corporal, gerando risco de morte por acidentes cerebrovasculares ou infarto agudo do miocárdio (GILLIS et al., 1995).

### **2.3. Adicção**

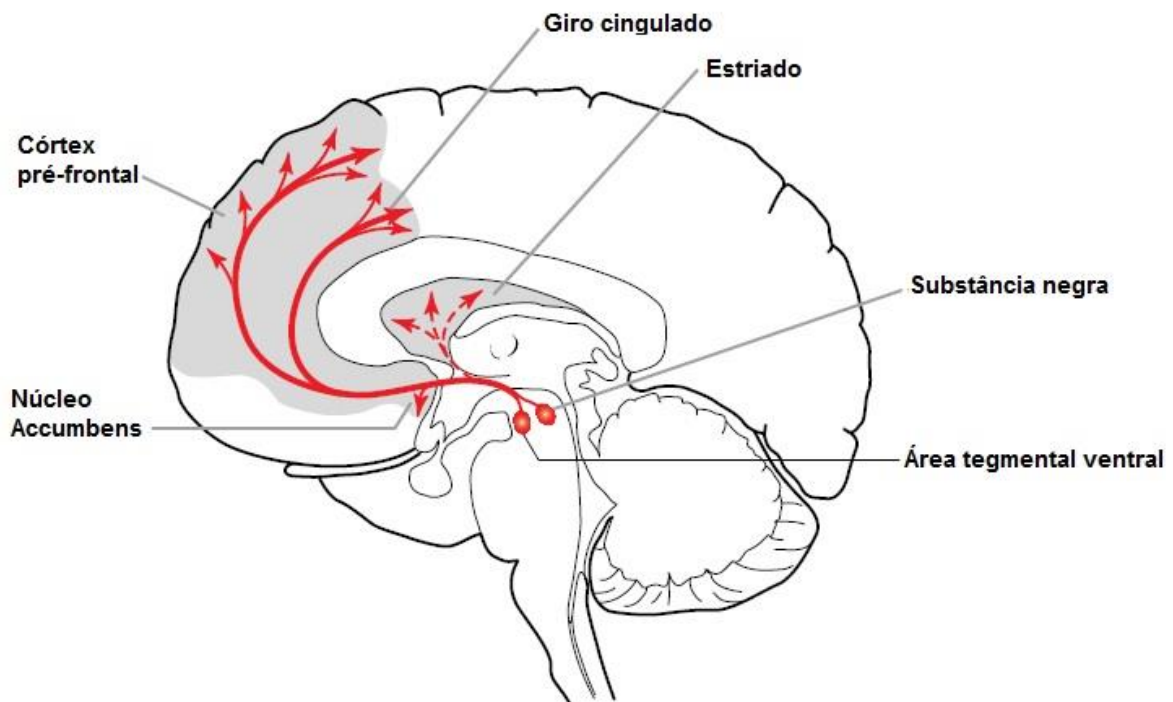
A adicção é uma doença crônica e cíclica, caracterizada pela compulsão para buscar e consumir determinada substância, perda do controle sobre a quantidade administrada e início de um estado físico-emocional negativo quando o acesso à substância é privado (KOOB; VOLKOW, 2016). A partir do lançamento do DSM-5, para fins diagnósticos, passou-se a utilizar o termo “transtorno por uso de substâncias”, o qual corresponde à fusão dos conceitos “abuso” e “dependência de substâncias”, sendo a adicção o estágio grave desse transtorno (American Psychiatric Association, 2013; KOOB; VOLKOW, 2016).

A transição do uso casual de determinada substância para a adicção é um fenômeno complexo, caracterizado por alterações de plasticidade em diferentes circuitos encefálicos (KOOB; VOLKOW, 2010). A adicção culmina da associação entre fatores genéticos e ambientais que determinarão a resposta do encéfalo do indivíduo à presença constante da droga (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006). Diversos são os endofenótipos que tornam determinados indivíduos mais propícios ao uso compulsivo de drogas, como alterações em estruturas e circuitos encefálicos, traços de personalidade (ERSCHE et al., 2011a, 2011b, 2012a, 2012b, 2013), precocidade do início do uso de substâncias (VOLKOW; KOOB; MCLELLAN, 2016) e mecanismos genéticos e epigenéticos (NESTLER, 2014).

Apesar das drogas de abuso possuírem diferentes alvos no SNC todas elas convergem para algumas ações comuns. O substrato neurobiológico para a administração repetida da droga é a ativação do sistema de recompensa, o qual é naturalmente ativado no organismo pelas recompensas naturais, como alimentos e sexo. As drogas, contudo, ativam esse sistema de maneira mais intensa, de forma que sua presença constante no organismo “sequestra-o”, causando alterações celulares, moleculares e plásticas que culminam em alterações comportamentais (STEKETEE; KALIVAS, 2011).

Esse sistema consiste na via mesolímbica dopaminérgica, formada por corpos celulares de neurônios dopaminérgicos localizados na área ventral do tegmento mesencefálico (VTA) que se projetam para o núcleo accumbens (NAc). Enquanto a conexão é relevante durante as fases iniciais da aquisição da adicção, as vias nigroestriatal e mesocortical apresentam importante papel quando o consumo compulsivo está consolidado (BELIN; EVERITT, 2008; GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002). A via nigroestriatal é composta por corpos celulares localizados na substância negra *pars compacta* (SNc) que se projetam para o estriado dorsal e para a região *core* do NAc; enquanto a mesocortical compreende corpos celulares da VTA e se projetam para o córtex pré-frontal (CPF) (WISE, 2009). A Figura 8 mostra as conexões dopaminérgicas envolvidas na adicção.

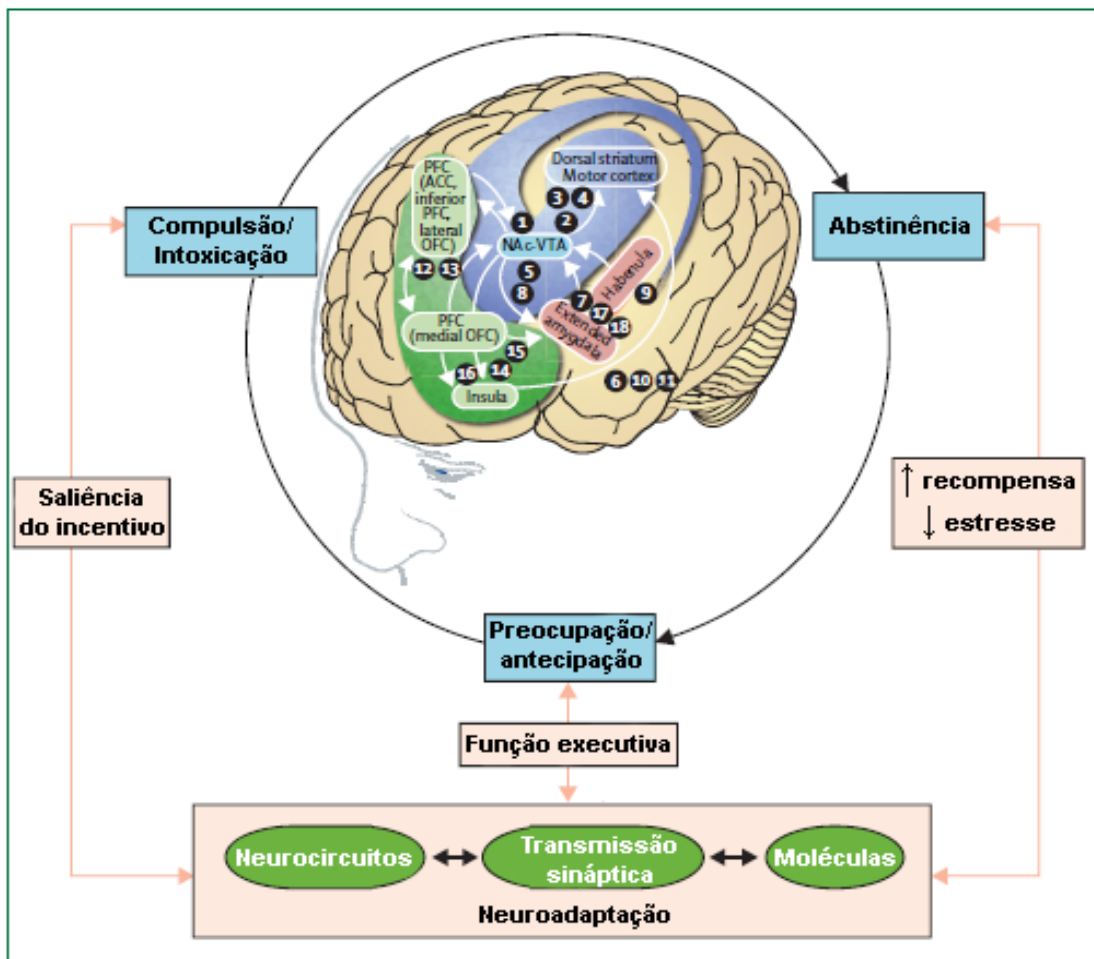
Figura 8: Projeções dopaminérgicas ao prosencéfalo.



Observam-se as projeções dopaminérgicas relevantes à adicção, a saber: via mesolímbica (da VTA ao Nac); via mesocortical (da VTA ao CPF); e via nigroestriatal (da substância negra ao estriado).  
Fonte: adaptado de HYMAN, MALENKA e NESTLER (2006).

A adicção pode ser entendida como um processo cíclico composto por três estágios (Figura 9): i. compulsão/intoxicação, caracterizada pelo aumento na saliência do incentivo; ii. abstinência, caracterizada por decréscimo da recompensa e aumento do estresse; iii. preocupação/antecipação, caracterizada pelo comprometimento da função executiva (UHL; KOOB; CABLE, 2019).

Figura 9: Modelo da interação entre os principais circuitos neuronais relacionados à neurobiologia da adicção.



Compulsão/intoxicação, azul (recompensa e saliência de incentivo: gânglios da base). Abstinência, rosa (estado físico e emocional negativo: amígdala e habenula). Preocupação/antecipação, verde (fissura, impulsividade e função executiva: insula e córtex). Cada número refere-se a um circuito neuronal associado às alterações que contribuem para o estado alostático da adicção. PFC: córtex pré-frontal; ACC: córtex cingulado anterior; OFC: cortex orbitofrontal; NAc-VTA: núcleo accumbens-área tegmental ventral.

Fonte: adaptado de Koob & Volkow (2016).

O uso inicial de uma droga deriva do reforço positivo, associado à sensação hedônica de prazer que a substância promove, oriunda do aumento da liberação de dopamina no estriado ventral (MALDONADO; ROBLEDO; BERRENDERO, 2013). Estudos de neuroimagem indicam que isto se correlaciona à interação da dopamina com os receptores dopaminérgicos do tipo 1 ( $D_1R$ ) (VOLKOW; FOWLER; WANG, 2003). Este é um dos gatilhos para a indução de mecanismos de plasticidade sináptica em regiões associadas ao aprendizado e à memória, que gerarão, por mecanismos de condicionamento, uma resposta associativa entre o contexto relacionado ao consumo da droga e uma experiência prazerosa, gerando o desejo de repetir esta experiência (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002; VOLKOW; BALER, 2014).

Conforme o uso da droga persiste, os neurônios dopaminérgicos começam a disparar não só devido à recompensa, mas também preditivamente, em função das pistas ambientais (VOLKOW et al., 2009). Logo, os estímulos ambientais associados à droga deixam de ser neutros e tornam-se capazes de antecipar a recompensa, induzindo o desejo de utilizar a droga e desencadeando a busca pela substância (BERRIDGE; ROBINSON, 2016; VOLKOW; MORALES, 2015). Conforme o uso da droga torna-se frequente, a ativação constante do estriado ventral ativa, por sua vez, a conexão em *loop* estriatal-palidal-talamocortical, via receptores glutamatérgicos (BELIN; EVERITT, 2008; EVERITT; GIULIANO; BELIN, 2018). Essa conexão ativa o estriado dorsal, sendo responsável pelo desenvolvimento do comportamento compulsivo, no qual o uso da droga deixa de ser um comportamento direcionado, modulado pelo CPF, passando a se tornar um hábito regulado pelas regiões subcorticais (BELIN et al., 2013).

A retirada da droga inicia o período de abstinência, no qual as alterações neuroquímicas induzidas pelo estado de alostase no encéfalo se manifestam (KOOB; VOLKOW, 2010). Logo, a ausência da droga origina sinais físicos e emocionais de irritabilidade, disforia, perda de motivação, estresse, anedonia e fissura. Estas sensações desagradáveis são reforçadoras negativas, ou seja, o indivíduo pode administrar a droga a fim de cessar esta experiência indesejada (KOOB; MOAL, 2005, 2008; LE MOAL; KOOB, 2007).

Este período é consequência da alteração neuroquímica em diferentes sistemas. Há hiperativação dos sistemas “antirrecompensa” e de reatividade ao estresse, associados principalmente às regiões de habenula e amígdala (JENNINGS et al., 2013; TIAN et al., 2022). Também ocorrem neuroadaptações no sistema endocanabinoide, o qual naturalmente se contrapõe ao sistema de estresse, prejudicando o efeito modulatório na neurotransmissão (GUNDUZ-CINAR et al., 2012). Neuroquimicamente, há aumento da secreção de fator liberador de corticotropina (CRF), orexina, dinorfina e substância P; enquanto os neurotransmissores associados à recompensa estão diminuídos (KOOB et al., 2015; WISE; KOOB, 2014). Essas alterações geram dessensibilização dos circuitos de recompensa, diminuindo sua resposta tanto às drogas quanto às recompensas naturais (VOLKOW; KOOB; MCLELLAN, 2016). Isso significa que o consumo da droga durante a adicção promove menos liberação de dopamina e, portanto, menor sensação hedônica de prazer, do que quando o uso da droga era controlado (UHL;

KOOB; CABLE, 2019). O mesmo ocorre no que diz respeito à obtenção de recompensas naturais, sendo este o substrato patológico da falta de motivação.

O estágio de preocupação/antecipação é o período caracterizado por intensa fissura e busca compulsiva pela droga, que antecede a recaída. Esta etapa é caracterizada principalmente pela falha da função executiva do CPF, devido à hipofunção das regiões pré-frontais lateral, inferior e cíngulo anterior (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2011). Conseqüentemente, há falha dos mecanismos de controle inibitório e déficits no processamento de informações, atenção, planejamento e raciocínio (BECHARA et al., 2019). Logo, comportamentos conduzidos por estímulos, que normalmente seriam monitorados e suprimidos, são acentuados, como a impulsividade (PARVAZ et al., 2011). Essa falha no controle executivo por parte do CPF está associada, dentre outros mecanismos, às alterações plásticas que afetam a liberação de glutamato e dopamina, principalmente nas projeções do CPF para o estriado (KALIVAS, 2009).

Atualmente, a abordagem psicossocial permanece sendo o tratamento de escolha para o transtorno por uso de cocaína, sendo uma abordagem multidisciplinar com ações preventivas, grupos de autoajuda, acompanhamento psicológico e familiar, reabilitação neuropsicológica e redução de danos (KAMPMAN, 2019). Até o momento, não há nenhum fármaco específico aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento, então a farmacoterapia é apenas sintomática, com o objetivo de tratar as comorbidades e prevenir as recaídas (BRANDT et al., 2020). O grande problema é que o tamanho de efeito dessa abordagem não é grande, sendo o tratamento ineficaz para grande parte dos pacientes, de forma que muitos recaem ao uso da cocaína. Portanto, a investigação de novos agentes farmacológicos para uso no tratamento do transtorno por uso de cocaína é essencial.

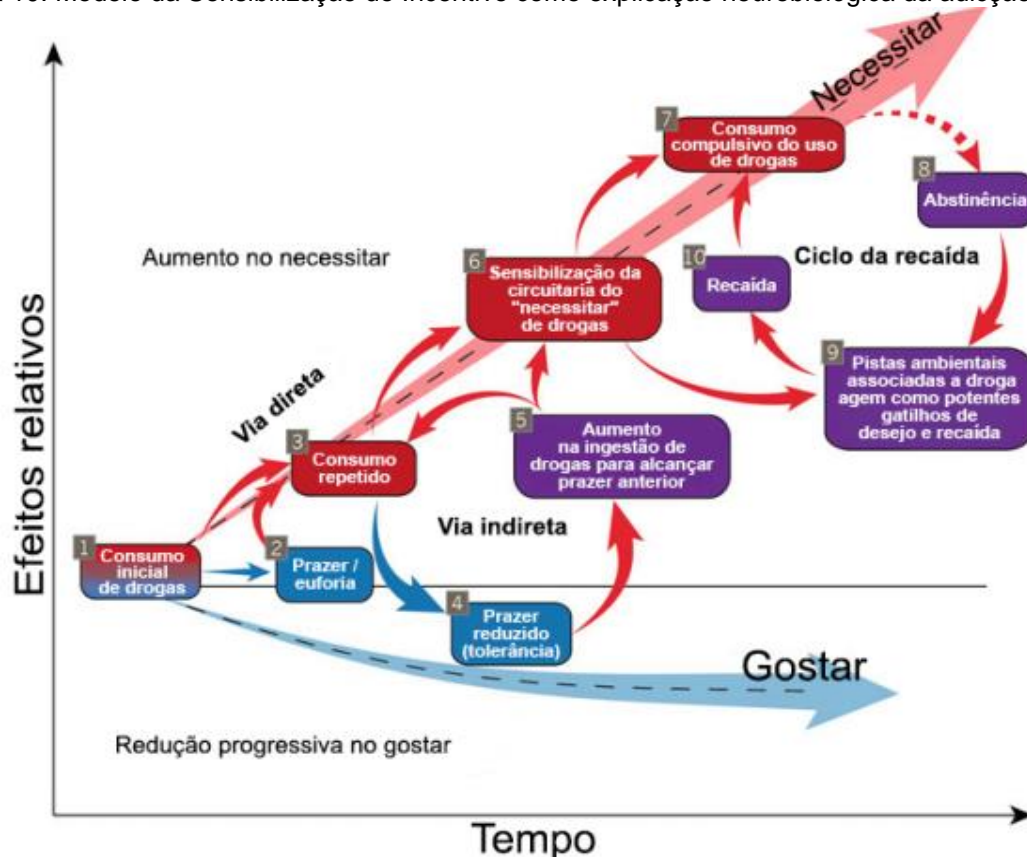
### **2.3.1. Teoria da Sensibilização do Incentivo**

Robinson e Berridge (1993) propuseram a teoria da Sensibilização do Incentivo, que constitui uma das bases neurobiológicas da transição do uso controlado de drogas para o estabelecimento da adicção. Segundo a proposta, a exposição repetida às drogas causa plasticidade nos circuitos encefálicos relacionados à atribuição de saliência aos estímulos, tornando-os hipersensíveis à droga e, por aprendizado condicionado, aos estímulos associados a ela (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). A

ativação desses sistemas sensibilizados torna a droga patologicamente atrativa e desejada pelo organismo, levando à fissura e aos comportamentos de busca pela droga (BERRIDGE; ROBINSON, 2016).

Neuroquimicamente, os neurônios dopaminérgicos tornam-se mais hiperexcitáveis na presença dos estímulos associados à droga, aumentando a frequência de pulsos disparados e a quantidade de dopamina liberada, enquanto os D<sub>1</sub>R dos neurônios que recebem este sinal apresentam aumento da sensibilidade à dopamina (BERRIDGE, 2017; ROBINSON et al., 2015). São ativadas vias de transdução de sinais que induzem alterações na expressão gênica diretamente relacionadas ao efeito duradouro da sensibilização (DOS SANTOS et al., 2018; EVERITT; GIULIANO; BELIN, 2018; NESTLER; LÜSCHER, 2019).

Figura 10: Modelo da Sensibilização do Incentivo como explicação neurobiológica da adicção.



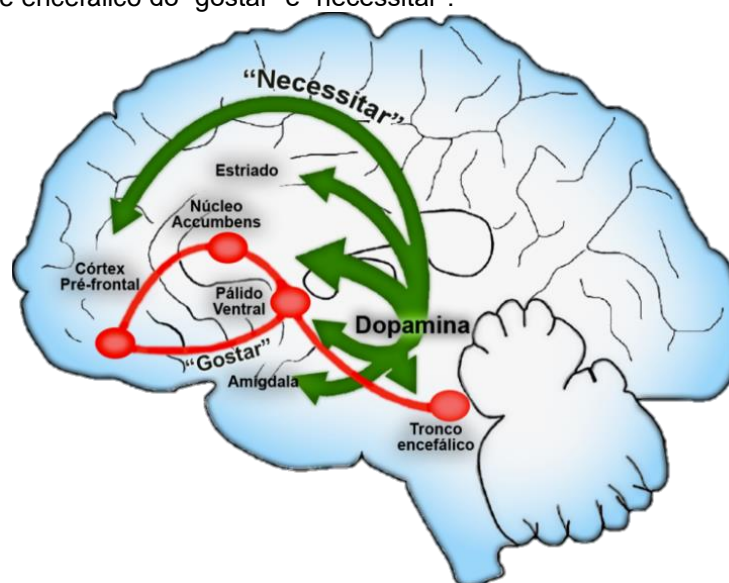
A transição do uso casual para o uso compulsivo na adicção envolve progressiva dissociação entre a necessidade que o organismo sente da droga, a qual sofre saliência do incentivo, e a sensação de prazer gerada pela substância, que reduz gradualmente. Este desenvolvimento pode seguir uma via direta, após a administração repetida e escalonada da droga, levando à sensibilização do “querer” e ao comportamento compulsivo (passos 1-2-3-6-7); ou uma via indireta, na qual as sensações de prazer e euforia buscadas não são obtidas, em virtude da tolerância, gerando o uso de quantidades progressivamente maiores da substância, o que culmina na sensibilização do “necessitar” (passos 1-2-3-4-5). Quando o uso da droga é interrompido inicia-se o período de abstinência, marcado pela fissura intensa que culmina em recaída, caracterizando a cronicidade da adicção (passos 7-8-9-10).

Fonte: adaptado de Robinson et al (2015).

Na teoria da sensibilização do incentivo, é importante dissociar dois fatores distintos. O primeiro é o “gostar”, consequente da sensação de prazer gerada por uma recompensa. O segundo é o “querer”, relacionado à necessidade da presença da droga por parte do encéfalo, a fim de conservar seu estado alostático. O “querer” adquire saliência, ou seja, é sensibilizado, tornando-se uma necessidade patológica progressiva, manifestada por meio do sentimento de fissura (BERRIDGE; ROBINSON, 2016). A sensação de prazer (“gostar”), por sua vez, não sensibiliza e, em função da dessensibilização da recompensa, é reduzido em relação a seu nível basal, de forma que o usuário não experimentará o mesmo prazer obtido em seu primeiro contato com a droga (BECHARA et al., 2019). Portanto, sensibilização aumenta o desejo pela droga e a motivação para utilizar a substância, mas não o quão gratificante a experiência será para o indivíduo, gerando progressiva dissociação entre “querer” e “gostar” (ROBINSON; BERRIDGE, 2008).

Os mecanismos encefálicos associados ao prazer são dissociados dos mecanismos relacionados ao necessitar (Figura 11). A experiência prazerosa é mediada por *hotspots* hedônicos localizados no CPF e estruturas límbicas, via neurotransmissão peptídeo-opioide e endocanabinoide (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2015). Já o necessitar associa-se à via mesolímbica dopaminérgica, explicando o porquê de apenas ele sofrer saliência de incentivo (BERRIDGE; ROBINSON, 2016).

Figura 11 - Controle encefálico do “gostar” e “necessitar”.



Enquanto o “necessitar” é robustamente controlado por projeções dopaminérgicas (verde), o “gostar” é mediado por *hotspots* hedônicos (vermelho) que não sofrem saliência de incentivo.

Fonte: adaptado de Robinson & Berridge (2016).



De fato, estudos de eletroestimulação e de neuroimagem concluíram que as alterações geradas na transmissão dopaminérgica estavam correlacionadas à sensação subjetiva de necessitar a recompensa e não de gostar dela (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2015; EVANS et al., 2006; SMITH et al., 2016; VOLKOW et al., 2002).

A sensibilização é relevante para o estudo dos fatores neurobiológicos da adicção, bem como de possíveis intervenções terapêuticas, pois correlaciona-se aos mecanismos pelos quais as drogas de abuso induzem alterações neuronais duradouras (VALJENT et al., 2010). Em modelos animais para o estudo de drogas psicoestimulantes essa teoria é aplicada por meio de paradigmas comportamentais de sensibilização psicomotora. Nestes, a exposição repetida às drogas em um determinado contexto ambiental resulta em reforço condicionado e, quando os animais são reexpostos ao ambiente no qual a exposição ocorreu, observa-se um aumento progressivo da resposta psicoestimulante (ANDERSON; PIERCE, 2005; BADIANI, 2013). Este fenômeno é denominado sensibilização psicomotora e pode ser analisado a partir da quantificação da atividade locomotora, devido à sobreposição dos circuitos dopaminérgicos que regulam motivação e locomoção (STEKETEE; KALIVAS, 2011).

A sensibilização psicomotora apresenta duas fases a serem consideradas. A primeira é a indução ou aquisição, na qual procede-se com a intoxicação e o condicionamento entre a experiência gerada pela droga e o ambiente (CAMARINI; PAUTASSI, 2016). A aquisição da sensibilização em roedores é constatada a partir do aumento progressivo da atividade psicoestimulante após exposição repetida a uma mesma dose da droga (DIDONE et al., 2016). Há também a expressão, em que, após um período de abstinência, há reexposição à droga no mesmo ambiente que às administrações ocorreram, sendo observada uma resposta a fim de gerar um fenômeno mais robusto (BADIANI; ROBINSON, 2004). A expressão envolve mudanças neurais duradouras que surgem como consequência da indução e medeiam a resposta comportamental sensibilizada (CAMARINI; PAUTASSI, 2016). Neste sentido, um dos aspectos principais deste fenômeno é sua duração, uma vez que as respostas sensibilizadas podem ser observadas após semanas, meses e até anos de abstinência (ROBINSON; BERRIDGE, 1993).

## 2.4. Sistema endocanabinoide

O sistema endocanabinoide é um sistema neuromodulador composto pelos receptores endocanabinoides CB1 e CB2, seus ligantes endógenos e moléculas responsáveis pela síntese e degradação. Este sistema está envolvido em grande parte dos mecanismos fisiológicos do organismo, como regulação da homeostase, neurodesenvolvimento, neurogênese, plasticidade sináptica e função imunológica (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020). Em função disso, sua desregulação está associada ao mecanismo patológico de doenças neuropsiquiátrica e neurodegenerativas, o que o torna um alvo terapêutico de grande relevância para estas condições (DI MARZO, 2008)

Os dois endocanabinoides identificados até o momento são a etanolamida do ácido aracdônico, também denominada anandamina (AEA) e o 2-aracdonoilglicerol (2-AG) (DEVANE et al., 1992; MECHOULAM et al., 1995). No tecido encefálico, as concentrações de 2AG são 10 - 100 vezes superiores às de AEA (SCHERMA et al., 2019). Essas moléculas são reguladoras retrógradas da sinalização sináptica, uma vez que bloqueiam a liberação de neurotransmissores e neuromediadores pelas células pré-sinápticas.

Os endocanabinoides são moléculas lipídicas sintetizadas sob demanda a partir de fosfolípides de membrana do neurônio pós-sináptico. O processo de síntese ocorre por diferentes vias, que também são responsáveis pela produção de outros mediadores lipídicos. O sinal iniciador da síntese é o aumento da concentração intracelular de cálcio na célula pós-sináptica, que pode ser resultado da despolarização e amplificação de sinal pela ativação de receptores metabotrópicos excitatórios (OLMO; FERREIRA-VIEIRA; RIBEIRO, 2016). Portanto, a sinalização endocanabinoide é dependente do estado vigente de atividade sináptica (BATTISTA et al., 2012; WANG; UEDA, 2009)

A principal via de síntese da AEA é a "transacilação-fosfodiesterase". Primeiramente, a N-aciltransferase (NAT) converte fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina em N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE); este é o passo limitante para a síntese (DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2009). A NAPE é hidrolisada pela N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina-fosfolipase-D (NAPE-PLD), gerando AEA. Para o 2-AG, a principal via de síntese é a fosfolipase C-beta, diacilglicerol-lipase (FLC $\beta$ -DAGL). A FLC $\beta$ , localizada na membrana do retículo endoplasmático, converte

fosfoinosítídeos membranares em 1,2-diacilglicerol, cuja hidrólise pela DAGL resulta no 2-AG (DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2009). Uma vez sintetizados, os endocanabinoides são prontamente liberados sob demanda, ou seja, não há armazenamento vesicular (VOLKOW; HAMPSON; BALER, 2017). Após a interação com seus receptores, são transportados para o meio intracelular por transportadores de membrana. A AEA é metabolizada principalmente pela amina hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e o 2-AG pela monoacilglicerol lipase (MAGL); e ambos também são substratos da ciclooxigenase-2, lipoxigenase-12 e 15, e oxigenases do citocromo P450 (CYP450) (DI MARZO; PISCITELLI, 2015). Como a MAGL está localizada nos terminais axônicos e a FAAH em corpos celulares e dendritos, 2-AG e AEA são degradados, respectivamente, na pré e na pós-sinapse (OLMO; FERREIRA-VIEIRA; RIBEIRO, 2016).

Os efeitos dos endocanabinoides são modulados por dois receptores metabotrópicos com sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G inibitória ( $G_{i/o}$ ), denominados CB1 (DEVANE et al., 1988) e CB2 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Estes receptores reconhecem os mesmos grupos estruturais de agonistas canabinoides, apresentam afinidades distintas às moléculas, devido ao diferente reconhecimento das cadeias laterais (REGGIO, 2010). O 2-AG liga-se ao receptor CB1 com afinidade inferior à AEA, porém é mais abundante no tecido encefálico e mais eficaz farmacologicamente, uma vez que se comporta como agonista pleno do receptor, enquanto a AEA é agonista parcial (MACKIE; DEVANE; HILLE, 1993; SUGIURA et al., 1999). Em relação a CB2, o 2-AG possui afinidade semelhante quando comparado a CB1, enquanto a AEA possui afinidade inferior (HILLARD, 2000).

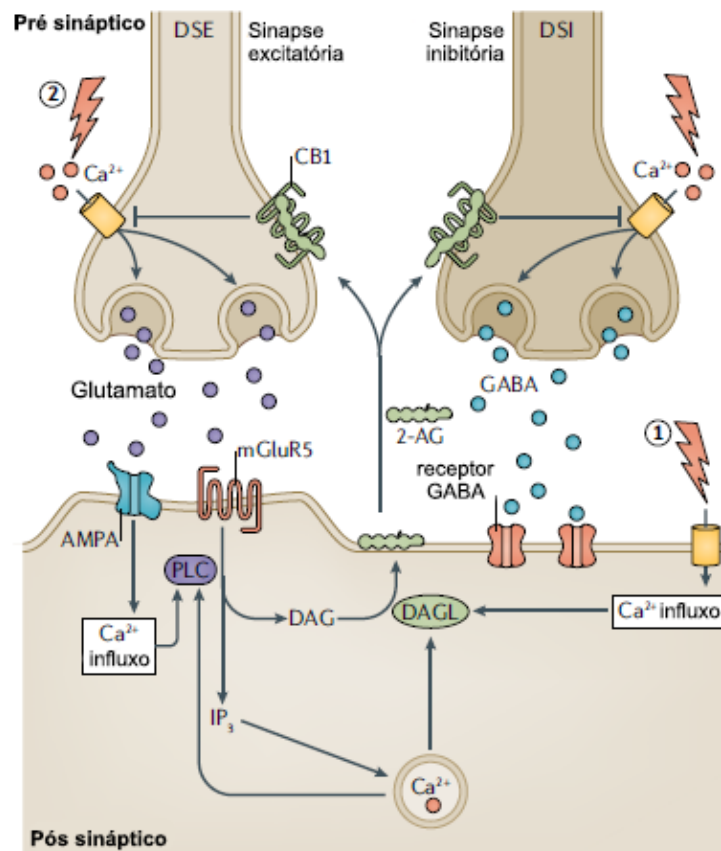
CB1R são os receptores metabotrópicos mais abundantes no SNC e participam de muitos eventos celulares importantes (IBSEN; CONNOR; GLASS, 2017). As maiores concentrações estão no hipocampo, córtex, VTA, estriado, amígdala, gânglios da base e cerebelo, sendo a eficiência do receptor variável conforme a região (KOPPEL et al., 2014). Estes receptores são expressos não só em neurônios, mas também nas mitocôndrias, em astrócitos e, em menor proporção, nos oligodendrócitos e células da microglia (BÉNARD et al., 2012; LU; MACKIE, 2021; NAVARRETE; ARAQUE, 2008). A localização mais abundante consiste em terminais pré-sinápticos de interneurônios GABAérgicos e também em neurônios glutamatérgicos, onde são

responsáveis por modular os disparos neuronais, controlando o balanço excitatório/inibitório (MARSICANO; LUTZ, 1999). Entretanto, também são encontrados em diversos outros neurônios, como colinérgicos e serotoninérgicos (HU; MACKIE, 2015). CB1 é um receptor particularmente propenso a formar heterodímeros com outros receptores metabotrópicos, incluindo o receptor dopaminérgico do tipo 2 (D<sub>2</sub>R), o que amplia seus mecanismos de transdução de sinais (LU; MACKIE, 2021).

Os receptores CB2 são primariamente expressos em células de origem imune, então acreditou-se por um longo período que o receptor fosse restrito aos tecidos periféricos (CABRAL; FERREIRA; JAMERSON, 2015). Contudo, sua presença e atividade também no SNC já foram evidenciadas, bem como seu relevante papel neuroprotetor (PACHER; MECHOULAM, 2011). O receptor já foi identificado em neurônios da substância cinzenta periaquedutal (KOPPEL et al., 2014), do hipocampo (STEMPEL et al., 2016) e da VTA (ZHANG et al., 2014), porém sua expressão mais relevante é nas células da microglia, desempenhando papel anti-inflamatório (TANAKA; SACKETT; ZHANG, 2020).

Após ativação de CB1 ocorre ativação dos canais iônicos de potássio dependentes de voltagem, gerando hiperpolarização neuronal e bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem, cujo resultando é o bloqueio da liberação de neurotransmissores (OLMO; FERREIRA-VIEIRA; RIBEIRO, 2016). Além disso, há inibição da adenilciclase e redução da concentração de AMP cíclico, com consequente inibição da cascata intracelular da proteína quinase A (PKA) (MECHOULAM; PARKER, 2013). O efeito final desta transmissão (Figura 12) pode ser a supressão da inibição GABAérgica induzida pela despolarização (DSI) ou supressão da excitação glutamatérgica induzida pela despolarização (DSE), além de potenciação e depressão de longa duração (LTP e LTD) (ARAQUE et al., 2017; WEI et al., 2021). Diferentes vias de transdução de sinais podem ser ativadas, além da PKA, dentre elas ativação da proteína quinase ativa por mitógenos (MAPK), uma das vias de ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK), associada à transcrição gênica (TURU; HUNYADY, 2010); e da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT), associada à neuroproteção (VILELA et al., 2015).

Figura 12: Modulações da neurotransmissão mediadas pelos endocanabinoides.



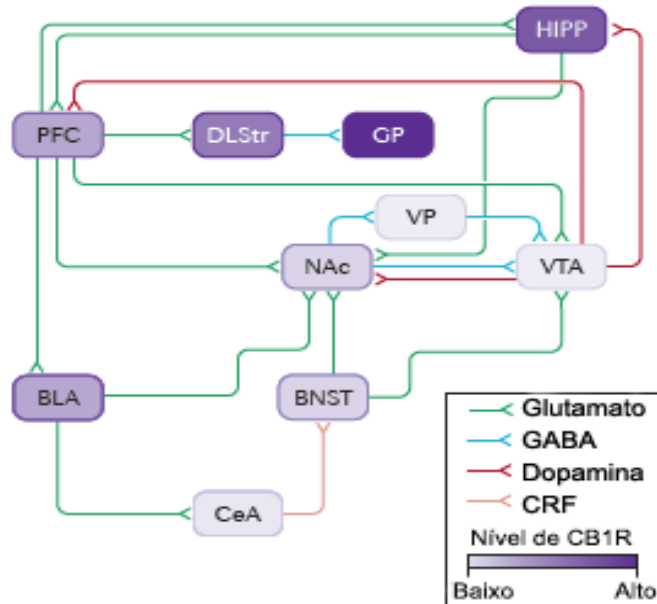
A síntese destes mediadores decorre da ativação enzimática pelo aumento da concentração de cálcio na célula pós-sináptica, associada a despolarização e amplificação pela ativação de receptores metabotrópicos. Os endocanabinoides interagem com os receptores CB1 na célula pré-sináptica, bloqueando a liberação de neurotransmissores, promovendo DSE nas sinapses excitatórias e DSI nas inibitórias. DSE: supressão da excitação mediada pela despolarização; DSI: supressão da inibição mediada pela despolarização.

Fonte: adaptado de CRISTINO et al (2019).

O sistema endocanabinoide modula o sistema mesolímbico dopaminérgico por meio de CB1 e CB2, o que interfere diretamente nas respostas neurobiológicas às drogas de abuso. De fato, conforme a Figura 13, os receptores CB1 estão presentes em todas as estruturas encefálicas associadas aos mecanismos de recompensa, modulando-as, por meio de DSE e DSI (PANAGIS; MACKAY; VLACHOU, 2014). Além disso, a sinalização endocanabinoide induz mecanismos de plasticidade, sobretudo LTD, nestas regiões, associados ao aprendizado e à memória (HEIFETS; CASTILLO, 2009; SIDHPURA; PARSONS, 2011). Portanto, CB1 está envolvido nos efeitos de recompensa, condicionamento e motivação para buscar e autoadministrar diferentes classes de drogas de abuso, como nicotina, etanol, opiáceos e psicoestimulantes (MALDONADO; ROBLEDOS; BERRENDERO, 2013). A exposição crônica a essas

drogas de abuso altera o controle endocanabinoide deste circuito, contribuindo para o fenótipo da adicção (FOURGEAUD et al., 2004; PARSONS; HURD, 2015).

Figura 13: Distribuição dos receptores CB1 nas estruturas do sistema límbico.

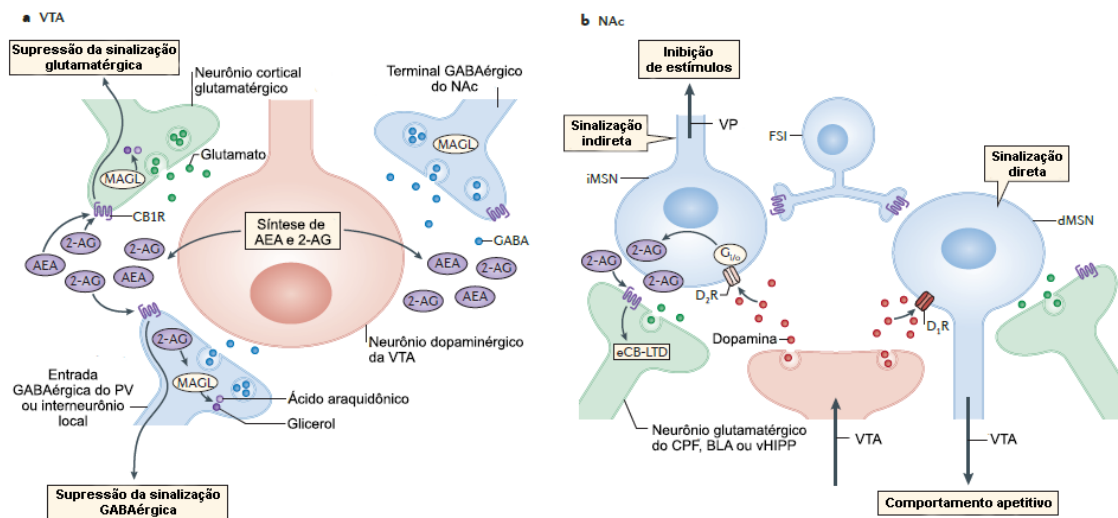


Os receptores CB1 localizam-se em regiões implicadas nos mecanismos de recompensa e ao desenvolvimento da adicção, como amígdala basolateral (BLA), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HIPP), *pallidum* ventral (VP), globo pálido (GP), estriado dorsolateral (DLSTr), NAc, VTA, núcleo leito da estria terminal (BNST) e núcleo central da amígdala (CeA).

Fonte: adaptado de Parsons & Hurd (2015).

Na VTA, os receptores CB2 estão presentes no corpo celular dos neurônios dopaminérgicos, enquanto os CB1 estão expressos em terminações GABAérgicas aferentes mesolímbicas e em projeções glutamatérgicas vindo das regiões corticais, onde pode exercer seus efeitos inibitórios (WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2017). No NAc, as terminações glutamatérgicas regulam os interneurônios GABAérgicos associados à via direta, a qual estimula os comportamentos de recompensa via D<sub>1</sub>R, e à via indireta, que regula a evasão a estímulos aversivos, via D<sub>2</sub>R (WANG et al., 2015). Esses interneurônios são modulados por terminações glutamatérgicas da amígdala basolateral e do CPF que expressam CB1. A sinalização de D<sub>2</sub>R induz produção de 2-AG, cuja ação inibe o efeito glutamatérgico, favorecendo os comportamentos de recompensa (PARSONS; HURD, 2015) (Figura 14).

Figura 14: Controle do sistema endocanabinoide sobre a transmissão dopaminérgica da VTA e do NAc.



Na VTA a síntese de 2-AG gera inibição das terminações glutamatérgicas e GABAérgicas, controlando a liberação de dopamina pelos neurônios dopaminérgicos. Estes, por sua vez, se projetam ao NAc, onde influenciam os interneurônios GABAérgicos que, por sua vez, são modulados por terminações glutamatérgicas do CPF e da BLA. Nac: núcleo accumbens; VTA: área ventral do tegmento mesencefálico; PV: *pallidum* ventral; MSN: neurônio espinhal médio; CPF: córtex pré-frontal; BLA: amígdala basolateral; vHIP: hipotálamo ventral.  
 Fonte: adaptado de Parsons & Hurd (2015).

Considerando a modulação endocanabinoide nos neurônios da via mesolímbica dopaminérgica, pode-se especular que este sistema pode ser um alvo interessante para o tratamento dos transtornos por uso de substâncias. De fato, dados da literatura indicam que manipulações no sistema endocanabinoide influenciam diferentes efeitos neurobiológicos da cocaína, como na motivação para autoadministrar a droga; na indução de hiperlocomoção, sensibilização, e preferência condicionada por lugar (CPP); nas recaídas; e no aumento da concentração extracelular de dopamina no NAc (GOBIRA et al., 2015, 2019; HU; MACKIE, 2015; LI et al., 2009; LOPES et al., 2020; MARINHO et al., 2015, 2017; MEREU et al., 2015; YU et al., 2011).

As manipulações farmacológicas relacionam-se à utilização de inibidores das enzimas de degradação ou agonistas/antagonistas dos receptores endocanabinoides. Sabe-se que o bloqueio de FAAH aumenta as concentrações de AEA em mais de dez vezes, além de aumentar o tempo de meia vida e a atividade da mesma (CRAVATT et al., 2001; LICHTMAN et al., 2004). Já foi demonstrado que a inibição farmacológica de FAAH suprimiu a busca pela cocaína, apesar de não interferir em seus efeitos de recompensa (ADAMCZYK et al., 2009). Além disso, a inibição farmacológica de

MAGL, associada à inibição do receptor CB1 com baixas doses de rimonabanto, atenuou a hiperlocomoção induzida pela cocaína, o que não foi observado quando utilizado inibidor de FAAH, sugerindo que o endocanabinoide 2-AG esteja envolvido nestes comportamentos (GOBIRA et al., 2019).

Manipulações no receptor CB1 não são tão interessantes, uma vez que geram uma resposta difusa. A manipulação farmacológica de CB1 com antagonistas, como o rimonabanto, evidenciou em testes clínicos efeitos adversos graves, como depressão e comportamento suicida (LE FOLL; GORELICK; GOLDBERG, 2009). Sendo assim, a manipulação do receptor CB2 passou a ser mais investigada e observou-se que agonistas deste receptor promovem os mesmos efeitos do bloqueio de CB1, ou seja, atenuação da hiperlocomoção (ARACIL-FERNÁNDEZ et al., 2012), da auto-administração (ARACIL-FERNÁNDEZ et al., 2012), da CPP (IGNATOWSKA-JANKOWSKA et al., 2013; LOPES et al., 2020) e da liberação de dopamina induzidas pela cocaína (GOBIRA et al., 2019; XI et al., 2011; ZHANG et al., 2017, 2014).

## 2.5. Canabidiol

O CBD é o fitocanabinoide não psicoativo mais abundante na *Canabis sativa*. Foi isolado por Rogers Adams em 1943 e apenas 20 anos depois sua estrutura molecular foi completamente elucidada (LEE et al., 2017). Essa substância, com amplo espectro de ação, tornou-se o canabinoide mais estudado em humanos e modelos pré-clínicos como intervenção terapêutica de doenças neuropsiquiátricas como esclerose múltipla, doença de Huntington, epilepsia, mania, transtornos de ansiedade, esquizofrenia e adicção (CAMPOS et al., 2016; LIGRESTI; DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2016; MACHADO BERGAMASCHI et al., 2011; ZHORNITSKY; POTVIN, 2012). Os estudos com CBD nessas áreas iniciaram-se em 1970, com grande aumento das pesquisas a partir de 2010 (CAMPOS et al., 2016).

Diferentemente do delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), principal constituinte da *Cannabis*, o CBD não possui propriedades hedônicas, ou seja, não apresenta potencial para induzir transtorno por uso de Cannabis, e não altera parâmetros fisiológicos de temperatura, pressão e ritmo cardíaco, nem a função motora (MACHADO BERGAMASCHI et al., 2011). Além disso, apresenta poucos efeitos adversos significativos e baixos índices de mortalidade, de forma que é bem tolerado por humanos em doses diárias superiores a 1.500 mg, sendo inclusive aprovado para



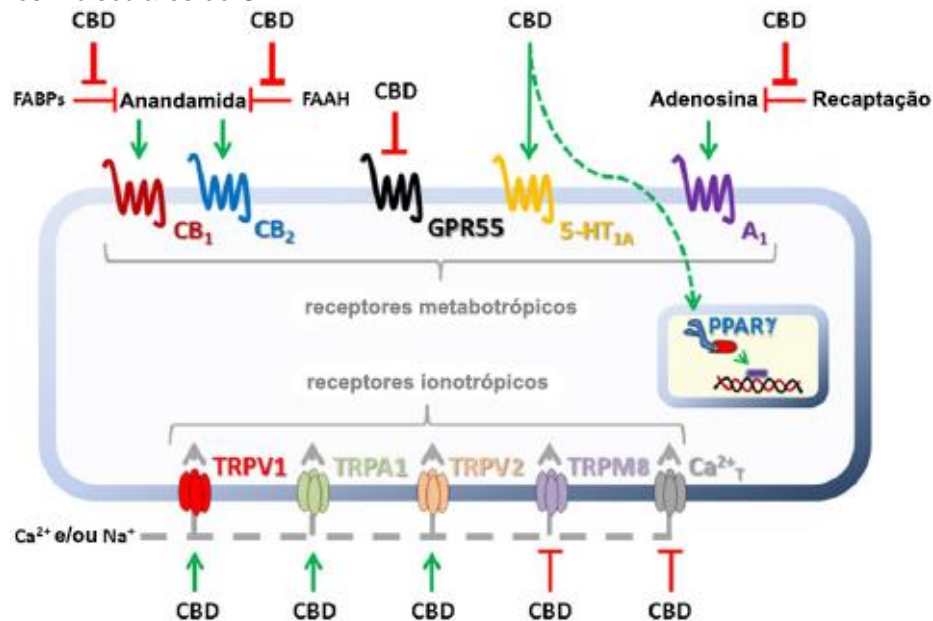
uso em casos de crianças com epilepsia resistente ao tratamento (CUNHA et al., 1980; FRANCO; BIALER; PERUCCA, 2021; PARK et al., 2020; ZUARDI, 2008). De fato, atualmente estão disponíveis fármacos a base de CBD para o tratamento de algumas condições clínicas, aprovados por agências regulatórias internacionais, como *Food and Drug Administration* e *European Medicines Agency*, e pela ANVISA (SPELTA; BRUNO; MARCOURAKIS, 2021).

Após administração pela via intravenosa ou inalatória, a biodisponibilidade do CBD é de 31%, e o pico plasmático é obtido em aproximadamente 3-10 minutos (GROTHENHERMEN, 2003). Após administração oral, o CBD sofre intenso metabolismo de primeira passagem, o que lhe confere pequena biodisponibilidade (cerca de 6%) e menores picos plasmáticos que demoram cerca de 2 horas para serem atingidos (GASTON; FRIEDMAN, 2017). A administração oromucosa limita o intenso metabolismo hepático, promovendo absorção mais rápida e concentrações plasmáticas superiores em relação à administração oral. Devido ao elevado grau de lipossolubilidade, o volume de distribuição é elevado e os órgãos mais vascularizados são alcançados rapidamente, incluindo o SNC (GASTON; FRIEDMAN, 2017; HUESTIS, 2007). O processo de biotransformação é catabolizado pelas enzimas do CYP450, principalmente CYP2C19 e CYP3A4 e a excreção predominantemente fecal e, em menor escala, urinária (GASTON; FRIEDMAN, 2017). A meia vida de eliminação é longa e diretamente relacionada à dose, via de administração e concentração administrada. Em revisão sistemática conduzida por MILLAR e colaboradores (2018), os estudos incluídos indicam que o tempo de meia vida pode chegar a 2,4 horas após administração por nebulização ou aerossol; 3,2 horas após administração oral única ou de 2 – 5 dias após administração crônica; de 1,4 a mais de 10 horas após administração oromucosa. Um estudo conduzido por Deiana e colaboradores (2012) avaliou a farmacocinética do CBD em camundongos após administração intraperitoneal (120 mg/kg). A concentração máxima foi atingida de 60 a 120 minutos no plasma e no cérebro, e meia vida de eliminação foi de 280 a 290 minutos em ambos os tecidos. Comparado à administração oral, a via intraperitoneal gerou absorção mais rápida e eficaz, com maior biodisponibilidade ao tecido nervoso em relação à administração oral (DEIANA et al., 2012).

O CBD, bem como todos os fitocanabinoides, é uma molécula farmacologicamente complexa, uma vez que possui amplo espectro de mecanismos de ação derivados de seus vários alvos moleculares, muitos ainda não completamente

elucidados (Figura 15). Outro ponto importante da farmacologia dos canabinoides é a curva dose-resposta em forma de sino, a qual torna a resposta farmacológica final dependente de um intervalo de dose específico, o qual varia conforme a condição patológica e os alvos moleculares relevantes para ela (LIGRESTI; DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2016).

Figura 15: Alvos moleculares do CBD.



O CBD é agonista dos receptores TRPV1 e 2, PPAR $\gamma$  e 5HT $_{1A}$ ; e antagonista do receptor GPR55. Inibe a captação de adenosina e interage com os receptores A $_2$ . No sistema endocanabinoide é agonista inverso de CB1 e CB2 e inibe a enzima FAAH, aumentando as concentrações de anandamida, a qual é agonista CB1, CB2 e TRPV1.

Fonte: adaptado de LEE et al. (2017).

Por apresentar uma configuração molecular preferencial com dois anéis em ângulo reto, o CBD possui baixa afinidade aos receptores endocanabinoide CB1 e CB2, comportando-se como modulador alostérico negativo de ambos (BURSTEIN, 2015; MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2017). Sendo assim, a ligação do CBD ao receptor CB1 pode inibir a sinalização endocanabinoide, de maneira dependente da dose, alterando a eficácia das ações de seus ligantes endógenos e também de ligantes exógenos, razão pela qual o CBD não apenas não produz os mesmos efeitos psicoativos do  $\Delta^9$ -THC, como também gera efeitos antagônicos aos dele (HUDSON et al., 2019). No sistema endocanabinoide, o CBD mimetiza algumas ações de agonistas CB1 indiretamente, pela inibição da enzima FAAH, a qual degrada o endocanabinoide anandamida (CHAUVET et al., 2015). Acredita-se que este mecanismo é importante para as propriedades antipsicóticas, pró-neurogênicas e de

facilitação da extinção de memórias aversivas associadas ao CBD (CAMPOS et al., 2017; HILL et al., 2012; STERN et al., 2018).

Os papéis mais relevantes do CBD no encéfalo, contudo, derivam da modulação neuronal de receptores metabotrópicos, canais iônicos e enzimas não pertencentes ao sistema endocanabinoide. É antagonista dos receptores órfãos GPR55; agonista de receptores serotoninérgicos 5HT1A e 5HT2A, vaniloides TRVP1-4 e TRPA1, de adenosina A<sub>2</sub>, e de receptores protetores gama ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ); modulador alostérico positivo dos receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides; e agonista inverso dos receptores órfãos GPR3, GPR6 e GPR12 (BISOGLIO et al., 2001; BURSTEIN, 2015; CAMPOS et al., 2012, 2016; DE PETROCELLIS et al., 2011; ESPOSITO et al., 2011; FRANCO; BIALER; PERUCCA, 2021; KATHMANN et al., 2006; LAUN et al., 2019; LEWEKE et al., 2012; LISBOA et al., 2016; MARTÍN-MORENO et al., 2011; MECHA et al., 2013; PANDOLFO et al., 2011; QIN et al., 2008; ROSS, 2009; RUSSO et al., 2005). Além disso, o CBD apresenta mecanismos não neuronais, relacionados à modulação da atividade das células da microglia (ativação, migração, proliferação e liberação de citocinas) via receptores CB2, GPR55, PPAR $\gamma$ , A<sub>2</sub> e TRVP, e com o bloqueio da receptação de adenosina e inibição da FAAH, influenciando diretamente na neuroproteção (CASSANO et al., 2020; CUTANDO; MALDONADO; OZAITA, 2017; MILANO; CAPASSO, 2018; ZLEBNIK; CHEER, 2016).

Uma série de estudos mostra que o CBD atenua ou inibe fatores neurobiológicos associados às recaídas e à manutenção do uso descontrolado de drogas de abuso, tanto psicoestimulantes quanto depressoras do SNC, em modelo animal (DE CARVALHO; TAKAHASHI, 2017; GONZALES; SMITH, 2015; HAY et al., 2018; KATSIDONI; ANAGNOSTOU; PANAGIS, 2013; LUJÁN et al., 2018; LUJÁN; CANTACORPS; VALVERDE, 2020; MAHMUD et al., 2017; PARKER et al., 2004; REN et al., 2009; RENARD et al., 2016; VIUDEZ-MARTÍNEZ et al., 2018). Portanto, considerando a importância do sistema endocanabinoide na regulação da homeostase encefálica e os distintos alvos moleculares do CBD que lhe garantem as propriedades antidepressiva, ansiolítica e antipsicótica, bem como sua capacidade de aliviar parâmetros relevantes para a neurobiologia da adicção, acreditamos que esta substância seja um alvo terapêutico potencial para auxiliar no tratamento do transtorno por uso de cocaína.

## 2.6. Imagem de Tomografia por Emissão de Pósitrons

O advento das técnicas de neuroimagem no século XX revolucionou a medicina e a maneira como o SNC pode ser estudado. Por meio de ressonância magnética, tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons (PET) tornou-se possível observar *in vivo* os aspectos anatômicos, funcionais e moleculares do encéfalo. A imagem PET é uma técnica de imagem molecular minimamente invasiva na qual avaliam-se processos fisiológicos e bioquímicos considerando a biodistribuição de uma molécula de interesse radiomarcada com um radionuclídeo emissor de pósitrons (HUTCHINS et al., 2012; PARVAZ et al., 2011).

Quando o radiofármaco é injetado no organismo, geralmente pela via intravenosa, os pósitrons são liberados por decaimento  $\beta^+$ . O pósitron é uma partícula muito interativa já que possui baixa massa e carga positiva, sendo a antimatéria do elétron (BASU et al., 2011). Assim, quando estas partículas se encontram, ocorre a aniquilação e suas massas são convertidas em energia eletromagnética, na forma de dois fótons de 511 keV (SALEEM; CHARNLEY; PRICE, 2006). Estes são emitidos em direções opostas, num ângulo de aproximadamente  $180^\circ$ , e simultaneamente detectados pelo aparelho de PET, que os converte em um sinal elétrico.

Na década de 1970 foi desenvolvido o radiofármaco [ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodeoxiglicose ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG), o qual possibilitou investigações relacionadas às alterações no metabolismo de glicose, um indicativo de atividade celular que, no encéfalo, reflete atividade neuronal e sináptica (BASU et al., 2014; BERTI; MOSCONI; PUPI, 2014). O [ $^{18}\text{F}$ ]FDG consiste em uma molécula de glicose radiomarcada com um átomo de flúor-18 que, uma vez no organismo, é interiorizado nas células pelos transportadores de glicose e fosforilado a FDG-6-fosfato pela enzima hexoquinase (RAHMAN et al., 2019). No entanto, diferentemente da glicose-6-fosfato, o [ $^{18}\text{F}$ ]FDG fosforilado não entra na via glicolítica, devido ao fluoreto presente na posição 2', ficando retido no meio intracelular, de maneira que seu acúmulo refletirá a taxa metabólica celular (PETERSON; MANNING, 2009). O encéfalo humano saudável consiste em apenas 2% da massa corporal humana, porém é responsável por 20% do consumo total de oxigênio, dos quais 80% são utilizados em eventos associados às neurotransmissões GABAérgica e glutamatérgica (SHULMAN et al., 2004). As maiores captações de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG envolvem a substância cinzenta cortical e as estruturas subcorticais tálamo e gânglios da base, enquanto os menores níveis associam-se às regiões de

substância branca; já regiões como cerebelo e tronco encefálico apresentam captação mediana (LOESSNER et al., 1995; SOKOLOFF et al., 1977).

Desde a primeira aplicação de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG em um humano em 1976, este tem sido o radiofármaco mais utilizado em imagens de PET pré-clínicas e clínicas, sendo uma ferramenta de estudo muito comum nos campos da oncologia, neuropsiquiatria, cardiologia e inflamação/infecção (AL TABAA; BAILLY; KANOUN, 2021; HESS; HØILUND-CARLSEN; ALAVI, 2014; SCHÖLL; DAMIÁN; ENGLER, 2014), principalmente em estudos longitudinais devido à possibilidade de correlacionar individualmente traços de comportamento e marcadores neuroquímicos (VIRDEE et al., 2012). Atualmente diversos outros radiofármacos foram desenvolvidos, ampliando as opções e aumentando a especificidade dos fenômenos estudados (HUTCHINS et al., 2012).

No contexto do estudo do transtorno por uso de cocaína, a escolha do radiofármaco está associada tanto ao escopo do estudo quanto à disponibilidade da molécula. Marcadores do metabolismo de glicose, como [ $^{18}\text{F}$ ]FDG e [ $^{14}\text{C}$ ]2-deoxiglicose e de fluxo sanguíneo cerebral, como [ $^{15}\text{O}$ ]H<sub>2</sub>O refletem funções gerais, cuja captação reflete indiretamente nas alterações plásticas do fenótipo da adicção. Moléculas mais específicas também podem ser utilizadas. Dentre estas estão [ $^{11}\text{C}$ ]racloprida e [ $^{18}\text{F}$ ]fluorocleboprida utilizadas para avaliar a disponibilidade de receptores dopaminérgicos e alterações na concentração extracelular de dopamina (MONTGOMERY et al., 2007; NADER et al., 1999); [ $^{11}\text{C}$ ]cocaína, a fim de analisar os parâmetros farmacocinéticos da cocaína (FOWLER et al., 2001); [ $^{18}\text{F}$ ]FDOPA e [ $^{18}\text{F}$ ]LBT-999, para evidenciar a funcionalidade da via dopaminérgica e a disponibilidade do transportador de dopamina (REAL et al., 2019; SÉRIÈRE et al., 2014).

Os estudos de PET em humanos com histórico de transtorno por uso de substâncias preencheram as lacunas neurocientíficas existentes entre dados pré-clínicos e clínicos, principalmente por: i. elucidar os mecanismos de reforço e as propriedades toxicológicas das drogas; ii. Promover a base das alterações metabólicas e neuroquímicas induzidas por essas substâncias e responsáveis pelo desencadeamento de transtornos de uso; iii. Estabelecer uma relação temporal entre consequências fisiológicas e comportamentais induzidas pelo uso da substância (FOWLER; VOLKOW, 1998).

De fato, por imagem de PET, as principais características da adicção foram estabelecidas. Di Chiara e Imperato (1988) observaram por imagem PET que todas as drogas de abuso geram aumento da concentração de dopamina no núcleo accumbens e Volkow e colaboradores (1999) que a sensação subjetiva de euforia é acompanhada por aumento da captação de [ $^{11}\text{C}$ ]cocaina no estriado. Abstinência prolongada de cocaína, por sua vez, relaciona-se à redução da disponibilidade de receptores  $\text{D}_2$  no estriado e à redução do metabolismo cortical de glicose, conforme observados por imagem PET com [ $^{11}\text{C}$ ]racloprida e [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (FOWLER et al., 2001; VOLKOW et al., 1991).

Apesar destes estudos esclarecerem muito sobre os efeitos das drogas no organismo humano, os estudos em animais permanecem um importante pilar para entender a complexidade do transtorno por uso de substâncias (DEROCHE-GAMONET; PIAZZA, 2014; NICOLAS et al., 2017). Devido a questões éticas não é possível avaliar os efeitos das drogas em indivíduos não usuários, impossibilitando, portanto, o acompanhamento dos fenômenos neurobiológicos que medeiam o desenvolvimento e a progressão da doença; bem como o estudo de novos candidatos a terapias farmacológicas (CANNELLA et al., 2017a). Neste cenário, a associação entre estudos de imagem PET e modelos animais cria uma ciência translacional bidirecional para o entendimento do transtorno por uso de substâncias.

## *Capítulo 3 - Objetivo*

## **CAPÍTULO 3 – OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho é verificar o potencial do CBD como possível agente terapêutico do transtorno de uso de cocaína, verificando sua capacidade de interferir na expressão da sensibilização psicomotora e nas alterações induzidas pela droga no metabolismo de glicose encefálico e no perfil celular.

### **3.1. Estratégias experimentais**

- a) Induzir a sensibilização psicomotora à cocaína (5 administrações totais em dias alternados) em camundongos C57Bl/6 machos adultos;
- b) Tratar os animais durante o período de abstinência (8 dias) com veículo (2% de Tween 80 em solução salina 0,9%) ou CBD;
- c) Verificar a eficiência do tratamento após um novo desafio com cocaína por meio do teste de expressão da sensibilização;
- d) Avaliar a atividade encefálica dos animais em regiões encefálicas de interesse para a adicção, antes e no último dia de indução da sensibilização; no último dia de abstinência e tratamento; e após o desafio da expressão da sensibilização;
- e) Avaliar por imuno-histoquímica alterações no número de neurônios, astrócitos, e células da microglia e na densidade do receptor endocanabinoide CB1 e da enzima FAAH.



## *Capítulo 4 - Materiais e Métodos*

## **CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados 120 camundongos C57Bl/6 machos adultos (20-30g) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram retirados com 6 semanas e permaneceram 2 semanas no biotério de experimentação do Laboratório de Medicina Nuclear (LIM 43) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), para aclimação. Foram acomodados em grupos de 2 a 4 animais em caixas acrílicas forradas com serragem, em ambiente com ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 7h) e temperatura (21-22°C) e umidade (60-70%) controladas. Água e ração esterilizadas foram fornecidas *ad libitum*.

Ao longo da segunda semana de aclimação no biotério de manutenção, os animais foram manipulados e contidos, a fim de minimizar os efeitos não específicos do estresse gerado por esses procedimentos durante o protocolo experimental. Todos os experimentos foram conduzidos na fase de claro do ciclo circadiano dos animais.

O presente trabalho foi aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA 77.2016-P518; Anexo 1) e FMUSP (CEUA 963/2018; Anexo 2). Todos os experimentos foram conduzidos no LIM 43, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel e sob supervisão da Dra. Daniele de Paula Faria. Para tanto, o projeto foi aprovado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo 2).

### **4.2. Substâncias**

#### **4.2.1. Cocaína**

A cocaína utilizada (Lacre SPTC 427210) foi cedida pela Diretoria do Núcleo de Exames de Entorpecentes do Centro de Exames Análises e Pesquisas do Instituto de Criminalística de São Paulo, após autorização judicial (Processo 1517/2017). A droga foi avaliada em colaboração com o Laboratório de Análises Toxicológicas, sob

coordenação do professor Dr. Maurício Yonamine, por HPLC-MS/MS. Verificou-se que ela estava na forma de cloridrato de cocaína, com grau de pureza de 89%, considerado satisfatório para uso. Para os experimentos, a droga foi solubilizada em solução salina 0,9% imediatamente antes do início das administrações.

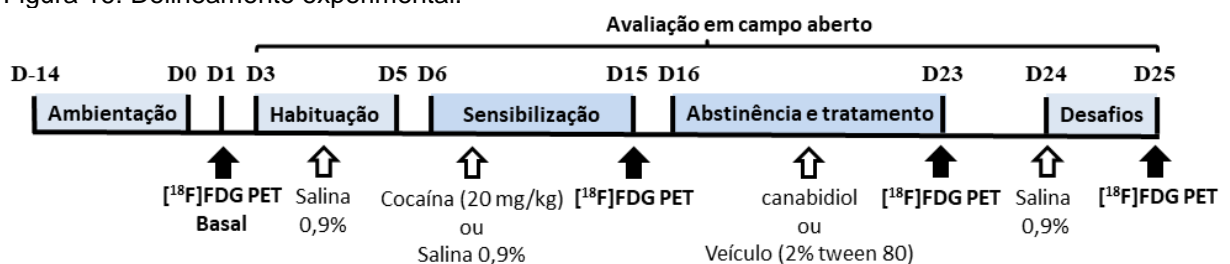
#### 4.2.2. CBD

O CBD utilizado foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Aline Cristina Campos da Universidade de São Paulo. O composto provém da *BioSynthesis Pharma Group Limited (BSPG-Pharm, Reino Unido)* e apresenta pureza de 99,99%, apresentando-se na forma liofilizada. Para os experimentos, foi ressuspenso em 2% de Tween 80 em solução salina 0,9% e manipulado ao abrigo da luz.

#### 4.3. Desenho experimental

Este é um trabalho longitudinal que apresenta 3 pontos principais, conforme observado na Figura 16: indução da sensibilização psicomotora à cocaína, abstinência e tratamento com CBD, e desafio da expressão da sensibilização. Todos os protocolos aplicados seguiram este desenho experimental geral.

Figura 16: Delineamento experimental.



