

Cristiane Ribeiro de Carvalho

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA HEDÔNICA EM RATOS:
POTENCIAL EFEITO DO CANABIDIOL**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutora em Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto
Takahashi

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carvalho, Cristiane Ribeiro de
Envolvimento do sistema endocanabinoide na
reconsolidação da memória hedônica em ratos: Potencial efeito
do canabidiol / Cristiane Ribeiro de Carvalho ;
orientador, Reinaldo Naoto Takahashi - Florianópolis, SC,
2014.
141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Sistema endocanabinoide. 3.
Canabidiol . 4. Reconsolidação da memória contextual. 5.
Modelo animal de dependência . I. Takahashi, Reinaldo
Naoto. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

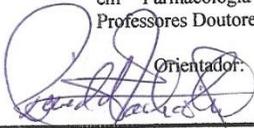
“Envolvimento do sistema endocanabinoide na reconsolidação de memórias
hedônicas em ratos Wistar: Potencial efeito do Canabidiol”

por

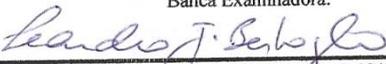
CRISTIANE RIBEIRO DE CARVALHO.

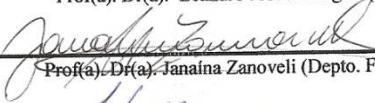
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos
membros titulares da Banca Examinadora (Port.
13/PPGFMC/2014) do Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia - UFSC, composta pelos
Professores Doutores:

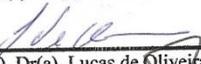
Orientador:


Prof(a). Dr(a). Reinaldo Naoto Takahashi
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)

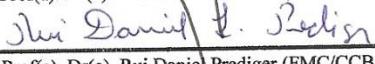
Banca Examinadora:


Prof(a). Dr(a). Leandro José Bertoglio (FMC/CCB/UFSC)

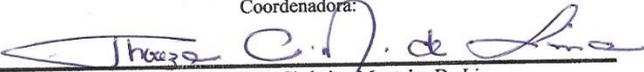

Prof(a). Dr(a). Janaina Zanoveli (Depto. Farmacologia/UFPR)


Prof(a). Dr(a). Lucas de Oliveira Alvares (Depto. Biofísica/UFRGS)


Prof(a). Dr(a). Giles Alexander Era (FMC/CCB/UFSC)


Prof(a). Dr(a). Rui Daniel Prediger (FMC/CCB/UFSC)

Coordenadora:


Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 10 de abril 2014.

Este trabalho é dedicado ao meu
filho Carlos Eduardo e ao meu
querido pai José Eracleo de
Carvalho (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Reinaldo, meu orientador, pela oportunidade e pela confiança em mim depositada. Agradeço, a orientação, os ensinamentos e as críticas construtivas, ao longo desses quase 8 anos de convivência, desde a iniciação científica;

Ao Dr. Fabrício Alano Pamplona, pela amizade, colaboração, suporte científico e pelo entusiasmo pelo trabalho;

A Jéssica Silveira da Cruz, pela convivência amigável, pelo envolvimento com o trabalho e, principalmente, pelo auxílio técnico em diversos experimentos;

Ao Matheus Garcia de Fragas, pelo auxílio em alguns experimentos;

Aos Professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Drs. Giles A. Rae, Rui Daniel S. Prediger, Leandro José Bertoglio e Geison Izídio, que avaliaram o meu exame de qualificação de doutorado e contribuíram com suas sugestões para este documento;

Aos Professores Drs. Janaína Menezes Zanovelli, Lucas de Oliveira Alvares, Giles Alexander Rae, Leandro José Bertoglio, Rui Daniel S. Prediger e Thereza Christina Monteiro de Lima, pelas críticas e sugestões que contribuíram para este trabalho;

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos conhecimentos que contribuíram para a minha formação científica;

Aos ex-colegas do laboratório Tatiane, Lívia, Marília, Thiago, Sanmara, Vanessa e Meigy, por auxiliarem nas atividades de rotina do laboratório, e por tornarem o convívio mais agradável e produtivo;

Aos ex-colegas de laboratório, “os veteranos,” Drs. Fabrício Assini, Fabrício Pamplona, Pablo Pandolfo e Rafael Mariano Bitencourt, pela convivência amigável, pelos ensinamentos e pelos momentos de distração;

Aos colegas do departamento Alessandra, Ana Carolina, Chris Mochny, Cristina Stern, Filipe, Flora, Lucas, Paulo, Renata, Samantha e Wagner pela prestatividade e pelo convívio agradável;

A todos os colegas que tive a oportunidade de conhecer, trocar ideias, ouvir histórias ou apenas dividir uma xícara de café;

Ao Eduardo, pelo amor, carinho, companheirismo, dedicação e incentivo que temos um com o outro. Agradeço também o entusiasmo pelo meu trabalho e o imenso apoio em todos os momentos;

Ao meu filho, Carlos Eduardo, por ser minha motivação diária e por tornar minha vida mais bela e alegre todos os dias;

Aos meus pais José Eracleo e Maria das Dores pelos bons exemplos de honestidade e de outros valores que me deram;

À minha mãe e aos meus irmãos, Marcelo e Ana Paula, pelo amor, carinho incondicionais; E aos meus cunhados, Laisa e Sandro, pela amizade;

Aos meus sobrinhos lindos, Laura, Pedro, Antônio, Miguel e Lorena, por trazerem mais alegrias à minha vida;

Aos meus sogros, Neuza e Geovani pelo apoio e amizade;

Às minhas amigas Betina, Bruna, Eliane, Franciane, Laisa, Nicolle, pela amizade e por tornarem minha vida mais alegre;

A todos os funcionários da UFSC pela prestatividade e pelo auxílio técnico;

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro;

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”.
(Albert Einstein)

RESUMO

Indivíduos dependentes constantemente apresentam recaídas após a evocação de memórias relacionadas à experiência com a droga. O sistema endocanabinoide está criticamente envolvido em processos específicos de memória, motivação e reforço induzido por drogas. Neste sentido, o propósito deste estudo foi avaliar o impacto do sistema endocanabinoide e os efeitos do canabidiol (CBD), um componente não psicotomimético da *Cannabis sp.*, sobre a reconsolidação da memória relacionada à droga em ratos. Imediatamente após a reativação da memória, grupos independentes de ratos previamente treinados no protocolo de preferência condicionada ao lugar induzida pela morfina (PCL-morfina), receberam uma única injeção sistêmica de diferentes agentes canabinoides, incluindo: antagonista seletivo dos receptores CB1 (rimonabanto) e CB2 (AM630); agonista não seletivo (WIN 55,212-2); inibidor do catabolismo da anandamida (URB597); agonista endógeno 2-araquidonoilglicerol (2-AG, infusão intra-hipocampal) ou CBD; Também foram avaliados os efeitos do tratamento com CBD sobre a reinstalação da PCL induzida pela morfina e na subsequente abstinência motivacional precipitada pela naltrexona. Os testes ocorreram 1 e 2 semanas pós-tratamento. O bloqueio dos receptores canabinoides CB1 prejudicou de maneira persistente a PCL induzida pela morfina, enquanto o agonista seletivo dos receptores CB2 (AM1241) apresentou uma tendência em reduzir o parâmetro de PCL. A ativação direta pelo agonista WIN 55,212-2, assim como o bloqueio seletivo dos receptores CB2, não produziram efeitos significativos sobre a PCL. Entretanto, a inibição da degradação da anandamida promoveu um aumento transitório da PCL, que foi mediado pelos receptores CB1. A ativação intra-hipocampal dos receptores canabinoides, pelo 2-AG, também aumentou a PCL. Adicionalmente, o CBD interrompeu a reconsolidação da memória relacionada à droga e enfraqueceu a subsequente abstinência motivacional condicionada no mesmo contexto. Nossos achados sugerem que os endocanabinoides são necessários para a desestabilização da memória hedônica, reativada pela reexposição ao contexto como parte do processo de reconsolidação. Adicionalmente, fornece evidências do efeito do CBD em prejudicar as memórias relacionadas à droga pelo bloqueio da reconsolidação, ressaltando seu potencial terapêutico em atenuar as recaídas associadas às memórias relacionadas à droga.

Palavras-chave: Dependência às drogas. Preferência condicionada ao lugar. Reconsolidação da memória. Morfina. Sistema endocanabinoide. Canabidiol.

ABSTRACT

Drug addicts constantly relapse to drug seeking after recall of memories linked to the drug experience. The endocannabinoid system is critically involved in specific processes of memory, motivation and drug reinforcement. The purpose of this study was to investigate the impact of the endocannabinoid system, along with the effects of cannabidiol (CBD), a non-psychoactive component of *Cannabis sp.*, on reconsolidation of drug-related memories in rats. Immediately post-reactivation memory, independent groups of rats - previously trained on morphine conditioned place preference (morphine-CPP) - received a single systemic injection of different cannabinoid drugs including: cannabinoid CB1 receptor antagonist (rimonabant); CB2-selective agonist (AM1241) or antagonist (AM630); non-selective agonist CB1/CB2 (WIN 55,212-2); inhibitor of catabolism of anandamide (URB597); endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG, intra-hippocampal infusion, exceptionally) or CBD. We also investigate the effects of CBD post-reactivation treatment on reinstatement of morphine reward memory and on subsequent naltrexone-precipitated conditioned withdrawal. Morphine-CPP was retested, most of time 1 and 2 weeks later. Blockade of CB1 cannabinoid receptors impaired CPP reconsolidation of morphine-CPP at both tests 1 and 2 weeks post-reactivation, whereas selective CB2 agonist (AM1241) tended to reduce the morphine-CPP score. Neither the direct activation of receptors by synthetic agonist WIN 55,212-2 nor selective blockade of CB2 receptors produced significant effects on morphine-CPP. However, boosting endocannabinoid signaling by inhibition of anandamide metabolism promoted a transient CB1-dependent enhancement of CPP score. Moreover intra-hippocampal activation of cannabinoid receptors by 2-AG promoted an increase in morphine-CPP. Additionally, CBD disrupted the reconsolidation of drug-memory, blocked the reinstatement of morphine-CPP and weakened the subsequent conditioned motivational withdrawal in the same context. Our findings suggest that endocannabinoids are required for the destabilization of hedonic memories during context re-exposure as part of the reconsolidation process. Additionally, our study provide evidence for the disruptive effect of CBD on drug-related memories by the blockade of their reconsolidation, and highlight their therapeutic potential to attenuate the relapse associated with drug-related memories.

Keywords: Addiction. Conditioned place preference. Memory reconsolidation. Morphine. Endocannabinoid system. Cannabidiol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama representativo de todas memórias relacionadas à droga.	27
Figura 2	Etapas do processo de memória.	31
Figura 3	Mecanismos neuromoleculares envolvidos na reconsolidação da memória.	35
Figura 4	Representação esquemática do sistema endocanabinoide	39
Figura 5	Representação do efeito modulatório dos endocanabinoides através dos receptores CB1 na via mesocorticolímbica.	37
Figura 6	Fotografia da caixa de preferência condicionada ao lugar	53
Figura 7	Esquema representativo do procedimento experimental da memória de reconhecimento de objetos	58
Figura 8	Fotografia do labirinto em cruz elevado	59
Figura 9	Esquema ilustrativo dos locais de infusão no hipocampo em plano rostrocaudal.	60
Figura 10	Padronização do protocolo de reconsolidação da PCL induzida pela morfina.	64
Figura 11	Esquema representativo do procedimento de reconsolidação da memória condicionada à droga.	66
Figura 12	Efeitos dos antagonistas canabinoides CB1 e CB2 sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina.	69
Figura 13	Efeito da ativação direta e indireta dos receptores canabinoides sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina.	71
Figura 14	Os efeitos do inibidor da enzima FAAH (URB597) sobre a reconsolidação PCL associada à morfina, são mediados pela ativação dos receptores CB1.	74
Figura 15	Efeito da infusão bilateral no hipocampo do agonista endógeno (2-AG) dos receptores canabinoides sobre a reconsolidação associada à morfina.	76
Figura 16	Efeitos do canabidiol sobre a reconsolidação memória condicionada à morfina.	78
Figura 17	Efeito da administração do canabidiol pós-reativação, sobre a reinstalação da PCL.	81
Figura 18	Níveis plasmáticos de corticosterona dos ratos	83

	submetidos à reinstalação induzida pelo estresse após o teste do labirinto em cruz elevado.	
Figura 19	Efeito da administração do canabidiol após a reativação da memória sobre a subsequente aversão condicionada ao contexto.	85
Figura 20	Efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da PCL induzida pela cocaína.	87
Figura 21	Efeito da administração do canabidiol pós-reativação da memória sobre a expressão da PCL induzida pela morfina, em animais que foram condicionados sob tratamento crônico com o opioide e tiveram a memória reativada após 7 dias de abstinência.	89
Figura 22	Efeito da administração aguda de canabidiol após a reativação sobre a memória de reconhecimento de objetos.	91
Figura 23	O pré-tratamento com dose subefetiva de canabidiol não altera os efeitos causados pela administração do URB597, inibidor da degradação da anandamida.	93
Figura 24	Efeitos da coadministração de doses subefetivas do canabidiol, com os antagonistas seletivos CB1, CB2 ou com o agonista, sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina.	95
Figura 25	Mecanismo sugerido para o envolvimento dos endonabinoides na reconsolidação da memória condicionada à droga.	103
Figura 26	Possível envolvimento dos receptores CB2 nos efeitos do canabidiol sobre a reconsolidação da memória.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios de diagnóstico da dependência de acordo a quinta edição do Manual Estatístico dos Distúrbios Mentais.	20
Tabela 2	Modulação do sistema endocanabinoide através dos receptores CB1, em modelos animais de dependência.	43
Tabela 3	Efeitos da manipulação farmacológica dos receptores CB1 na reconsolidação de memórias pavlovianas.	45
Tabela 4	Fármacos e as doses que foram utilizadas no presente estudo.	51
Tabela 5	Comportamentos do tipo ansiedade avaliados no LCE, após o teste de reinstalação da preferência condicionada ao lugar induzida pelo estresse.	82
Tabela 6	Sumário dos principais resultados obtidos.	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2-AG – 2-Araquidonilglicerol
ANOVA – Análise de variância
ATV – Área tegmental ventral
CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas
CPF – Córtex pré-frontal
CBD – Canabidiol
DAGL – diacilglicerol lipase
DSMV – Manual Estatístico de Distúrbios Mentais, quinta edição)
- DSE – Supressão da excitação induzida por despolarização
DSI – Supressão da inibição induzida por despolarização
eCB – Endocanabinoide
EUA – Estados Unidos da América
FAAH – Amidohidrolase de ácidos graxos (do inglês, *fatty acid amide hydrolase*)
GABA – Ácido γ -aminobutírico
i.p. – Intraperitoneal
s.c. – Subcutâneo
i.m. – Intramuscular
LCE – Labirinto em cruz elevado
LTD – Depressão de longa duração (do inglês, *long-term depression*)
LTP – Potenciação de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*)
MAGL – Monoacilglicerol lipase
MSN – Neurônios espinhosos médios (do inglês, *medium-sized spiny neurons*)
NAc – Núcleo *accumbens*
PBS – Solução tampão fosfato-salina (do inglês, *phosphate buffered saline*)
PCL – Preferência condicionada ao lugar (PCL)
PPAR – Receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomos
SNC – Sistema nervoso central
THC – Δ^9 Tetrahydrocannabinol
TRPV – Receptores de potencial transitório

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Cenário atual das drogas de abuso	19
1.2. Sistema de recompensa	21
1.3. Dependência às drogas como distúrbio de memória	23
1.4. Memórias relacionadas à droga	26
1.5. Formação e manutenção da memória	29
1.6. Reconsolidação da memória em modelos animais de dependência	32
1.7. Sistema endocanabinoide	35
1.8. Sistema endocanabinoide & reforço induzido por drogas de abuso	40
1.9. Sistema endocanabinoide em modelos animais de dependência	37
1.10. Canabinoides e memória	44
1.11. Potencialidades terapêuticas do canabidiol	46
2. JUSTIFICATIVA	48
3. OBJETIVOS	49
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1. Animais	50
4.2. Drogas	50
4.3. Procedimentos experimentais	52
4.3.1. Preferência condicionada ao lugar	52
4.3.1.1. Aquisição da preferência condicionada ao lugar	53
4.3.1.2. Reconsolidação da preferência condicionada ao lugar	54
4.3.1.3. Reinstalação da preferência condicionada ao lugar	55
4.3.2. Tarefa de reconhecimento de objetos	56
4.3.3. Labirinto em cruz elevado	58
4.3.4. Cirurgia estereotáxica e microinfusão hipocampal	59
4.3.5. Controle histológico do local da infusão	60
4.3.6. Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona	61
4.4. Delineamento experimental	61
4.5. Análise estatística	62

5. RESULTADOS	63
5.1. Padronização do protocolo de reconsolidação da memória condicionada à morfina.	63
5.1.1 Experimento 1: Padronização do procedimento de reconsolidação da preferência condicionada à morfina.	63
5.1.2 Experimento 2: Efeito amnésico temporal da administração do MK801 após a reativação sobre a reconsolidação.	64
5.2. Envolvimento do sistema endocanabinoide na reconsolidação de memórias associadas à droga.	65
5.2.1 Experimento 3: Participação dos receptores canabinoides CB1 e CB2 na reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.	67
5.2.2 Experimento 4: Impacto da ativação direta e indireta dos receptores canabinoides na reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.	69
5.2.3 Experimento 5: Os efeitos da inibição da FAAH sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina são mediados pelos receptores CB1	73
5.2.4 Experimento 6: Efeitos da infusão intra-hipocampal do endocanabinoide 2-AG sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.	74
5.3. Efeitos do canabidiol sobre a reconsolidação de memórias contextuais ligadas à droga em ratos.	76
5.3.1 Experimento 7: Efeitos da administração sistêmica do canabidiol, pós-reativação, sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.	76
5.3.2 Experimento 8: Influência da administração aguda do canabidiol, sobre a reinstalação da preferência condicionada à morfina, parâmetros do tipo ansiedade e níveis plasmáticos de corticosterona em ratos.	78
5.3.3 Experimento 9: Efeito da administração aguda do canabidiol pós-reativação sobre a	83

	subsequente abstinência motivacional condicionada no mesmo contexto.	
5.3.4.	Experimento 10: Efeito da administração aguda de canabidiol pós-reativação sobre a reconsolidação da memória condicionada à cocaína.	85
5.3.5.	Experimento 11: Efeitos da administração aguda do canabidiol pós-reativação sobre a expressão da PCL em ratos mantidos sob tratamento crônico com a morfina durante a aquisição da memória condicionada ao opioide.	87
5.3.6.	Experimento 12: Efeitos da administração aguda de canabidiol pós-reativação, sobre a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos.	89
5.4.	Investigação do envolvimento do sistema eCB nos efeitos do CBD sobre a reconsolidação da memória contextual ligada à morfina.	91
5.4.1.	Experimento 13: Avaliar se o pré-tratamento de uma dose subefetiva de CBD, reverte o aumento da PCL promovido pela administração do URB597, após a reativação da memória.	91
5.4.2	Experimento 14: Investigar se a diferentes combinações de doses subefetivas do canabidiol coadministradas com um agente canabinoide seletivo, logo após a reativação, poderiam interferir na reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.	93
5.5.	Sumário dos resultados	96
6.	DISCUSSÃO	97
7.	CONCLUSÃO	115
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
9.	ANEXO	141
9.1.	Lista de publicações durante o doutorado	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Cenário atual das drogas de abuso*

De acordo com o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas, realizado pelo INPAD (Instituto Nacional de Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas) da Universidade Federal de São Paulo, entre os anos de 2006 e 2012, aproximadamente 12% da população brasileira relatou algum problema relacionado ao uso abusivo de drogas ou à dependência (LARANJEIRA *et al.*, 2013). O álcool e o tabaco são as drogas que apresentam maior prevalência de consumo na população. Entre as drogas ilícitas, a maconha é a que exibe maior prevalência de consumo. Estima-se que cerca de 3% da população consome maconha pelo menos uma vez por mês. Em relação à cocaína e seus derivados, o percentual de consumo anual é de 0,7%. De acordo com a mesma pesquisa, o uso abusivo de opioides foi considerado pouco frequente no Brasil quando comparado a outros países, sendo que aproximadamente 0,2% dos indivíduos relatou ter consumido opioides pelo menos uma vez no último ano (LARANJEIRA *et al.*, 2013). De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas, publicado em 2013, a maconha e outras preparações derivadas de plantas do gênero *Cannabis* ainda são as drogas ilícitas mais consumidas no mundo. O documento indica que em alguns países da Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) existe uma estabilidade no uso de drogas tradicionais, como a cocaína e a heroína. Entretanto, o mesmo documento destaca o aumento substancial do consumo de cocaína no Brasil e aponta nosso país como o segundo maior consumidor de cocaína no mundo, atrás apenas dos EUA (UNODC, 2013). Segundo este estudo, o consumo de cocaína dobrou nos últimos seis anos, sendo que 1,75% da população brasileira com idade entre 15 e 64 anos consome a droga pelo menos uma vez por ano. O estudo também relata o uso não medicinal de fármacos psicotrópicos, incluindo psicoestimulantes e opioides, como um crescente problema de saúde em vários países, entre eles o Brasil (UNODC, 2013). Em relação ao uso recreativo de opioides o Relatório Mundial sobre Drogas indica o Brasil como o maior mercado da América do Sul, com cerca de 600 mil usuários. Isso corresponde a 0,5% da população entre 12 e 65 anos, e com o maior índice de prevalência anual (uso pelo menos uma vez ao ano). Cabe ressaltar que a prevalência anual do uso de heroína é baixa (0,05% da população adulta), sendo que a maior parte dos indivíduos faz uso de opioides sintéticos (UNODC, 2013).

Ao longo dos anos, a dependência às drogas vem sendo considerada uma doença psiquiátrica, ao invés de simplesmente um

desvio de personalidade ou a falta de força de vontade em abandonar o “vício”. Enquanto alguns usuários regulares de drogas deixam de usá-las por conta própria, para muitos a dependência torna-se um problema crônico. O desenvolvimento da dependência ocorre devido a uma complexa interação entre fatores sociais, biológicos e genéticos (ROBBINS & EVERITT, 1999).

Tabela 1. Critérios de diagnóstico da dependência de acordo com o DSMV.

Critérios de diagnóstico para os transtornos relacionados ao uso de substâncias (dependência)	Condições suficientes	Condições necessárias
Falha recorrente em cumprir obrigações importantes;	Dependência leve e moderada (1-5)	
Uso frequente da substância em situações fisicamente perigosas;		
Uso continuado da substância, apesar de problemas sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes;		
Tolerância;		
Síndrome de abstinência;		
A substância é frequentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido;	Dependência severa (6-11)	
Desejo persistente ou incapacidade de controlar o desejo;		
Fissura (“ <i>craving</i> ”);		
Gasto importante de tempo na obtenção da substância, ou no uso, ou se recuperando de seus efeitos;		
Negligenciar as atividades sociais, ocupacionais ou familiares em detrimento do uso da substância;		
Uso continuado apesar do conhecimento de problemas causados por ou agravados pelo uso da substância;		

Condições suficientes e necessárias para caracterizar o transtorno psiquiátrico conforme a presença dos sintomas no período de 1 ano: (0-1) não acometido pela doença, (2-3) dependência leve, (4-5) moderada ou (6 ou mais) severa (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

De acordo com a quinta versão do Manual Estatístico para Distúrbios Mentais (*do inglês DSM-V*), os transtornos relacionados ao uso de drogas - terminologia utilizada para a dependência às drogas - podem diferir quanto à gravidade da patologia entre os indivíduos acometidos, em relação a uma mesma droga (Tabela 1). Assim, a dependência às drogas é uma doença crônica caracterizada pela perda de controle sobre o uso da droga e pela presença da “fissura”, ou seja, o desejo compulsivo pela droga (PIAZZA & DEROCHE-GAMONET, 2013). Além disso, o uso repetido da droga pode levar ao surgimento da tolerância (necessidade de doses maiores da droga para manter um efeito estável) e da síndrome de abstinência (sinais e sintomas que aparecem quando o uso da droga é interrompido) (PIAZZA & DEROCHE-GAMONET, 2013; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Entretanto, cabe ressaltar que a probabilidade de desenvolvimento da tolerância e as manifestações da abstinência diferem marcadamente entre as diferentes drogas de abuso.

1.2 Sistema de recompensa

O sistema de recompensa foi identificado na década de 1950 por Olds e Milner, quando investigavam mecanismos de aprendizagem através da técnica de autoestimulação elétrica intracranial em ratos. Os autores relataram que ratos em gaiolas de condicionamento pressionavam continuamente a alavanca em troca de um breve pulso de estimulação elétrica no feixe prosencefálico medial (OLDS & MILNER, 1954). Posteriormente, descobriu-se que um subgrupo de neurônios dopaminérgicos projeta-se diretamente da área tegmental ventral (ATV) para o *nucleus accumbens* (NAc) através do feixe prosencefálico medial (WISE, 2004).

A via mesocorticolímbica é constituída por neurônios dopaminérgicos que se projetam da ATV para o estriado ventral (NAc) e dorsal e para o córtex pré-frontal (CPF), e interage com projeções glutamatérgicas provenientes de outras estruturas límbicas como hipocampo e amígdala (WISE, 2004), que conjuntamente regulam respostas aos reforços naturais. A função fisiológica do sistema de recompensa é motivar ações necessárias para a sobrevivência do indivíduo ou para a perpetuação da espécie (por exemplo, consumo de água e alimentos e comportamento sexual). As drogas de abuso também ativam a via mesocorticolímbica. Isso é crucial para os efeitos reforçadores iniciais das drogas de abuso e contribui fortemente para o desenvolvimento da dependência (NESTLER, 2005; HYMAN *et al.*, 2006; KAUER & MALENKA, 2007).

O principal componente celular, que compreende cerca de 95% dos neurônios do NAc e do estriado dorsal em roedores, são os neurônios GABAérgicos, denominados de neurônios espinhosos médios (do inglês *medium-sized spiny neurons*, *MSN*) que expressam receptores dopaminérgicos (D1 ou D2). Os outros 5% remanescentes são interneurônios GABAérgicos e colinérgicos (TEPPER & BOLAM, 2004).