Após três dias de habituação ao campo aberto, a cocaína (20 mg/kg, i.p.) foi administrada em dias alternados, totalizando 5 administrações (sensibilização psicomotora). A seguir, os animais foram submetidos a 8 dias consecutivos de abstinência, durante os quais foram tratados com canabidiol ou veículo (2% de tween 80 em salina 0,9%). Finalizado o tratamento, os animais foram desafiados com salina 0,9% (D24), e, no dia seguinte, realizou-se o desafio da expressão da sensibilização, no qual os animais receberam cocaína (20 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9%. Em todos estes períodos os animais foram avaliados em campo aberto durante 30 minutos quanto à atividade locomotora total. Além disso, a atividade encefálica dos animais foi avaliada por meio de imagem PET com  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  dois dias antes da habituação (D1), imediatamente após a indução da sensibilização (D15), no último dia de abstinência e tratamento (D23) e após o ensaio de expressão da sensibilização (D25).

O período de habituação compreendeu 3 dias consecutivos nos quais os animais receberam uma injeção de solução salina via i.p. e foram então expostos ao

campo aberto por 30 minutos. Esta etapa é importante para evitar efeitos do comportamento exploratório na atividade locomotora. Os animais passaram então para a etapa de sensibilização psicomotora, durante a qual foram tratados com cocaína (20 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9%, (i.p.) em dias alternados, totalizando 5 administrações. Terminada a sensibilização, iniciou-se o período de abstinência e tratamento (T), no qual os animais foram tratados com veículo (2% de tween 80 em solução salina, i.p.) ou CBD (i.p.) durante 8 dias consecutivos. Após 24h do oitavo dia, todos os animais foram desafiados com solução salina e, 24h depois, no último dia do protocolo, foram desafiados quanto à expressão da sensibilização com cocaína (20 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9% (i.p.). Dois dias antes da habituação (dia 1), no último dia de indução da sensibilização psicomotora (dia 15), no último dia de abstinência e tratamento (dia 23) e no dia do desafio da expressão da sensibilização (dia 25) os animais foram avaliados quanto a atividade encefálica por tomografia por emissão de pósitrons (PET) com [<sup>18</sup>F]FDG.

#### **4.4. Avaliação comportamental**

Para a avaliação comportamental os animais foram diariamente aclimatados na sala de experimentação durante 30 minutos, com intensidade luminosa (100 Lux) e temperatura (21°C) controladas. Quatro campos abertos circulares com 40 cm de altura e 40 cm de diâmetro foram utilizados para quantificação da atividade locomotora horizontal total (distância percorrida em cm) e dos parâmetros de tempo de permanência e frequência de entradas nas zonas central e periférica do aparato, um indicativo de comportamento do tipo ansioso.

Em todas as etapas do protocolo experimental (habituação, sensibilização, abstinência e desafios), os animais eram inseridos no centro do aparato imediatamente após a administração da substância de interesse referente ao dia experimental, a saber: salina na habituação; salina ou cocaína na sensibilização; CBD ou veículo no tratamento; e cocaína ou salina no desafio da expressão da sensibilização. Os animais foram avaliados durante 30 minutos, na ausência do experimentador. O campo aberto foi higienizado, após cada avaliação comportamental, com solução alcoólica 5% antes da introdução do próximo animal, para evitar rastros de odor; e com álcool 70% após o término dos experimentos. Todos os experimentos foram gravados por um sistema de filmagem Intelbras® HDC-VI com

infravermelho, utilizando o módulo multi-HD Intelbras® e os dados quantificados pelo software *Ethovision XT*® versão 11.5.

#### 4.5. Imagem PET

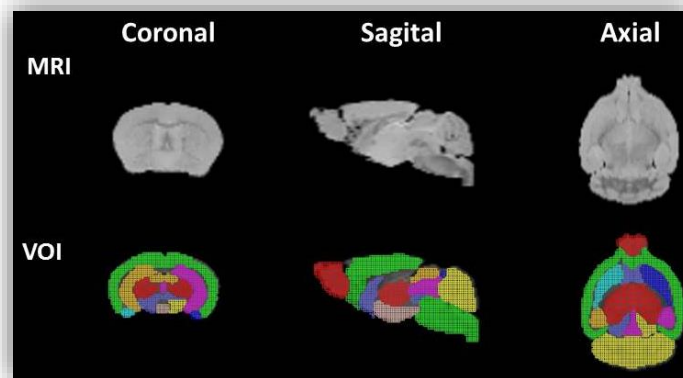
Realizou-se imagens PET com [<sup>18</sup>F]FDG, a fim de avaliar a atividade metabólica encefálica dos animais em diferentes regiões encefálicas. Utilizou-se o equipamento PET/SPECT/TC para pequenos animais, modelo LabPET4 Triumph™ (Gamma Medica-Ideas, Northridge, CA, U.S.A.), pertencente à rede multiusuário da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (rede PREMIUM) e localizado no LIM 43. O radiofármaco [<sup>18</sup>F]FDG é produzido nas instalações do Centro de Medicina Nuclear do HCFMUSP.

As imagens foram adquiridas dois dias antes da habituação (imagem basal); no último dia de indução da sensibilização psicomotora; no último dia de abstinência e tratamento; e após o ensaio de expressão da sensibilização. Para tanto, os animais foram anestesiados com isoflurano (5% indução; 1,0-2,0% manutenção) em oxigênio 100% para medida da glicemia e injeção intravenosa de [<sup>18</sup>F]FDG (37 MBq). Quando imagens estáticas foram adquiridas, os animais foram mantidos acordados ao longo dos 45 minutos posteriores à injeção do radiofármaco, para sua biodistribuição e, passado este período, foram novamente anestesiados para serem escaneados por 30 minutos. Quando imagens dinâmicas foram adquiridas, os animais foram escaneados imediatamente após a injeção do radiofármaco, durante 75 minutos. Em ambos os casos, os animais foram posicionados com o encéfalo no centro do campo de visão do aparelho de PET, onde a resolução é maior. Durante toda a aquisição de imagem os animais foram mantidos sob anestesia (isoflurano 1-2% em oxigênio), aquecimento e monitoramento da função cardiorrespiratória.

As imagens geradas foram reconstruídas pelo algoritmo iterativo OSEM-3D (20 iterações e 4 subgrupos), com campo de visão transversal de 60 mm, matriz de 120 x 120 e pixel de 0,5 x 0,5 mm. As imagens estáticas foram reconstruídas em um único frame de 30 minutos e as dinâmicas em 15 frames de 5 minutos. Os arquivos gerados foram exportados em formato DICOM e analisadas no *software* PMOD® (PMOD Technologies Ltd, Zurich Suíça) versão 4.1, no modo fusão. As imagens PET foram manualmente corrigidas com o *template* de ressonância magnética T2-weighted Ma-Benveniste-Mirrione de camundongos (MIRRIONE *et al*, 2007), o qual

definiu as 16 regiões de interesse (VOIs) utilizadas neste estudo (Figura 17): estriado (hemisférios direito e esquerdo), córtex, hipocampo (hemisférios direito e esquerdo), tálamo, cerebelo, prosencéfalo basal, hipotálamo, amígdala (hemisfério direito e esquerdo), tronco encefálico, substância cinzenta periaquedutal, colículo superior, mesencéfalo (hemisférios direito e esquerdo).

Figura 17: Representação dos cortes coronal, sagital e axial utilizados no *templates* de MRI e nos VOIs delimitados pelo atlas T2 *weighted* Ma-Benveniste-Mirrione de camundongos.



MRI: Ressonância magnética; VOI: volumes de interesse.  
Fonte: PMOD *software*

Todos os resultados foram apresentados na forma de *Standardized Uptake Values* (SUV), o qual consiste na medida da concentração radioativa de [<sup>18</sup>F]FDG (kBq/mL) *in vivo* nas regiões encefálicas relacionando a atividade presente no início da imagem (kBq) e ao peso do animal, conforme a equação abaixo. O SUV de cada região foi normalizado pelo SUV do encéfalo total da imagem basal do respectivo animal.

$$SUV = \frac{\text{concentração radioativa no tecido (kBq/mL)}}{\frac{\text{dose injetada (kBq)}}{\text{peso corporal (g)}}}$$

#### 4.6. Imuno-Histoquímica

Após a última avaliação por neuroimagem, os animais foram eutanasiados e submetidos a perfusão transcardíaca seguida de coleta do encéfalo total. Para tanto, os animais foram mantidos profundamente anestesiados com isoflurano (5%) em oxigênio e perfundidos pelo ventrículo esquerdo com solução salina tamponada (0,9% de NaCl em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4) e em seguida com 4% de paraformaldeído

(PFA) em tampão fosfato (0,2 M, pH 7,4). Os encéfalos foram dissecados, pós-fixados em PFA durante 4 horas, e transferidos para uma solução de sacarose 30% em PB 0,2 M por 48 horas, para criopreservação. O tecido foi envolvido em meio Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura) e seccionado em criostato (LEICA), a -20°C, na espessura de 30 µm em séries de 8 cortes histológicos. Estes foram coletados em placas de cultivo de 24 poços em PB 0,1M para utilização dentro de 30 dias ou em solução *antifreezing* (sacarose 30% e etilenoglicol 60% em PB 0,1M) para períodos mais prolongados de manutenção.

Foram avaliados os seguintes anticorpos primários: anti-NeuN (1:2000, Sigma-Aldrich); anti-Iba1 (1:1000, WAKO); anti-GFAP (1:1000, Immunon Shandon); anti-CB1 (1:1000, Abcam) e anti-FAAH (1:1000, Abcam). Para a reação, os cortes foram inicialmente lavados (4 x 5 minutos) em solução de tampão fosfato (PB 0,1M). Os tecidos cuja perfusão não tenha sido satisfatória foram, ainda, incubados em solução anti-peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% em PB 0,1M) durante 5 minutos, seguida por 20 minutos (4 x 5 minutos) de lavagem com PB 0,1M. Os cortes foram então incubados, sob agitação lenta com os anticorpos primários em PB 0,1M contendo 3% de triton X-100 e 5% do soro do animal no qual foi produzido o anticorpo secundário (cabra ou jumento). Para NeuN, Iba1 e GFAP a incubação foi *overnight*, em temperatura ambiente, enquanto CB1 e FAAH foram incubados por 48 horas, de 2 a 8 °C. Após esse período os cortes foram lavados (3 x 10 minutos em PB 0,1M) e incubados com os anticorpos secundários biotinilados (*donkey anti-mouse IgG ou goat anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.*, 1:200) durante 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após um novo ciclo de lavagens (3 x 10 minutos em PB 0,1M), os cortes foram incubados por 1,5 hora na solução amplificadora da reação contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase HRP (ABC ELITE kit, Vecstatein), a qual consiste em 10% das soluções A e B em tampão fosfato 0,1M com 0,4M de NaCl e Triton-X 0,3%. Por fim, os cortes foram novamente lavados (3 x 10 minutos em PB 0,1M) para início do processo de revelação, no qual foram pré-incubados em 1 mL de 3,3'-diaminobenzidina (DAB-Sigma-Aldrich) diluído em 100 mL de PB 0,1M durante 5 minutos, sob agitação. Em seguida, foram acrescentadas algumas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% em água destilada, mantendo-se os cortes em solução até a constatação da imunorreatividade desejada (desenvolvimento de coloração marrom). A reação foi interrompida pela remoção dos cortes da solução de DAB seguida por lavagens em PB 0,1M (6 x 5 minutos). Os cortes foram armazenados em geladeira, sob abrigo da

luz e montados em lâminas gelatinizadas com solução de montagem (PB 0,1M contendo etanol absoluto e gelatina bovina) em até uma semana. Após pelo menos 48 horas de secagem das lâminas iniciou-se a bateria de desidratação, na qual após exposição do material a solução de tetróxido de ósmio (1 minuto) para intensificação da cor e a água deionizada (5 minutos), os cortes foram expostos às seguintes soluções alcoólicas, por 5 minutos: álcool 70%; álcool 90%; álcool 95%; álcool absoluto I; álcool absoluto II; xilol I; xilol II; e xilol III. As lamínulas foram então fixadas com Permount™ (Fisher Chemical™) e após secagem do mesmo armazenadas em caixas apropriadas.

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico Zeiss acoplado à câmera AxioCam HR e à ferramenta *ZEN pro 2012*, no aumento de 10x. Foram fotografados 10 cortes representativos de diferentes níveis das regiões de interesse em ambos os hemisférios, com 1 foto por campo. A quantificação da marcação foi efetuada pelo software Image-J (National Institutes of Health, USA). Para todas as quantificações, as imagens foram convertidas em 16-bit e aplicou-se um *threshold* de 130 a 180, para remoção da coloração de fundo. As análises respeitaram a marcação particular de cada um dos anticorpos. Para CB1 e FAAH analisou-se a densidade óptica integrada, sendo as regiões escolhidas para CB1 globo pálido, amígdala basolateral, substância negra reticular e porções hipocámpais CA-1, CA-3 e giro denteado; e para FAAH as regiões CA-1 e CA-3 do hipocampo. Realizou-se a contagem de células NeuN, GFAP e Iba1 positivas nas regiões de córtex cingulado, córtex pré-límbico, núcleo accumbens, caudado-putâmen ventro-lateral e ventromedial, substância cinzenta periaquetudal e hipocampo. No hipocampo, para NeuN procedeu-se com análise por densidade integrada, nas sub-regiões regiões CA-1, CA-3 e giro denteado.

#### **4.7. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelos softwares SPSS 20 (IBM Corporation, USA) e GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, USA). Todos os dados numéricos estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão ou porcentagem, considerando o nível de significância de  $\alpha < 0,05$ . A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a distribuição normal foi constatada. Neste sentido, análises paramétricas foram aplicadas. A esfericidade foi acessada pelo teste de Mauchly e conforme o valor da



estimativa de esfericidade ( $\epsilon$ ) dados não esféricos foram corrigidos pelas correções de Huynh-Feldt ( $\epsilon > 0,75$ ) ou Greenhouse-Geisser ( $\epsilon \leq 0,75$ ). O tamanho do efeito foi calculado pelo teste de Cohen (disponível em <https://www.socscistatistics.com/effectsize/default3.aspx>), de forma que o efeito foi considerado pequeno quando  $d < 0,5$ ; médio quando  $0,5 \leq d < 0,8$ ; e grande para  $d \geq 0,8$ .

As avaliações comportamentais foram analisadas por ANOVA de duas vias com medidas repetidas quando se considerou os fatores dia experimental (dentro dos sujeitos e medida repetida) e grupo experimental (entre os sujeitos) ou ANOVA de uma via, quando apenas um dos fatores foi considerado. Para a avaliação dos dados de imagem PET com [ $^{18}\text{F}$ ]FDG foi utilizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas quando apenas um grupo de animais foi avaliado, considerando os fatores VOI e tratamento como fatores dentro dos sujeitos e medidas repetidas. Já quando mais de um grupo foi avaliado, utilizou-se a ANOVA de três vias com medidas repetidas, considerando-se VOI e tratamento como fatores dentro dos sujeitos e medidas repetidas e grupo como o fator entre os sujeitos. Para avaliação da imunohistoquímica foi utilizada ANOVA de uma via. O *post-hoc* de Bonferroni com correção para múltiplas comparações foi utilizado após todas as análises por ANOVA. Quando cabível, utilizou-se o teste “t” de *Student* para comparação de dois parâmetros, sendo o teste pareado aplicado quando o mesmo grupo de animais foi avaliado em dois momentos distintos, e o teste não pareado utilizado quando grupos diferentes foram comparados. Por fim, correlação de Pearson foi aplicada para estabelecer relações entre dois parâmetros.

*Capítulo 5 - Avaliação  
Comportamental*

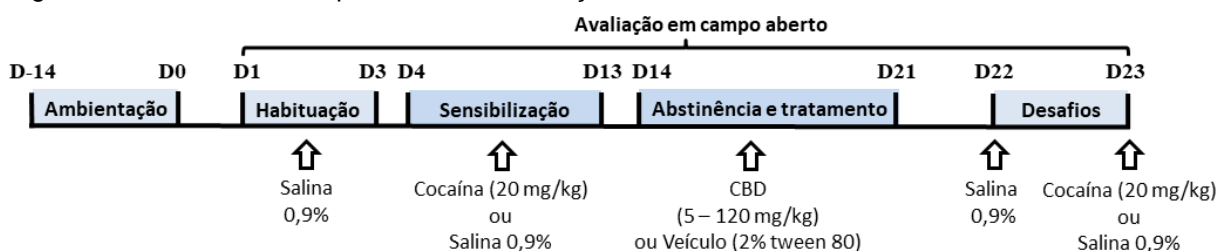
## CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

### 5.1. Desenho experimental

Esta avaliação teve o objetivo de evidenciar se o canabidiol seria eficaz em inibir a expressão da sensibilização psicomotora induzida pela cocaína. Conforme ilustrado na Figura 18, todos os animais foram habituados 3 dias no campo aberto; sensibilizados com cocaína (20 mg/kg, i.p.) ou salina por 10 dias, em dias alternados, totalizando 5 administrações; tratados com veículo ou CBD por 8 dias consecutivos; e desafiados com cocaína (expressão da sensibilização) ou salina após 48h. Foram utilizados 60 animais, randomicamente divididos em 8 grupos experimentais:

- SSS: grupo controle (n = 8) – recebe apenas salina em todos os dias experimentais;
- SSC: grupo agudo de cocaína (n = 7) – recebe uma injeção aguda de cocaína no dia do desafio (último dia experimental) e solução salina nos demais dias;
- CSC: grupo sensibilizado (n = 7) – recebe cocaína na etapa de sensibilização, veículo na etapa de tratamento e cocaína no dia do desafio.
- Grupos CCBDC: grupos sensibilizados e tratados com CBD – recebem cocaína na etapa de sensibilização, canabidiol na etapa de tratamento e cocaína no dia do desafio. Foram testadas 5 doses de canabidiol: 5 (n = 7), 15 (n = 8), 30 (n = 7), 60 (n = 7) e 120 mg/kg (n = 8).

Figura 18: Delineamento experimental da avaliação da dose de CBD.



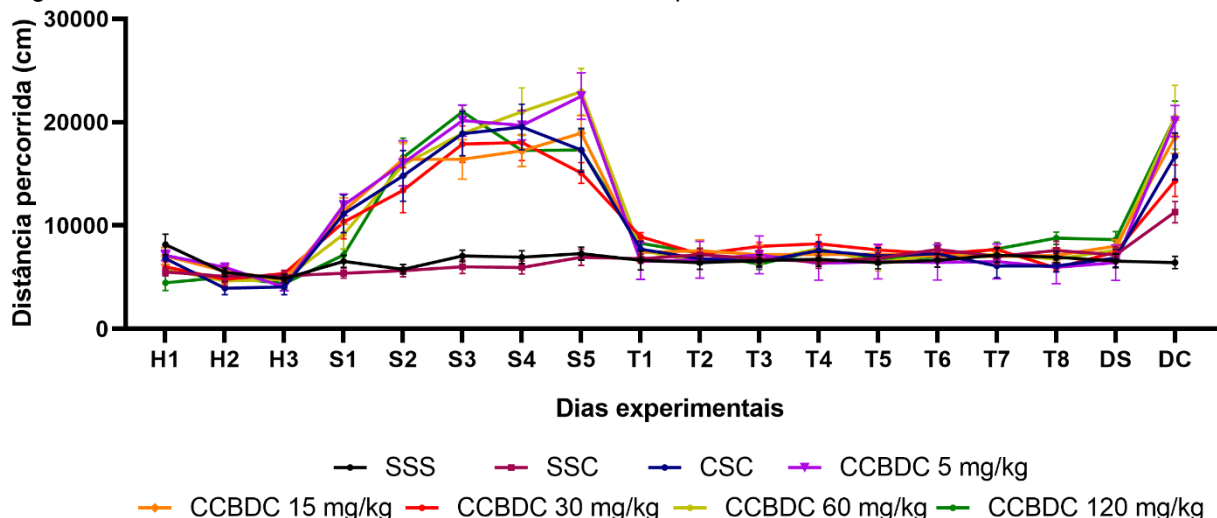
60 animais foram divididos em 8 grupos: SSS (n = 8), SSC (n = 7), CSC (n = 7), CCBDC 5 mg/kg (n = 7), CCBDC 15 mg/kg (n = 8), CCBDC 30 mg/kg (n=7), CCBDC 60 mg/kg (n = 7) e CCBDC 120 mg/kg (n = 8). Os animais foram habituados 3 dias no campo aberto, sensibilizados com cocaína (20 mg/kg, i.p.) ou salina em dias alternados, totalizando 5 administrações; tratados com veículo ou CBD (5 - 120 mg/kg, i.p.) durante 8 dias consecutivos; desafiados com salina e, 24h após, com cocaína (20 mg/kg).

Ao final do protocolo, todos os animais foram eutanasiados, sob anestesia de isoflurano (5% em oxigênio) por remoção cardíaca. Os encéfalos foram dissecados para coleta das estruturas de estriado, hipocampo e córtex pré-frontal. As estruturas foram congeladas imediatamente após a coleta, a  $-80^{\circ}\text{C}$  e armazenadas para serem analisadas futuramente.

## 5.2. Resultados

Os resultados da avaliação comportamental podem ser observados na Figura 19. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas, considerando dia experimental como fator dentro dos sujeitos e medidas repetidas e grupo como fator entre os sujeitos, evidenciou efeito significativo para ambos os fatores (dia experimental:  $F_{(17, 867)} = 138,20$ ,  $p < 0,0001$ ; grupo:  $F_{(7, 51)} = 7,31$ ,  $p < 0,0001$ ) e para interação entre ambos ( $F_{(119, 867)} = 7,43$ ,  $p < 0,001$ ).

Figura 19: Análise da atividade locomotora total em campo aberto.



A atividade locomotora total (cm) foi quantificada no campo aberto todos os dias, durante 30 minutos logo após a administração das substâncias de interesse. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. SSS: animais que receberam apenas salina ( $n = 8$ ); SSC: animais que receberam cocaína no dia do desafio da expressão e salina nos demais dias ( $n = 7$ ); CSC: animais sensibilizados com cocaína, tratados com veículo e desafiados com cocaína ( $n = 7$ ); CCBDC: animais sensibilizados com cocaína, tratados com CBD e desafiados com cocaína ( $n = 7 - 8$ ). S: sensibilização; DC: desafio da expressão da sensibilização. H: habituação; S: sensibilização; T: tratamento; DS: desafio salina; DC: desafio da expressão da sensibilização.

Durante o período de habituação (H1-H3) o *post-hoc* de Bonferroni não evidenciou efeito significativo entre os grupos, nem entre os três dias avaliados dentro de cada grupo, demonstrando que os animais apresentaram o mesmo nível basal de atividade locomotora. Também não houve diferenças entre os grupos durante o

período de abstinência e tratamento (T1 – T8) nem no desafio com salina, indicando que nenhuma das doses de CBD avaliadas apresentou efeito na atividade locomotora. Além disso, como a atividade no dia do desafio salina (DS) foi semelhante aos dias de habituação, conclui-se que o período de abstinência e tratamento foi eficaz em dissociar o contexto (campo aberto) da cocaína. Contudo, isso não foi um efeito exclusivo do CBD, uma vez que o grupo que recebeu veículo (CSC) se comportou da mesma maneira.

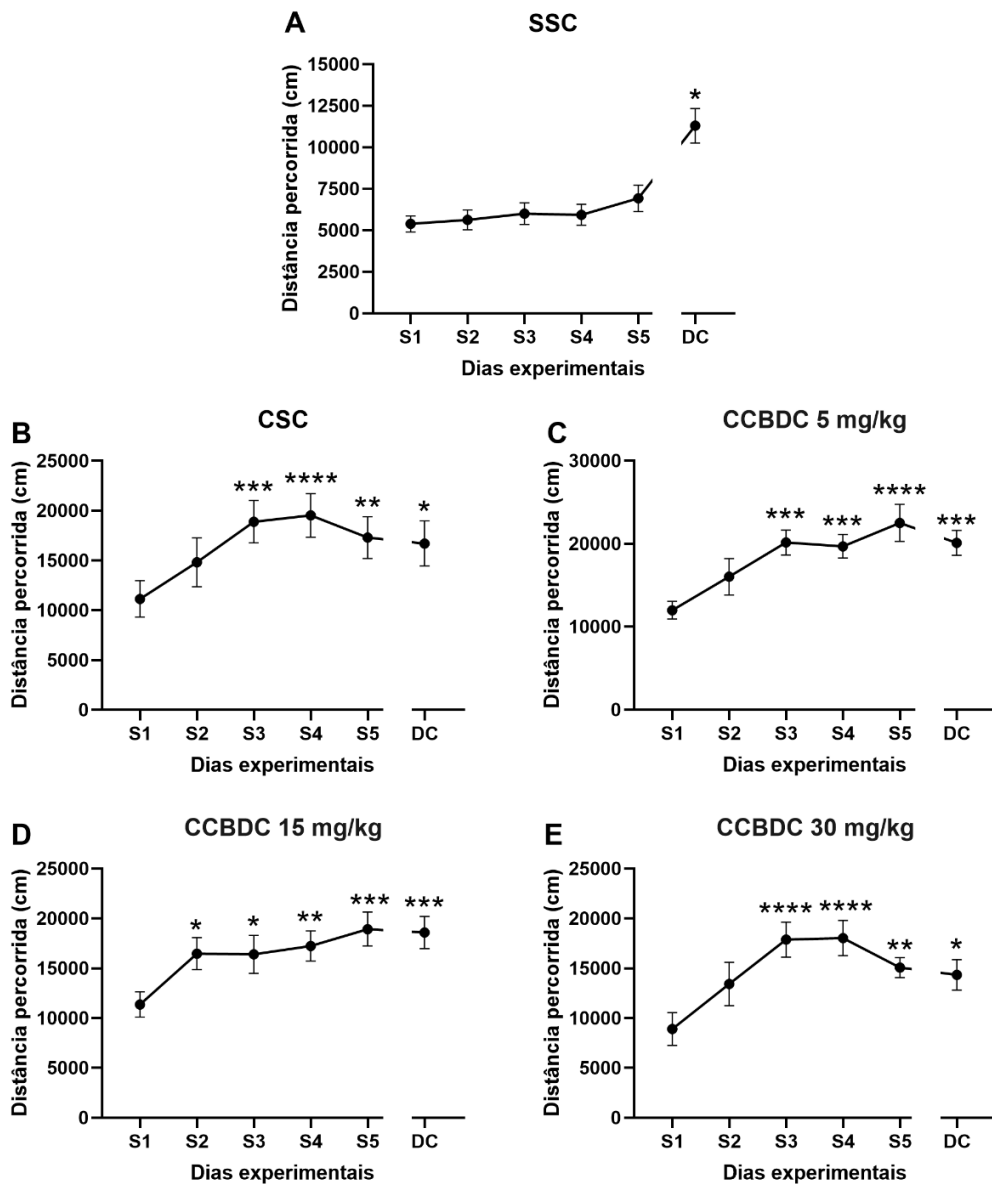
Na etapa experimental de aquisição da sensibilização psicomotora (S1 a S5), observou-se o efeito psicoestimulante da cocaína em todos os animais que receberam a droga, de forma que a atividade locomotora deles diferiu daqueles que receberam salina (SSS e SSC). Ainda, no dia do desafio (DC) todos os animais sensibilizados apresentaram o fenômeno da expressão da sensibilização psicomotora, indicando que nenhuma das doses avaliadas de canabidiol foi eficaz na prevenção ou atenuação deste fenômeno. Neste dia também se observou a manifestação do efeito agudo da cocaína (grupo SSC), o qual foi inferior em relação ao efeito gerado pela sensibilização, exceto no grupo tratado com a dose de 30 mg/kg de CBD na etapa de abstinência e tratamento (CSC:  $p = 0,026$ ; CCBDC 5 mg/kg, 60 mg/kg e 120mg/kg:  $p < 0,00001$ ; CCBDC 15 mg/kg:  $p = 0,0001$ ; CCBDC 30 mg/kg:  $p > 0,999$ , em relação a SSC no dia do DC). De fato, no dia do DC, o grupo tratado com 30 mg/kg de CBD apresentou atividade locomotora inferior àquelas dos grupos que receberam 5 ( $p = 0,011$ ), 60 ( $p = 0,005$ ) e 120 mg/kg ( $p = 0,003$ ) de CBD.

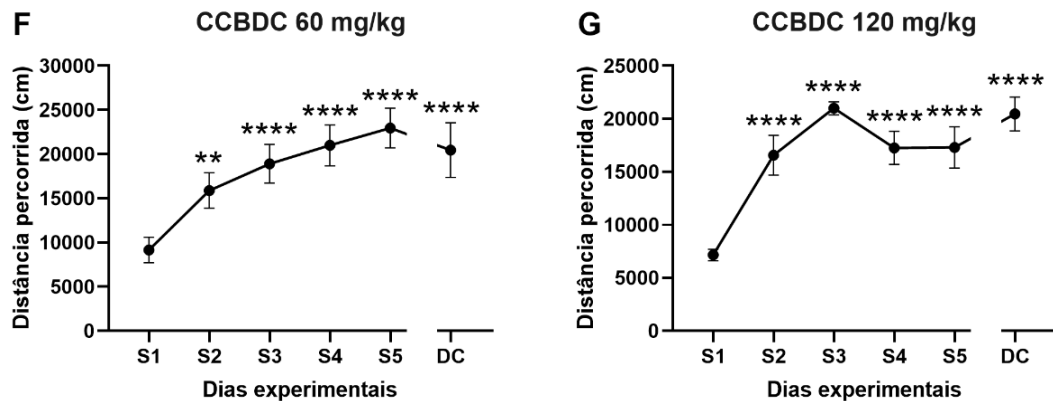
Para fazer uma avaliação mais completa da aquisição e da expressão da sensibilização, além do efeito agudo, avaliou-se por ANOVA de duas vias com medidas repetidas a atividade dos grupos sensibilizados (CSC e CCBDCs) e do grupo agudo (SSC) nesse período (S1 a S5 e DC). Os dados estão ilustrados na Figura 20.

A ANOVA mostrou que os dois fatores analisados foram significativos (dia experimental:  $F_{(5, 220)} = 40,70$ ,  $p < 0,0001$ ; grupo:  $F_{(6, 44)} = 10,23$ ,  $p < 0,0001$ ), bem como a interação  $F_{(30, 220)} = 2,32$ ,  $p = 0,0003$ ). O *post-hoc* de Bonferroni indicou a aquisição no segundo dia de administração para os grupos CCBDC 15 mg/kg ( $p = 0,025$ ; Figura 20C), CCBDC 60 mg/kg ( $p = 0,003$ , Figura 20E) e CCBDC 120 mg/kg ( $p < 0,0001$ , Figura 20E) e no terceiro dia para os grupos CSC ( $p = 0,0004$ , Figura 20B), CCBDC 5 mg/kg ( $p = 0,0002$ , Figura 20C) e CCBDC 30 mg/kg ( $p < 0,0001$ , Figura 20E). Conforme o esperado, foram evidenciados o efeito agudo no grupo SSC ( $p = 0,012$ , Figura 20A) e a expressão da sensibilização no grupo CSC ( $p = 0,02$ , Figura 20B).

Contudo, esse efeito foi observado após o tratamento com as três doses de CBD, demonstrando que este composto, administrado sob estas condições, foi incapaz de atenuar/reverter as alterações de plasticidade desencadeadas pela exposição repetida à cocaína (CCBDC 5 mg/kg:  $p = 0,0002$ , Figura 20C; CCBDC 15 mg/kg:  $p = 0,0004$ , Figura 20D; CCBDC 30 mg/kg:  $p = 0,025$ , Figura 20E; CCBDC 60 mg/kg:  $p < 0,0001$ , Figura 20F; CCBDC 120 mg/kg:  $p < 0,00001$ , Figura 20G).

Figura 20: Análise da sensibilização psicomotora.



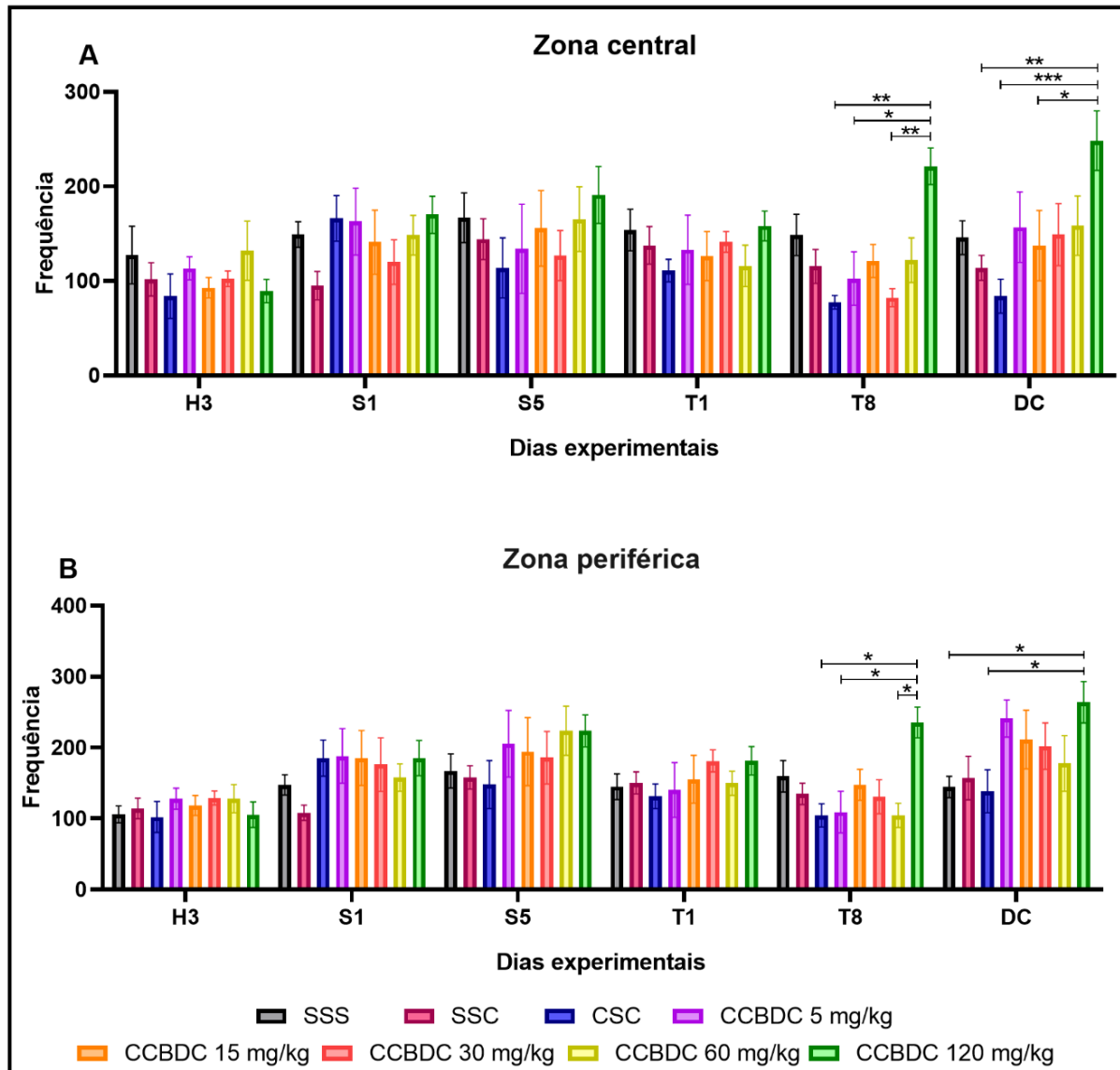


Foram avaliados animais dos grupos SSC (n = 7), CSC (n = 7), CCBDC 5 (n = 7), 15 (n = 8), 30 (n = 7), 60 (n = 7) e 120 mg/kg (n = 8). ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 em relação a S1. Dados expressos como média ± erro padrão. SSC: animais que receberam cocaína no dia do desafio da expressão e salina nos demais dias; CSC: animais sensibilizados com cocaína, tratados com veículo e desafiados com cocaína; CCBDC: animais sensibilizados com cocaína, tratados com CBD e desafiados com cocaína. S: sensibilização; DC: desafio da expressão da sensibilização.

O comportamento dos animais também foi avaliado nas regiões central e periférica do campo aberto, para se obter uma medida sugestiva de ansiedade. Analisou-se para cada grupo experimental a frequência e o tempo de permanência em cada região do aparato nos seguintes dias: último dia de habituação (H3), primeiro e último dia de sensibilização (S1 e S5) e de abstinência e tratamento (T1 e T8), e no desafio da expressão (DC).

Em relação à frequência de entrada nas zonas, em ambas, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou efeito significativo para o fator dia experimental (zona central:  $F_{(5, 255)} = 5,837$ ,  $p < 0,0001$ ; zona periférica:  $F_{(5, 255)} = 14,84$ ,  $p < 0,0001$ ) e para a interação entre os fatores (zona central:  $F_{(35, 255)} = 1,537$ ,  $p = 0,033$ ; zona periférica:  $F_{(35, 255)} = 1,50$ ,  $p < 0,041$ ); mas não para o fator grupo (zona central:  $F_{(7, 51)} = 1,80$ ,  $p = 0,11$ ; zona periférica:  $F_{(7, 51)} = 1,38$ ,  $p = 0,24$ ). O *post-hoc* de Bonferroni evidenciou algumas alterações deste perfil locomotor entre os grupos, conforme observa-se na Figura 21. O grupo que recebeu 120 mg/kg de CBD apresentou maior frequência de entradas na zona central no último dia de tratamento (T8) em relação aos grupos tratados com 5 mg/kg ( $p < 0,05$ ) e 30 mg/kg ( $p < 0,01$ ) de CBD e também comparado ao grupo CSC ( $p < 0,01$ ), sugerindo um efeito ansiolítico. No dia do desafio, esse efeito foi replicado, de forma que a dose de 120 mg/kg gerou maior frequência de entradas em relação à dose de 15 mg/kg ( $p < 0,05$ ) e em relação aos grupos SSC ( $p < 0,01$ ) e CSC ( $p < 0,001$ ), sugerindo que a dose de 120 mg/kg de CBD gerou um efeito ansiolítico mesmo na presença da cocaína.

Figura 21: Avaliação da frequência de entradas nas zonas central e periférica do campo aberto.



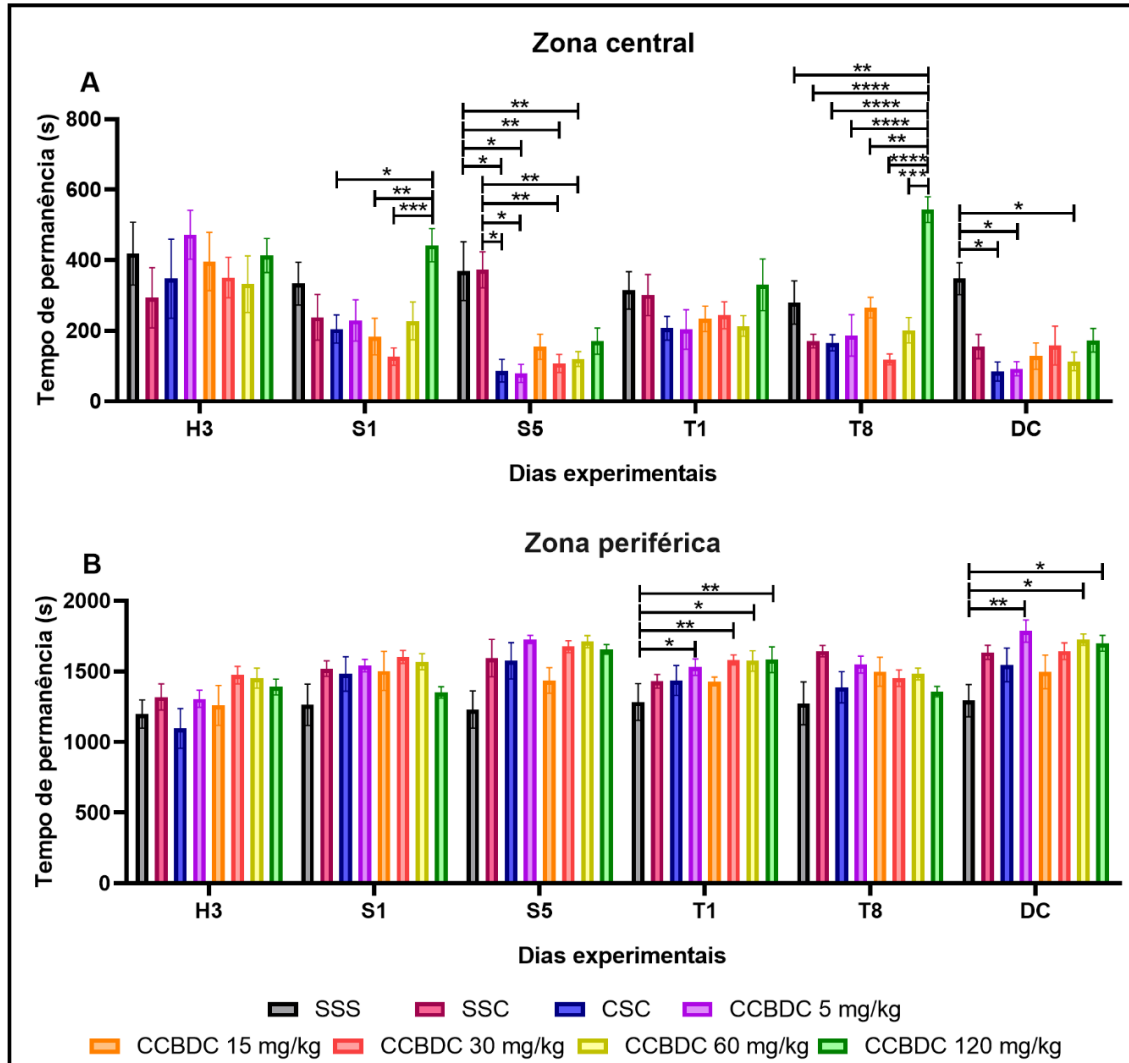
ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. SSS ( $n = 8$ ): animais que receberam apenas salina; SSC ( $n = 7$ ) animais que receberam cocaína no dia do desafio da expressão e salina nos demais dias; CSC ( $n = 7$ ): animais sensibilizados com cocaína, tratados com veículo e desafiados com cocaína. CCBDC: animais sensibilizados com cocaína, tratados com CBD nas seguintes doses: 5 mg/kg ( $n = 7$ ), 15 mg/kg ( $n = 8$ ), 30 mg/kg ( $n = 7$ ), 60 mg/kg, ( $n = 7$ ) e 120 mg/kg ( $n = 8$ ). H: habituação; S: sensibilização; T: tratamento; DC: desafio da expressão da sensibilização.

Em relação ao tempo de permanência (Figura 22), os animais do grupo CCBDC 120 mg/kg permaneceram mais tempo explorando a região central no primeiro dia de sensibilização (S1) em relação aos dias do desafio quando comparados aos dos grupos CSC ( $p < 0,05$ ), CCBDC 15 mg/kg ( $p < 0,01$ ) e CCBDC 30 mg/kg ( $p < 0,001$ ). Porém, no último dia de sensibilização (S5) essa aparente tendência mais ansiolítica desses animais não esteve mais presente. De fato, neste dia os animais que receberam salina ao longo da sensibilização (SSS e SSC) permaneceram mais tempo na zona central em relação aos animais tratados com cocaína, indicando que o



tratamento repetido com a droga associa-se a um comportamento ansiogênico (CSC:  $p < 0,05$ ; CCBDC 5 mg/kg:  $p < 0,05$ ; CCBDC 30 mg/kg:  $p < 0,01$ ; CCBDC 60 mg/kg:  $p < 0,01$ , em relação a ambos, SSS e SSC).

Figura 22: Avaliação do tempo de permanência nas zonas central e periférica do campo aberto.



ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. SSS ( $n = 8$ ): animais que receberam apenas salina; SSC ( $n = 7$ ): animais que receberam cocaína no dia do desafio da expressão e salina nos demais dias; CSC ( $n = 7$ ): animais sensibilizados com cocaína, tratados com veículo e desafiados com cocaína. CCBDC: animais sensibilizados com cocaína, tratados com CBD nas seguintes doses: 5 mg/kg ( $n = 7$ ), 15 mg/kg ( $n = 8$ ), 30 mg/kg ( $n = 7$ ), 60 mg/kg, ( $n = 7$ ) e 120 mg/kg ( $n = 8$ ). H: habituação; S: sensibilização; T: tratamento; DC: desafio da expressão da sensibilização.

No dia do desafio da expressão (DC; Figura 22), a permanência do grupo SSS na zona central foi visualmente superior a dos demais grupos, porém houve significância estatística apenas em relação aos grupos CSC ( $p < 0,05$ ), CCBDC 5 mg/kg ( $p < 0,05$ ) e CCBDC 60 mg/kg ( $p < 0,05$ ). Em relação ao tratamento com CBD, no último dia (T8) de administração, os animais que receberam a maior dose

permaneceram mais tempo na zona central do que todos os outros grupos, incluindo o controle, indicando efeito ansiolítico dessa dose (SSS:  $p < 0,01$ ; SSC:  $p < 0,0001$ ; CSC:  $p < 0,0001$ ; CCBDC 5 mg/kg:  $p < 0,0001$ ; CCBDC 15 mg/kg:  $p < 0,01$ ; CCBDC 30 mg/kg:  $p < 0,0001$ ; CCBDC 60 mg/kg:  $p < 0,001$ ). Contudo, como no desafio da expressão esses animais não apresentaram este mesmo comportamento, sugere-se que o efeito ansiolítico do CBD não é suficiente para evitar o efeito ansiogênico que a cocaína promove.

### 5.3. Discussão

Observamos que a dose de cocaína utilizada foi satisfatória para induzir a sensibilização psicomotora, bem como efeito psicoestimulante agudo, porém o CBD, apesar de ter proporcionado efeito ansiolítico, foi incapaz de impedir a expressão da sensibilização. A utilização do protocolo de sensibilização psicomotora tem como objetivo estudar alterações comportamentais e de plasticidade promovidas pela administração repetida de drogas, em determinado contexto.

Em nosso estudo, a indução da sensibilização psicomotora foi observada em todas as avaliações realizadas com a cocaína, uma vez que os animais apresentaram aumento da resposta psicomotora para uma mesma dose da cocaína, locomovendo-se mais no último dia de sensibilização do que no primeiro dia, no qual houve a primeira experiência com a substância. Conseqüentemente, pode-se dizer que houve aumento do tônus do sistema mesolímbico dopaminérgico, devido ao excesso de dopamina liberada na fenda sináptica, e aumento da saliência do incentivo (BERRIDGE; ROBINSON, 2016; SCHLUSSMAN et al., 2005).

A intervenção farmacológica, no protocolo de sensibilização psicomotora é realizada na fase da abstinência, com o intuito de reverter as alterações geradas na indução, impedindo, então, sua expressão. Para tanto, a estratégia terapêutica pode bloquear o mecanismo de ação da droga; ou induzir uma resposta neuroquímica que competirá com o mesmo, ou ainda, ativar um mecanismo similar ao induzido pela droga gerando, porém, efeitos desagradáveis (PHILLIPS et al., 2011). Em relação à adicção, são conduzidos protocolos de extinção, nos quais a substância de interesse, como o CBD, é administrada no ambiente pareado com a droga, esperando-se que no dia do desafio em que a droga é reintroduzida, a expressão da sensibilização seja suprimida (OLIVEIRA-LIMA et al., 2015).

Em nosso protocolo, antes do período de indução da sensibilização, os animais foram habituados ao campo aberto por três dias consecutivos. Isso é importante para evitar o sinergismo entre o efeito psicoestimulante da cocaína e o comportamento exploratório de um ambiente novo. Além disso, os animais receberam injeções de salina, para se adaptarem à contenção e à injeção, evitando que a administração da droga se tornasse um estresse imprevisível que pudesse afetar a locomoção (CAMARINI et al., 2008; CARRARA-NASCIMENTO; OLIVE; CAMARINI, 2014). Conforme observado, a atividade locomotora dos animais foi estabilizada no segundo dia de habituação, permitindo a quantificação da atividade locomotora basal em um ambiente conhecido e certificando que o aumento da mesma foi consequência do efeito psicoestimulante.

Durante a aquisição da sensibilização, houve um pareamento entre a cocaína e o contexto (campo aberto). Durante o período de abstinência, contudo, houve um processo de extinção, pois este contexto passou a ser pareado com o CBD. Para avaliar a eficácia dessa extinção, procedeu-se com o desafio salina, um dia após a última administração de CBD. A extinção é eficaz caso os animais apresentem uma atividade locomotora semelhante ao basal, ou seja, após o tratamento com CBD deseja-se observar uma dissociação entre o contexto e a droga (TIRELLI; MICHEL; BRABANT, 2005). Isso foi, de fato, observado em nosso protocolo para todas as doses de CBD avaliadas (5, 15, 30, 60 e 120 mg/kg) e também para quando houve administração de salina (grupo CSC).

No dia seguinte ao com salina, os animais foram avaliados quanto à expressão da sensibilização, sendo reexpostos à cocaína. A eficácia do tratamento seria confirmada caso a expressão fosse reduzida ou bloqueada em relação à indução, o que refletiria na ausência de um pico locomotor induzido pelo efeito psicoestimulante da cocaína. Entretanto, nenhuma das doses de CBD avaliadas foi capaz de inibir a expressão da sensibilização psicomotora induzida pela cocaína. O mesmo foi observado por Luján e colaboradores (2018), e Gerdeman e colaboradores (2008); ainda, FILEV e colaboradores (2017) viram o mesmo efeito para o etanol.

Isso poderia ser um indicativo de que o CBD não atuaria nos mecanismos biológicos relacionados a este fenômeno. Contudo, infusões de CBD intra-NAc foram efetivas em inibir os disparos neuronais dopaminérgicos, com envolvimento de receptores 5HT<sub>1A</sub>, demonstrando que o CBD influencia essa via (NORRIS et al., 2016). Além disso, um recente estudo observou que o CBD não apenas aliviou sinais motores

(atividade locomotora) e somáticos (ansiedade) de abstinência após escalonamento de dose de cocaína, como também bloqueou o aumento da expressão gênica do transportador de dopamina e da enzima tirosina hidroxilase na VTA e, no NAc, reverteu a redução da expressão do gene que codifica CB1 e induziu aumento do gene que codifica CB2 (GASPARYAN et al., 2021).

De fato, estudos avaliando outros psicoestimulantes e distintas classes de drogas, confirmam a interação do CBD com a via mesocorticolímbica dopaminérgica, bem como o envolvimento de diferentes vias de transdução, derivadas da complexa farmacologia dessa molécula. Já foi relatado que o CBD reduziu ou inibiu a sensibilização psicomotora induzida por metanfetamina (UMPIERREZ et al., 2022), anfetamina (RENARD et al., 2016), e agonista canabinoide (NAVARRETE; ARACIL-FERNÁNDEZ; MANZANARES, 2018), bem como o efeito locomotor agudo da metanfetamina (UMPIERREZ et al., 2022). Para tanto, diferentes mecanismos moleculares estiveram envolvidos, como o aumento da atividade dopaminérgica na VTA e a ativação da via mTOR/p70S6K (RENARD et al., 2016). Além disso, a administração do CBD reverteu alterações moleculares induzidas pela cocaína, gerando um efeito final de redução da expressão dos genes da tirosina hidroxilase na VTA e aumento dos genes dos receptores  $\mu$ -opioides e CB1 no NAc (NAVARRETE; ARACIL-FERNÁNDEZ; MANZANARES, 2018). Logo, os eventos de neuroplasticidade são essenciais para a eficácia farmacológica do CBD.

Ainda, alguns estudos observaram um papel relevante do receptor CB1 na sensibilização, porém mais estudos são necessários para compreender a complexa relação entre esse receptor e o CBD e como isso está implicado no fenótipo da adicção. Observou-se que animais *knockout* para o receptor CB1 e seu bloqueio farmacológico com o antagonista rimonabanto, preveniram tanto a indução quanto a expressão da sensibilização à cocaína em camundongos (CORBILLÉ et al., 2007; GERDEMAN; SCHECHTER; FRENCH, 2008).

O CBD também foi eficaz em reduzir os efeitos recompensadores e reforçadores da cocaína, acessados, respectivamente, pelos testes de CPP e de autoadministração, de forma que potencializa a extinção e dificulta a reconsolidação da CPP induzida pela droga e reduz seus efeitos reforçadores e a motivação para a autoadministração (DE CARVALHO; TAKAHASHI, 2017; GALAJ et al., 2020; GALAJ; XI, 2021; HAY et al., 2018; LUJÁN et al., 2018; LUJÁN; CANTACORPS; VALVERDE, 2020; PARKER et al., 2004). Essa eficácia também foi verificada para outras

substâncias, como etanol (VIUDEZ-MARTÍNEZ et al., 2018) e morfina (KATSIDONI; ANAGNOSTOU; PANAGIS, 2013; MARKOS et al., 2018; PARKER et al., 2004). Os mecanismos moleculares associados foram a ação agonista em receptores CB2 e TRPV1, modulação alostérica negativa de CB1 (GALAJ et al., 2020), além de alterações na expressão gênica, como aumento da expressão de CB1 e do fator neurotrópico do encéfalo (BDNF) no hipocampo (LUJÁN et al., 2018), redução da expressão gênica da tirosino-hidroxilase na VTA e dos receptores  $\mu$ -opioide, CB1 e GPR55 no NAc, onde CB2 também aumentou (VIUDEZ-MARTÍNEZ et al., 2018).

Em relação à prevenção de recaídas, o CBD, apresenta efeito variável, conforme o protocolo utilizado. Enquanto não houve eficácia na prevenção de recaída induzida por reexposição à cocaína (LUJÁN; CANTACORPS; VALVERDE, 2020), o CBD foi efetivo na recaída induzida pela reexposição à metanfetamina (HAY et al., 2018) ou à cocaína em protocolos que utilizaram estresse e reexposição ao contexto (GONZALEZ-CUEVAS et al., 2018). Mais ainda, o CBD inibiu a recaída à heroína, induzida por pistas ambientais, o que se associou tanto à redução da expressão gênica de CB1 quanto da quantidade expressa do receptor, no NAc e na porção medial do estriado dorsal (REN et al., 2009). De fato, sabe-se que os circuitos associados à recaída variam conforme o estímulo aplicado (BOSSERT et al., 2013). A recaída é motivada principalmente por altos níveis de ansiedade resultantes da fissura pela droga, os quais consistem em uma das principais preocupações do tratamento da adicção.

Em nosso estudo, conforme o esperado, durante o tratamento com CBD não foram observadas alterações na atividade locomotora induzidas pela substância em si. Diferentemente do  $\Delta^9$ -THC, o CBD não possui propriedades reforçadoras nem induz CPP, não altera a atividade locomotora nem induz catalepsia (GALAJ et al., 2020; KATSIDONI; ANAGNOSTOU; PANAGIS, 2013; PARKER et al., 2004; VIUDEZ-MARTÍNEZ et al., 2018). Em humanos, o CBD não induz os sintomas psicoativos nem as alterações cognitivas consequentes ao  $\Delta^9$ -THC (MACHADO BERGAMASCHI et al., 2011).

Ao analisarmos a locomoção dos animais nas zonas central e periférica do campo aberto, observamos um efeito ansiolítico induzido pelo CBD na dose de 120 mg/kg, refletido em maior tempo de permanência e maior frequência de visitas à zona periférica do campo aberto. Contudo, esse efeito foi eficaz em prevenir a manifestação ansiogênica da cocaína apenas em relação à frequência à zona periférica do aparelho.

Os animais tendem a permanecer mais tempo na periferia, onde se sentem mais seguros, do que no centro da arena, comportamento denominado tigmotaxia (PRUT; BELZUNG, 2003). Assim, quando o animal aumenta a exploração da área central, infere-se a manifestação de um comportamento menos ansioso.

O potencial ansiolítico do CBD já está bem descrito na literatura, tanto por estudos pré-clínicos quanto clínicos (BOLSONI et al., 2022; CAMPOS et al., 2016; DE SOUZA CRIPPA et al., 2004; FOGAÇA et al., 2018; NAVARRETE et al., 2021) e sabe-se que o mesmo é, ao menos em parte, mediado por agonismo aos receptores 5HT<sub>2a</sub> (CAMPOS; GUIMARÃES, 2008; RUSSO et al., 2005). Em estudo duplo-cego com pacientes apresentando transtorno de ansiedade, observou-se que o CBD reduziu a ansiedade, apresentando redução do fluxo sanguíneo cerebral em regiões límbicas e paralímbicas, conforme observado por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) com [<sup>99m</sup>Tc]ECD (dicloridrato de etilenocisteínadietiléster) (CRIPPA et al., 2011). Estudos pré-clínicos utilizando doses medianas de CBD (15 e 20 mg/kg) relataram ansiedade em animais com histórico de uso de cocaína (GONZALEZ-CUEVAS et al., 2018; LUJÁN et al., 2018; NAVARRETE; ARACIL-FERNÁNDEZ; MANZANARES, 2018). Considerando que elevados níveis de ansiedade são fator de risco para recaídas em indivíduos com adicção, o efeito ansiolítico induzido pelo CBD é interessante para aplicabilidade clínica, principalmente quando se considera que essa substância é bem tolerada pelo organismo.

#### **5.4. Conclusão**

Apesar de existirem evidências de que o canabidiol modula com a via mesolímbica dopaminérgica, nossos resultados indicam que o CBD em diferentes doses não foi eficaz em prevenir a expressão da sensibilização psicomotora à cocaína.

*Capítulo 6 - Padronização do  
protocolo de imagem PET com  
[<sup>18</sup>F]FDG e verificação do efeito  
da cocaína no metabolismo  
encefálico de glicose*

## **CAPÍTULO 6 – PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE IMAGEM PET COM [18F]FDG E VERIFICAÇÃO DO EFEITO DA COCAÍNA NO METABOLISMO ENCEFÁLICO DE GLICOSE.**

Parte dos dados apresentados neste item foi publicada no periódico científico *Journal of Neuroscience Research*: SPELTA, L. E. W.; REAL, C. C.; BUCHPIGUEL, C. A.; DE PAULA FARIA, D.; MARCOURAKIS, T. [18F]FDG brain uptake of C57Bl / 6 male mice is affected by locomotor activity after cocaine use : A small animal positron emission tomography study. **Journal of Neuroscience Research**, v. 100, n. 10, p. 1876-1889, 2022. <https://doi.org/10.1002/jnr.25102>

### **6.1. Delineamentos experimentais**

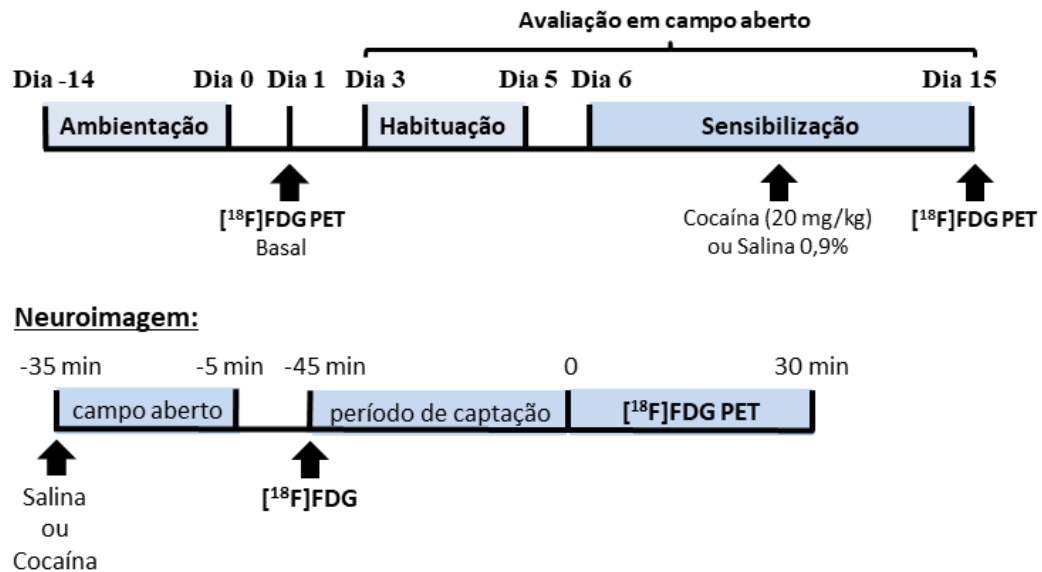
#### **6.1.1. Avaliação da resposta à cocaína por imagem PET**

Esta análise foi realizada para avaliar como seria a resposta da imagem PET ao tratamento com cocaína (20 mg/kg) dentro do protocolo experimental proposto. Sabe-se que há diferenças individuais na resposta psicoestimulante inicial à droga, o que significa que alguns indivíduos podem ser mais resistentes aos efeitos de baixas doses de estimulantes. A dose de 20 mg/kg é utilizada na literatura e foi mais efetiva em produzir respostas comportamentais homogêneas em relação a doses inferiores (Gulley et al., 2003).

Foram utilizados 4 camundongos C57Bl/6 machos habituados por 3 dias consecutivos ao campo aberto e então avaliados quanto à aquisição da sensibilização por 5 dias alternados, com 20 mg/kg de cocaína, conforme a Figura 23. Dois dias antes da habituação e no último dia de sensibilização a atividade encefálica foi avaliada por PET com [18F]FDG. Para tanto, imediatamente após a saída do campo aberto, os animais foram anestesiados (isoflurano 2% em oxigênio a 100%) para injeção do [18F]FDG (37 MBq, i.v.). Uma vez despertados, retornaram às caixas moradias, onde permaneceram 45 minutos para biodistribuição do radiofármaco. Passado este tempo, os animais foram anestesiados novamente (isoflurano 5% para indução e 2% para manutenção) e posicionados com o encéfalo no centro do campo de visão do PET para 30 minutos de aquisição de imagem.



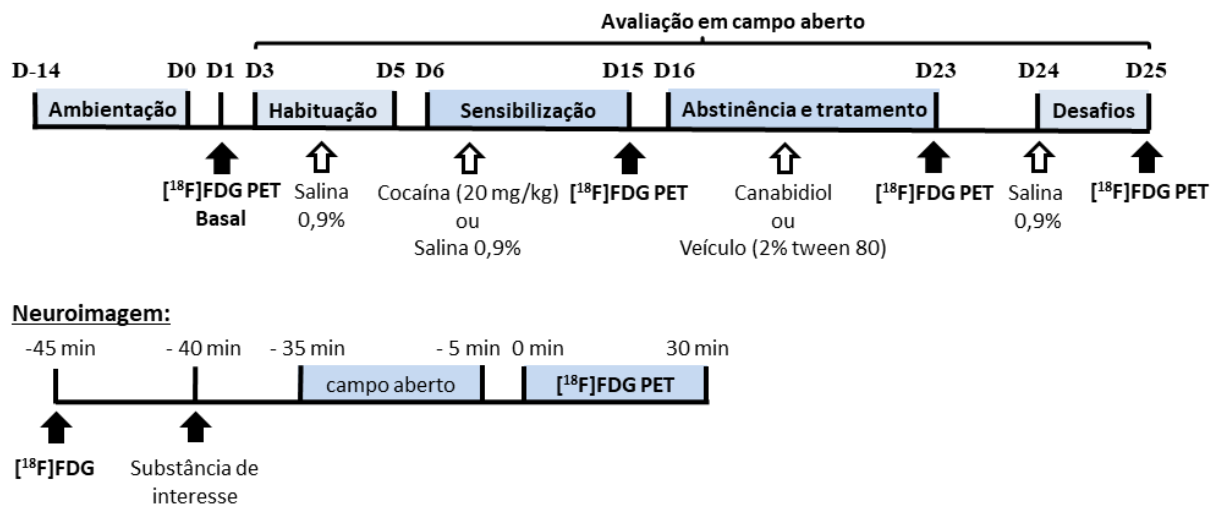
Figura 23: Delineamento experimental da avaliação da resposta à cocaína na imagem PET



Após 3 dias de habituação ao campo aberto, a sensibilização psicomotora à cocaína (20 mg/kg, i.p.) foi induzida em dias alternados por 10 dias, totalizando 5 administrações. A atividade encefálica foi avaliada por imagem PET com [<sup>18</sup>F]FDG 2 dias antes da habituação (D1), imediatamente após a indução da sensibilização (D15). Nos dias de aquisição de imagem, os animais foram retirados do campo aberto e anestesiados (isoflurano 5% para indução e 2% para manutenção, em oxigênio 100%) para injeção de [<sup>18</sup>F]FDG (iv). Após permanecerem 45 minutos na caixa moradia para captação do radiofármaco, os animais foram novamente anestesiados e escaneados no PET durante 30 minutos.

### 6.1.2. Teste dos momentos de injeção de cocaína e [<sup>18</sup>F]FDG

Este teste teve o intuito de avaliar a alteração dos momentos de injeção das substâncias de interesse (cocaína ou CBD) e do [<sup>18</sup>F]FDG, além de verificar a eficácia da dose de 15 mg/kg (i.p.) de CBD. Utilizou-se 4 animais, que, após habituados ao campo aberto, foram sensibilizados com cocaína (20 mg/kg, i.p.), tratados com CBD (15 mg/kg, i.p.) e desafiados com cocaína (20 mg/kg, i.p.), conforme a Figura 24. Houve 4 pontos de aquisição de imagem: imagem basal; último dia de sensibilização; último dia de tratamento; e após o desafio da expressão da sensibilização. Nestes dias os animais foram anestesiados (isoflurano 2% em oxigênio a 100% para indução e manutenção) para medida da glicemia e injeção do [<sup>18</sup>F]FDG (20-37 MBq, i.v.). Após despertarem (5 minutos), os animais foram tratados com as substâncias de interesse (cocaína ou CBD) e encaminhados ao campo aberto por 30 minutos e, em seguida, reconduzidos às caixas moradias para completar os 45 minutos da distribuição do [<sup>18</sup>F]FDG. Os animais foram anestesiados pela segunda vez (isoflurano 2% em oxigênio a 100% para indução e manutenção) e posicionados com o encéfalo no centro do campo de visão do equipamento de PET para aquisição de imagens durante 30 minutos. Durante todo o experimento foi realizada monitorização respiratória.

Figura 24: Delineamento experimental do teste dos momentos de injeção de cocaína e [<sup>18</sup>F]FDG.