O NAc pode ser dividido em duas porções, a cortical e a central, que são anatômica e funcionalmente distintas e cuja denominação em inglês é “*shell*” e “*core*”, respectivamente (HEIMER *et al.*, 1991). A porção central projeta-se para ATV e para a parte compacta/reticulada da substância negra, contém neurônios GABAérgicos MSN que expressam exclusivamente os receptores dopaminérgicos do subtipo D1. O NAc *core* está mais relacionado com a função motora, assemelhante ao estriado dorsal (OLMOS & HEIMER, 1999). Já a porção cortical está mais relacionada com estruturas límbicas e contém neurônios GABAérgicos MSN que coexpressam receptores dopaminérgicos (D1 e D2), sintetizam neuropeptídeos opioides. Diferentemente do que ocorre no NAc *core* e no estriado dorsal, os neurônios GABAérgicos MSN da porção *shell* do NAc projetam-se de maneira complexa e difusa (OLMOS & HEIMER, 1999; MATAMALES *et al.*, 2009).

Os neuropeptídeos opioides β -endorfina, encefalina e dinorfina originam-se a partir dos seus respectivos precursores proteicos: proopiomelanocortina, proencefalina e prodinorfina. Esses peptídeos exibem diferentes afinidades pelos receptores opioides: a β -endorfina exibe afinidade semelhante pelos receptores μ e δ opioides, a encefalina apresenta afinidade maior pelo receptor δ opioide, mas também se liga ao receptor μ , enquanto que a dinorfina apresenta maior afinidade pelo receptor κ opioide. Os receptores opioides μ , κ e δ , são receptores com sete alças transmembrana acoplados à proteína G e que inibem a adenil ciclase. De modo geral, a ativação dos receptores μ e δ medeiam efeitos euforizantes, ao passo que a ativação do receptor κ produz disforia (MUCHA & HERZ, 1985). As encefalinas são amplamente expressas no sistema nervoso central (SNC), particularmente em estruturas implicadas na recompensa e na regulação do estresse, tais como o NAc, a região central da amígdala, o núcleo do leito da estria terminal e o CPF (WILLIAMS & GOLDMAN-RACK, 1993). A neurotransmissão opioide na porção cortical do NAc parece ser crucial na geração das respostas hedônicas de recompensas fisiológicas e induzidas por drogas (PECINA & BERRIGE, 2005).

Os receptores opioides e canabinoides são frequentemente localizados em muitas estruturas encefálicas, incluindo a ATV e o estriado, as quais modulam comportamentos motores e a recompensa (PICKEL *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2001). Além disso, a formação de heterodímeros entre os receptores CB1 e μ e δ opioides também sugere uma cooperação entre os dois sistemas (MARCKIE, 2005; RIOS *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado uma interação funcional entre os sistemas canabinoide e opioide no que se refere à circuitaria neuronal subjacente aos comportamentos motivacionais induzidos pelas drogas de abuso (FATTORE *et al.*, 2004; MALDONADO *et al.*, 2006).

Os efeitos reforçadores primários das diferentes classes de drogas de abuso são decorrentes da ativação direta do prosencéfalo basal (particularmente NAc e núcleo central da amígdala) e/ou ativação indireta da ATV, e consequente liberação de dopamina no NAc (KOOB, 2009). A ativação da via mesolímbica pode ser mediada por vários neurotransmissores, incluindo dopamina, serotonina, peptídeos opioides ou ácido γ -aminobutírico (GABA) (KOOB & LE MOAL, 2005; NESTLER, 2005; KOOB, 2009). A liberação de dopamina no NAc e na ATV é influenciada por impulsos excitatórios, que incluem as projeções glutamatérgicas originadas no córtex, amígdala e hipocampo, bem como pelos impulsos inibitórios que incluem projeções de interneurônios GABAérgicos (JOHNSON, 2004).

1.3 Dependência às drogas como distúrbio de memória

Um corpo substancial de investigações pré-clínicas e clínicas sugere que os fenômenos adaptativos, incluindo as adaptações homeostáticas e o remodelamento sináptico no sistema de recompensa cerebral e em outras estruturas subjacentes aos processos de aprendizagem e memória são cruciais para o desenvolvimento da dependência. Este conjunto de alterações adaptativas, associado a fatores ambientais e sociais contribuem para as recaídas mesmo após longos períodos de abandono do uso. Isso dificulta o tratamento e a manutenção da abstinência e leva ao “ciclo vicioso” da dependência (HYMAN *et al.*, 2006; KOOB *et al.*, 2009; MILTON, 2013).

Ao longo dos anos foram elaboradas diversas teorias para tentar explicar o desenvolvimento da dependência. As teorias iniciais eram baseadas em explicações mais intuitivas, focadas nos efeitos reforçadores das drogas de abuso e nas alterações homeostáticas do sistema de recompensa geradas pelo uso repetido da droga (WIKLER, 1948; KOOB & LE MOAL, 1997; KOOB *et al.*, 1998; WISE, 2002). Neste contexto, a dependência poderia ser considerada um ciclo em espiral

produzido pela “desregulação da homeostasia hedônica” no sistema de recompensa e estruturas relacionadas. O ciclo em espiral aumentaria progressivamente, resultando no uso compulsivo e na perda de controle sobre o uso da droga. Inicialmente, os indivíduos utilizariam a droga para obter um reforço positivo. Com o uso repetido da droga ocorria neuroadaptações duradouras na via mesocorticolímbica, promovendo um “estado hedônico positivo” (KOOB *et al.*, 2009). A interrupção súbita do uso da droga reduziria a liberação de dopamina e serotonina a níveis bem abaixo dos basais, o que levaria à manifestação de um “estado hedônico negativo” (incluindo a síndrome de abstinência). Este estado alostático¹ persistiria por longos períodos, devido à combinação da (i) atividade reduzida do sistema de recompensa, e (ii) do recrutamento do sistema cerebral de estresse ou “anti-recompensa”. Segundo esta vertente, tais adaptações alostáticas constituem uma poderosa fonte de reforço negativo e contribuem para o comportamento compulsivo de busca pela droga que leva às recaídas (KOOB & LE MOAL, 2005).

De fato, o uso de drogas inicia-se pelo aprendizado de que a droga é “gratificante” devido aos seus poderosos efeitos interoceptivos, aumentando assim o desejo de usá-la novamente. O aprendizado relacionado à recompensa e pistas ambientais é um fenômeno natural. Entretanto, tem sido proposto que as drogas de abuso alteram e melhoram estes processos normais de aprendizagem e memória (HYMAN *et al.*, 2006). Assim, durante a dependência ocorre uma “melhora” do aprendizado relacionado à obtenção da droga e, também, uma inibição da capacidade de controlar o uso, especialmente em indivíduos vulneráveis (JENTSCH & TAYLOR, 1999; HYMAN & MALENKA, 2001). Isto sugere que a dependência às drogas envolva uma aprendizagem aberrante, mediada particularmente pelo sistema de recompensa (Di CHIARA, 1999; HYMAN *et al.*, 2006; ROBBINS *et al.*, 2008; MILTON, 2013).

Cabe ressaltar que o termo “memória da dependência” não é tão recente no meio científico. Ele foi introduzido pela primeira vez por Mello (1972) em uma discussão acerca dos comportamentos relacionados à dependência.

-
1. A alostase é uma adaptação prolongada frente a exposição crônica de uma droga, que cria uma homeostase alterada dependente da presença contínua da droga. O conceito de alostase oferece explicação interessante para a persistência da dependência (KOOB & LE MOAL, 2005).

Contudo, naquele período não haviam evidências substanciais que sugerissem uma relação importante entre dependência e processos de aprendizagem e memória. Posteriormente, estudos pioneiros mostraram que as pistas ou dicas ambientais previamente associadas ao uso de droga poderiam funcionar como um estímulo classicamente condicionado, e induzir tanto efeitos hedônicos, como sintomas de abstinência condicionada em animais e humanos (WIKLER & PESCOR, 1967; SIEGEL, 1975; O'BRIEN *et al.*, 1977; SIEGEL *et al.*, 1982). Os estímulos condicionados consistem em estímulos sensoriais externos (por exemplo, pessoas, parafernália e locais relacionados ao uso das drogas) e estímulos interoceptivos (por exemplo, incluindo sintomas hedônicos positivos e negativos). Estes estímulos condicionados à droga podem produzir a “fissura”, bem como a busca pela droga em indivíduos dependentes (KILTS *et al.*, 2001; LI & SINHA, 2008). Posteriormente, Norman White (1996) propôs que as drogas de abuso poderiam influenciar de maneira independente três processos de aprendizagem de incentivo condicionado, aprendizado declarativo, e aprendizagem estímulo-resposta ou hábito (WHITE, 1996).

Estudos apontam que as drogas de abuso compartilham os mesmos substratos neuronais que estão envolvidos nos processos de aprendizagem e memória, através de suas ações farmacológicas (diretas e indiretas) em diversos sistemas de neurotransmissão (HYMAN *et al.*, 2006; ROBBINS *et al.*, 2008; MILTON, 2013). Conforme mencionado, uma característica comum a todas as drogas de abuso é o aumento da liberação de dopamina no NAc, que reforça o aprendizado e aumenta a probabilidade de se usar a droga novamente (TORREGROSSA & KALIVAS, 2008). O uso repetido das drogas de abuso também promove alterações duradouras na plasticidade glutamatérgica e GABAérgica no NAc, amígdala, hipocampo e CPF (KALIVAS & O'BRIEN, 2008; SIDHPURA & PARSONS, 2011), que são imprescindíveis nos processos de aprendizagem e memória. Além disso, a disfunção glutamatérgica no CPF compromete os comportamentos de autocontrole, como tomadas de decisão e impulsividade, resultando em comportamentos compulsivos que favorecem a recaída (HYMAN & MALENKA, 2001; KALIVAS *et al.*, 2005).

De fato, o aspecto mais problemático do tratamento da dependência são as recaídas contantes. A recaída consiste na retomada de comportamentos de busca e consumo da droga após um longo período de abstinência, e pode ocorrer de maneira inconsciente, automática, e habitual (TIFFANY, 1990; EVERITT & ROBBINS, 2005). Esse fenômeno parece ser fortemente influenciado pelas dicas e

contextos ambientais previamente associados ao uso das drogas (parafernália utilizada como seringas e contato com indivíduos ou locais específicos). Estes estímulos condicionados evocam memórias marcantes da experiência com droga as quais podem induzir “fissura” e ativar as circuitarias corticoestriatal e límbica nos indivíduos dependentes em abstinência (KILTS *et al.*, 2001; LI & SINHA, 2008). Os estímulos condicionados associados à droga podem precipitar comportamentos preditivos de recaída em diferentes modelos animais de dependência, incluindo protocolos de autoadministração operante e a preferência condicionada ao lugar (PCL). A liberação de dopamina induzida por estímulos condicionados também ativa regiões corticoestriatais análogas em roedores (SCHIFFER *et al.*, 2009).

Atualmente, um grande número de observações clínicas e laboratoriais tem convergido para a hipótese de que a natureza crônica da dependência, parece estar intimamente ligada aos processos mal adaptativos subjacentes à memória associativa de longo prazo (O'BRIEN *et al.*, 1998; BERKE & HYMAN, 2000; ROBBINS & EVERITT, 2005; HYMAN *et al.*, 2006; MILTON & EVERITT, 2010; 2012). Memórias de longo prazo, ao contrário da maioria das adaptações homeostáticas, podem durar muitos anos ou mesmo uma vida. Apesar disso, a importância e a persistência das memórias associativas não excluem o papel relevante das adaptações homeostáticas de longa duração na dependência às drogas.

1.4 Memórias relacionadas à droga

De um modo geral, os diferentes tipos de memória podem ser agrupados de acordo com o tempo que perduram, podendo ser classificadas como memórias de trabalho, curta ou longa duração e remotas (IZQUIERDO, 2011). Müller e Schumann (2011) propuseram uma classificação para as memórias relacionadas à experiência da droga a qual foi baseada na classificação das memórias de longa duração proposta por Tulving e colaboradores na década de 1980 (MILNER *et al.*, 1998). As memórias relacionadas à experiência da droga podem ser classificadas em duas categorias distintas: memórias declarativas relacionadas à droga e memórias não declarativas relacionadas à droga (Figura 1). As memórias declarativas são adquiridas com plena intervenção da consciência e podem ser divididas em memórias semânticas e episódicas. A memória semântica refere-se aos conhecimentos gerais ou informações impessoais sobre a droga. Estudos sugerem que a formação de memórias semânticas relacionadas à droga geralmente começa antes que ocorra o primeiro episódio de consumo,

quando o indivíduo adquire informações sobre a droga (MÜLLER, 2013).

As memórias episódicas compreendem as memórias de todos os episódios vividos com a droga. Isso pode incluir desde memórias formadas automaticamente a partir dos efeitos induzidos pela intoxicação aguda, até os episódios de cunho emocional aversivo que ocorrem durante a subsequente abstinência. Na pesquisa pré-clínica existe uma limitação experimental no que diz respeito à avaliação das memórias episódicas relacionadas à droga, apesar da existência de tarefas experimentais preditivas de memórias episódicas, como o teste de reconhecimento de objetos (WINTERS *et al.*, 2008).

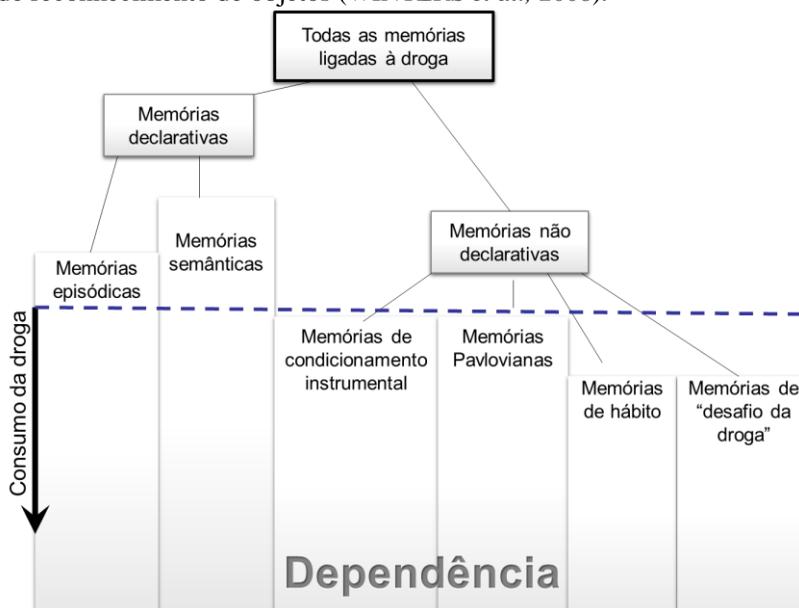


Figura 1. Diagrama representativo de todas as memórias relacionadas à droga, que inclui desde as memórias semânticas adquiridas antes mesmo da primeira experiência com droga (linha tracejada azul) até as memórias episódicas e não declarativas estabelecidas durante o uso repetido de drogas (modificada de MÜLLER, 2013).

As memórias não declarativas, por sua vez, referem-se àquelas memórias que são adquiridas de maneira inconsciente, automática, sem que o indivíduo perceba de forma clara que as está aprendendo. Elas podem ser inferidas através de mudanças no comportamento e sua avaliação ocorre geralmente por meio de demonstração (MÜLLER &

SCHUMANN, 2011). A classificação quanto ao conteúdo torna-se difícil de aplicar na pesquisa pré-clínica, contudo existem várias tarefas experimentais que avaliam memórias não declarativas, as quais envolvem um aprendizado associativo (tarefas de preferência condicionadas ao lugar e de condicionamento operante ou instrumental) e não associativo (sensibilização) (IZQUIERDO, 2011).

De acordo com a classificação proposta por Müller e Schumann (2011), as memórias não declarativas relacionadas à droga englobam as memórias clássicas, memórias de condicionamento instrumental, memórias de hábito, memórias de desafio da droga (do inglês “*priming drug memory*”) e memórias de procedimento. Elas se expressam normalmente mediante a execução de determinados comportamentos que, uma vez adquiridos, são realizados de modo automático. As memórias clássicas se referem àquelas adquiridas através do condicionamento Pavloviano em humanos e animais de experimentação (BOUTON & MOODY, 2004), como exemplo respostas emocionais e fisiológicas condicionadas (FOLTIN & HANEY, 2000), preferência condicionada ao lugar (BARDO & BEVINS, 2000; TZSCHENTKE, 2007), efeitos de abstinência condicionada (O’BRIEN *et al.*, 1998; TAUBENFELD *et al.*, 2010) e sensibilização aos efeitos agudos das drogas (VANDERSCHUREN & KALIVAS, 2000; MÜLLER, 2013).

Memórias condicionadas instrumentalmente compreendem os aprendizados relacionados à droga estabelecidos através do condicionamento instrumental. Essas memórias são dirigidas ao estímulo e incluem aquelas relacionadas às dicas ambientais previamente associadas à droga que são recompensadoras por si próprias. Um exemplo disso é o comportamento de busca pelo compartimento pareado à droga no teste da preferência condicionada ao lugar (HUSTON *et al.*, 2013; MÜLLER & SCHUMANN, 2011).

As memórias de hábito se referem ao comportamento instrumental que não é voltado a um objetivo, e sim controlado pelo estímulo. As memórias de procedimento compreendem todas as memórias de habilidades envolvidas na manipulação de droga; em humanos seriam o equivalente às “habilidades adquiridas”, por exemplo, nos rituais de preparação da droga, ou nas formas de uso. Por último, as memórias de “desafio” (do inglês *priming drug memories*) são memórias que são evocadas após a administração de uma pequena quantidade da droga (dose desafio) em indivíduos sem experiência prévia com a droga (MÜLLER & SCHUMANN, 2011).

1.5 Formação e manutenção da memória

Tem sido proposto que a formação de memória é constituída por diferentes processos, os quais envolvem substratos neurobiológicos distintos e complexos. A formação da memória de longa duração compreende três fases distintas: aquisição, consolidação e evocação (IZQUIERDO, 2011). A aquisição refere-se ao período de tempo entre a percepção do estímulo aprendido após uma experiência prévia e o momento que esse estímulo é convertido em uma memória. A consolidação consiste na conversão do conhecimento/informação adquirido e estabilizado para ser armazenado como uma memória de longa duração (MCGAUGH, 1966). Após a consolidação da memória ela permanece estável e pouco sensível a interferências (JI *et al.*, 2003). Assim, quando a informação armazenada não agrega mais nenhum valor ao indivíduo, a memória é esquecida, priorizando o armazenamento de novas informações. Desse modo, na consolidação ocorre o fortalecimento das sinapses em diversas estruturas encefálicas. Os principais mecanismos de plasticidade propostos para a manutenção de memórias são a potenciação de longa duração e a depressão de longa duração (do inglês *long-term potentiation* e *long-term depression*: LTP e LTD, respectivamente) (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Esses dois fenômenos eletrofisiológicos são mediados por diferentes sistemas de neurotransmissão, incluindo os sistemas: glutamatérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e o eCB (LIM *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2012). A LTP consiste no aumento persistente da atividade sináptica em frente a uma estimulação breve e repetida de um neurônio ou conjunto de axônios que fazem sinapse. Esse perfil de estimulação permite uma redução do limiar de excitabilidade neuronal, o que facilita a despolarização da célula. Na LTD, ocorre um processo semelhante, mas que culmina com a inibição da resposta neuronal (NAPOLITANO *et al.*, 1999). Evidências experimentais demonstraram que esses dois fenômenos (LTP e LTD) podem durar horas ou semanas. Essa observação levou a interessante analogia entre LTP/LTD e a consolidação de memórias de longa duração (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993).

A evocação ou recordação refere-se ao acesso à informação armazenada. É o retorno da memória ao estado em que a informação pode ser acessada de maneira consciente e/ou utilizada na execução de um comportamento. Com a evocação de uma determinada memória dois processos importantes podem ocorrer: a extinção ou a reconsolidação da memória (Figura 2). Esses dois processos mnemônicos diferem drasticamente entre si e dependem basicamente do tempo de evocação

da memória. Assim, quando a evocação é prolongada na ausência do estímulo incondicionado a memória é extinta (PAVLOV, 1927; HARRIS *et al.*, 2000).

A extinção consiste no aprendizado de uma nova memória que coexiste com a memória original e que é capaz de inibir, ao menos temporariamente, a evocação da memória original (BOUTON, 2004), conforme ilustrado na Figura 2. Cabe acrescentar que a extinção não implica no esquecimento da memória. Com o passar do tempo, ou havendo mudanças no contexto ou no estado emocional, a memória original pode vir a dominar novamente o comportamento (QUIRK, 2002), e isso pode ocorrer espontaneamente, ou através da reexposição ao estímulo incondicionado, a dicas ambientais, ou ao estresse. No âmbito experimental, uma maneira clássica de se observar esse processo pode ocorrer através dos fenômenos de recuperação espontânea, renovação e reinstalação. Assim, o sentido biológico da extinção é formar uma nova memória com significado distinto da memória original.

Exposições curtas ao estímulo condicionado geralmente desencadeiam o processo de reativação (DEBIEC *et al.*, 2002; EISENBERG *et al.*, 2003), o qual induz a desestabilização da memória previamente consolidada, tornando-a lábil em estado ativo temporário. A memória labilizada precisa passar por um novo processo de estabilização, dependente de síntese proteica para ser novamente armazenada. Assim, a reconsolidação da memória (LEWIS, 1979; NADER, 2003) consiste no processo pelo qual as memórias que foram desestabilizadas durante a evocação precisam ser re-estabilizadas para persistirem no encéfalo e serem atualizadas (RODRIGUEZ-ORTIZ *et al.*, 2005; ROSSATO *et al.*, 2007; WINTERS *et al.*, 2009), fortalecidas (LEE, 2008) ou funcionalmente integradas a outras memórias mais antigas (LEE *et al.*, 2009). Nesse contexto, a evocação pode mudar o conteúdo da memória original, podendo ser vista como um processo dinâmico, que confere uma propriedade adaptativa ao SNC (SARA, 2000).

A reativação refere-se ao processo de evocação da memória que induz a desestabilização da memória previamente consolidada, tornando-a lábil em estado ativo temporário (LEWIS, 1979; MILTON & EVERITT, 2010). Assim, a memória labilizada precisa passar por um novo processo de estabilização, dependente de síntese proteica. O termo reativação foi proposto por Lewis (1979) e dá uma conotação de que a memória estava no “estado inativo” e passou para um “estado ativo”. Experimentalmente, o termo tem sido frequentemente empregado em referência à sessão de treino em que a memória é “labilizada” pela

apresentação do estímulo condicionado, geralmente na ausência do estímulo incondicionado (MILTON & EVERITT, 2010). A interferência por meios farmacológicos, por exemplo, no intervalo de tempo conhecido como “janela de reconsolidação” altera o re-armazenamento da memória (CONKLIN & TIFFANY, 2002).

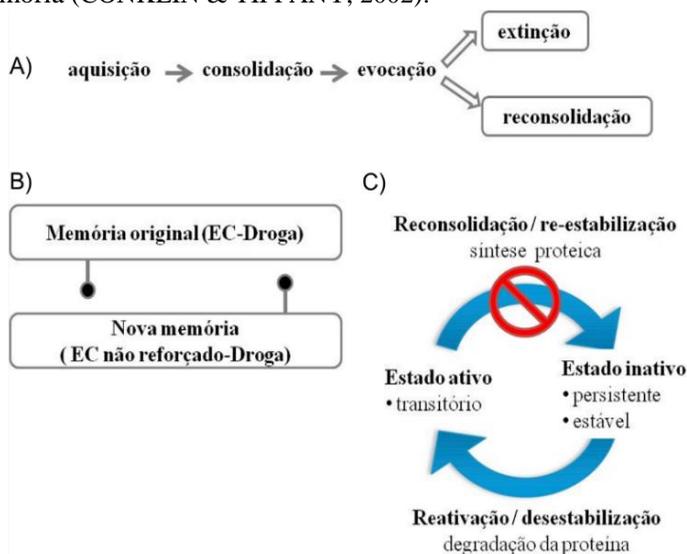


Figura 2. Etapas do processo de memória. Processos de formação e manutenção da memória de longa duração (A). Na extinção o aprendizado de uma nova memória compete com a memória original para a expressão do comportamento, inibindo a memória original (B). Na reconsolidação uma memória previamente consolidada no “estado inativo” é convertida (reativada) ao “estado ativo” por meio de mecanismos de desestabilização via degradação de proteínas. Estas memórias “ativas” podem ser re-estabilizadas ao estado “inativo” de uma maneira dependente da síntese de proteica em um espaço temporal curto (janela de reconsolidação) (C). A reconsolidação pode ser interrompida pela administração de agentes amnésicos que impeçam a restabilização da memória (Figura modificada de MILTON 2013).

A desestabilização da memória original é o mecanismo pelo qual a memória torna-se lábil (LEE *et al.*, 2008). Esse processo requer a degradação de algumas proteínas sintetizadas no processo de consolidação dessa memória, além da ativação de receptores CB1, canais de cálcio dependentes de tensão do tipo L e receptores glutamatérgicos do tipo NMDA que contém a subunidade NR2B

(SUZUKI *et al.*, 2004, 2008; KAANG *et al.*, 2009). Enquanto a re-estabilização após a evocação requer a síntese de proteínas e fatores de transcrição de genes imediatos, assim como moléculas de sinalização intracelular como a proteína quinase A (PKA) e o CREB em diversas estruturas encefálicas. As proteínas necessárias para a re-estabilização da memória são reguladas pela expressão do gene imediato *Zif/268*, relacionado à plasticidade, que é crítico para que ocorra o processo de reconsolidação.

A consolidação tem sido demonstrada experimentalmente em diversos tipos de memórias de longa duração (DUDAI, 2004), enquanto a reconsolidação não parece ser um fenômeno universal, uma vez que diferentes pesquisadores falharam em detectá-la em paradigmas comportamentais bem estabelecidos (CAMMAROTA *et al.*, 2004; HERNANDEZ & KELLEY, 2004; POWER *et al.*, 2006). Muitas intervenções farmacológicas que bloqueiam a consolidação também são capazes de prejudicar a reconsolidação, o que levou à hipótese de que a reconsolidação envolveria uma espécie de recapitulação dos acontecimentos moleculares que ocorrem durante a consolidação (SARA, 2000). No entanto, importantes diferenças bioquímicas e farmacológicas entre os dois processos foram encontradas (LEE *et al.*, 2004; BUCHERELLI *et al.*, 2006), indicando que, apesar de existirem algumas semelhanças, consolidação e reconsolidação não são processos idênticos (LEE *et al.*, 2004; ALBERINI, 2006).

No que diz respeito ao tratamento da dependência, tanto a extinção quanto a reconsolidação da memória são os processos que oferecem maiores oportunidades de serem manipuladas como estratégias terapêuticas anti-recaídas ou pró-abstinência (SORG, 2012). Neste contexto, a terapia de exposição de pistas tem sido empregada no cenário clínico. Em termos gerais, ela consiste em reexpor os indivíduos dependentes aos estímulos que remetem ao uso da droga, na tentativa de reduzir a “fissura” e a recaída associada à experiência da droga. Entretanto, devido à persistência das memórias ligadas à droga e à resistência ao processo de extinção, as terapias baseadas na extinção têm tido sucesso limitado na clínica.

1.6 Reconsolidação da memória em modelos animais de dependência

Nos estudos pré-clínicos a reconsolidação tipicamente envolve três etapas: treinamento, reativação e teste. A interferência por meios farmacológicos ou comportamentais, no intervalo de tempo conhecido como “janela de reconsolidação” altera o rearmazenamento da memória

(MILTON & EVERITT, 2010). Os estudos baseados na reconsolidação da memória foram originalmente descritos na década de 1960 (MISANIN *et al.*, 1968; SCHNEIDER & SHERMAN, 1968) e ficaram negligenciados por mais de 30 anos. Quando ressurgiram no início do século XXI, foram primeiramente focados em memórias de condicionamento pavloviano aversivo (NADER *et al.*, 2000; DEBIEC *et al.*, 2002; SUZUKI *et al.*, 2004). Pesquisas posteriores passaram a investigar a utilidade clínica de abordagens terapêuticas baseadas na interrupção da reconsolidação da memória para o tratamento de distúrbios associados a memórias mal adaptativas, como o transtorno de estresse pós-traumático (DEBIEC & LEDOUX, 2006; BRUNET *et al.*, 2008; KINDT *et al.*, 2009) e a dependência às drogas (MILLER & MARSHALL, 2005; LEE *et al.*, 2005). Contudo, cabe mencionar que o desenvolvimento de terapias pró-abstinência ou anti-recaída baseadas no processo de reconsolidação não representam apenas um passo incremental resultante da possível aplicabilidade de tratamentos clínicos baseados em reconsolidação para os transtornos de ansiedade, visto que a dependência e os transtornos de ansiedade são doenças muito diferentes no âmbito psicológico e neurobiológico.

Um dos trabalhos originais sobre a reconsolidação de memórias associada à droga utilizou o procedimento de PCL (MILLER & MARSHALL, 2005). Neste trabalho, os autores demonstraram que a administração de inibidores da proteína quinase ERK durante a evocação da memória, preveniu a expressão da PCL induzida pela cocaína nos testes subsequentes. Com isso, foi sugerido que as terapias baseadas na reconsolidação poderiam constituir um tratamento pró-abstinência ou anti-recaída para dependência às drogas (MILLER & MARSHALL, 2005; LEE *et al.*, 2005). Após estas demonstrações pioneiras, tem-se estabelecido que as memórias induzidas por outras drogas de abuso, incluindo anfetamina (SADLER *et al.*, 2007) e morfina (MILEKIC *et al.*, 2006; VALJENT *et al.*, 2006), também são susceptíveis à interrupção da reconsolidação por agentes amnésicos (SORG, 2012). A inibição da síntese de proteínas após a reativação da memória não só reduz a subsequente expressão da PCL (VALJENT *et al.*, 2006; BERNARDI *et al.*, 2007), mas também impede que o estímulo condicionado à cocaína possa agir posteriormente como um reforço condicionado em tarefas de autoadministração operante (LEE *et al.*, 2005).

A maioria dos estudos que investigam os mecanismos neuroquímicos envolvidos na reconsolidação de memórias associadas às drogas de abuso é focada nos sistemas noradrenérgico e glutamatérgico,

especificamente nos receptores β -adrenérgicos (FRICKS-GLEASON & MARSHALL, 2008; BERNARDI *et al.*, 2009) e do subtipo NMDA, respectivamente (BROWN *et al.*, 2008; ITZHAK, 2008) (Figura 3). Ambos os sistemas de neurotransmissão estão envolvidos na consolidação da memória e na plasticidade sináptica na via mesocorticolímbica (MALDONADO, 2006). Além disso, a ativação dos receptores canabinoides CB1 (YU *et al.*, 2009; FANG *et al.*, 2011), assim como mudanças na atividade GABAérgica parecem ser cruciais na reconsolidação de memórias (CARBÓ TANO *et al.*, 2009), inclusive em humanos (RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

A reconsolidação parece ser dependente especificamente da sinalização noradrenérgica na amígdala basolateral (BERNARDI *et al.*, 2009) e da sinalização mediada pela ERK na região medular do NAc (MILLER & MARSHALL, 2005). Tem sido também proposto que durante a desestabilização da memória ocorre a ativação de vias noradrenérgica e glutamatérgica, as quais podem levar ao aumento da expressão de fatores de transcrição de genes imediatos, como o Zif/268 que está envolvido na plasticidade e síntese proteica na amígdala basolateral e região medular do NAc (THÉBERGE *et al.*, 2010).

Neste contexto, nos últimos anos tem sido proposto que uma disfunção no processo de reconsolidação pode estar envolvido na etiologia de distúrbios relacionados às memórias mal adaptativas, incluindo a dependência às drogas. Há diversas evidências bem estabelecidas na literatura que reforçam essa hipótese, por exemplo: (i) a reconsolidação ocorre em humanos (JAVADI & CHENG, 2013) e (ii) a memória pode ser fortalecida após a evocação (JAVADI & CHENG, 2013). O uso repetido das drogas causa alterações duradouras na plasticidade sináptica, por meio de mecanismos de transdução de sinal que envolvem segundos mensageiros como o AMP cíclico e as proteínas quinases PKA e CREB (KAUER, 2004; JENHSCH *et al.*, 2002; REN *et al.*, 2013), os quais parecem fortalecer o aprendizado e a memória relacionados à droga. Além disso, a sinalização induzida por ERK parece ser crucial para o desenvolvimento do fenômeno de “incubação da fissura” (do inglês *craving incubation*) que envolve a evocação espontânea de memórias ligadas à droga (MILLER & MARSHAL, 2005). Assim, o fortalecimento dessas memórias após contínuas evocações ao longo do tempo poderia fortalecer ainda mais essas memórias, tornando-as mais resistentes à extinção.

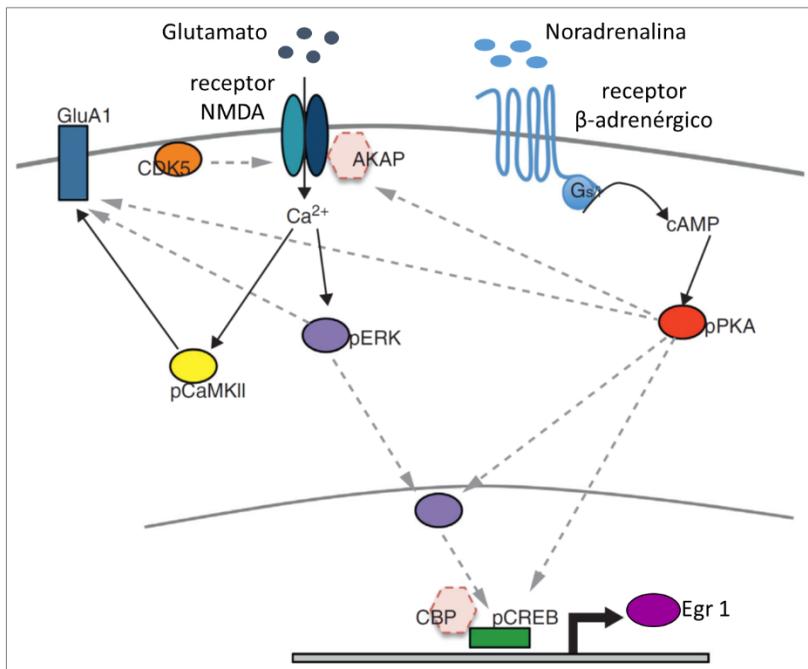


Figura 3. Principais mecanismos neuromoleculares envolvidos na reconsolidação de memórias apetitivas. A ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA ou dos receptores β -adrenérgicos, desencadeia cascatas de sinalização intracelular que culminam com a transcrição de genes e proteínas, cruciais no processo de reconsolidação. Os símbolos (cheios e tracejados) representam proteínas com um papel identificado na reconsolidação. As setas (cheias e tracejadas) representam as principais vias de sinalização que podem mediar esse processo. Abreviaturas: pPKA, proteína quinase A fosforilada; pCaMKII, proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II fosforilada; pERK, proteína quinase regulada por sinais extracelulares fosforilada; AKAP, proteína quinase de ancoragem; pCREB, proteína de ligação ao elemento de resposta CRE fosforilada; CBP, proteína de ligação ao CREB; Egr-1, proteína de resposta ao crescimento precoce-1 (Zif268); CDK5, proteína quinase dependente de ciclina 5; Gs, proteína G, que estimula a adenil ciclase; cAMP, AMP cíclico; GluA1, subunidade do receptor AMPA glutamatérgico (Figura reproduzida de TRONSON & TAYLOR, 2013).

1.7 Sistema endocanabinoide

O sistema endocanabinoide (eCB) é composto pelos canabinoides endógenos, ou endocanabinoides (eCBs), seus receptores e

enzimas de síntese e degradação. Os eCBs são lipídios originados a partir de ésteres, éteres e amidas de ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturada (DI MARZO *et al.*, 1998). Atualmente são conhecidos cinco eCBs, sendo que os mais estudados a N-aracondoniletanolamina, a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (PERTWEE, 2005). A concentração no tecido cerebral do 2-AG, o agonista total dos receptores canabinoides, é cerca de 200 vezes maior que a de anandamida, considerada um agonista parcial dos mesmos receptores (SUGIURA *et al.*, 1995). Os eCBs são sintetizados e liberados sob demanda, a partir de estímulos fisiológicos como a despolarização neuronal (DI MARZO *et al.*, 1994), ou ainda em resposta ao estresse (O'SULLIVAN *et al.*, 2012). A maioria das ações fisiológicas dependentes da atividade eCB são mediadas pelo 2-AG, particularmente na regulação da função dos neurônios dopaminérgicos localizados na ATV (WANG & LUPICA, 2014).

Existem várias vias para a síntese e degradação da anandamida e do 2-AG. A anandamida origina-se a partir de um precursor fosfolipídico, o N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina (NArPE). O NArPE é transformado em anandamida através de quatro vias distintas, sendo que a mais estudada e direta (aquela que não produz intermediários) é a via catalisada pela enzima N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD). As outras três vias são catalisadas pelas seguintes enzimas: 1) fosfolipase C e tirosina fosfatase; 2) fosfolipase A1/2 e fosfolipase D; 3) $\alpha\beta$ -hidrolase e glicerolfosfodiester-fosfodiesterase (LIU *et al.*, 2008). Ao contrário da anandamida, o 2-AG é sintetizado predominantemente a partir do diacilglicerol (DAG) através da ação da enzima DAG-lipase. A inativação dos eCB é dependente da recaptação destes para o interior da célula. Apesar das características lipídicas, as evidências sugerem que a recaptação ocorre através da difusão facilitada por transportador de membrana (DI MARZO, 2008). Após a recaptação, a anandamida é metabolizada pela enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, *do inglês fatty acid amide hydrolase*), enquanto o 2-AG é metabolizado preferencialmente pela monoacilglicerol lipase (MAGL) (DI MARZO & PETROSINO, 2007; MUNRO *et al.*, 1993).

Os receptores canabinoides CB1 são receptores pré-sinápticos acoplados à proteína G, sendo amplamente expressos no SNC (DI MARZO, 2009), incluindo diversas estruturas cerebrais como o NAc, o córtex, a amígdala e o hipocampo (BERKE & HYMAN, 2000; ROBBINS *et al.*, 2008). Essas estruturas são cruciais na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo aprendizagem, memória e motivação

(MALDONADO *et al.*, 2006). Já os receptores CB2 estão expressos periféricamente nas células do sistema imunológico, mas também são expressos em menor quantidade no corpo celular de neurônios e em micróglia de estruturas encefálicas como o córtex cerebral, o hipocampo e o estriado, particularmente, em regiões pós-sinápticas (ONAIVI *et al.*, 2006) e NAc (XI *et al.*, 2011; ARACIL-FERNÁNDEZ, *et al.*, 2012).

Além dos receptores de membrana, há indícios de que os eCBs possam agir em alvos nucleares para lipídeos como os receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR), levando à transcrição gênica (O'SULLIVAN, 2007). Embora os receptores de potencial transitório TRPV1 (vaniloides) (canais iônicos não seletivos permeáveis a Ca^{+2}) não façam parte do sistema eCB, eles são um dos alvos moleculares da anandamida. Cabe ressaltar que os efeitos psicoativos do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) e do canabidiol (CBD), os dois maiores constituintes químicos extraídos da *Cannabis sp.*, são em grande parte mediados pela ativação de receptores CB1 (DI MARZO *et al.*, 2009).

De maneira geral, os receptores CB1 e CB2 apresentam um sistema primário de transdução de sinal bastante semelhante. Ambos os receptores são acoplados à proteína $G_{i/o}$ e atuam inibindo a adenil ciclase (que leva à diminuição dos níveis de AMP cíclico e reduz a atividade da PKA), inibindo canais de Ca^{+2} dependentes de tensão e ativando canais de K^+ . Os receptores canabinoides também ativam a via de quinases ativadas por mitógeno (MAP) e da inositol-3-fosfato (IP3) quinase, entre outras vias intracelulares (HOWLETT *et al.*, 2004; PACHER *et al.*, 2006).

Os eCBs agem como mensageiros retrógrados. Diferentemente da sequência usual, o estímulo começa no neurônio pós-sináptico e a excitação neuronal leva à despolarização e ao influxo de íons cálcio que estimulam várias fosfolipases, iniciando assim a síntese dos eCBs (Figura 4). Os eCBs, como o 2-AG e a anandamida são produzidos sob demanda e liberados na fenda sináptica e se difundem livremente para estimular os receptores canabinoides nos terminais neuronais pré-sinápticos (WILSON & NICOLL, 2002). A consequência funcional da ativação de receptores canabinoides é a redução da excitabilidade do neurônio pré-sináptico e inibição através da despolarização, que leva a redução da liberação de neurotransmissores, incluindo monoaminas, aminoácidos excitatórios e inibitórios, além de neuropeptídeos (HOWLETT *et al.*, 2002). No entanto, há evidências que sugerem que os eCBs modulam a função neuronal e a transmissão sináptica de maneira não-retrógrada e também autócrina (sinalização neurônio-astrocítico). Na

sinalização não-retrógrada, os eCBs produzidos nos neurônios pós-sinápticos ativam os receptores vaniloides do tipo TRPV1 e/ou canabinoides localizados nos neurônios pós-sinápticos. Estudos revelaram que a anandamida pode mediar a plasticidade de longa duração através da LTD, pela da ativação de receptores TRPV1. Este tipo LTD tem sido observado em neurônios GABAérgicosMSN do NAc que coexpressam os receptores dopaminérgicos D2 (GRUETER *et al.*, 2010) e na região do giro dentado do hipocampo (CHÁVEZ *et al.*, 2010).

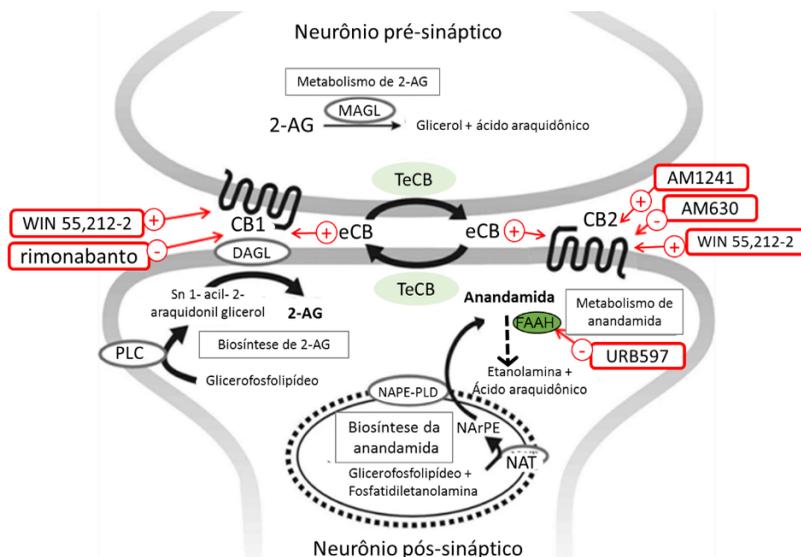


Figura 4. Representação esquemática simplificada da biossíntese e do metabolismo dos eCBs nos neurônios pré e pós sinápticos, assim como o alvo dos agentes farmacológicos utilizados neste estudo. As enzimas de biossíntese do 2-AG, fosfolipase C (PLC) e diacilglicerollipase (DAGL) estão localizadas principalmente nas membranas plasmáticas de neurônios pós sinápticos. Enquanto a monoacilglicerol lipase (MAGL), que cataboliza o 2-AG está localizada em neurônios pré-sinápticos. As enzimas de biossíntese de anandamida N-acil-transferase (NAT) e N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD) e de catabolismo a FAAH, são localizadas em membranas intracelulares. A FAAH está localizada primordialmente em neurônios pré-sinápticos. Os transportadores de membrana dos eCBs (TeCB) localizados em neurônios pré e pós sinápticos facilitam a recepção dos eCBs. (Figura modificada de DI MARZO *et al.*, 2004).

Adicionalmente, os eCBs liberados de neurônios pós-sinápticos podem estimular os receptores canabinoides de astrócitos, desencadeando a liberação de glutamato por células gliais, o que poderia modular indiretamente a função sináptica em curto e longo prazo (CASTILLO *et al.*, 2012).

Assim, os eCBs regulam a atividade neuronal e contribuem para a plasticidade sináptica de curto prazo conhecida como a supressão da inibição induzida por despolarização (do inglês *depolarization-induced suppression of inhibition, DSI*) e supressão da excitação induzida por despolarização (*depolarization-induced suppression of excitation, DSE*), conforme seja induzida em neurônios inibitórios/excitatórios. Ambos DSI ou DSE mediados pelos eCBs iniciam-se pelo aumento intracelular de Ca^{+2} em neurônios pós-sinápticos (WILSON & NICOLL, 2002). O influxo de Ca^{+2} ocorre principalmente através dos canais de cálcio dependentes de tensão e dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do tipo 1 (mGluR1) que mobilizam as reservas de Ca^{+2} via fosfolipase C, promovendo a formação dos eCB (2-AG e/ou anandamida) (WILSON & NICOLL, 2002). A ligação do eCB no receptor CB1 ativa a proteína $G_{i/o}$ (provavelmente através das subunidades $\beta\gamma$). Isso que leva à redução do influxo de Ca^{+2} e fechamento dos canais de Ca^{+2} dependentes de tensão e consequentemente suprime a liberação do neurotransmissor (CASTILLO *et al.*, 2012).

Em relação as formas mais persistentes de plasticidade sináptica, como na depressão de longa duração (LTD), os receptores CB1 são recrutados somente durante a indução, mas não na manutenção da LTD. O mecanismo de manutenção da LTD após a ativação dos receptores CB1 dentro da escala de curta duração (minutos) não está bem estabelecido (CASTILLO *et al.*, 2012). A indução da LTD mediada pelos eCBs também requer um aumento intracelular de Ca^{+2} e ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos pós-sinápticos e já foi demonstrada em diversas regiões encefálicas como o estriado dorsal, NAc, amígdala, hipocampo, CPF e ATV (MALDONADO *et al.*, 2006; SIDHPURA *et al.*, 2011). A indução da LTD mediada pelos eCB, inicia-se pela liberação pré-sináptica de glutamato que ativa os receptores glutamatérgicos metabotrópicos pós-sinápticos, os quais estimulam a síntese de 2-AG pelas enzimas fosfolipase (PLC β) e diacilglicerol lipase (DGL α). Com isso, o 2-AG pode agir em receptores CB1 pré-sinápticos localizados em terminais excitatórios glutamatérgicos ou em receptores CB1 pré-sinápticos localizados em terminais GABAérgicos (CASTILLO *et al.*, 2012). Isso promove a redução adenililato ciclase e da atividade da PKA que suprime a liberação do transmissor através de mecanismo

dependente da subunidade $\alpha_{i/0}$ da proteína $G_{i/0}$ acoplada ao receptor CB1 (CASTILLO *et al.*, 2012). Os eCBs também podem promover, indiretamente, a indução da LTP em sinapses glutamatérgicas através da desinibição de neurônios GABAérgicos pós-sinápticos (CARLSON *et al.*, 2002). Essas mudanças causam o enfraquecimento ou o fortalecimento das sinapses são importantes para o remodelamento e para a eficácia sináptica. Isso contribui para os mecanismos de plasticidade sináptica que ocorre na dependência (MALDONADO *et al.*, 2006; SIDHPURA *et al.*, 2011).

1.8 Sistema eCB e reforço induzido por drogas de abuso

Os receptores de canabinoides CB1 estão presentes em diversas regiões do circuito cerebral de recompensa (Figura 5), incluindo o ATV e NAc, e também em várias regiões que se projetam para estas duas estruturas, tais como hipocampo, CPF e amígdala basolateral (LUPICA & RIEGEL, 2005). No hipocampo, os receptores canabinoides CB1 são densamente expressos em terminais pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos (KAWAMURA *et al.*, 2006), particularmente nas células que co-liberam colescistocinina (KATONA *et al.*, 1999, WILSON & NICOLL, 2002), assim como nos terminais pré-sinápticos de neurônios piramidais glutamatérgicos, ainda que em menor densidade (KATONA *et al.*, 2006; KAWAMURA *et al.*, 2006). Os eCB agem através dos receptores CB1 como moduladores retrógrados exercendo controle sobre a neurotransmissão dopaminérgica da via mesocorticolímbica, através da supressão dos impulsos excitatórios e inibitórios oriundos das projeções glutamatérgicas e GABAérgicas, respectivamente (MALDONADO *et al.*, 2006). A ativação dos receptores CB1 dos axônios terminais dos neurônios GABAérgicos presentes na ATV inibe a transmissão GABAérgica, o que culmina com a desinibição dos neurônios dopaminérgicos (LUPICA & RIEGEL, 2005). De maneira semelhante, a transmissão sináptica dos neurônios glutamatérgicos no CPF, NAc e ATV são igualmente inibidas pela ativação dos receptores canabinoides

Os receptores de canabinoides CB1 estão presentes em diversas regiões do circuito cerebral de recompensa (Figura 5), incluindo o ATV e NAc, e também em várias regiões que se projetam para estas duas estruturas, tais como hipocampo, CPF e amígdala basolateral (LUPICA & RIEGEL, 2005). No hipocampo, os receptores canabinoides CB1 são densamente expressos em terminais pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos (KAWAMURA *et al.*, 2006), particularmente nas células que co-liberam colescistocinina (KATONA *et al.*, 1999, WILSON &

NICOLL, 2002), assim como nos terminais pré-sinápticos de neurônios piramidais glutamatergicos, ainda que em menor densidade (KATONA *et al.*, 2006; KAWAMURA *et al.*, 2006).

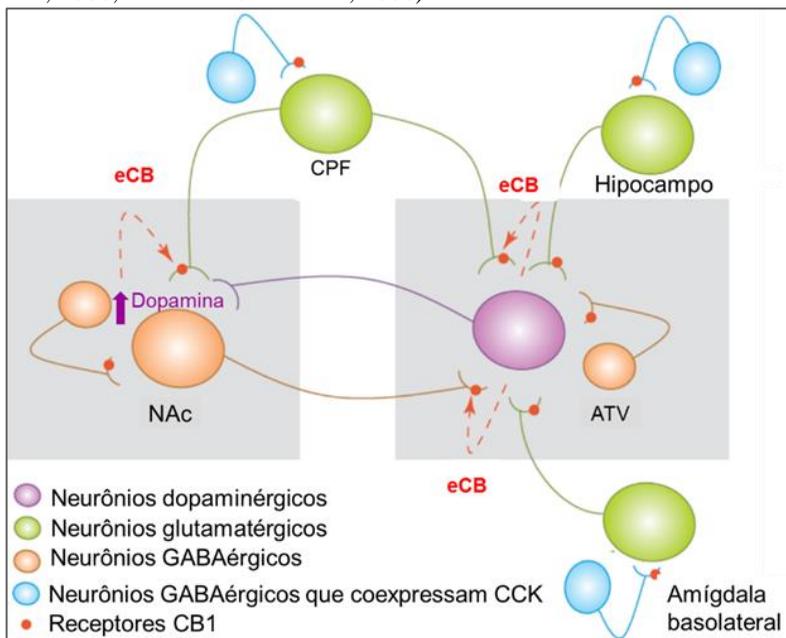


Figura 5. Esquema representativo do papel modulatório dos eCBs através dos receptores CB1 na via mesocorticolímbica, em estruturas cruciais para a regulação dos efeitos reforçadores induzidos por drogas de abuso. Na ATV os receptores CB1 estão localizados em neurônios pré-sinápticos GABAérgicos e glutamatergicos. Na ATV, a ativação dos receptores CB1 pelos eCBs inibe a liberação de GABA, que culmina com a ativação dos neurônios dopaminérgicos e com o aumento da liberação de dopamina no NAc. Projeções de outras estruturas como amígdala basolateral, hipocampo e CPF, envolvidas nos processos de motivação e memória, também estão sob o controle de receptores CB1 através de um efeito inibitório sobre os neurônios GABAérgicos pré-sinápticos que colibram GABA e colecistocinina (CCK). No NAc, os eCBs agem se como moduladores retrógrados ativando os receptores CB1 nos terminais do axônio dos neurônios glutamatergicos. A subsequente inibição da liberação de glutamato inibe os neurônios GABAérgicos provenientes do NAc e que projetam-se para o ATV, isso estimula indiretamente os neurônios dopaminérgicos da ATV (Figura reproduzida de MALDONADO *et al.*, 2006).