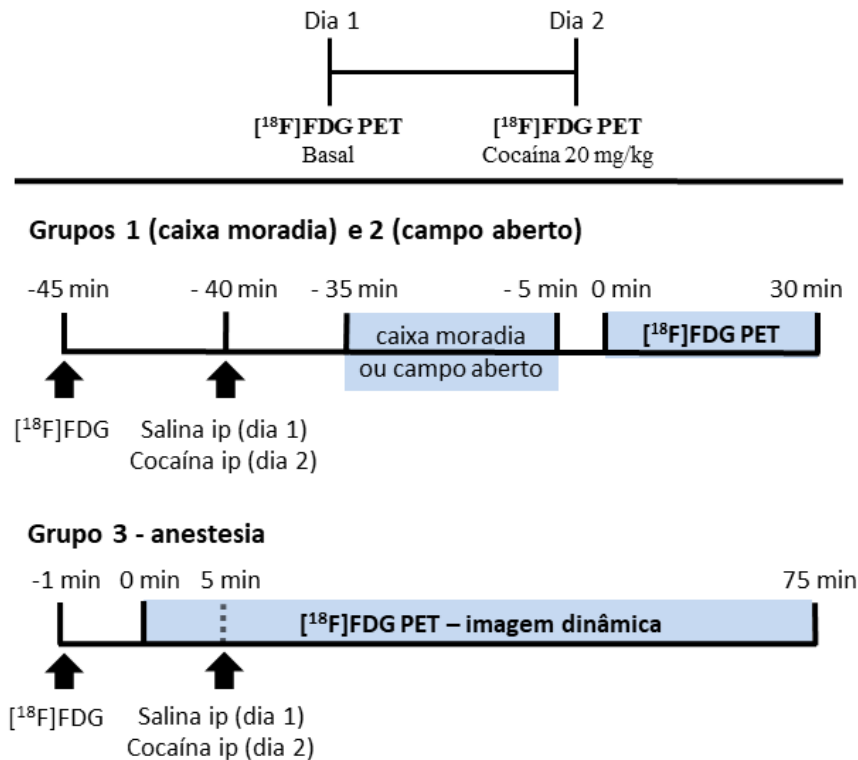
Após 3 dias de habituação ao campo aberto, a sensibilização psicomotora à cocaína (20 mg/kg, i.p.) foi induzida em dias alternados por 10 dias, totalizando 5 administrações. A seguir, os animais foram submetidos a 8 dias consecutivos de abstinência, sendo tratados com CBD 15 mg/kg. Passado o tratamento foram desafiados com salina 0,9%, e, no dia seguinte, avaliados quanto a expressão da sensibilização, no qual os animais receberam cocaína (20 mg/kg, i.p.). Em todos estes períodos a atividade locomotora total foi quantificada durante 30 minutos. A atividade encefálica foi avaliada por PET com [<sup>18</sup>F]FDG dois dias antes da habituação (D1), no último dia de sensibilização (D15), no último dia de abstinência e tratamento (D23) e após o ensaio de expressão da sensibilização (D25). Para a aquisição das imagens os animais foram anestesiados (isoflurano 5% para indução e 2% para manutenção, em oxigênio 100%) para injeção de [<sup>18</sup>F]FDG (iv) e, após acordarem, foram injetados com a substância de interesse e expostos ao campo aberto por 30 minutos. Os animais foram novamente anestesiados e escaneados no PET durante 30 minutos. D: dia.

### 6.1.3. Avaliação da interferência do metabolismo periférico na captação encefálica de [<sup>18</sup>F]FDG

Este teste avaliou a influência do metabolismo periférico, sob o efeito psicoestimulante da cocaína, na captação encefálica do [<sup>18</sup>F]FDG, conforme o protocolo experimental abaixo (Figura 25). Para tanto, 18 animais foram anestesiados (isoflurano 2% em oxigênio a 100%, para indução e manutenção) para injeção do [<sup>18</sup>F]FDG (37 MBq, i.v.). Neste momento, os animais foram randomicamente divididos em três grupos. Os grupos 1 e 2 foram deixados despertar após a injeção do [<sup>18</sup>F]FDG e foram tratados com salina 0,9% (dia 1 – basal) ou cocaína (dia 2 – agudo de cocaína, 20 mg/kg) 5 minutos após a injeção. Os animais do grupo 1 (n = 5, um animal faleceu após a injeção do radiofármaco) foram expostos ao campo aberto durante 30 min e os do grupo 2 (n = 6) foram alojados individualmente em caixas moradias pelo mesmo tempo. Passados 45 minutos da injeção do [<sup>18</sup>F]FDG, os animais foram anestesiados pela segunda vez (isoflurano 2% em oxigênio a 100%) e posicionados com o encéfalo no centro do campo de visão do equipamento de PET para aquisição de imagens

durante 30 min. O terceiro grupo (n = 6) foi encaminhado ao PET imediatamente após a injeção do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, e realizaram-se imagens em modo dinâmico por 75 minutos. Salina 0,9% (dia 1 - basal) e cocaína (dia 2 – agudo de cocaína, 20 mg/kg) foram injetadas 5 minutos após o início da imagem.

Figura 25: Delineamento experimental da avaliação da interferência do metabolismo periférico na captação encefálica de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG.



Os animais foram anestesiados (isoflurano 2% em oxigênio 100%) para injeção de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (iv) e foram divididos em três grupos. Os grupos 1 e 2 despertaram e receberam salina 0,9% no dia 1 (basal) e cocaína (20 mg/kg) no dia 2. O grupo 1 (n=5) permaneceu 30 minutos em campo aberto e o grupo 2 (n=6) o mesmo tempo em uma caixa moradia. Passados 45 minutos da injeção do radiofármaco ambos os grupos foram novamente anestesiados (isoflurano 3% em oxigênio 100%) e submetidos à aquisição de imagem PET por 30 minutos. Os animais do grupo 3 foram encaminhados ao PET imediatamente após a injeção de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, para aquisição de imagem dinâmica ao longo de 75 minutos. Salina 0,9% (dia 1- basal) e cocaína (dia 2 – agudo, 20 mg/kg) foram injetadas 5 minutos após o início da imagem.

Outro grupo de animais foi testado para validar a eficácia metodológica, avaliando se animais sensibilizados à cocaína apresentariam resposta semelhante frente a este novo protocolo, comparado àqueles que receberam a dose aguda. Conforme mostrado na Figura 26, a imagem basal foi adquirida antes do início das administrações da cocaína e, após 24 horas, iniciou-se a avaliação em campo aberto. Primeiramente, os 12 animais utilizados receberam uma injeção de salina e foram habituados ao aparato por 30 minutos (dia 2). No dia seguinte (dia 3), os animais foram randomicamente divididos em dois grupos: grupo cocaína (20 mg/kg, i.p.; n = 5, um

animal faleceu durante o experimento) e grupo controle ( $n = 6$ ). Os animais foram tratados em dias alternados por nove dias, totalizando cinco administrações. Após as quatro primeiras administrações os animais foram avaliados no campo aberto por 30 minutos para verificação da aquisição da sensibilização psicomotora, enquanto no último dia de tratamento a administração ocorreu durante a aquisição da imagem.

Figura 26: Delineamento experimental para validação do protocolo.



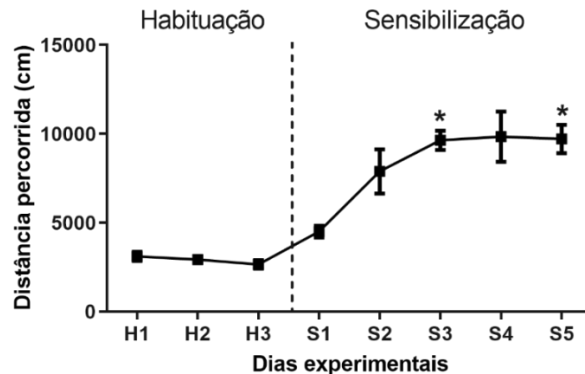
Os animais foram divididos em dois grupos, um grupo controle, que recebeu apenas salina ( $n = 6$ ) e um grupo que foi sensibilizado com cocaína ( $n = 5$ ). Foi realizada uma imagem basal, e após 24h o tratamento foi iniciado, com as substâncias administradas em dias alternados por 9 dias (5 administrações no total). Após as 4 primeiras administrações os animais foram avaliados em campo aberto quanto à atividade locomotora total. A última administração, por sua vez, ocorreu 5 minutos após o início da imagem PET. Foram adquiridas imagens dinâmicas de 75 minutos, nas quais os animais foram mantidos anestesiados ao longo de todo tempo.

## 6.2. Resultados

### 6.2.1. Teste da avaliação da resposta à cocaína na imagem PET

Em relação à avaliação da atividade locomotora, a ANOVA de uma via com medidas repetidas apresentou efeito significativo para o fator dia experimental ( $F_{(2,117, 6,352)} = 6,14$ ,  $p = 0,032$ ), demonstrando que houve diferença na atividade locomotora dos animais na habituação e no período de sensibilização, conforme indicado na Figura 27. A sensibilização psicomotora foi adquirida no terceiro dia de administração (S3;  $p < 0,05$ ) e foi sustentada no último dia de administração (S5,  $p < 0,05$ ), de acordo com o *post-hoc* de Bonferroni.

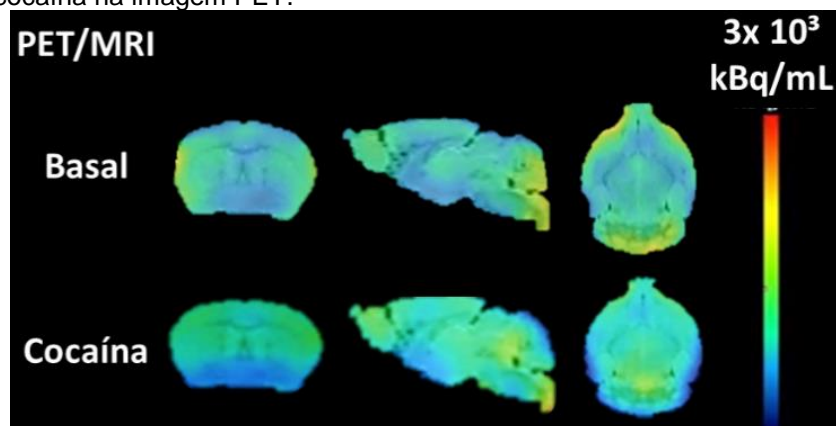
Figura 27: Análise da atividade locomotora da dose de 20 mg/kg de cocaína na aquisição da sensibilização.



Após habituação dos animais ( $n = 4$ ) ao campo aberto por 3 dias consecutivos, iniciou-se o período da sensibilização psicomotora, no qual os animais foram tratados com cocaína (20 mg/kg, i.p.) em dias alternados por 9 dias, totalizando 5 administrações. A atividade locomotora total (cm) foi quantificada diariamente por 30 minutos. ANOVA de uma via com medidas repetidas e Teste "t" de *Student* para amostras pareadas. \* $p < 0,05$  em relação a S1. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

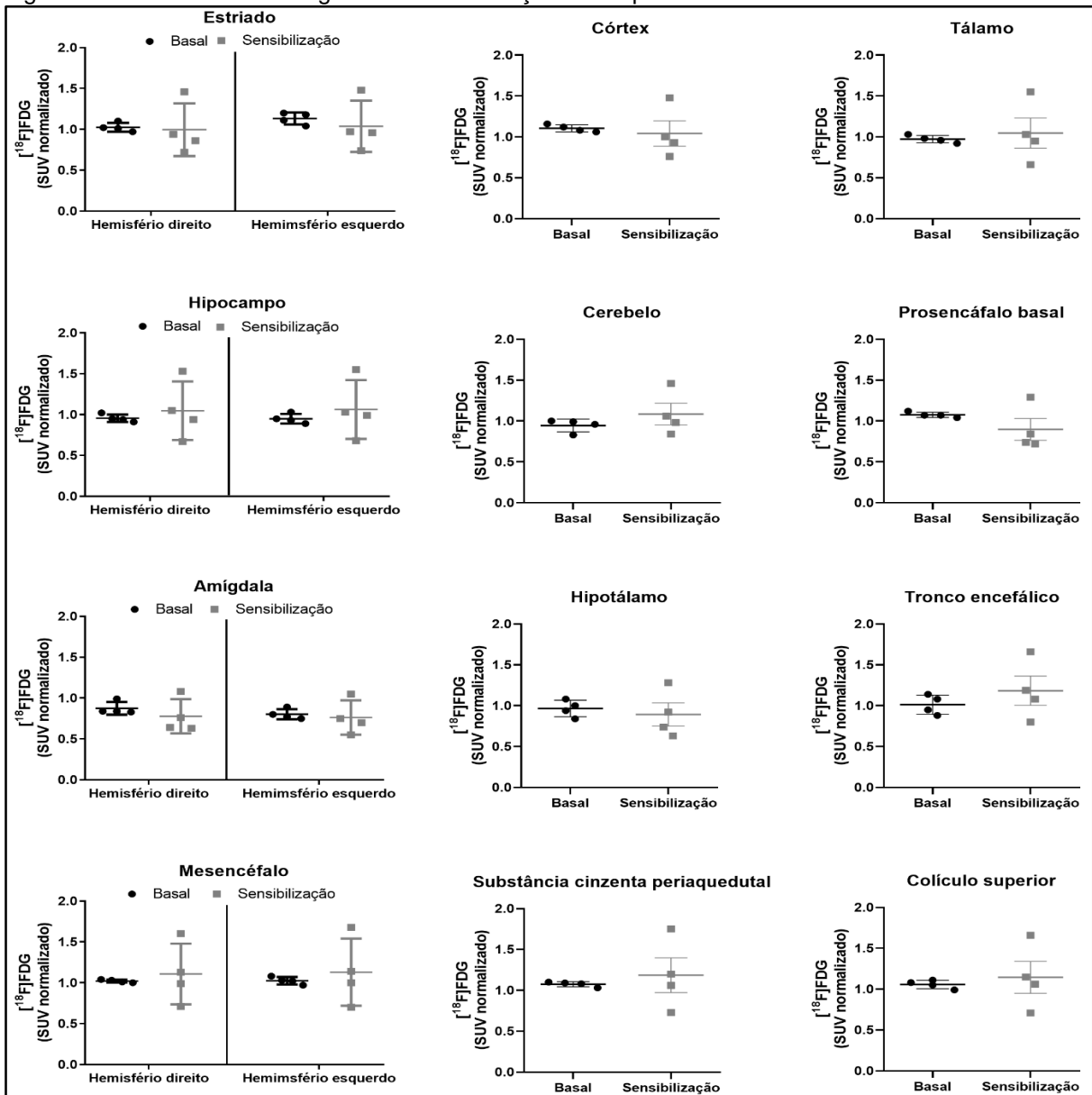
As imagens PET representativas do experimento estão ilustradas na Figura 28. A análise estatística comparativa da atividade encefálica nos dias basal e último dia de aquisição da sensibilização (S5) foi feita por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, considerando VOI e tratamento como fatores dentro dos sujeitos e medidas repetidas. Como o fator tratamento apresenta apenas dois níveis, o conceito de esfericidade é aplicado. Foi observado um efeito significativo do fator VOI ( $F_{(16, 48)} = 21,21$ ,  $p < 0,0001$ ) e da interação entre VOI e tratamento ( $F_{(16, 48)} = 3,17$ ,  $p = 0,001$ ). O fator tratamento não apresentou efeito significativo ( $F_{(1, 3)} = 0,02$ ,  $p = 0,89$ ), indicando que o protocolo utilizado não evidenciou efeito da cocaína no metabolismo encefálico. Os resultados gráficos estão apresentados na Figura 29.

Figura 28: Imagens encefálicas de PET fusionadas com *template* de MRI representativas da avaliação da resposta à cocaína na imagem PET.



As imagens foram realizadas em 2 pontos: imagem basal e último dia de sensibilização psicomotora. Todos os animais ( $n = 4$ ) foram tratados com cocaína no período de sensibilização psicomotora.

Figura 29: Resultados de imagem PET da avaliação da resposta à cocaína.

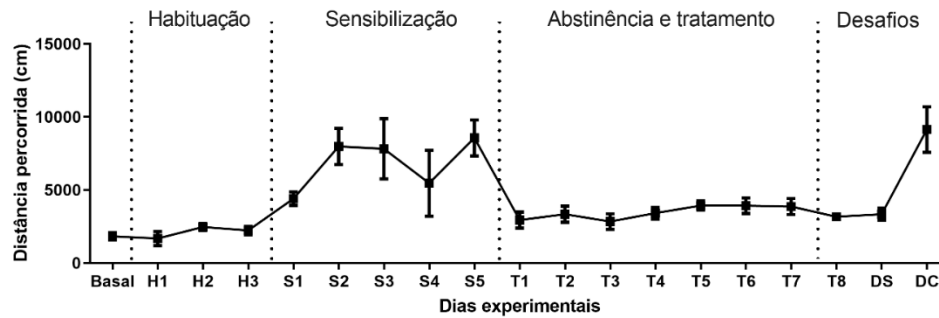


Os animais ( $n = 4$ ) foram analisados quando à atividade encefálica por PET com  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  durante 30 minutos, em 2 pontos: imagem basal e último dia de sensibilização psicomotora (S5). ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

### 6.2.3. Teste dos momentos de injeção de cocaína e $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

Diferentemente do primeiro piloto, no qual o  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  foi injetado após o animal receber cocaína e ser exposto ao campo aberto, o teste dos momentos de injeção consistiu em injetar primeiramente o  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  e, após cinco minutos, a cocaína. Os resultados comportamentais podem ser observados na Figura 30.

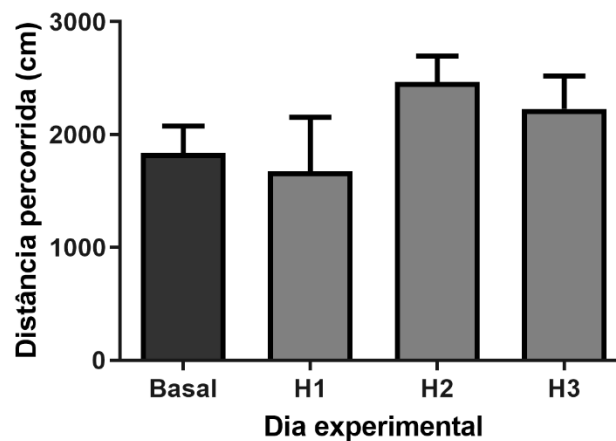
Figura 30: Análise da atividade locomotora do teste dos momentos de injeção.



Foram avaliados animais do grupo CCBDC ( $n = 4$ ). Os animais foram sensibilizados com cocaína (20 mg/kg, i.p.), tratados com CBD (15 mg/kg, i.p.) e desafiados com cocaína (20 mg/kg, i.p.). A atividade locomotora total (cm) foi quantificada no campo aberto todos os dias, durante 30 minutos. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. CCBDC: grupo sensibilizado com cocaína, tratado com CBD na abstinência e desafiado com cocaína. H: habituação; S: sensibilização; DS: desafio salina; DC: desafio com cocaína.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas não detectou efeito significativo na atividade locomotora dos animais nos dias da habituação (H1 – H3) em relação ao dia de imagem PET basal ( $F_{(1,964, 5,893)} = 1,07$ ,  $p = 0,399$ ), indicando que a pré-anestesia dos animais não está influenciando na locomoção, conforme pode ser observado na Figura 31.

Figura 31: Efeito da pré-anestesia com isoflurano na atividade locomotora.

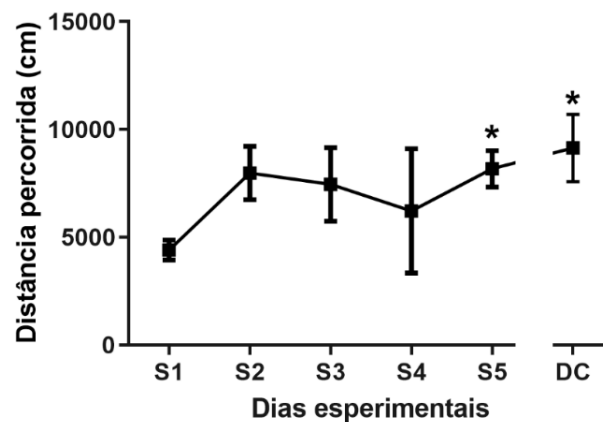


Os animais foram anestesiados (isoflurano 2-2,5% em oxigênio 100%) para injeção do  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  (via i.v.). Após despertarem (5 minutos) receberam uma injeção de salina e permaneceram por 30 minutos em campo aberto. Nos dias de habituação, o procedimento comportamental foi o mesmo, porém os animais não foram submetidos à anestesia. ANOVA de uma via com medidas repetidas e teste *post-hoc* de Bonferroni. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

A administração de canabidiol também não alterou o perfil locomotor dos animais, uma vez que a ANOVA de uma via com medidas repetidas não evidenciou alteração significativa entre a distância percorrida durante a habituação, ao longo do tratamento e durante o desafio salina ( $F_{(2,225, 6,675)} = 4,19$ ,  $p = 0,06$ ). Em relação ao

período de sensibilização psicomotora (Figura 32), a ANOVA de uma via com medidas repetidas identificou um efeito significativo para o fator dia experimental ( $F_{(5, 15)} = 3,14$ ,  $p = 0,039$ ). Segundo o *post-hoc* de Bonferroni, os animais se locomoveram mais em S5 do que em S1 ( $p = 0,049$ ), indicando a aquisição da sensibilização. Após o tratamento por oito dias consecutivos com CBD, ao reexpor os animais a mesma dose de cocaína, houve a expressão da sensibilização ( $p = 0,012$ ), ou seja, a dose de 15 mg/kg de CBD não foi capaz de prevenir esse fenômeno.

Figura 32: Análise da sensibilização psicomotora do teste dos momentos de injeção de cocaína e [ $^{18}\text{F}$ ]FDG.

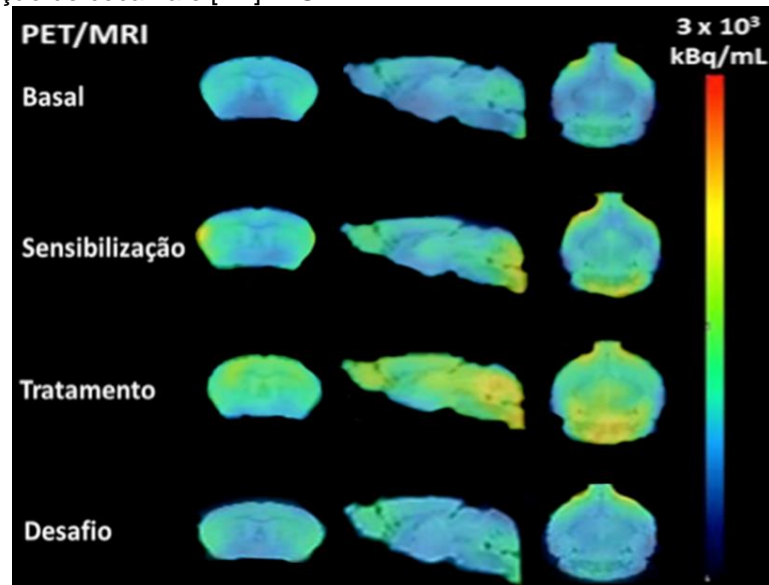


Foram avaliados animais do grupo CCBDC ( $n = 4$ ). Para verificação da aquisição da sensibilização os animais receberam cocaína (20 mg/kg, i.p.) em dias alternados por 10 dias, totalizando 5 administrações, e, após os oito dias de tratamento, foram desafiados com a mesma dose de cocaína. A atividade locomotora total (cm) foi quantificada no campo aberto todos os dias, durante 30 minutos. ANOVA de uma via com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0,05$  em relação a S1. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. CCBDC: grupo sensibilizado com cocaína, tratado com CBD na abstinência e desafiado com cocaína. S: sensibilização; DC: desafio com cocaína.

Apesar da dose de CBD utilizada ter sido ineficaz para prevenir a expressão da sensibilização, ela apresentou efeitos na atividade encefálica. Os dados de PET com [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, cujas imagens representativas encontram-se na Figura 33, foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, considerando VOI e tratamento como fatores dentro dos sujeitos. Como o teste de Mauchly foi significativo para os três fatores e  $\epsilon < 0,75$ , a correção de Greenhouse-Geisser foi aplicada.



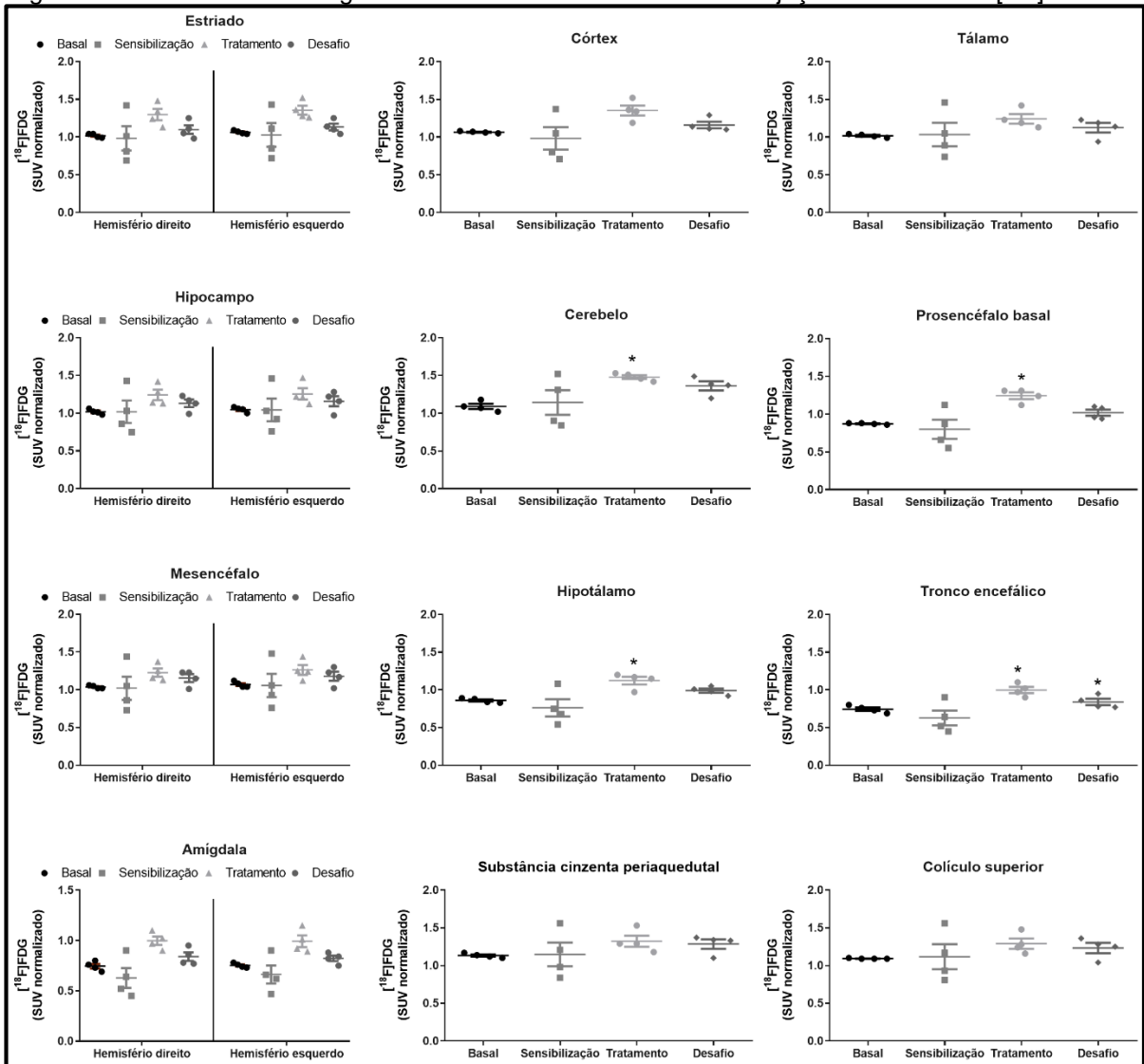
Figura 33: Imagens encefálicas de PET fusionadas com *template* de MRI representativas do teste dos momentos de injeção de cocaína e [<sup>18</sup>F]FDG.



As imagens foram realizadas em 4 pontos do protocolo: imagem basal; último dia de sensibilização psicomotora (S5); último dia de abstinência e tratamento (T8); e desafio da expressão da sensibilização (DC). Grupo CCBDC: sensibilizado com cocaína, tratado com CBD na abstinência e desafiado com cocaína (n = 4).

A ANOVA evidenciou efeito significativo apenas para o fator VOI ( $F_{(1,952, 5,857)} = 55,89, p = 0,0002$ ), mas não para tratamento ( $F_{(1,066, 3,198)} = 2,97, p = 0,179$ ) e interação ( $F_{(2,417, 7,251)} = 2,11, p = 0,188$ ). Contudo, o *post-hoc* de Bonferroni identificou que o CBD aumentou a atividade encefálica nas regiões de cerebelo ( $p = 0,02$ ), prosencéfalo basal ( $p = 0,013$ ), hipotálamo ( $p = 0,030$ ), amígdala direita ( $p = 0,032$ ) e tronco encefálico ( $p = 0,027$ ), conforme observa-se na Figura 34. Além disso, no tronco encefálico a atividade encefálica após o desafio foi superior ao basal ( $p = 0,04$ ).

Figura 34: Resultados de imagem PET do teste dos momentos de injeção de cocaína e  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ .



Os animais foram analisados quando à atividade encefálica por PET  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  durante 30 minutos, em 4 pontos: imagem basal, último dia de sensibilização psicomotora (S5), último dia de abstinência e tratamento (T8) e desafio da expressão da sensibilização (DC). Grupo CCBDC ( $n = 4$ ): sensibilizado com cocaína (20 mg/kg), tratado com CBD (15 mg/kg) e desafiado com cocaína (20 mg/kg). ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0,05$  em relação ao basal. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

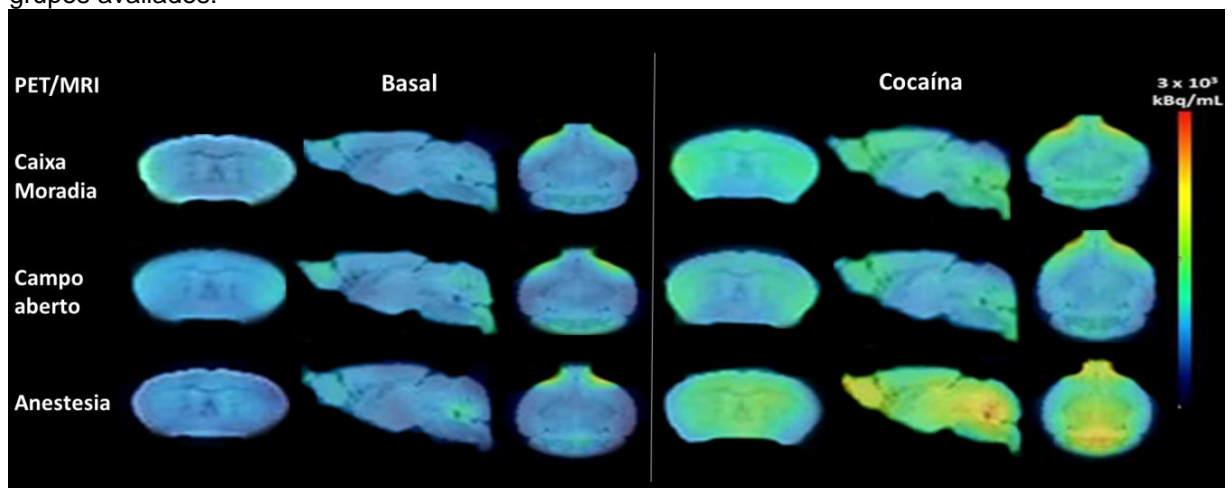
#### 6.2.4. Avaliação da interferência do metabolismo periférico na captação encefálica de cocaína

Os animais deste teste foram submetidos a dois protocolos de aquisição de imagem PET distintos. Os animais dos grupos 1 e 2 foram, respectivamente, levados ao campo aberto ou mantidos na caixa moradia após as administrações de salina e cocaína e durante a captação do  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ , foram submetidos à imagem estática, com duração de 30 minutos. Os animais do grupo 3, permaneceram anestesiados após a administração do radiofármaco para serem submetidos à imagem dinâmica durante

75 minutos, com as administrações de salina e cocaína realizadas após cinco minutos do início da imagem. É importante ressaltar que em nosso modelo, a imagem estática de 30 minutos gerou apenas um valor final de SUV, enquanto a dinâmica foi conduzida em *frames* de 5 minutos, gerando um SUV para cada *frame* ao longo do tempo de aquisição. Assim, para comparar a captação de glicose entre os três grupos, foi utilizado o SUV médio dos 30 minutos finais de imagem do grupo 3, uma vez que este dado corresponde ao SUV gerado pelos 30 minutos de imagem estática.

Os dados foram analisados por ANOVA de três vias com medidas repetidas, considerando tratamento e VOIS como fatores dentro dos sujeitos e medidas repetidas, e grupo experimental como o fator entre os sujeitos. Os dados foram considerados esféricos pelo teste de Mauchly. A Figura 35 mostra as imagens representativas desses dados. Observa-se predominância de tons frios em ambos os grupos na imagem basal, realizada após administração de salina. Porém, quando há presença de cocaína, a atividade metabólica encontra-se aumentada, porém ainda predominam tons frios nos dois primeiros grupos de animais. No terceiro grupo, por sua vez, a atividade metabólica encontra-se ainda maior, então os tons quentes tornam-se mais evidentes.

Figura 35: Imagens encefálicas de PET fusionadas com *template* de MRI representativas dos diferentes grupos avaliados:



Caixa moradia (n = 6); campo aberto (n = 5) e anestesia (n = 6). As imagens foram realizadas em 2 pontos: basal (dia 1) e pós injeção de cocaína (dia 2).

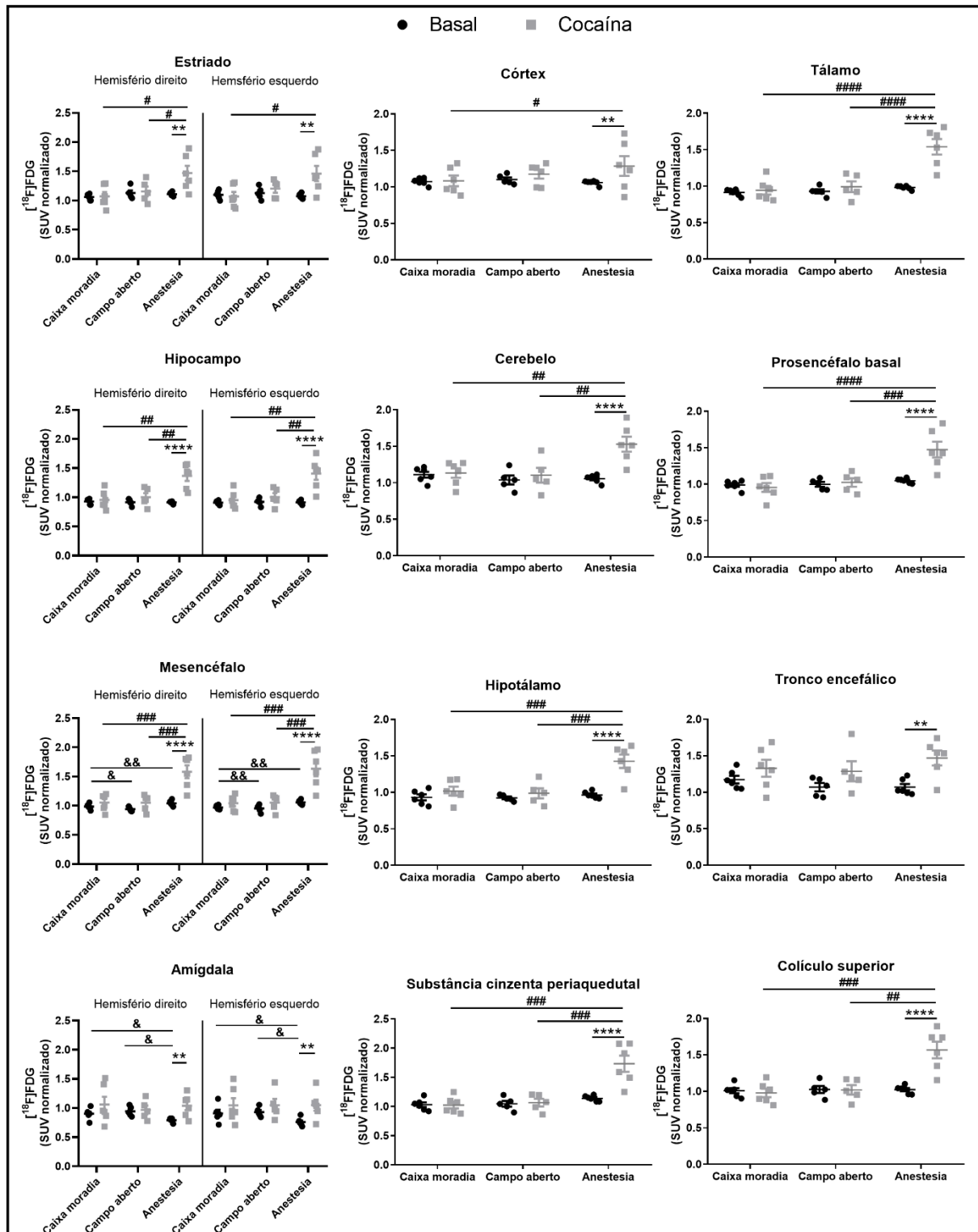
A ANOVA revelou um efeito significativo para os fatores grupo ( $F_{(2, 14)} = 8,339$ ,  $p = 0,004$ ), tratamento ( $F_{(1, 14)} = 16,74$ ,  $p = 0,001$ ), e VOI ( $F_{(16, 221)} = 21,22$ ,  $p < 0,0001$ ), e para as interações entre tratamento e grupo ( $F_{(2, 14)} = 8.34$ ,  $p = 0.004$ ), VOI e grupo

( $F_{(32, 221)} = 7,05$ ,  $p < 0,0001$ ), tratamento e VOI ( $F_{(16, 221)} = 1,76$ ,  $p = 0,038$ ), e tratamento, VOI e grupo ( $F_{(32, 221)} = 2,12$ ,  $p = 0,001$ ).

Na imagem basal, os testes multivariados revelaram algumas diferenças entre os animais anestesiados e aqueles que permaneceram acordados durante a captação de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET. Os animais do grupo anestesia apresentaram menor metabolismo de glicose na amígdala direita (caixa moradia:  $p = 0,021$ ; campo aberto:  $p = 0,049$ ) e na esquerda (caixa moradia:  $p = 0,025$ ; campo aberto:  $p = 0,017$ ), e aumento do metabolismo no mesencéfalo direito (caixa moradia,  $p = 0,046$ ; campo aberto,  $p = 0,002$ ) e no esquerdo (caixa moradia:  $p = 0,007$ ; campo aberto:  $p = 0,002$ ). Em todos os outros VOIs os três grupos apresentaram captação similar de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET na imagem basal.

Quando a cocaína foi administrada, houve um efeito na captação encefálica do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG apenas no grupo mantido sob anestesia, no qual o metabolismo de glicose mostrou-se superior ao apresentado pela imagem basal (Figura 36), em todos os VOIs (encéfalo total: 30%,  $p < 0,0001$ ; estriado direito: 33%,  $p = 0,004$ ; estriado esquerdo: 36%,  $p = 0,002$ ; córtex: 28%,  $p = 0,007$ ; hipocampo direito: 50%,  $p < 0,0001$ ; hipocampo esquerdo: 54%,  $p < 0,0001$ ; tálamo: 57%,  $p < 0,0001$ ; cerebelo: 44%,  $p < 0,0001$ ; prosencéfalo basal: 41%,  $p < 0,0001$ ; hipotálamo: 48%,  $p < 0,0001$ ; amígdala direita: 48%,  $p = 0,016$ ; amígdala esquerda: 60%,  $p = 0,009$ ; tronco encefálico: 39%,  $p = 0,007$ ; substância cinzenta periaquedutal: 48%,  $p < 0,0001$ ; colículo superior: 55%,  $p < 0,0001$ ; mesencéfalo direito: 39%,  $p < 0,0001$ ; mesencéfalo esquerdo: 36%,  $p < 0,0001$ ). De fato, na presença da cocaína, a captação de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG foi significativamente aumentada no grupo anestesia comparado aos demais grupos em quase todos os VOIs, conforme evidenciado na Tabela 1. Além disso, a análise de medida de tamanho de efeito corroborou os dados da ANOVA, já que o grupo anestesia apresentou grande efeito (*Cohen's d* = 2,26), enquanto os grupos caixa moradia e campo aberto apresentaram um efeito médio (*Cohen's d* = 0,42 para ambos).

Figura 36: Resultados de imagem PET com  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  no teste da influência do metabolismo periférico na captação do radiofármaco.



Os animais foram analisados quanto a atividade encefálica por PET  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ , durante 30 minutos, em 2 pontos: imagem basal (dia 1) e imagem após injeção de cocaína (20 mg/kg, dia 2). Para este teste os animais foram divididos em três grupos: Grupos 1 e 2 (n = 3): animais expostos ao campo aberto ou mantidos na caixa moradia por 30 minutos após as injeções de salina e cocaína; grupo 3 (n = 4): animais mantidos em anestesia e submetidos à imagem dinâmica durante 75 minutos, com injeções de salina e cocaína 5 minutos após o início das imagens. ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 em relação ao basal; #p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001 em relação aos animais anestesia-cocaína. Dados expressos como média ± erro padrão.

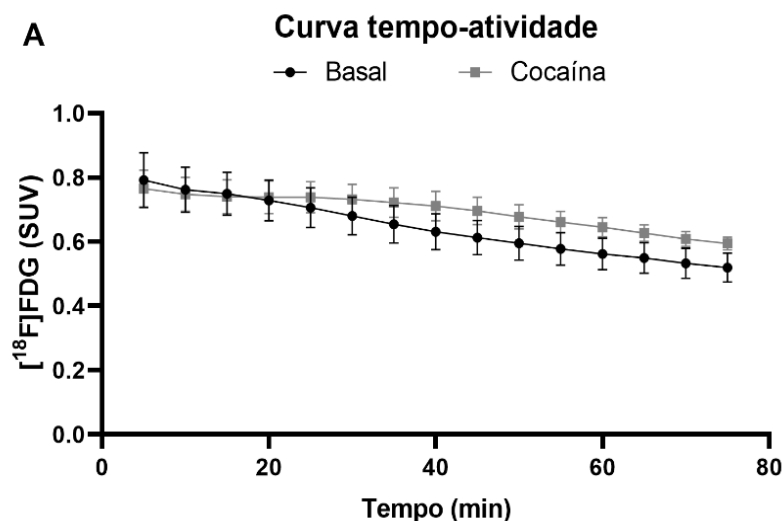
Tabela 1: Dados estatísticos das comparações em pares da captação de [<sup>18</sup>F]FDG após a administração de cocaína no grupo anestesia comparado aos grupos caixa moradia e campo aberto.

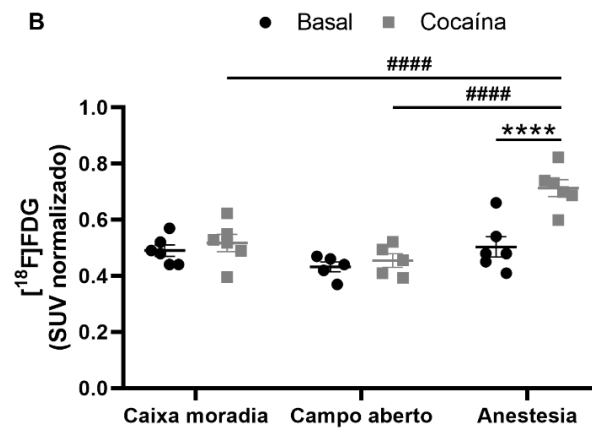
VOI	<i>p</i> valor relacionado ao “grupo anestesia”	
	Caixa moradia	Campo aberto
<i>Encéfalo total</i>	<b>0,002</b>	<b>0,005</b>
<i>Estriado direito</i>	<b>0,01</b>	<b>0,043</b>
<i>Estriado esquerdo</i>	<b>0,013</b>	0,094
<i>Córtex</i>	<b>0,04</b>	0,143
<i>Hipocampo direito</i>	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>
<i>Hipocampo esquerdo</i>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>
<i>Tálamo</i>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<i>Cerebelo</i>	<b>0,007</b>	<b>0,006</b>
<i>Prosencéfalo basal</i>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,002</b>
<i>Hipotálamo</i>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<i>Amígdala direita</i>	0,907	0,634
<i>Amígdala esquerda</i>	0,974	0,990
<i>Tronco encefálico</i>	0,396	0,306
<i>Substância cinzenta periaquedutal</i>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<i>Colículo superior</i>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,001</b>
<i>Mesencéfalo direito</i>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,001</b>
<i>Mesencéfalo esquerdo</i>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,001</b>

Valores significativos em negrito.

A Figura 37, por fim, ilustra a análise do encéfalo total, por meio da curva-tempo atividade de captação do radiofármaco no tecido encefálico, bem como o SUV médio dos últimos 30 minutos de imagem.

Figura 37: Avaliação do encéfalo total.

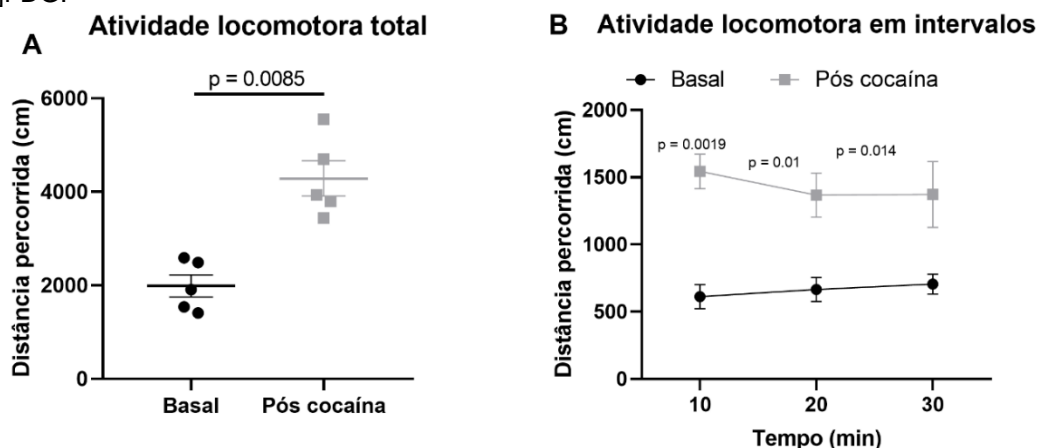


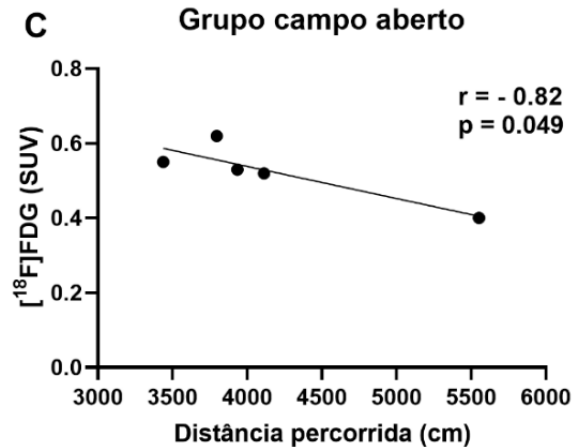


A: Curva tempo-atividade do encéfalo total representando a variação da captação de [18F]FDG ao longo dos 75 minutos de aquisição da imagem PET. Cada ponto representa um intervalo de tempo de 5 minutos, já que as imagens foram reconstruídas em 15 frames de 5 minutos. B: SUV médio dos 30 minutos finais no encéfalo total. ANOVA de três vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. \*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao basal; ####  $p < 0,001$  em relação ao tratamento cocaína do grupo anestesia. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

O efeito psicoestimulante agudo da cocaína foi evidenciado nos animais expostos ao campo aberto, conforme a Figura 38. O teste "t" de *Student* mostrou uma atividade locomotora superior nesses animais após a injeção de cocaína, comparada à atividade anterior à imagem basal (Figura 38A). Quando o intervalo de tempo foi considerado um fator (Figura 38B), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou efeito significativo para o fator tratamento (basal vs. cocaína;  $F_{(1, 4)} = 23,3$ ,  $p = 0,009$ ), mas não para o tempo ( $F_{(2, 8)} = 0,13$ ,  $p = 0,88$ ) nem para a interação entre eles ( $F_{(2, 8)} = 0,69$ ,  $p = 0,53$ ). Além disso, houve uma correlação inversa entre a atividade locomotora dos animais sob efeito de cocaína e a captação de [18F]FDG no encéfalo total ( $r = -0,82$ ,  $p = 0,049$ ), indicando que a hiperlocomoção induzida pela droga pode interferir com a captação encefálica de [18F]FDG (Figura 38C).

Figura 38: Análise da atividade locomotora dos animais expostos ao campo aberto durante a captação de [18F]FDG.

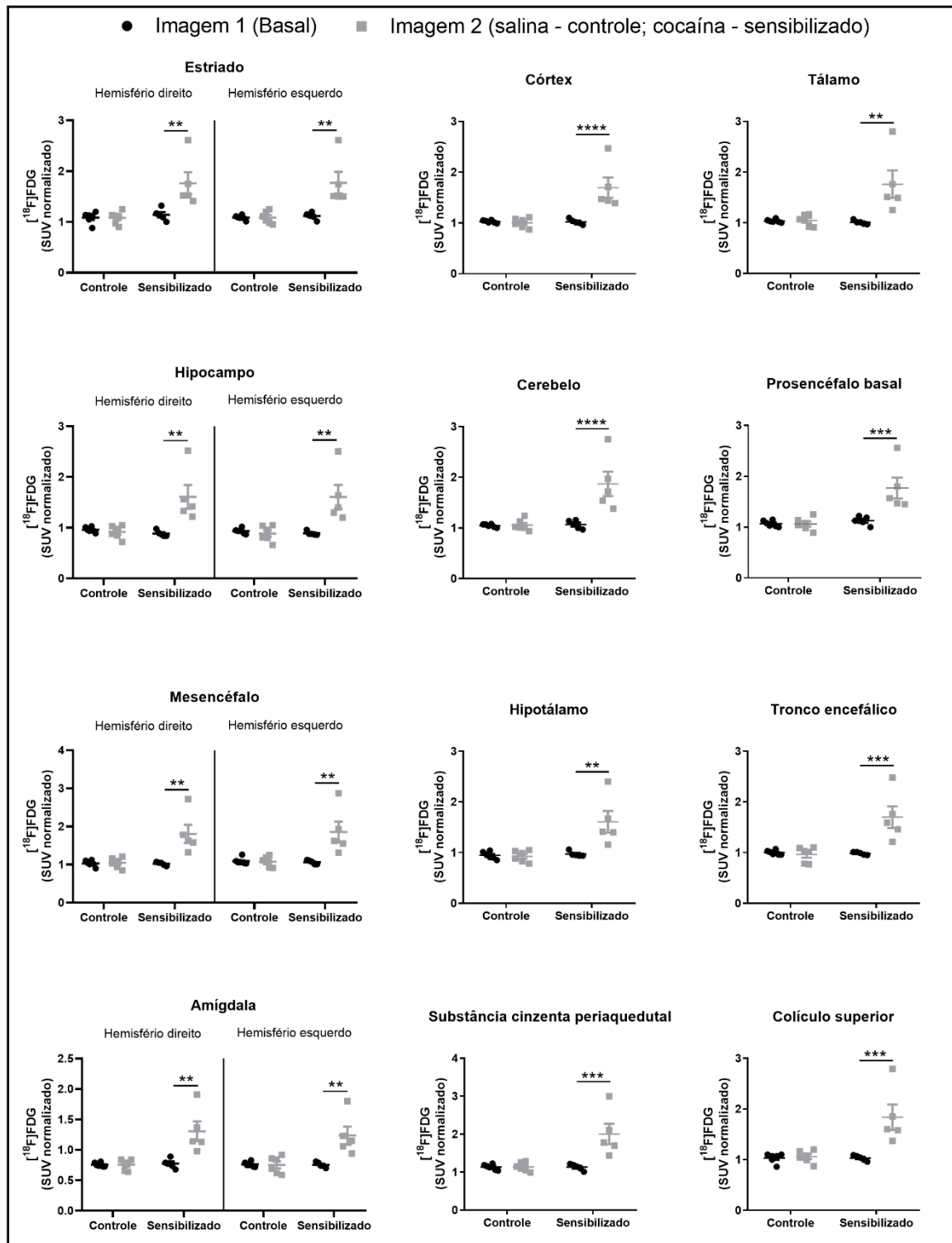




Atividade locomotora total basal e após administração aguda de cocaína (20 mg/kg). Teste “t” de *Student* pareado. B: Atividade locomotora basal e após administração aguda de cocaína (20 mg/kg) em intervalos de tempo de 10 minutos. ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni; valores de “p” comparados ao basal. C: Correlação de Pearson entre a atividade locomotora total e a captação de [<sup>18</sup>F]FDG pelo encéfalo total. Dados expressos como média ± erro padrão.

As alterações evidenciadas no metabolismo encefálico de glicose dos animais que receberam apenas uma dose de cocaína foram reproduzidas em animais que receberam o composto em um protocolo de sensibilização psicomotora, comprovando a eficácia do protocolo de aquisição de imagem. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou efeito significativo dos fatores tratamento ( $F_{(1, 9)} = 11,35$ ,  $p = 0,008$ ), VOI ( $F_{(16, 144)} = 71,29$ ,  $p < 0,0001$ ), e grupo ( $F_{(1, 9)} = 9,34$ ,  $p = 0,014$ ), e das interações entre tratamento e grupo ( $F_{(1, 9)} = 11,92$ ,  $p = 0,007$ ), VOI e grupo ( $F_{(16, 144)} = 2,35$ ,  $p = 0,004$ ), tratamento e VOI ( $F_{(16, 144)} = 2,15$ ,  $p = 0,009$ ), e tratamento, VOI, e grupo ( $F_{(16, 144)} = 1,88$ ,  $p = 0,028$ ). Os testes de multivariáveis (Figura 39) revelaram que a captação de [<sup>18</sup>F]FDG foi maior após o tratamento com cocaína em comparação com a imagem basal (Figura 50; encéfalo total: 63%,  $p = 0,001$ ; estriado direito: 56%,  $p = 0,005$ ; estriado esquerdo: 57%,  $p = 0,001$ ; córtex: 64%,  $p < 0,0001$ ; hipocampo direito: 84%,  $p = 0,002$ ; hipocampo esquerdo: 82%,  $p = 0,002$ ; tálamo: 76%,  $p = 0,004$ ; cerebelo: 73%,  $p < 0,0001$ ; prosencéfalo basal: 56%,  $p = 0,001$ ; hipotálamo: 67%,  $p = 0,002$ ; substância cinzenta periaquedutal: 76%,  $p = 0,001$ ; colículo superior: 77%,  $p = 0,001$ ; tronco encefálico: 73%,  $p = 0,001$ ; mesencéfalo direito: 77%,  $p = 0,002$ ; mesencéfalo esquerdo: 76%,  $p = 0,003$ ; amígdala direita: 72%,  $p = 0,002$ ; amígdala esquerda: 64%,  $p = 0,003$ ). Juntamente a isso, os dados apresentaram tamanho de efeito elevado (*Cohen’s d* = 2,76). No grupo controle, por sua vez, não houve alteração na captação do [<sup>18</sup>F]FDG em nenhum dos VOIS avaliados e esse fenômeno associou-se a um tamanho de efeito pequeno (*Cohen’s d* = 0.14).



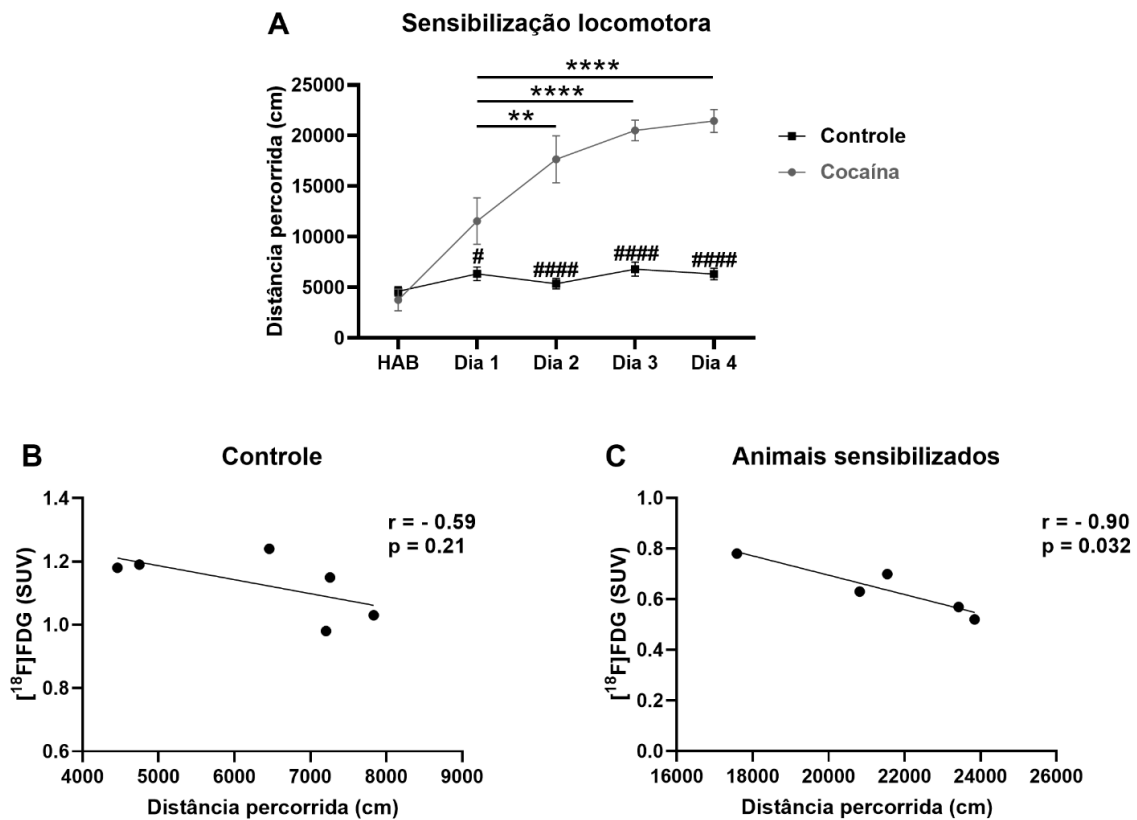
Figura 39: Captação de [<sup>18</sup>F]FDG em animais controle ou sensibilizados com cocaína

Os animais receberam cocaína (20 mg/kg, n = 5) ou salina (n = 6) em um protocolo de sensibilização psicomotora e foram avaliados por imagem PET. ANOVA de três vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

Em relação à análise da atividade locomotora (Figura 40), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou um efeito significativo dos fatores dia ( $F_{(4, 36)} = 23,16$ ,  $p < 0,0001$ ), grupo ( $F_{(1, 9)} = 72,12$ ,  $p < 0,0001$ ), e interação ( $F_{(4, 36)} = 2,92$ ,  $p <$

0,0001). O *post-hoc* de Bonferroni mostrou que durante a habituação todos os animais apresentaram a mesma atividade locomotora basal. Porém, quando o tratamento foi iniciado, os animais do grupo controle sustentaram essa mesma atividade ao longo dos dias, enquanto os animais que receberam cocaína apresentaram uma atividade locomotora superior à desenvolvida na habituação (dia 1:  $p = 0,0002$ ; dias 2 a 4:  $p < 0,0001$ ) e em comparação ao grupo controle (dia 1:  $p = 0,03$ ; dias 2 a 4:  $p < 0,0001$ ), evidenciando o efeito psicoestimulante da droga (Figura 40A). A sensibilização psicomotora foi adquirida no segundo dia de tratamento com cocaína ( $p = 0,0018$ ) e sustentada até o quarto dia de tratamento ( $p < 0,0001$ ). Ainda, houve correlação inversa entre a atividade locomotora deste dia e o metabolismo encefálico de glicose ( $r = -0,92$ ,  $p = 0,026$ ) (Figura 40B), indicando que conforme a atividade locomotora aumenta, a captação encefálica de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG diminui. No grupo controle não houve correlação significativa (Figure 40C).

Figura 40: Atividade locomotora de animais controle e animais sensibilizados com cocaína e sua correlação com o metabolismo encefálico de glicose.



Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. A: Atividade locomotora dos animais durante a habituação e nas 4 administrações de salina (controle,  $n = 6$ ) ou cocaína (20 mg/kg,  $n = 5$ ). ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post-hoc* de Bonferroni. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao dia 1; # $p < 0.05$  e #### $p < 0,0001$  em relação ao controle. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. HAB = habituação. B e C: Correlações de Pearson entre a atividade locomotora do quarto dia de avaliação e o SUV médio do encéfalo total após administração de salina (B) ou cocaína (C).

### 6.3. Discussão

O foco do presente capítulo foi padronizar a técnica de PET, evidenciando o efeito da cocaína na captação encefálica de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, o que era imprescindível para verificar, conforme abordado posteriormente, se o canabidiol altera o padrão metabólico estabelecido pela cocaína. Após as devidas alterações de protocolo, obteve-se um desenho experimental final, no qual os animais permanecem sendo submetidos ao campo aberto após a administração das substâncias de interesse, pareando-as com o ambiente e gerando alterações neuroplásticas mais robustas. No entanto, nos dias de avaliação por PET, as administrações são feitas durante a aquisição da imagem, a fim de otimizar a captação encefálica do radiofármaco por eliminar o efeito psicoestimulante periférico. Após todas as padronizações, o protocolo final da imagem PET com [ $^{18}\text{F}$ ]FDG foi estabelecido e consta na Figura 46. As injeções de cocaína são realizadas 6 minutos após a injeção do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, durante a aquisição dinâmica das imagens de PET, com duração de 75 minutos.

Como inicialmente não houve uma resposta na imagem à dose de 20 mg/kg de cocaína, foi necessário alterar o protocolo de imagem PET inicialmente proposto. Inicialmente o radiofármaco era administrado após a retirada dos animais do campo aberto, ou seja, pelo menos 40 minutos após a administração da cocaína. Considerando a toxicocinética da droga quando administrada pela via i.p., as concentrações plasmáticas estavam baixas quando o [ $^{18}\text{F}$ ]FDG estava no organismo. Neste sentido, nossa nova proposta foi injetar primeiramente o [ $^{18}\text{F}$ ]FDG e, após 5 minutos, a cocaína, para que a captação do mesmo estivesse sob influência do aumento metabólico encefálico induzido pela droga. Com a mudança do protocolo, a captação do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG ocorre na vigência da cocaína, e será, portanto, influenciada pela presença dela no SNC. Logo, a alteração do momento da aquisição da imagem tornou-se mais adequada à proposta deste estudo e às limitações do radiofármaco utilizado.

Como os animais passaram a ser anestesiados com isoflurano para injeção do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG anteriormente ao campo aberto, foi preciso verificar se essa pré-anestesia geraria um efeito hipolocomotor, principalmente nos primeiros minutos de avaliação. Contudo, nenhuma diferença foi observada entre a atividade locomotora dos animais no dia do PET basal, quando haviam sido anestesiados, e os três dias de habituação. Este dado é condizente com o estudo de (SIEGAL; DOW-EDWARDS, 2009), que não

observaram quaisquer alterações na atividade locomotora nem no comportamento estereotipado de animais machos expostos a uma dose de isoflurano após tratamento de 10 dias com cocaína (15 mg/kg, i.p.).

Contudo, a mudança de protocolo também não evidenciou o efeito da cocaína na captação de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG. Sendo uma substância simpatomimética, a cocaína gera alterações não só no SNC, mas também no sistema nervoso periférico (SNP), dentre elas o aumento da frequência cardiorrespiratória e da pressão arterial, principalmente como consequência do bloqueio da recaptção da noradrenalina (CHIUEH; KOPIN, 1978; SOFUOGLU et al., 2001). Além disso, a ativação locomotora promovida pela inibição da recaptção de dopamina aumenta, conseqüentemente, a perfusão sanguínea muscular. Assim, para avaliar se a atividade periférica estava interferindo no resultado, avaliou-se a imagem PET em três contextos distintos: 1) animais expostos ao campo aberto; 2) animais mantidos na caixa moradia; ou 3) animais anestesiados em tempo integral. Observou-se que quando os animais permanecem anestesiados, a administração de cocaína promove elevação no metabolismo encefálico, o que não acontece se os animais permanecem acordados sob efeito psicoestimulante. De fato, correlações inversas foram encontradas entre a distância percorrida no campo aberto e a captação de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG pelo encéfalo, corroborando a hipótese de que o efeito psicoestimulante da cocaína nas regiões periféricas afeta a captação central. Observou-se que os encéfalos dos animais não expostos ao campo aberto apresentaram maior captação do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG em relação ao dos expostos. Estes achados reforçam nossa teoria de que, não só o metabolismo periférico estava sendo aumentado pela cocaína, mas também a atividade física no campo aberto estava causando maior consumo de glicose em outros tecidos. Logo, o aumento metabólico em regiões distintas da região alvo do estudo proporcionava um redirecionamento da captação do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG do SNC para elas, impedindo que o efeito da cocaína no encéfalo fosse evidenciado.

O [ $^{18}\text{F}$ ]FDG acumula-se intensamente no miocárdio e no encéfalo, já que ambos são sítios metabólicos altamente glicolíticos (SHREVE; ANZAI; WAHL, 1999). O metabolismo encefálico de glicose reflete, em parte, a energia necessária para a neurotransmissão, então alterações regionais nesse processo trazem informações mecánísticas sobre os neurotransmissores associados a elas (FOWLER et al., 1967). Após a administração de um psicoestimulante, alterações funcionais temporalmente limitadas acontecem no SNC (PEÑA; GEVORKIANA; SHI, 2015; UNGLESS et al.,

2001; XU et al., 2017). A maior quantidade de dopamina interagindo com receptor D<sub>1</sub> nas projeções dopaminérgicas nigroestriatal e mesocortical contribuem para o estabelecimento da hiperatividade, o que se reflete nos modelos animais como hiperlocomoção (KOOB, 1992).

Além de observar um efeito agudo da cocaína no metabolismo de glicose, também observamos que a administração repetida da substância em um protocolo de sensibilização psicomotora, promove efeito semelhante. De fato, dados de autorradiografia da literatura mostram aumento do consumo de glicose nas regiões mesocorticolímbicas e no hipocampo após administração repetida de cocaína pela via intravenosa, o que se relacionou às alterações funcionais que a droga induziu na transmissão dopaminérgica (PORRINO et al., 1984; 1988; PORRINO, 1993; LONDON et al., 1986; PONTIERI et al., 1995). Não obstante, a cocaína também bloqueia a recaptação de serotonina e norepinefrina, contribuindo para alterações metabólicas em regiões onde elas exercem maior influência, como córtex, tálamo e mesencéfalo (CELADA; VICTORIA PUIG; ARTIGAS, 2013; RANJBAR-SLAMLOO; FAZLALI, 2020). Portanto, como os neurotransmissores operam em redes neuronais, as alterações nestas vias refletem em outros sistemas e caminhos intracelulares, gerando alterações encefálicas generalizadas (JIANG et al., 2021; NESTLER; LÜSCHER, 2019).

Devido às suas propriedades simpatomiméticas, a cocaína também gera efeitos periféricos, sobretudo aumento da frequência cardiorrespiratória e da pressão arterial (CHIUEH; KOPIN, 1978; LONDON et al., 1990; SOFUOGLU et al., 2001). No coração, a ação da cocaína envolve principalmente a liberação de norepinefrina e epinefrina das adrenais e inibição dos sítios de recaptação da norepinefrina no miocárdio (CHIUEH; KOPIN, 1978). Tudo isso gera um custo significativo na utilização da glicose pela periferia, o que influencia no quanto de [<sup>18</sup>F]FDG é captado pelo encéfalo.