Os eCBs agem através dos receptores CB1 como moduladores retrógrados exercendo controle sobre a neurotransmissão dopaminérgica da via mesocorticolímbica, através da supressão dos impulsos excitatórios e inibitórios oriundos das projeções glutamatérgicas e GABAérgicas, respectivamente (MALDONADO *et al.*, 2006). A ativação dos receptores CB1 dos axônios terminais dos neurônios GABAérgicos presentes na ATV inibe a transmissão GABAérgica, o que culmina com a desinibição dos neurônios dopaminérgicos (LUPICA & RIEGEL, 2005). De maneira semelhante, a transmissão sináptica dos neurônios glutamatérgicos no CPF, NAc e ATV são igualmente inibidas pela ativação dos receptores canabinoides CB1 (ROBBE *et al.*, 2001; MALDONADO *et al.*, 2006). Neste sentido, diversas evidências experimentais têm indicado que o efeito primário de recompensa de diferentes drogas de abuso não-canabinoides parece depender da liberação de eCBs, especialmente o 2-AG na ATV, assim como da plasticidade sináptica mediada pelos eCBs no SNC (MALDONADO *et al.*, 2006; MELIS & PISTIS, 2012; OLESON *et al.*, 2012; WANG & LUPICA, 2014).

Além disso, evidências recentes têm revelado que a ativação dos receptores CB2 no NAc diminui a liberação de dopamina, assim como os efeitos reforçadores de diferentes classes de drogas de abuso (ISHIGURO *et al.*, 2007; XI *et al.*, 2011; ARACIL-FERNÁNDEZ, *et al.*, 2012). Desta forma, a liberação de dopamina também poderia ser regulada pelos receptores CB2 expressos em (i) neurônios GABAérgicosMSN; (ii) neurônios GABAérgicos ou colinérgicos que se projetam para o NAc; (iii) em terminais de sinapses glutamatérgicas provenientes do hipocampo e córtex, ou ainda nos terminais dopaminérgicos provenientes da ATV (MORALAES & BONCI, 2012).

1.9 Sistema eCB em modelos animais de dependência

Os modelos animais de dependência variam em sua relevância translacional, desde procedimentos que utilizam pareamentos limitados entre o estímulo condicionado e a droga (PCL), a tarefas comportamentais que envolvem centenas de pareamentos entre o estímulo condicionado e a droga (autoadministração operante) (SANCHIS-SEGURA & SPANAGEL, 2006).

Tabela 2. Modulação do sistema eCB, através dos receptores CB1, em alguns modelos animais de dependência.

Droga	Modelo animal	Droga	Efeito	Referências
Morfina ou heroína	PCL	Rimonabanto	↓	CHAPERON <i>et al.</i> , 1998; MAS-NIETO <i>et al.</i> , 2001; NAVARRO <i>et al.</i> , 2001; SINGH <i>et al.</i> , 2004
		CP-55940	NA*	BRAIDA <i>et al.</i> , 2001
	AAO	Rimonabanto	↓	NAVARRO <i>et al.</i> , 2001; 2004; SOLINAS <i>et al.</i> , 2003; 2004; DE VRIES <i>et al.</i> , 2003; CAILLÉ & PARSONS, 2003
		Δ^9 THC e WIN55,212-2	↑	SOLINAS <i>et al.</i> , 2004; 2005; ELLGREN <i>et al.</i> , 2007
AAO/ Reinstalação	Rimonabanto	↓	DE VRIES <i>et al.</i> , 2003	
Álcool	Consumo voluntário (LEDG)	Rimonabanto	↓	FREEDLAND <i>et al.</i> , 2001; WANG <i>et al.</i> , 2003; LALLEMAND & DE WITTE 2005; VINOD <i>et al.</i> , 2008a
		AM404	↑	VINOD <i>et al.</i> , 2008b
	AAO	Rimonabanto ou AM251	↓	FREEDLAND <i>et al.</i> , 2001; ECONOMIDOU <i>et al.</i> , 2006; CAILLÉ <i>et al.</i> , 2007
	Reinstalação AAO	Rimonabanto	NA*	ECONOMIDOU <i>et al.</i> , 2006
Nicotina	PCL	Rimonabanto ou AM251	↓	CIPPITELLI <i>et al.</i> , 2005
	AAO	Rimonabanto	↓	LE FOOL & GOLDBERG, 2004; FORGET <i>et al.</i> , 2005; DE VRIES <i>et al.</i> , 2005
	Reinstalação	Rimonabanto ou AM251	↓	COHEN <i>et al.</i> , 2002; COHEN <i>et al.</i> , 2005; DE VRIES <i>et al.</i> , 2005; FORGET <i>et al.</i> , 2009
Cocaína	AAO e/ou Reinstalação	Rimonabanto ou AM251	↓	DE VRIES <i>et al.</i> , 2001; SORIA <i>et al.</i> , 2005; XI <i>et al.</i> , 2006; 2007
Metanfetanina	AAO	AM251 ou Rimonabanto	↓	VINKLEROVA <i>et al.</i> , 2002, ANGGADEREDJA <i>et al.</i> , 2004
		Δ^9 THC	↑	ANGGADEREDJA <i>et al.</i> , 2004
	Reinstalação	Rimonabanto	↓	ANGGADEREDJA <i>et al.</i> , 2004

Abreviaturas: PCL; AAO (autoadministração operante); LEDG (livre escolha entre duas garrafas); Δ^9 THC, WIN 55,212-2 e CP-55940 (agonistas receptores CB1/CB2); Rimonabanto e AM251 (antagonistas dos receptores CB1); AM404 (potencializa a sinalização dos eCB); *NA (não altera a reinstalação do comportamento).

O sistema eCB não é apenas o sítio de ação primário para as propriedades motivacionais e reforçadoras do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC), principal constituinte psicoativo de plantas do gênero *Cannabis*. Diversos estudos com modelos animais demonstraram que os eCBs estão diretamente envolvidos nos efeitos reforçadores primários de diferentes classes de drogas de abuso não canabinoides, como o álcool (MECHOULAM & PARKER, 2003), a cocaína (ARNOLD, 2005), a metanfetamina (ANGGADIREDA *et al.*, 2004), a nicotina (FORGET *et al.*, 2009; SIMONNET *et al.*, 2013) e os opioides (NAVARRO *et al.*, 2001; FATTORE *et al.*, 2004; 2005; SPANO *et al.*, 2004). Esses estudos mostram que os efeitos dos eCB na modulação da via mesocorticolímbica são mediados principalmente pelos receptores CB1 (SOLINAS *et al.*, 2008; TRIGO *et al.*, 2010; MELIS & PISTIS, 2012; OLESON *et al.*, 2012; WANG & LUPICA, 2014) (Tabela 2). Porém, nos últimos anos, tem sido descrita a influência dos receptores CB2 na modulação dos efeitos reforçadores do álcool (ISHIGURO *et al.*, 2007), cocaína (XI *et al.*, 2011; ARACIL-FERNÁNDEZ, *et al.*, 2012) e nicotina (NAVARRETE *et al.*, 2013).

1.10 Canabinoides e memória

Está bem estabelecido que o uso abusivo e regular de derivados da *Cannabis sp.* leva a um comprometimento cognitivo caracterizado por apatia, letargia, morosidade, dificuldade de julgamento, problemas de concentração e memória (VOLKOW *et al.*, 2014). No entanto, o envolvimento do sistema canabinoide em diferentes aspectos do aprendizado e da memória é bastante complexo.

Em geral, nos modelos experimentais de tarefas cognitivas, o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 favorece os processos cognitivos. Por outro lado, os agonistas canabinoides CB1 causam prejuízos em processos de aprendizagem e memória (ZANETTINI *et al.*, 2011). O sistema eCB tem sido implicado na extinção de memórias aversivas previamente aprendidas (MARSICANO *et al.*, 2002; SUZUKI *et al.*, 2004). Por exemplo, Marsicano e coautores (2002) relataram que tanto os camundongos do tipo selvagem tratados um antagonista dos receptores CB1, quanto os camundongos nocautes para os receptores CB1, apresentaram um prejuízo na extinção da memória de medo condicionado, sem que a aquisição e a consolidação da memória fossem afetadas. Outros estudos observaram resultados semelhantes em diferentes tarefas aversivas (SUZUKI *et al.*, 2004; VARVEL & LICHMAN, 2002; PAMPLONA *et al.*, 2006). No entanto, evidências indicam que os eCBs parecem modular seletivamente as memórias

aversivas (LUTZ, 2007), sem interferir na extinção de memórias associadas a estímulos recompensadores (HOLTER *et al.*, 2005; HARLOE *et al.*, 2008; MANWELL *et al.*, 2009).

O sistema eCB está envolvido na reconsolidação de memórias contextuais aversivas, através dos receptores CB1 (LIN *et al.*, 2006; KOBILO *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2008; STERN *et al.*, 2012). Ademais, algumas evidências indicam que o bloqueio dos receptores CB1 após a reativação prejudica a reconsolidação de memórias associadas à droga (YU *et al.*, 2009; FANG *et al.*, 2011) e das memórias aversivas (BUCHERELLI *et al.*, 2006). Ademais, o CBD prejudica a reconsolidação da memória por um mecanismo mediado pela ativação dos receptores canabinoides (STERN *et al.*, 2012) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos da manipulação farmacológica dos receptores CB1 na reconsolidação da memória, utilizando diferentes tarefas de condicionamento pavloviano.

Tarefa de aprendizado	Droga	Local de administração	Efeito sobre a reconsolidação	Referências
CMC	AM251	Amígdala	Prejudica	BUCHERELLI <i>et al.</i> , 2006
PCL metanfetamina	Rimonabanto	IP	Prejudica	YU <i>et al.</i> , 2011
PCL-nicotina	Rimonabanto	IP	Prejudica	FANG <i>et al.</i> , 2011
CMC (sobressalto)	WIN55,212-2 ou HU	Amígdala	Prejudica	LIN <i>et al.</i> , 2006
CAP	WIN55,212-2 Rimonabanto	Amígdala	Prejudica Não afeta	KOBILO <i>et al.</i> , 2007
CMC	AM251	Hipocampo	Facilita	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2008
CMC	Rimonabanto	IP	Facilita	SUZUKI <i>et al.</i> , 2008
CMC	CBD (mediado pela ativação de CB1)	IP	Prejudica	STERN <i>et al.</i> , 2012

CAP (condicionamento aversivo de paladar); CMC (condicionamento de medo contextual); PCL (preferência condicionada ao lugar); CBD (canabidiol); AM251 e rimonabanto (antagonistas CB1) e WIN 55,212-2 e HU210 (agonistas canabinoides não seletivos) e IP (intraperitoneal).

1.11 Potencialidades terapêuticas do canabidiol

O CBD é o segundo constituinte majoritário da *Cannabis sp.* e não promove os efeitos psicotrópicos e psicomiméticos típicos do Δ^9 THC (PARKER *et al.*, 2004; CRIPPA *et al.*, 2004; ZUARDI *et al.*, 2006). Além disso, diversos estudos têm mostrado que as propriedades do CBD são opostas às do Δ^9 THC especialmente em relação ao potencial efeito como agente ansiolítico (ZUARDI *et al.*, 1982; ONAIVI *et al.*, 1990; CAMPOS *et al.*, 2012) e antipsicótico (BHATTACHARYYA *et al.*, 2010).

Diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que o CBD exerce seus efeitos por interferir em diferentes sistemas neurotransmissores incluindo os sistemas eCB, serotoninérgico (RUSSO *et al.*, 2005), colinérgico (MAHGOUB *et al.*, 2013), adenosinérgico (CARRIER *et al.*, 2006), entre outros (CAMPOS *et al.*, 2012). O CBD apresenta baixa afinidade pelos receptores canabinoides e estudos *in vitro* mostraram que o CBD pode agir como antagonista dos receptores CB1 e agonista inverso dos receptores CB2 (THOMAS *et al.*, 2007), bem como agonista dos receptores vaniloides TRPV1 e TRPV2 (QUIN *et al.*, 2008). Outras evidências indicam que o CBD pode inibir a enzima FAAH que degrada a anandamida, potencializando os efeitos deste eCB (CAMPOS *et al.*, 2012).

Apesar da escassez de estudos na literatura, há evidências que demonstram que o CBD atenua os efeitos reforçadores induzidos por psicoestimulantes e pela heroína em diferentes modelos animais de dependência (PARKER *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2009). Ren e colaboradores (2009) mostraram que a administração do CBD preveniu a reinstalação do comportamento de autoadministração operante induzido pela re-exposição a pistas previamente associadas à heroína, o que sugere que o tratamento com CBD é capaz de prevenir comportamentos preditivos de recaída em ratos previamente treinados a autoadministrar heroína (REN *et al.*, 2009). Em outro estudo foi demonstrado que o CBD facilita a extinção da PCL induzida pela cocaína e pela anfetamina, sem afetar a aquisição ou a expressão da memória associada a ambos, por um mecanismo que não depende da ativação dos receptores canabinoides (PARKER *et al.*, 2004). Adicionalmente, o CBD também facilita a extinção de memórias aversivas tanto em ratos como em humanos (BITTENCOURT *et al.*, 2008; DAS *et al.*, 2013; DO MONTE *et al.*, 2013), além de prejudicar a reconsolidação da memória de medo contextual em ratos (STERN *et al.*, 2012), por mecanismos que parecem envolver a sinalização eCB

(BITTENCOURT *et al.* 2008; STERN *et al.* 2012; DO MONTE *et al.* 2013).

Devido à inexistência de efeitos psicotrópicos do CBD (BHATTACHARYYA *et al.*, 2009) em roedores e humanos, este fármaco apresenta-se como uma alternativa em potencial para o tratamento de alguns distúrbios psiquiátricos (CAMPOS *et al.*, 2012), especialmente àqueles relacionados a memórias mal adaptativas com um forte componente emocional, como o transtorno de estresse pós-traumático (STERN *et al.*, 2012) e a dependência às drogas (REN *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Conforme exposto anteriormente, a sobreposição entre os processos de aprendizagem e memória e o remodelamento sináptico que ocorrem na dependência, tem levado os cientistas a suporem que a dependência às drogas se desenvolve, pelo menos em parte, devido aos processos de aprendizagem e memória que ocorrem de forma aberrante. A persistência das recaídas, mesmo após longos períodos de abstinência, também reforça a hipótese de que essas memórias ligadas à droga são bastante estáveis e resistentes à extinção. Se essas memórias associativas, estabelecidas pelo uso repetido da droga, contribuem com a persistência da dependência, então, a interrupção dessas memórias poderia reduzir o seu impacto sobre a recaída.

A investigação dos processos envolvidos na manutenção de memórias associadas à droga poderia auxiliar na compreensão da neurobiologia da dependência, bem como sugerir novas possibilidades terapêuticas para o desenvolvimento de tratamentos anti-recaída baseados na reconsolidação da memória. Neste sentido, a investigação do possível efeito do sistema eCB e do fitocanabinoide canabidiol parece uma abordagem promissora, tendo em vista (i) as evidências do papel modulatório do sistema eCB nos processos de aprendizagem, memória e recompensa; e (ii) a escassez de estudos acerca do possível envolvimento deste sistema, bem como do CBD, na reconsolidação de memórias relacionadas às drogas de abuso.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da manipulação farmacológica do sistema eCB, assim como o efeito do CBD, sobre a reconsolidação da memória hedônica em ratos, utilizando o paradigma da preferência condicionada ao lugar.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o procedimento de reconsolidação da PCL induzida pela morfina, às condições do nosso laboratório;
- Avaliar os efeitos da manipulação do sistema endocanabinoide, imediatamente após a reativação, sobre a reconsolidação da memória hedônica condicionada ao lugar;
- Avaliar os efeitos da administração do CBD imediatamente após a reativação, sobre a reconsolidação da memória contextual ligada à droga em ratos;
- Avaliar se os efeitos do CBD sobre a reconsolidação da memória podem ser mediados pelos receptores canabinoides;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar adultos (60 - 90 dias de idade; 180 – 230 g, ao início dos experimentos), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas de moradia coletiva em uma sala com temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h, fase clara 07:00 h - 19:00 h) controladas. Os animais tiveram livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram realizados entre as 07:30 - 18:30 horas para minimizar as variações comportamentais circadianas dos roedores. A manipulação experimental dos animais ocorreu de acordo com as normas de conduta com animais experimentais e o consentimento prévio do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC) (números dos projetos PP00505/2011 e PP00816/2012).

4.2 Drogas

Os cloridratos de morfina (Merck) e de cocaína (Sigma-Aldrich), cloreto de naltrexona (Tocris Bioscience) e (5S,10R)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d]ciclohepten-5,10-imine maleato (MK801, Tocris Bioscience) foram dissolvidos em solução de cloreto de sódio 0,9 % (salina). Os outros fármacos: rimonabanto (Sanofi-Aventis); 3'-(aminocarbonil)[1,1'-bifenil]-3-il)-ciclohexilcarbamato (URB597, Cayman Chemical Company); 2-[(1R,6R)-3-metil-6-(1-metiletetil)-2-ciclohexen-1-il]-5-pentil-1,3-benzenediol; 6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil) metanona; (2-iodo-5-nitrofenil)-(1-(1-metilpiperidin-2-ilmetil)-1H-indol-3-il) metanona; (R)-(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanona mesilato (respectivamente canabidiol, AM630, AM1241, WIN 55,212-2; Tocris Bioscience) foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%) ou solução fosfato-salina (PBS, Sigma-Aldrich) contendo 10% de dimetilsulfóxido e 0,1 % de Tween 80. Para as administrações sistêmicas, o volume de injeção da cocaína e da morfina e seus respectivos controles foi de 1,0 ml/kg, sendo que os demais agentes farmacológicos foram injetados a um volume de 2,0 ml/kg pela via subcutânea (s.c.), exceto a cocaína que foi administrada pela via intraperitoneal (i.p.). O 2-araquidonoilglicerol, (5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14- ácido eicosatetraenoico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etil éster (2-AG, Tocris Bioscience), foi diluído em

solução 0,1 M de tampão fosfato-salina (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) contendo 10% de dimetilsulfóxido. O fármaco (2R, 3S, 4S)-4-hidroxi-2-(4-metoxibenzil)-pirrolidin-3-il acetato (anisomicina, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em PBS contendo ácido clorídrico (HCl 1 M), que foi posteriormente neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH 1 M) até a obtenção de pH próximo de 7,0. As doses dos fármacos utilizados neste trabalho foram escolhidas com base na literatura ou definidas através de experimentos piloto (Tabela 4).

Tabela 4. Fármacos utilizados no presente estudo, seu mecanismo de ação simplificado, assim como os estudos utilizados como referência para escolha da dose (ou faixa de dose).

Fármaco	Mecanismo de ação proposto	Dose: referência (s) para a escolha da (s) dose (s)
AM1241	Agonista CB2 seletivo	1, 3 e 10 mg/kg: GARCIA-GUTIEREZ <i>et al.</i> , 2010; GAMALEDING <i>et al.</i> , 2012
AM630	Antagonista CB2 seletivo	1,5 e 3 mg/kg: GAMALEDING <i>et al.</i> , 2012
Anisomicina	Inibidor de síntese proteica	125 µg/ µl/ hemisfério: MILEKIC <i>et al.</i> , 2006, TAUBENFELD <i>et al.</i> , 2010
2-AG	Agonista total CB1/CB2	36 µg/ µl/ hemisfério: Piloto
Canabidiol	?	5 e 10 mg/kg: REN <i>et al.</i> , 2009
Cocaína	Inibidor a recaptação de dopamina, noradrenalina e serotonina	10 mg/kg: BROWN <i>et al.</i> , 2008
MK801	Antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgicos NMDA	0,20 mg/kg: MILEKIC <i>et al.</i> , 2006; BROWN <i>et al.</i> , 2008
Morfina	Agonista opioide µ, κ e δ	10 mg/kg: MILEKIC <i>et al.</i> , 2006
Rimonabanto (SR141716A)	Antagonista CB1	1 e 3 mg/kg: YU <i>et al.</i> 2009; FANG <i>et al.</i> , 2011
URB597	Inibidor da enzima FAAH	0,3 mg/kg: MANWELL <i>et al.</i> , 2009
Naltrexona	Antagonista opioide µ, κ e δ	0,3 mg/kg: TAUBENFELD <i>et al.</i> , 2010
WIN55,212-2	Agonista CB1/CB2	0,125; 0,25 e 2,5 mg/kg: PANDOLFO <i>et al.</i> , 2009

4.3 Procedimentos experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram planejados com intuito de minimizar o número de animais utilizados, seguindo normas internacionais de cuidado e manuseio de animais de experimentação científica. Todos os animais foram manipulados ao experimentador, pelo menos 5 dias antes do início de cada experimento. Os animais eram habituados à sala de experimentação por pelo menos 30 min antes de cada sessão experimental. As salas de experimentação foram mantidas com temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade controladas durante o experimento.

4.3.1 Preferência condicionada ao lugar (PCL)

Os protocolos envolvendo a PCL têm sido extensamente utilizados para investigar as bases neuroquímicas da reconsolidação das memórias associadas a drogas (TAYLOR & TRONSON, 2013). O paradigma da PCL é baseado na capacidade do animal em associar o “efeito da droga” com dicas do ambiente. Tal associação leva o animal a apresentar um comportamento de busca pelo efeito da droga quando não está sob o efeito desta (TZSCHENTKE, 2007). Assim, um efeito reforçador positivo induzido pela droga manifesta-se através de um aumento relativo no tempo gasto no ambiente pareado à droga, e um efeito reforçador negativo manifesta-se através de uma redução relativa no tempo gasto no ambiente pareado à droga (TZSCHENTKE, 2007).

As sessões de PCL foram conduzidas sob iluminação baixa (aproximadamente 10 lux no compartimento central da caixa de PCL) em quatro caixas retangulares idênticas feitas de madeira revestida com fórmica. Cada caixa era constituída por dois grandes compartimentos de condicionamento ($30 \times 25 \times 40$ cm) separados por um compartimento central “neutro” ($15 \times 25 \times 40$ cm) através de portas de guilhotina (10×10 cm). Os dois compartimentos de condicionamento apresentavam diferentes pistas visuais e táteis. Um compartimento tinha paredes e assoalho lisos e pretos e o outro tinha paredes com listras verticais pretas e brancas e assoalho de alumínio (Figura 6). O comportamento de cada animal foi registrado através de uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato de PCL e monitorado a partir de uma sala adjacente por um circuito fechado de TV, por um experimentador que não tinha conhecimento do tratamento dos grupos experimentais durante a avaliação comportamental.



Figura 6. Fotografia da caixa de PCL (fonte do autor)

4.3.1.1 Aquisição da preferência condicionada ao lugar

O protocolo de aquisição da PCL consistiu em várias sessões consecutivas, sendo elas: pré-teste (dia 1), condicionamento (dias 2-5) e teste pós-condicionamento ou teste de preferência inicial (dia 6). No pré-teste cada animal foi colocado no compartimento central e após cerca de 10 segundos as portas das guilhotinas foram abertas e o animal teve livre acesso aos três compartimentos, durante 15 min. O tempo gasto por cada animal nos compartimentos maiores foi registrado e os animais que apresentaram uma preferência “não-condicionada” por qualquer compartimento de condicionamento, ou seja, os animais que permaneceram por 540 segundos ou mais em um dos compartimentos, foram eliminados do experimento (aproximadamente 5% dos animais) (WANG *et al.*, 2001).

No dia seguinte, cada animal foi submetido à primeira sessão de condicionamento, a qual foi conduzida utilizando um protocolo enviesado. Os animais foram sempre condicionados/pareados com a droga no compartimento que eles gastaram menos tempo no dia anterior. Em cada sessão de condicionamento, o animal recebia uma injeção subcutânea (s.c.) de morfina (5 ou 10 mg/kg) ou intraperitoneal (i.p.) de cocaína (10 mg/kg) e era imediatamente confinado no compartimento de condicionamento por 30 min. Na sessão seguinte, o animal recebia uma injeção de solução salina e era confinado no compartimento oposto. Na maioria dos experimentos, o condicionamento foi conduzido através de duas sessões diárias com intervalo de 6 h entre elas. A ordem das injeções foi contrabalanceada entre os grupos e entre os dias de condicionamento. Assim, cada animal recebeu uma injeção da droga (cocaína ou morfina) e foi imediatamente confinado no compartimento de condicionamento por 30 min. No dia seguinte, o animal recebeu uma injeção de solução salina e foi confinado no outro compartimento. Cada animal recebeu 4 pareamentos com salina alternados com 4 pareamentos com a droga, exceto para o grupo controle que recebeu apenas injeções de salina em todas as sessões do condicionamento.

Posteriormente, 24 h após a última sessão de condicionamento, os animais foram colocados no aparato e foi avaliada a expressão da PCL induzida pela droga (teste de preferência inicial). De modo semelhante à sessão de pré-teste, foi registrado o tempo gasto pelo animal em cada compartimento grande durante 15 min. Na maior parte dos experimentos, o parâmetro de PCL induzido pela droga foi representado pela diferença (em segundos) entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga nos testes após o condicionamento e o tempo gasto no mesmo compartimento durante o pré-teste (FANG *et al.*, 2011).

Neste estudo, todos os animais condicionados com morfina permaneceram mais tempo no compartimento pareado com a droga no dia do teste de preferência inicial (tempo gasto no compartimento pareado à droga – tempo gasto no compartimento pareado à salina > 0). Ademais, os animais que não apresentaram um aumento de pelo menos 10% (90 s) no tempo gasto no compartimento pareado com a droga no teste de preferência inicial, comparado com o mesmo compartimento durante o pré-condicionamento, foram excluídos do estudo (aproximadamente 5%). Este critério de exclusão tem sido usado para garantir uma maior robustez da PCL induzida pela droga (PAOLONE *et al.*, 2009).

4.3.1.2 Reconsolidação da PCL

O protocolo de reconsolidação utilizado neste estudo foi modificado a partir do estudo de Milekic e colaboradores (2006). A reconsolidação é o processo pelo qual as memórias formadas podem ser novamente estabilizadas ou desestabilizadas após a evocação, por estímulos previamente associados com a droga. O protocolo de reconsolidação da PCL é constituído pela aquisição da PCL, reativação da PCL e testes pós-reativação para avaliar a reconsolidação da memória condicionada à droga.

A etapa de aquisição consistiu em pré-teste (dia 1), condicionamento (dias 2-5) e teste de preferência inicial (dia 6), conforme descrito no item 4.3.1.1. Uma semana após o teste de preferência inicial, foi realizada a reativação da memória relacionada à droga. Neste estudo, a reativação da memória contextual condicionada à droga foi conduzida utilizando dois protocolos distintos:

- (1) Cada rato foi confinado por 10 minutos no compartimento em que foi condicionado à droga durante a aquisição da PCL, para reativar seletivamente a memória hedônica condicionada à droga

(na ausência do efeito da droga) (MILEKIC *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2011).

- (2) Cada rato foi submetido a uma sessão extra de condicionamento com a droga (1XCOND), ou seja, recebiam uma única injeção de morfina (10 mg/kg s.c.) e foram confinados por 30 min no compartimento pareado à droga, de acordo com o protocolo adaptado de Milekic e coautores (2006).

Com exceção do experimento 2, os grupos experimentais sempre receberam seus respectivos tratamentos farmacológicos imediatamente após a sessão de reativação. Em seguida retornaram para suas gaiolas de moradia onde permaneceram até os dias em que foram testados para avaliação da reconsolidação da memória. Cada teste pós-reativação foi conduzido na ausência de qualquer tratamento farmacológico em diferentes tempos (dias ou semanas). Durante os diferentes testes/retestes assim como no pré-teste e no teste de preferência inicial, cada rato teve livre acesso aos três compartimentos da caixa de PCL por 15 min.

A representação do parâmetro comportamental de preferência ou aversão condicionada ao lugar induzido pela droga, foi obtida pela diferença (em segundos) entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e o tempo gasto no mesmo compartimento durante o pré-teste (FANG *et al.*, 2011), exceto nos experimentos 8 e 10. Nestes experimentos, o parâmetro de PCL em cada teste foi determinado pela diferença (em segundos) entre o tempo gasto no compartimento pareado com salina e o tempo gasto no compartimento pareado com morfina no dia do teste (TAUBENFELD *et al.*, 2010).

4.3.1.3 Reinstalação da PCL

A reinstalação da PCL consiste no restabelecimento de uma resposta aprendida quando o animal é exposto a um estímulo estressor ou a uma dose desafio da droga (SANCHIS-SEGURA & SPANAGEL, 2006). O protocolo experimental consistiu em quatro etapas distintas: aquisição, reativação, extinção e reinstalação da PCL. A aquisição da PCL induzida pela morfina foi conduzida em 6 dias consecutivos. Após sete dias de intervalo foi realizada a reativação, pela reexposição ao contexto previamente pareado à morfina. O procedimento de extinção foi conduzido de maneira muito semelhante às sessões de condicionamento para aquisição da memória original, exceto pelo fato que em cada sessão de extinção o rato foi confinado em um dos dois compartimentos grandes, durante 30 min, na ausência de qualquer tratamento (morfina ou salina) (HEINRICHS *et al.*, 2010). No total, cada

rato foi submetido a 16 sessões de extinção (8 re-exposições ao contexto previamente pareado com morfina alternadas com 8 re-exposições ao contexto previamente pareado com salina), configurando duas sessões diárias com intervalo de 6 h entre elas, por 8 dias consecutivos (35° - 42° dia). Após 24 h da última sessão de extinção (42° dia), cada rato teve livre acesso aos três compartimentos durante 15 min, a fim de verificar se havia ocorrido a extinção da PCL condicionada à morfina (teste pós-extinção). A PCL é considerada extinta quando não ocorre diferença significativa entre os tempos gastos no compartimento condicionado com morfina ou com salina no teste de extinção (AGUILAR *et al.*, 2009). Foram utilizados dois protocolos diferentes de reinstalação da PCL à morfina: (i) a reinstalação induzida por uma dose desafio de morfina, e (ii) a reinstalação induzida pelo estresse agudo. No primeiro protocolo os animais receberam uma injeção de morfina na dose de 2,5 mg/kg (s.c.), 15 min antes do teste PCL (teste de reinstalação 1). A escolha da dose desafio para a reinstalação da PCL induzida pela droga foi baseada no estudo de Mueller e colaboradores (2002).

Na reinstalação induzida pelo estresse foi utilizado o estresse de contenção. O procedimento de contenção foi realizado em tubos de PVC opacos (20 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro, contendo pequenos furos ao longo da sua extensão que permitiam a respiração do animal). Cada rato foi cuidadosamente introduzido no tubo e as duas extremidades permaneceram fechadas de modo a não permitir a movimentação do animal dentro do tubo durante os 15 min. Esse procedimento de contenção física é considerado um forte estímulo estressor agudo (PATEL *et al.*, 2005) e tem sido utilizado nos estudos de reinstalação do comportamento de busca pela droga em roedores (LU *et al.*, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2003). Logo após a exposição ao estresse de contenção os animais tiveram livre acesso aos três compartimentos do aparato de PCL durante 15 min (teste de reinstalação 2).

4.3.2 Tarefa de reconhecimento de objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos (RO) é baseada na observação de que os roedores despendem maior tempo explorando um objeto novo, quando apresentados simultaneamente a um objeto familiar e outro novo (ENNACEUR & DELACOUR, 1988). Este comportamento típico tem sido utilizado na tarefa de reconhecimento de objeto, para investigar os mecanismos subjacentes às memórias declarativas em roedores (WINTERS *et al.*, 2008; DAVIS *et al.*, 2010).

A tarefa de reconhecimento de objetos foi realizada em uma caixa de campo aberto (50 cm x 50 cm x 50 cm), localizada numa sala

com luminosidade intensa (250 lux no centro do campo aberto) e poucas dicas ambientais. Os objetos estímulo utilizados na tarefa de reconhecimento eram constituídos de alumínio ou plástico, com formatos e cores distintos e dimensões similares (uma lata de energético de 300 ml, uma garrafa plástica de 250 ml, uma pirâmide e uma torre feitas de Lego®). Nenhum dos objetos possuía significância comportamental para os animais experimentais, os quais não demonstraram preferência por algum deles durante estudos piloto realizados previamente. Cada objeto foi preso ao assoalho do campo aberto com fita adesiva, sendo posicionados a cerca de 10 cm das paredes do aparato e a 30 cm do outro objeto. Os objetos, assim como todo o aparato, foram limpos com solução de etanol 70% após cada teste, a fim de minimizar possíveis pistas olfativas.

O tempo de investigação, definido como o tempo em que o animal permanece com o focinho posicionado em direção ao objeto a uma distância igual ou inferior a 2 cm ou tocando ou cheirando o objeto, foi registrado (em segundos) e utilizado como índice de memória. Comportamentos como sentar no objeto ou permanecer ao redor dele não foram considerados comportamentos exploratórios. O tempo gasto explorando cada objeto foi mensurado por um observador e expresso como porcentagem do tempo total de exploração (ROSSATO *et al.*, 2007).

O protocolo experimental de reconhecimento de objetos foi adaptado de um estudo previamente descrito por Rossato *et al.* (2007) e consistiu de quatro etapas: habituação, apresentação dos objetos, reativação e teste. (i) Habituação ao campo aberto: durante quatro dias consecutivos, os animais foram expostos ao campo aberto para o explorarem livremente na ausência de objetos por 20 min. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de familiarização dos animais ao contexto, para que a exploração do campo aberto não interferisse na investigação dos objetos ao longo do experimento. (ii) Após 24 h da última sessão de habituação, os animais foram submetidos à apresentação dos objetos (Dia 1). Nesta etapa os animais foram individualmente colocados no campo aberto de costas para os dois objetos estímulos, para que explorassem livremente os dois objetos distintos (nomeados de A e B) durante 5 min. (iii) No dia seguinte à apresentação dos objetos, os animais foram submetidos à reativação/atualização dos objetos (Dia 2), um dos objetos previamente apresentados (A ou B) foi aleatoriamente substituído por um objeto novo (objeto C). Os animais foram individualmente colocados no campo aberto para explorarem livremente os dois objetos (um familiar e outro

novo) durante 5 min. Imediatamente após a reativação, os animais receberam o tratamento farmacológico e, em seguida, foram mantidos em suas respectivas gaiolas até o dia do teste, que ocorreu após sete dias. (iv) No dia do teste de retenção (73º dia), os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais, e cada grupo foi que foi exposto a um dos objetos familiares (A, B ou C) e um novo objeto (nomeado D), exceto o grupo 4: Grupo 1 (A e D); Grupo 2 (B e D); Grupo 3 (C e D) e Grupo 4 (A e B) (Figura 7).

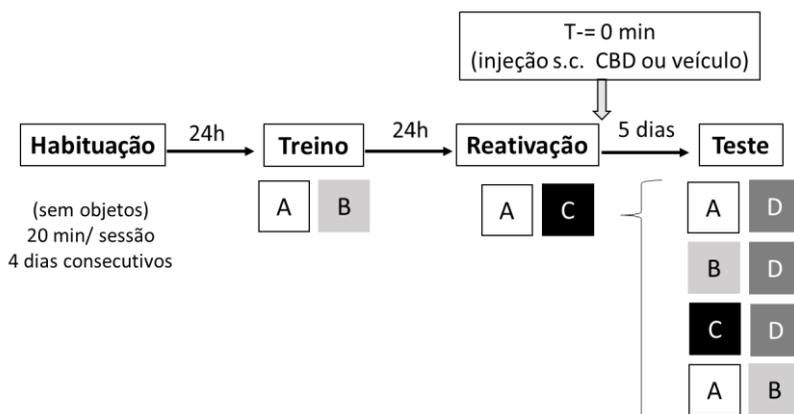


Figura 7. Esquema representativo do procedimento experimental de reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos.

4.3.3 Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE), baseado no conflito de roedores entre explorar um ambiente novo e o medo de áreas elevadas abertas, foi utilizado para mensurar comportamentos relacionados à ansiedade em ratos (PELLOW *et al.*, 1985). O aparato do LCE foi feito de madeira e revestido com fórmica preta e impermeável, possuindo quatro braços elevados (52 cm de altura) com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura (Figura 8). Os braços estão dispostos perpendicularmente, formando uma cruz, com dois braços opostos fechados por paredes de 40 cm de altura e dois braços abertos. A intersecção dos quatro braços forma uma plataforma central (10 x 10 cm) que dá acesso a qualquer um dos braços. Os testes foram conduzidos sob iluminação moderada (50 lux na plataforma central), sendo o comportamento registrado por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD instalado na sala adjacente à sala de experimentos. Cada animal foi colocado nessa plataforma, com a face voltada para um

dos braços abertos, e observados durante 5 min. Foi considerada “entrada” toda vez que o animal permanecia com as quatro patas no braço. Os parâmetros comportamentais avaliados foram: o número de entradas nos braços fechados, tempo gasto nos braços abertos em relação aos braços fechados e entradas nos braços abertos em relação aos braços fechados. Os dois últimos parâmetros foram considerados como medidas do comportamento do tipo ansiedade e foram expressos como percentual do total.



Figura 8. Fotografia representativa do labirinto em cruz elevado

4.3.4 Cirurgia estereotáxica e microinfusão hipocampal

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com os animais previamente anestesiados com uma mistura de cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada pela via intramuscular (i.m.). Após a tricotomia e assepsia da parte superior da cabeça, foi injetada uma solução de lidocaína 3% com adrenalina 1:50000 (Lidostesim®, Brasil) pela via subcutânea no local da incisão. Foi realizada uma incisão local, com posterior raspagem do periósteo, que permitiu a visualização do crânio e das suturas lambdoide e coronal. Em seguida, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de calibre 0,2 mm, que foram posicionadas seguindo as coordenadas da região do hipocampo (anteroposterior = -4,0 mm e médio-lateral = \pm 2,60 mm a partir da bregma; dorsoventral = 2,0 mm a partir da superfície do crânio) de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998) (Figura 9). Foi utilizada uma resina acrílica auto-polimerizante de secagem rápida (pó e líquido, Clássico®) para fixar as cânulas-guia no crânio dos animais e foi inserido em cada cânula um fio de aço inoxidável para evitar obstrução. Após recuperação da anestesia, todos os animais receberam o analgésico anti-inflamatório não esteroide de uso veterinário, flunixinina meglumina (Banamine®, 1,1 mg/kg s.c.), e o antibiótico contendo dihidroestreptomicina e estreptomicina

(Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte®, 0,1 ml para cada 100 g de peso corporal, i.m.).

Durante a microinfusão o animal foi cuidadosamente imobilizado, os fios de aço foram retirados e após a desobstrução, uma agulha de infusão (0,3 mm de diâmetro) foi acoplada a uma microseringa Hamilton (10 µl) por meio de um tubo de polietileno PE10 (Clay Adams®, EUA), e inserida dentro de cada cânula. Com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight®, Brasil), cada animal recebeu o volume de 1,0 µl/hemisfério durante 90 s. As agulhas foram removidas apenas 60 s após o término da infusão para evitar o refluxo da solução.

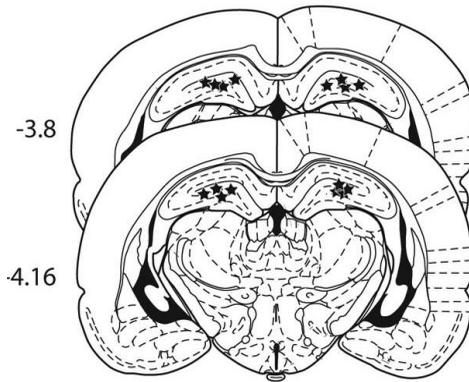


Figura 9. Esquema dos ilustrativo dos locais de infusão no hipocampo em plano rostrocaudal. As estrelas representam os locais aproximados das infusões. Os números (-3,8mm e -4,16mm) representam as coordenadas posteriores a partir do bregma de acordo com Paxinos e Watson (1998).

4.3.5 Controle histológico do local da infusão

Após o término dos experimentos comportamentais, foi feita a avaliação histológica dos animais previamente operados, para verificar a posição de suas cânulas e a região cerebral atingida pela infusão, visando garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a administração correta dos fármacos fossem incluídos na análise estatística final. Para isso, após a conclusão dos procedimentos comportamentais, os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas. Cerca de 15 min depois, foi realizada a eutanásia por decaptação e a remoção dos encéfalos, os quais foram colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 dias, quando então se procedeu a análise

histológica, considerando-se somente os animais com a localização dentro de 2 mm² do sítio de posição da cânula.

4.3.6 Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona

Logo após a exposição ao LCE, os animais foram individualmente anestesiados e após a eutanásia foi coletada uma amostra de sangue por punção intracardíaca. Cada amostra coletada foi imediatamente armazenada em um *ependorf* contendo uma solução aquosa do anticoagulante etileno diaminotetracetato de potássio (EDTA) a 10%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 RPM durante 10 min (4°C) para a obtenção das amostras de soro, o qual foi armazenado em freezer (-20 °C) até a realização do ensaio. Nesse dia, as amostras foram descongeladas e reconstituídas por agitação em vórtice. Em seguida, foram diluídas na proporção de 1:10 e a concentração de corticosterona em cada amostra foi avaliada em duplicata por conjunto para ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immuno absorbent Assay; Corticosterone ELISA, IBL International®, Alemanha). No ensaio foram utilizados 20 µl da solução padrão ou de da cada amostra. A construção das curvas padrão foi feita através de concentrações padrão de 0,5, 15, 30, 60, 120 e 240 nmol/L providas pelo conjunto ELISA. A densidade óptica (450 nm) para cada poço das placas do conjunto foi medida utilizando um leitor de placa (TECAN Group Ltd., Switzerland) dentro de 10 min após a adição de solução de parada para o encerramento da reação enzimática. A determinação das curvas de concentração foi feita por método automatizado utilizando um programa de computador específico (MasterPlex® 2010; Hitachi Software Engineering Co. Ltd. EUA). O cálculo dos resultados foi feito após a construção de curvas padrão e plotagem das absorbâncias médias dentro das curvas padrão. Todas as concentrações mensuradas nas amostras ficaram dentro dos limites das curvas padrão.

4.4 Delineamento experimental

Os experimentos listados a seguir foram agrupados em quatro blocos, os quais foram desenvolvidos para responder diferentes questões pertinentes ao nosso estudo utilizando as metodologias anteriormente mencionadas. Primeiramente, padronizamos o protocolo de reconsolidação da memória hedônica às condições do nosso laboratório e, logo iniciamos a investigação do envolvimento do sistema eCB na reconsolidação de memórias condicionada à morfina. Em seguida, avaliamos os efeitos da administração aguda do CBD sobre a reconsolidação a reconsolidação de memórias contextuais ligadas à

droga em ratos. Finalmente, investigamos se os efeitos do CBD sobre a reconsolidação da memória contextual ligada à droga poderiam ser mediados pelo sistema eCB.

4.5 Análises estatísticas

Os dados experimentais estão expressos como média + erro padrão da média (média + E.P.M.), com o número da amostra (n) expresso na legenda de cada figura. A verificação da distribuição normal dos dados coletados foi feita por meio do teste de Kolmogorov Smirnov. Conforme o tipo de experimento e os grupos experimentais, a análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via com medidas repetidas quando necessário. Os diferentes testes da PCL foram considerados “fatores de repetição” e os diferentes grupos experimentais como fator “tratamento”. Na análise dos dados paramétricos da tarefa de reconhecimento de objetos foi utilizado o teste *t* de Student para a determinação do desempenho no teste, ou seja, a avaliação se o percentual de exploração do objeto novo diferia significativamente de um valor teórico de 50%. O teste *post hoc* de Tukey foi empregado para múltiplas comparações ponto a ponto. O nível mínimo de significância considerado para todos os testes foi $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica 7 (Statsoft Inc, EUA) e os gráficos elaborados através do programa GraphPad 5 (GraphPad Inc, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do protocolo de reconsolidação da memória condicionada à morfina.

5.1.1 Experimentos 1: Padronização do procedimento de reconsolidação da PCL.

O objetivo deste experimento foi reproduzir os procedimentos experimentais de reconsolidação da PCL previamente descritos na literatura (MILEKIC *et al.*, 2006; TAUBENFELD *et al.*, 2010; FANG *et al.*, 2011) nas condições do nosso laboratório, para posterior investigação das questões pertinentes ao nosso estudo. Inicialmente, os ratos foram submetidos ao procedimento de aquisição da PCL induzida pela morfina (pré-teste, condicionamento e teste de preferência inicial) que foi conduzido durante seis dias consecutivos, conforme descrito anteriormente. Sete dias após o teste de preferência inicial, os animais condicionados com morfina foram divididos em 4 grupos experimentais: (1) Morf/não-reativado, permaneceram na gaiola de moradia; (2) Morf/morf, foram injetados com morfina (10 mg/kg) e em seguida foram colocados na gaiola de moradia; (3) Morf/1XCOND, receberam uma sessão extra de condicionamento com morfina; (4) Morf/lado pareado, foram brevemente confinados (10 min) no compartimento onde foram condicionados com morfina. O grupo controle, recebeu somente salina durante o condicionamento e permaneceu na gaiola de moradia durante a sessão de reativação. Os animais foram testados 7 dias após essa manipulação.

A Figura 10A mostra os resultados referentes à padronização da reconsolidação da memória associada à morfina no paradigma da PCL. A ANOVA de uma via com medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento ($F_{4, 42}=28,77$; $p\leq 0,0001$) e do fator repetição ($F_{2, 84}=22,09$; $p\leq 0,00001$) e uma interação entre os dois fatores ($F_{8, 84}=5,16$; $p\leq 0,001$). A análise *post hoc* revelou que os quatro grupos condicionados com morfina adquiriram PCL em relação ao grupo controle ($p\leq 0,00001$) no teste de preferência inicial e mantiveram a preferência ao longo dos outros testes ($p\leq 0,05$). A análise *post hoc* também mostrou que ambos os grupos Morf/não-reativado e Morf/Morf apresentaram parâmetros de PCL menores comparados aos grupos condicionados com morfina que tiveram a memória reativada no lado pareado à droga ($p<0,05$; para ambos) ou que receberam uma sessão extra de condicionamento ($p<0,05$; para ambos). Não foram observadas

diferenças significativas entre os seguintes grupos: Morf/lado pareado vs. Morf/1XCOND e Morf/não reativado vs. Morf/morf) durante o teste pós-reativação. Conjuntamente, os resultados sugerem que tanto a breve reexposição ao contexto quanto uma sessão extra de condicionamento são capazes reativar a memória condicionada à morfina.

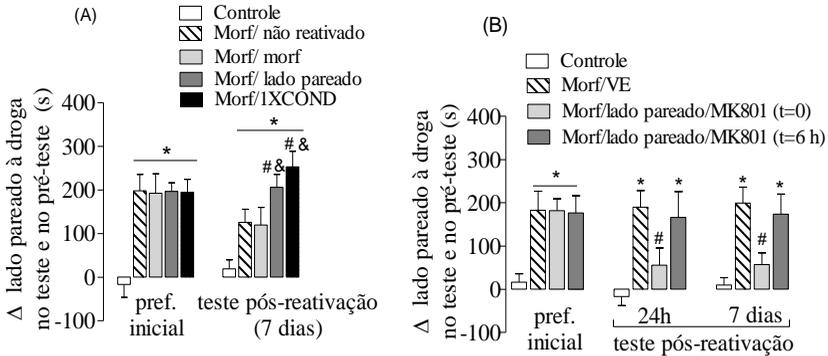


Figura 10. Padronização do protocolo de reconsolidação da PCL induzida pela morfina. O efeito de diferentes manipulações experimentais para sobre a reativação da PCL em ratos previamente condicionados com morfina que foram avaliados na semana seguinte (A). Efeito amnésico temporal do MK801 sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina (B). * $p \leq 0,05$ vs. grupo (no mesmo teste); & $p \leq 0,05$ vs. Morf/Morf; # $p \leq 0,05$ vs. Morf/não reativado ou Morf/VE. As linhas e barras verticais representam a média + EPM da diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste o tempo gasto durante o pré-teste (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; N=9-10/grupo).

5.1.2. Experimento 2: Efeito amnésico da administração do MK801 após a reativação se restringe à janela de reconsolidação.

A reconsolidação da memória é um processo dinâmico que dura em torno de 6 horas (DUDAI, 2004). Estudos anteriores mostraram que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA, pelo antagonista MK801, prejudica a reconsolidação da memória associada à droga no paradigma da PCL (SADLER *et al.*, 2007; BROWN *et al.*, 2008). Neste sentido, os animais foram treinados para desenvolverem PCL induzida pela morfina. Uma semana depois, os ratos condicionados com morfina foram reexpostos ao contexto pareado à droga (10 min), a fim de reativar a memória contextual ligada à droga, com exceção do grupo controle. Em seguida, os grupos condicionados com morfina foram divididos em três grupos: (1) os que receberam uma única injeção de solução salina logo após a reativação ($t = 0$); (2) ou os que receberam

MK801, na dose de 0,20 mg/kg, imediatamente ($t=0$) ou (3) 6 h após a reativação da memória. Todos os animais foram testados 24 h e 7 dias após a sessão de reativação.

Os dados do experimento 2 estão ilustrados na Figura 10B. A ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL através dos grupos experimentais e dos testes revelou um efeito significativo do tratamento ($F_{3, 36}=28,34$; $p<0,0001$), da repetição ($F_{2, 72}=23,06$; $p<0,01$) e uma interação entre esses fatores ($F_{6, 72}=10,90$; $p<0,05$). As comparações *post hoc* relevaram no teste de preferência inicial todos os grupos condicionados com morfina adquiriram PCL induzida pela morfina, quando comparados com o grupo controle ($p<0,01$). Os grupos Morf/VE e o grupo tratado com MK801 6 horas após a reexposição ao contexto pareado à droga, mantiveram a PCL nos testes seguintes, quando comparados com o grupo controle ($p<0,05$). Somente o grupo que recebeu a injeção de MK801 imediatamente após a reativação, apresentou uma redução significativa no PCL em relação aos demais grupos experimentais condicionados com morfina ($p<0,05$) nos testes 24 h e 7 dias após a reativação, comparado aos demais grupos condicionados com a droga. Além disso, não foram observadas diferenças significantes entre o grupo que recebeu a injeção de MK801 ($t=0$) e o grupo controle. Deste modo, esses resultados sugerem que o efeito amnésico do MK801 não é observado quando a administração é feita 6 h após o término da etapa de reconsolidação. Tendo em vista os resultados obtidos nesses dois experimentos, na maioria dos experimentos seguintes o procedimento de reativação foi conduzido através da reexposição ao compartimento pareado à droga. Além disso, todas as intervenções farmacológicas foram realizadas imediatamente após a reativação da memória.

5.2 Envolvimento do sistema eCB na reconsolidação de memórias associadas à droga.

Neste bloco de experimentos, foi utilizado o mesmo procedimento experimental de aquisição e reativação da memória e testes após a reativação, conforme esquematicamente representado como na Figura 11. Uma semana após a aquisição da PCL induzida pela morfina (teste de preferência inicial), os animais foram reexpostos por 10 min ao contexto previamente pareado à droga, para reativar a memória contextual condicionada à droga.