A atividade metabólica muscular é aumentada *in vivo* quando o músculo é estimulado eletricamente para gerar contração isométrica (Barrington and Maisey, 1996). Elevada captação de [<sup>18</sup>F]FDG é verificada nos músculos esqueléticos sob contração ativa, especialmente nos primeiros 30 minutos da distribuição de [<sup>18</sup>F]FDG (SHREVE; ANZAI; WAHL, 1999). De fato, a captação muscular é um artefato clássico em avaliações de PET com [<sup>18</sup>F]FDG reportada diversas vezes em avaliações clínicas na literatura. Há evidências de que exercício muscular, tensão muscular induzida por

estresse, atividade sexual e outras atividades rotineiras como falar, mastigar, tossir ou vomitar previamente ao exame de PET elevam a captação do [ $^{18}\text{F}$ ]FDG no grupamento muscular envolvido causando interferência na avaliação de interesse (BAR-SHALOM, 2000; BARRINGTON; MAISEY, 1996; LIU et al., 2018; MENERET et al., 2020; REINKING; OSMAN, 2009; YEUNG et al., 2003). Conforme mostrado na análise da atividade locomotora da Figura 47, um animal sob efeito agudo de cocaína é capaz de se locomover no campo aberto duas vezes mais do que sob condições basais, o que requer significativo consumo de glicose pelos músculos e pelo próprio sistema cardiovascular. Considerando que os músculos são considerados o maior tecido utilizador de glicose (VAN DER VEEN et al., 2012) e a correlação inversa entre a atividade locomotora e a captação encefálica de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG encontrada neste estudo, é razoável supor que o metabolismo periférico sob efeito de uma droga psicoestimulante como a cocaína afeta o quanto de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG chega ao SNC.

A contração muscular intensifica a entrada de glicose nas células musculares pela translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática, mimetizando um efeito insulinérgico que pode persistir mesmo após o exercício cessar (KOISTINEN; ZIERATH, 2002). Foi demonstrado que ratos submetidos a 35 minutos de natação possuem transporte de glicose aumentado nos músculos esqueléticos e persistente além de 60 minutos após a finalização do exercício (WALLBERG-HENRIKSSON et al., 1988). Acredita-se que o mecanismo molecular da captação de glicose estimulada pelo exercício provém do aumento das concentrações intracelulares de cálcio consequentes da contração muscular, juntamente a *up*-regulação da via de transdução da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (MAPK) (MIZUMA et al., 2010).

Considerando que os animais ficam expostos ao isoflurano por 75 minutos, incluindo a janela temporal dos efeitos neurobiológicos da cocaína, é importante considerar possíveis influências do anestésico nas alterações metabólicas induzidas pela cocaína. Apesar da anestesia ser essencial nas imagens pré-clínicas para evitar artefatos de movimento, ela está associada às alterações fisiológicas da função encefálica, como redução da atividade neuronal e do metabolismo encefálico (FRANKS, 2008). Ainda, comparado ao estado acordado, a anestesia com isoflurano gera uma vasodilatação no encéfalo, além de aumento do fluxo sanguíneo e redução da atividade neuronal (DU et al., 2009; GUTIERREZ-BARRAGAN et al., 2022). Por outro lado, a administração aguda de cocaína, diferentemente da de outras drogas,

reduz o fluxo sanguíneo encefálico, em função do efeito vasoconstritor e aumenta a atividade neuronal (PARVAZ et al., 2011). Algumas avaliações com imagens dinâmicas também demonstraram que o isoflurano pode reduzir a heterogeneidade entre a substância branca e a cinzenta (SHIMOJI et al., 2003), bem como diferentes padrões de utilização da glicose em órgãos periféricos, como aumento da captação pelo miocárdio (FUEGER et al., 2006; TOYAMA et al., 2004a).

Apesar de alguns autores terem relatado captação reduzida de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG devido ao uso de isoflurano (MIZUMA et al., 2010; PRANDO et al., 2019; PRIETO et al., 2011; TOYAMA et al., 2004b), há também quem não tenha observado diferenças ou ainda, diferenças região-dependentes. Bascuñana e colaboradores (2019), não observaram diferenças na captação encefálica global de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG em animais acordados ou anestesiados com isoflurano, nem nas concentrações sanguíneas de glicose. Isso pode estar relacionado ao fato da manutenção da anestesia durante o período de captação do radiofármaco aumentar sua biodistribuição pela redução do *clearance* sanguíneo e da captação pelos músculos esqueléticos e pela gordura marrom (FUEGER et al., 2006). Em relação às avaliações de regiões específicas, alguns autores não verificaram alterações no hipocampo, amígdala, cerebelo e estriado (JAHREIS et al., 2021; SPANGLER-BICKELL et al., 2016), enquanto outros encontraram aumento de captação em regiões subcorticais (mesencéfalo, hipotálamo e hipocampo) e captação reduzida no córtex e nos núcleos da base (MIZUMA et al., 2010; ORI et al., 1986; PRIETO et al., 2011). Como em nosso estudo não houve diferença entre as imagens basal dos grupos mantidos acordados e do grupo sob anestesia, pode-se supor que a manutenção da anestesia não influenciou o metabolismo de glicose.

Alguns estudos observaram que o isoflurano altera a sinalização dopaminérgica basal e interfere com os efeitos da cocaína (OPACKA-JUFFRY; AHIER; CREMER, 1991; SAKAMOTO et al., 2006; TSUKADA et al., 1999). Porém, isso pode ser consequência de dois fatores: a administração concomitante de óxido nítrico, o qual altera a sinalização dopaminérgica *per se* ou a utilização de doses altas de isoflurano (> 6%). Entretanto, a utilização de baixas doses do anestésico dissolvido em oxigênio para manutenção da anestesia não se associou a quaisquer alterações na cinética da sinalização dopaminérgica, tanto basal quanto na presença da cocaína, mesmo em prolongado período de tempo – 350 minutos - em anestesia (ADACHI et al., 2008; BRODNIK; ESPAÑA, 2015; VOTAW et al., 2003). Isso indica que o efeito na atividade

metabólica detectado por este estudo não se relaciona a interações entre isoflurano e sinalização dopaminérgica ou isoflurano e cocaína, mas sim ao efeito da própria cocaína.

#### **6.4. Conclusão**

O uso de anestesia durante a distribuição de [<sup>18</sup>F]FDG foi essencial para visualizar as alterações induzidas pela cocaína no metabolismo encefálico por imagem PET, com o efeito psicoestimulante na locomoção e a captação do traçador sendo negativamente correlacionados. Assim, esta é uma abordagem pré-clínica interessante para investigar animais nunca expostos à cocaína e permitir uma abordagem científica translacional bidirecional para melhor compreensão do transtorno por uso de cocaína.



*Capítulo 7 - Efeito do canabidiol  
nas alterações do metabolismo  
encefálico de glicose induzidas  
pela cocaína*

## CAPÍTULO 7 – EFEITO DO CANABIDIOL NAS ALTERAÇÕES DO METABOLISMO ENCEFÁLICO DE GLICOSE INDUZIDAS PELA COCAÍNA

Como nenhuma das doses de CBD avaliadas no capítulo 5 foi eficaz em prevenir a expressão da sensibilização psicomotora e, apesar do interessante efeito ansiolítico da dose máxima avaliada em nosso estudo, optamos por seguir com as imagens PET utilizando a dose de 30 mg/kg. Esta é uma dose intermediária e dentro da faixa de dose mais recorrente na literatura (10 - 40 mg/kg). Além disso, conforme observado no capítulo 6, verificamos que a dose de 15 mg/kg não foi eficaz em prevenir os efeitos da cocaína no protocolo de neuroimagem.

### 7.1. Desenho experimental

Esta avaliação teve o objetivo de avaliar se o CBD seria eficaz em prevenir as alterações no metabolismo de glicose induzidas pela cocaína. Para tanto, foram utilizados 31 animais, randomicamente divididos em 4 grupos experimentais, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Grupos experimentais avaliados e substância administrada em cada etapa do protocolo

<b>Grupo</b>		<b>Substância administrada</b>		
		<b>Sensibilização</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Desafio</b>
SSS	n = 6	salina	veículo	salina
SCBDS	n = 5*	salina	CBD	salina
SCBDC	n = 6	salina	CBD	cocaína
CCBDS	n = 5**	cocaína	CBD	salina
CCBDC	n = 7	cocaína	CBD	cocaína

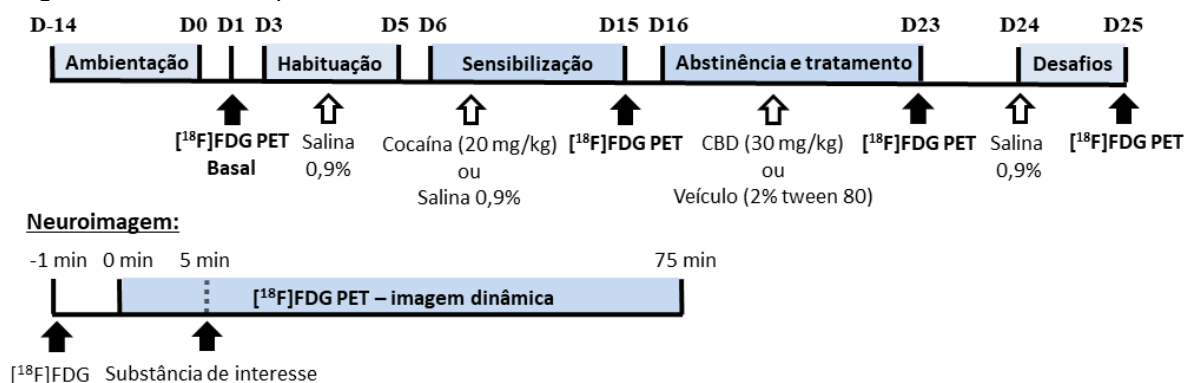
\* Um animal morreu na etapa de tratamento

\*\* um animal foi excluído da análise estatística (*outlier* no ponto sensibilização).

Os animais foram expostos ao campo aberto por 30 minutos imediatamente após a administração das substâncias, a fim de manter o pareamento entre elas e o ambiente. Assim, após três dias de habituação ao aparato, os animais foram sensibilizados com cocaína (20 mg/kg, i.p.) ou salina por 5 dias alternados; tratados com CBD (30 mg/kg) ou veículo (2% de tween 80 em salina) por 8 dias consecutivos; e desafiados com cocaína (20 mg/kg) ou salina após 48h (Figura 41). Imagens PET foram adquiridas dois dias antes da habituação (basal), no último dia de sensibilização

e de tratamento, e no dia do desafio da expressão. Nestes dias os animais não foram avaliados no campo aberto, pois as substâncias foram administradas durante a aquisição da imagem PET, conforme o protocolo definido no capítulo anterior.

Figura 41: Delineamento experimental da avaliação do efeito do canabidiol sobre as alterações de imagem PET induzidas pela cocaína.



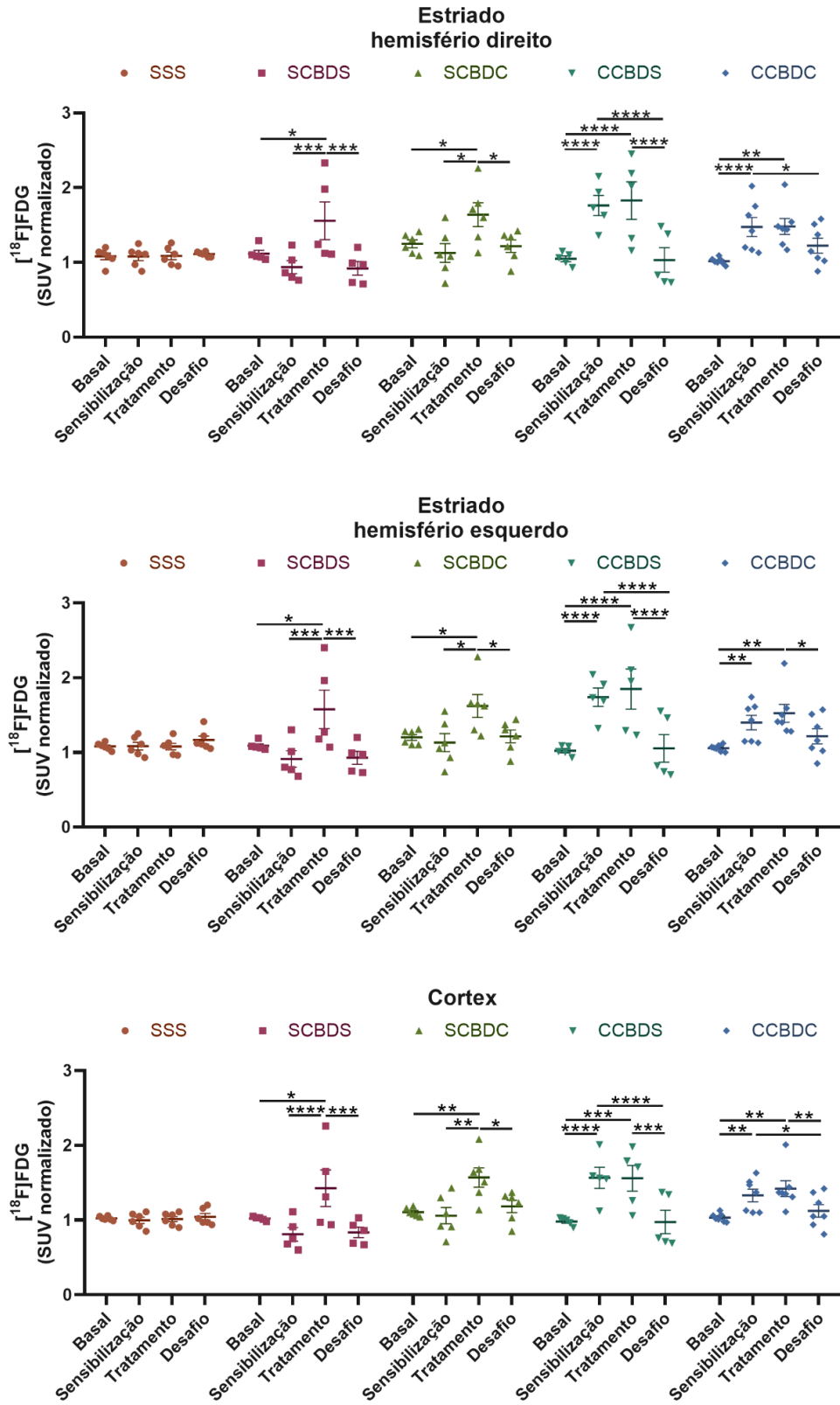
Após três dias de habituação ao campo aberto, a sensibilização psicomotora à cocaína (20 mg/kg, i.p.) foi induzida em dias alternados por 10 dias, totalizando 5 administrações. A seguir, houve 8 dias consecutivos de abstinência, com administração de canabidiol ou veículo (2% de tween 80 em salina 0,9%). Finalizado o tratamento, os animais foram desafiados com salina 0,9% (D24) e, no dia seguinte, avaliados quanto à expressão da sensibilização (D25), recebendo cocaína (20 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9%. As administrações foram pareadas com exposição ao campo aberto por 30 minutos, exceto nos dias de imagem PET (D15, D23 e D25), sendo as substâncias administradas 5 minutos após o início das imagens dinâmicas, cuja duração foi de 75 minutos. Também foi realizada uma imagem basal (D1), dois dias antes do início da habituação. D: dia.

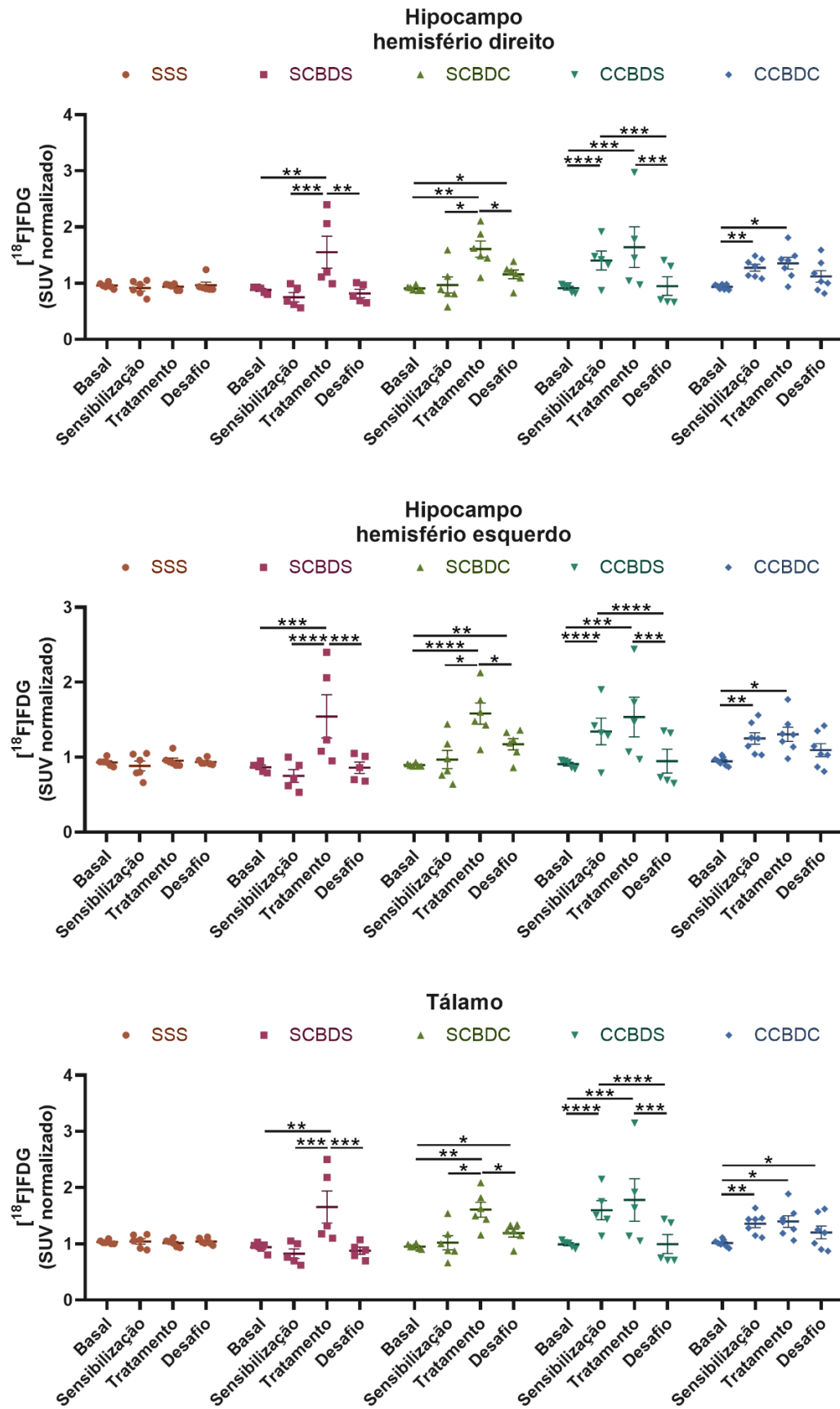
## 7.2. Resultados

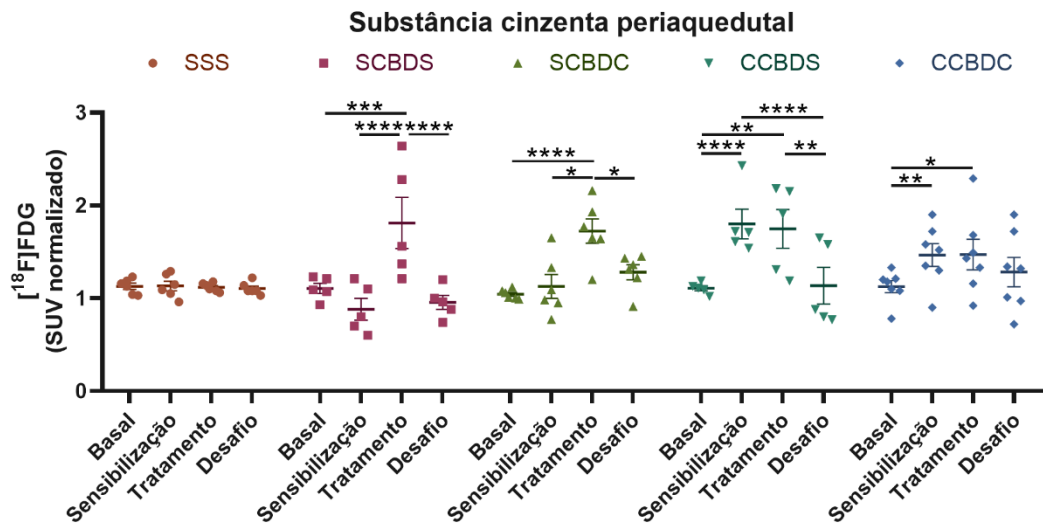
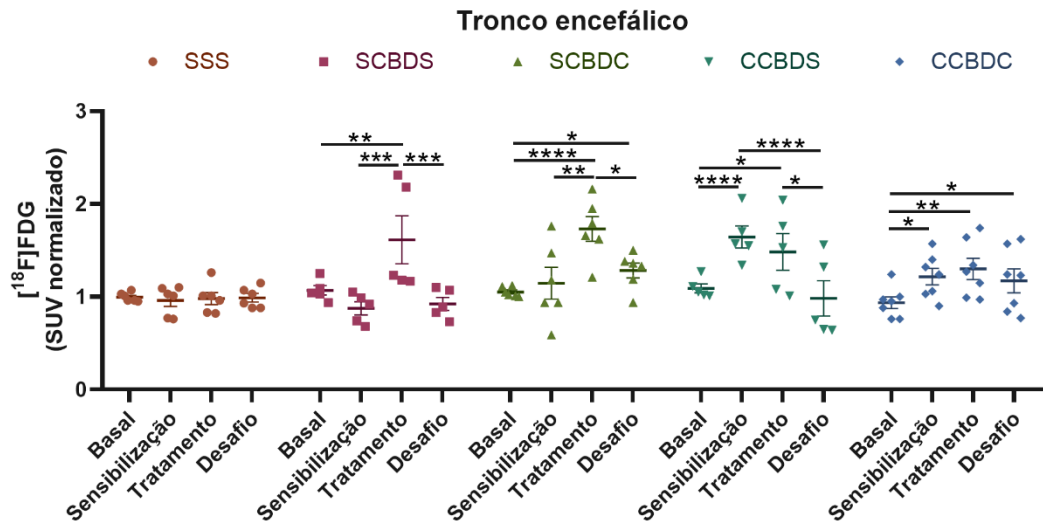
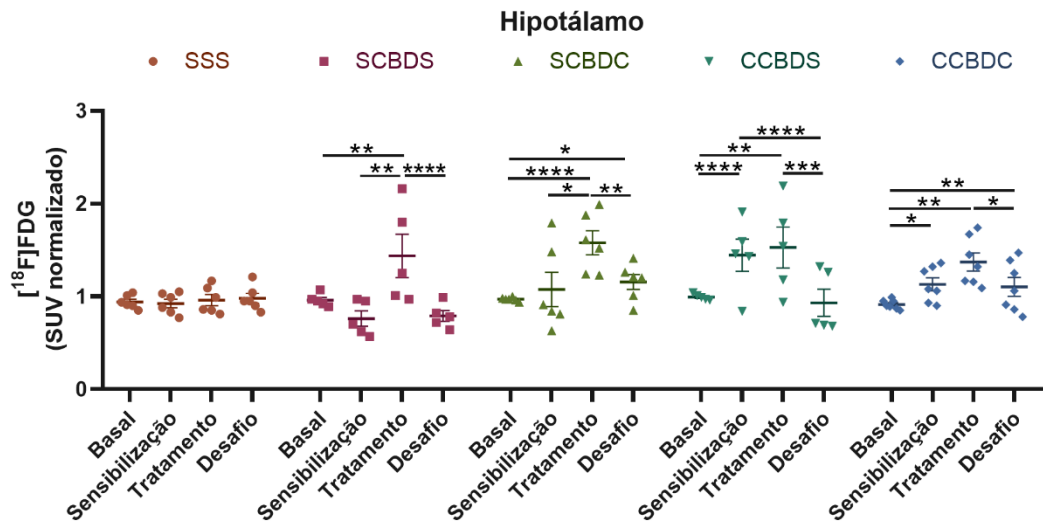
### 7.2.1. Imagem PET com [<sup>18</sup>F]FDG

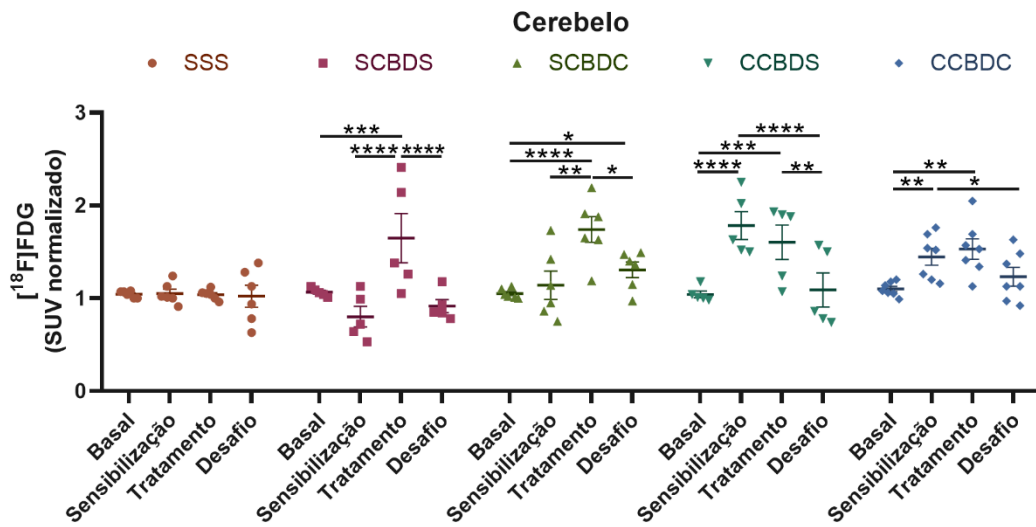
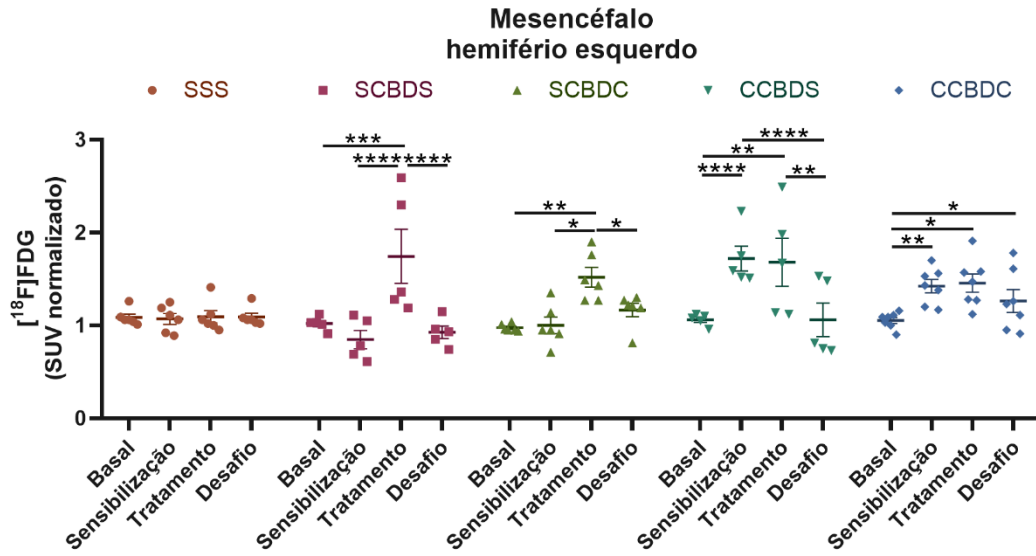
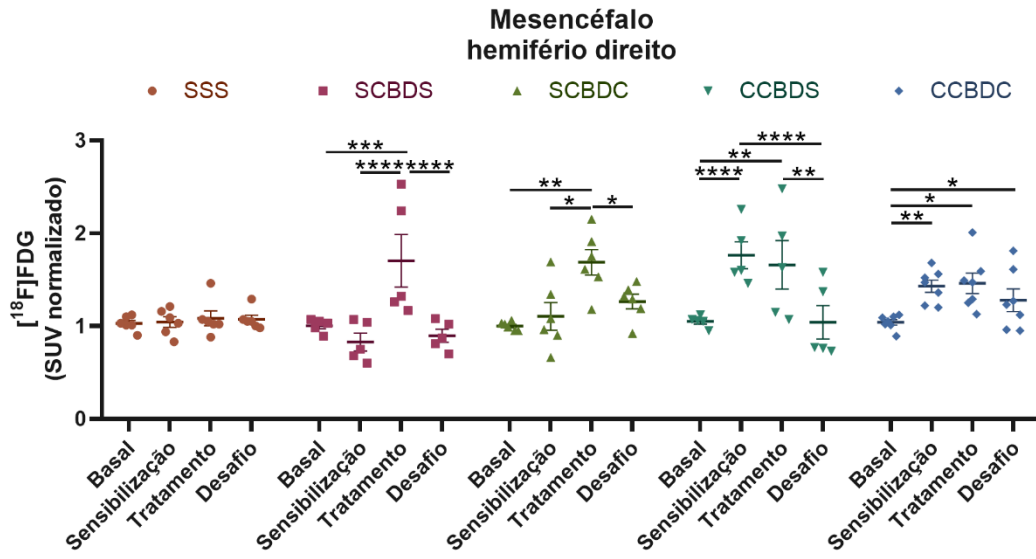
Segundo o Teste de Mauchly, os fatores tratamento ( $p = 0,032$ ) e VOI ( $p < 0,0001$ ) não apresentaram esfericidade, então aplicou-se a correção de Greenhouse-Geisser (Epsilon  $< 0,75$ ). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou efeito significativo dos fatores tratamento ( $F_{(2,16, 51,85)} = 22,50$ ,  $p < 0,0001$ ), VOI ( $F_{(3,98, 95,53)} = 86,56$ ,  $p < 0,0001$ ), e grupo ( $F_{(1, 24)} = 2,94$ ,  $p = 0,041$ ), e das interações entre tratamento e grupo ( $F_{(8,64, 51,85)} = 4,26$ ,  $p < 0,0001$ ), VOI e grupo ( $F_{(15,92, 95,53)} = 1,90$ ,  $p < 0,0001$ ), VOI e tratamento ( $F_{(7,97, 191,38)} = 2,86$ ,  $p = 0,005$ ), e VOI, tratamento e grupo ( $F_{(31,88, 191,38)} = 1,93$ ,  $p = 0,004$ ) (Figura 42).

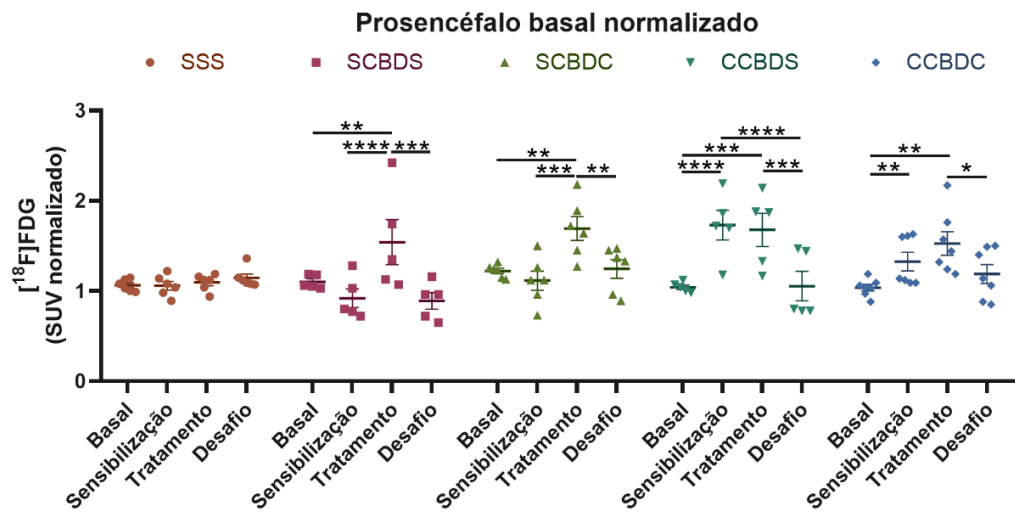
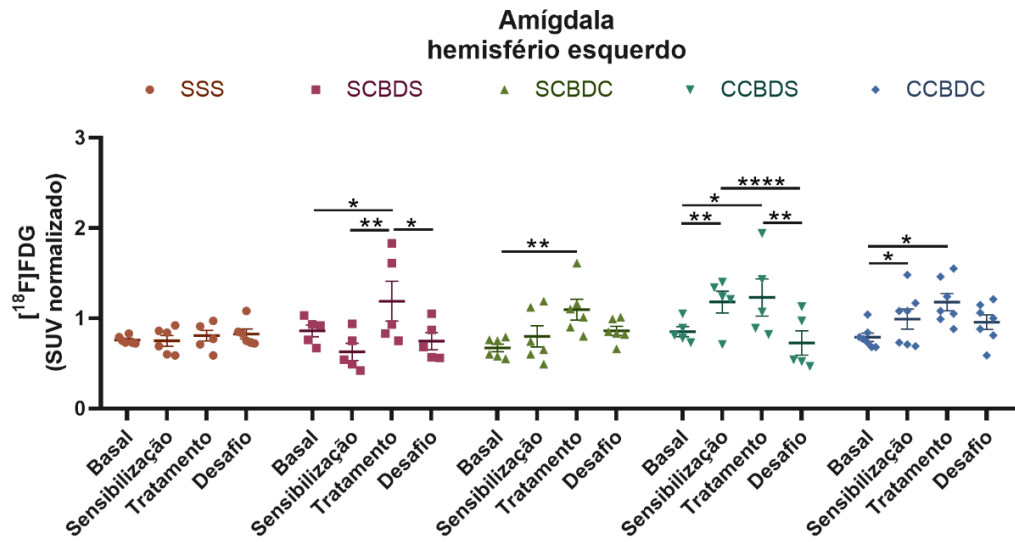
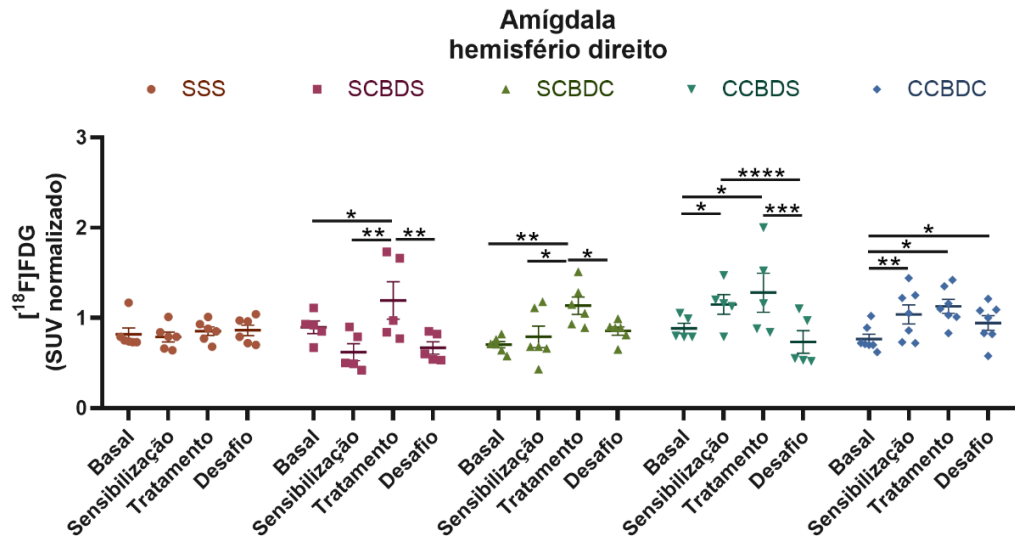
Figura 42: Efeito do CBD sobre as alterações no metabolismo de glicose induzidas pela cocaína.



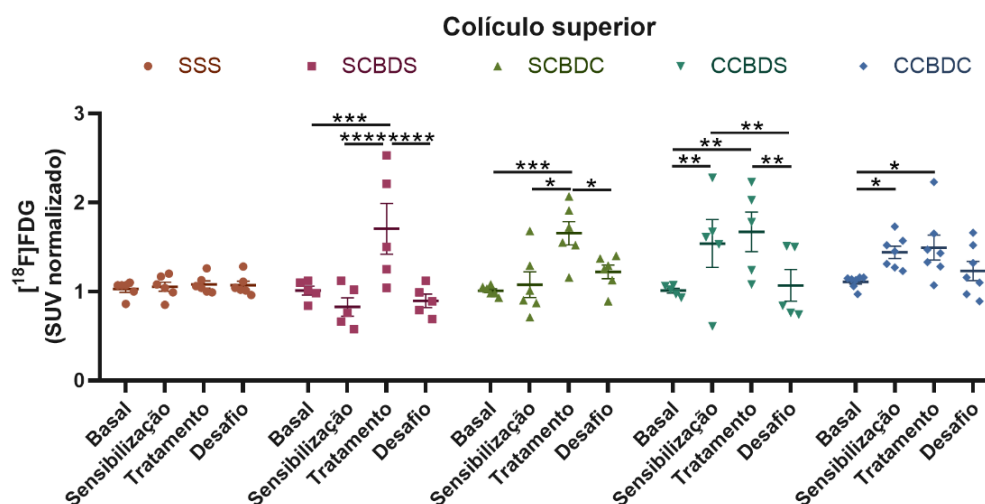












Imagens PET dinâmicas foram adquiridas durante 75 minutos, com as substâncias de interesse injetadas após 5 minutos do início da imagem. ANOVA de três vias com medidas repetidas. *Pairwise comparisons*. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. SSS: grupo controle, recebeu apenas salina; SCBDS: grupo CBD, recebeu CBD na etapa de abstinência e tratamento e salina nas demais; SCBDC: grupo tratado com CBD e desafiado com cocaína; CCBDS: grupo sensibilizado com cocaína, tratado com CBD e desafiado com salina; CCBDC: grupo sensibilizado com cocaína, tratado com CBD e desafiado com cocaína.

Considerando o aspecto longitudinal do protocolo experimental, foram realizadas comparações aos pares intra-grupo. Em relação ao grupo controle (SSS), observou-se a manutenção da mesma atividade encefálica nos 4 pontos de imagem, em todos os VOIs avaliados, bem como no encéfalo total.

No grupo que recebeu apenas CBD (SCBDS), observou-se em todos os VOIS avaliados um aumento da atividade encefálica no oitavo dia de tratamento, sendo esse aumento superior aos demais três pontos de imagem, nos quais houve administração de salina (valores de  $p$  na Tabela 3). De fato, o teste de Cohen demonstrou um elevado tamanho de efeito no ponto tratamento em relação aos demais (basal:  $d = 1,63$ ; sensibilização:  $d = 1,83$ ; desafio:  $d = 1,71$ ), confirmando os achados da ANOVA.

Tabela 3: Valores de  $p$  do grupo SCBDS, comparando-se a imagem do tratamento com as demais.

VOI	Valor de $p$ em relação ao tratamento		
	Basal	Sensibilização	Desafio
Cérebro total	0,002	0,002	0,0001
Estriado direito	0,021	0,008	0,001
Estriado esquerdo	0,013	0,007	0,001
Córtex	0,011	0,002	0,001
Hipocampo direito	0,004	0,008	0,002
Hipocampo esquerdo	0,001	0,005	0,001
Tálamo	0,003	0,008	0,001
Cerebelo	0,001	0,001	0,0001
Prosencéfalo basal	0,011	0,002	0,001
Hipotálamo	0,007	0,003	0,001

<i>Tronco encefálico</i>	0,002	0,0001	0,001
<i>Substância cinzenta periaquedutal</i>	0,001	0,002	0,0001
<i>Colículo superior</i>	0,001	0,004	0,0001
<i>Mesencéfalo direito</i>	0,001	0,002	0,0001
<i>Mesencéfalo esquerdo</i>	0,001	0,002	0,0001
<i>Amígdala direita</i>	0,075	0,003	0,001
<i>Amígdala esquerda</i>	0,054	0,006	0,013

Valores relativos ao ponto tratamento. Observa-se que apenas na amígdala não houve significância na comparação entre os pontos basal e tratamento. Todas as demais comparações aos pares foram significativas, demonstrando o efeito de aumento no metabolismo de glicose induzido pelo CBD.

Já no grupo dos animais sensibilizados com cocaína e tratados com canabidiol (CCBDS), o efeito de aumento metabólico tanto da cocaína - evidenciado no capítulo 6 - quanto do CBD foram confirmados. Assim, em todos os VOIS avaliados houve aumento da captação do [<sup>18</sup>F]FDG em ambos pontos de imagem em relação as imagens basal e do desafio, nas quais os animais receberam salina (valores de p na Tabela 4). O tamanho de efeito corroborou estes achados, uma vez que um efeito elevado foi identificado entre o ponto basal e os pontos sensibilização (d = 1,67) e tratamento (d = 2,09).

Tabela 4: Valores de p do grupo CCBDS, comparando-se as imagens de sensibilização e tratamento com as imagens basal e do desafio.

<b>VOI</b>	<b>Valor de p em relação a sensibilização</b>		<b>Valor de p em relação ao tratamento</b>	
	<b>Basal</b>	<b>Desafio</b>	<b>Basal</b>	<b>Desafio</b>
<i>Cérebro total</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,001	0,001
<i>Estriado direito</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<i>Estriado esquerdo</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<i>Córtex</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,001	0,001
<i>Hipocampo direito</i>	< 0,0001	0,001	0,002	0,003
<i>Hipocampo esquerdo</i>	0,001	< 0,0001	0,001	0,004
<i>Tálamo</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,001	0,001
<i>Cerebelo</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,002	0,008
<i>Prosencéfalo basal</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,001	0,001
<i>Hipotálamo</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,003	0,001
<i>Tronco encefálico</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,02	0,011
<i>Substância cinzenta periaquedutal</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,002	0,004
<i>Colículo superior</i>	0,005	0,003	0,002	0,006
<i>Mesencéfalo direito</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,004	0,005
<i>Mesencéfalo esquerdo</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,003	0,004
<i>Amígdala direita</i>	0,023	< 0,0001	0,027	0,001
<i>Amígdala esquerda</i>	0,007	< 0,0001	0,033	0,006

Valores relativos aos pontos basal e desafio, nos quais administrou-se salina. Observa-se que todas as comparações aos pares entre sensibilização vs basal, sensibilização vs desafio, tratamento vs basal e tratamento vs desafio, foram significativas, comprovando o efeito da cocaína e do CBD no metabolismo de glicose.

Quando se avaliou a prevenção do efeito agudo da cocaína pelo CBD (grupo SCBDC), não houve diferença significativa na captação do [<sup>18</sup>F]FDG entre os pontos basal e desafio na maioria dos VOIs avaliados. Logo, há indícios de que o CBD preveniu o aumento de captação induzido pela administração aguda da droga nas regiões de estriado, córtex, prosencéfalo basal, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, colículo superior, mesencéfalo, amígdala e no encéfalo total. Já nas regiões de hipocampo (hemisfério direito:  $p = 0,023$ ; hemisfério esquerdo:  $p = 0,005$ ), tálamo ( $p = 0,023$ ), cerebelo ( $p = 0,024$ ), hipotálamo ( $p = 0,049$ ) e tronco encefálico ( $p = 0,035$ ), o CBD não apresentou esta eficácia e o efeito agudo da cocaína permaneceu evidente, ou seja, houve aumento da captação do [<sup>18</sup>F]FDG em relação ao basal. Além disso, o efeito próprio do CBD no aumento do metabolismo de glicose foi evidenciado em todos os VOIs, sendo inclusive superior ao aumento induzido pela cocaína (valores de  $p$  descritos na Tabela 5). A análise de tamanho de efeito comprovou a eficácia do CBD em aumentar a atividade metabólica em relação ao basal ( $d = 2,09$ ). Contudo, o tamanho de efeito da cocaína foi médio comparado ao basal ( $d = 0,63$ ), confirmando os achados da ANOVA, de que o CBD, de fato, foi capaz de inibir/atenuar o efeito da cocaína. Ainda, quando se comparou o tamanho de efeito do CBD em relação à cocaína, observou-se um efeito grande ( $d = 1,59$ ), ou seja, o CBD foi mais eficaz do que a cocaína em produzir aumento no metabolismo de glicose.

Tabela 5: Valores de  $p$  do grupo SCBDC, comparando a imagem do tratamento com as demais.

<b>VOI</b>	<b>Valor de <math>p</math> em relação ao tratamento</b>		
	<b>Basal</b>	<b>Sensibilização</b>	<b>Desafio</b>
<i>Cérebro total</i>	0,001	0,013	0,015
<i>Estriado direito</i>	0,025	0,015	0,014
<i>Estriado esquerdo</i>	0,018	0,024	0,018
<i>Córtex</i>	0,002	0,005	0,012
<i>Hipocampo direito</i>	0,001	0,019	0,027
<i>Hipocampo esquerdo</i>	< 0,0001	0,015	0,023
<i>Tálamo</i>	0,003	0,036	0,043
<i>Cerebelo</i>	< 0,0001	0,006	0,013
<i>Prosencéfalo basal</i>	0,004	0,002	0,007
<i>Hipotálamo</i>	< 0,0001	0,012	0,009
<i>Tronco encefálico</i>	< 0,0001	0,004	0,014
<i>Substância cinzenta periaquedutal</i>	< 0,0001	0,024	0,018
<i>Colículo superior</i>	0,001	0,032	0,023
<i>Mesencéfalo direito</i>	0,001	0,03	0,02
<i>Mesencéfalo esquerdo</i>	0,003	0,04	0,058
<i>Amígdala direita</i>	0,007	0,039	0,044
<i>Amígdala esquerda</i>	0,08	0,09	0,129

Valores relativos ao ponto tratamento, no qual administrou-se CBD. Observa-se que não houve alteração significativa apenas na comparação tratamento vs desafio na amígdala direita.

Por fim, avaliou-se o efeito do CBD sobre a reexposição à cocaína após um protocolo de aquisição da sensibilização (grupo CCBDC). Em todos os VOIs, e, portanto, no encéfalo total, constatou-se o aumento da captação de [<sup>18</sup>F]FDG nos pontos sensibilização e tratamento, sendo ambos equiparáveis (valores de p descritos na Tabela 6). Contudo quando houve a reexposição à droga no desafio, não se observou o efeito de aumento metabólico induzido pela cocaína no encéfalo total e nos VOIs de estriado, hipocampo, córtex, tálamo, cerebelo, prosencéfalo basal, colículo superior e amígdala esquerda, uma vez que nessas regiões não houve diferença entre a imagem basal e a imagem do desafio. Logo, nessas regiões, o CBD exerceu efeito modulatório de forma a evitar a expressão do efeito da cocaína. No entanto, isso não aconteceu nos VOIs de tálamo (p = 0,049), hipotálamo (p = 0,033), tronco encefálico (p = 0,022), mesencéfalo (hemisfério direito: p = 0,024; hemisfério esquerdo: p = 0,041) e na amígdala direita (p = 0,036), nos quais houve aumento do metabolismo induzido pela cocaína. Ainda, houve diferença significativa na captação do [<sup>18</sup>F]FDG entre a imagem da sensibilização e a do desafio nos VOIs de estriado direito (p = 0,013), córtex (p = 0,007) e cerebelo (p = 0,048); e entre a imagem do tratamento e a do desafio nos VOIs de estriado esquerdo (p = 0,042), córtex (p = 0,033), prosencéfalo basal (p = 0,025) e hipotálamo (p = 0,049). O teste de tamanho de efeito corroborou a eficácia da cocaína na sensibilização (d = 1,52) e do CBD no tratamento (d = 1,34), em relação a imagem basal. Contudo, quando foi verificado o efeito da cocaína no desafio, o tamanho de efeito foi médio (d = 0,67) em relação ao basal, e elevado em relação à sensibilização (d = 1,03), ou seja, após o tratamento com CBD houve uma redução do efeito da cocaína na captação do [<sup>18</sup>F]FDG.

Tabela 6: Valores de p do grupo CCBDC, comparando-se as imagens de sensibilização, tratamento e desafio com a imagem basal.

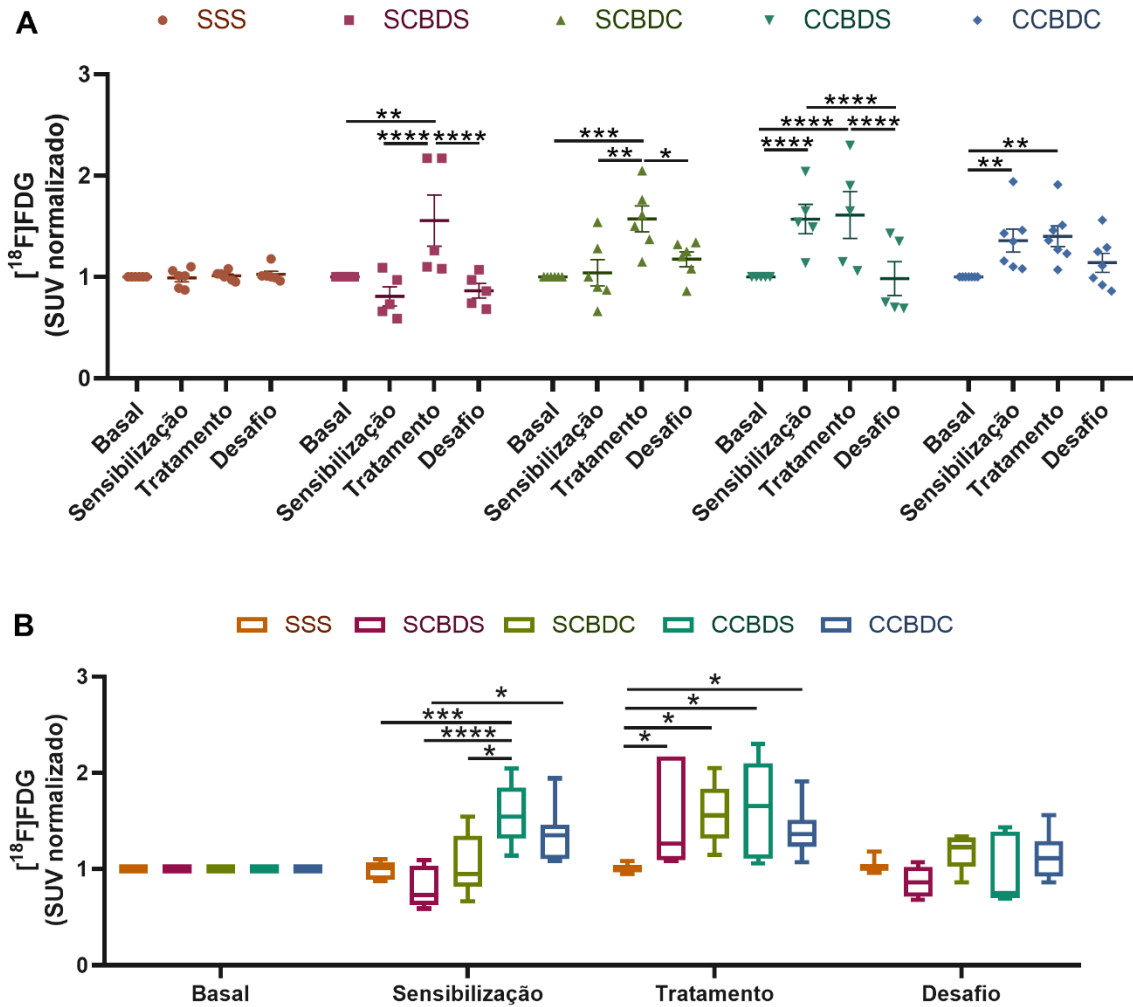
VOI	Valor de p em relação ao basal		
	Sensibilização	Tratamento	Desafio
<i>Cérebro total</i>	<b>0,002</b>	<b>0,008</b>	0,112
<i>Estriado direito</i>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,005</b>	0,061
<i>Estriado esquerdo</i>	<b>0,002</b>	<b>0,006</b>	0,150
<i>Córtex</i>	<b>0,002</b>	<b>0,006</b>	0,305
<i>Hipocampo direito</i>	<b>0,003</b>	<b>0,028</b>	0,063
<i>Hipocampo esquerdo</i>	<b>0,006</b>	<b>0,030</b>	0,092
<i>Tálamo</i>	<b>0,002</b>	<b>0,047</b>	0,051
<i>Cerebelo</i>	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	0,196
<i>Prosencéfalo basal</i>	<b>0,006</b>	<b>0,002</b>	0,150
<i>Hipotálamo</i>	<b>0,047</b>	<b>0,003</b>	<b>0,034</b>
<i>Tronco encefálico</i>	<b>0,005</b>	<b>0,013</b>	<b>0,021</b>
<i>Substância cinzenta periaquedutal</i>	<b>0,005</b>	<b>0,041</b>	0,159

<i>Colículo superior</i>	<b>0,019</b>	<b>0,027</b>	0,238
<i>Mesencéfalo direito</i>	<b>0,001</b>	<b>0,017</b>	<b>0,023</b>
<i>Mesencéfalo esquerdo</i>	<b>0,001</b>	<b>0,016</b>	<b>0,043</b>
<i>Amígdala direita</i>	<b>0,005</b>	<b>0,015</b>	<b>0,039</b>
<i>Amígdala esquerda</i>	<b>0,040</b>	<b>0,011</b>	0,072

Valores significativos em negrito. Observa-se que a comparação basal vs desafio não foi significativa na maior parte dos VOIS, nem no encéfalo total, indicando que o CBD atenuou o efeito psicoestimulante da cocaína no metabolismo encefálico.

Estes dados intra-grupo foram replicados no cérebro total (Figura 43A) e também foram corroborados pela comparação inter-grupo (Figura 43B).

Figura 43: Avaliação intra e inter-grupo do efeito do CBD sobre as alterações no metabolismo de glicose induzidas pela cocaína no encéfalo total.



Imagens PET dinâmicas foram adquiridas durante 75 minutos, com as substâncias de interesse injetadas após 5 minutos do início da imagem. ANOVA de três vias com medidas repetidas. *Pairwise comparisons*. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001. Dados expressos como média ± erro padrão. A: Comparação intra-grupo. B: Comparação inter-grupo. SSS: grupo controle, recebeu apenas salina; SCBDS: grupo CBD, recebeu CBD na etapa de abstinência e tratamento e salina nas demais; SCBDC: grupo tratado com CBD e desafiado com cocaína; CCBDS: grupo sensibilizado com cocaína, tratado com CBD e desafiado com salina; CCBDC: grupo sensibilizado com cocaína, tratado com CBD e desafiado com cocaína.

Em resumo, os grupos que receberam cocaína no período da sensibilização (CCBDS e CCBDC) apresentaram maior atividade metabólica em relação aos grupos que receberam salina (CCBDS:  $p < 0,001$  em relação a SSS,  $p < 0,0001$  em relação a SCBDS,  $p = 0,02$  em relação a SCBDC; CCBDC:  $p = 0,02$  em relação a SCBDS). Em todos os grupos, o CBD exerceu efeito significativo em relação ao controle, tratado com veículo (SCBDS:  $p = 0,021$ ; SCBDC:  $p = 0,013$ ; CCBDS:  $p = 0,015$ ; CCBDC:  $p = 0,046$ ). Contudo, na imagem final, os grupos desafiados com cocaína não apresentaram alteração na captação de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG em relação aos desafiados com salina, indicando que o tratamento de 8 dias com CBD atenuou a expressão do efeito psicoestimulante da cocaína no metabolismo encefálico de glicose, considerando o encéfalo total.

## 7.2.2. Imuno-histoquímica

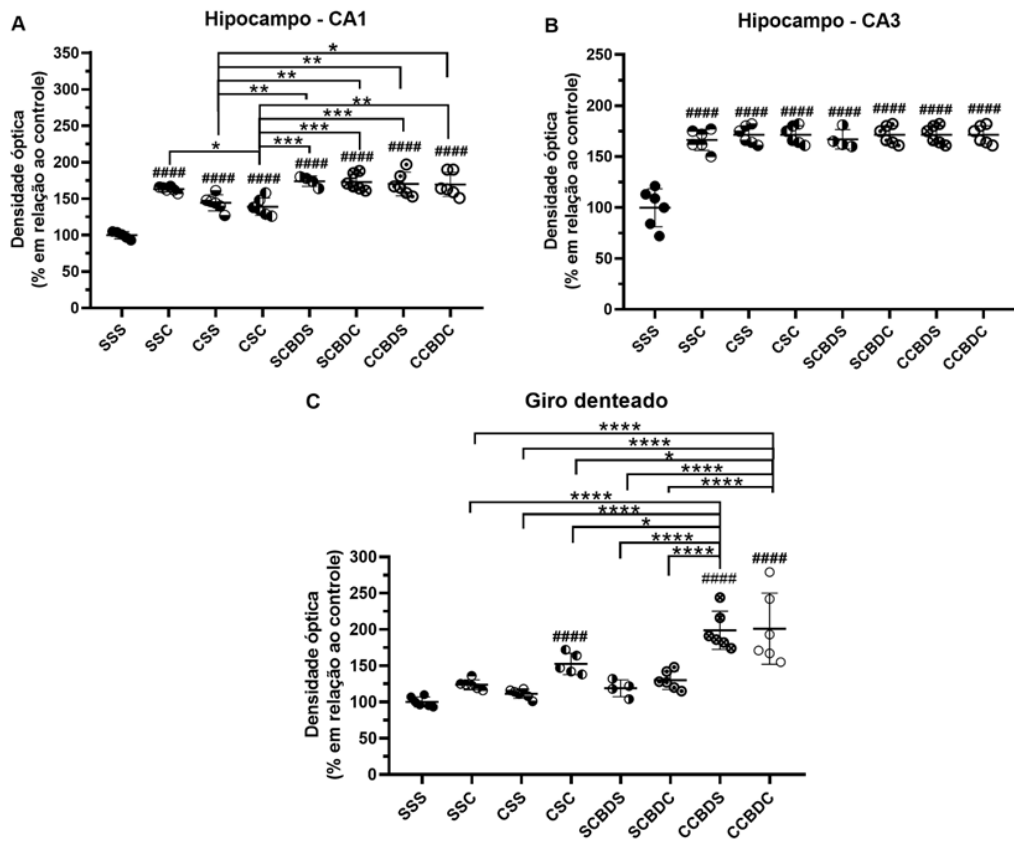
### 7.2.2.1 CB1

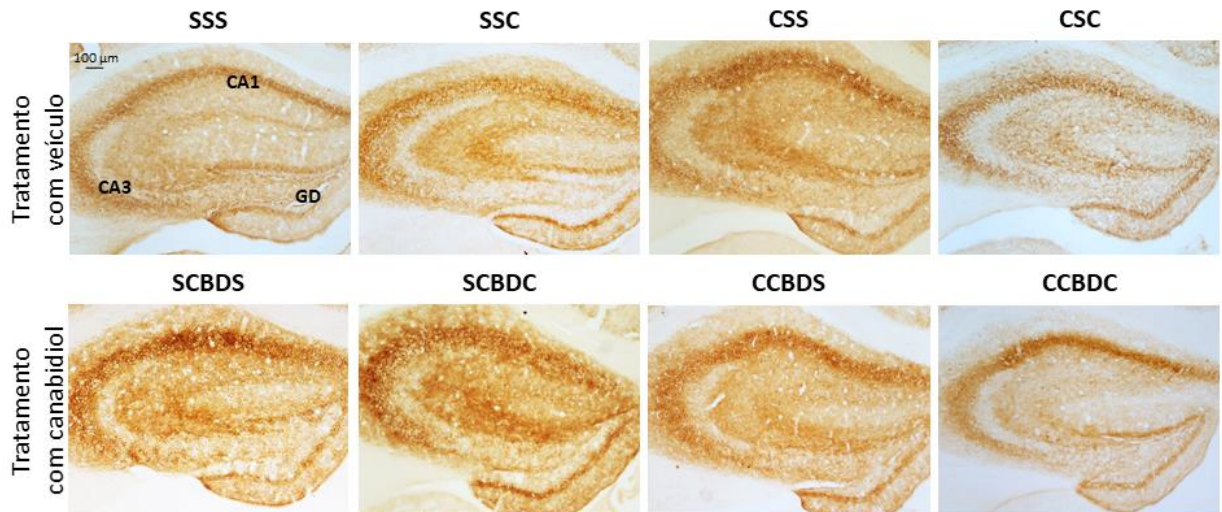
No hipocampo (Figura 44), a ANOVA de uma via apresentou efeito significativo nas três porções avaliadas, CA1 ( $F_{(7, 38)} = 29,00$ ,  $p < 0,00001$ ), CA3 ( $F_{(7, 38)} = 31,42$ ,  $p < 0,00001$ ), e giro denteado ( $F_{(7, 38)} = 18,50$ ,  $p < 0,00001$ ). O *post-hoc* de Bonferroni indicou que na região CA1, todos os grupos apresentaram aumento da população neuronal em relação ao controle ( $p < 0,0001$  para todos). Além disso, o CBD potencializou esse fenômeno, já que todos os grupos que receberam o canabinoide, seja apenas ele (grupo SCBDS) ou em combinação com cocaína (grupos SCBDC, CCBDS e CCBDC) apresentaram população neuronal superior aos grupos que receberam veículo (CSS:  $p = 0,0059$  em relação a SCBDS,  $p = 0,0027$  em relação a SCBDC,  $p = 0,008$  em relação a CCBDS,  $p = 0,0008$  em relação a CCBDC; e CSC:  $p = 0,0007$  em relação a SCBDS,  $p = 0,0002$  em relação a SCBDC,  $p = 0,01$  em relação a CCBDS,  $p = 0,001$  em relação a CCBDC). Também não se pode descartar certa participação do efeito agudo da cocaína, pois não houve diferença entre os grupos que receberam CBD e o grupo SSC, sendo, ainda, o número de neurônios superior neste grupo do que no grupo CSC ( $p = 0,016$ ).

Na região CA3, por sua vez, todos os grupos apresentaram maior quantidade neuronal em relação ao controle ( $p < 0,0001$  para todos os grupos), sem distinção de efeito entre cocaína, CBD ou ambos em conjunto.

No giro denteado, por fim, o grupo sensibilizado e reexposto à cocaína e tratado com veículo (CSC) apresentou aumento da contagem neuronal em relação ao controle ( $p = 0,0045$ ), bem como os grupos que foram sensibilizados com a droga e tratados com CBD (grupos CCBDS e CCBDC,  $p < 0,0001$  para ambos). Contudo, quando o CBD foi administrado, o aumento da população neuronal foi superior em relação ao tratamento com veículo (CSC,  $p = 0,014$  em relação a CCBDS;  $p = 0,009$  em relação a CCBDC). De fato, o aumento neuronal foi induzido pelo efeito de sensibilização e reexposição à cocaína, sendo o tratamento com CBD determinante para potencializar esse fenômeno, uma vez que o mesmo não esteve presente quando se administrou: i. apenas CBD (grupo SCBDS,  $p < 0,0001$  em relação a CCBDS e CCBDC); ii. cocaína agudamente no desafio, precedida por veículo (grupo SSC,  $p < 0,0001$  em relação a CCBDS e CCBDC) ou por CBD (grupo SCBDC,  $p < 0,0001$  em relação a CCBDS e CCBDC); iii. cocaína apenas na sensibilização (grupo CSS,  $p < 0,0001$  em relação a CCBDS e CCBDC).

Figura 44: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de CB1 no hipocampo.

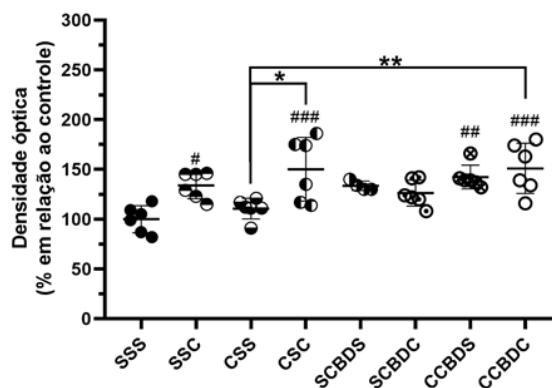




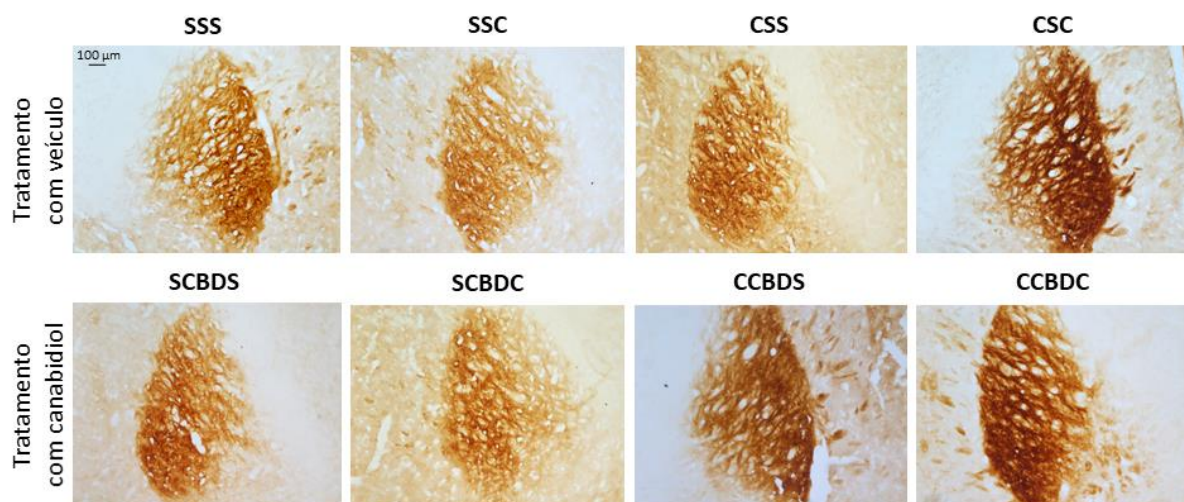
Imagens digitais de cortes coronais do hipocampo marcados para CB1. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e post-hoc de Bonferroni (n = 4-6). ####p < 0,0001 em relação ao controle; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

No globo pálido (Figura 45), onde  $F_{(7, 38)} = 6,13$ ,  $p < 0,00001$ , o *post-hoc* de Bonferroni demonstrou, em relação ao controle, um aumento da densidade de CB1 no grupo que recebeu cocaína agudamente no desafio (SSC,  $p = 0,043$ ), no grupo sensibilizado e reexposto à cocaína (CSC,  $p = 0,0005$ ) e nos grupos sensibilizados com cocaína e tratados com CBD (CCBDS,  $p = 0,005$ ; CCBDC,  $p = 0,0004$ ). Este parece ser um efeito da cocaína, pois o CBD *per se* (grupo SCBDS) não causou nenhuma alteração. Ainda, há aparente predomínio do efeito agudo na cocaína no fenômeno, pois o grupo que foi apenas sensibilizado com a droga (CSS) não apresentou diferenças em relação ao controle, apresentando, inclusive, menor densidade de CB1 em relação aos grupos CSC ( $p = 0,001$ ) e CCBDC ( $p = 0,008$ ).