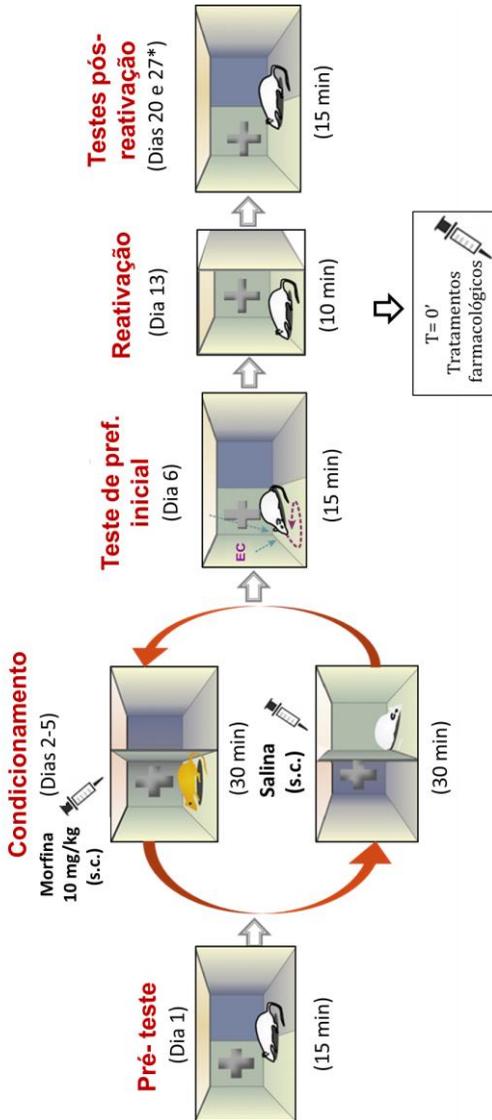


Figura 11. Esquema ilustrativo do protocolo de reconsolidação da memória condicionada à droga (*) utilizado na maioria dos experimentos: aquisição (pré-teste, condicionamento e teste de preferência inicial), reativação e testes pós-reativação da PCL induzida pela droga, conforme detalhado nos itens 4.3.1.1 e 4.3.1.2 de Material e Métodos (Figura modificada de HUSTON *et al.*, 2013).

Toda a manipulação farmacológica pós-reativação foi realizada de maneira sistêmica pelas vias subcutânea ou intraperitoneal e todos os grupos foram testados 7 e 14 dias após a reativação/tratamento (ver Figura 11), exceto no experimento 6. Cada experimento foi conduzido com grupos experimentais independentes. Para cada experimento havia um grupo controle que só recebeu solução salina durante o condicionamento e solução veículo logo após a reativação.

5.2.1. Experimento 3: Investigar a participação dos receptores canabinoides do tipo CB1 e CB2 na reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.

Os experimentos de antagonismo farmacológico foram realizados para investigar a participação dos receptores canabinoides do tipo CB1 e CB2 na reconsolidação da memória contextual associada à morfina. Os experimentos foram conduzidos de maneira idêntica ao experimento anterior (ver Figura 11). Os animais condicionados com morfina (N =9–10/grupo) foram injetados com rimonabanto (1,0 ou 3,0 mg/kg), um antagonista dos receptores canabinoides CB1; ou MK801 (0,20 mg/kg.), um antagonista dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA usado como controle positivo ou solução veículo, imediatamente após a sessão de reativação. De modo similar, grupos independentes de ratos condicionados com morfina (N =9–10/grupo) receberam uma injeção de AM630 (1,5 ou 5,0 mg/kg), um antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB2 ou solução veículo, logo após a sessão de reativação.

Conforme mostrado na Figura 12A, a ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL através dos fatores tratamento e repetição (testes) revelou efeitos significantes dos diferentes tratamentos ($F_{4, 42}=23,73$; $p<0,00001$) da repetição ($F_{2, 84}=23,22$; $p<0,00001$) e uma interação entre ambos os fatores ($F_{8, 84}=4,26$; $p<0,001$), no experimento com o antagonista CB1 rimonabanto. As análises *post hoc* revelaram que, depois do condicionamento, todos os grupos condicionados com morfina apresentaram um aumento significativo no tempo de permanência no compartimento pareado à droga após o condicionamento, comparados ao grupo controle ($p<0,01$), mas não houve diferença significativa no parâmetro de PCL entre esses quatro grupos durante o teste de preferência inicial. O grupo experimental que recebeu MK801 mostrou uma redução significativa no tempo gasto no compartimento pareado à droga, em relação aos grupos Morf/VE e Morf/Rimonabanto 1 mg/kg nos testes de 7 dias ($p\leq 0,05$ e $p<0,03$; respectivamente) e 14 dias ($p<0,002$ e $p<0,004$;

respectivamente) após o tratamento. Ambos os grupos Morf/VE e Morf/Rimonabanto 1 mg/kg continuaram apresentando diferenças significantes no parâmetro de PCL em relação ao grupo controle, quando avaliados 7 dias ($p < 0,005$ e $p < 0,002$; respectivamente para cada grupo) e 14 dias ($p < 0,02$ e $p < 0,01$; respectivamente para cada grupo) após o tratamento. Além disso, não foram observadas diferenças significantes entre esses dois grupos experimentais em nenhum dos testes. A análise *post hoc* revelou que, de maneira semelhante ao que ocorreu com o grupo Morf/MK801 (controle positivo), o grupo que recebeu a dose de 3 mg/kg de rimonabanto apresentou uma redução significativa do tempo gasto no compartimento pareado à morfina, em ambos os testes de 7 e 14 dias após a reativação ($p < 0,005$) em relação ao teste de preferência inicial. Conjuntamente, estes resultados indicam que o bloqueio dos receptores canabinoides CB1 prejudica a reconsolidação da memória associada à morfina no modelo da PCL.

A Figura 12B mostra os resultados do experimento com AM630, antagonista seletivo CB2. A ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL através dos diferentes tratamentos, revelou efeito significativo do fator tratamento ($F_{3,36} = 42,40$; $p < 0,00001$). Não houve efeito significativo do fator repetição (testes) e nem interação entre os esses fatores. As análises *post hoc* revelaram que depois do condicionamento, todos os grupos condicionados com morfina apresentaram um aumento significativo no compartimento pareado à droga após o condicionamento, comparados ao grupo controle ($p < 0,03$). Além disso, não houve diferença significativa no parâmetro de PCL entre os grupos condicionados com morfina durante o teste de preferência inicial, assim como nos subsequentes testes após a reativação. Esses achados sugerem que a administração do antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB2, AM630, parece não interferir na reconsolidação da memória condicionada à morfina no modelo de PCL.

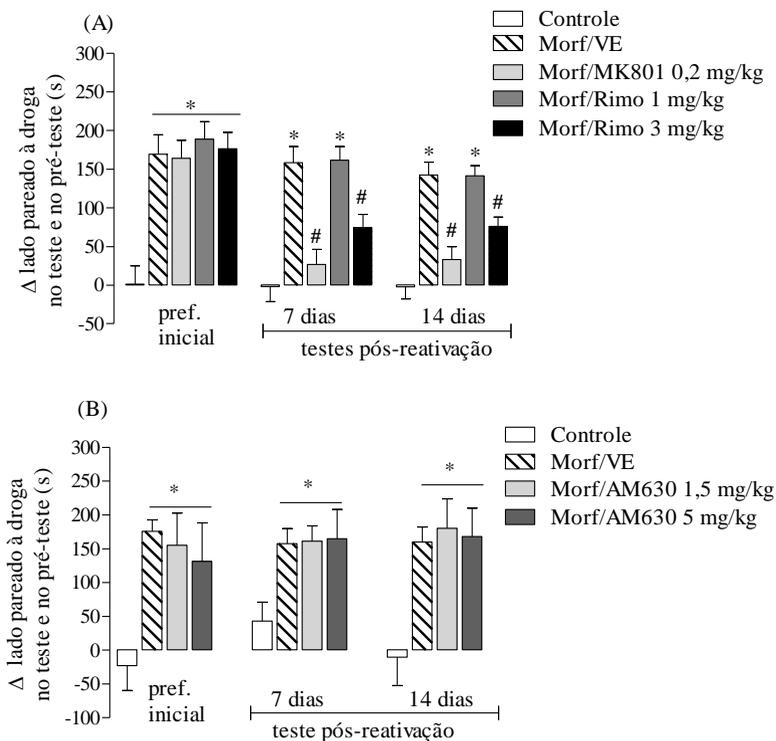


Figura 12. Efeitos dos antagonistas canabinoides CB1 e CB2 sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina. Imediatamente após a reativação, grupos independentes foram injetados com os antagonistas seletivos **(A)** CB1 rimonabanto (Rimo, 1 ou 3 mg/kg) ou **(B)** CB2 (AM630, 1,5 ou 5 mg/kg) ou seus veículos correspondentes. Todos os grupos foram reavaliados 7 e 14 dias pós-tratamento. Os dados estão expressos como a diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + EPM). * $p < 0,05$ vs grupo controle; # $p < 0,05$ vs grupo Morf/VE (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; $N = 9-10$ /grupo).

5.2.2. Experimento 4: Investigar o impacto da ativação direta e indireta dos receptores canabinoides na reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.

Estes experimentos tiveram como objetivo investigar os efeitos da ativação direta e indireta dos receptores canabinoides através administração de agonistas canabinoides ou de um inibidor do catabolismo da anandamida, logo após a reativação da memória. Os experimentos foram conduzidos de maneira idêntica ao experimento

anterior (ver protocolo na Figura 11). Contudo, imediatamente após a reativação, grupos independentes de ratos previamente condicionados com morfina foram injetados com um potente agonista canabinoide CB1/CB2 não seletivo (N =10–11/grupo), o WIN 55, 212-12 (0,0; 0,125; 0,25 ou 2,5 mg/kg); ou com o agonista seletivo dos receptores CB2 (N =9-10/grupo), o AM1241 (0,0; 1, 3, ou 10 mg/kg); ou com um inibidor da enzima amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH), que potencializa o efeito da anandamida, o URB597 (0,0; 0,3; ou 1,0 mg/kg).

A Figura 13A ilustra os efeitos da administração sistêmica do agonista canabinoide, WIN 55,212-2, sobre a reconsolidação da memória associada à morfina na PCL. A ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL através dos diferentes tratamentos revelou efeitos significantes do tratamento ($F_{4, 45}=25,09$; $p<0,00001$), da repetição ($F_{2,90}=4,21$; $p<0,02$) e uma interação entre ambos os fatores ($F_{8, 90}=2,07$; $p<0,05$). As análises *post hoc* revelaram que depois do condicionamento, todos os grupos condicionados com morfina apresentaram um significativo aumento no compartimento pareado à droga quando comparados ao grupo controle ($p<0,02$) durante o teste de preferência inicial. Ademais, não houve diferença significativo no parâmetro de PCL entre esses quatro grupos no teste de preferência inicial nem no teste 7 dias após a reativação/tratamento. O teste de Tukey também indicou que o grupo Morf/WIN 2,5 apresentou uma redução significativa no parâmetro de PCL no último teste (14 dias) após o tratamento, quando comparado com os dois testes anteriores ($p<0,01$). Em relação ao teste 14 dias após a reativação, não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de PCL entre os grupos Morf/VE, Morf/WIN 0,125 ou Morf/WIN 2,5. Esses resultados sugerem que a administração do WIN 55,212-12, em diferentes doses (0,125-2,5 mg/kg), parece não influenciar na reconsolidação da memória associada à morfina na tarefa de PCL.

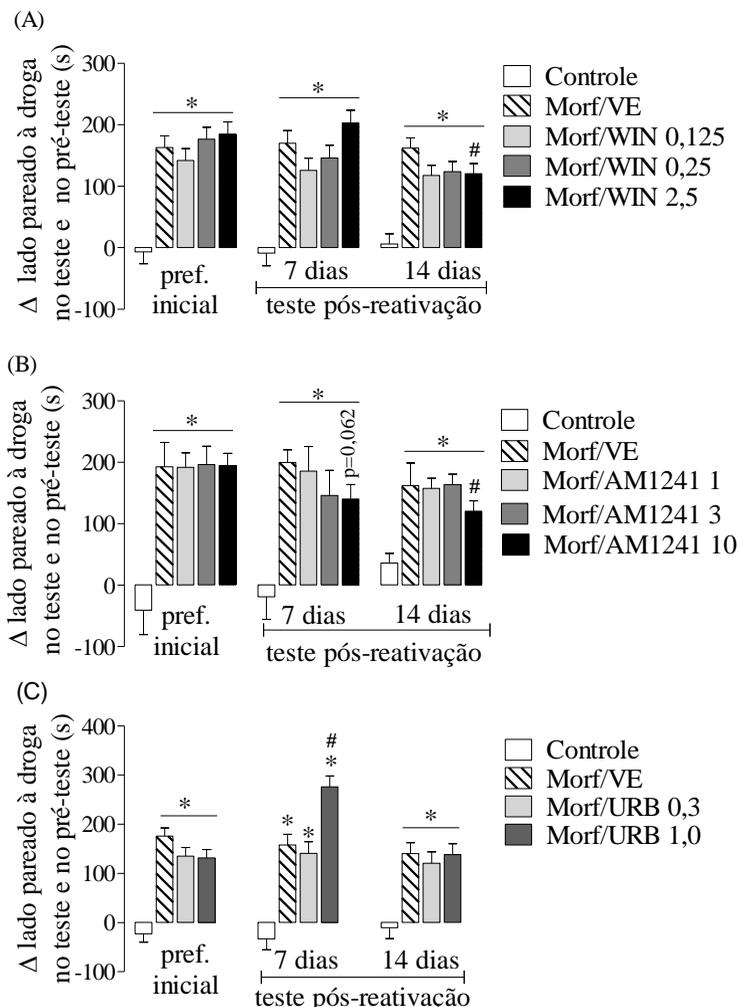


Figura 13. Efeito da ativação direta e indireta dos receptores canabinoides sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina. Imediatamente após a reativação, grupos independentes receberam foram injetados com o agonista canabinoide não seletivo CB1/CB2 (A), WIN55,212-2 (0,0-2,5 mg/kg) e seletivo dos receptores CB2 (B), AM1241 (0,0-10 mg/kg) ou com o inibidor da enzima de degradação da anandamida URB597 (C), (0,0-1,0 mg/kg). Todos os grupos foram reavaliados 7 e 14 dias após a reativação. Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + E.P.M). * $p < 0,05$ vs grupo controle; # $p < 0,05$ do mesmo grupo nos testes anteriores (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; N=8-11/grupo).

A Figura 13B ilustra os efeitos da administração sistêmica do agonista canabinoide seletivo CB2, AM1241, sobre a reconsolidação da memória associada à morfina na PCL. A ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL através dos diferentes tratamentos, revelou efeitos significantes do tratamento ($F_{4, 45}=24,29$; $p<0,0001$) e uma interação entre os fatores tratamento e repetição (testes) ($F_{8, 90}=2,21$; $p<0,01$). As análises *post hoc* revelaram que depois do condicionamento, todos os grupos condicionados com morfina apresentaram seus respectivos parâmetros de PCL significativamente maiores do que o grupo controle ($p<0,00001$) no teste de preferência inicial. Subsequentes análises *post hoc* revelaram que esse perfil apresentado pelos 4 grupos condicionados com morfina se manteve nos retestes pós-reativação, quando comparados com grupo controle na mesma sessão ($p<0,01$). O teste de Tukey também indicou que o grupo que recebeu a maior dose (10 mg/kg) do agonista seletivo CB2, AM1241, apresentou uma redução significativa do tempo gasto no compartimento pareado à droga nos testes 7 e 14 dias após a reativação/tratamento, quando comparados ao teste de preferência inicial ($p=0,048$ e $p=0,041$; respectivamente). Outras comparações indicaram que durante o primeiro reteste, o grupo que recebeu a maior dose de AM1241 (10 mg/kg), apresentou uma leve, porém não significativa ($p=0,062$), redução da PCL em relação ao grupo morf/VE. No entanto, não foi detectada diferença entre esses dois grupos Morf/AM1241 (10 mg/kg) vs Morf/VE no teste seguinte. Esses resultados indicam que a ativação dos receptores canabinoides CB2 pode atenuar a preferência condicionada à morfina em ratos.

A Figura 13C, ilustra os resultados do experimento com o inibidor da enzima FAAH, que degrada a anandamida. A ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL através dos diferentes tratamentos, revelou efeitos significantes dos fatores tratamento ($F_{3, 35}=31,11$; $p<0,0001$), repetição, ($F_{2, 70}=6,90$; $p<0,002$) e uma interação entre ambos os fatores ($F_{6,70}=8,02$; $p<0,0001$). As análises *post hoc* revelaram que depois do condicionamento todos os grupos condicionados com morfina apresentaram um aumento significativo no compartimento pareado à droga, quando comparados ao grupo controle ($p<0,005$). Ademais, não houve diferenças significativas no parâmetro de PCL entre os três grupos durante o teste de preferência inicial. Outras comparações através do teste de Tukey mostraram que o grupo que recebeu a maior dose de URB597 (1,0 mg/kg) teve um aumento significativo da PCL, comparado às medidas de PCL dos

grupos Morf/VE ($p < 0,01$) e Morf/URB0,3 ($p < 0,004$) durante o reteste, 7 dias após a reativação. Não há diferença estatística entre os grupos Morf/VE e Morf/URB 0,3 mg/kg no primeiro reteste. Além disso, no teste 14 dias após a reativação os três grupos treinados com morfina continuaram apresentando diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,005$). Ademais, não houve diferenças significativas entre eles neste teste. Esses achados sugerem que a potencialização da sinalização eCB imediatamente após a reativação da memória, promove um aumento transitório na PCL induzida pela morfina.

5.2.3. Experimento 5: Investigar se os receptores CB1 estão envolvidos no aumento da reconsolidação da memória condicionada à morfina induzida pelo URB597 em ratos.

Este experimento também foi conduzido de maneira similar aos anteriores (ver Figura 11), exceto pelo fato que logo após a reativação os animais condicionados com morfina ($N = 8-10$ /grupo) foram injetados com antagonista dos receptores CB1, rimonabanto (0,0; 1,0 ou 3,0 mg/kg) e após 30 min, cada grupo experimental recebeu uma injeção de URB597 na dose de 1,0 mg/kg ou solução veículo.

Conforme ilustrado na Figura 14, a ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL revelou efeitos significantes dos fatores tratamento ($F_{6, 63} = 27,99$; $p < 0,00001$), repetição ($F_{2, 106} = 33,68$; $p < 0,00001$) e uma interação entre ambos ($F_{12, 106} = 12,99$; $p < 0,001$). Na sequência, análises *post hoc* revelaram que após o condicionamento, todos os grupos condicionados com morfina apresentaram parâmetros de PCL significativamente maiores em relação ao grupo controle ($p < 0,005$), e não houve diferença significativa entre os seis grupos, durante o teste de preferência inicial. O teste de Tukey revelou que entre os grupos condicionados com morfina, somente os grupos (Morf/Rimo3+VE e Morf/Rimo3+URB) que receberam a maior dose (3 mg/kg) do antagonista CB1 não diferiram estatisticamente do grupo controle durante os dois testes pós-reativação. Os demais grupos (Morf/VE+VE, Morf/VE+URB, Morf/Rimo1+VE e Morf/Rimo1+URB1) continuaram apresentando índices de PCL significativamente maiores, quando comparados ao grupo controle, durante os testes de 7 dias ($p < 0,000001$) e 14 dias ($p < 0,003$) pós-reativação/tratamento. Comparações adicionais revelaram somente no primeiro teste, 7 dias após a reativação, o parâmetro de PCL do grupo Morf/VE+URB1 difere significativamente dos demais grupos ($p < 0,002$ até $p < 0,000001$). Reproduzindo os resultados anteriores, a administração *per se* de URB597 (1 mg/kg) promove um aumento transitório na PCL,

enquanto a maior dose de rimonabanto promoveu uma redução da PCL, em relação ao considerado controle do teste (Morf/VE+VE), considerado controle do teste ($p < 0,001$ e $p < 0,01$; respectivamente). O pré-tratamento com rimonabanto em uma dose sem efeito aparente (1 mg/kg), assim como a dose efetiva (3 mg/kg), foi capaz de prevenir o aumento da PCL induzidas pela administração de URB597 ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente) no primeiro teste pós-reativação. Deste modo, os resultados sugerem que o aumento transitório da PCL induzido pelo URB597 parece ser mediado pela ativação dos receptores CB1.

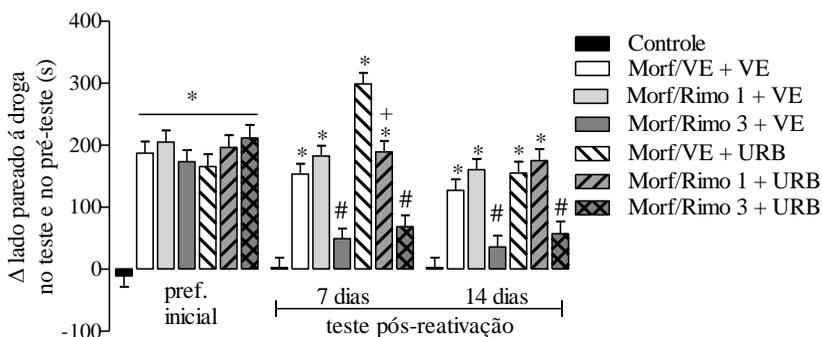


Figura 14. O antagonista dos receptores CB1 previne os efeitos da administração do inibidor da enzima FAAH (URB597) sobre a reconsolidação PCL associada à morfina. Imediatamente após a reativação os ratos condicionados com morfina receberam uma injeção do antagonista canabinoide rimonabanto (Rimo: 0,0-3,0 mg/kg) e 30 min depois foram tratados com o URB597 (0,0 ou 1,0 mg/kg). Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + EPM). * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. Morf/VE+VE; + $p < 0,05$ vs. Morf/VE+URB (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; $N=8-11$ /grupo).

5.2.4. Experimento 6: Avaliar os efeitos da infusão intra-hipocampal do eCB 2-AG sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.

Estudos anteriores mostraram que o hipocampo desempenha um papel importante na reconsolidação da memória contextual ligada à droga. Neste sentido, o objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da microinfusão do 2-AG, agonista total dos receptores canabinoides, nesta estrutura, imediatamente após a reativação da memória condicionada à morfina.

Para isso, os ratos foram operados para inserção bilateral de cânulas guia na região do hipocampo. Cinco dias após a recuperação da cirurgia, os animais foram submetidos ao procedimento de aquisição da PCL e reativação da memória, de maneira idêntica aos experimentos anteriores. Imediatamente após a reativação, os animais canulados que foram previamente condicionados, foram divididos em dois grupos (n=5-6/grupo). Metade recebeu infusão bilateral no hipocampo do inibidor da síntese proteica, anisomicina (125 µg/µl/hemisfério), e a outra metade recebeu a infusão do agonista canabinoide endógeno, 2-AG (36 µg/µl/hemisfério). Aqui, todos os grupos foram testados 24 e 48 horas após a reativação. Os grupos controle/SHAM e Morf/SHAM passaram pelo procedimento cirúrgico, mas não foram inseridas as cânulas guia. Ambos os grupos, receberam somente injeções sistêmicas de solução salina após a reativação. Estudos anteriores mostraram que a infusão de anisomicina no hipocampo, nessa dose, bloqueia a reconsolidação da memória associada à morfina na PCL em ratos (MILEKIC *et al.* 2006; TAUBENFELD *et al.* 2010).

A Figura 15 ilustra os efeitos da infusão intra-hipocampal do agonista total dos canabinoides, 2-AG, sobre a reconsolidação da memória induzida pela morfina na PCL. A ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL, revelou efeito significativo do fator tratamento ($F_{3, 23}=96,97$; $p<0,000001$) e uma interação entre os fatores tratamento e repetição ($F_{6, 46}=25,09$; $p<0,00001$). As análises *post hoc* revelaram que depois do condicionamento, todos os grupos condicionados com morfina permaneceram significativamente mais tempo no compartimento pareado à droga após o condicionamento, quando comparados ao grupo controle ($p<0,01$) no teste de preferência inicial. A análise *post hoc* indicou que grupo que recebeu a infusão de anisomicina (controle positivo) no hipocampo após a reativação da memória, apresentou uma redução significativa no parâmetro de PCL em relação ao grupo Morf/SHAM em nos testes de 24 e 48 horas após a reativação ($p<0,04$ e $p<0,05$; respectivamente). O teste de Tukey indicou que o grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de 2-AG apresentou um aumento significativo da PCL, nos retestes de 24 e 48 horas pós-reativação, quando comparado ao próprio grupo no teste de preferência inicial ($p<0,0001$ para ambos os testes). Outras comparações indicaram que o grupo que recebeu a infusão de 2-AG no hipocampo, difere significativamente do grupo morf/SHAM, tanto no primeiro quanto no segundo teste pós-reativação ($p<0,0001$ e $p<0,0001$; respectivamente). Além disso, os grupos Morf/SHAM e Morf/2-AG continuaram

apresentando PCL durante os dois testes pós-reativação, comparados com o grupo controle ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$; respectivamente). Esses resultados indicam que a infusão do 2-AG, imediatamente após a reativação da memória, pode facilitar a reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.

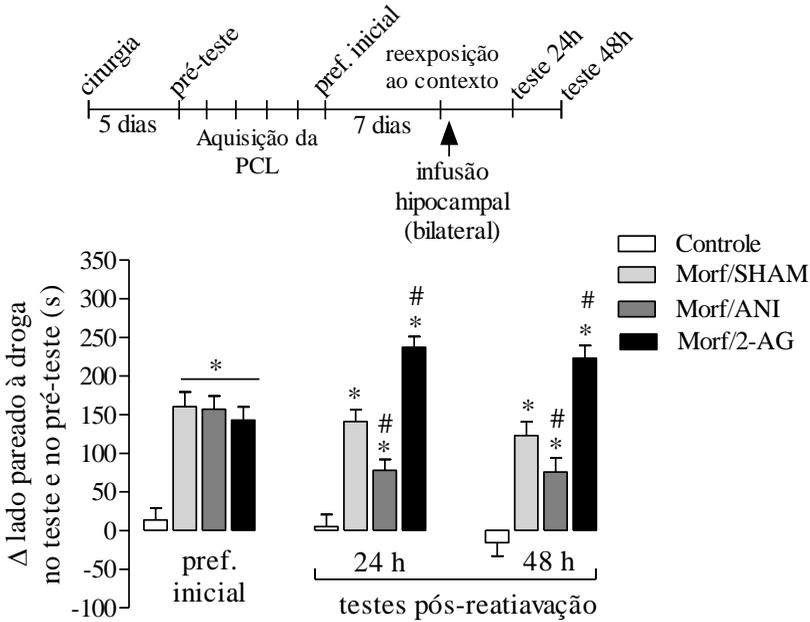


Figura 15. Efeito da infusão bilateral do agonista dos receptores canabinoides 2-AG no hipocampo, sobre a reconsolidação associada à morfina. Imediatamente após a reativação os ratos condicionados com morfina receberam infusão bilateral de 2-AG (36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ /hemisfério) ou anisomicina (ANI, 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ /hemisfério), utilizado como controle positivo. Todos os grupos foram reavaliados 24 e 48 horas após a reativação. Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + EPM). * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. Morf/SHAM, utilizado como controle no experimento (ANOVA uma via com repetição/teste de Tukey; $N=6-7$ /grupo).