Figura 45: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de CB1 no globo pálido.



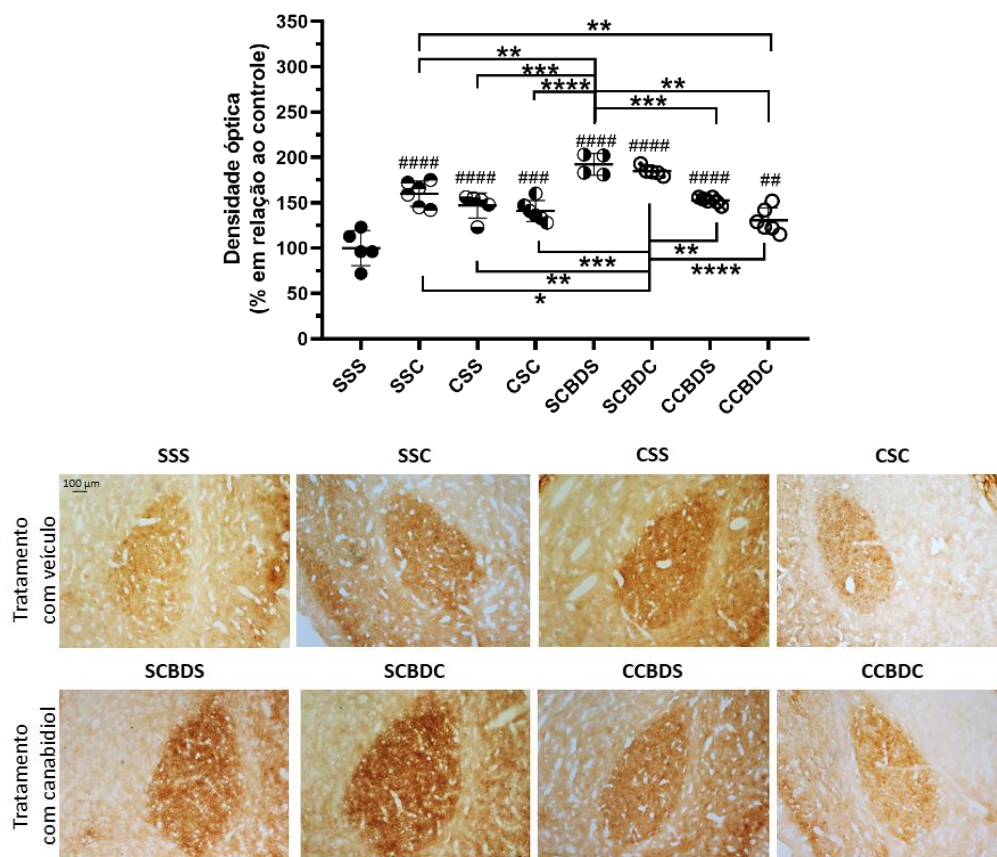




Imagens digitais de cortes coronais do globo pálido marcados para CB1. Bregma aproximado, -0,7 mm; interneural aproximado, +3,1 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 4-6). #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 em relação ao controle; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

Na amígdala basolateral (Figura 46), onde  $F_{(7, 38)} = 26,75$ ,  $p < 0,00001$ , o *post-hoc* de Bonferroni evidenciou que todos os grupos apresentaram maior densidade de CB1 em relação ao controle ( $p < 0,0001$  para SSC, CSS, SCBDS, SCBDC e CCBDS;  $p = 0,0001$  para CSC; e  $p = 0,006$  para CCBDC). Logo, tanto a cocaína quanto o CBD apresentaram efeito sobre essa região. Observou-se que o grupo tratado apenas com CBD (SCBDS) e o grupo que recebeu cocaína após o tratamento com CBD (SCBDC) apresentaram maior densidade de CB1 em relação aos demais (em relação a SCBDS:  $p = 0,006$  para SSC,  $p = 0,0001$  para CSS,  $p < 0,0001$  para CSC,  $p = 0,0005$  para CCBDS,  $p < 0,0001$  para CCBDC; em relação a SCBDC:  $p = 0,04$  para SSC,  $p = 0,0007$  para CSS,  $p < 0,0001$  para CSC,  $p = 0,003$  para CCBDS,  $p < 0,0001$  para CCBDC), mostrando que a sensibilização com cocaína reduz o aumento em CB1 induzido pelo CBD. O efeito agudo da cocaína, por outro lado, aparenta fazer pouco efeito no aumento de CB1, inclusive os animais do grupo SSC apresentaram maior densidade do receptor em relação ao grupo CCBDC ( $p = 0,006$ ).

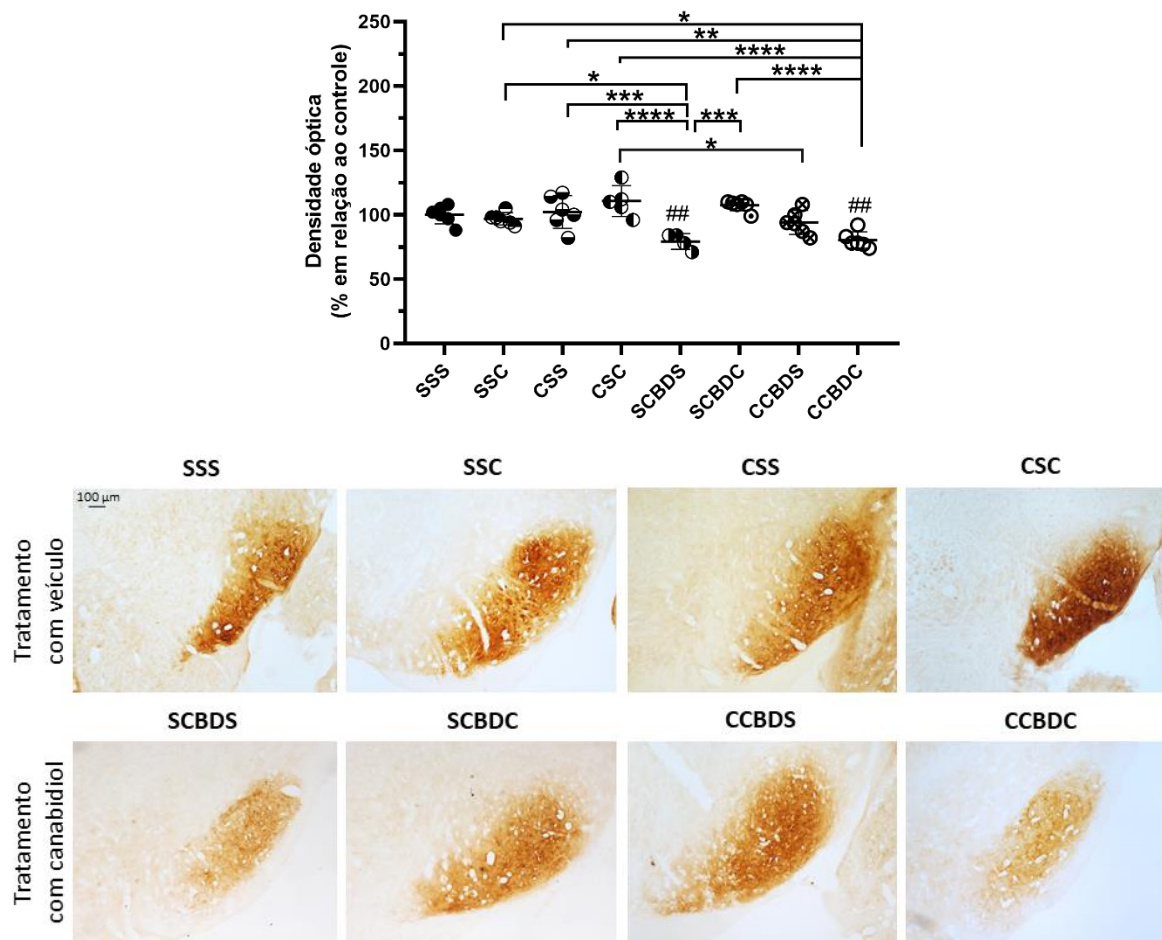
Figura 46: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de CB1 na amígdala basolateral.



Imagens digitais de cortes coronais da amígdala basolateral marcados para CB1. Bregma aproximado, -0,7 mm; interneural aproximado, +3,1 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni ( $n = 4-6$ ). ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  em relação ao controle; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Na substância negra reticular (Figura 47), onde  $F_{(7, 38)} = 11,14$ , o *post-hoc* de Bonferroni mostrou uma menor densidade de receptores CB1 na substância negra reticular dos grupos SCBDS e CCBDC em relação ao controle ( $p = 0,006$  e  $p = 0,003$ , respectivamente). Ambos os grupos também apresentaram diferença em relação aos demais (SCBDS:  $p = 0,03$  em relação a SSC,  $p = 0,002$  em relação a CSS,  $p < 0,0001$  em relação a CSC,  $p < 0,0001$  em relação a SCBDC; CCBDC:  $p = 0,02$  em relação a SSC,  $p = 0,0008$  em relação a CSS,  $p < 0,0001$  em relação a CSC,  $p < 0,0001$  em relação a SCBDC). Ainda, o grupo CSC expressou maior densidade do receptor do que o grupo CCBDS ( $p = 0,015$ ). Estes dados indicam que a redução de CB1 foi dependente da ação do CBD isoladamente ou da combinação entre ele e a sensibilização acrescida de reexposição à cocaína.

Figura 47: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de CB1 na substância negra reticular.



Imagens digitais de cortes coronais da substância negra reticular marcados para CB1. Bregma aproximado, -3,52 mm; interneural aproximado, +0,28 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 4-6). ##p < 0,01 em relação ao controle; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

#### 7.2.2.2 FAAH

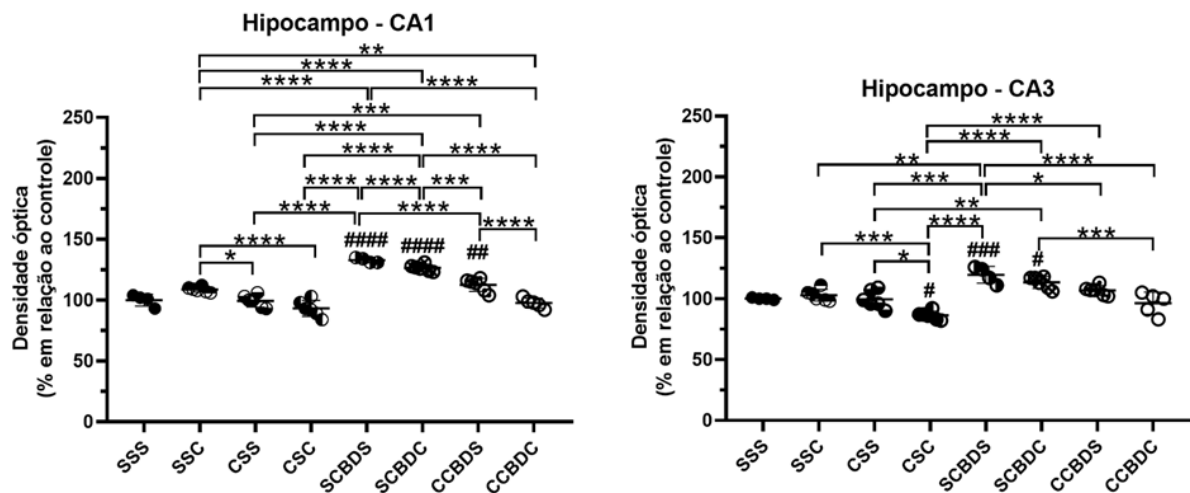
A análise de FAAH foi realizada no hipocampo (Figura 48), considerando as regiões CA1 e CA3. O giro denteado não foi avaliado devido à baixa marcação. Observou-se um efeito significativo da ANOVA de uma via, tanto em CA1 ( $F_{(7, 35)} = 50,89$ ,  $p < 0,0001$ ) quanto em CA3 ( $F_{(7, 35)} = 17,29$ ,  $p < 0,0001$ ).

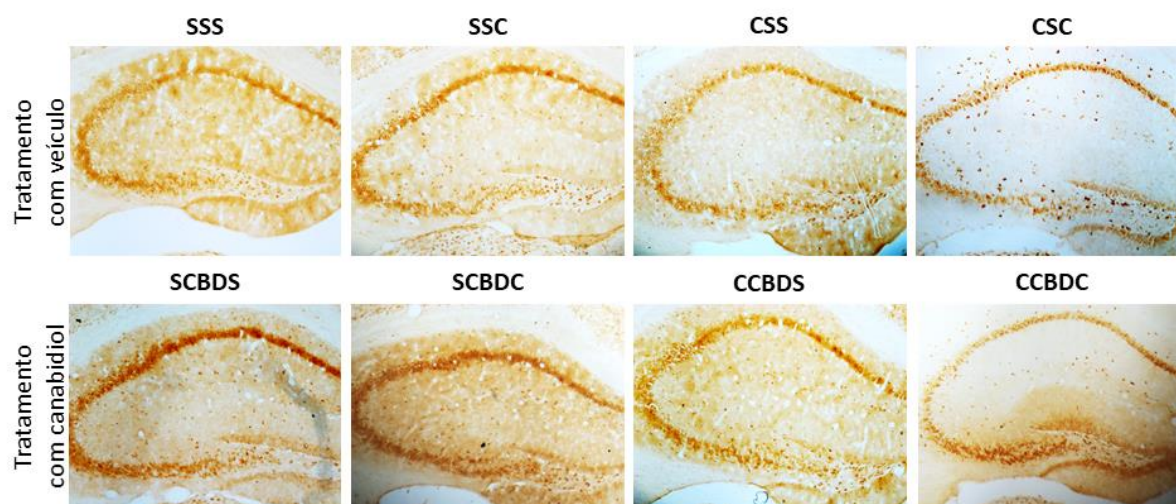
Na região CA1 o *post-hoc* de Bonferroni identificou um aumento na densidade de FAAH em relação ao controle nos grupos que receberam apenas CBD (SCBDS,  $p < 0,0001$ ), CBD previamente à cocaína (SCBDC,  $p < 0,0001$ ) ou CBD após a sensibilização (CCBDS,  $p = 0,0035$ ). Esses grupos também expressaram mais FAAH do que os grupos: sensibilizado com cocaína (CSS;  $p < 0,0001$  em relação a SCBDS e SCBDC;  $p = 0,0004$  em relação a CCBDS); desafiado com cocaína (SSC;  $p < 0,0001$

em relação a SCBDS e SCBDC); sensibilizado e desafiado com cocaína (CSC;  $p < 0,0001$  em relação a SCBDS, SCBDC e CCBDS); sensibilizado com cocaína, tratado com CBD, e desafiado com cocaína (CCBDC;  $p < 0,0001$  em relação a SCBDS e SCBDC;  $p = 0,0001$  em relação a CCBDS). Ainda, o aumento de FAAH foi menor no grupo CCBDS ( $p = 0,0001$ ) em relação aos grupos SCBDS ( $p < 0,0001$ ) e SCBDC ( $p = 0,0001$ ). Por fim, o grupo agudo de cocaína (SSC) expressou mais FAAH do que os outros grupos que receberam cocaína e foram tratados com veículo (CSS,  $p = 0,027$ ; CSC,  $p < 0,0001$ ) e do que o grupo CCBDC ( $p < 0,0001$ ).

Já em CA3, o *post-hoc* de Bonferroni evidenciou que o grupo CSC apresentou menor densidade de FAAH ( $p = 0,015$ ) e os grupos SCBDS e SCBDC maiores densidades em relação ao controle ( $p = 0,006$  e  $p = 0,023$ , respectivamente). Essas alterações foram refletidas na comparação entre grupos, de forma que CSC apresentou menor densidade de FAAH em relação aos grupos SSC ( $p = 0,0003$ ), CSS ( $p = 0,007$ ), SCBDS ( $p < 0,0001$ ), SCBDC ( $p < 0,0001$ ), CCBDS ( $p < 0,0001$ ); o grupo SCBDS apresentou maior densidade de FAAH em relação aos grupos SSC ( $p = 0,0016$ ), CSS ( $p < 0,0001$ ), CCBDS ( $p = 0,033$ ) e CCBDC ( $p < 0,0001$ ); e o grupo SCBDC em relação aos grupos CSS ( $p = 0,0042$ ) e CCBDC ( $p = 0,0004$ ).

Figura 48: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na densidade óptica de FAAH no hipocampo.





Imagens digitais de cortes coronais do hipocampo marcados para FAAH. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e post-hoc de Bonferroni (n = 4-6). #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001, ####p < 0,0001 em relação ao controle; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

### 7.2.2.3 NeuN

No hipocampo (Figura 49), observou-se um efeito significativo pela ANOVA de uma via, nas três regiões avaliadas: CA1 ( $F_{(7, 34)} = 4,30$ ,  $p = 0,0017$ ), CA3 ( $F_{(7, 34)} = 15,44$ ,  $p < 0,0001$ ) e giro denteado ( $F_{(7, 34)} = 13,82$ ,  $p = 0,0017$ ).

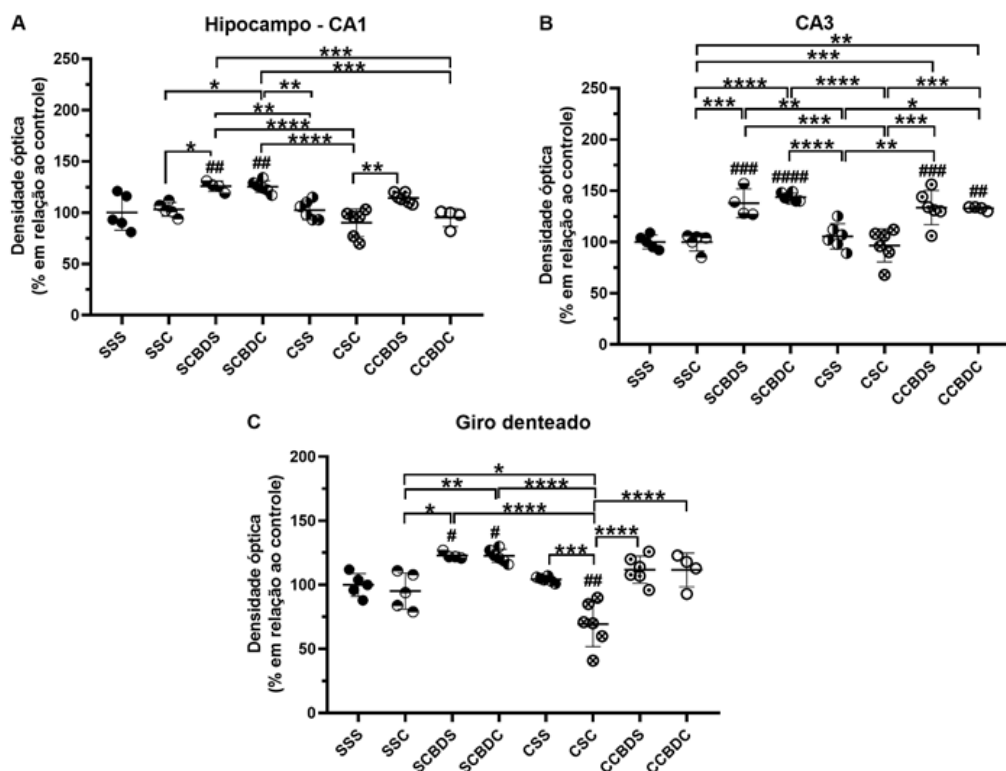
Na região CA1 (Figura 49A), foi demonstrado pelo *post-hoc* de Bonferroni que os animais tratados apenas com CBD e aqueles tratados com CBD e desafiados com cocaína, apresentaram aumento do número de neurônios em relação ao controle (grupo SCBDS,  $p = 0,01$ ; grupos SCBDC,  $p = 0,004$ ). Além disso, estes grupos também apresentaram mais neurônios que os demais grupos (em relação a SCBDS:  $p = 0,033$  para SSC,  $p = 0,018$  para CSS,  $p < 0,0001$  para CSC,  $p = 0,0025$  para CCBDC; em relação a SCBDC:  $p = 0,015$  para SSC,  $p = 0,0069$  para CSS,  $p < 0,0001$  para CSC,  $p = 0,0009$  para CCBDC). Por fim, o grupo sensibilizado com cocaína e tratado com CBD (CCBDS) apresentou aumento neuronal em relação ao grupo sensibilizado com cocaína, tratado com veículo e reexposto à cocaína (CSC,  $p = 0,0036$ ).

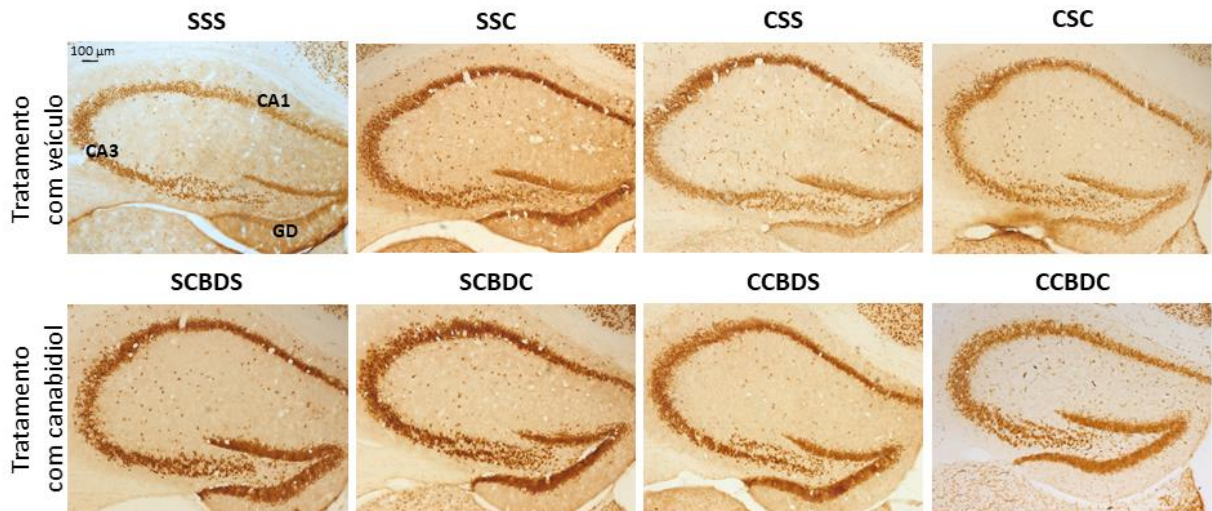
Já na região CA3 (Figura 49B), todos os grupos que foram tratados com CBD apresentaram aumento de neurônios em relação ao controle, conforme mostrou o *post-hoc* de Bonferroni (SCBDS:  $p = 0,0007$ ; SCBDC:  $p < 0,0001$ ; CCBDS:  $p = 0,0009$ ; CCBDC:  $p = 0,0043$ ). Além disso, estes grupos também apresentaram mais neurônios do que os grupos: agudo de cocaína (SSC;  $p = 0,0007$  para SCBDS,  $p < 0,0001$  para

SCBDC,  $p = 0,0009$  para CCBDS,  $p = 0,0043$  para CCBDC); sensibilizado com cocaína (CSS;  $p = 0,0032$  para SCBDS,  $p < 0,0001$  para SCBDC,  $p = 0,0046$  para CCBDS,  $p = 0,019$  para CCBDC); sensibilizado e reexposto à cocaína após tratamento com veículo (CSC;  $p = 0,0001$  para SCBDS,  $p < 0,0001$  para SCBDC,  $p = 0,0001$  para CCBDS,  $p = 0,0008$  para CCBDC). Portanto, o CBD foi capaz de aumentar a população neuronal e a cocaína não interferiu neste efeito.

Por fim, no giro denteado (Figura 49C) o *post-hoc* de Bonferroni identificou um aumento da população neuronal no grupo que recebeu apenas CBD (SCBDS) e no grupo que recebeu cocaína após o CBD, em relação ao controle ( $p = 0,046$  e  $p = 0,028$ , respectivamente) e em relação ao grupo agudo de cocaína (SSC;  $p = 0,011$  e  $p = 0,0039$ , respectivamente). Além disso, houve uma redução da população neuronal do grupo sensibilizado e reexposto à cocaína após tratamento com veículo (CSC) em relação ao controle ( $p = 0,0011$ ), aos demais grupos expostos à cocaína (SSC:  $p = 0,008$ ; CSS:  $p < 0,0001$ ) e aos grupos que receberam o CBD, seja apenas ele (SCBDS:  $p < 0,0001$ ) ou a combinação entre ele e a cocaína (grupos SCBDC, CCBDS e CCBDC,  $p = 0,0001$ ), indicando que o tratamento com o canabinoide reverteu a redução na população neuronal.

Figura 49: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios nas regiões hipocâmpais CA1, CA3 e no giro denteado.

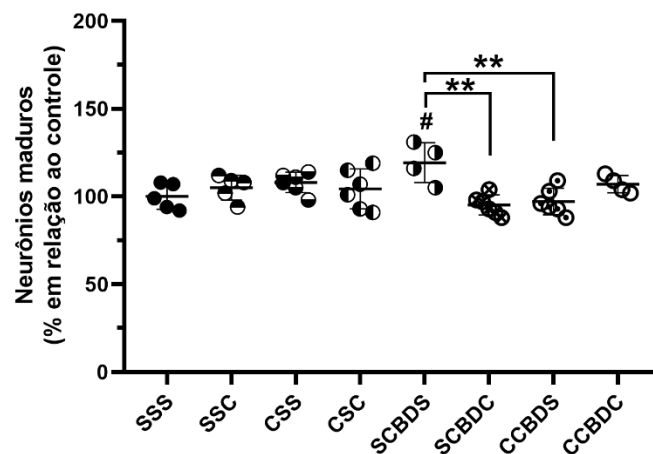


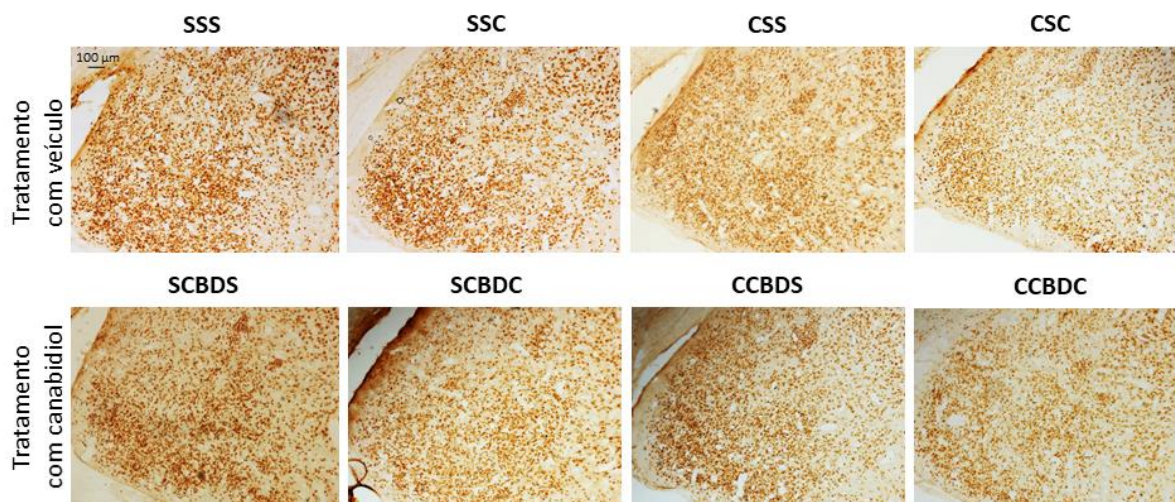


Imagens digitais de cortes coronais do hipocampo marcados para NeuN. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e post-hoc de Bonferroni ( $n = 4-6$ ). # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  em relação ao controle; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Na amígdala (Figura 50), a ANOVA de uma via também apresentou efeito significativo ( $F_{(7, 34)} = 4,30$ ,  $p = 0,0017$ ), sendo que o CBD per se (grupo SCBDS) gerou aumento da contagem neuronal em relação ao controle ( $p = 0,02$ ) e aos grupos que receberam cocaína após (SCBDC,  $p = 0,001$ ) ou anteriormente (CCBDS,  $p = 0,003$ ) à administração do canabinoide, conforme mostrou o *post-hoc* de Bonferroni.

Figura 50: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios na amígdala.



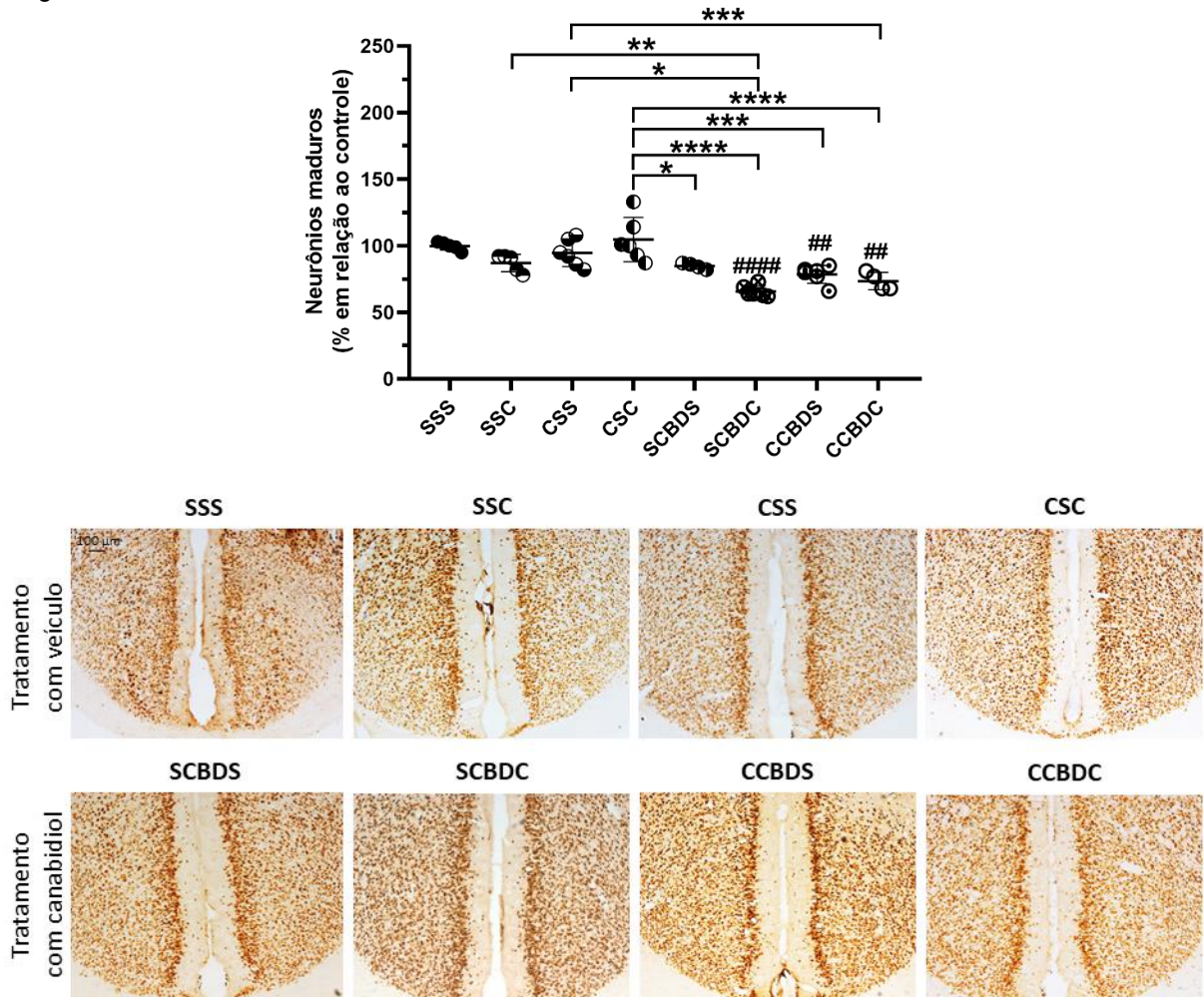


Imagens digitais de cortes coronais da amígdala marcados para NeuN. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 4-6). #p < 0,05, em relação ao controle; \*\*p < 0,01.

No córtex cingulado (Figura 51), também houve efeito significativo da ANOVA de uma via ( $F_{(7, 34)} = 13,05$ ,  $p < 0,0001$ ). O *post-hoc* de Bonferroni identificou que os grupos que receberam CBD e cocaína apresentaram redução do número neuronal, quando a cocaína foi administrada na sensibilização (CCBDS,  $p = 0,008$ ), no desafio (SCBDC,  $p < 0,0001$ ), ou em ambos os momentos (CCBDC,  $p = 0,002$ ). Aparentemente, este foi um efeito consequente da interação entre CBD e cocaína, pois quando os animais receberam a cocaína na sensibilização e no desafio, mas foram tratados com veículo (CSC), o número de neurônios foi superior em relação a todos os grupos tratados com o CBD (SCBDS:  $p = 0,03$ ; SCBDC:  $p < 0,0001$ ; CCBDS:  $p = 0,0003$ ; CCBDC,  $p < 0,0001$ ). Ainda, alguns grupos que receberam tratamento com CBD apresentaram menos neurônios do que o grupo sensibilizado com cocaína (CSS;  $p < 0,0001$  em relação a SCBDC e  $p = 0,017$  em relação a CCBDC) ou do que o grupo que recebeu a administração aguda da cocaína (SSC;  $p = 0,0085$  em relação a SCBDC).



Figura 51: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios no córtex cingulado.

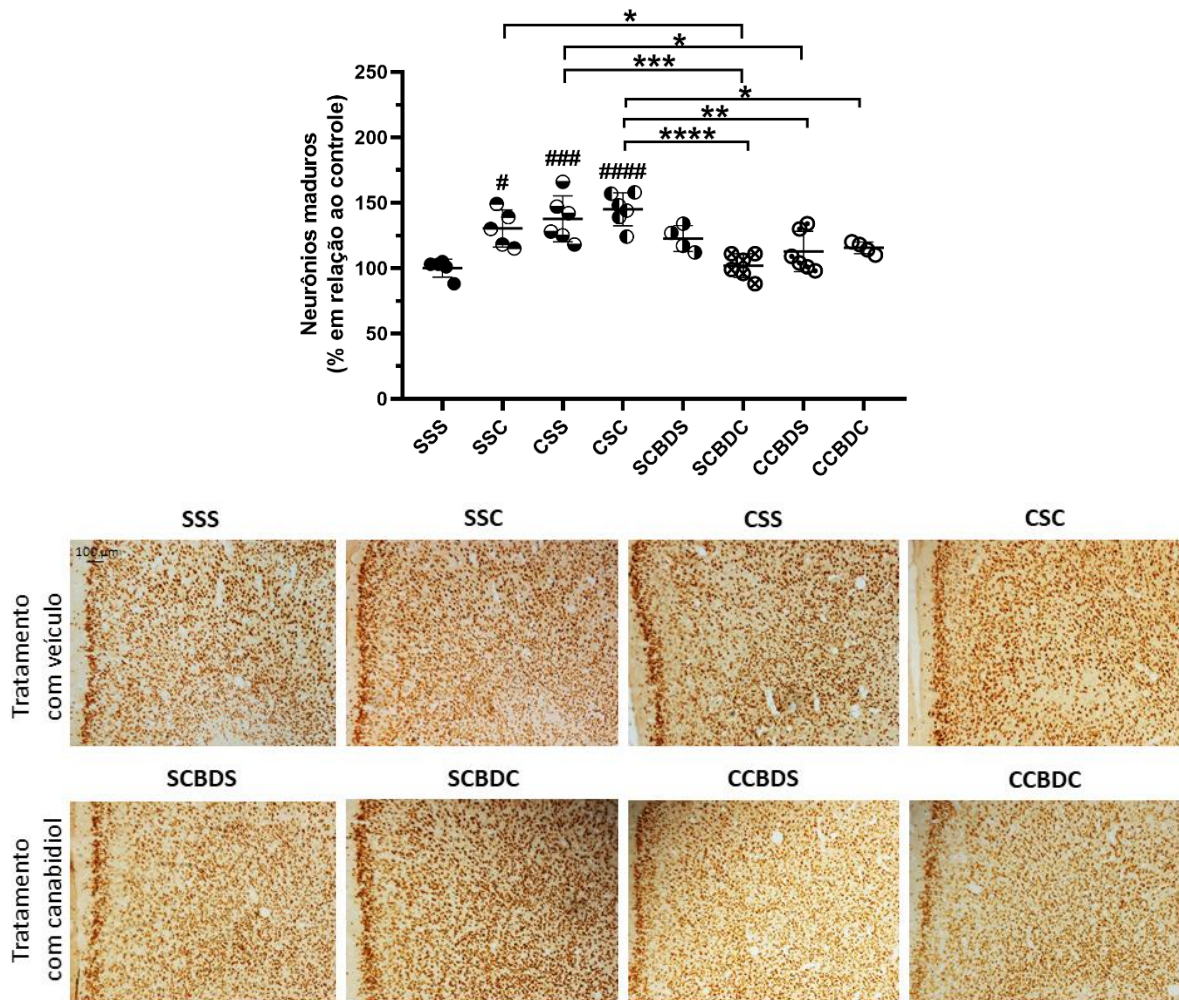


Bregma aproximado, +0,86 mm; interneural aproximado, +4,66 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 4-6). ##p < 0,01, ####p < 0,0001 em relação ao controle; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

No córtex pré-límbico (Figura 52) o efeito significativo foi também identificado pela ANOVA ( $F_{(7, 34)} = 13,05$ ,  $p < 0,0001$ ), sendo que a administração de cocaína aumentou o número de neurônios, quando a mesma aconteceu apenas na sensibilização (CSS,  $p = 0,0004$ ) ou no desafio (SSC,  $p = 0,011$ ), ou em ambos os momentos (CSC,  $p < 0,0001$ ) em relação ao controle, conforme indicado pelo *post-hoc* de Bonferroni. O CBD *per se* (grupo SCBDS) não alterou o número de neurônios quando comparado tanto ao controle quanto aos grupos cocaína. No entanto, a combinação dele com a cocaína, administrada nas três situações citadas acima, inibiu o aumento neuronal que a droga induziu no córtex pré-límbico. Dessa forma, algumas alterações entre os grupos que receberam apenas cocaína e os que receberam cocaína e CBD foram detectadas. O grupo agudo de cocaína (SSC) apresentou mais neurônios do que o grupo em que a cocaína aguda foi precedida pelo CBD (SCBDC,

$p = 0,014$ ). O grupo sensibilizado com cocaína (CSS) apresentou mais neurônios do que o sensibilizado com cocaína e tratado com CBD (CCBDS,  $p = 0,0005$ ) e o grupo SCBDC ( $p = 0,029$ ). Por fim, o grupo sensibilizado e reexposto à cocaína (CSC) apresentou mais neurônios do que todos os grupos que receberam CBD e cocaína (SCBDC,  $p < 0,0001$ ; CCBDS,  $p = 0,0019$ ; CCBDC:  $p = 0,017$ ).

Figura 52: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios no córtex pré-límbico.

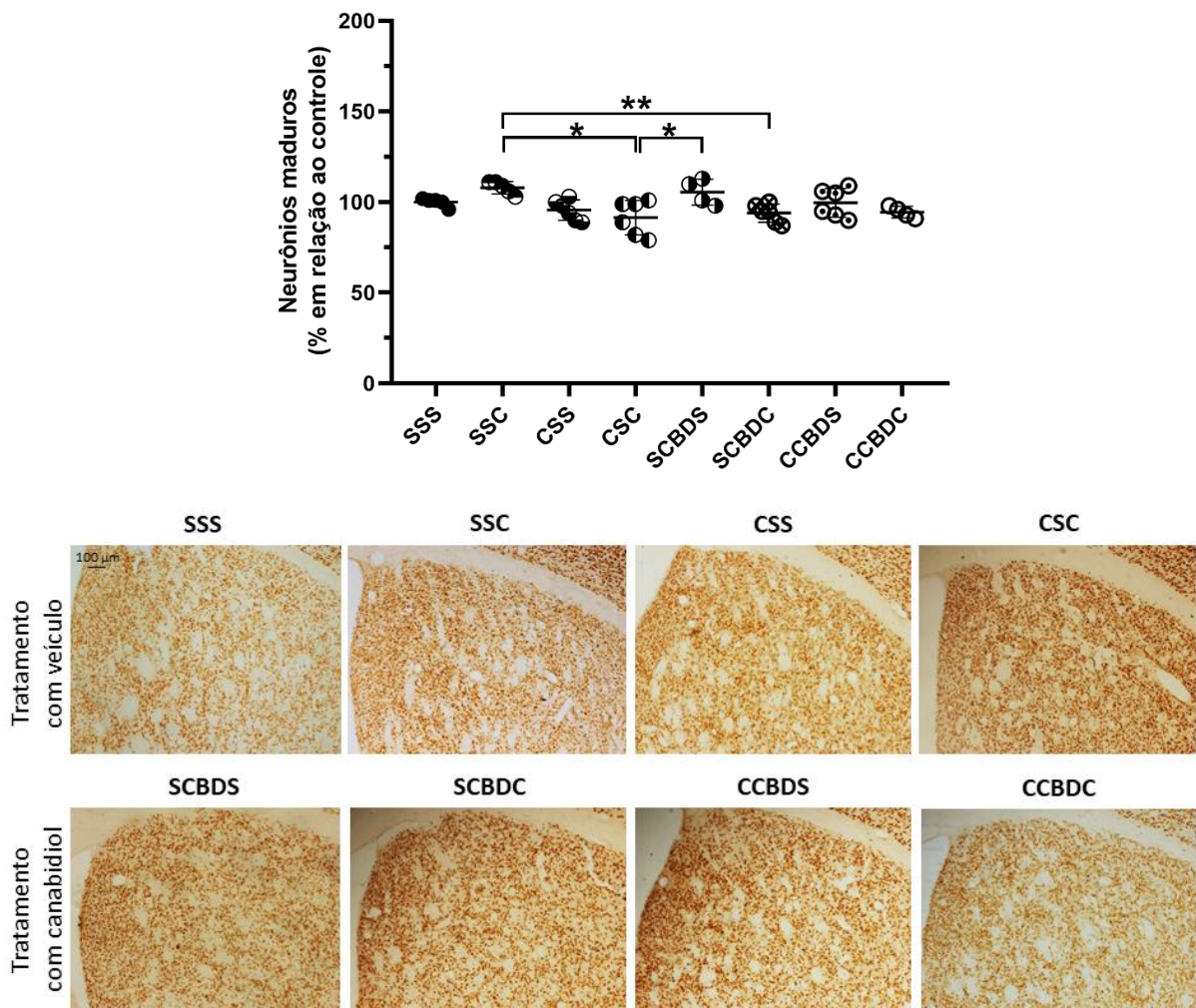


Bregma aproximado, +2,46 mm; interneural aproximado, +6,26 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni ( $n = 4-6$ ). # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  em relação ao controle; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Na região de caudado-putâmen, a ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo em suas duas porções, dorsomedial ( $F_{(7, 34)} = 4,42$ ,  $p = 0,0014$ ) e dorsolateral ( $F_{(7, 34)} = 8,12$ ,  $p < 0,0001$ ).

Na região dorsomedial (Figura 53), o *post-hoc* de Bonferroni não identificou alterações dos grupos em relação ao controle. Porém, algumas diferenças entre os grupos tratados foram identificadas. O grupo que recebeu apenas uma injeção aguda de cocaína (SSC) apresentou maior população neuronal na região do que os animais que foram sensibilizados e reexpostos à droga (CSC,  $p = 0,0029$ ) e também em relação aos animais que receberam CBD previamente à injeção aguda de cocaína (SCBDC,  $p = 0,02$ ). Além disso, o grupo tratado apenas com CBD (SCBDS) apresentou mais neurônios em relação ao grupo sensibilizados e reexposto à cocaína (CSC,  $p = 0,037$ ).

Figura 53: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios na porção dorsomedial do caudado-putâmen.

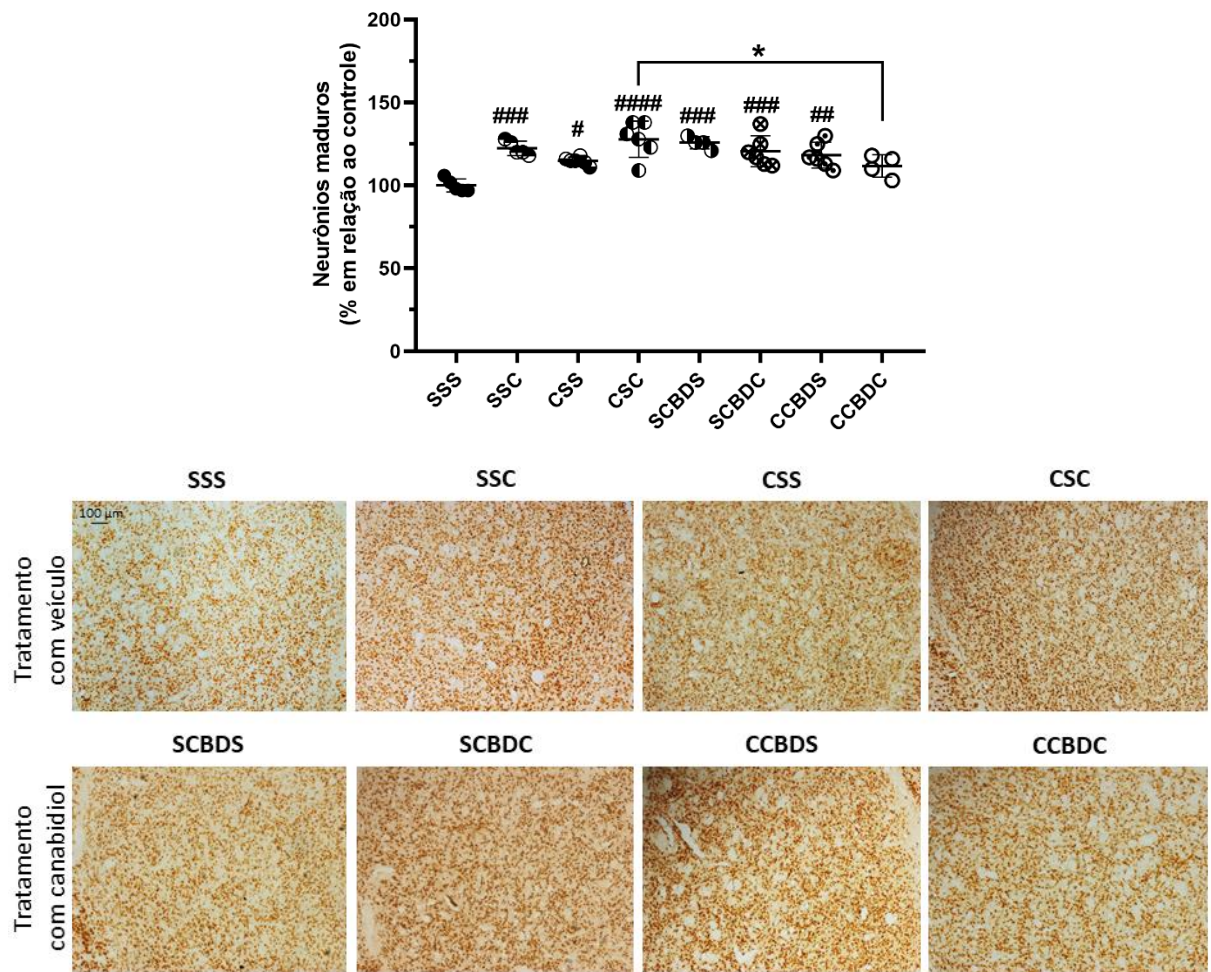


Bregma aproximado, +0,86 mm; interneural aproximado, +4,66 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni ( $n = 4-6$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Já na porção dorsolateral (Figura 54), o *post-hoc* de Bonferroni verificou que, com exceção do grupo CCBDC (sensibilizado e reexposto à cocaína, e tratado com

CBD), os demais grupos apresentaram aumento da população neuronal em relação ao grupo controle (SSC:  $p = 0,0004$ ; CSS:  $p = 0,038$ ; CSC:  $p < 0,0001$ ; SCBDS:  $p = 0,0001$ ; SCBDC:  $p = 0,0007$ ; CCBDS:  $p = 0,0036$ ). Ainda, o grupo CCBDC apresentou menos neurônios em relação ao grupo que recebeu veículo no tratamento, ao invés do CBD (CSC,  $p = 0,03$ ), sugerindo que cocaína e CBD interagem de maneira a prevenir o aumento neuronal que ambos causam isoladamente.

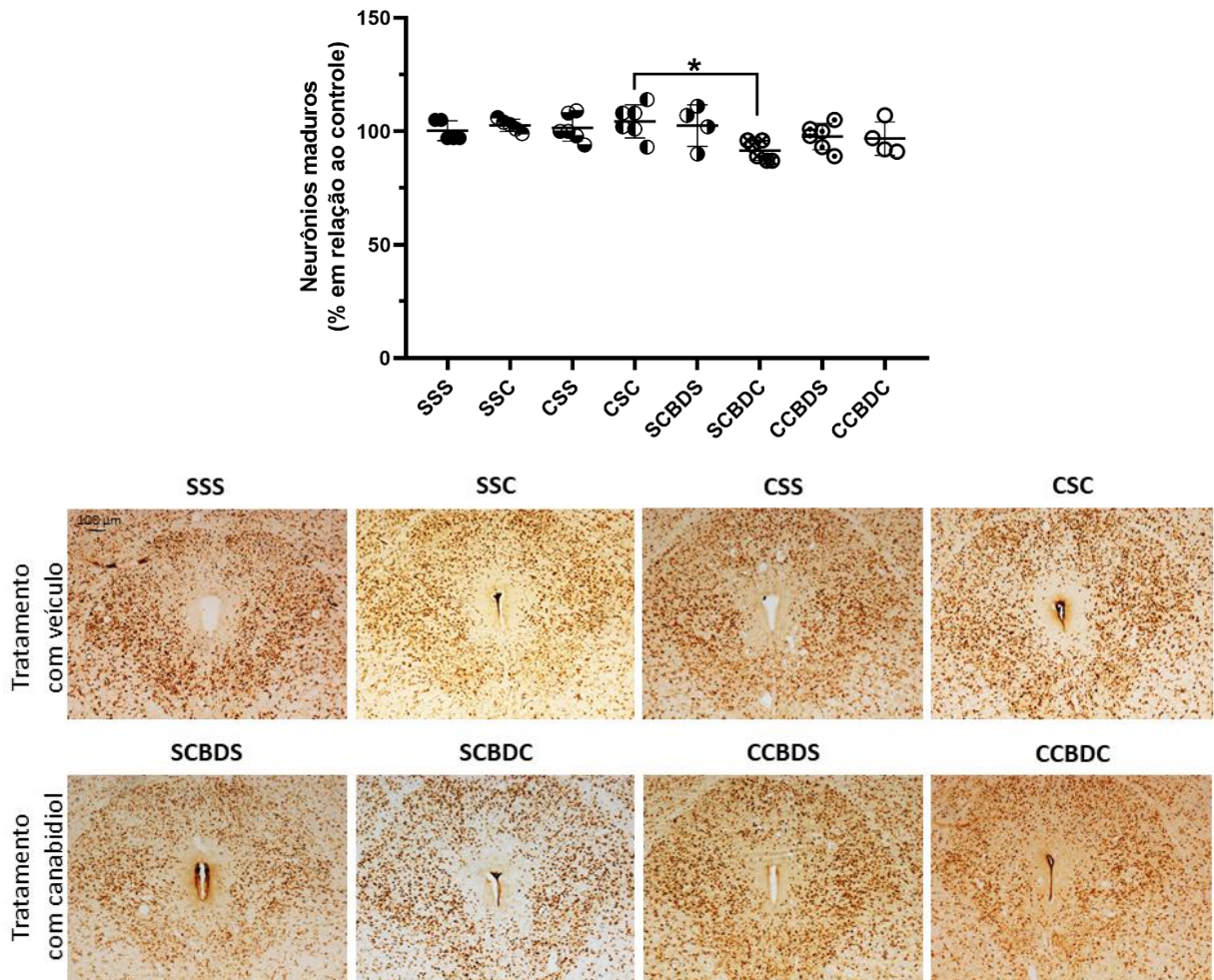
Figura 54: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios na porção dorsolateral do caudado-putâmen.



Bregma aproximado, +0,86 mm; interneuronal aproximado, +4,66 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni ( $n = 4-6$ ). # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  em relação ao controle; \* $p < 0,05$ .

Na substância cinzenta periaquedutal (Figura 55), houve efeito significativo, identificado pela ANOVA de uma via ( $F_{(7, 34)} = 4,42$ ,  $p = 0,0014$ ), sendo a única diferença encontrada após *post-hoc* de Bonferroni uma menor quantidade de neurônios no grupo que foi tratado com CBD previamente a exposição à injeção aguda de cocaína (SCBDC) em relação ao grupo sensibilizado e reexposto à cocaína (CSC) ( $p = 0,015$ ).

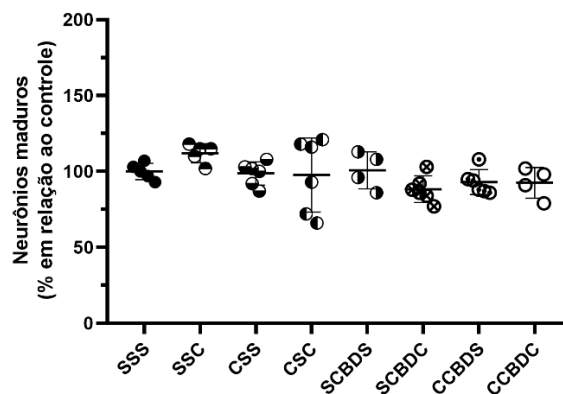
Figura 55: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios na substância cinzenta periaquedutal.

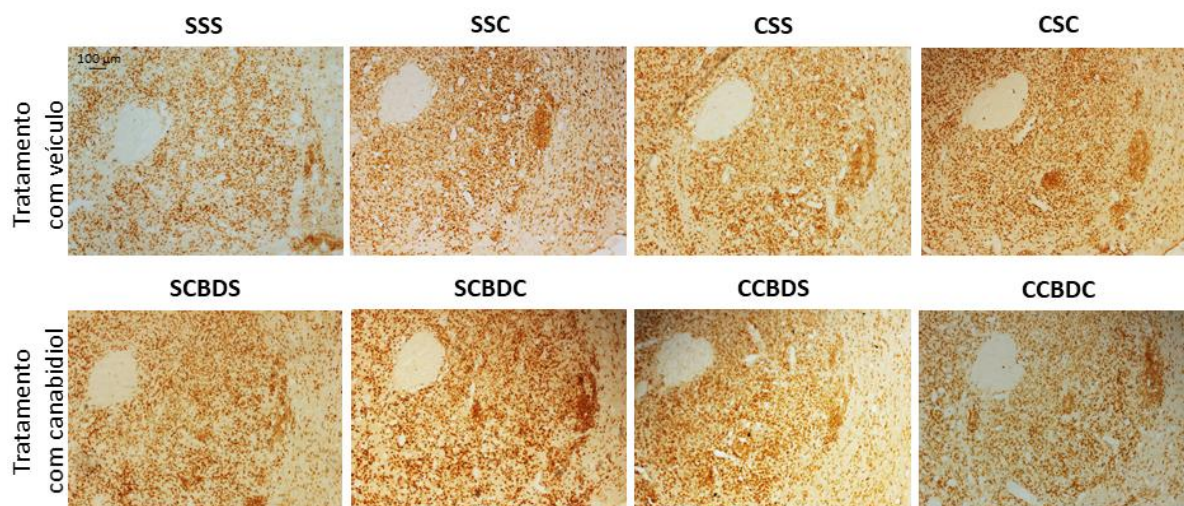


Imagens digitais de cortes coronais da substância cinzenta periaquedutal marcados para NeuN. Bregma aproximado, -3,52 mm; interneural aproximado, +0,28 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 4-6). \* $p < 0,05$ .

Por fim, no núcleo accumbens (Figura 56), a ANOVA de uma via não detectou alteração no número de neurônios ( $F_{(7, 34)} = 1,798$ ,  $p = 0,1198$ ).

Figura 56: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos na contagem de neurônios no núcleo accumbens.



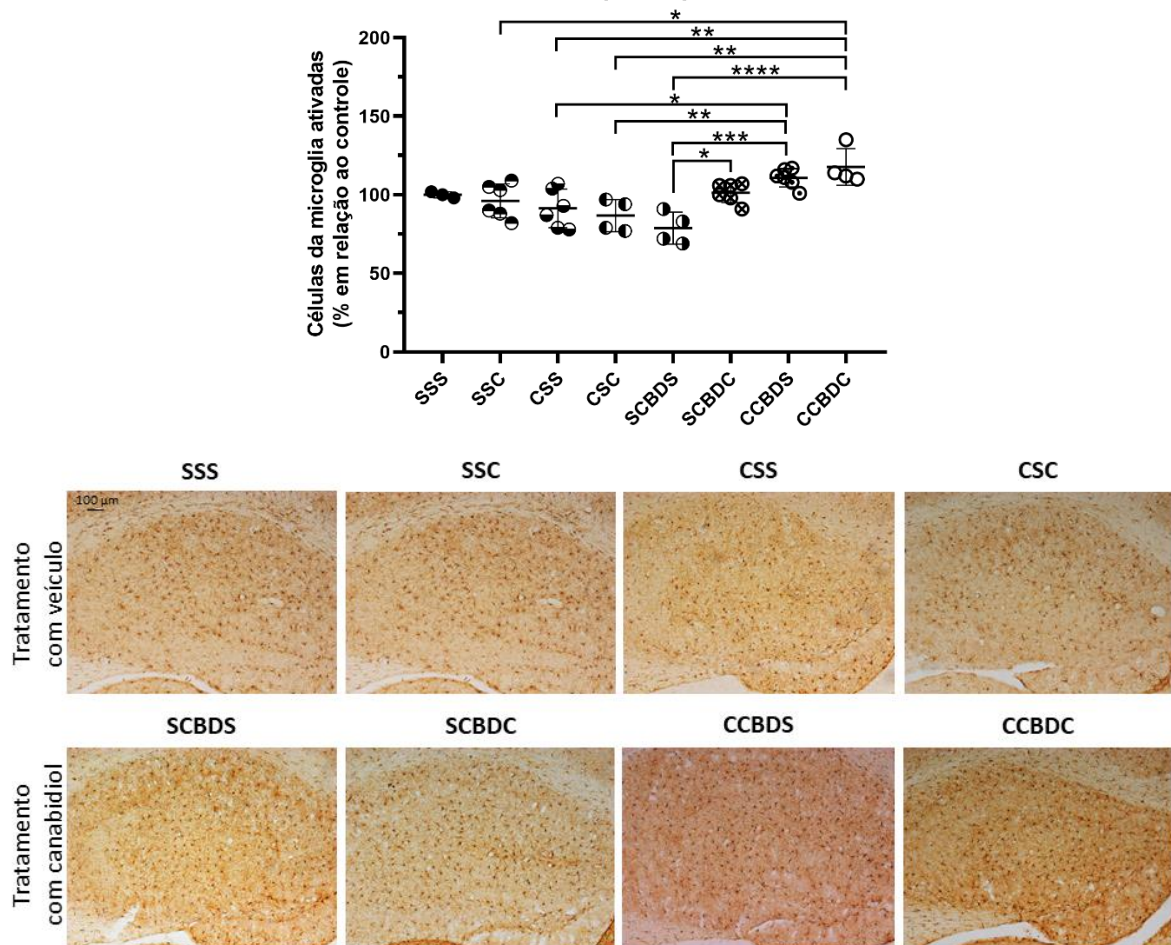


Imagens digitais de cortes coronais do núcleo accumbens marcados para NeuN. Bregma aproximado, +0,86 mm; interneuronal aproximado, +4,66 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni ( $n = 4-6$ ).

#### 7.2.2.4 Iba1

No hipocampo (Figura 57), a ANOVA de uma via detectou efeito significativo das administrações de cocaína e CBD ( $F_{(7, 31)} = 7,88$ ,  $p < 0,0001$ ). O *post-hoc* de Bonferroni não encontrou alteração do número de células ativadas dos grupos tratados em relação ao controle. Contudo, a exposição à cocaína precedida (grupo SCBDC), precedida (grupo CCBDS) ou ambas (grupo CCBDC) pela administração de CBD, associou-se a um aumento do número de células ativadas da microglia em relação a quando apenas uma das substâncias, CBD (grupo SCBDS), ou cocaína (grupos SSC, CSS e CSC), foi administrada, ou seja, a combinação das substâncias provoca aumento da ativação destas células. Assim, o grupo SCBDC apresentou mais células da microglia ativadas em relação ao grupo SCBDS ( $p = 0,016$ ); o grupo CCBDS em relação aos grupos SCBDS ( $p = 0,0002$ ), CSS ( $p = 0,022$ ) e CSC ( $p = 0,0086$ ); e o grupo CCBDC em relação aos grupos SCBDS ( $p < 0,0001$ ), CSS ( $p = 0,0031$ ), CSC ( $p = 0,0013$ ) e SSC ( $p = 0,024$ ).

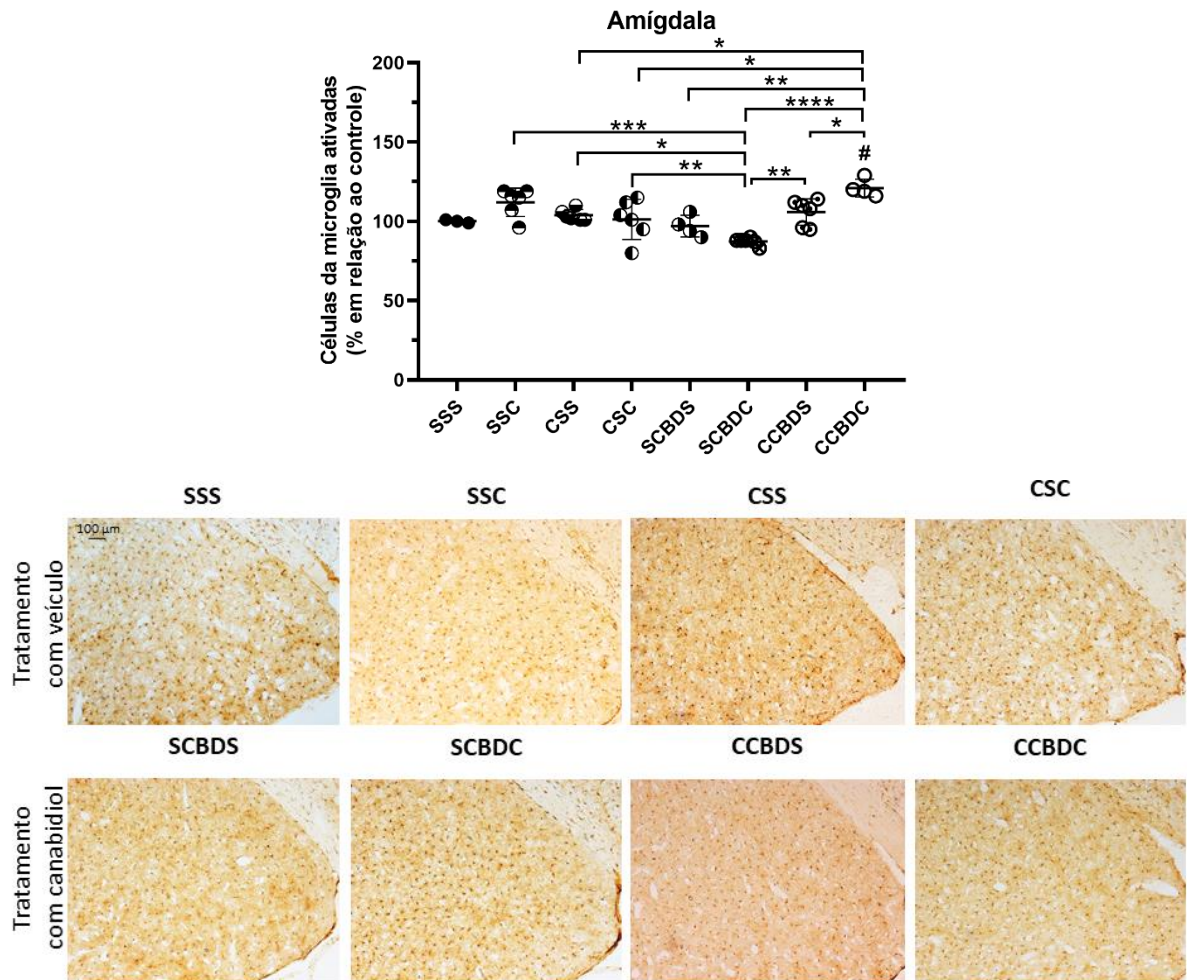
Figura 57: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de células da microglia ativadas no hipocampo.



Imagens digitais de cortes coronais do hipocampo marcados para Iba1. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 3-6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

Na amígdala (Figura 58), a ANOVA de uma via também apresentou efeito significativo ( $F_{(7, 33)} = 8,80$ ,  $p < 0,0001$ ) e o *post-hoc* de Bonferroni verificou que o grupo sensibilizado e reexposto à cocaína e tratado com canabidiol (CCBDC) apresentou maior número de células da microglia ativadas em relação ao controle ( $p = 0,018$ ), aos demais grupos que receberam CBD (SCBDS:  $p = 0,0018$ ; SCBDC:  $p < 0,0001$ ; CCBDS:  $p = 0,045$ ) e aos grupos sensibilizados com cocaína e tratados com veículo (CSS:  $p = 0,024$ ; CSC:  $p = 0,006$ ). Além disso, o grupo SCBDC apresentou menor número de células da microglia ativadas em relação aos grupos CSC ( $p = 0,046$ ), CSS ( $p = 0,013$ ), CCBDS ( $p = 0,0036$ ) e SSC ( $p < 0,0001$ ). Estes dados permitem fazer três suposições: i. a sensibilização à cocaína pode aumentar o número de células da microglia ativadas na amígdala; ii. esse efeito é potencializado pelo CBD procedido por reexposição à cocaína; iii. o CBD possui um papel protetor na ativação das células da microglia induzida pelo efeito agudo da cocaína.

Figura 58: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de células da microglia ativadas na amígdala.

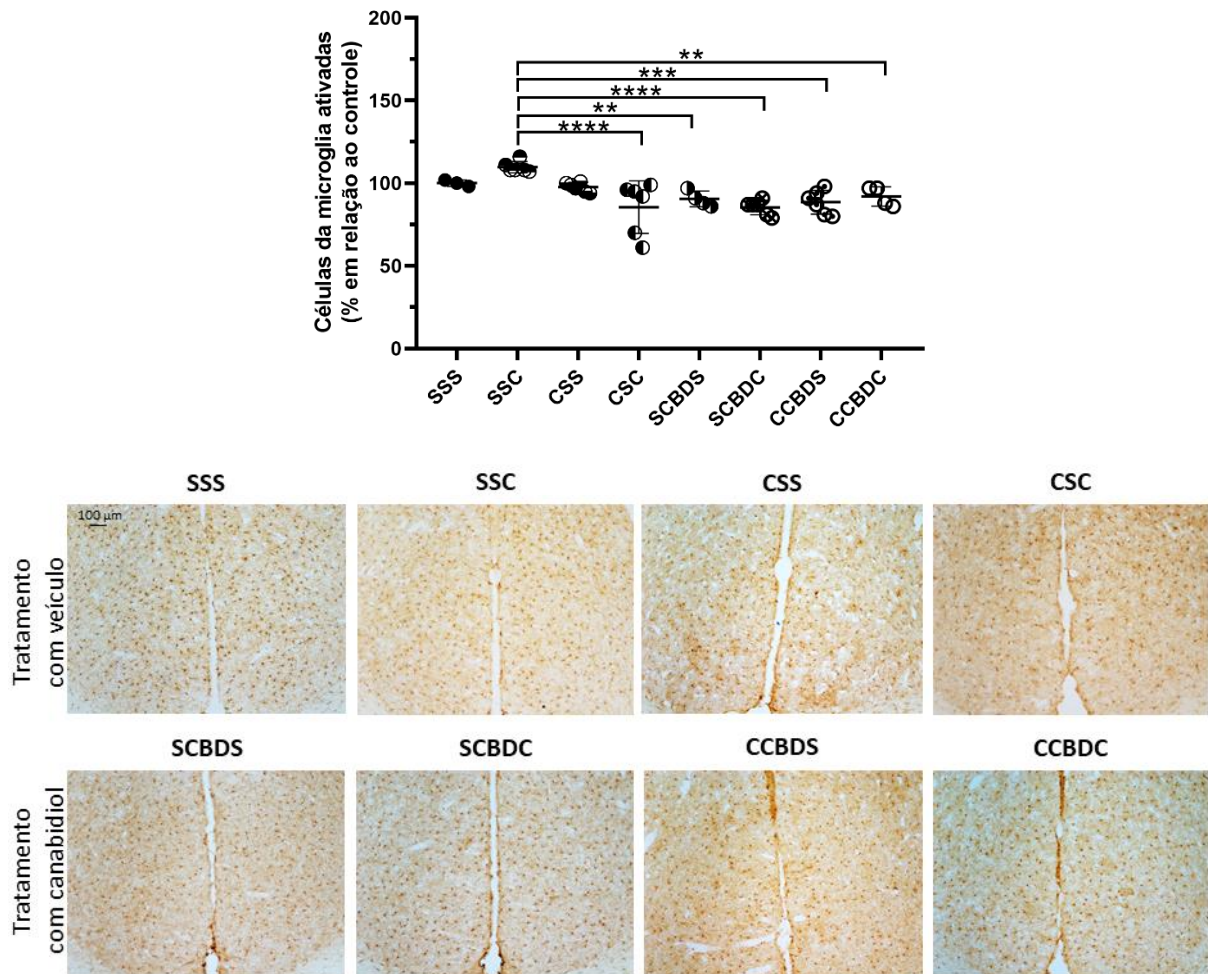


Imagens digitais de cortes coronais da amígdala marcados para Iba1. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 3-6). #p < 0,05 em relação ao controle; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

No córtex cingulado (Figura 59), a ANOVA também apresentou efeito significativo ( $F_{(7, 33)} = 6,90$ ,  $p < 0,0001$ ). Não houve alterações dos grupos em relação ao controle, conforme demonstrado pelo *post-hoc* de Bonferroni. Porém, o grupo que recebeu a administração aguda de cocaína (SSC), associou-se a um maior número de células da microglia expressando Iba1 quando comparado aos grupos que receberam CBD (SCBDS:  $p = 0,009$ ; SCBDC:  $p < 0,0001$ ; CCBDS:  $p = 0,0007$ ; CCBDC:  $p = 0,02$ ) e ao grupo sensibilizado e reexposto à cocaína (CSC,  $p < 0,0001$ ).



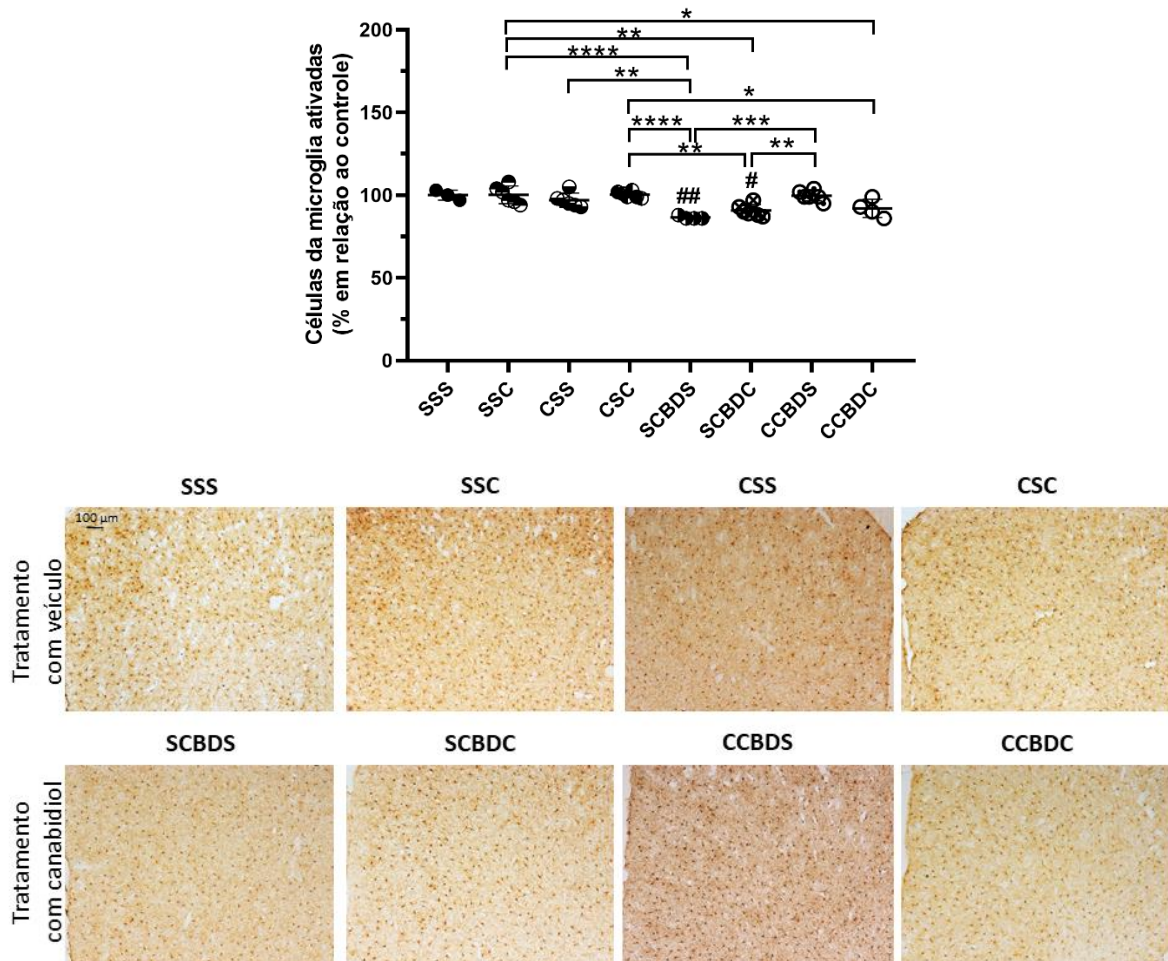
Figura 59: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de células da microglia ativadas no córtex cingulado.



Imagens digitais de cortes coronais do córtex cingulado marcados para Iba1. Bregma aproximado, +0,86 mm; interneural aproximado, +4,66 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 3-6). \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

No córtex pré-límbico (Figura 60), a ANOVA de uma via também apresentou efeito significativo ( $F_{(7, 33)} = 9,19$ ,  $p < 0,0001$ ). Quando apenas CBD foi administrado (grupo SCBDS) ou quando essa administração foi precedida pela administração aguda de cocaína (SCBDC), houve uma redução do número de células da microglia ativadas em relação ao controle ( $p = 0,014$  e  $p = 0,03$ , respectivamente) e em relação aos grupos que receberam cocaína no desafio (grupo SSC;  $p < 0,0001$  e  $p = 0,003$ , respectivamente), na sensibilização (grupo CSS;  $p = 0,004$  em relação a SCBDS), ou em ambos os momentos (grupo CSC;  $p < 0,0001$  e  $p = 0,003$ ). Essa redução também se fez presente em relação ao grupo sensibilizado com cocaína e tratado com CBD (grupo CCBDS:  $p = 0,0002$  e  $p = 0,006$ , respectivamente). Além disso, animais do grupo CCBDC apresentaram menor número de microglia ativada em relação ao grupo tratado com veículo (CSC,  $p = 0,037$ ) e ao grupo SSC ( $p = 0,043$ ).

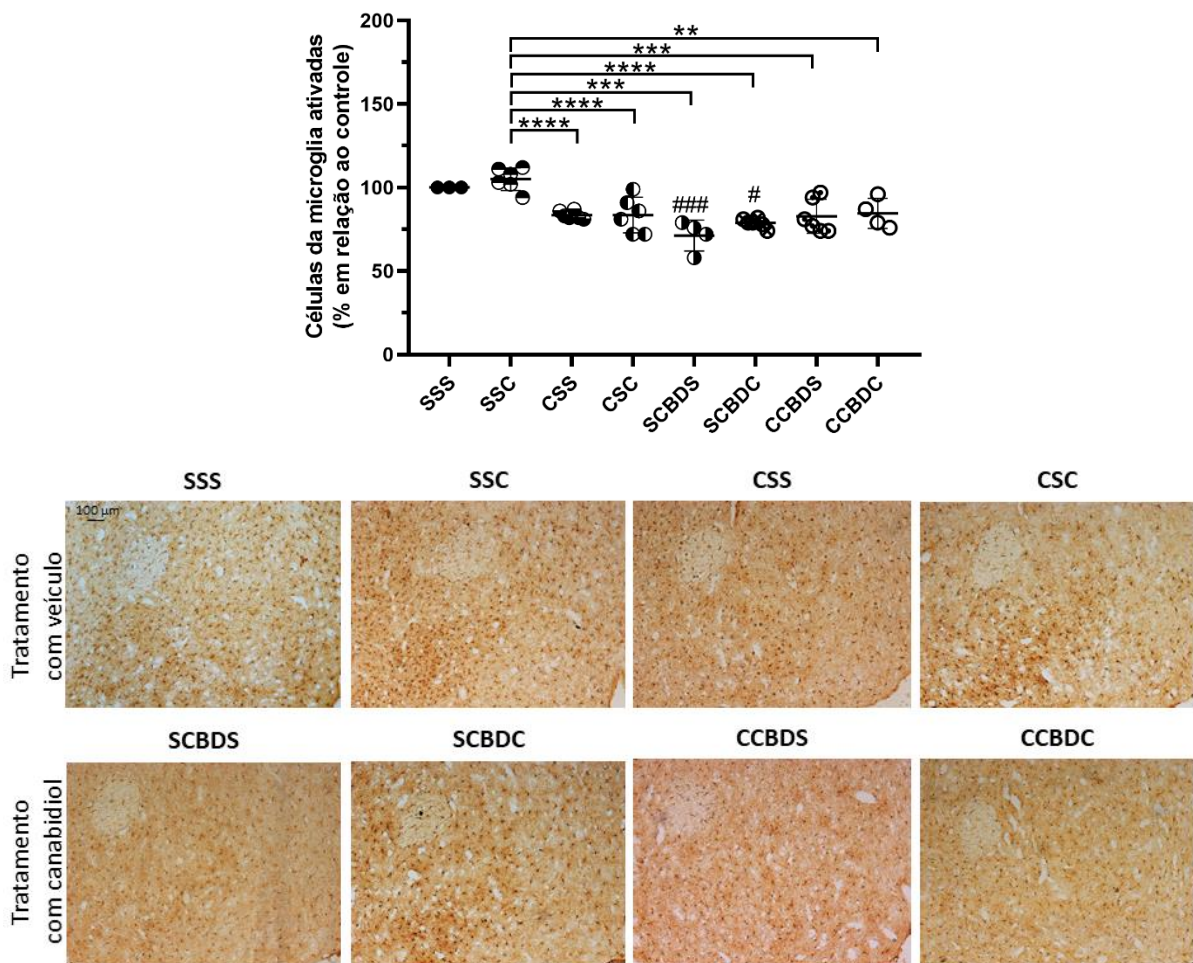
Figura 60: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de células da microglia ativadas no córtex pré-límbico.



Imagens digitais de cortes coronais do córtex pré-límbico marcados para Iba1. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 3-6). #p < 0,05, ##p < 0,01 em relação ao controle; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

No núcleo accumbens (Figura 61), o efeito da ANOVA de uma via foi significativo ( $F_{(7, 33)} = 10,18$ ,  $p < 0,0001$ ) e o *post-hoc* de Bonferroni verificou uma redução do número de células da microglia ativadas no grupo que recebeu apenas CBD (SCBDS,  $p = 0,0005$ ) e no grupo que recebeu CBD previamente à cocaína (SCBDC,  $p = 0,0081$ ), quando comparado ao controle. Além disso, observou-se que a administração aguda de cocaína gerou um aumento na ativação dessa população celular superior a todos os grupos com intervenção farmacológica (CSS e CSC:  $p = 0,0006$ ; CCBDS:  $p = 0,0004$ ; SCBDS e SCBDC:  $p < 0,0001$ ; CCBDC:  $p = 0,0042$ ).

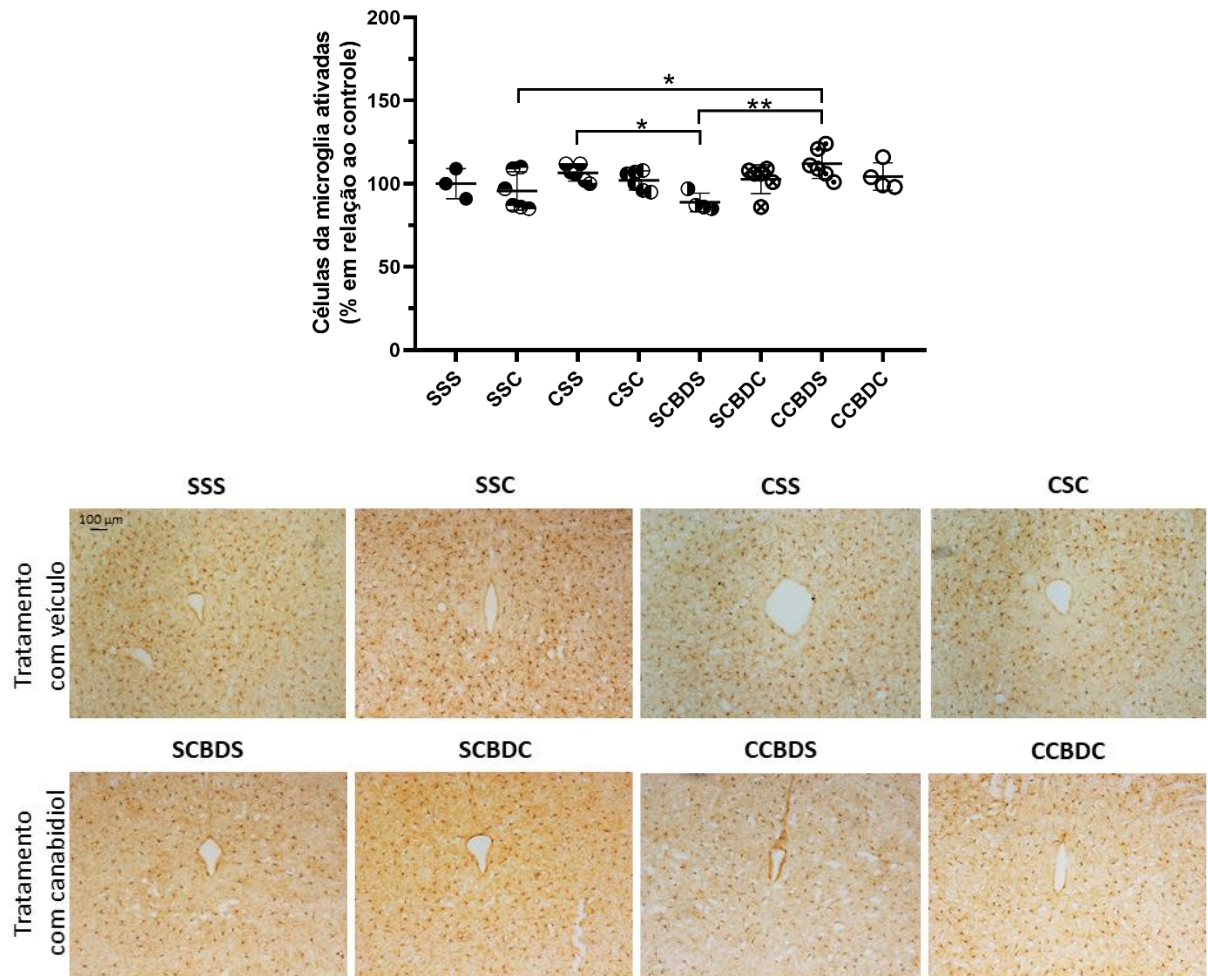
Figura 61: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de células da microglia ativadas no núcleo accumbens.



Imagens digitais de cortes coronais do núcleo accumbens marcados para Iba1. Bregma aproximado, +0,86 mm; interneuronal aproximado, +4,66 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 3-6). #p < 0,05, ###p < 0,001 em relação ao controle; \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

Na substância cinzenta periaquedutal (Figura 62), a ANOVA de uma via indicou um efeito significativo ( $F_{(7, 33)} = 3,68$ ,  $p = 0,0048$ ) e, apesar de não haver diferenças em relação ao grupo controle, o *post-hoc* de Bonferroni detectou algumas diferenças entre os grupos tratados. Observou-se que o grupo tratado apenas com CBD (SCBDC) apresentou menor número de células da microglia ativadas do que os animais que foram sensibilizados com cocaína e então tratados com CBD (grupo CCBDS,  $p = 0,002$ ) ou veículo (CSS,  $p = 0,035$ ). Além disso, os animais que receberam apenas uma injeção aguda de cocaína (SSC), expressaram menos células da microglia ativadas do que os animais do grupo CCBDS ( $p = 0,028$ ).

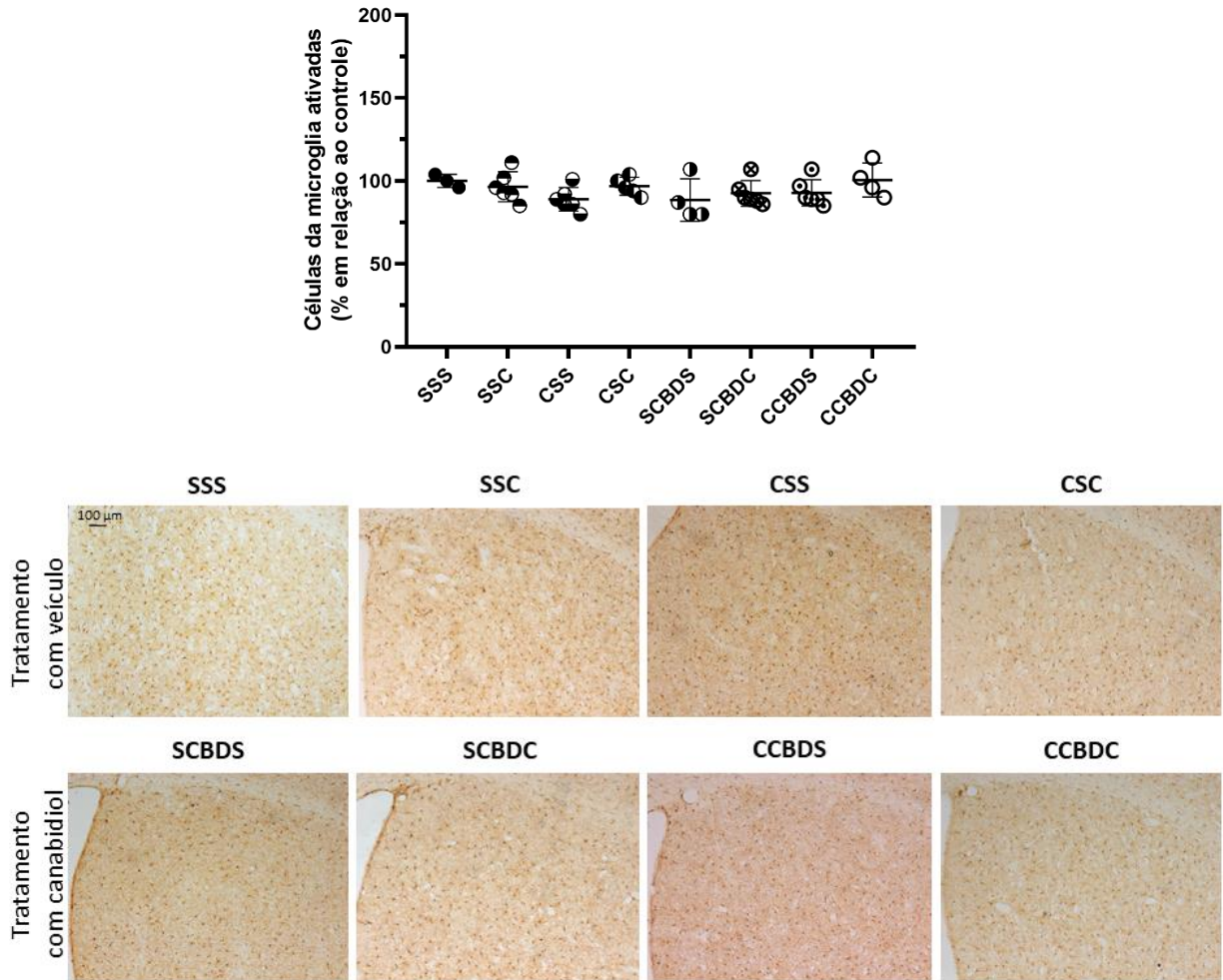
Figura 62: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de células da microglia ativadas na substância cinzenta periaquedutal.



Imagens digitais de cortes coronais da substância cinzenta periaquedutal marcados para Iba1. Bregma aproximado, -3,52 mm; interneural aproximado, +0,28 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 3-6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

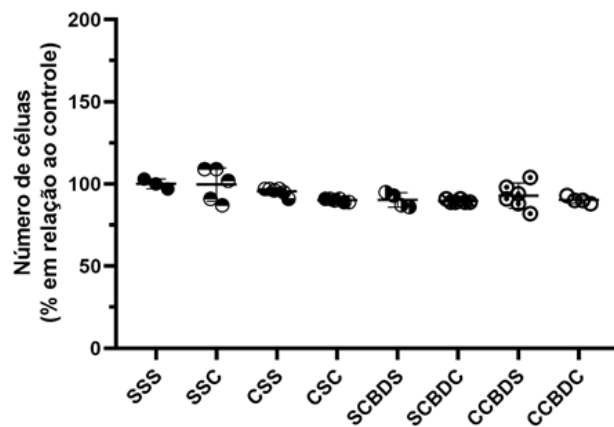
Em relação ao núcleo-caudado putâmen, não houve alterações significativas no número de células da microglia ativadas na porção dorsomedial ( $F_{(7, 32)} = 1,327$ ,  $p = 0,27$ , Figura 63) nem na porção dorsolateral ( $F_{(7, 33)} = 2,152$ ,  $p = 0,065$ , Figura 64).

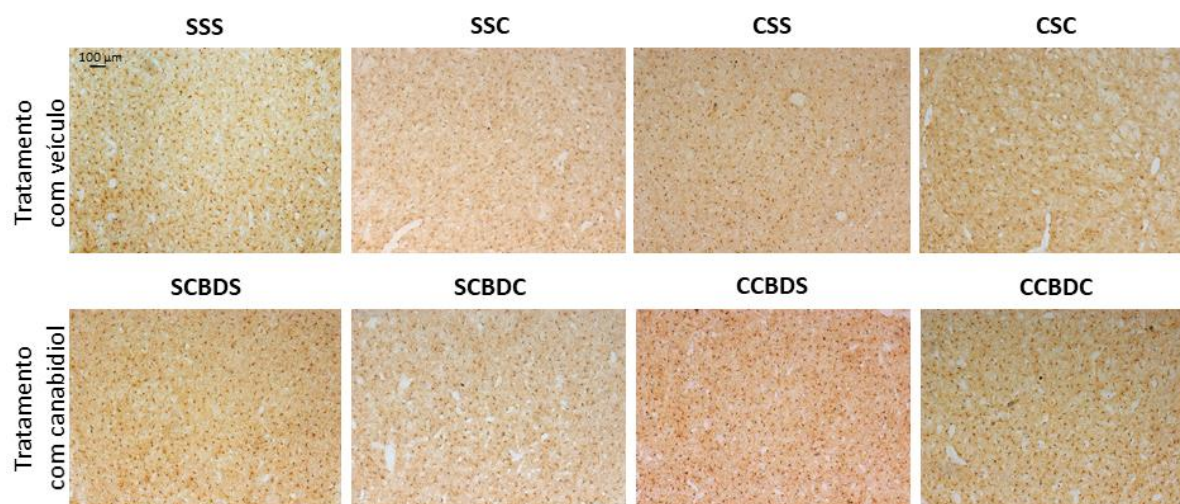
Figura 65: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de células da microglia ativadas no caudado-putâmen dorsomedial.



Imagens digitais de cortes coronais do caudado-putâmen dorsomedial marcados para Iba1. Bregma aproximado, +0,86 mm; interneural aproximado, +4,66 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 3-6).

Figura 64: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de células da microglia ativadas no caudo-putâmen dorsolateral.





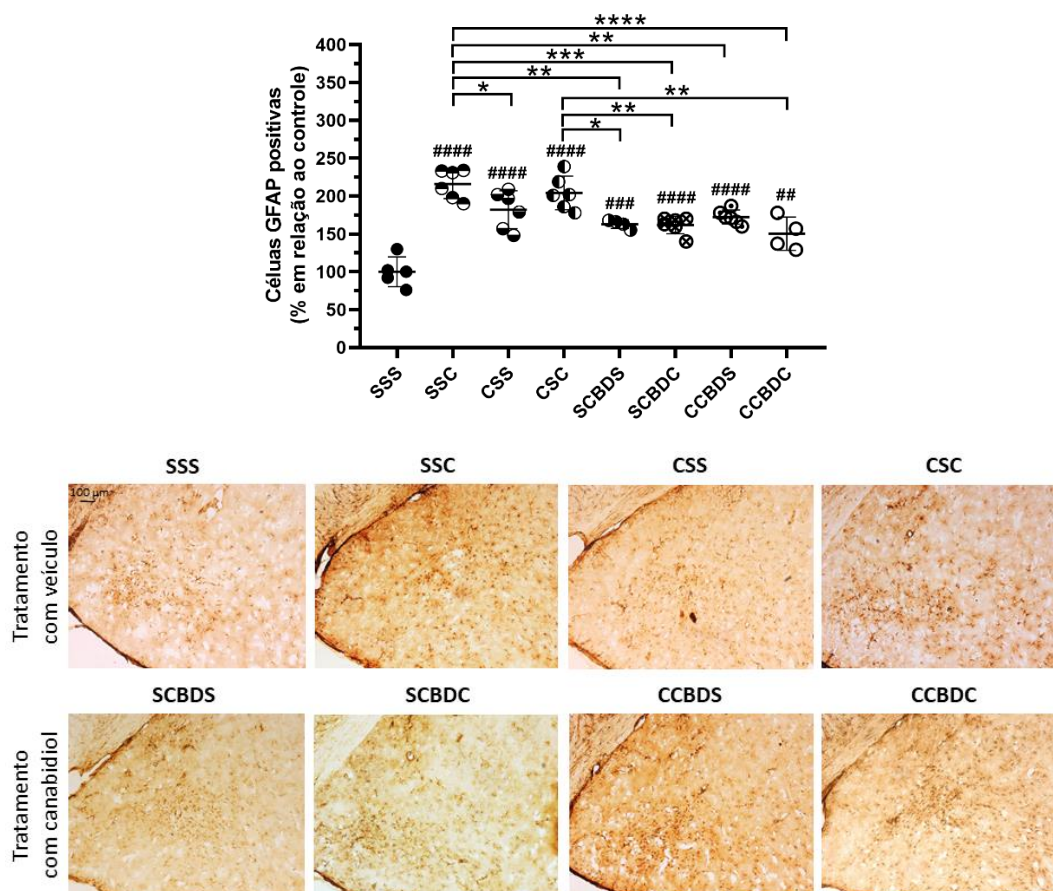
Imagens digitais de cortes coronais do caudado-putâmen ventro-lateral marcados para Iba1. Bregma aproximado, +0,86 mm; interneural aproximado, +4,66 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 3-6).

#### 7.2.2.5 GFAP

A análise de GFAP foi realizada apenas nas regiões de amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal, pois foram as únicas com células GFAP positivas dentre as regiões de interesse. Nas três regiões, a ANOVA de uma via apresentou efeito significativo, a saber: amígdala:  $F_{(7, 35)} = 20,23$ ,  $p < 0,0001$ ; substância cinzenta periaquedutal:  $F_{(7, 35)} = 5,65$ ,  $p = 0,0002$ ; hipocampo:  $F_{(7, 35)} = 7,00$ ,  $p < 0,0001$ ).

Na amígdala (Figura 65), o *post-hoc* de Bonferroni identificou que todos os grupos experimentais tratados apresentaram aumento do número de astrócitos GFAP positivos em relação ao grupo controle (grupos SSC, CSS, CSC, SCBDC e CCBDS:  $p < 0,0001$ ; grupo SCBDS:  $p = 0,0003$ ; grupo CCBDC:  $p = 0,005$ ). Contudo, a administração de CBD gerou não só um aumento de GFAP menos intenso do que a cocaína, como também reduziu a expressão de GFAP induzida por ela, visto que a exposição aguda à cocaína (grupo SSC) e a reexposição à droga após sensibilização (grupo CSC) geraram mais astrócitos GFAP positivos em relação aos quatro grupos que receberam CBD (grupo SCBDS:  $p = 0,0017$  em relação a SSC e  $p = 0,026$  em relação a CSC; grupo SCBDC:  $p = 0,0002$  em relação a SSC e  $p = 0,0062$  em relação a CSC; grupo CCBDS:  $p = 0,0016$  em relação a SSC; grupo CCBDC:  $p < 0,0001$  em relação a SSC e  $p = 0,0013$  em relação a CSC). Além disso, o grupo cocaína aguda (SSC) associou-se a um maior número de astrócitos GFAP positivos em relação ao grupo apenas sensibilizado com cocaína (CSS,  $p = 0,049$ ).

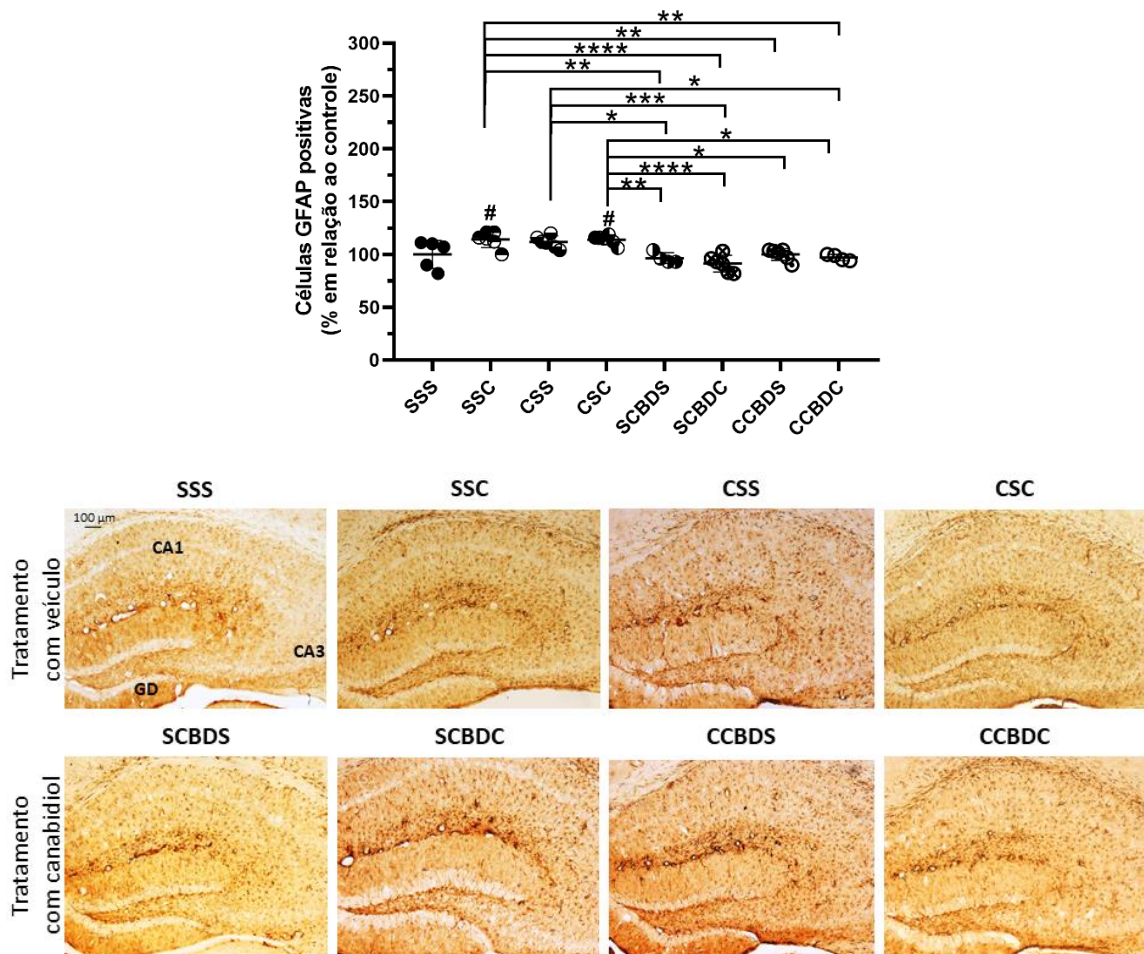
Figura 65: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de astrócitos GFAP positivos na amígdala.



Imagens digitais de cortes coronais da amígdala marcados para GFAP. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni ( $n = 4-6$ ). ### $p < 0,01$ , #### $p < 0,001$ , ##### $p < 0,0001$  em relação ao controle; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

No hipocampo (Figura 66) o *post-hoc* de Bonferroni mostrou que a exposição aguda à cocaína (grupo SSC) e a reexposição à droga após sensibilização (grupo CSC) promoveram aumento do número de GFAP positivos (respectivamente,  $p = 0,049$  e  $p = 0,044$ ). Contudo, quando houve o tratamento com CBD (grupos SCBDC e CCBDC), esse aumento não foi mais observado. De fato, a presença do CBD frente à administração de cocaína preveniu o aumento das células GFAP positivas, uma vez que os grupos SSC, CSS e CSC apresentaram maior número dessas células em relação aos grupos que tiveram a intervenção farmacológica apenas com CBD (grupo SCBDS:  $p = 0,013$  em relação a SSC;  $p = 0,048$  em relação a CSS,  $p = 0,014$  em relação a CSC) ou com CBD pré e/ou pós cocaína (grupo SCBDC:  $p < 0,0001$  em relação a SSC,  $p = 0,0006$  em relação a CSS,  $p = 0,0001$  em relação a CSC; grupo CCBDS:  $p = 0,034$  em relação a SSC,  $p = 0,038$  em relação a CSC; grupo CCBDC:  $p = 0,017$  em relação a SSC,  $p = 0,042$  em relação a CSS,  $p = 0,018$  em relação a CSC).

Figura 66: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de astrócitos GFAP positivos no hipocampo.

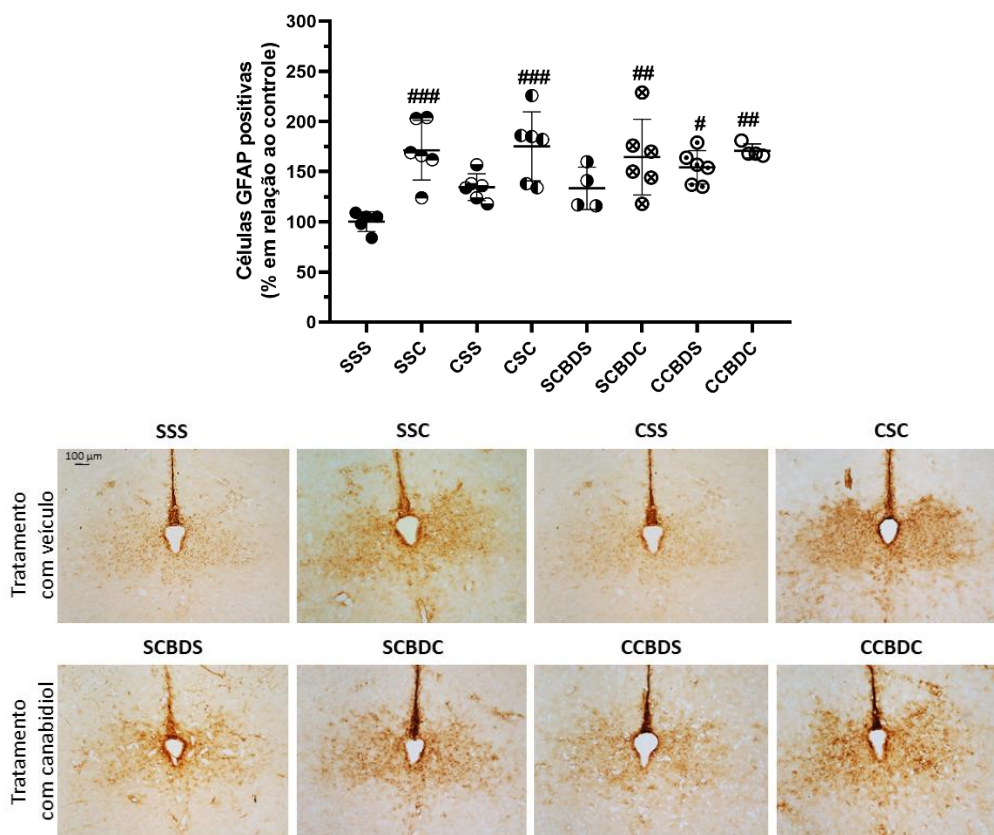


Imagens digitais de cortes coronais do hipocampo marcados para CB1. Bregma aproximado, -1,94 mm; interneural aproximado, +1,86 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 4-6). #p < 0,05, em relação ao controle; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

Por fim, na substância cinzenta periaquedutal (Figura 67), o *post-hoc* de Bonferroni indicou que, com exceção do grupo sensibilizado com cocaína (CSS) e do grupo que recebeu apenas CBD (SCBDS), os demais grupos apresentaram aumento da população de astrócitos GFAP positivos (SSC: p = 0,0009; CSC: p = 0,0004; SCBDC: p = 0,0032; CCBDS: p = 0,02; CCBDC: p = 0,0036).



Figura 67: Efeitos da cocaína, do CBD e da combinação de ambos no número de astrócitos GFAP positivos na substância cinzenta periaquedutal.



Imagens digitais de cortes coronais da substância cinzenta periaquedutal marcados para GFAP. Bregma aproximado, -3,52 mm; interneural aproximado, +0,28 mm. ANOVA de uma via e *post-hoc* de Bonferroni (n = 4-6). #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 em relação ao controle.

### 7.3. Discussão

No presente capítulo observou-se que o tratamento de oito dias com CBD (30 mg/kg) foi eficaz em atenuar ou inibir a manifestação do efeito da cocaína em animais previamente sensibilizados, bem como seu efeito agudo, no encéfalo total e na maior parte dos VOIs individualmente avaliados. Além disso, o CBD apresentou *per se* um efeito de aumento do metabolismo. Essas alterações foram acompanhadas por uma mudança no perfil celular encefálico, avaliado por meio da quantificação de neurônios, microglia ativada e astrócitos GFAP positivos, bem como na expressão do receptor CB1 e da enzima FAAH. Ainda, CBD e cocaína promoveram diferentes alterações região-específicas nestes marcadores avaliados, e interagiram de forma a gerar efeitos diversos.

Em relação à adicção, estudos em humanos mostram alteração de atividade relacionada ao metabolismo de glicose em regiões meso-estriato-corticais, límbicas e fronto-corticais, que refletem o desbalanço entre as redes neuronais que medeiam os processos neurobiológicos da doença (FOWLER et al., 2003; GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002; VOLKOW; BALER, 2014). Essas alterações são dinâmicas, variando conforme a situação em que o indivíduo se encontra: vigência da droga, abstinência aguda ou abstinência prolongada. Em modelo animal, estudos indicam que a administração aguda ou prolongada de cocaína em um modelo de sensibilização psicomotora, bem como a autoadministração da droga, aumenta a atividade metabólica, medida por PET com [<sup>18</sup>F]FDG (CANNELLA et al., 2017b; PORCHE'KIRKLAND et al., 2010; SPELTA et al., 2022). Foi observado em humanos que a administração aguda de cocaína aumenta o metabolismo de glicose nas regiões corticais pré-frontais envolvidas com mecanismos de atenção e expectativa de recompensas, bem como em regiões límbicas, como estriado, globo pálido, substância negra, e núcleo subtalâmico (LONDON et al., 1986). Os processos de propagação do potencial de ação, manutenção/alteração dos potenciais de membrana, reciclagem de vesículas e liberação de neurotransmissores relacionados à sinalização neuronal demandam grande quantidade de energia na forma de ATP, proveniente da oxidação da glicose (SHULMAN et al., 2004). Sendo a cocaína uma droga psicoestimulante, esses processos tendem a aumentar em relação ao nível basal, gerando o aumento de atividade.

Sabe-se que a atividade encefálica em indivíduos adictos na abstinência aguda de cocaína é superior à basal de indivíduos sem histórico de uso de substâncias e de adictos em abstinência prolongada (VOLKOW et al., 1991). Observa-se aumento de atividade em regiões corticais associadas à fissura, como o córtex orbitofrontal e em regiões dos núcleos da base, associadas aos mecanismos de recompensa, como o estriado ventral (GATLEY et al., 2005; HENRY et al., 2010; VOLKOW et al., 1991). Além disso, já está bem estabelecido que quanto maior a gravidade da adicção, menor a atividade cortical em abstinência prolongada (MORENO-LÓPEZ et al., 2012). Isso foi corroborado inclusive em modelo pré-clínico, de forma que animais considerados resilientes à adicção, apresentaram captação cortical de [<sup>18</sup>F]FDG superior da observada nos animais com fenótipo de adicção, refletindo em função inibitória cortical preservada e explicando o porquê da tal resiliência (CANNELLA et al., 2017).

De fato, a redução de atividade do córtex pré-frontal em adictos, é uma das marcas da doença, pois culmina na falha no controle inibitório e consequente manifestação do comportamento compulsivo (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2011; VOLKOW et al., 2011). Indivíduos nesta condição também expressam redução de atividade na ínsula, importante região para a interocepção, e no estriado, onde também há menor expressão de receptores dopaminérgicos (NICOLAS et al., 2017; VOLKOW et al., 1992). A redução dos receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> é um achado de neuroimagem comum em humanos com adicção à cocaína e persistente mesmo após meses de abstinência (CAPRIOLI et al., 2013). Em função dessas alterações, há diminuição da captação encefálica de [<sup>11</sup>C]cocaína, principalmente nas regiões de cerebelo, tálamo, córtex e gânglios da base (VOLKOW et al., 1996). Contudo, regiões encefálicas envolvidas com formação de hábitos, fissura, reatividade ao estresse e recaídas, como estriado dorsal, amígdala e hipotálamo apresentam aumento de atividade (LEE et al., 2013), o que reflete os sinais de ansiedade e estresse, reforçadores negativos para as recaídas. Em nosso estudo, observou-se que o CBD atenuou o efeito psicoestimulante da cocaína no metabolismo nessas regiões, inferindo-se que essa substância poderia auxiliar no período de abstinência, reduzindo os fatores reforçadores negativos que resultam no comportamento de busca pela droga, de forma a reduzir o potencial de recaída ao uso da droga.

As alterações de atividade correlacionadas às mudanças no metabolismo de glicose consequentes da adicção refletem em prejuízo cognitivo evidenciado no período de abstinência, um fenômeno associado ao fracasso durante os programas de tratamento para os transtornos por uso de substâncias. Estudos com primatas não humanos e roedores com histórico de autoadministração de cocaína mostraram que os animais apresentaram déficits cognitivos em testes de memória, aprendizado e função executiva, correlacionados às alterações na atividade nas regiões encefálicas relacionadas ao desempenho nos testes (GOULD; GAGE; NADER, 2012).

Neste sentido, considerando o aumento do metabolismo de glicose induzido pelo CBD neste estudo em regiões reconhecidamente afetadas pela abstinência de cocaína, e pelo seu perfil pró-neurogênico, sua utilização poderia ser uma estratégia para auxiliar indivíduos que estão passando pela desintoxicação, inclusive trazendo benefícios à função cognitiva. Dois recentes estudos clínicos randomizados (MENESES-GAYA et al., 2020; MONGEAU-PÉRUSSE et al., 2021) não observaram uma eficácia do CBD perante os desfechos referentes à cocaína, como fissura e

recaídas. Este dado contrasta com os dados pré-clínicos (discutidos no capítulo 5), estudos clínicos e relato de caso envolvendo diferentes drogas, como heroína (HURD et al., 2019), *cannabis* (CRIPPA et al., 2013; FREEMAN et al., 2020) e tabaco (MORGAN et al., 2013), os quais mostraram efeitos promissores do CBD no prolongamento da abstinência, por meio da redução da fissura e da ansiedade; ou na quantidade de substância administrada pelo usuário. Portanto, no que diz respeito à cocaína, o CBD poderia ser uma estratégia terapêutica adjuvante, porém é provável que não seria suficiente como agente terapêutico único.

O CBD surgiu como uma das principais ferramentas terapêuticas da atualidade frente aos transtornos por uso de substâncias. Apesar dos dados pré-clínicos demonstrarem que o CBD reduz as manifestações comportamentais e moleculares da plasticidade mal adaptativa induzida por diferentes classes de drogas de abuso, há pouco conhecimento acerca dos mecanismos neuronais que são elicitados pelo CBD em animais que receberam drogas de abuso. Acredita-se que o CBD poderia aliviar os efeitos da cocaína tanto por sua ação no sistema endocanabinoide, quanto pela interação com outros sistemas neurotransmissores, como serotoninérgico e glutamatérgico. Assim, o CBD exerceria sua ação por meio da normalização das alterações que a cocaína induz na sinalização dopaminérgica e pela modulação de distintas vias de transdução de sinais, além de reduzir a neuroinflamação e a toxicidade causadas pela cocaína (DALDEGAN-BUENO et al., 2021).

Existem evidências de que a manipulação do sistema endocanabinoide altera aspectos comportamentais e sinápticos em animais tratados com cocaína. O uso de agonista CB2 e antagonista CB1, reduziu a atividade neuronal no hipocampo (LOPES et al., 2020) e na porção de concha do NAc (GOBIRA et al., 2019), via redução da expressão de c-Fos. Esta menor ativação poderia contribuir para uma resposta metabólica inferior nas respectivas regiões, conforme observado nos animais dos grupos CCBDC e SCBDC, culminando em um prejuízo dos processos mnemônico associados às drogas.

As alterações na densidade do receptor CB1 obtidas neste estudo variaram conforme a região avaliada e o grupo experimental. No hipocampo, houve um aumento da marcação para CB1 nas porções CA1 e CA3 nos grupos que receberam apenas cocaína (SSC, CSS, CSC), apenas CBD (SCBDS) ou ambos (SCBDC, CCBDS, CCBDC). Contudo, enquanto na região CA3 o aumento foi semelhante entre todos os grupos tratados, em CA1, todos os quatro grupos que receberam CBD no

tratamento, apresentaram mais CB1 em relação aos animais sensibilizados com cocaína e tratados com veículo (grupos CSS e CSC). No giro denteado, por sua vez, detectou-se mais CB1 nos grupos sensibilizados com cocaína, sendo o tratamento com CBD após a sensibilização determinante para potencializar esse fenômeno. Esses vão ao encontro do achado de Lujan e colaboradores (2020), que detectaram aumento da expressão do gene codificador de CB1 no hipocampo. Esse fenômeno é interessante, uma vez que CB1 regula positivamente a neurogênese adulta nesta região e ativa a via de transdução de sinais MAPK-CREB, a qual contribui para proliferação celular e atividade do BDNF (MALLIPEDDI et al., 2017; ORTEGA-MARTÍNEZ, 2015; PRENDERVILLE; KELLY; DOWNER, 2015; ZHANG et al., 2016).

Além disso, no hipocampo, as alterações em CB1 foram acompanhadas por alterações em FAAH. Na região CA1, o CBD promoveu aumento da densidade da marcação, exceto quando houve sensibilização e reexposição à cocaína. Em CA3, por sua vez, o CBD também aumentou a densidade de marcação (grupos SCBDS e SCBDC) quando não houve prévia sensibilização à cocaína; e a sensibilização com reexposição à droga (grupo CSC) associou-se à redução de FAAH. Estes dados devem ser interpretados com cautela, uma vez que não foi realizada avaliação da atividade enzimática. Sabe-se que o CBD inibe a atividade de FAAH (DE PETROCELLIS et al., 2011), aumentando a atividade da AEA e, conseqüentemente, a ativação de CB1. Como observamos um aumento da densidade de CB1 no hipocampo, é provável que o aumento de FAAH seja uma resposta adaptativa para reduzir a atividade endocanabinoide, regulando o sistema neurotransmissor (MANNEKOTE THIPPAIAH; IYENGAR; VINOD, 2021). A redução da marcação de FAAH observada no grupo CSC é interessante porque já foi observado que a sensibilização comportamental e neuroquímica à cocaína é facilitada pelo bloqueio farmacológico de FAAH (MEREU et al., 2015), sugerindo que o CBD administrado em nosso experimento induziu alterações neuroquímicas que aumentaram a expressão da enzima e foram de encontro ao efeito da cocaína.

Na amígdala basolateral, por sua vez, todos os grupos também aumentaram a densidade da marcação para CB1 em relação ao controle, porém esse aumento foi superior nos animais que receberam apenas CBD ou então CBD procedido pela administração aguda de cocaína. Assim, quando houve sensibilização à cocaína previamente ao tratamento com CBD, o aumento de CB1 induzido pelo canabinoide foi menos intenso. A amígdala basolateral conecta-se com a via mesolímbica

dopaminérgica e apresenta papel fundamental para o comportamento de busca por recompensas, emoção e memórias associadas à recompensa. Neste sentido, essa região é fundamental para o restabelecimento do comportamento de busca à cocaína, desencadeado por associações ao contexto, bem como para a reconsolidação da memória contextual que regula o fenômeno de preferência condicionada por lugar, sendo a interação entre amígdala basolateral e hipocampo dorsal necessária para promover tal fenômeno (HIGGINBOTHAM et al., 2021a; WASSUM et al., 2012; WELLS et al., 2011). Estudos conduzidos por Higginbotham e colaboradores (2021a; 2021b) observaram que o bloqueio farmacológico de CB1 na amígdala basolateral durante a reconsolidação da memória contextual à cocaína reduziu o comportamento de busca pela droga.

No globo pálido apenas os animais que receberam cocaína em alguma etapa do protocolo apresentaram maior densidade de CB1, sendo a presença do CBD irrelevante nesse efeito. Por fim, na substância negra reticular, a administração apenas de CBD ou a combinação entre sensibilização à cocaína, tratamento com CBD e reexposição à cocaína (grupo CCBDC) reduziu a densidade de CB1. Este dado contrasta com os dados de dois estudos presentes na literatura, os quais quantificaram CB1 após 10 dias de abstinência à autoadministração de cocaína e em animais reexpostos à droga após esse período. No primeiro caso, obtiveram-se resultados opostos aos deste estudo, sendo uma redução da densidade do receptor no globo pálido e um aumento na substância negra reticular (BYSTROWSKA et al., 2018), enquanto o segundo não detectou alterações (BYSTROWSKA et al., 2019). É provável que os diferentes padrões de administração da droga sejam a causa das discrepâncias. As regiões de globo pálido e substância negra reticular são importantes para a neurobiologia da adicção pois compõem o circuito estriatal-palidal-talamocortical, a qual está envolvida no desenvolvimento do comportamento compulsivo (BELIN et al., 2013; SIVILS; WANG; CHU, 2021), sendo a modulação endocanabinoide importante para a regulação dos circuitos subtalâmicos (MORERA-HERRERAS et al., 2010). Neste sentido, o efeito final das alterações de CB1 nestas estruturas dependerá do balanço final entre os circuitos, podendo culminar em maior ou menor estimulação tálamo-cortical o que, conseqüentemente, afeta a ativação do córtex pré-frontal (VOLKOW; MORALES, 2015).

Um outro fator associado ao aumento da atividade encefálica induzida pelo CBD pode ser o aumento da população neuronal, detectado pela imunomarcagem com

NeuN. As células tronco neurais no encéfalo mamífero adulto são capazes de iniciar proliferação celular e induzir diferenciação neuronal ao longo da vida e isso é essencial para funções encefálicas elevadas, como processos cognitivos, humor, metabolismo e regulação do estresse (TAN et al., 2021). Apesar das regiões classicamente relacionadas à neurogênese serem as zonas subglandular do giro denteado e subventricular, são reconhecidas atualmente outras regiões pró-neurogênicas, como estriado, córtex, amígdala, substância negra e hipotálamo, nas quais os novos neurônios provêm de células progenitoras que migram da região subventricular ou de *pools* celulares locais (ERNST et al., 2014; EVANS et al., 2002; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2021; INTA et al., 2008; JHAVERI et al., 2018; JURKOWSKI et al., 2020; ZHAO et al., 2003).

O marcador NeuN emerge durante a embriogênese inicial de neuroblastos pós-mitóticos e permanece em neurônios em diferenciação e terminalmente diferenciados ao longo de toda a ontogenia subsequente (GUSEL'NIKOVA; KORZHEVSKIY, 2015). NeuN não é encontrado nas células progenitoras neurais imaturas, sendo sua expressão iniciada um dia após o final da fase de proliferação, quando as células saem do ciclo celular (KEMPERMANN, 2012; WOLF et al., 1996). Neste sentido, para afirmar se os aumentos da expressão de NeuN relacionados a este trabalho de fato associaram-se aos de neurogênese e proliferação celular, teria sido interessante a avaliação de marcadores presentes em células imaturas, como da proteína DCX, uma proteína associada aos microtúbulos expressa em neurônios em migração (AYANLAJA et al., 2017). Contudo, considerando o aumento neuronal concomitante ao aumento da densidade de CB1, é bastante provável que tal fenômeno tenha ocorrido.

O potencial neurogênico do CBD é bem reconhecido na literatura. Foi demonstrado *in vitro* que ele aumenta a neurogênese hipocampal adulta com envolvimento dos receptores endocanabinoides, mas não do receptor serotoninérgico 5HT<sub>1A</sub> (CAMPOS et al., 2013). Também observou-se que animais que receberam cocaína e foram tratados com CBD, apresentaram aumento da densidade do receptor CB1 no hipocampo, associada à diferenciação neuronal com o envolvimento da via de ativação de CREB/MAPK, e aumento da concentração de BDNF, sugerindo uma conexão entre a ativação de CB1 e o desenvolvimento da neurogênese hipocampal (LUJÁN et al., 2018). Ainda, foi mostrado que o tratamento com CBD também melhorou a proliferação celular e a neurogênese de animais em abstinência de

metanfetamina (RAZAVI et al., 2021). De fato, a importância dos mecanismos pró-neurogênicos associados ao CBD, em animais no contexto de administração de drogas foi confirmada por Luján e colaboradores (2020), uma vez que a redução farmacológica da neurogênese reduziu o papel protetor do canabinoide na autoadministração de cocaína.

Acredita-se que no giro denteado os neurônios jovens promovem o crescimento de árvores dendríticas, as quais recebem aferências do córtex entorrinal e modulam projeções axonais para a camada CA3, que projetam para as camadas CA1 e de subículo, alcançando o NAc e o córtex pré-frontal (KEMPERMANN, 2012). Assim, esses novos neurônios podem determinar mudanças na função da rede córtico-estriatal que sustenta o comportamento impulsivo e é crucial para o controle inibitório adaptativo, o qual é prejudicado em indivíduos adictos (EVERITT; ROBBINS, 2016). Logo, sugere-se que agentes pró-neurogênicos melhoram a função hipocampal e o controle da excitabilidade dopaminérgica da via mesolímbica, o que conseqüentemente afeta a coordenação da atividade fronto-estriatal. Ao encontro disso, um estudo clínico conduzido em indivíduos saudáveis observou, por ressonância magnética funcional, que o CBD aumenta a conectividade do circuito fronto-estriatal (GRIMM et al., 2018).

Os efeitos pró-neurogênicos do CBD focam-se primordialmente no estágio pós-mitótico da neurogênese, por facilitar a maturação neuronal e a sobrevivência das células regulando positivamente diferentes componentes moleculares das vias de transdução de sinais associadas à facilitação da neurogênese adulta, impulsionada pelo sistema endocanabinoide (CAMPOS et al., 2013). De fato, tratamentos subcrônicos com CBD associam-se à regulação positiva de moléculas importantes para a síntese proteica e sobrevivência celular no hipocampo, como BDNF, calbindina, proteína 2 associada aos microtúbulos (MAP-2), sinapsina 1 e a ativação de receptores PPAR $\gamma$ . (LUJÁN; VALVERDE, 2020).

Já é um consenso na literatura que a administração tanto aguda quanto crônica de cocaína afeta potencialmente a neurogênese hipocampal adulta, modulando os mecanismos neurobiológicos relacionados ao aprendizado (CASTILLA-ORTEGA et al., 2016). As aferências do nicho neurogênico localizado no giro denteado estão diretamente relacionadas aos processos de proliferação, sobrevivência e maturação desses novos neurônios. Entretanto, a cocaína altera os reguladores centrais deste fenômeno, desregulando sistemas neurotransmissores e neuromoduladores,



reduzindo fatores neurotróficos e aumentando fatores inflamatórios que podem ser sintetizados localmente e liberados no giro denteado, bem como as concentrações circulantes dos reguladores periféricos (neurotrofinas, glicocorticoides, fatores inflamatórios, endocanabinoides) que chegam à região através da corrente sanguínea (CHAMBERS, 2013; GUHA; HARRAZ; SNYDER, 2016; MCCARTHY et al., 2014). Essa desregulação está, inclusive, associada à vulnerabilidade para recaídas ao uso da droga durante a abstinência (DESCHAUX et al., 2014; NOONAN et al., 2010).

Neste sentido, os papéis pró-neurogênico e neuroprotetor do CBD são promissores, pois podem reverter ou conter estas alterações induzidas pela cocaína. Em nosso estudo, observamos que a administração de CBD aumentou o número de células marcadas com NeuN no hipocampo (regiões CA1, CA3 e giro denteado). Contudo, apenas em CA3 esse aumento ocorreu independentemente de os animais terem recebido cocaína na sensibilização e/ou no desafio, sugerindo que o CBD conteve o efeito deletério da cocaína. Nas regiões CA1 e no giro denteado, esse aumento não foi evidenciado quando o tratamento com CBD foi precedido e procedido pela administração da cocaína (grupo CCBDC). Ainda, no giro denteado houve uma diminuição do número de células nos animais que foram sensibilizados e desafiados com cocaína e tratados com veículo (CSC), ou seja, pode-se sugerir que o CBD apresentou um papel neuroprotetor nessa região.

O CBD *per se* também aumentou o número de neurônios na amígdala. Entretanto, na presença da cocaína, seja a administração na sensibilização, no desafio ou em ambas as situações, eliminou o efeito de aumento induzido pelo CBD. No contexto da adicção, a amígdala relaciona-se à regulação do humor e da reatividade ao estresse, sendo que o aumento da função do estresse nos circuitos motivacionais do estriado ventral e na amígdala estendida é um poderoso indutor de reforço negativo que contribui para o comportamento compulsivo de busca pela droga (KOOB; VOLKOW, 2016; CARDINAL et al., 2002). Isso associa-se à redução na função do componente dopaminérgico do sistema de recompensa e recrutamento de neurotransmissores de estresse encefálico, como fator liberador de corticotropina e dinorfina no neurocircuito da amígdala estendida, juntamente à desregulação das principais projeções aferentes do córtex pré-frontal para a amígdala estendida, com significativo envolvimento dos endocanabinoides e do glutamato (VANDERSCHUREN; EVERITT, 2005).

Outro aspecto celular avaliado foi a expressão de astrócitos GFAP positivos. Alterações quantitativas na expressão dessa proteína já foram observadas após administração de diferentes drogas de abuso, incluindo a cocaína. Após administração tanto aguda quanto crônica de droga, há significativo aumento da expressão de GFAP em diferentes regiões encefálicas, como córtex cerebral (YANG et al., 2016), estriado (BLANCO-CALVO et al., 2014), hipocampo (MAI et al., 2019), e giro denteado (FATTORE et al., 2002), associado inclusive a mudança na morfologia celular (FATTORE et al., 2002).

Dados quantitativos semelhantes foram obtidos por nosso estudo, quando animais foram expostos à cocaína agudamente ou após sensibilização e desafio com a droga, considerando o hipocampo como um todo, a substância cinzenta periaquedutal e a amígdala. O grupo que foi apenas sensibilizado com cocaína (CSS) não apresentou alteração em relação ao controle no hipocampo e na substância cinzenta periaquedutal, o que pode refletir os 10 dias de intervalo entre a última administração da cocaína e a eutanásia dos animais. De fato, Fattore e colaboradores (2002) também não viram alterações na expressão de GFAP após um período prolongado de abstinência (14 dias). Já na substância cinzenta periaquedutal, o grupo CSS permaneceu diferente do controle, indicando que nessa região mais tempo seria necessário para estabilizar a quantidade de GFAP.

Acredita-se que mecanismos intracelulares associados ao estresse de retículo endoplasmático com subsequente ativação das vias autofágicas, sejam o gatilho para o aumento da expressão de GFAP induzido pela cocaína, estando este aumento inclusive acompanhado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (PERIYASAMY; GUO; BUCH, 2016). A cocaína é, de fato, reconhecidamente neurotóxica e indutora de autofagia (GUHA; HARRAZ; SNYDER, 2016; MAI et al., 2019). O mecanismo subjacente a esses efeitos envolve a regulação positiva da expressão de GFAP mediada pela cocaína e envolve a ativação da sinalização de MAPKs com subsequente ativação do gene de resposta de crescimento precoce (Egr-1) e regulação transcricional de GFAP (YANG et al., 2016).

O tratamento feito com CBD em nosso estudo bloqueou o aumento de GFAP induzido pela cocaína no hipocampo e reduziu esse aumento na amígdala. Sabe-se que dentre as funções desempenhadas pelos astrócitos para manutenção da função encefálica está a neuroproteção, a qual também consiste em uma relevante ação do CBD. Portanto, sugere-se que o CBD protegeu o encéfalo dos efeitos tóxicos da

cocaína nessas regiões, não sendo necessário o recrutamento celular. Na substância cinzenta periaquedutal, por outro lado, o CBD foi ineficaz em inibir o aumento de GFAP induzido pela cocaína, já que o aumento gerado pela droga permaneceu independentemente de os animais terem recebido veículo ou CBD na etapa de abstinência e tratamento.

Estudos pré-clínicos sugerem que o CBD não induz astrogliose nem alteração na morfologia celular (LANDUCCI et al., 2022) e, ainda, reduz a superexpressão de GFAP em astrócitos, tanto *in vitro* (ESPOSITO et al., 2011) quanto *in vivo* (GOMES et al., 2015; PEREZ et al., 2013), corroborando nossos achados. Além disso, o CBD também reduz a liberação de IL-6, uma relevante citocina para a neuroinflamação, por astrócitos e células da microglia, consequente da administração prévia de LPS (WU et al., 2021). Neste sentido, destaca-se o potencial neuroprotetor deste composto, consequente de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (CAMPOS et al., 2017; CASSANO et al., 2020; MILANO; CAPASSO, 2018). Tais propriedades advêm não apenas de mecanismos neuronais, mas também da modulação da atividade das células da microglia (ativação, migração, proliferação e liberação de citocinas) e deriva da interação do canabinoide com seus distintos alvos moleculares (CUTANDO; MALDONADO; OZAITA, 2017). Dessa forma, a melhora no perfil neuroinflamatório induzida pelo CBD correlaciona-se diretamente com a melhora cognitiva (CHENG et al., 2014; WATT et al., 2020). Neste sentido, é bastante provável que esta modulação do CBD tenha sido um dos fatores que favoreceu a redução do metabolismo de glicose nos animais dos grupos SCBDC e CCBDC.

Em nosso estudo, a quantificação das células da microglia que expressam Iba1 sugere que o CBD apresentou um efeito geral de redução da ativação microglial, quando este foi a única substância administrada ao longo do protocolo (grupo SCBDS) ou quando foi procedido pela administração aguda da cocaína (grupo SCBDC), sugerindo um efeito neuroprotetor por parte do CBD. Contudo, como não foi realizada avaliação da morfologia celular, não é possível fazer suposições mais aprofundadas sobre o grau de ativação celular.

Nas regiões de córtex pré-límbico e NAc, o tratamento com CBD (grupos SCBDS e SCBDC) promoveu redução do número de células da microglia expressando Iba1 em relação ao controle, porém quando houve sensibilização prévia com cocaína, este efeito não foi verificado. Ainda, na substância cinzenta periaquedutal, quando

apenas CBD foi administrado, menos células da microglia ativadas foram detectadas em relação à quando houve sensibilização com cocaína.