5.3 Efeitos do CBD sobre a reconsolidação de memórias contextuais ligadas à droga em ratos.

5.3.1. Experimento 7: Avaliar os efeitos da administração sistêmica do CBD, pós-reativação, sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.

Inicialmente, os animais foram treinados para devolverem a PCL induzida pela morfina. Sete dias após a expressão (teste de preferência inicial) da PCL, os ratos condicionados com morfina tiveram

a memória reativada pela reexposição ao contexto previamente pareado à droga, conforme descrito no segundo bloco de experimentos (Figura 11). Imediatamente após essa sessão, os animais condicionados com morfina receberam uma injeção de CBD (5 ou 10 mg/kg) ou solução veículo. Todos os grupos experimentais foram reavaliados no teste da PCL 24h, 7 e 14 dias após a reativação/tratamento.

Conforme mostrado na Figura 16, a ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL, revelou efeitos significantes dos fatores tratamento ($F_{3, 34}=61,57$; $p<0,000001$), repetição ($F_{2, 68}=25,95$; $p<0,000001$) e uma interação entre ambos os fatores ($F_{6, 68}=12,57$; $p<0,001$). As análises *post hoc* revelaram que depois do condicionamento, todos os grupos condicionados com morfina apresentaram um aumento significativo no compartimento pareado à droga após o condicionamento quando comparados ao grupo controle ($p<0,0003$), porém não houve diferença significativa entre os três grupos durante o teste de preferência inicial. Apenas o grupo experimental que recebeu a maior dose de CBD (10 mg/kg) mostrou uma redução significativa do tempo gasto no compartimento pareado à droga, em relação aos grupos Morf/VE e Morf/CBD 5 mg/kg, nos testes de 24h ($p\leq 0,05$ e $p<0,03$; respectivamente), 7 dias ($p<0,002$ e $p<0,004$; respectivamente) e 14 dias ($p<0,002$ e $p<0,004$; respectivamente) após o tratamento. Ambos os grupos Morf/VE e Morf/CBD 5 mg/kg continuaram apresentando diferenças significativas no parâmetro de PCL em relação ao grupo controle, quando avaliados nos três testes pós-reativação ($p<0,001$). Além disso, não foram observadas diferenças significantes entre esses dois grupos experimentais em nenhum dos testes. Estes resultados sugerem que a administração sistêmica do CBD, na dose de 10 mg/kg, imediatamente após a reativação, prejudica a reconsolidação da PCL induzida pelo opioide em ratos.

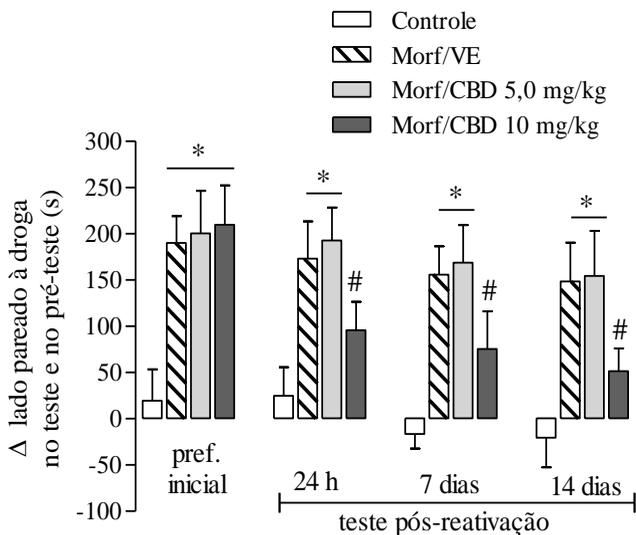


Figura 16. Efeitos do CBD sobre a reconsolidação memória condicionada à morfina. Sete dias após a expressão da preferência inicial, os ratos foram reexpostos ao contexto previamente condicionado à droga (10 min). Imediatamente após a reativação eles receberam uma injeção de CBD (10 mg/kg) ou veículo e foram reavaliados 7 e 14 dias depois. Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + E.P.M.). * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo Morf/VE (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; $N = 10-11$ /grupo).

5.3.2. Experimento 8: Avaliar o efeito da administração aguda do CBD pós-reativação, sobre a reinstalação da preferência condicionada à morfina, parâmetros do tipo ansiedade e níveis plasmáticos de corticosterona em ratos.

O objetivo desse experimento foi confirmar se a administração aguda do CBD interfere na reconsolidação da memória condicionada à morfina na tarefa de PCL. Paralelamente a isso, também o propósito de avaliar o efeito desse tratamento sobre os comportamentos relacionados à ansiedade, após a extensa manipulação experimental.

Foram utilizados ratos adultos jovens (60 dias de idade), devido à longa duração do protocolo experimental. Neste experimento, o grupo controle não foi incluído nas análises estatísticas. Além disso, o parâmetro de PCL em cada teste foi determinado pela diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado com morfina e o tempo gasto no compartimento pareado com salina na mesma sessão de teste (HEINRICHS *et al.*, 2010).

Os procedimentos de aquisição e reativação da memória condicionada à droga foram conduzidos de maneira idêntica aos experimentos anteriores (Figura 11). Imediatamente após a reativação, os ratos receberam uma injeção de CBD na dose selecionada (10 mg/kg s.c.) ou solução veículo imediatamente após a reexposição ao contexto. Neste experimento, todos os ratos foram testados na PCL 21 dias depois da sessão de reativação/tratamento (34º dia de experimento).

No dia seguinte, os dois grupos experimentais que treinados com morfina e que receberam tratamento (CBD ou veículo) pós-reativação foram submetidos a duas sessões diárias de extinção, durante 8 dias consecutivos (35º - 42º dia) e 24h após a última sessão de extinção (42º dia), cada rato foi testado, a fim de verificar se havia ocorrido a extinção PCL condicionada à morfina (teste pós-extinção).

No 43º dia de experimento, todos os grupos experimentais receberam uma injeção morfina de 2,5 mg/kg, 15 min antes de serem reavaliados na PCL (teste de reinstalação 1). Sete dias após a reinstalação induzida pela dose desafio (50º dia de experimento), cada grupo experimental foi dividido em dois grupos (n=9-10/grupo). Metade dos animais de cada grupo foi submetida ao estresse agudo e a outra metade permaneceu na gaiola de moradia (controle). Logo após a exposição ao estresse de contenção, os animais foram testados durante 15 min (teste de reinstalação 2). Cerca de 30 minutos após o último teste de reinstalação da PCL induzida pelo estresse, os animais dos Morf/VE/controle, Morf/VE/estresse, Morf/CBD/controle e Morf/CBD/estresse (n=6/grupo), foram avaliados no teste do LCE durante 5 min. Em seguida, foi coletada uma amostra de sangue para posterior dosagem dos níveis de corticosterona.

Conforme mostrado na Figura 17, uma análise global dos dados pela ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL, revelou efeito significativo dos fatores tratamentos ($F_{3,34}=16,44$; $p<0,0001$), repetição ($F_{1,136}=60,48$; $p<0,0001$) e uma interação entre ambos os fatores ($F_{12,136}=25,60$; $p<0,01$). O teste *post hoc* não apontou diferença significativa no parâmetro de PCL entre os grupos quatro grupos no teste de preferência inicial. Além disso, a ANOVA de uma via revelou que no teste de preferência inicial, todos os quatro grupos experimentais apresentaram diferença significativa entre o tempo gasto no compartimento pareado com salina *vs.* compartimento pareado com droga: Morf/VE/controle: $F_{1,9}=72,13$ $p<0,0001$; Morf/VE/estresse: $F_{1,10}=62,14$; $p<0,0001$; Morf/CBD/controle: $F_{1,11}=12,7$; $p<0,05$ e Morf/CBD/estresse $F_{1,10}=19,0$; $p<0,001$. Todos eles permaneceram mais tempo no compartimento condicionado com a droga

neste teste. Esses resultados indicam que após o condicionamento, todos os quatro grupos experimentais (que são idênticos entre si), desenvolveram PCL induzida pela morfina.

Durante o primeiro teste, a análise *post hoc* revelou diferenças significativas ($p < 0,008$) entre os grupos que receberam o CBD (Morf/CBD/controle e Morf/CBD/estresse) e os grupos que receberam veículo (Morf/VE/controle e Morf/VE/estresse). Além disso, ambos os grupos que receberam o CBD (Morf/CBD/controle e Morf/CBD/estresse) apresentaram uma redução significativa do parâmetro de PCL durante o primeiro teste pós-reativação, em relação ao teste de preferência inicial ($p < 0,0001$ para ambos). Conjuntamente, estes resultados sugerem que a administração aguda do CBD, imediatamente após a reativação, é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória condicionada à morfina, 21 dias após o tratamento (Figura 17).

No teste de extinção, as análises *post hoc* dos parâmetros de PCL não apontou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais que receberam o CBD, mas indicou uma redução significativa dos parâmetros de PCL nos outros dois grupos experimentais Morf/VE/controle ($p < 0,0001$) e Morf/VE/estresse ($p < 0,0007$), em relação ao teste pós-reativação. Adicionalmente, a ANOVA de uma via comparando o tempo gasto no compartimento pareado com morfina *vs.* tempo gasto no compartimento pareado com salina para cada grupo experimental, no teste de extinção, indicou que não há diferença significativa em nenhum dos grupos experimentais, no teste de extinção. O que revela que os quatro grupos experimentais adquiriram o critério de extinção da PCL (Figura 17).

O teste de Tukey revelou que após todos os grupos terem recebido a dose desafio de morfina, somente os grupos Morf/VE/controle ($p < 0,00001$) e Morf/VE/estresse ($p < 0,00001$) apresentaram aumento significativo nos seus respectivos parâmetros de PCL, em relação ao teste de extinção. No teste de reinstalação induzida pela administração da droga (reinstalação 1), ambos os grupos que receberam o CBD apresentaram diferenças significativas em relação aos outros dois grupos que receberam veículo: Morf/CBD/controle *vs.* Morf/VE/controle e Morf/CBD/controle *vs.* Morf/VE/estresse ($p < 0,02$ para ambos). Conjuntamente, esses dados sugerem que a administração aguda do CBD, imediatamente após a reativação, é capaz de prevenir a subsequente reinstalação da PCL extinta, promovida pela administração uma dose desafio de morfina antes do teste (Figura 17).

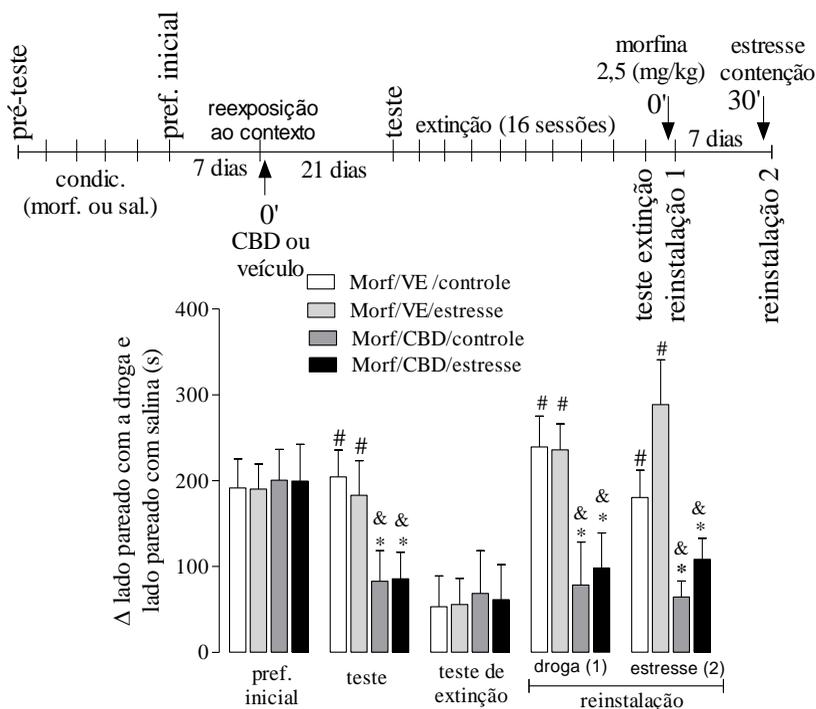


Figura 17. Efeito da administração do CBD pós-reativação, sobre a reinstalação da PCL. Diagrama representativo do protocolo experimental: Imediatamente após a reativação eles receberam uma injeção de CBD (10 mg/kg) ou veículo e foram reavaliados 21 dias depois. Em seguida foram submetidos extinção da PCL e posteriormente à reinstalação da PCL promovida pela injeção de uma dose desafio de morfina e pelo estresse de contenção (reinstalação 1 e 2, respectivamente). Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado com droga e o compartimento pareado com salina no mesmo teste (média + EPM). * p<0,05 vs. respectivo grupo controle no mesmo teste; # e & indicam p<0,05 vs. do mesmo grupo em relação aos testes de extinção e preferência inicial, respectivamente (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; N=9-11/grupo).

Após a reinstalação induzida pela exposição ao estresse de contenção (reinstalação 2), a análise *post hoc* revelou que o grupo Morf/VE/estresse apresentou um aumento significativo da PCL, em relação aos grupos Morf/VE/control (p<0,05), grupos Morf/CBD/control (p<0,0001) e Morf/VE/control (p<0,001). O teste de Tukey também indicou que o parâmetro de PCL do grupo Morf/VE/control foi estatisticamente diferente dos grupos que

receberam o CBD (Morf/CBD/controle e Morf/CBD/estresse; $p < 0,01$ e $p < 0,001$; respectivamente). Além disso, não houve diferenças estatísticas entre os Morf/CBD/controle e Morf/CBD/estresse. Em conjunto, os dados indicam que a administração aguda do CBD, logo após a reativação, preveniu a subsequente reinstalação da PCL induzida pela exposição ao estresse agudo antes do teste. Em conjunto, esses resultados sugerem que uma única injeção do CBD, imediatamente após a reativação, é capaz de prevenir a posterior reinstalação da PCL induzidas por nova administração da droga ou por exposição ao estresse de contenção.

A Tabela 5 mostra os parâmetros comportamentais avaliados no teste do LCE, cerca de 30 min após o teste de reinstalação da PCL induzida pelo estresse. A ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os grupos experimentais ($F_{3, 20}=5,04$; $p < 0,05$) apenas em relação ao percentual de tempo de permanência nos braços abertos ($F_{3, 20}=5,04$; $p < 0,05$). A análise através do teste de Tukey revelou que o grupo Morf/VE/controle apresentou um percentual de tempo de permanência nos braços abertos significativamente maior ($p < 0,05$) do que os grupos Morf/VE/estresse e Morf/CBD/estresse. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais Morf/CBD/controle e Morf/CBD/estresse. A ANOVA de uma via não detectou diferenças significantes entre os diferentes tratamentos, no percentual de entradas nos braços abertos e nem no número de entradas nos braços fechados. Conjuntamente, os resultados indicam que a injeção aguda do CBD, imediatamente após a reativação, não alterou o comportamento do tipo ansiedade após a extensa manipulação experimental dos animais condicionados com morfina.

Tabela 5. Comportamentos do tipo ansiedade avaliados no LCE, após o teste de reinstalação da PCL induzida pelo estresse.

Grupos experimentais	% Entradas nos BA (Média \pm EPM)	% Tempo nos BA (Média \pm EPM)	Nº de entradas nos BF (Média \pm EPM)
Morf/VE/controle	40,6 \pm 5,7	29,2 \pm 7,6	7,6 \pm 3,1
Morf/VE/estresse	31,7 \pm 8,4	13,2 \pm 5,5 *	5,4 \pm 3,7
Morf/CBD/controle	38,2 \pm 6,1	22,7 \pm 4,4	9,3 \pm 2,5
Morf/CBD/estresse	33,7 \pm 4,3	15,6 \pm 3,8 *	8,7 \pm 2,6

Abreviaturas: BA (braços abertos) e BF (braços fechados). * $p < 0,05$ vs. grupo Morf/VE/controle (ANOVA de uma via/teste de Tukey/ $n=6$).

A Figura 18, ilustra os níveis plasmáticos de corticosterona diferentes grupos experimentais Morf/VE/controle, Morf/VE/estresse, Morf/CBD/controle e Morf/CBD/estresse, após o teste de reinstalação da PCL induzida pelo estresse. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento ($F_{3, 20}=6,15$; $p<0,001$). As comparações pelo teste de Tukey, indicam que os níveis plasmáticos de corticosterona não foram alterados pela administração aguda de CBD após a reativação.

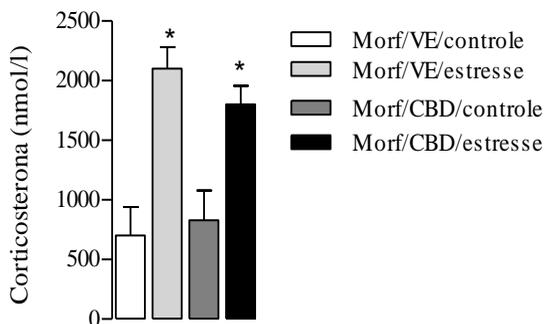


Figura 18. Níveis plasmáticos de corticosterona dos ratos submetidos à reinstalação induzida pelo estresse e em seguida, ao teste do LCE. A coleta da amostra de sangue ocorreu aproximadamente 30 min após o teste de reinstalação induzido pelo estresse. As barras e linhas verticais representam a média + EPM. * $p<0,05$ vs. respectivo controle (ANOVA de uma via/teste de Tukey; $N=6$ /grupo).

5.3.3. Experimento 9: Avaliar o efeito da administração aguda do CBD, após a reativação da memória hedônica, sobre a subsequente abstinência motivacional condicionada no mesmo contexto.

Evidências demonstram que a interrupção da memória contextual hedônica, estabelecida no modelo da PCL induzida pela morfina, interfere na subsequente abstinência motivacional precipitada pela naltrexona no mesmo contexto (TAUBENFELD *et al.*, 2010). Tal observação indica que existe uma ligação entre a memória contextual induzida pela experiência com droga e a abstinência motivacional (TAUBENFELD *et al.*, 2010).

Neste sentido, o objetivo desse experimento foi avaliar se o prejuízo da reconsolidação da memória original, promovido pela administração aguda do CBD, após a reativação, interfere na subsequente abstinência motivacional precipitada pela naltrexona no mesmo contexto. Os procedimentos de aquisição da PCL induzida pela morfina foram conduzidos de maneira idêntica aos experimentos anteriores (Figura 11). Contudo, a memória foi reativada através de uma única sessão de condicionamento com morfina, 7 dias após o teste de

preferência inicial. Na sessão de reativação, cada rato recebeu uma injeção de morfina (10 mg/kg, s.c.) e foi confinado no compartimento pareado à droga por 30 min. Imediatamente após a reativação (condicionamento extra), os animais foram injetados com CBD (10 mg/kg s.c.) ou veículo. No dia seguinte, ambos os grupos (Morf/VE e Morf/CBD) receberam uma sessão extra de condicionamento com morfina e, 4 h após o condicionamento, metade dos animais de cada grupo recebeu uma injeção de naltrexona (0,3 mg/kg, s.c.) e a outra metade recebeu veículo. Em seguida, todos os ratos dos quatro grupos experimentais (Morf/VE/VE, Morf/VE/NTX, Morf/CBD/VE, Morf/CBD/NTX) foram novamente confinados no compartimento pareado à droga por 30 min. Os animais foram testados 48 h e 7 dias depois. Este procedimento foi descrito por Taubenfeld e colaboradores (2010). Os testes foram conduzidos de maneira idêntica aos outros testes. O parâmetro de PCL foi determinado pela diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado com droga e o tempo gasto no compartimento pareado com salina na mesma sessão de teste (HEINRICHS *et al.*, 2010).

A Figura 19 ilustra os resultados desse experimento. A ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL através dos fatores tratamento e teste revelou efeito significativo dos diferentes tratamentos ($F_{3, 27}=28,42$; $p<0,00001$), teste ($F_{2,54}=92,54$; $p<0,00001$) e uma interação entre esses fatores ($F_{6,54}=37,27$; $p<0,00001$). O teste *post hoc* revelou que os parâmetros de PCL do grupo Morf/VE/VE mantiveram-se estáveis ao longo dos testes. Além disso, houve diferenças significantes dos três grupos Morf/VE/NTX ($p<0,0001$), Morf/CBD/VE ($p<0,01$) e Morf/CBD/NTX ($p<0,0001$) em relação ao grupo Morf/VE/VE nos testes 1 e 2. O teste de Tukey também apontou diferenças significativas entre os dois grupos Morf/CBD/VE vs. Morf/CBD/NTX em ambos os testes ($p<0,004$ e $p<0,01$; respectivamente). Esses, resultados indicam que a administração do CBD pós-reativação da memória, atenua de maneira persistente, a subsequente aversão condicionada ao lugar precipitada pela naltrexona em ratos.

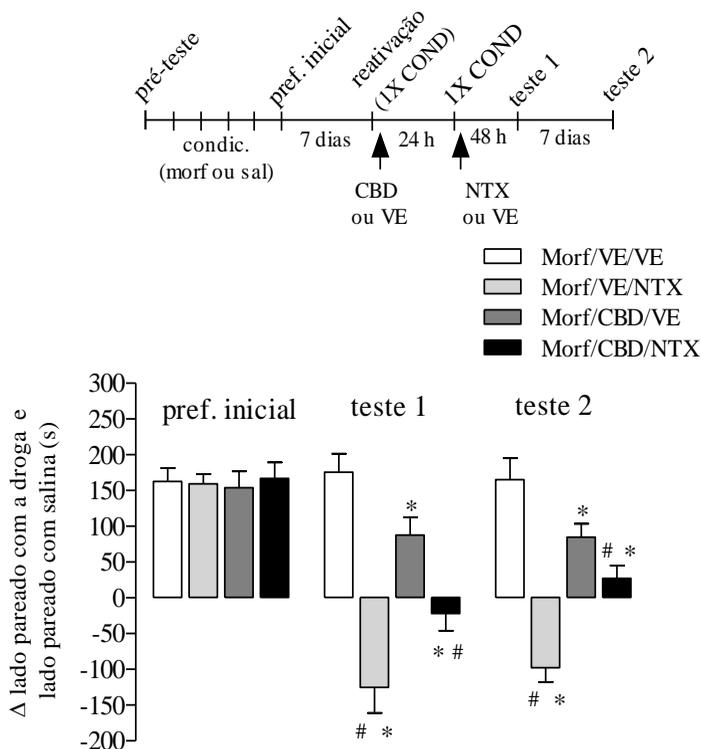


Figura 19. Efeito da administração do CBD após a reativação da memória sobre a subsequente aversão condicionada ao contexto. Sete dias após a expressão da preferência inicial, a memória foi reativada através de uma sessão extra de condicionamento com a morfina. Imediatamente após a reativação eles receberam uma injeção de CBD (0,0-10 mg/kg). No dia seguinte, 4 h após outra sessão de condicionamento com morfina, os ratos foram injetados com naltrexona (NTX 0,3 mg/kg, s.c.) ou veículo e foram reavaliados na PCL após 24h e 8 dias após a indução da “abstinência motivacional” pela naltrexona. Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado com droga e o compartimento pareado com salina no mesmo teste (média + EPM). * $p < 0,05$ vs. Morf/VE/VE; # $p < 0,05$ vs. Morf/NTX/VE (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; $N = 8-9$ /grupo).

5.3.4. Experimento 10: Avaliar o efeito da administração aguda de CBD, após a reativação, sobre a reconsolidação da memória condicionada à cocaína.

O objetivo desse experimento foi avaliar se o efeito do CBD sobre a reconsolidação da memória de PCL se estende a outras drogas

de abuso, como a cocaína. O procedimento de aquisição da PCL induzida pela cocaína foi conduzido, durante 10 dias consecutivos (conforme detalhado em em 4.3.1.). Sete dias depois, a memória foi reativada pela reexposição (10 min) ao compartimento pareado com a cocaína. Imediatamente após a reativação, os ratos condicionados com cocaína foram injetados com uma dose selecionada de CBD (10 mg/kg s.c.) ou com veículo. O grupo controle recebeu somente injeções do veículo durante todo o experimento. Os três grupos experimentais (controle, COCA/VE e COCA/CBD) foram reavaliados na PCL aos 7 e 14 dias depois da reativação/tratamento.

Conforme mostrado na Figura 20, a ANOVA de uma via com medidas repetidas, revelou efeitos significantes do tratamento ($F_{2, 27}=28,59$; $p<0,001$) e dos testes ($F_{2, 54}=9,35$; $p<0,005$) e uma interação entre ambos os fatores ($F_{8, 54}=3,16$; $p<0,01$). As análises *post hoc* revelaram que depois do condicionamento, todos os grupos condicionados com cocaína apresentaram um aumento significativo do gasto no compartimento pareado à droga, comparados ao grupo controle ($p<0,0001$), mas não houve diferença significativa entre os três grupos durante o teste de preferência inicial. O grupo que recebeu o CBD (10 mg/kg), mostrou uma redução significativa da PCL, em relação ao grupo COCA/VE nos testes 7 e 14 dias após o tratamento ($p<0,01$ e $p<0,03$; respectivamente). O *post hoc* também detectou diferenças entre os grupos controle e COCA/CBD e o grupo controle nos dois testes ($p<0,05$ em ambos). Conjuntamente, estes resultados sugerem que a administração aguda do CBD, imediatamente após a reativação da memória, atenua a reconsolidação da memória condicionada à cocaína no modelo da PCL.