Sabe-se que o tratamento com cocaína pode aumentar a marcação de Iba1 (BURKOVETSKAYA et al., 2020; COTTO et al., 2018; DA SILVA et al., 2021; MAI et al., 2019). Tanto a vigência quanto a abstinência à cocaína afetam a expressão de genes reguladores do funcionamento adequado das células da glia, demonstrando a importância destas células nas mudanças adaptativas as quais o cérebro está sujeito devido à exposição à droga (BURKOVETSKAYA et al., 2020). Por outro lado, os dados presentes na literatura acerca de estudos *in vivo* corroboram o potencial do CBD em reduzir a ativação das células da microglia (via redução do marcador Iba1), além de reduzir a liberação de marcadores pró-inflamatórios e aumentar a expressão de proteínas anti-inflamatórias pelas células de microglia (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2020; GOMES et al., 2015; HAYAKAWA et al., 2008; MARTÍN-MORENO et al., 2011; PEREZ et al., 2013; WU et al., 2021). Entretanto, a maquinaria intracelular relacionada a ação do CBD nas células da microglia e os mecanismos correlacionados ao efeito anti-inflamatório permanecem em investigação. Estudos *in vitro* revisados por KIM e colaboradores (2021) indicam que o efeito anti-inflamatório do CBD relaciona-se à via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) dependente de NADPH/ROS, reduzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias pela microglia. Este fenômeno, bem como o aumento da expressão de Iba1 induzido pelo CBD, relacionam-se ao receptor PPAR $\gamma$  (SONEGO et al., 2018).

Na amígdala, apenas o grupo CCBDC (sensibilizado com cocaína e reexposto a ela após o tratamento com CBD) apresentou aumento em relação ao controle. Neste sentido, é possível fazer três suposições: a sensibilização à cocaína pode aumentar o número de microglia ativada na amígdala; esse efeito é potencializado pelo CBD procedido por reexposição à cocaína; o CBD possui um papel protetor no aumento do número de células da microglia ativadas, induzido pelo efeito agudo da cocaína. No hipocampo, a administração de cocaína e CBD no protocolo longitudinal associou-se a uma maior quantidade de células do que quando apenas uma das substâncias foi administrada.

Neste sentido, pode haver algum mecanismo regulador de transcrição gênica comum entre CBD e cocaína ou alguma interação farmacodinâmica, de forma que o CBD aumente o efeito da droga na ativação microglial. Um estudo conduzido por Reid e Bornheim (2001) indicou que o pré-tratamento com CBD gerou aumento das

concentrações plasmática e encefálica de cocaína, bem como a ação farmacológica dela, refletida por aumento da atividade locomotora em campo aberto, sugerindo a existência de uma interação farmacocinética entre CBD e cocaína. Interessantemente, isso não aconteceu quando outras drogas, como morfina, metadona e *ecstasy*, sugerindo uma interação farmacocinética entre cocaína e CBD (REID; BORNHEIM, 2001). Os dados acerca de interações farmacocinéticas e, principalmente, farmacodinâmicas entre fármacos ou drogas de abuso e os canabinoides ainda são escassos, principalmente em relação ao CBD (LUCAS; GALETTIS; SCHNEIDER, 2018). Isso é muito relevante quando considerado o aumento do interesse medicinal destes compostos, sendo uma questão que requer aprofundamento científico via avaliações pré-clínicas para ser considerada também nas avaliações clínicas e tornar as prescrições mais seguras aos pacientes.

#### **7.4. Conclusão**

Os dados obtidos evidenciam que a cocaína (20 mg/kg) promove um aumento da atividade encefálica, seja após administração aguda ou após um protocolo de sensibilização psicomotora. Em ambos os casos, o tratamento de 8 dias com CBD (30 mg/kg) foi capaz de atenuar/inibir o aumento metabólico de glicose induzido pela cocaína no encéfalo total e na maior parte dos VOIs avaliados. Juntamente a isso, o CBD altera o padrão celular encefálico, quando avaliado o número de neurônios, de astrócitos GFAP positivos e células da microglia ativadas, bem como o padrão de expressão do receptor CB1 e da enzima endocanabinoide FAAH.

## *Capítulo 8 - Considerações finais*

## **CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O conjunto de evidências fornecidos por este trabalho permite sugerir que o CBD apresentou efeito pró-neurogênico e neuroprotetor perante a administração de cocaína, de forma a alterar o padrão de atividade encefálica induzida pela droga tanto após aplicação aguda quanto após um protocolo de sensibilização psicomotora. Considerando a natureza pré-clínica deste estudo, concluímos que o CBD pode ser uma estratégia terapêutica adjuvante interessante para intervenção na adicção à cocaína e é base para novos estudos nessa área, a fim de confirmar os mecanismos moleculares associados a essas alterações, bem como verificar a reação neurobiológica à administração de CBD em humanos adictos à cocaína.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, Y. U. et al. Isoflurane anesthesia inhibits clozapine- and risperidone-induced dopamine release and anesthesia-induced changes in dopamine metabolism was modified by fluoxetine in the rat striatum: An in vivo microdialysis study. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 3, p. 384–391, 2008.

ADAMCZYK, P. et al. The effects of fatty acid amide hydrolase inhibitors on maintenance of cocaine and food self-administration and on reinstatement of cocaine-seeking and food-taking behavior in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 119–125, 2009.

AL TABAA, Y.; BAILLY, C.; KANOUN, S. Fdg-pet/ct in lymphoma: Where do we go now? **Cancers**, v. 13, n. 20, 2021.

ALLAIN, F. et al. How fast and how often: The pharmacokinetics of drug use are decisive in addiction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 56, p. 166–179, 2015.

American Psychiatric Association. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders** (5th ed.), 2013.

<https://doi-org.ezproxy.frederick.edu/10.1176/appi.books.9780890425596>.

ANDERSON, S. M.; PIERCE, R. C. T. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: Implications for reinforcement and reinstatement. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 106, p. 389–403, 2005.

ARACIL-FERNÁNDEZ, A. et al. Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 7, p. 1749–1763, 2012.

ARAQUE, A. et al. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 13–24, 2017.

AYANLAJA, A. A. et al. Distinct features of doublecortin as a marker of neuronal migration and its implications in cancer cell mobility. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. June, p. 1–13, 2017.

BADIANI, A. Substance-specific environmental influences on drug use and drug preference in animals and humans. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 4, p. 588–596, 2013.

BADIANI, A.; ROBINSON, T. E. Drug-induced neurobehavioral plasticity: The role of environmental context. **Behavioural Pharmacology**, v. 15, n. 5–6, p. 327–339, 2004.

BAR-SHALOM, R. Muscle Uptake of 18-Fluorine Fluorodeoxyglucose. **Seminars in nuclear medicine**, n. 4, p. 306–309, 2000.

BARRINGTON, S. F.; MAISEY, M. N. Skeletal Muscle Uptake of Fluorine-18-FDG: Effect of Oral Diazepam. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 37, p. 1127–1129, 1996.



BASCUÑANA, P. et al. Anesthesia and Preconditioning Induced Changes in Mouse Brain [18F] FDG Uptake and Kinetics. **Molecular Imaging and Biology**, v. 21, n. 6, p. 1089–1096, 2019.

BASTOS, F. I. P. M. et al. **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira - Sumário Executivo**. [s.l: s.n.].

BASU, S. et al. Fundamentals of PET and PET/CT imaging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1228, n. 1, p. 1–18, 2011.

BASU, S. et al. The basic principles of FDG-PET/CT imaging. **PET Clinics**, v. 9, n. 4, p. 355–370, 2014.

BATTISTA, N. et al. The endocannabinoid system: An overview. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, n. FEBRUARY 2012, p. 1–7, 2012.

BECHARA, A. et al. A Neurobehavioral Approach to Addiction: Implications for the Opioid Epidemic and the Psychology of Addiction. **Psychological Science in the Public Interest**, v. 20, n. 2, p. 96–127, 2019.

BELIN, D. et al. Addiction : failure of control over maladaptive incentive habits. **Current Opinion in Neurobiology**, p. 1–9, 2013.

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

BÉNARD, G. et al. Mitochondrial CB 1 receptors regulate neuronal energy metabolism. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 558–564, 2012.

BERRIDGE, K. C. Is Addiction a Brain Disease? **Neuroethics**, v. 10, n. 1, p. 29–33, 2017.

BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Pleasure Systems in the Brain. **Neuron**, v. 86, n. 3, p. 646–664, 2015.

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

BERTI, V.; MOSCONI, L.; PUPI, A. Brain: Normal variations and benign findings in fluorodeoxyglucose-PET/ computed tomography imaging. **PET Clinics**, v. 9, n. 2, p. 129–140, 2014.

BIONDICH, A. S.; JOSLIN, J. D. Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. **Emergency Medicine International**, v. 2016, n. April, 2016.

BISOGNO, T. et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845–852, 2001.

BLANCO-CALVO, E. et al. 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. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 7, n. JAN, p. 1–13, 2014.

BOGHDADI, M. S.; HENNING, R. J. Cocaine: Pathophysiology and clinical toxicology. **Heart & Lung**, v. 26, n. 6, p. 466–483, nov. 1997.

BOLSONI, L. M. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol depends on the nature of the trauma when patients with post-traumatic stress disorder recall their trigger event. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 44, n. 3, p. 298–307, 2022.

BOSSERT, J. M. et al. The reinstatement model of drug relapse: Recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. **Psychopharmacology**, v. 229, n. 3, p. 453–476, 2013.

BRANDT, L. et al. Pharmacotherapeutic strategies for treating cocaine use disorder — what do we have to offer? **Addiction**, v. 116, n. 4, p. 1–17, 2020.

BRODNIK, Z. D.; ESPAÑA, R. A. Dopamine uptake dynamics are preserved under isoflurane anesthesia. **Neuroscience Letters**, v. 606, p. 129–134, 2015.

BURKOVETSKAYA, M. E. et al. Cocaine self-administration differentially activates microglia in the mouse brain. **Neuroscience Letters**, v. 728, n. April, p. 134951, 2020.

BURSTEIN, S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: A review of their effects on inflammation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1377–1385, 2015.

BYSTROWSKA, B. et al. Effects of Cocaine Self-Administration and Its Extinction on the Rat Brain Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. **Neurotoxicity Research**, v. 34, n. 3, p. 547–558, 2018.

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

CABRAL, G. A.; FERREIRA, G. A.; JAMERSON, M. J. Endocannabinoids and the Immune System in Health and Disease. In: PERTWEE, R. G. (Ed.). **Endocannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l: s.n.]. p. 187–207.

CAMARINI, R. et al. Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity and extracellular dopamine and glutamate levels in nucleus accumbens of DBA/2J mice. **Brain Research**, v. 1193, p. 34–42, 2008.

CAMARINI, R.; PAUTASSI, R. M. Behavioral sensitization to ethanol: Neural basis and factors that influence its acquisition and expression. **Brain Research Bulletin**, 2016.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1607, p. 3364–3378, 2012.

CAMPOS, A. C. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice

depends on hippocampal neurogenesis : involvement of the endocannabinoid system. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 1407–1419, 2013.

CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 119–127, 2016.

CAMPOS, A. C. et al. Plastic and neuroprotective mechanisms involved in the therapeutic effects of cannabidiol in psychiatric disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. MAY, 2017.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 2, p. 223–230, 2008.

CANNELLA, N. et al. [18F]-Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in rats with prolonged cocaine self-administration suggests potential brain biomarkers for addictive behavior. **Frontiers in Psychiatry**, v. 8, n. NOV, p. 1–14, 2017a.

CANNELLA, N. et al. [18F]-Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in rats with prolonged cocaine self-administration suggests potential brain biomarkers for addictive behavior. **Frontiers in Psychiatry**, v. 8, n. NOV, p. 1–14, 2017b.

CAPRIOLI, D. et al. Translating positron emission tomography studies in animals to stimulant addiction: Promises and pitfalls. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 4, p. 597–606, 2013.

CARDINAL, R. N. et al. Emotion and motivation: The role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 3, p. 321–352, 2002.

CARRARA-NASCIMENTO, P. F.; OLIVE, M. F.; CAMARINI, R. Ethanol pre-exposure during adolescence or adulthood increases ethanol intake but ethanol-induced conditioned place preference is enhanced only when pre-exposure occurs in adolescence. **Developmental Psychobiology**, v. 56, n. 1, p. 36–48, 2014.

CASSANO, T. et al. From Cannabis sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. March, p. 1–10, 2020.

CASTILLA-ORTEGA, E. et al. A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult hippocampal neurogenesis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 66, p. 15–32, 2016.

CELADA, P.; VICTORIA PUIG, M.; ARTIGAS, F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 7, n. APR 2013, p. 1–20, 2013.

CHAMBERS, R. A. Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 130, n. 1–3, p. 1–12, 2013.

CHAUVET, C. et al. Chronic stimulation of the tone of endogenous anandamide

reduces cue- and stress-induced relapse in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1–5, 2015.

CHEN, J. C.; CHEN, P. C.; CHIANG, Y. C. Molecular mechanisms of psychostimulant addiction. **Chang Gung Medical Journal**, v. 32, n. 2, p. 148–154, 2009.

CHENG, D. et al. **Chronic cannabidiol treatment improves social and object recognition in double transgenic APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 mice** *Psychopharmacology*, 2014.

CHIUEH, C. C.; KOPIN, I. Centrally mediated release by cocaine of endogenous epinephrine and norepinephrine from the sympathoadrenal medullary system of unanesthetized rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 205, p. 148–154, 1978.

CONE, E. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 459–478, 1995.

CORBILLÉ, A. G. et al. Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 6937–6947, 2007.

COTTO, B. et al. Cocaine-mediated activation of microglia and microglial MeCP2 and BDNF production. **Neurobiology of Disease**, v. 117, n. May, p. 28–41, 2018.

CRAVATT, B. F. et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9371–9376, 2001.

CRIPPA, J. A. S. et al. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: A preliminary report. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 121–130, 2011.

CRIPPA, J. A. S. et al. Cannabidiol for the treatment of cannabis withdrawal syndrome: A case report. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 38, n. 2, p. 162–164, 2013.

CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 9–29, 2020.

CUNHA, J. M. et al. **Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients** *Pharmacology*, 1980.

CUTANDO, L.; MALDONADO, R.; OZAITA, A. Microglial Activation and Cannabis Exposure. In: **Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment**. 1st. ed. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 401–412.

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

11, n. 1, p. 1–15, 2021.

DALDEGAN-BUENO, D. et al. Co-exposure of cocaine and cannabinoids and its association with select biological, behavioural and health outcomes: A systematic scoping review of multi-disciplinary studies. **European Neuropsychopharmacology**, v. 51, p. 106–131, 2021.

DE CARVALHO, C. R.; TAKAHASHI, R. N. **Cannabidiol disrupts the reconsolidation of contextual drug-associated memories in Wistar rats** *Addiction Biology*, 2017.

DE PETROCELLIS, L. et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1479–1494, 2011.

DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca<sup>2+</sup> signalling. **Cell Calcium**, v. 45, n. 6, p. 611–624, 2009.

DE SOUZA CRIPPA, J. A. et al. Effects of Cannabidiol (CBD) on Regional Cerebral Blood Flow. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 417–426, 2004.

DEIANA, S. et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV),  $\Delta$  9-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behav. **Psychopharmacology**, v. 219, n. 3, p. 859–873, 2012.

DEROCHE-GAMONET, V.; PIAZZA, P. V. Psychobiology of cocaine addiction: Contribution of a multi-symptomatic animal model of loss of control. **Neuropharmacology**, v. 76, n. PART B, p. 437–449, 2014.

DESCHAUX, O. et al. Hippocampal neurogenesis protects against cocaine-primed relapse. **Addiction Biology**, v. 19, n. 4, p. 562–574, 2014.

DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605–613, 1988.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 1992.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 14, p. 5274–5278, 1988.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 5, p. 438–455, 2008.

DI MARZO, V.; PISCITELLI, F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 692–698, 2015.

DIDONE, V. et al. Differential effects of context on psychomotor sensitization to ethanol and cocaine. **Behavioural Pharmacology**, v. 27, n. 2–3, p. 173–181, 2016.

DOS-SANTOS-PEREIRA, M. et al. Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF- $\kappa$ B-dependent signaling and glucose consumption. *Glia*, v. 68, p. 561–573, 2020.

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

DU, C. et al. Differential Effects of Anesthetics on Cocaine's Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects in Brain. *European Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 8, p. 1565–1575, 2009.

ERNST, A. et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, v. 156, n. 5, p. 1072–1083, 2014.

ERSCHE, K. D. et al. Response perseveration in stimulant dependence is associated with striatal dysfunction and can be ameliorated by a D 2/3 receptor agonist. *Biological Psychiatry*, v. 70, n. 8, p. 754–762, 2011a.

ERSCHE, K. D. et al. Abnormal structure of frontostriatal brain systems is associated with aspects of impulsivity and compulsivity in cocaine dependence. *Brain*, v. 134, n. 7, p. 2013–2024, 2011b.

ERSCHE, K. D. et al. Cognitive dysfunction and anxious-impulsive personality traits are endophenotypes for drug dependence. *American Journal of Psychiatry*, v. 169, n. 9, p. 926–936, 2012a.

ERSCHE, K. D. et al. Abnormal brain structure implicated in stimulant drug addiction. *Science*, v. 335, n. 6068, p. 601–604, 2012b.

ERSCHE, K. D. et al. Distinctive personality traits and neural correlates associated with stimulant drug use versus familial risk of stimulant dependence. *Biological Psychiatry*, v. 74, n. 2, p. 137–144, 2013.

ESPOSITO, G. et al. **Cannabidiol reduces A $\beta$ -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR $\gamma$  involvement** *PLoS ONE*, 2011.

EVANS, A. H. et al. Compulsive Drug Use Linked to Sensitized Ventral Striatal Dopamine Transmission. *Annals of Neurology*, v. 59, p. 852–858, 2006.

EVANS, J. et al. Characterization of mitotic neurons derived from adult rat hypothalamus and brain stem. *Journal of Neurophysiology*, v. 87, n. 2, p. 1076–1085, 2002.

EVERITT, B. J.; GIULIANO, C.; BELIN, D. Addictive behaviour in experimental animals: Prospects for translation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 373, n. 1742, 2018.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Drug addiction: Updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annual Review of Psychology*, v. 67, p. 23–50, 2016.

FARRAR, H. C.; KEARNS, G. L. Cocaine: Clinical pharmacology and toxicology. *The*

**Journal of Pediatrics**, v. 115, n. 5 PART 1, p. 665–675, 1989.

FATTORE, L. et al. Astroglial in vivo response to cocaine in mouse dentate gyrus: a quantitative and qualitative analysis by confocal microscopy. **Science**, v. 110, n. 1, p. 1–6, 2002.

FILEV, R. et al. THC inhibits the expression of ethanol-induced locomotor sensitization in mice. **Alcohol**, v. 65, p. 31–35, 2017.

FOGAÇA, M. V. et al. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 22–33, 2018.

FOURGEAUD, L. et al. A single In Vivo exposure to cocaine abolishes endocannabinoid-mediated long-term depression in the nucleus accumbens. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 31, p. 6939–6945, 2004.

FOWLER, J. S. et al. PET Imaging Studies in Drug Abuse Research. In: **Angewandte Chemie International Edition**, 6(11), 951–952. [s.l.: s.n.]. v. 1p. 1–30.

FOWLER, J. S. et al. [11]Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 28, n. 5, p. 561–572, 2001.

FOWLER, J. S. et al. PET imaging studies in drug abuse research. In: **Handbook of radiopharmaceuticals, radiochemistry and applications**. [s.l.: s.n.]. v. 30p. 791.

FOWLER, J. S.; VOLKOW, N. D. PET imaging studies in drug abuse. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v. 36, n. 3, p. 163–174, 1998.

FRANCO, V.; BIALER, M.; PERUCCA, E. Cannabidiol in the treatment of epilepsy: Current evidence and perspectives for further research. **Neuropharmacology**, v. 185, n. October 2020, 2021.

FRANKS, N. P. General anaesthesia: From molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 370–386, 2008.

FREEMAN, T. P. et al. Cannabidiol for the treatment of cannabis use disorder: a phase 2a, double-blind, placebo-controlled, randomised, adaptive Bayesian trial. **The Lancet Psychiatry**, v. 7, n. 10, p. 865–874, 2020.

FUEGER, B. J. et al. Impact of Animal Handling on the Results of 18 F-FDG PET Studies in Mice. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 47, p. 999–1006, 2006.

GALAJ, E. et al. Cannabidiol attenuates the rewarding effects of cocaine in rats by CB2, 5-HT1A and TRPV1 receptor mechanisms. **Neuropharmacology**, v. 167, p. 107740, 2020.

GALAJ, E.; XI, Z. X. Possible receptor mechanisms underlying cannabidiol effects on addictive-like behaviors in experimental animals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2021.

GARCÍA-GONZÁLEZ, D. et al. Neurogenesis of medium spiny neurons in the nucleus accumbens continues into adulthood and is enhanced by pathological pain. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 9, p. 4616–4632, 2021.

GASPARYAN, A. et al. Cannabidiol Modulates Behavioural and Gene Expression Alterations Induced by Spontaneous Cocaine Withdrawal. **Neurotherapeutics**, v. 18, n. 1, p. 615–623, 2021.

GASTON, T. E.; FRIEDMAN, D. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 70, p. 313–318, 2017.

GATLEY, S. et al. PET Imaging in Clinical Drug Abuse Research. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 25, p. 3203–3219, 2005.

GAY, G. R. et al. Cocaine: History, epidemiology, human pharmacology, and treatment. A perspective on a new debut for an old girl. **Clinical Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 149–178, 1975.

GERDEMAN, G. L.; SCHECHTER, J. B.; FRENCH, E. D. Context-specific reversal of cocaine sensitization by the CB1 cannabinoid receptor antagonist rimonabant. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 11, p. 2747–2759, 2008.

GILLIS, R. A. et al. Sympathetic nervous system mediated cardiovascular effects of cocaine are primarily due to a peripheral site of action of the drug. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 37, n. 3, p. 217–230, 1995.

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

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

GOLDSTEIN, R. A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A. M. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity-A Review. **Disease-a-Month**, v. 55, n. 1, p. 6–38, 2009.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: Neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 10, p. 1642–1652, 2002.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 652–669, 2011.

GOMES, F. V. et al. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. **Schizophrenia Research**, v. 164, n. 1–3, p. 155–163, 2015.

GONZALES, K. K.; SMITH, Y. Striatal Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1349, n. 1, p. 1–45, 2015.



GONZALEZ-CUEVAS, G. et al. Unique treatment potential of cannabidiol for the prevention of relapse to drug use: preclinical proof of principle. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 10, p. 2036–2045, 2018.

GOULD, R. W.; GAGE, H. D.; NADER, M. A. Effects of chronic cocaine self-administration on cognition and cerebral glucose utilization in rhesus monkeys. **Biological Psychiatry Psychiatry**, v. 72, n. 10, p. 856–863, 2012.

GRIMM, O. et al. Probing the endocannabinoid system in healthy volunteers: Cannabidiol alters fronto-striatal resting-state connectivity. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 7, p. 841–849, 2018.

GRINSPOON, L.; BAKALAR, J. B. Coca and cocaine as medicines: An historical review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, n. 2–3, p. 149–159, 1981.

GROTENHERMEN, F. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids**. [s.l: s.n.]. v. 42

GUHA, P.; HARRAZ, M. M.; SNYDER, S. H. Cocaine elicits autophagic cytotoxicity via a nitric oxide-GAPDH signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 5, p. 1417–1422, 2016.

GUNDUZ-CINAR, O. et al. Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and. **Molecular Psychiatry**, n. December 2011, 2012.

GUSEL'NIKOVA, V. V.; KORZHEVSKIY, D. E. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. **Acta Naturae**, v. 7, n. 2, p. 42–47, 2015.

GUTIERREZ-BARRAGAN, D. et al. Unique spatiotemporal fMRI dynamics in the awake mouse brain. **Current Biology**, v. 32, n. 3, p. 631- 644.e6, 2022.

HAY, G. L. et al. Cannabidiol treatment reduces the motivation to self-administer methamphetamine and methamphetamine-primed relapse in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 32, n. 12, p. 1369–1378, 2018.

HAYAKAWA, K. et al. Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1280–1286, 2008.

HEIFETS, B. D.; CASTILLO, P. E. Endocannabinoid Signaling and Long-term Synaptic Plasticity. **Annual Review of Physiology**, v. 71, p. 283–306, 2009.

HESS, S.; HØILUND-CARLSEN, P. F.; ALAVI, A. Historic images in nuclear medicine 1976: The first issue of clinical nuclear medicine and the first human FDG study. **Clinical Nuclear Medicine**, v. 39, n. 8, p. 701–703, 2014.

HIGGINBOTHAM, J. A. et al. CB1 Receptor Signaling Modulates Amygdalar Plasticity during Context-Cocaine Memory Reconsolidation to Promote Subsequent Cocaine Seeking. **The Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 4, p. 613–629, 2021.

HILL, A. J. et al. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders.

**Pharmacology and Therapeutics**, v. 133, n. 1, p. 79–97, 2012.

HILLARD, C. J. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 61, n. 1–2, p. 3–18, 2000.

HU, S. S.-J.; MACKIE, K. Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. In: PERTWEE, R. G. (Ed.). **Endocannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2015. p. 61–85.

HUDSON, R. et al. **Cannabidiol counteracts the psychotropic side-effects of  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol in the ventral hippocampus through bidirectional control of erk1-2 phosphorylation** *Journal of Neuroscience*, 2019.

HUESTIS, M. A. Human cannabinoid pharmacokinetics. **Chemistry and Biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1770–1804, 2007.

HURD, Y. L. et al. Cannabidiol for the reduction of cue-induced craving and anxiety in drug-abstinent individuals with heroin use disorder: A double-blind randomized placebo-controlled trial. **American Journal of Psychiatry**, v. 176, n. 11, p. 911–922, 2019.

HUTCHINS, G. D. et al. Small animal PET imaging. **ILAR Journal**, v. 53, n. 1, p. 54–65, 2012.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. **Annual Review of Neuroscience**, v. 29, p. 565–598, 2006.

IBSEN, M. S.; CONNOR, M.; GLASS, M. Cannabinoid CB 1 and CB 2 Receptor Signaling and Bias. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 2, n. 1, p. 48–60, 2017.

IGNATOWSKA-JANKOWSKA, B. M. et al. The cannabinoid CB2 receptor is necessary for nicotine-conditioned place preference, but not other behavioral effects of nicotine in mice. **Psychopharmacology**, v. 229, n. 4, p. 591–601, 2013.

INTA, D. et al. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 52, p. 20994–20999, 2008.

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). **Findings from the Global Burden of Disease Study 2017**. Seattle, WA: IHME, 2018.

JAHREIS, I. et al. Choice of anesthesia and data analysis method strongly increases sensitivity of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET imaging during experimental epileptogenesis. **PLoS ONE**, v. 16, n. 11 November, p. 1–20, 2021.

JENNINGS, J. H. et al. Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 224–228, 2013.

JHAVERI, D. J. et al. Evidence for newly generated interneurons in the basolateral amygdala of adult mice. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 3, p. 521–532, 2018.

JIANG, S. Z. et al. Cocaine-dependent acquisition of locomotor sensitization and conditioned place preference requires D1 dopaminergic signaling through a cyclic AMP, NCS-rapegef2, ERK, and Egr-1/Zif268 pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 4, p. 711–725, 2021.

JURKOWSKI, M. P. et al. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, n. September, p. 1–36, 2020.

KALIVAS, P. W. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 8, p. 561–572, 2009.

KAMPMAN, K. M. The treatment of cocaine use disorder. **Science Advances**, v. 5, n. 10, p. 1–9, 2019.

KATHMANN, M. et al. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 372, n. 5, p. 354–361, 2006.

KATSIDONI, V.; ANAGNOSTOU, I.; PANAGIS, G. **Cannabidiol inhibits the reward-facilitating effect of morphine: Involvement of 5-HT1A receptors in the dorsal raphe nucleus** *Addiction Biology*, 2013.

KEMPERMANN, G. New neurons for “survival of the fittest”. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, p. 727–736, 2012.

KIM, J. et al. In vitro studies on therapeutic effects of cannabidiol in neural cells: Neurons, glia, and neural stem cells. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 1–33, 2021.

KOISTINEN, H. A.; ZIERATH, J. R. Regulation of glucose transport in human skeletal muscle Regulation of glucose transport in human skeletal. **Annals of Medicine**, v. 34, p. 410–418, 2002.

KOOB, G. F. Neural Mechanisms of Drug Reinforcement. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 654, n. 1, p. 171–191, 1992.

KOOB, G. F. et al. Addiction as a Stress Surfeit Disorder. **Neuropharmacology**, v. 76, n. 00, p. 1–30, 2015.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Psychostimulants. In: **Neurobiology of addiction**. [s.l.: s.n.]. p. 119.

KOOB, G. F.; MOAL, M. LE. Plasticity of reward neurocircuitry and the ‘ dark side ’ of drug addiction. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 1442–1444, 2005.

KOOB, G. F.; MOAL, M. LE. Addiction and the Brain Antireward System. **The Annual Review of Psychology**, v. 59, p. 29–53, 2008.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction.

**Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. **The Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 8, p. 760–773, 2016.

KOPPEL, B. S. et al. Systematic review: Efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 82, n. 17, p. 1556–1563, 2014.

LANDUCCI, E. et al. **Neuronal and Astrocytic Morphological Alterations Driven by Prolonged Exposure with  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol but Not Cannabidiol** **Toxics**, 2022.

LAUN, A. S. et al. GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 300–308, 2019.

LE FOLL, B.; GORELICK, D. A.; GOLDBERG, S. R. The future of endocannabinoid-oriented clinical research after CB 1 antagonists. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 1, p. 171–174, 2009.

LE MOAL, M.; KOOB, G. F. Drug addiction: Pathways to the disease and pathophysiological perspectives. **European N**, v. 17, p. 377–393, 2007.

LEE, B. R. et al. Maturation of silent synapses in amygdala-accumbens projection contributes to incubation of cocaine craving. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 1644–1651, 2013.

LEE, J. L. C. et al. Cannabidiol regulation of emotion and emotional memory processing: relevance for treating anxiety-related and substance abuse disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 19, p. 3242–3256, 2017.

LEWEKE, F. M. et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. January, 2012.

LI, X. et al. Attenuation of basal and cocaine-enhanced locomotion and nucleus accumbens dopamine in cannabinoid CB1-receptor- knockout mice. **Pharmacology (Berl)**, v. 204, n. 1, p. 1–11, 2009.

LICHTMAN, A. H. et al. Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: Evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 2, p. 441–448, 2004.

LIGRESTI, A.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. From phytocannabinoids to cannabinoid receptors and endocannabinoids: Pleiotropic physiological and pathological roles through complex pharmacology. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1593–1659, 2016.

LISBOA, S. F. et al. Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. JAN, 2016.

LIU, J. et al. Intense FDG uptake in the muscles due to severe vomiting. **Clinical Nuclear Medicine**, v. 43, n. 10, p. e363–e365, 2018.

LOESSNER, A. et al. Regional cerebral function determined by FDG-PET in healthy volunteers: Normal patterns and changes with age. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 36, n. 7, p. 1141–1149, 1995.

LONDON, E. D. et al. Effects of l-cocaine on local cerebral glucose utilization in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 68, n. 1, p. 73–78, 1986.

LONDON, E. D. et al. Cocaine-Induced Reduplication of Glucose Utilization in Human Brain: A Study Using Positron Emission Tomography and [Fluorine 18]-Fluorodeoxyglucose. **Archives of General Psychiatry**, v. 47, n. 6, p. 567–574, 1990.

LOPES, J. B. et al. The roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 2, p. 385–394, 2020.

LU, H. C.; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607–615, 2021.

LUCAS, C. J.; GALETTIS, P.; SCHNEIDER, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 2477–2482, 2018.

LUJÁN, M. Á. et al. Repeated Cannabidiol treatment reduces cocaine intake and modulates neural proliferation and CB1R expression in the mouse hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 143, n. June, p. 163–175, 2018.

LUJÁN, M. Á.; CANTACORPS, L.; VALVERDE, O. The pharmacological reduction of hippocampal neurogenesis attenuates the protective effects of cannabidiol on cocaine voluntary intake. **Addiction Biology**, v. 25, n. 4, p. 1–12, 2020.

LUJÁN, M.; VALVERDE, O. The Pro-neurogenic Effects of Cannabidiol and Its Potential Therapeutic Implications in Psychiatric Disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, n. June, p. 1–11, 2020.

MACHADO BERGAMASCHI, M. et al. Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. **Current Drug Safety**, v. 6, n. 4, p. 237–249, 2011.

MACKIE, K.; DEVANE, W. A.; HILLE, B. Anandamide, an endogenous as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. **ASPET Molecular Pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 498–503, 1993.

MAHMUD, A. et al. Effects of an acute cannabidiol treatment on cocaine self-administration and cue-induced cocaine seeking in male rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 1, p. 96–104, 2017.

MAI, H. N. et al. Astrocytic mobilization of glutathione peroxidase-1 contributes to the protective potential against cocaine kindling behaviors in mice via activation of JAK2/STAT3 signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 131, n. September

2018, p. 408–431, 2019.

MALDONADO, R.; ROBLEDO, P.; BERRENDERO, F. Endocannabinoid system and drug addiction: New insights from mutant mice approaches. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 4, p. 480–486, 2013.

MALLIPEDDI, S. et al. Functional selectivity at G-protein coupled receptors: Advancing cannabinoid receptors as drug targets. **Biochemical Pharmacology**, v. 128, p. 1–11, 2017.

MANNEKOTE THIPPAIAH, S.; IYENGAR, S. S.; VINOD, K. Y. Exo- and Endo-cannabinoids in Depressive and Suicidal Behaviors. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, n. April, p. 1–10, 2021.

MARINHO, A. L. Z. et al. Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: Contribution of 5HT1A receptors and stressful experiences. **Behavioural Brain Research**, v. 286, p. 49–56, 2015.

MARINHO, E. A. V. et al. Post-sensitization treatment with rimonabant blocks the expression of cocaine-induced behavioral sensitization and c-Fos protein in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 156, n. August 2016, p. 16–23, 2017.

MARKOS, J. R. et al. Effects of Cannabidiol on Morphine Conditioned Place Preference in Mice. **Planta Medica**, v. 84, n. 4, p. 221–224, 2018.

MARSICANO, G.; LUTZ, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 4213–4225, 1999.

MARTÍN-MORENO, A. M. et al. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: Relevance to alzheimer's disease. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 964–973, 2011.

MARTÍNEZ-PINILLA, E. et al. Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. OCT, p. 1–10, 2017.

MCCARTHY, D. M. et al. **Effects of prenatal exposure to cocaine on brain structure and function**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 211

MECHA, M. et al. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: A role for A2A receptors. **Neurobiology of Disease**, v. 59, p. 141–150, 2013.

MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual Review of Psychology**, v. 64, p. 21–47, 2013.

MENERET, P. et al. Intense Increased 18F-FDG Uptake of Masticator Muscles after Cocaine Use. **Clinical Nuclear Medicine**, v. 45, n. 11, p. 919–920, 2020.

MENESES-GAYA, C. DE et al. Cannabidiol for the treatment of crack-cocaine craving: an exploratory double-blind study. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 00, n. 00, p. 1–10, 2020.

MEREU, M. et al. Cocaine-induced endocannabinoid release modulates behavioral and neurochemical sensitization in mice. **Addiction Biology**, v. 20, n. 1, p. 91–103, 2015.

MILANO, W.; CAPASSO, A. Neuroprotection by Cannabinoids in Neurodegenerative Diseases. **Alzheimer's, Dementia & Cognitive Neurology**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2018.

MILLAR, S. A. et al. A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, 2018.

MIZUMA, H. et al. Establishment of in vivo brain imaging method in conscious mice. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1068–1075, 2010.

MONGEAU-PÉRUSSE, V. et al. Cannabidiol as a treatment for craving and relapse in individuals with cocaine use disorder: a randomized placebo-controlled trial. **Addiction**, v. 116, n. 9, p. 2431–2442, 2021.

MONTGOMERY, A. J. et al. The effect of nicotine on striatal dopamine release in man: A [<sup>11</sup>C]raclopride PET study. **Synapse**, v. 61, n. 8, p. 637–645, 2007.

MORENO-LÓPEZ, L. et al. Neural correlates of the severity of cocaine, heroin, alcohol, MDMA and cannabis use in polysubstance abusers: A resting-PET brain metabolism study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

MORERA-HERRERAS, T. et al. Regulation of subthalamic neuron activity by endocannabinoids. **Synapse**, v. 64, n. 9, p. 682–698, 2010.

MORGAN, C. J. A. et al. Cannabidiol reduces cigarette consumption in tobacco smokers: Preliminary findings. **Addictive Behaviors**, v. 38, n. 9, p. 2433–2436, 2013.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

NADER, M. A. et al. PET imaging of dopamine D2 receptors with [<sup>18</sup>F]fluorocleobopride in monkeys: Effects of isoflurane- and ketamine-induced anesthesia. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 589–596, 1999.

NAVARRETE, F. et al. Role of Cannabidiol in the Therapeutic Intervention for Substance Use Disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. May, p. 1–24, 2021.

NAVARRETE, F.; ARACIL-FERNÁNDEZ, A.; MANZANARES, J. Cannabidiol regulates behavioural alterations and gene expression changes induced by spontaneous cannabinoid withdrawal. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 13, p. 2676–2688, 2018.

NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. **Neuron**, v. 57, n. 6, p. 883–893, 2008.

NESTLER, E. J. Epigenetic mechanisms of drug addiction. **Neuropharmacology**, v. 76, n. PART B, p. 259–268, 2014.

NESTLER, E. J.; LÜSCHER, C. The Molecular Basis of Drug Addiction: Linking Epigenetic to Synaptic and Circuit Mechanisms. **Neuron**, v. 102, n. 1, p. 48–59, 2019.

NICOLAS, C. et al. Longitudinal changes in brain metabolic activity after withdrawal from escalation of cocaine self-administration. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 10, p. 1981–1990, 2017.

NOONAN, M. A. et al. Reduction of adult hippocampal neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 304–315, 2010.

NORRIS, C. et al. Cannabidiol modulates fear memory formation through interactions with serotonergic transmission in the mesolimbic system. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 12, p. 2839–2850, 2016.

OLIVEIRA-LIMA, A. J. et al. Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. **Physiology and Behavior**, v. 142, p. 28–36, 2015.

OLIVEIRA, H. P. et al. The route of administration exacerbates prefrontal functional impairments in crack cocaine users. **Psychology of Addictive Behaviors**, v. 32, n. 7, p. 812–820, 2018.

OLMO, I. G.; FERREIRA-VIEIRA, T. H.; RIBEIRO, F. M. Dissecting the signaling pathways involved in the crosstalk between metabotropic glutamate 5 and cannabinoid type 1 receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 5, p. 609–619, 2016.

OPACKA-JUFFRY, J.; AHIER, R. G.; CREMER, J. E. Nomifensine-induced increased in extracellular striatal dopamine is enhanced by isoflurane anaesthesia. **Synapse**, v. 7, p. 169–171, 1991.

ORI, C. et al. Effects of isoflurane anesthesia on local cerebral glucose utilization in the rat. **Anesthesiology**, v. 65, p. 152–156, 1986.

ORTEGA-MARTÍNEZ, S. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. AUGUST, p. 1–12, 2015.

PACHER, P.; MECHOULAM, R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 2, p. 193–211, 2011.

PANAGIS, G.; MACKEY, B.; VLACHOU, S. Cannabinoid Regulation of Brain Reward Processing with an Emphasis on the Role of CB1 Receptors: A Step Back into the Future. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, n. July, p. 1–20, 2014.

PANDOLFO, P. et al. Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and



dopamine in the rat and mouse striatum. **European Journal of Pharmacology**, v. 655, n. 1–3, p. 38–45, 2011.

PARK, Y. D. et al. Long-term efficacy and safety of cannabidiol (CBD) in children with treatment-resistant epilepsy: Results from a state-based expanded access program. **Epilepsy and Behavior**, v. 112, p. 107474, 2020.

PARKER, L. A. et al. **Effect of low doses of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats** **Psychopharmacology**, 2004.

PARSONS, L. H.; HURD, Y. L. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 579–594, 2015.

PARVAZ, M. A. et al. Neuroimaging for drug addiction and related behaviors. **Bone**, v. 22, n. 6, p. 609–624, 2011.

PEÑA, I. DELA; GEVORKIANA, R.; SHI, W.-X. Psychostimulants affect dopamine transmission through both dopamine transporter-dependent and independent mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 764, p. 562–570, 2015.

PEREZ, M. et al. Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 10, p. 3424–3434, 2013.

PERIYASAMY, P.; GUO, M. L.; BUCH, S. Cocaine induces astrocytosis through ER stress-mediated activation of autophagy. **Autophagy**, v. 12, n. 8, p. 1310–1329, 2016.

PETERSON, T. E.; MANNING, H. C. Molecular imaging: 18F-FDG PET and a whole lot more. **Journal of Nuclear Medicine Technology**, v. 37, n. 3, p. 151–161, 2009.

PHILLIPS, T. J. et al. **Animal Models of Behavioral Analysis**. [s.l: s.n.]. v. 50

PONTIERI, F. E. et al. Functional correlates of repeated administration of cocaine and apomorphine in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 284, n. 1–2, p. 205–209, 1995.

PORCHE'KIRKLAND, H. et al. Acute Brain Metabolic Effects of Cocaine in Rhesus Monkeys with a History of Cocaine Use. **Brain Imaging Behavioral**, v. 4, n. 3–4, p. 212–219, 2010.

PORRINO, L. J. Functional consequences of acute cocaine treatment depend on route of administration. **Psychopharmacology** 112, 343-51, 1993.

PORRINO, L. J., DOMER, F. R., CRANE, A. M., SOKOLOFF, L. Selective alterations in cerebral metabolism within the mesocorticolimbic dopaminergic system produced by acute cocaine administration in rats. **Neuropsychopharmacology** 1(2), 109-18, 1988. [https://doi.org/10.1016/0893-133x\(88\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0893-133x(88)90002-4).

PRANDO, S. et al. Effects of ketamine/xylazine and isoflurane on rat brain glucose metabolism measured by 18 F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. **European Journal of Neuroscience**, v. 49, n. 1, p. 51–61, 2019.

PRENDERVILLE, J. A.; KELLY, Á. M.; DOWNER, E. J. The role of cannabinoids in adult neurogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 16, p. 3950–3963, 2015.

PRIETO, E. et al. Statistical parametric maps of 18F-FDG PET and 3-D autoradiography in the rat brain: A cross-validation study. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 38, n. 12, p. 2228–2237, 2011.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

QIN, N. et al. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 24, p. 6231–6238, 2008.

RAHMAN, W. T. et al. The impact of infection and inflammation in oncologic 18F-FDG PET/CT imaging. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 117, n. May, p. 109168, 2019.

RANJBAR-SLAMLOO, Y.; FAZLALI, Z. Dopamine and Noradrenaline in the Brain; Overlapping or Dissociate Functions? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1–8, 2020.

RAZAVI, Y. et al. Cannabidiol promotes neurogenesis in the dentate gyrus during an abstinence period in rats following chronic exposure to methamphetamine. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 6, p. 1381–1390, 2021.

REAL, C. C. et al. Evaluation of exercise-induced modulation of glial activation and dopaminergic damage in a rat model of Parkinson's disease using [11C]PBR28 and [18F]FDOPA PET. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 39, n. 6, p. 989–1004, 2019.

REGGIO, P. Endocannabinoid Binding to the Cannabinoid Receptors: What Is Known and What Remains Unknown. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 1468–1486, 2010.

REID, M. J.; BORNHEIM, L. M. Cannabinoid-induced alterations in brain disposition of drugs of abuse. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 11, p. 1357–1367, 2001.

REINKING, M. F.; OSMAN, M. M. Prospective Evaluation of Physiologic Uptake Detected with True Whole-Body 18 F-FDG PET / CT in Healthy Subjects. **Journal of Nuclear Medicine Technology**, v. 37, n. 1, p. 31–37, 2009.

REN, Y. et al. Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin-seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 47, p. 14764–14769, 2009.

RENARD, J. et al. Cannabidiol counteracts amphetamine-induced neuronal and behavioral sensitization of the mesolimbic dopamine pathway through a novel mTOR/p70S6 kinase signaling pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 18, p. 5160–5169, 2016.

ROBINSON, M. J. F. et al. Roles of “Wanting” and “Liking” in Motivating Behavior: Gambling, Food, and Drug Addictions. **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**, v. 27, p. 105–136, 2015.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v. 18, n. 3, p. 247–291, 1993.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: Some current issues. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1507, p. 3137–3146, 2008.

ROSS, R. A. The enigmatic pharmacology of GPR55. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 3, p. 156–163, 2009.

RUSSO, E. B. et al. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> receptors. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 8, p. 1037–1043, 2005.

SAKAMOTO, S. et al. The differential effects of nitrous oxide and xenon on extracellular dopamine levels in the rat nucleus accumbens: A microdialysis study. **Anesthesia and Analgesia**, v. 103, n. 6, p. 1459–1463, 2006.

SALEEM, A.; CHARNLEY, N.; PRICE, P. Clinical molecular imaging with positron emission tomography. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 12, p. 1720–1727, 2006.

SCHERMA, M. et al. Brain activity of anandamide: a rewarding bliss? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 309–323, 2019.

SCHLUSSMAN, S. D. et al. Steady-dose and escalating-dose “binge” administration of cocaine alter expression of behavioral stereotypy and striatal preprodynorphin mRNA levels in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 67, n. 3, p. 169–175, 2005.

SCHÖLL, M.; DAMIÁN, A.; ENGLER, H. Fluorodeoxyglucose PET in neurology and psychiatry. **PET Clinics**, v. 9, n. 4, p. 371–390, 2014.

SÉRRIÈRE, S. et al. **In vivo PET quantification of the dopamine transporter in rat brain with [18F]LBT-999** *Nuclear Medicine and Biology*, 2014.

SHIMOJI, K. et al. Measurement of Cerebral Glucose Metabolic Rates in the Anesthetized Rat by Dynamic Scanning with 18 F-FDG, the ATLAS Small Animal PET scanner, and arterial blood sampling. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 4, p. 665–672, 2003.

SHREVE, P. D.; ANZAI, Y.; WAHL, R. L. Pitfalls in Oncologic Diagnosis with FDG PET Imaging: Physiologic and Benign Variants. **Radiographics**, v. 19, p. 61–77, 1999.

SHULMAN, R. G. et al. Energetic basis of brain activity: Implications for neuroimaging. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 8, p. 489–495, 2004.

SIDHPURA, N.; PARSONS, L. H. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 7, p. 1070–1087, 2011.

SIEGAL, N.; DOW-EDWARDS, D. Isoflurane anesthesia interferes with the expression of cocaine-induced sensitization in female rats. **Neuroscience Letters**, v. 464, n. 1, p. 52–56, 2009.

SILVA, M. I. G. et al. Cocaína: História, ações neurobiológicas do vício e recaída e perspectivas terapêuticas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 23, n. 2, p. 247–258, 2010.

SIVILS, A.; WANG, J. Q.; CHU, X. P. Striatonigrostriatal Spirals in Addiction. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 15, n. December, 2021.

SMITH, L. N. et al. Assessment of cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2016, n. 108, p. 1–13, 2016.

SOFUOGLU, M. et al. Intravenous cocaine increases plasma epinephrine and norepinephrine in humans. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 68, n. 3, p. 455–459, 2001.

SOKOLOFF, L. et al. The [<sup>14</sup>C]Deoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization: Theory, Procedure, and Normal Values in the Conscious and Anesthetized Albino Rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 28, n. 5, p. 897–916, 1977.

SONEGO, A. B. et al. **Cannabidiol prevents haloperidol-induced vacuos chewing movements and inflammatory changes in mice via PPAR<sub>γ</sub> receptors** *Brain, Behavior, and Immunity*, 2018.

SPANGLER-BICKELL, M. G. et al. The effect of isoflurane on <sup>18</sup>F-FDG uptake in the rat brain: a fully conscious dynamic PET study using motion compensation. **EJNMMI Research**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016.

SPELTA, L. E. W.; BRUNO, V.; MARCOURAKIS, T. Cannabis. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2021. p. 501-518.

SPELTA, L. E. W. et al. [<sup>18</sup>F] FDG brain uptake of C57Bl / 6 male mice is affected by locomotor activity after cocaine use : A small animal positron emission tomography study. **Journal of Neuroscience Research**, p. 1–14, 2022.

STEKETEE, J. D.; KALIVAS, P. W. Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 348–365, 2011.

STEMPEL, V. et al. Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 795–809, 2016.

STERN, C. A. J. et al. Effects of Cannabinoid Drugs on Aversive or Rewarding Drug-Associated Memory Extinction and Reconsolidation. **Neuroscience**, v. 370, p. 62–80, 2018.

SUGIURA, T. et al. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor: Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**,

v. 274, n. 5, p. 2794–2801, 1999.

TAN, L. L. et al. Neurogenesis in the adult brain functionally contributes to the maintenance of chronic neuropathic pain. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.

TANAKA, M.; SACKETT, S.; ZHANG, Y. Endocannabinoid Modulation of Microglial Phenotypes in Neuropathology. **Frontiers in Neurology**, v. 11, n. February, 2020.

TIAN, G. et al. An extended Amygdal-midbrain circuit controlling cocaine withdrawal-induced anxiety and reinstatement. **Cell Reports**, v. 39, n. 1, p. 1–23, 2022.

TIRELLI, E.; MICHEL, A.; BRABANT, C. Cocaine-conditioned activity persists for a longer time than cocaine-sensitized activity in mice: Implications for the theories using Pavlovian excitatory conditioning to explain the context-specificity of sensitization. **Behavioural Brain Research**, v. 165, n. 1, p. 18–25, 2005.

TOYAMA, H. et al. Evaluation of anesthesia effects on [18F]FDG uptake in mouse brain and heart using small animal PET. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, n. 2, p. 251–256, 2004a.

TOYAMA, H. et al. Absolute Quantification of Regional Cerebral Glucose Utilization in Mice by 18 F-FDG Small Animal PET Scanning and 2- 14 C-DG. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 8, p. 1398–1405, 2004b.

TSUKADA, H. et al. Isoflurane anesthesia enhances the inhibitory effects of cocaine and GBR12909 on dopamine transporter: PET studies in combination with microdialysis in the monkey brain. **Brain Research**, v. 849, n. 1–2, p. 85–96, 1999.

TURU, G.; HUNYADY, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 2, p. 75–85, 2010.

UHL, G. R.; KOOB, G. F.; CABLE, J. The neurobiology of addiction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1451, n. 1, p. 5–28, 2019.

UMPIERREZ, L. S. et al. Cannabidiol but not cannabidiolic acid reduces behavioural sensitisation to methamphetamine in rats, at pharmacologically effective doses. **Psychopharmacology**, v. 239, n. 5, p. 1593–1603, 2022.

UNGLESS, M. A. et al. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 583–587, 2001.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). Executive Summary and Policy Implications. In: **World Drug Report 2022**. [s.l.: s.n.].

VALJENT, E. et al. Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 401–415, 2010.

VAN DER VEEN, D. R. et al. A 24-hour temporal profile of in vivo brain and heart pet imaging reveals a nocturnal peak in brain 18F-fluorodeoxyglucose uptake. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–9, 2012.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; EVERITT, B. J. Behavioral and neural mechanisms of compulsive drug seeking. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, n. 1–3, p. 77–88, 2005.

VILELA, L. R. et al. Enhancement of endocannabinoid signaling protects against cocaine-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 286, n. 3, p. 178–187, 2015.

VIRDEE, K. et al. Applications of positron emission tomography in animal models of neurological and neuropsychiatric disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 4, p. 1188–1216, 2012.

VIUDEZ-MARTÍNEZ, A. et al. Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. **Addiction Biology**, v. 23, n. 1, p. 154–164, 2018.

VOLKOW, N. D. et al. Changes in brain glucose metabolism in Cocaine in Brain Glucose and Withdrawal. **American Journal of Psychiatry**, v. 148, n. 5, p. 621–626, 1991.

VOLKOW, N. D. et al. Long-Term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. **Synapse**, v. 11, n. 3, p. 184–190, 1992.

VOLKOW, N. D. et al. Cocaine uptake is decreased in the brain of detoxified cocaine abusers. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 159–168, 1996.

VOLKOW, N. D. et al. Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D2 receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 1, p. 409–415, 1999.

VOLKOW, N. D. et al. Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. **Life Sciences**, v. 67, n. 12, p. 1507–1515, 2000.

VOLKOW, N. D. et al. “Nonhedonic” Food Motivation in Humans Involves Dopamine in the Dorsal Striatum and Methylphenidate Amplifies This Effect. **Synapse**, v. 44, p. 175–180, 2002.

VOLKOW, N. D. et al. Imaging dopamine’s role in drug abuse and addiction. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 3–8, 2009.

VOLKOW, N. D. et al. Reduced metabolism in brain “control networks” following cocaine-cues exposure in female cocaine abusers. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16573, 2011.

VOLKOW, N. D.; BALER, R. D. Addiction science: Uncovering neurobiological complexity. **Neuropharmacology**, v. 76, n. PART B, p. 235–249, 2014.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J. The addicted human brain: Insights from imaging studies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 10, p. 1444–1451, 2003.

VOLKOW, N. D.; HAMPSON, A. J.; BALER, R. D. Don’t Worry, Be Happy:

Endocannabinoids and Cannabis at the Intersection of Stress and Reward. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 57, p. 285–308, 2017.

VOLKOW, N. D.; KOOB, G. F.; MCLELLAN, A. T. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 4, p. 363–371, 2016.

VOLKOW, N. D.; MORALES, M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. **Cell**, v. 162, n. 4, p. 712–725, 2015.

VOTAW, J. et al. Interaction of isoflurane with the dopamine transporter. **Anesthesiology**, v. 98, n. 2, p. 404–411, 2003.

WALLBERG-HENRIKSSON, H. et al. Glucose transport into rat skeletal muscle: interaction between exercise and insulin. **Journal of Applied Physiology**, v. 65, n. 2, p. 909–913, 1988.

WANG, H. et al. Cocaine-Induced Endocannabinoid Mobilization in the Ventral Tegmental Area. **Cell Reports**, v. 12, n. 12, p. 1997–2008, 2015.

WANG, J.; UEDA, N. Biology of endocannabinoid synthesis system. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 89, n. 3–4, p. 112–119, 2009.

WASSUM, K. M. et al. Transient extracellular glutamate events in the basolateral amygdala track reward-seeking actions. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 8, p. 2734–2746, 2012.

WATT, G. et al. Chronic Treatment with 50 mg/kg Cannabidiol Improves Cognition and Moderately Reduces A $\beta$ 40 Levels in 12-Month-Old Male A $\beta$ PPswe/PS1 $\Delta$ E9 Transgenic Mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 74, n. 3, p. 937–950, 2020.

WEI, Q. et al. Metabolic and inflammatory functions of cannabinoid receptor type 1 are differentially modulated by adiponectin. **World Journal of Diabetes**, v. 12, n. 10, p. 1750–1764, 2021.

WELLS, A. M. et al. Interaction between the basolateral amygdala and dorsal hippocampus is critical for cocaine memory reconsolidation and subsequent drug context-induced cocaine-seeking behavior in rats. **Learnin**, v. 18, p. 693–702, 2011.

WHITE, S. M.; LAMBE, C. J. T. The pathophysiology of cocaine abuse. **Journal of Clinical Forensic Medicine**, v. 10, n. 1, p. 27–39, 2003.

WISE, R. A. Roles for nigrostriatal-not just mesocorticolimbic-dopamine in reward and addiction. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 10, p. 517–524, 2009.

WISE, R. A.; KOOB, G. F. The development and maintenance of drug addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 254–262, 2014.

WOLF, H. K. et al. NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1167–1171, 1996.

WU, J. et al. Studies of involvement of G-protein coupled receptor-3 in cannabidiol

effects on inflammatory responses of mouse primary astrocytes and microglia. **PLoS ONE**, v. 16, n. 5 May, p. 1–15, 2021.

XI, Z.-X. et al. **Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice***Nature Medicine*, 2011.

XU, H. et al. Extracellular Dopamine, Acetylcholine, and Activation of Dopamine D1 and D2 Receptors after Selective Breeding for Cocaine Self-Administration in Rats Haiyang. **Physiology & behavior**, v. 234, n. 16, p. 2475–2487, 2017.

YANG, L. et al. Role of Sigma Receptor in Cocaine-Mediated Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein: Implications for HAND. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 1329–1342, 2016.

YEUNG, H. W. D. et al. Patterns of 18 F-FDG Uptake in Adipose Tissue and Muscle : A Potential Source of false-positives for PET. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. December 2001, p. 1789–1796, 2003.

YU, L. L. et al. **Effects of cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant on acquisition and reinstatement of psychostimulant reward memory in mice***Behavioural Brain Research*, 2011.

ZEHRA, A. et al. Cannabis Addiction and the Brain: a Review. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 438–452, 2018.

ZHANG, H.-Y. et al. Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. **Revista del colegio americano de Cardiologia**, v. 22, n. 3, p. 752–765, 2017.

ZHANG, H. Y. et al. Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 46, p. E5007–E5015, 2014.

ZHANG, J. et al. CREB-mediated synaptogenesis and neurogenesis is crucial for the role of 5-HT1a receptors in modulating anxiety behaviors. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, 2016.

ZHAO, M. et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 7925–7930, 2003.

ZHORNITSKY, S.; POTVIN, S. Cannabidiol in humans-The quest for therapeutic targets. **Pharmaceuticals**, v. 5, n. 5, p. 529–552, 2012.

ZLEBNIK, N. E.; CHEER, J. F. Beyond the CB1 Receptor: Is Cannabidiol the Answer for Disorders of Motivation? **Annual Review of Neuroscience**, v. 39, n. Li 1978, p. 1–17, 2016.

ZUARDI, A. W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action Canabidiol: de um canabinóide inativo a uma droga com amplo espectro de ação. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 30, n. 3, p. 271–280, 2008.



## Anexo 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

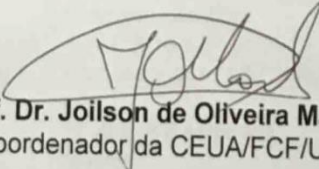
Ofício CEUA/FCF 77.2016-P518

São Paulo, 6 de dezembro de 2016.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 2 de dezembro de 2016, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa "**Canabidiol e ayahuasca no tratamento da farmacodependência à cocaína: possíveis intervenções terapêuticas?**" (Protocolo CEUA nº 518), conforme constante nos documentos apresentados (substituição da linhagem do modelo animal – de *Swiss-Webster* para C7BL/6J).

Cordialmente,



**Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**  
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a): Profa. Dra. Tania Marcourakis  
FBC/FCF/USP

## Anexo 2



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada "Atividade encefálica de camundongos adultos sob administração de canabidiol como tratamento da farmacodependência à cocaína", registrada com o nº 963/2018, sob a responsabilidade de Tania Marcourakis e Lídia Emmanuela Wiazowski Spelta, apresentada pelo Departamento de Radiologia e Oncologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 15.02.18.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-02-2018 Término: 22-11-2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	<b>200</b>
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 15 de Fevereiro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais

### Anexo 3



Universidade de São Paulo  
 Faculdade de Medicina  
 Departamento de Radiologia e Oncologia  
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, s/nº - CEP 05403-010  
 São Paulo - SP  
 11 2661-7861

#### DRO - APROVAÇÃO 113/2017

#### APROVAÇÃO

O Departamento de Radiologia e Oncologia aprovou em 06/12/2017, o projeto de pesquisa: *Atividade encefálica de camundongos adultos sob administração de canabidiol como tratamento da farmacodependência à cocaína.*

**Pesquisador(a) Responsável:** Profa. Dra. Tania Marcourakis

**Pesquisador(a) Executante:** Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta


**Disciplina:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP

**Finalidade:** Doutorado

#### Responsabilidades do Pesquisador:

- Iniciar as atividades do estudo após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq, CEP-FMUSP ou CEUA) e instâncias regulatórias, conforme Resolução CNS nº 466/12 e fornecer cópia a este Departamento;
- Apresentar relatório parcial e/ou final do projeto semestralmente;
- Enviar publicação dos resultados finais do estudo.

São Paulo, 06 de dezembro de 2017.

  
 Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Kolke Folgueira  
 Chefe do Departamento de Radiologia e Oncologia  
 Faculdade de Medicina da USP

# [<sup>18</sup>F]FDG brain uptake of C57Bl/6 male mice is affected by locomotor activity after cocaine use: A small animal positron emission tomography study

Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta<sup>1</sup>  | Caroline Cristiano Real<sup>2</sup>  |  
Carlos Alberto Buchpiguel<sup>2</sup>  | Daniele de Paula Faria<sup>2</sup>  | Tania Marcourakis<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Nuclear Medicine, Department of Radiology and Oncology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

## Correspondence

Daniele de Paula Faria, Laboratory of Nuclear Medicine, Department of Radiology and Oncology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Doutor Ovidio Pires de Campos Street, 872, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brazil.  
Email: [danielefar1@gmail.com](mailto:danielefar1@gmail.com)

## Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2018/15167-1

## Abstract

We verified if cocaine-induced peripheral activation might disrupt [<sup>18</sup>F]FDG brain uptake after a cocaine challenge and suggested an optimal protocol to measure cocaine-induced brain metabolic alterations in mice. C57Bl/6 male mice were injected with [<sup>18</sup>F]FDG and randomly separated into three groups. Groups 1 and 2 were kept conscious after [<sup>18</sup>F]FDG administration and after 5 min received saline or cocaine (20 mg/kg). The animals in group 1 ( $n = 5$ ) were then evaluated in the open field for 30 min and those from group 2 ( $n = 6$ ) were kept alone in a home cage for the same period. Forty-five minutes after [<sup>18</sup>F]FDG administration, images were acquired for 30 min. Group 3 ( $n = 6$ ) was kept anesthetized and image acquisition started immediately after tracer injection, for 75 min. Saline (Day 1) or cocaine (Day 2) was injected 5 min after starting acquisition. Another set of animals ( $n = 5$ ) were treated with cocaine every other day for 10 days or saline ( $n = 6$ ) and were scanned with the dynamic protocol to verify its efficacy. [<sup>18</sup>F]FDG uptake increased after cocaine administration when compared to baseline only in animals kept under anesthesia. No brain effect of cocaine was observed in animals submitted to the open field or kept in the home cage. The use of anesthesia is essential to visualize cocaine-induced changes in brain metabolism by [<sup>18</sup>F]FDG PET, providing an interesting preclinical approach to investigate naïve subjects and enabling a bidirectional translational science approach for better understanding of cocaine use disorder.

## KEYWORDS

<sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose, animal models, cocaine, glucose metabolism, PET

## 1 | INTRODUCTION

Molecular imaging with positron emission tomography (PET) is a minimally invasive imaging technique employed to evaluate physiological and biochemical processes, by considering the biodistribution

of imaging agents labeled with positron-emitting radionuclides (Hutchins et al., 2012; Parvaz et al., 2011). The development of [<sup>18</sup>F]-fluorodeoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG) in the 70s made it possible to investigate *in vivo* alterations in glucose metabolism, an indicator of cellular activity that reflex neuronal and synaptic activity in the brain (Basu et al., 2014; Berti et al., 2014). Since the first application of [<sup>18</sup>F]FDG in a human in 1976, it has been the most widely used PET tracer in both clinical and research settings, being a very useful

Daniele de Paula Faria and Tania Marcourakis contributed equally.

Edited by Junie Paula Warrington. Reviewed by Kwang Choi and Nicolas Tournier.

tool in the fields of oncology, neurology, and neuropsychiatry (Hess et al., 2014; Schöll et al., 2014).

Drug use disorder is a chronically relapsing neuropsychiatric disorder characterized by loss of control of drug intake, compulsion to seek and take the drug, and the development of a negative emotional state marked by intense craving during withdrawal periods (Koob & Volkow, 2016). PET studies in humans with a history of drug use have started to bridge the gap between preclinical neuroscience and clinical research, by: i. elucidating the mechanisms involved in the reinforcement and toxic properties of drugs; ii. providing the basis of drug-induced metabolic and neurochemical changes that could lead to a substance use disorder; iii. establishing a temporal relationship between behavioral and physiological drug outcomes (Fowler & Volkow, 1998). In fact, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG studies have demonstrated abnormal brain glucose metabolism associated with cocaine use disorder and withdrawal (London et al., 1990; Volkow et al., 1991, 1992, 2011; Wang et al., 1999).

Although these studies elucidate many aspects of neurobiological dysfunctions associated with cocaine use disorder, animal studies play a pivotal role in deciphering the complexity of its pathophysiology, which is difficult to assess in humans (Deroche-Gamonet & Piazza, 2014; Nicolas et al., 2017). Ethical concerns hamper the study of cocaine naïve subjects; therefore, it is not possible to analyze the biological processes related to the development and progression of drug use disorder or to investigate potential candidates for pharmacological therapy, limiting understanding of the physiological and abnormal responses to cocaine (Cannella et al., 2017). In this scenario, PET imaging and animal models are important tools for investigation.

Different from clinical neuroimaging acquisitions that are performed in awake subjects, small animal *in vivo* imaging is generally conducted under anesthesia, as restriction of movements is necessary to avoid undesirable artifacts. Anesthesia is therefore one limitation for translational data, as studies in anesthetized animals have reported alterations in brain functioning and connectivity, cerebral blood, and inhibitory GABAergic neurotransmission (Gutierrez-Barragan et al., 2022; Miranda et al., 2021; Ogawa et al., 2011; Prando et al., 2019). To avoid these limitations, some methodologies have been developed for evaluations in awake-animals, such as performing scans using devices that restrict movement (Gutierrez-Barragan et al., 2022; Mizuma et al., 2010; Suzuki et al., 2021) or using motion tracking and motion correction during image reconstruction (Miranda et al., 2019; Spangler-Bickell et al., 2016).

Cocaine is a psychostimulant alkaloid naturally present in plants from the genus *Erythroxylon*, especially *Erythroxylon coca*. This compound has indirect sympathomimetic actions, by blocking dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters, and consequently enhancing the activity of these neurotransmitters in the central nervous system (Di Chiara & Imperato, 1988; Koob & Le Moal, 2006). While dopamine is related to the stimulant effects desired by users, which might lead to the development of cocaine use disorder and cocaine-induced locomotor activation (Berridge & Robinson, 2016;

## Significance

This paper reports that the high locomotor activity induced by cocaine use masks the increase in brain metabolism caused by the drug, therefore, to identify this increase using positron emission tomography (PET), an optimized image acquisition protocol is necessary, where the animal should be anesthetized during the period of tracer distribution and whole image acquisition. This represents an adequate protocol for measuring cocaine-induced brain metabolic alterations in mice and provides an interesting preclinical approach to investigate naïve subjects, enabling a bidirectional translational science approach for better understanding of cocaine use disorder.

Koob, 1992; Volkow et al., 2016), the sympathomimetic peripheral effects, such as tachycardia and higher blood pressure levels are related to norepinephrine (Boghdadi & Henning, 1997).

Case reports showed the importance of patients avoiding muscle activities prior to [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET, with the goal of limiting its muscle uptake, which might interfere in the image (Liu et al., 2018; Meneret et al., 2020; Wang et al., 2017, 2018). Thus, the aim of the current study was to verify if cocaine-induced peripheral activation might affect [ $^{18}\text{F}$ ]FDG brain uptake in mice, after a cocaine challenge, and to evaluate a better protocol to measure cocaine-induced alterations in brain metabolic activity.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals

Twenty-eight C57Bl/6 male mice, 8-week-old (20–25 g), were obtained from the animal facility of the University of São Paulo, Brazil. Animals were housed in groups of three or four in plastic cages filled with wood shavings and kept in a temperature-controlled room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under a 12:12 h light/dark cycle, with food and water *ad libitum*. Experimental procedures were conducted after 10 days of animal acclimatization at the experimental facility. Manipulations were performed during the light period.

The number of animals used in this manuscript was established by a power test (<https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>) based on previous PET [ $^{18}\text{F}$ ]FDG studies performed by our laboratory, considering 80% power and 95% confidence.

All experiments comply with the ARRIVE guideline and were conducted following the guideline of the National Council for Control of Animal Experimentation, Brazil. This study was approved by the Ethics Committee of Animal Use of the School of Pharmaceutical Sciences (77.2016-P518) and School of Medicine (963/2018) from the University of São Paulo.

## 2.2 | Chemicals

Cocaine was donated by the Institute of Criminology of São Paulo, for research purposes, to the Laboratory of Toxicological Analyses of the School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo after legal authorization. Cocaine purity was confirmed as 95% using ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and was corrected to 100% for the animal injections.

[<sup>18</sup>F]FDG was produced by the Center of Nuclear Medicine from the Clinical Hospital of the University of São Paulo Medical School.

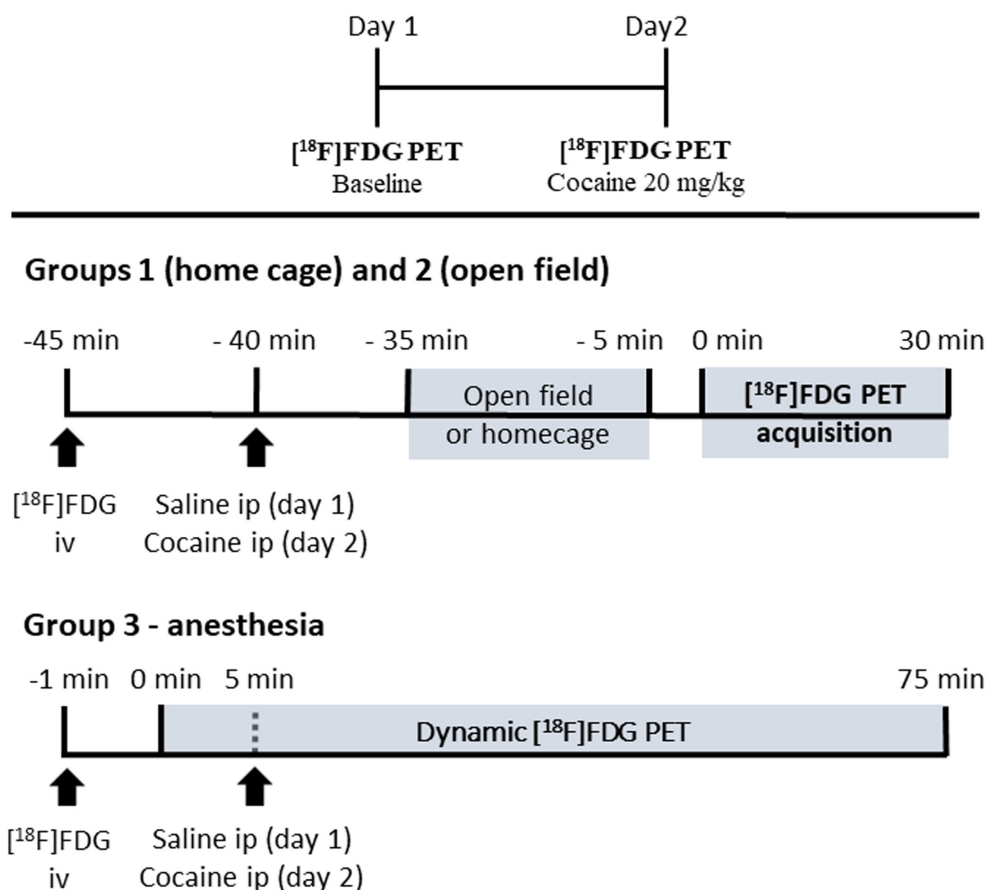
## 2.3 | Image acquisition and analysis

PET images were acquired in a small animal PET scanner (Triumph Trimodality, Gamma Medica-Ideas Inc., California, US) with a 24-h interval between the first (baseline) and the second images (acute cocaine injection).

The experimental design is shown in Figure 1. Mice were anesthetized with isoflurane (5% induction; 1.0%–2.0% maintenance)

in oxygen, for measurement of blood glucose level, [<sup>18</sup>F]FDG injection (37 MBq, intravenous), and image acquisition. Animals were randomly separated into three groups. Groups 1 and 2 were kept conscious after [<sup>18</sup>F]FDG injection and were injected intraperitoneally with saline 0.9% (image one—baseline) or cocaine (image 2; 20 mg/kg—[Gulley et al., 2003; Spelta et al., 2022]) 5 min after [<sup>18</sup>F]FDG administration. Animals from group 1 (*n* = 5, one animal died before starting the experiment) were then evaluated in the open field (a circular acrylic arena with a 40-cm diameter and height) for 30 min, to verify cocaine-induced locomotor activity. Animals from group 2 (*n* = 6) remained isolated in a home cage for the same period. Forty-five minutes after [<sup>18</sup>F]FDG administration, anesthetized animals from both groups were positioned in the scanner with the brain located in the center of the field of view (FOV) for PET acquisition during 30 min. Animals from group 3 (*n* = 6) were kept anesthetized during the whole experimental procedure and acquisition started 1 min after [<sup>18</sup>F]FDG injection, with dynamic images for 75 min. Saline or cocaine were injected 5 min after starting acquisition.

Emission sinograms were interactively reconstructed into a single frame of 30 min (groups 1 and 2) or 15 frames of 5 min (group



**FIGURE 1** Experimental design. Animals were randomized into three experimental groups: Home cage, open field, and anesthesia. The first two groups were kept awake after the injection of [<sup>18</sup>F]FDG and a static PET image was acquired (30 min). Animals from the final group were kept under anesthesia after [<sup>18</sup>F]FDG administration and scanned with the dynamic acquisition for 75 min.

3) using the OSEM-3D algorithm (20 iterations and 4 subsets). PET image analysis was performed with PMOD 4.1 software (PMOD™ Technologies Ltd, Switzerland). The scans were manually co-registered to a T2-weighted MRI template. Standardized uptake values (SUV) were calculated for 16 volumes of interest (VOI): right and left striatum, right and left hippocampus, cortex, thalamus, cerebellum, basal forebrain, hypothalamus, brainstem, central gray, right and left midbrain, superior colliculi, and right and left amygdala. To compare group 3 with the other groups, the SUVmean from the final 30min of the dynamic acquisition was calculated. [<sup>18</sup>F]FDG uptake (SUV) of each region was normalized by the whole-brain uptake of the baseline image for the respective animal.

## 2.4 | Anesthetized scanning protocol validation

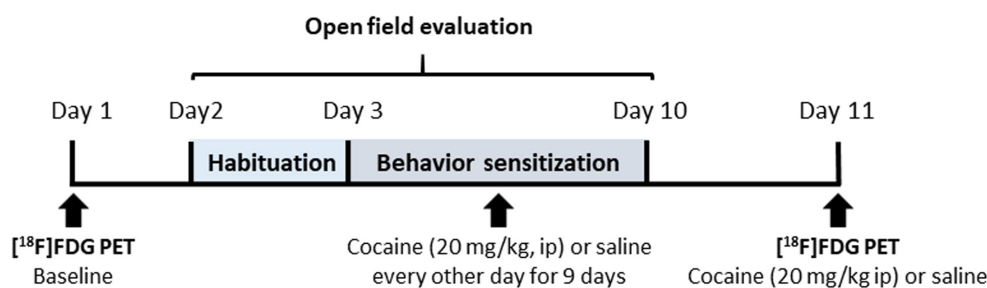
Another set of animals was tested to validate the methodological efficacy. We evaluated if animals sensitized to cocaine would have the same response when compared to those treated with an acute cocaine injection. Cocaine-induced behavior sensitization is a neurobiological model of cocaine addiction in which animals are treated for a few days with the drug in a paired environment (e.g., the open field) and have an increased behavior response to the effects of the drug, that can be seen through locomotor activity, so-called locomotor sensitization (Berridge & Robinson, 2016; Robinson & Berridge, 1993).

As seen in Figure 2, the [<sup>18</sup>F]FDG PET images were acquired before cocaine treatment (baseline), and 24 h later, the open field evaluation started. Firstly, mice received an injection of saline and were allowed to habituate to the apparatus for 30 min, and the cocaine administration started on the next day (day 3). Animals received cocaine (20mg/kg, intraperitoneal;  $n = 5$ ) or saline 0.9% (control;  $n = 6$ ), every other day for 9 days (five administrations). In the first four administrations, animals were immediately evaluated for 30min in the open field for locomotor activity and confirmation of locomotor sensitization. On the last day of treatment, cocaine or saline

were administered in the PET scan, 5 min after the dynamic scanning initiation.

## 2.5 | Statistical analyses

Statistical analyses were performed by SPSS 20 (IBM Corporation, USA) and GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, USA). Numerical data are presented as mean  $\pm$  SEM, or percentage, considering a significance level of  $\alpha < .05$ . Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test and all parameters presented normal distribution. Blood glucose levels from all animals were evaluated by repeated measures two-way ANOVA, considering treatment (baseline vs. cocaine) as the within-subject factor and repeated measure, and group as the between-subject factor. The effect size was calculated through Cohen's  $d$  based on whole-brain [<sup>18</sup>F]FDG uptake from the first (baseline–control) and second images (cocaine: open field, home cage, anesthesia, and sensitized mice groups; saline for control group). For PET data analysis, a repeated measures three-way ANOVA was performed, adopting group (open field vs. home cage vs. anesthesia; or controls vs. sensitized animals) as the between-subject factor, and treatment (baseline vs. cocaine) and VOIs as the within-subject factors and repeated measures. Total locomotor activity from animals exposed to the open field was analyzed by the paired Student “ $t$ ” test and locomotion in a 10-min interval was analyzed by repeated measures two-way ANOVA, adopting treatment (cocaine or saline) as the between-subject factor and time as the within-subject factor, with both factors considered as repeated measures. In the set of mice used to validate the protocol, cocaine-induced locomotor sensitization was analyzed by repeated measures two-way ANOVA, considering day as the within-subject factor and repeated measure and group (control vs. cocaine) as the between subject factor. All post hoc analyses were performed by the Bonferroni test with multiple comparison correction. Pearson's correlations were performed of the whole brain SUV with locomotor activity from: (i) animals exposed to the open field in the validation; (ii) sensitized animals; (iii) Control animals.



**FIGURE 2** Experimental design. PET scan was acquired at baseline time point and the behavioral analysis in the open field began the next day. Animals were first habituated in the apparatus, during 30 min, and after 24 h, the sensitization protocol was initiated. For this, cocaine (20 mg/kg) or saline (control group) were administered every other day for 9 days. After the first four administrations, animals were evaluated in the open field for locomotor activity assessment during 30 min, immediately after the injections. After the final administration, animals were dynamically PET scanned for 75 min.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Blood glucose levels

No significant differences were detected in blood glucose levels between any of the groups of animals or between the images (baseline or after cocaine), suggesting that glucose did not affect the results of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake (see Supporting Information Table S1 for descriptive statistics and  $p$  values). The repeated measures two-way ANOVA showed no significant effects of group ( $F_{[4, 23]} = 2.576$ ,  $p = .065$ ), treatment ( $F_{[1, 23]} = 1.03$ ,  $p = .32$ ), or interaction between them ( $F_{[4, 23]} = 1.096$ ,  $p = .38$ ).

#### 3.2 | Acute effects of cocaine

Representative [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET images are illustrated in Figure 3. The three-way ANOVA revealed a significant effect of group ( $F_{[2, 14]} = 8.339$ ,  $p = .004$ ), treatment ( $F_{[1, 14]} = 16.739$ ,  $p = .001$ ), and VOI ( $F_{[16, 221]} = 21.224$ ,  $p < .0001$ ), as well as interactions between treatment and group ( $F_{[2, 14]} = 8.342$ ,  $p = .004$ ), VOI and group ( $F_{[32, 221]} = 7.053$ ,  $p < .0001$ ), treatment and VOI ( $F_{[16, 221]} = 1.760$ ,  $p = .038$ ), and treatment, VOI, and group ( $F_{[32, 221]} = 2.123$ ,  $p = .001$ ).

At the baseline, multivariate tests revealed some differences between anesthetized animals and those who remained awake during [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET uptake. Animals from the anesthesia group presented reduced levels of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake in right (home cage:  $p = .021$ ; open field:  $p = .05$ ) and left amygdala (home cage:  $p = .025$ ; open field:  $p = .017$ ), and increased uptake in the right (home cage,  $p = .046$ ; open field,  $p = .002$ ) and left midbrain (home cage:  $p = .007$ ; open field:  $p = .002$ ). In all other VOIs, the three groups had similar [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET uptake at baseline.

When cocaine was administered, it caused an effect on [ $^{18}\text{F}$ ]FDG brain uptake only in the anesthesia group, with higher uptake compared to baseline (Figure 4), in all analyzed VOIs (whole brain: 30%,  $p < .001$ ; right striatum: 33%,  $p = .004$ ; left striatum: 36%,  $p = .002$ ; cortex, 28%,  $p = .007$ ; right hippocampus: 50%,  $p < .0001$ ; left hippocampus: 54%,  $p < .0001$ ; thalamus: 57,  $p < .0001$ ; cerebellum: 44%,  $p < .0001$ ; basal forebrain: 41%,  $p < .0001$ ; hypothalamus: 48%,  $p < .0001$ ; right amygdala: 48%,  $p = .016$ ; left amygdala: 60%,  $p = .009$ ; brainstem: 39%,  $p = .007$ ; central gray: 48%,  $p < .0001$ ; superior colliculi: 55%,  $p < .0001$ ; right midbrain: 39%,  $p < .0001$ ; left midbrain: 36%,  $p < .0001$ ). In fact, in the presence of cocaine, the [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake was significantly increased in the anesthesia group compared to the other groups in almost all analyzed VOIs (see Supporting Information Tables S2 and S3 for detailed mean, standard error, and  $p$  values; and Supporting Information Figure S1 for the time–activity curves). The effect size evaluation corroborated the ANOVA findings, as the anesthesia group presented a large effect size (Cohen's  $d = 2.26$ ), whereas the open field and home cage groups, there was a medium effect size (Cohen's  $d = 0.42$  for both).

The acute psychostimulant locomotor effect of cocaine was evidenced in the animals exposed to the open field, as seen in Figure 5. The Student “ $t$ ” test showed higher levels of activity in these animals after the cocaine injection compared to the activity prior to the baseline scan (Figure 5a). When considering time interval as a factor, the repeated measures two-way ANOVA showed a significant effect for treatment ( $F_{[1, 4]} = 23.3$ ,  $p = .0085$ ), but not for time ( $F_{[2, 8]} = 0.134$ ,  $p = .88$ ) or interaction ( $F_{[2, 8]} = 0.694$ ,  $p = .53$ ). This indicates that cocaine induces higher levels of activity in the open field, with a similar variation among time compared to saline (Figure 5b). In addition, in animals, the locomotor activity was inversely correlated to whole brain uptake ( $r = -.82$ ,  $p = .049$ ), indicating that psychostimulant-induced hyperlocomotion could interfere with brain [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake (Figure 5c).

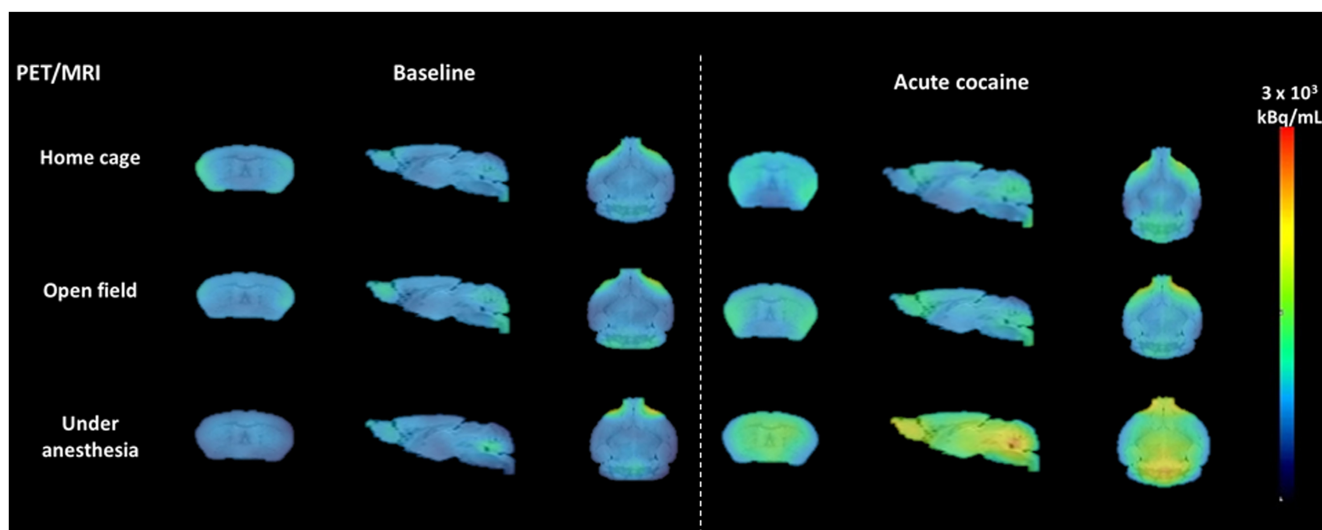
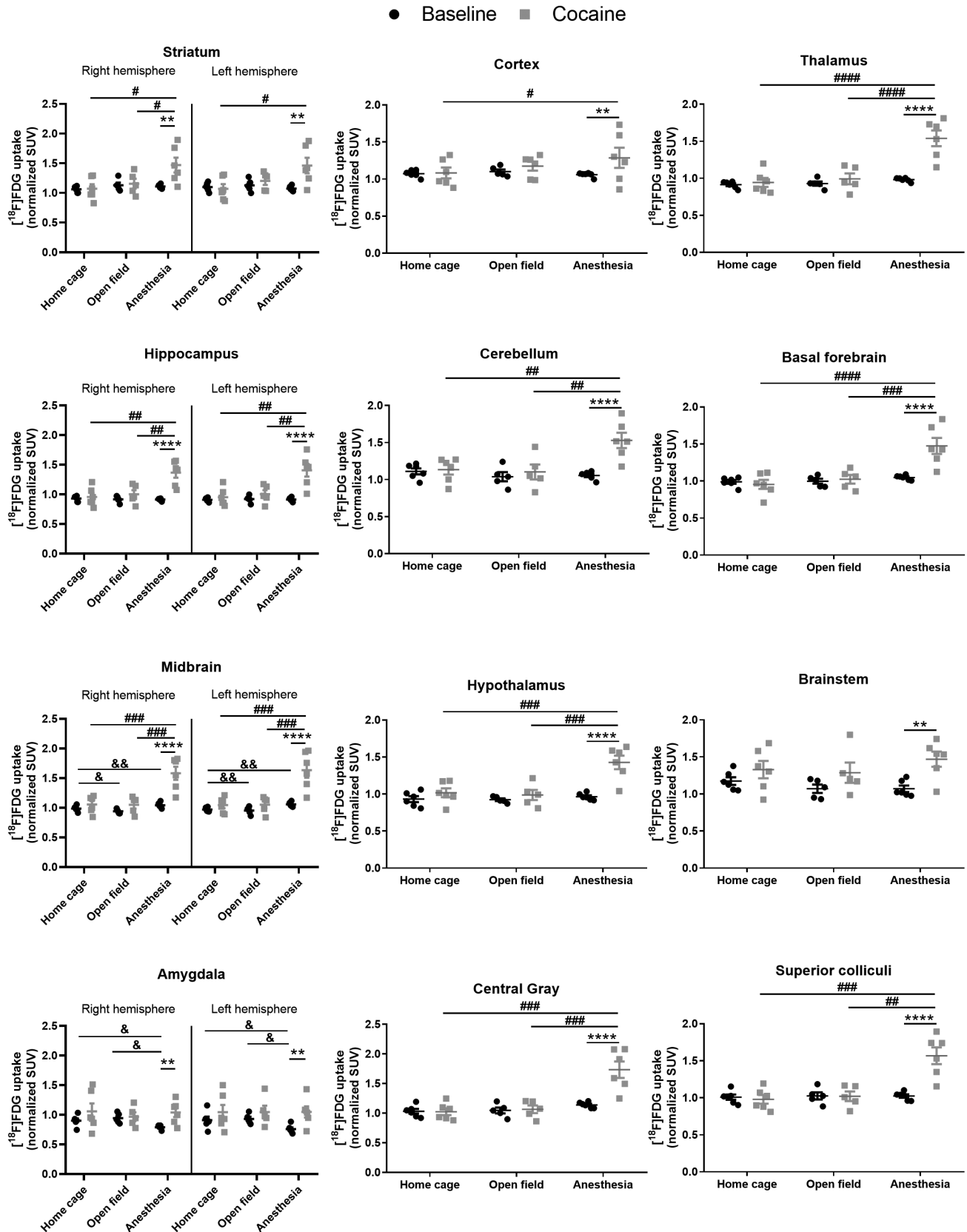
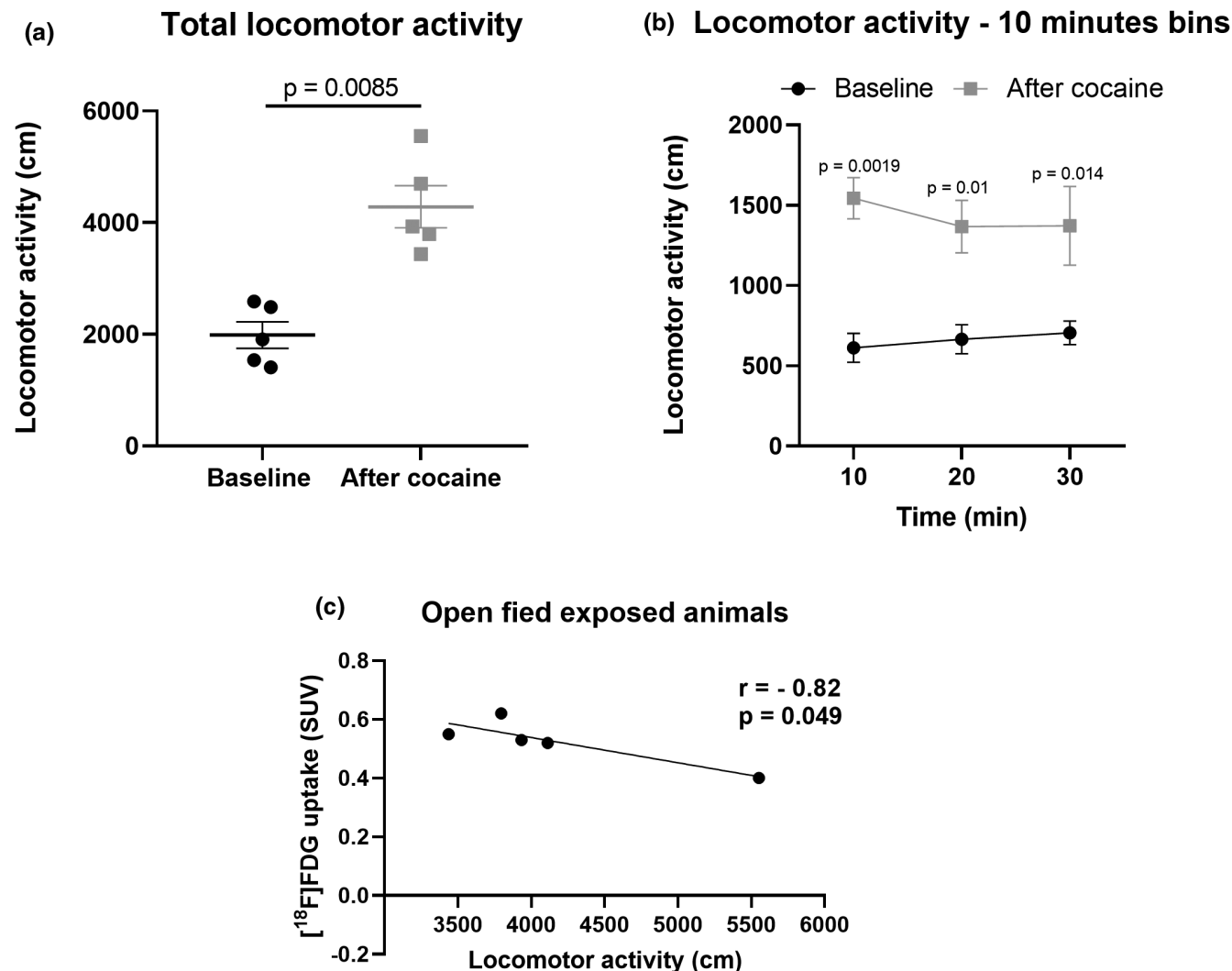


FIGURE 3 [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET illustrative images fused with the T2-weighted MRI template in coronal, sagittal, and transversal slices showing an increase in the uptake induced by cocaine only in the anesthesia group.





**FIGURE 4**  $[^{18}\text{F}]$ FDG uptake (normalized to the whole brain uptake in baseline scan of each respective animal) after saline or an acute cocaine injection in the home cage ( $n = 6$ ), open field ( $n = 5$ ), and anesthesia ( $n = 6$ ) groups. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Three-way repeated measures ANOVA and Bonferroni post hoc test. \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ; \*\*\*\* $p < .0001$ , related to baseline. # $p < .05$ ; ## $p < .01$ ; ### $p < .001$ ; #### $p < .0001$ , related to cocaine in anesthesia group; & $p < .05$ ; && $p < .01$  related to baseline in anesthesia group.



**FIGURE 5** Behavioral analysis from animals exposed to the open field during [<sup>18</sup>F]FDG uptake. (a) Total locomotor activity at baseline and after the acute cocaine administration. Paired student “t” test. (b) Locomotor activity in 10-min interval at baseline and after the acute cocaine administration. Repeated measures two-way ANOVA and Bonferroni post hoc; *p* values related to baseline. (c) Pearson correlation between [<sup>18</sup>F]FDG uptake and locomotor activity. Data are expressed as mean ± SEM.

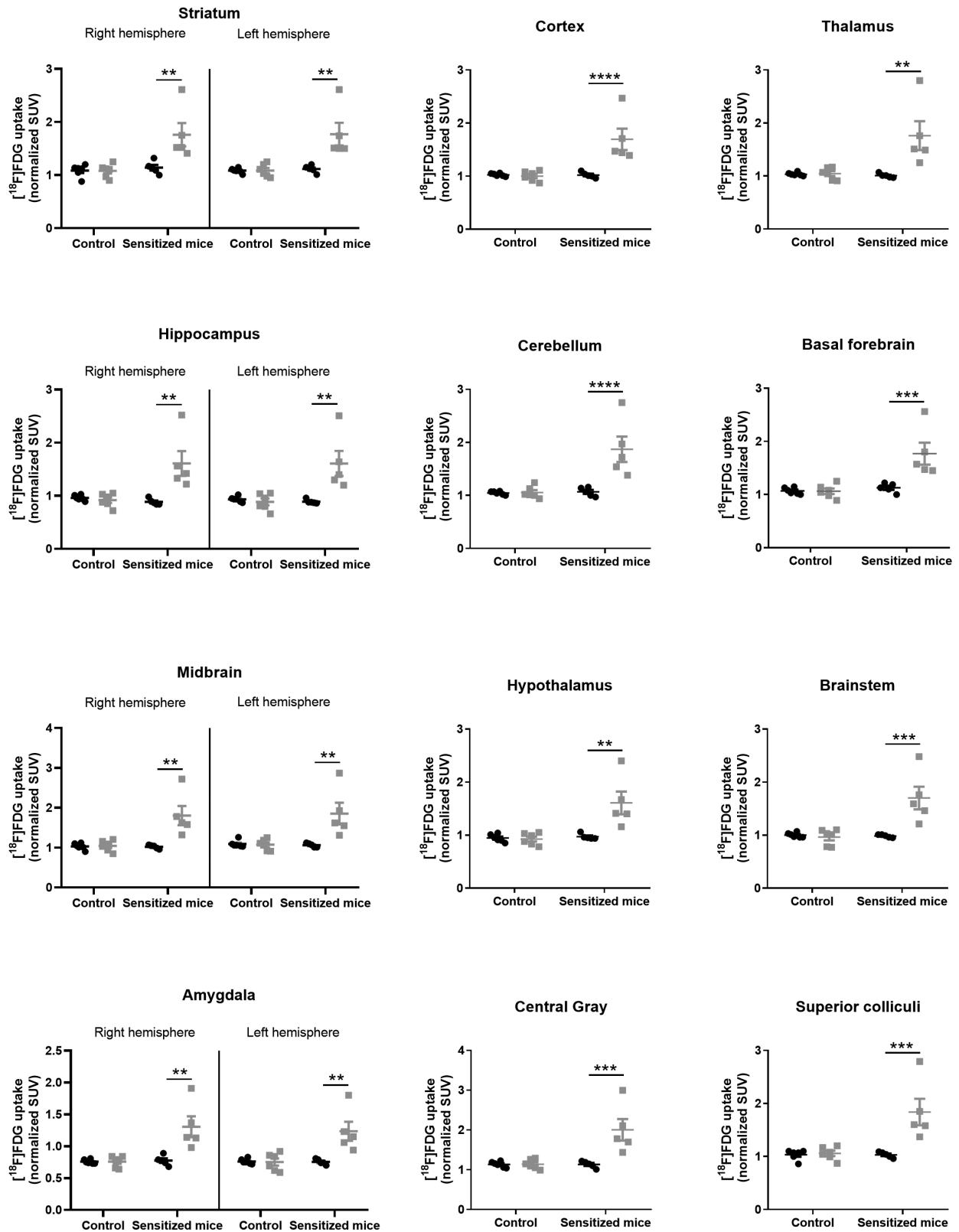
### 3.3 | Sensitization protocol

In relation to PET images (Figure 6), the two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ( $F_{[1, 9]} = 11.350$ ,  $p = .008$ ), VOI ( $F_{[16, 144]} = 71.290$ ,  $p < .0001$ ), and group ( $F_{[1, 9]} = 9.341$ ,  $p = .014$ ), and interactions between treatment and group ( $F_{[1, 9]} = 11.924$ ,  $p = .007$ ), VOI and group ( $F_{[16, 144]} = 2.347$ ,  $p = .004$ ), treatment and VOI ( $F_{[16, 144]} = 2.154$ ,  $p = .009$ ), and treatment, VOI, and group ( $F_{[16, 144]} = 1.879$ ,  $p = .028$ ). Multivariate tests revealed that [<sup>18</sup>F]FDG PET uptake was higher after cocaine treatment, compared to baseline, in almost all the VOIs, confirming the efficacy of our experimental strategy (Figure 5; whole brain: 63%,  $p = .001$ ; right striatum: 56%,  $p = .005$ ; left striatum: 57%,  $p = .001$ ; cortex: 64%,  $p < .0001$ ; right hippocampus: 84%,  $p = .002$ ; left hippocampus: 82%,  $p = .002$ ; thalamus: 76%,  $p = .004$ ; cerebellum: 73%,  $p < .0001$ ; basal forebrain: 56%,  $p = .001$ ; hypothalamus: 67%,  $p = .002$ ; central gray: 76%,  $p = .001$ ; superior colliculi: 77%,  $p = .001$ ; brainstem: 73%,  $p = .001$ ; right midbrain:

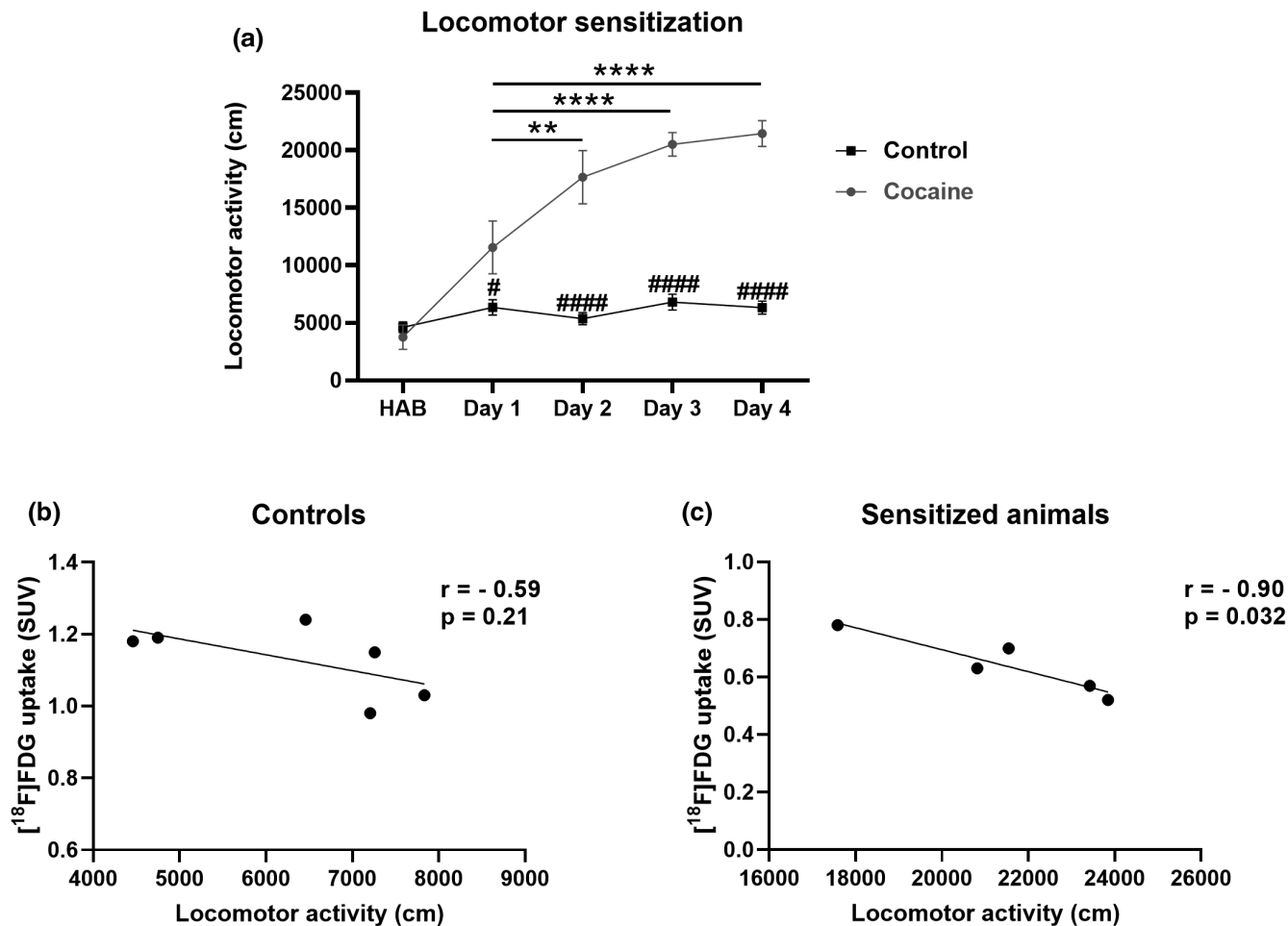
77%,  $p = .002$ ; left midbrain: 76%,  $p = .003$ ; right amygdala: 72%,  $p = .002$ ; left amygdala: 64%,  $p = .003$ ). These data also showed a large effect size (Cohen’s  $d = 2.76$ ). No metabolic changes between the two scans were detected in the control group and the associated effect size was small (Cohen’s  $d = 0.14$ ). See Supporting Information Table S1 for detailed mean, standard error, and *p* values.

In the behavioral analysis (Figure 7a), the two-way ANOVA showed a significant effect of day ( $F_{[4, 36]} = 23.16$ ,  $p < .0001$ ), group ( $F_{[1, 9]} = 72.12$ ,  $p < .0001$ ), and interaction ( $F_{[4, 36]} = 2.923$ ,  $p < .0001$ ). During habituation, all mice had the same basal activity. When treatment began, control animals sustained this same activity over the days, whereas cocaine-treated animals had higher locomotion compared to habituation (day 1:  $p = .0002$ ; days 2–4:  $p < .0001$ ) and compared to controls (day 1:  $p = .03$ ; days 2–4:  $p < .0001$ ), evidencing the psychostimulant effect of cocaine (Figure 7a). Locomotor sensitization was detected on the second day of cocaine administration ( $p = .0018$ ) and sustained until day 4 ( $p < .0001$ ). In addition, a significant inverse correlation was found

● Image 1 (Baseline) ■ Image 2 (saline - control; cocaine - sensitized mice)



**FIGURE 6**  $[^{18}\text{F}]$ FDG uptake in animals receiving cocaine ( $n = 5$ ) or saline ( $n = 6$ ) in a behavior sensitization protocol and evaluated by dynamic PET scan. Repeated measures three-way ANOVA and Bonferroni post hoc. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.



**FIGURE 7** Behavior sensitization of animals receiving cocaine or saline (controls). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. (a) Locomotor activity of animals under habituation and after cocaine ( $n = 5$ ) or saline ( $n = 6$ ) administration. Repeated measures two-way ANOVA and Bonferroni post hoc.  $**p < .01$  and  $****p < .0001$  related to day 1;  $\#p < .05$  and  $####p < .0001$  related to control. HAB, habituation. (b,c) Pearson correlation between SUV after the last dose of saline or cocaine and locomotor activity on day 4.

between locomotor activity of sensitized animals on the fourth day of cocaine administration and the whole brain SUV ( $r = -.92$ ,  $p = .026$ ) (Figure 7b), indicating that the psychostimulant effect on locomotion increases, as the brain [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake decreases. No significant correlation was present in the control group (Figure 7c).

## 4 | DISCUSSION

We evaluated the effects of cocaine on brain metabolism, which can be considered as a marker of brain function and is sensitive to the effects of drug administration. Our data support the hypothesis that locomotor activity induced by cocaine might be a relevant factor when performing brain PET scanning. When animals are anesthetized, an acute cocaine injection induces higher [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake in different brain regions, but this is not seen when animals are left awake to experience the locomotor stimulant effect of the drug. Moreover, locomotor activity and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG brain uptake are inversely correlated.

[ $^{18}\text{F}$ ]FDG accumulates intensely in the myocardium and brain, as both are high glycolytic metabolic sites (Shreve et al., 1999). The brain glucose

metabolism reflects in part the energy required for neurotransmission, so regional abnormalities in this process provide mechanistic information on specific neurotransmitters associated with these changes (Fowler et al., 1967). After the intake of a psychostimulant drug, such as cocaine, temporally limited function changes occur in the brain (Peña et al., 2015; Ungless et al., 2001; Xu et al., 2017). The higher amounts of dopamine interacting with D1 receptors in the nigrostriatal and mesocorticolimbic projections contribute to the established psychostimulant hyperactive state, reflecting in animals as hyperlocomotion (Koob, 1992).

We showed a global effect on brain glucose metabolism after acute and repeated administrations of cocaine, related to its psychostimulant effect. Data from the literature show that after repeated intravenous administration of the drug, increased glucose consumption has been detected in mesocorticolimbic areas and the hippocampus by autoradiography, which is related to cocaine-induced functional changes in dopaminergic neurotransmission (London et al., 1986; Pontieri et al., 1995; Porrino, 1993; Porrino et al., 1984, 1988). As the neurotransmitters operate in a neuronal network, dopaminergic alterations can reflect in other systems and in intracellular pathways, resulting in a general brain alteration (Jiang et al., 2021; Nestler &

Lüscher, 2019). As cocaine also blocks the reuptake of serotonin and norepinephrine, alterations in both systems could be influencing the increased metabolism in regions where these neurotransmitters exert major influence, such as the cortex, thalamus, and midbrain (Celada et al., 2013; Ranjbar-Slamloo & Fazlali, 2020).

As a sympathomimetic compound, cocaine also modulates peripheral systems, by causing higher cardiorespiratory frequency and higher arterial blood pressure, mainly due to noradrenaline action (Chiueh & Kopin, 1978; London et al., 1990; Sofuoglu et al., 2001). In the heart, the action of cocaine mainly involves the release of adrenaline and noradrenaline from the adrenals and inhibition of noradrenaline reuptake sites in myocardial tissue (Chiueh & Kopin, 1978). All this has a significant cost to glucose utilization by the periphery and might dampen the [ $^{18}\text{F}$ ]FDG from the brain.

Muscle metabolic activity is increased *in vivo* when muscle is electrically stimulated to undergo isometric contraction (Barrington & Maisey, 1996). Elevated uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG is seen in skeletal muscles under active contraction, especially in the first 30 min of the tracer distribution (Shreve et al., 1999). In fact, muscle uptake is a classic pitfall of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET, which has been previously reported several times. There is evidence that muscle exercise, stress-induced muscle tension, and activities such as sex, talking, chewing, coughing, or vomiting prior to a PET scan increase [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake in the involved group of muscles, interfering with the correct final outcome (Barrington & Maisey, 1996; Bar-shalom, 2000; Liu et al., 2018; Meneret et al., 2020; Reinking & Osman, 2009; Wang et al., 2018; Yeung et al., 2003). Considering our behavioral data from Figure 7a, an animal under an acute cocaine injection might walk in the open field twice as much as during habituation, which requires significant metabolic consumption by the muscles and the cardiovascular system. Considering that the muscle is commonly accepted as the largest glucose utilizing tissue (van der Veen et al., 2012) and the negative correlation between locomotion and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake in the brain, found in our study, it is reasonable to suppose that the peripheral metabolic rate is affecting brain glucose consumption.

Muscle contraction intensifies muscle glucose uptake by GLUT4 translocation to the plasma membrane as a result of an insulin-like effect and can persist even after exercise cessation (Koistinen & Zierath, 2002). Indeed, rats submitted to 35 min of swimming showed increased glucose transport in skeletal muscles, that remained up to 60 min after exercise, with additive effects of the muscle contraction and insulin concentration (Wallberg-Henriksson et al., 1988). The molecular mechanism of exercise-stimulated glucose uptake is probably related to muscle contraction-induced higher intracellular calcium levels, associated with upregulation of the 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) signal transduction pathway (Mizuma et al., 2010).

Considering that animals are exposed to isoflurane for 75 min and during the time window of cocaine neurobiological effects, it is important to consider possible influences of anesthesia on cocaine-induced metabolic changes. Although anesthesia is essential in small animal PET scanning to avoid motion, it promotes alterations in physiological brain function, such as reduced neuronal activity and brain metabolism (Franks, 2008). The comparison of brain metabolism

between awake and anesthetized animals indicates that anesthesia alters glucose uptake to different extents in different brain regions, depending on the anesthetic used (Bascuñana et al., 2019).

When compared to the awake state, isoflurane anesthesia promotes vasodilatation, increased blood flow, and reduced neuronal activity in the brain (Du et al., 2009; Gutierrez-Barragan et al., 2022). Alterations in the pattern of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake were also described. In brain dynamic images, decreased heterogeneity between gray and white matter was reported (Shimoji et al., 2003), as well as different patterns of glucose utilization in peripheral organs, such as increased myocardial [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake (Fueger et al., 2006; Toyama et al., 2004b).

However, our data suffered a significant influence of isoflurane only in the amygdala (decreased uptake) and midbrain (increased uptake) in the animals maintained under anesthesia, compared to those who remained awake during [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake. Although some authors have reported reduced [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake induced by isoflurane anesthesia (Toyama et al., 2004a; Mizuma et al., 2010; Prando et al., 2019; Prieto et al., 2011), there are also authors reporting no alterations or increased/decreased uptake depending on the evaluated VOI. Bascuñana et al. (2019) observed that the whole brain [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake in awake animals did not differ from the uptake under isoflurane anesthesia, as well as blood glucose levels. This could be related to the fact that maintenance of the isoflurane anesthesia during the whole [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake period increases tracer distribution, by reducing its blood clearance, reducing the uptake by skeletal muscle and brown fat tissue (Fueger et al., 2006). In region-specific analysis, some authors did not detect alterations in the hippocampus, amygdala, cerebellum, and striatum (Jahreis et al., 2021; Spangler-Bickell et al., 2016), while others found increased uptake in major subcortical regions (midbrain, hypothalamus, and hippocampus) and reduced uptake in cortical regions and basal ganglia (Ori et al., 1986).

A limited number of studies concluded that isoflurane anesthesia changes basal dopaminergic signaling (Opacka-Juffry et al., 1991; Sakamoto et al., 2006; Tsukada et al., 1999) and interferes with cocaine effects (Tsukada et al., 1999). However, the authors either use isoflurane in higher concentrations or administer it with  $\text{N}_2\text{O}$ , which has effects on dopamine signaling *per se*. More recent studies using low doses of isoflurane (0.5%–2.5%) administered with air did not find significant alterations in dopamine signaling or interactions with the mechanisms of dopamine release and uptake, even for prolonged periods of time, such as 350 min (Adachi et al., 2008; Brodник & España, 2015). Moreover, it did not change the effect of cocaine or dopamine transporter concentration, as shown by *ex vivo* and *in vitro* approaches (Brodnik & España, 2015; Votaw et al., 2003). This implies that the cocaine effects seen in our study in the brain metabolic activity were not related to isoflurane–dopamine or isoflurane–cocaine interactions, but to the cocaine itself.

Some limitations of the study should be mentioned. Pharmacokinetic modeling was not performed in this study, which could give a more precise calculation of the transport rates of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, as it is methodologically difficult to apply in longitudinal studies in mice, as it requires direct arterial blood sampling during the PET acquisition, which is a problem due to the small size of the vessels and the small total blood volume of the mice. Furthermore, it was not

possible to acquire images from lungs, heart, or muscle tissue, due to our small FOV (3.7 cm) and no anesthetics other than isoflurane were tested. Sex differences were not evaluated, and a small number of animals was used, although with adequate power (80%).

## 5 | CONCLUSION

The use of anesthesia during [<sup>18</sup>F]FDG distribution was essential to visualize cocaine-induced changes in brain metabolism by PET imaging, with the psychostimulant effect on locomotion and the tracer uptake being negatively correlated. Thus, this is an interesting pre-clinical approach to investigate naïve animals and enabling a bidirectional translational science approach for better understanding of cocaine use disorder.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. *Study concept and design:* D.P.F. and T.M. *Acquisition of data:* L.E.W.S., C.C.R. and D.P.F. *Analysis and interpretation of data:* L.E.W.S. and D.P.F. *Drafting of the manuscript:* L.E.W.S. *Critical revision of the manuscript for important intellectual content:* C.C.R., C.A.B., D.P.F. and T.M. *Statistical analysis:* L.E.W.S. *Obtained funding:* T.M. and D.P.F. *Administrative, technical and material support:* T.M., D.P.F. and C.A.B. *Study supervision:* T.M. and D.P.F.

### FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Ministério da Justiça e Segurança Pública of Brazil (Edital nº01 de 26/05/2015); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2018/15167-1); and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). T.M. is a research fellow of CNPq

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.


### PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/jnr.25102>.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### ORCID

Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta  <https://orcid.org/0000-0001-6526-2915>

Caroline Cristiano Real  <https://orcid.org/0000-0001-6096-3341>

Carlos Alberto Buchpiguel  <https://orcid.org/0000-0003-0956-2790>

Daniele de Paula Faria  <https://orcid.org/0000-0002-1766-2786>

Tania Marcourakis  <https://orcid.org/0000-0002-0076-5017>

## REFERENCES

- Adachi, Y. U., Yamada, S., Satomoto, M., Higuchi, H., Watanabe, K., Kazama, T., Mimuro, S., & Sato, S. (2008). Isoflurane anesthesia inhibits clozapine- and risperidone-induced dopamine release and anesthesia-induced changes in dopamine metabolism was modified by fluoxetine in the rat striatum: An in vivo microdialysis study. *Neurochemistry International*, 52, 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.07.012>
- Barrington, S. F., & Maisey, M. N. (1996). Skeletal muscle uptake of Fluorine-18-FDG: Effect of Oral diazepam. *Journal of Nuclear Medicine*, 37, 1127–1129.
- Bar-shalom, R. (2000). Muscle uptake of 18-fluorine fluorodeoxyglucose. *Seminars in Nuclear Medicine*, 30, 306–309.
- Bascuñana, P., Thackeray, J. T., Bankstahl, M., Bengel, F. M., & Bankstahl, J. P. (2019). Anesthesia and preconditioning induced changes in mouse brain [18F] FDG uptake and kinetics. *Molecular Imaging and Biology*, 21, 1089–1096. <https://doi.org/10.1007/s11307-019-01314-9>
- Basu, S., Hess, S., Nielsen Braad, P. E., Olsen, B. B., Inglev, S., & Høiland-Carsen, P. F. (2014). The basic principles of FDG-PET/CT imaging. *PET Clinics*, 9, 355–370. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2014.07.006>
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2016). Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *The American Psychologist*, 71, 670–679. <https://doi.org/10.1037/amp0000059>
- Berti, V., Mosconi, L., & Pupi, A. (2014). Brain: Normal variations and benign findings in fluorodeoxyglucose-PET/ computed tomography imaging. *PET Clinics*, 9, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2013.10.006>
- Boghdadi, M. S., & Henning, R. J. (1997). Cocaine: Pathophysiology and clinical toxicology. *Heart & Lung*, 26, 466–483. [https://doi.org/10.1016/S0147-9563\(97\)90040-6](https://doi.org/10.1016/S0147-9563(97)90040-6)
- Brodnik, Z. D., & España, R. A. (2015). Dopamine uptake dynamics are preserved under isoflurane anesthesia. *Neuroscience Letters*, 606, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.046>
- Cannella, N., Cosa-Linan, A., Roscher, M., Takahashi, T. T., Vogler, N., Wängler, B., & Spanagel, R. (2017). [18F]-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in rats with prolonged cocaine self-administration suggests potential brain biomarkers for addictive behavior. *Frontiers in Psychiatry*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00218>
- Celada, P., Victoria Puig, M., & Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00025>
- Chiueh, C. C., & Kopin, I. (1978). Centrally mediated release by cocaine of endogenous epinephrine and norepinephrine from the sympathoadrenal medullary system of unanesthetized rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 205, 148–154.
- Peña, I. D., Gevorkiana, R., & Shi, W. X. (2015). Psychostimulants affect dopamine transmission through both dopamine transporter-dependent and independent mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 764, 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.044>
- Deroche-Gamonet, V., & Piazza, P. V. (2014). Psychobiology of cocaine addiction: Contribution of a multi-symptomatic animal model of loss of control. *Neuropharmacology*, 76, 437–449. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.014>
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Du, C., Tully, M., Volkow, N. D., Schiffer, W. K., Yu, M., Luo, Z., Koretsky, A. P., & Benveniste, H. (2009). Differential effects of anesthetics on Cocaine's pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in brain. *The European Journal of Neuroscience*, 30, 1565–1575. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06931.x>

- Fowler, J. S., & Volkow, N. D. (1998). PET imaging studies in drug abuse. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 36, 163–174. <https://doi.org/10.3109/15563659809028936>
- Fowler, J. S., Volkow, N. D., Ding, Y. S., Logan, J., & Wang, G. (1967). PET imaging studies in drug abuse research. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952 1–30.
- Franks, N. P. (2008). General anaesthesia: From molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9, 370–386. <https://doi.org/10.1038/nrn2372>
- Fueger, B. J., Czernin, J., Hildebrandt, I., Tran, C., Halpern, B. S., Stout, D., Phelps, M. E., & Weber, W. A. (2006). Impact of animal handling on the results of 18 F-FDG PET studies in mice. *Journal of Nuclear Medicine*, 47, 999–1006.
- Gulley, J. M., Hoover, B. R., Larson, G. A., & Zahniser, N. R. (2003). Individual differences in cocaine-induced locomotor activity in rats: Behavioral characteristics, cocaine pharmacokinetics, and the dopamine transporter. *Neuropsychopharmacology*, 28, 2089–2101. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300279>
- Gutierrez-Barragan, D., Singh, N. A., Alvino, F. G., Coletta, L., Rocchi, F., De Guzman, E., Galbusera, A., Uboldi, M., Panzeri, S., & Gozzi, A. (2022). Unique spatiotemporal fMRI dynamics in the awake mouse brain. *Current Biology*, 32, 631–644.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.015>
- Hess, S., Høilund-Carlsen, P. F., & Alavi, A. (2014). Historic images in nuclear medicine 1976: The first issue of clinical nuclear medicine and the first human FDG study. *Clinical Nuclear Medicine*, 39, 701–703. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000000487>
- Hutchins, G. D., Miller, M. A., Soon, V. C., & Receveur, T. (2012). Small animal PET imaging. *ILAR Journal*, 53, 54–65. [https://doi.org/10.1142/9789812702708\\_0057](https://doi.org/10.1142/9789812702708_0057)
- Jahreis, I., Bascuñana, P., Ross, T. L., Bankstahl, J. P., & Bankstahl, M. (2021). Choice of anesthesia and data analysis method strongly increases sensitivity of 18F-FDG PET imaging during experimental epileptogenesis. *PLoS One*, 16, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260482>
- Jiang, S. Z., Sweat, S., Dahlke, S. P., Loane, K., Drossel, G., Xu, W., Tejada, H. A., Gerfen, C. R., & Eiden, L. E. (2021). Cocaine-dependent acquisition of locomotor sensitization and conditioned place preference requires D1 dopaminergic signaling through a cyclic AMP, NCS-rapegef2, ERK, and Egr-1/Zif268 pathway. *The Journal of Neuroscience*, 41, 711–725. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1497-20.2020>
- Koistinen, H. A., & Zierath, J. R. (2002). Regulation of glucose transport in human skeletal muscle regulation of glucose transport in human skeletal. *Annals of Medicine*, 34, 410–418. <https://doi.org/10.1080/078538902321012351>
- Koob, G. F. (1992). Neural mechanisms of drug reinforcement. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 654, 171–191. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb25966.x>
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2006). Psychostimulants. *Neurobiology of Addiction*, 1, 69–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-41923-9-3.50040-0>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: A neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3, 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Liu, J., Wang, W., Yuan, L., Kan, Y., & Yang, J. (2018). Intense FDG uptake in the muscles due to severe vomiting. *Clinical Nuclear Medicine*, 43, e363–e365. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002184>
- London, E. D., Cascella, N. G., Wong, D. F., Phillips, R. L., Dannals, R. F., Links, J. M., Herning, R., Grayson, R., Jaffe, J. H., & Wagner, H. N. (1990). Cocaine-induced reduppression of glucose utilization in human brain: A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose. *Archives of General Psychiatry*, 47, 567–574. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1990.01810180067010>
- London, E. D., Woolverton, G., Ori, C., & Kines, A. S. (1986). Effects of L-cocaine on local cerebral glucose utilization in the rat. *Neuroscience Letters*, 68, 73–78. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90232-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90232-6)
- Meneret, P., Palard-Novello, X., Cuvilliers, C., Girard, A., & Pontoizeau, C. (2020). Intense increased 18F-FDG uptake of masticator muscles after cocaine use. *Clinical Nuclear Medicine*, 45, 919–920. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000003288>
- Miranda, A., Bertoglio, D., Stroobants, S., Staelens, S., & Verhaeghe, J. (2021). Translation of preclinical PET imaging findings: Challenges and motion correction to overcome the confounding effect of anesthetics. *Frontiers in Medicine*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.753977>
- Miranda, A., Glorie, D., Bertoglio, D., Vleugels, J., De Bruyne, G., Stroobants, S., Staelens, S., & Verhaeghe, J. (2019). Awake 18F-FDG PET imaging of memantine-induced brain activation and test-retest in freely running mice. *Journal of Nuclear Medicine*, 60, 844–850. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.218669>
- Mizuma, H., Shukuri, M., Hayashi, T., Watanabe, Y., & Onoe, H. (2010). Establishment of in vivo brain imaging method in conscious mice. *Journal of Nuclear Medicine*, 51, 1068–1075. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.075184>
- Nestler, E. J., & Lüscher, C. (2019). The molecular basis of drug addiction: Linking epigenetic to synaptic and circuit mechanisms. *Neuron*, 102, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.016>
- Nicolas, C., Tauber, C., Lepelletier, F. X., Chalon, S., Belujon, P., Galineau, L., & Solinas, M. (2017). Longitudinal changes in brain metabolic activity after withdrawal from escalation of cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, 42, 1981–1990. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.109>
- Ogawa, S. K., Tanaka, E., Shin, M. C., Kotani, N., & Akaike, N. (2011). Volatile anesthetic effects on isolated GABA synapses and extrasynaptic receptors. *Neuropharmacology*, 60, 701–710. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.11.016>
- Opacka-Juffry, J., Ahier, R. G., & Cremer, J. E. (1991). Nomifensine-induced increased in extracellular striatal dopamine is enhanced by isoflurane anaesthesia. *Synapse*, 7, 169–171.
- Ori, C., Dam, M., Pizzolato, G., Battistin, L., & Giron, G. (1986). Effects of isoflurane anesthesia on local cerebral glucose utilization in the rat. *Anesthesiology*, 65, 152–156.
- Parvaz, M. A., Alia-Klein, N., Woicik, P. A., Volkow, N. D., & Goldstein, R. Z. (2011). Neuroimaging for drug addiction and related behaviors. *Bone*, 22, 609–624. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.055>
- Pontieri, F. E., Mainero, C., La Riccia, M., Passarelli, F., & Orzi, F. (1995). Functional correlates of repeated administration of cocaine and apomorphine in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 284, 205–209. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00441-M](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00441-M)
- Porrino, L. J. (1993). Functional consequences of acute cocaine treatment depend on route of administration. *Psychopharmacology*, 112, 343–351.
- Porrino, L. J., Esposito, R. U., Seeger, T. F., Crane, A. M., Pert, A., & Sokoloff, L. (1984). Metabolic mapping of the brain during rewarding self-stimulation. *Science*, 224, 306–309.
- Porrino, L. J., Domer, F. R., Crane, A. M., & Sokoloff, L. (1988). Selective alterations in cerebral metabolism within the mesocortico-limbic dopaminergic system produced by acute cocaine administration in rats. *Neuropsychopharmacology*, 1(2), 109–118. [https://doi.org/10.1016/0893-133x\(88\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0893-133x(88)90002-4)
- Prando, S., Carneiro, C. D. G., Otsuki, D. A., & Sapienza, M. T. (2019). Effects of ketamine/xylazine and isoflurane on rat brain glucose metabolism measured by 18 F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. *The European Journal of Neuroscience*, 49, 51–61. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.075184>
- Prieto, E., Collantes, M., Delgado, M., Juri, C., García-García, L., Molinet, F., Fernández-Valle, M. E., Pozo, M. A., Gago, B., Martí-Climent, J. M., Obeso, J. A., & Peñuelas, I. (2011). Statistical parametric maps of 18F-FDG PET and 3-D autoradiography in the rat brain:

- A cross-validation study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 38, 2228–2237. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1905-y>
- Ranjbar-Slamloo, Y., & Fazlali, Z. (2020). Dopamine and noradrenaline in the brain; overlapping or dissociate functions? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00334>
- Reinking, M. F., & Osman, M. M. (2009). Prospective evaluation of physiologic uptake detected with true whole-body 18 F-FDG PET / CT in healthy subjects. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 37, 31–37. <https://doi.org/10.2967/jnmt.108.055004>
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 18, 247–291. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90013-P](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90013-P)
- Sakamoto, S., Nakao, S., Masuzawa, M., Inada, T., Maze, M., Franks, N. P., & Shingu, K. (2006). The differential effects of nitrous oxide and xenon on extracellular dopamine levels in the rat nucleus accumbens: A microdialysis study. *Anesthesia and Analgesia*, 103, 1459–1463. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000247792.03959.f1>
- Schöll, M., Damián, A., & Engler, H. (2014). Fluorodeoxyglucose PET in neurology and psychiatry. *PET Clinics*, 9, 371–390.
- Shimoi, K., Ravasi, L., Schmidt, K., Soto-montenegro, M. L., Esaki, T., Seidel, J., Jagoda, E., Sokoloff, L., Green, M. V., & Eckelman, W. C. (2003). Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with 18 F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling. *Journal of Nuclear Medicine*, 45, 665–672.
- Shreve, P. D., Anzai, Y., & Wahl, R. L. (1999). Pitfalls in oncologic diagnosis with FDG PET imaging: Physiologic and benign variants. *Radiographics*, 19, 61–77.
- Sofuoglu, M., Nelson, D., Babb, D. A., & Hatsukami, D. K. (2001). Intravenous cocaine increases plasma epinephrine and norepinephrine in humans. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 68, 455–459. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00482-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00482-8)
- Spangler-Bickell, M. G., de Laat, B., Fulton, R., Bormans, G., & Nuyts, J. (2016). The effect of isoflurane on 18F-FDG uptake in the rat brain: A fully conscious dynamic PET study using motion compensation. *EJNMMI Research*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13550-016-0242-3>
- Spelta, L. E. W., Torres, Y. Y. S., Franco de Oliveira, S. C. W. S. E., Yonamine, M., Bailey, A., Camarini, R., Garcia, R. C. T., & Marcourakis, T. (2022). Chronic escalating-dose and acute binge cocaine treatments change the hippocampal cholinergic muscarinic system on drug presence and after withdrawal. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 447, 116068. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116068>
- Suzuki, C., Kosugi, M., & Magata, Y. (2021). Conscious rat PET imaging with soft immobilization for quantitation of brain functions: Comprehensive assessment of anesthesia effects on cerebral blood flow and metabolism. *EJNMMI Research*, 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13550-021-00787-6>
- Toyama, H., Ichise, M., Liow, J., Modell, K. J., Vines, D. C., Esaki, T., Cook, M., Seidel, J., Sokoloff, L., Green, M. V., & Innis, R. B. (2004a). Absolute quantification of regional cerebral glucose utilization in mice by 18F-FDG small animal PET scanning and 2-14C-DG autoradiography. *Journal of Nuclear Medicine*, 45, 1398–1405.
- Toyama, H., Ichise, M., Liow, J. S., Vines, D. C., Seneca, N. M., Modell, K. J., Seidel, J., Green, M. V., & Innis, R. B. (2004b). Evaluation of anesthesia effects on [18F]FDG uptake in mouse brain and heart using small animal PET. *Nuclear Medicine and Biology*, 31, 251–256. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(03\)00124-0](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(03)00124-0)
- Tsukada, H., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Ohba, H., Sato, K., Harada, N., & Nakanishi, S. (1999). Isoflurane anesthesia enhances the inhibitory effects of cocaine and GBR12909 on dopamine transporter: PET studies in combination with microdialysis in the monkey brain. *Brain Research*, 849, 85–96. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02018-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02018-1)
- Ungless, M. A., Whistler, J. L., Malenka, R. C., & Bonci, A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*, 411, 583–587. <https://doi.org/10.1038/35079077>
- van der Veen, D. R., Shao, J., Chapman, S., Leevy, W. M., & Duffield, G. E. (2012). A 24-hour temporal profile of in vivo brain and heart PET imaging reveals a nocturnal peak in brain 18F-fluorodeoxyglucose uptake. *PLoS One*, 7(2), e31792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031792>
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wolf, A. P., Hitzemann, R., Dewey, S., Bendriem, B., Alpert, R., & Hoff, A. (1991). Changes in brain glucose metabolism in cocaine in brain glucose and withdrawal. *The American Journal of Psychiatry*, 148, 621–626. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.5.621>
- Volkow, N. D., Hitzemann, R., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Wolf, A. P., Dewey, S. L., & Handlesman, L. (1992). Long-term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. *Synapse*, 11, 184–190. <https://doi.org/10.1002/syn.890110303>
- Volkow, N. D., Koob, G. F., & McLellan, A. T. (2016). Neurobiologic advances from the brain disease model of addiction. *The New England Journal of Medicine*, 374, 363–371. <https://doi.org/10.1056/nejmra1511480>
- Volkow, N. D., Tomasi, D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Telang, F., Goldstein, R. Z., Alia-Klein, N., & Wong, C. (2011). Reduced metabolism in brain “control networks” following cocaine-cues exposure in female cocaine abusers. *PLoS One*, 6(2): e16573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016573>
- Votaw, J., Byas-Smith, M., Hua, J., Voll, R., Martarello, L., Levey, A. I., Bowman, F. D. B., & Goodman, M. (2003). Interaction of isoflurane with the dopamine transporter. *Anesthesiology*, 98, 404–411. <https://doi.org/10.1097/0000542-200302000-00021>
- Wallberg-Henriksson, H., Constable, S. H., Young, D. A., & Holloszy, J. O. (1988). Glucose transport into rat skeletal muscle: Interaction between exercise and insulin. *Journal of Applied Physiology*, 65, 909–913.
- Wang, G., Volkow, N. D., Fowler, J. S., Cervany, P., Hitzemann, R. J., Pappas, N. R., Wong, C. T., & Felder, C. (1999). Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. *Life Sciences*, 64, 775–784.
- Wang, W., Kan, Y., Liu, J., Yuan, L., & Yang, J. (2018). Increased skeletal muscle FDG uptake due to sexual activity on PET/CT in a middle age woman. *Clinical Nuclear Medicine*, 43, 837–839. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002228>
- Wang, Y., Shao, F., Zhang, L., Luo, X., & Chen, Y. (2017). Increased 18F-FDG uptake in multiple muscles in a patient with violent cough. *Clinical Nuclear Medicine*, 42, 451–453. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001655>
- Xu, H., Das, S., Sturgill, M., Hodgkinson, C., Yuan, Q., Goldman, D., & Grasing, K. (2017). Extracellular dopamine, acetylcholine, and activation of dopamine D1 and D2 receptors after selective breeding for cocaine self-administration in Rats Haiyang. *Physiology & Behavior*, 234, 2475–2487. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4640-7>
- Yeung, H. W. D., Grewal, R. K., Gonen, M., Schoder, H., & Larson, S. M. (2003). Patterns of 18 F-FDG uptake in adipose tissue and muscle: A potential source of. *Journal of Nuclear Medicine*, 44, 1789–1797.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**TABLE S1** Descriptive statistics and *p* values of blood glucose levels comparing images one (baseline) and two (after cocaine or saline, depending on the evaluated group)



**TABLE S2** Mean and standard error of normalized SUV from all PET data

**TABLE S3** Statistical data of pairwise comparisons of [<sup>18</sup>F]FDG uptake after cocaine administration in anesthesia group compared to Home cage and Open field groups. Significant values are bold

**FIGURE S1** Whole-brain time-activity curve from animals keep under anesthesia during the protocol validation. Every point represents the end of an interval of 5 min, as images were reconstructed in 15 frames of 5 min

**Supplementary S2** Transparent Science Questionnaire for Authors

**How to cite this article:** Spelta, L. E. W., Real, C. C., Buchpiguel, C. A., de Paula Faria, D., & Marcourakis, T. (2022). [<sup>18</sup>F]FDG brain uptake of C57Bl/6 male mice is affected by locomotor activity after cocaine use: A small animal positron emission tomography study. *Journal of Neuroscience Research*, 100, 1876–1889. <https://doi.org/10.1002/jnr.25102>