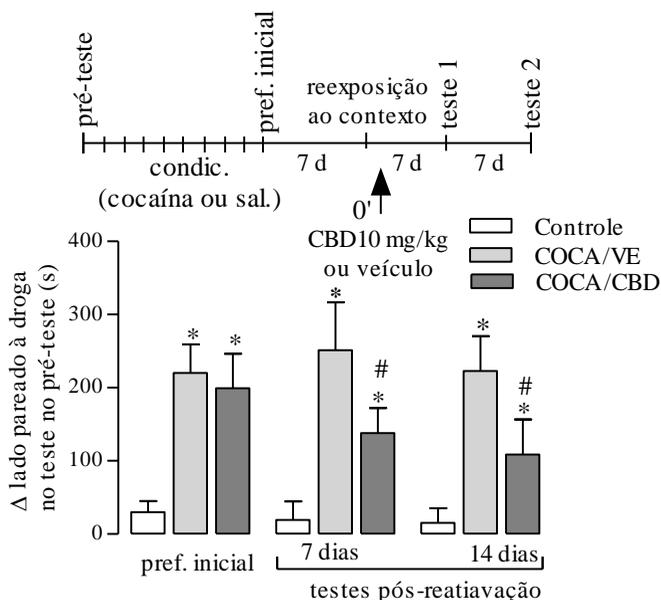


Figura 20. Efeito do CBD sobre a reconsolidação PCL induzida pela cocaína. Sete dias após a expressão da preferência inicial, os ratos foram reexpostos ao contexto previamente associado à droga (10 min). Imediatamente após a reativação eles receberam uma injeção de CBD (0,0 ou 10 mg/kg) e foram reavaliados 7 e 14 dias depois. Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + E.P.M.). * $p < 0,05$ vs. grupo controle e # $p < 0,05$ vs. grupo COCA/VE mesma sessão de teste (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; $N = 8/\text{grupo}$).

5.3.5. Experimento 11: Investigar os efeitos da administração aguda do CBD, após a reativação, em ratos mantidos sob tratamento crônico com a morfina durante a etapa de aquisição da memória condicionada ao opioide.

Os resultados anteriores mostraram que o tratamento agudo com o CBD pós-reativação prejudicou a reconsolidação da memória condicionada à droga e que esse efeito persistiu ao longo dos testes e não foi reinstalado por diferentes estímulos. O objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos da administração aguda do CBD pós-reativação, quando a reativação ocorre durante a descontinuação de um tratamento crônico com a morfina.

O procedimento de indução e manutenção do tratamento crônico com morfina utilizado foi modificado do estudo de Robinson e

Franklin (2010). O mesmo consistiu na administração diária de morfina por 10 dias, período que coincidiu com os 10 dias de aquisição da PCL (pré-teste, 1º dia; condicionamento, 2º-9º dia; teste de preferência inicial, 10º dia). A fim de reduzir a possibilidade de overdose, os animais recebiam o tratamento crônico com a morfina (s.c) por volta das 8:00 h, e eram condicionados diariamente com morfina (5 mg/kg, s.c.) ou solução salina no período da tarde, aproximadamente 6 h depois. No primeiro dia, os animais receberam 10 mg/kg de morfina e a dose foi aumentada diariamente em 5 mg/kg, nos cinco dias subsequentes, até atingir a dose de 30 mg/kg no quinto dia de tratamento (do pré-teste até a 4º sessão de condicionamento). Nos quatro dias seguintes, os ratos foram mantidos sob o tratamento de 30 mg/kg, no período da manhã, e condicionados com morfina (5 mg/kg) à tarde. No décimo dia de tratamento, os animais foram injetados com morfina (30 mg/kg) no período da manhã, e à tarde foram submetidos ao teste de preferência inicial. O grupo controle foi tratado cronicamente com morfina e recebeu somente injeções de solução veículo durante todo o condicionamento. Sete dias após a interrupção abrupta do tratamento, os dois grupos experimentais (morfina e grupo controle) foram reexpostos ao contexto previamente pareado à morfina e, em seguida, injetados com uma dose selecionada de CBD (10 mg/kg i.p.) ou do veículo. Os três grupos experimentais (Controle, Morf/VE e Morf/CBD) foram testados na PCL aos 7 e 14 dias após a reativação.

A Figura 21 ilustra os resultados desse experimento. A ANOVA de uma via com medidas repetidas comparando o parâmetro de PCL, revelou efeito significativo apenas do fator tratamento ($F_{2, 21}=58,43$; $p<0,0001$). Não foi observado efeito do teste nem uma interação entre ambos os fatores. O teste *post hoc* apontou diferença estatística do grupo controle em relação aos outros dois grupos ($p<0,001$, para ambos). Os resultados indicam que a administração aguda do CBD, logo após a reativação, não alterou a expressão PCL induzida pela morfina, nos animais condicionados enquanto eram mantidos sob regime de tratamento crônico com o opioide.

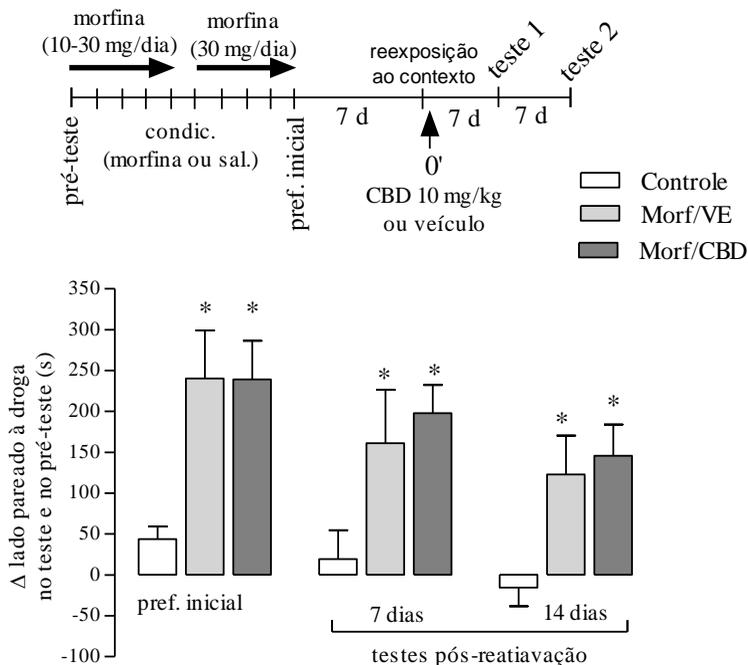


Figura 21. Efeito da administração aguda de CBD pós-reativação memória sobre a expressão da PCL induzida pela morfina, em animais que receberam tratamento crônico com o opioide concomitante à etapa de aquisição da PCL. Todos os grupos foram testados 7 e 14 dias depois. Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + E.P.M.). * $p < 0,05$ vs. grupo controle mesma sessão (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; N=8/grupo).

5.3.6. Experimento 12: Investigar os efeitos da administração aguda de CBD, após a reativação, sobre a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos.

Estudos sugerem que uma possível função biológica do processo de reconsolidação seria a integração de novas informações às memórias já consolidadas (RODRIGUEZ-ORTIZ *et al.*, 2005; ROSSATO *et al.*, 2007). Neste sentido, o objetivo desse experimento foi avaliar se o CBD afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos quando a reativação ocorre junto com a adição de novas informações à memória consolidada.

Para isso, ratos foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino, Dia 1); 24 horas depois foram expostos por 5 minutos (Sessão de reativação, Dia 2) a um dos objetos que havia sido apresentado durante a sessão de treino (A) e um objeto novo (C). Imediatamente após a reativação, os animais foram injetados com CBD (10 mg/kg s.c.) ou com veículo. Sete dias depois, ambos os grupos foram divididos em quatro grupos, e testados durante 5 min, na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objetos A + D; Grupo 2= Objetos B + D; Grupo 3= Objetos C + D e Grupo 4= Objetos A + B, sendo “D” um objeto novo (Figura 7).

A figura 22 mostra os resultados do efeito do CBD sobre a reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos. O teste *t* de Student não revelou uma diferença significativa no percentual de exploração dos objetos A e B durante a sessão de treino, o que indica que os animais exploraram, igualmente, ambos os objetos. Na sessão de reativação, o teste *t* de Student revelou uma diferença significativa no percentual de investigação dos objetos ($t=6,32$; $p<0,0001$), de maneira que os animais exploraram significativamente mais o objeto novo C, em relação ao objeto familiar B. No dia do teste, a análise através do teste *t* de Student apontou que todos os grupos expostos ao objeto novo “D”, apresentaram um percentual de exploração desse objeto significativamente maior em relação aos seus respectivos objetos familiares (Grupo 1: $t=2,91$ e $p<0,001$; Grupo 2: $t=5,01$ e $p<0,005$; Grupo 3: $t=3,58$; $p<0,003$; Grupo 4: $t=17,24$; $p=1,00$). Adicionalmente, a análise individual de cada grupo através da ANOVA de uma via não apontou efeito significativo do tratamento (VE vs. CBD) durante no dia do teste. Esses resultados sugerem que a administração do CBD, imediatamente após a reativação, não interfere na reconsolidação da memória no teste de reconhecimento de objetos.

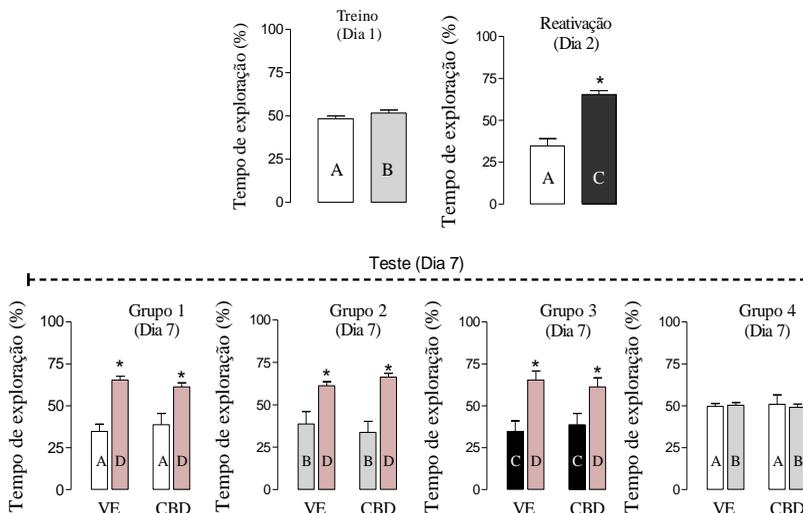


Figura 22. Efeito da administração aguda do CBD pós-reativação sobre a memória de reconhecimento de objetos. Ratos foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos (Treino; Dia 1). No dia seguinte, (Reativação; Dia 2) os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (C). Imediatamente após a sessão de reativação os ratos foram divididos em quatro grupos e receberam uma injeção sistêmica de CBD (10 mg/kg) ou veículo. Após 5 dias os animais foram novamente testados durante 5 min (Teste; Dia 7) na presença de diferentes combinações dos objetos familiares e de um novo objeto “D”. As barras e linhas verticais, representam o percentual de exploração do referido objeto (média + E.P.M). * $p < 0,01$ em teste t de Student para amostra única, valor de referência = 50 (n=10/ grupo).

5.4 Investigação do envolvimento do sistema eCB nos efeitos do CBD sobre a reconsolidação da memória contextual ligada à morfina.

5.4.1. *Experimento 13: Avaliar se o pré-tratamento de uma dose subefetiva de CBD, reverte o aumento da PCL promovido pela administração do URB597, após a reativação da memória.*

Os experimentos anteriores mostraram que o CBD e o URB597 causaram um perfil de efeitos contrários sobre a reconsolidação da memória condicionada à droga. Em vista disso, o objetivo desse experimento foi avaliar se o pré-tratamento com o CBD, em uma dose baixa insuficiente para causar esse efeito, poderia prevenir a facilitação

subsequente da reconsolidação da memória promovida pelo inibidor do catabolismo da anandamida o URB597.

Para isso, os animais foram submetidos aos procedimentos de aquisição e reativação da memória, na modelo PCL, de maneira idêntica aos experimentos anteriores (ver Figura 11). Imediatamente após a reativação, os ratos condicionados com morfina foram divididos em dois grupos experimentais e receberam uma injeção (i.p.) de CBD (5 mg/kg) ou do veículo. Depois de 30 min, metade dos animais de cada grupo recebeu uma injeção (1,0 mg/kg, via s.c.) do URB597, inibidor da enzima amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH). As doses do CBD sem efeito aparente, assim como a dose efetiva do URB597 foram selecionadas com base nos experimentos anteriores. Todos os grupos (Controle, Morf/VE/VE, Morf/VE/URB, Morf/CBD/VE e Morf/CBD/URB) foram reavaliados apenas 7 dias após a reativação e manipulação farmacológica, devido ao efeito transitório do URB597, demonstrado nos experimentos anteriores.

A Figura 23 ilustra os resultados desse experimento. A ANOVA de uma via com medidas repetidas, revelou efeito significativo do fator tratamento ($F_{4, 38}=61,32$; $p<0,0001$) e uma interação entre os fatores tratamento e repetição ($F_{4, 38}=12,53$; $p<0,0001$). As análises *post hoc* revelaram que depois do condicionamento (teste de preferência inicial), todos os grupos condicionados com morfina apresentaram um aumento significativo do tempo gasto no compartimento pareado à droga, quando comparados ao grupo controle ($p<0,0001$). Não houve diferença significativa entre esses quatro grupos neste teste. O teste de Tukey também indicou que o grupo Morf/VE/URB apresentou um aumento significativo da PCL no teste pós-reativação, quando comparado aos outros dois grupos condicionados com morfina (Morf/VE/VE e Morf/CBD/URB; $p <0,001$ para ambos). Estes dados replicam as evidências anteriores, em relação ao efeito do URB neste protocolo. Ademais, as comparações *post hoc* não apontaram diferença significativa entre os grupos Morf/VE/URB e Morf/CBD/URB. Esses resultados sugerem que a administração prévia do CBD não modificou o aumento da PCL promovido pela administração do inibidor da degradação da anandamida URB597.

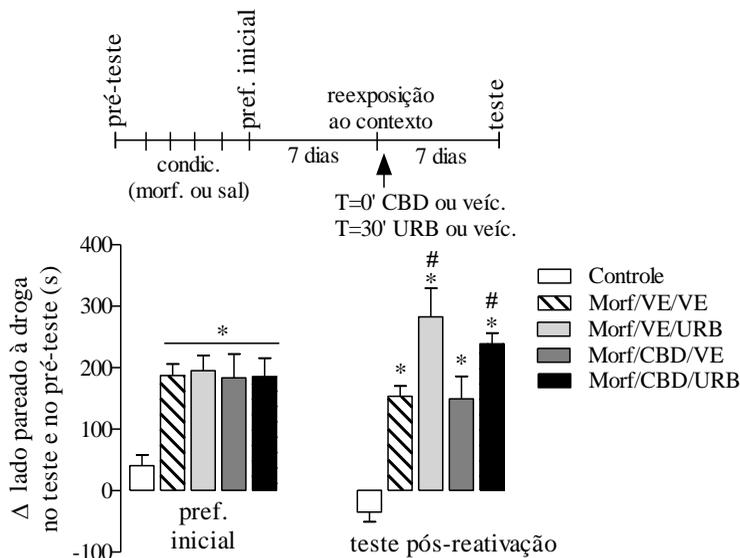


Figura 23. O pré-tratamento com uma dose subefetiva de CBD não altera os efeitos da administração do URB597, inibidor da FAAH. Sete dias após a expressão da preferência inicial, a memória foi reativada e em seguida os ratos foram injetados com CBD (5 mg/kg) ou veículo e 30 min depois receberam o tratamento com o URB597 (1 mg/kg) ou com veículo. Os animais foram testados 7 dias depois. Os dados estão expressos como a diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + E.P.M.). * $p < 0,05$ vs. grupo controle mesma sessão e # $p < 0,05$ vs. em relação ao mesmo grupo na sessão anterior (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; $N=7-10$ /grupo).

5.4.2. *Experimento 14: Investigar se a coadministração de diferentes combinações do CBD com um agente canabinoide seletivo, em doses inefetivas isoladamente, logo após a reativação, poderia interferir na reconsolidação da memória condicionada à morfina em ratos.*

Para isso, os animais foram submetidos aos procedimentos de aquisição e reativação da memória condicionada na PCL, de maneira idêntica aos experimentos anteriores (Figura 11). Imediatamente após a reativação, os animais condicionados com morfina foram divididos em quatro grupos experimentais, e cada grupo recebeu ao mesmo tempo duas injeções: uma contendo CBD (i.p.) e outra injeção com um agente canabinoide seletivo ou solução veículo (s.c.). As doses sem efeito aparente do CBD (5 mg/kg), antagonista seletivo CB1 (rimonabant, 1 mg/kg), antagonista seletivo ou CB2 (AM630, 1,5 mg/kg) e agonista

CB2 (AM1241, 3 mg/kg) foram selecionadas a partir dos experimentos anteriores. Todos os grupos experimentais: Morf/CBD+VE, Morf/CBD+Rimonabanto, Morf/CBD+AM630, Morf/CBD+AM1241 e controle, foram reavaliados na PCL 7 e 14 dias após a reativação.

A Figura 24 ilustra os resultados desse experimento. A ANOVA de uma via com medidas repetidas, revelou efeitos significantes do fator tratamento ($F_{4, 42}=28,35$; $p<0,00001$), repetição ($F_{2, 84}=12,92$; $p<0,00001$) e uma interação entre eles ($F_{8, 84}=2,75$; $p<0,01$). As análises *post hoc* revelaram que, depois do condicionamento (teste de preferência inicial), todos os grupos condicionados com morfina apresentaram um aumento significativo do tempo gasto no compartimento pareado à droga, comparados ao grupo controle ($p<0,0001$) e não foram apontadas diferenças significativas entre esses quatro grupos neste teste. O teste de Tukey indicou que no primeiro teste pós-reativação, o grupo Morf/CBD+AM1241 foi significativamente diferente dos grupos controle ($p<0,0001$) Morf/VE+VE ($p<0,05$). Embora esse grupo tenha apresentado uma sutil redução da PCL na segunda semana, não foi detectada diferença significativa entre os grupos Morf/CBD+AM1241 e Morf/VE+VE. As análises *post hoc* não mostraram diferenças entre os grupos que foram coadministrados com CBD e com os antagonistas canabinoides seletivos CB1 e CB2. Esses achados sugerem que a coadministração de doses sem efeito aparente do CBD e do agonista canabinoide CB2, logo após a reativação da memória, parece reduzir a reconsolidação da memória.

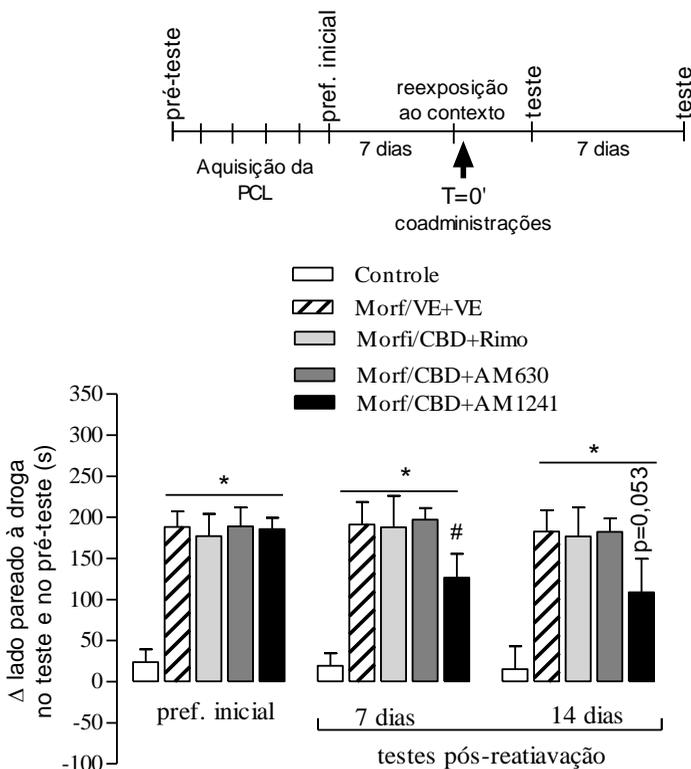


Figura 24. Efeitos da coadministração de doses subefetivas de CBD e dos antagonistas seletivos CB1, CB2 ou com o agonista canabinoide seletivo CB2, sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina. Logo após a reativação, os ratos grupos receberam duas injeções: uma com o CBD (5 mg/kg) e a outra com um dos antagonistas CB1 (rimo, 1 mg/kg) ou CB2 (AM630, 1,5 mg/kg); ou com o agonista CB2 (AM1241, 3 mg/kg). Exceto grupos controle e Morf/VE/VE que receberam duas injeções de veículo. Os animais foram testados 7 e 14 dias depois. Os dados estão expressos como diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado à droga no dia do teste e durante o pré-teste (média + E.P.M.). * p<0,05 vs. grupo controle mesma sessão e # p<0,05 vs. Morf/VE/VE na mesma sessão (ANOVA de uma via com repetição/teste de Tukey; N=9-10/grupo).

5.5. Sumário dos resultados.

A tabela 6 resume os principais resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 6. Sumário dos principais resultados obtidos com os diferentes agentes farmacológicos, administrados imediatamente após a reativação da memória.

Fármaco	Mecanismo de ação	Resultados obtidos
Rimonabanto	Antagonista seletivo CB1	Reduz a PCL pós-reativação, prejudica a reconsolidação;
AM630	Antagonista seletivo CB2	Nenhuma das doses alterou a PCL pós-reativação;
WIN 55, 212-2	Agonista CB1/CB2	Nenhuma das doses alterou a PCL pós-reativação;
AM1241	Agonista seletivo CB2	Tendência a reduzir a PCL pós-reativação, atenua a reconsolidação;
URB597	Inibe a FAAH	Aumento transitório da PCL, facilita a reconsolidação;
2-AG	Agonista total CB1/CB2	Aumenta a PCL pós-reativação, facilita a reconsolidação;
CBD	Agonista CB2?	<ul style="list-style-type: none">-Prejudica a reconsolidação da memória condicionada à cocaína e à morfina;-Previne a reinstalação da PCL induzida por diferentes estímulos (droga e estresse) mas não altera emocionalidade nem os níveis de corticosteroide no plasma;- Prejudica a memória original e a subsequente aversão condicionada ao mesmo contexto;- Não afeta a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos;-Não altera a reconsolidação quando a reativação ocorre 7 dias após a descontinuação do tratamento crônico com o opioide;- Atenua a PCL/prejudica a reconsolidação quando coadministrado em doses subefetivas juntamente com o agonista seletivo CB2 e não com os antagonistas seletivos CB1 ou CB2.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido para investigar duas questões principais, utilizando a tarefa de PCL em ratos. A primeira, avaliar o papel do sistema eCB na reconsolidação da memória contextual condicionada à droga. A segunda, investigar os efeitos do CBD, fitocanabinoide não psicotomimético, sobre a reconsolidação da memória hedônica em ratos. No presente trabalho, apresentamos evidências de que o sistema eCB é necessário para o processo de reconsolidação da memória condicionada à morfina: (i) o bloqueio sistêmico dos receptores CB1 prejudicou a reconsolidação da memória de condicionada à morfina; (ii) o incremento da sinalização eCB, pelo inibidor da degradação da anandamida, promoveu um aumento transitório da PCL induzida pela droga, sendo que esse efeito parece ser dependente da ativação dos receptores CB1; e (iii) a ativação dos receptores canabinoides CB1/CB2 no hipocampo, pelo eCB 2-AG, também promoveu um aumento da PCL induzida pela droga. Contudo, nem a ativação direta dos receptores canabinoides CB1/CB2, pelo potente agonista sintético WIN 55, 212-2 nem o bloqueio seletivo dos receptores CB2 pelo antagonista AM630 produziram efeitos significativos sobre a PCL induzida pela morfina. Por outro lado, a maior dose do agonista seletivo CB2 apresentou uma tendência a reduzir a PCL. Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que o sistema eCB, particularmente através da ativação dos receptores CB1, parece ser necessário para a reconsolidação da memória hedônica induzida por opioides em ratos.

O aspecto central do nosso protocolo experimental foi induzir a PCL por meio da administração de um forte reforço positivo (morfina ou cocaína), através da associação das pistas contextuais com a percepção de recompensa relacionada com a droga. Na sequência, os animais foram colocados no contexto previamente pareado com o reforço positivo com o intuito de desestabilizar a memória hedônica (reativação da memória), tornando-a susceptível à intervenções dentro da janela temporal da reconsolidação. Cabe ressaltar que, no presente trabalho, o efeito amnésico do antagonista glutamatérgico NMDA (MK801) foi observado apenas quando administrado imediatamente após a reativação da memória, mas não após 6 horas. Isso corrobora o aspecto temporal da reconsolidação já bem estabelecido na literatura (NADER *et al.*, 2000; DUDAI, 2004). Assim, todas as manipulações farmacológicas foram realizadas logo após a reativação do traço da

memória original e o impacto do tratamento sobre a memória foi avaliado pela mudança do comportamento de PCL durante o teste.

A administração pós-reativação do antagonista dos receptores CB1, rimonabanto, prejudicou a reconsolidação da memória condicionada à morfina de maneira dose-dependente. Esse efeito parece ser duradouro, uma vez que persistiu por duas semanas. Este resultado sugere que receptores canabinoides CB1 estão envolvidos no processo de reconsolidação da memória hedônica, corroborando estudos anteriores que utilizaram o mesmo modelo animal, porém com reforços positivos diferentes (YU *et al.*, 2009; FANG *et al.*, 2011). Tais estudos demonstraram que bloqueio seletivo dos receptores CB1 pelo rimonabanto, na mesma dose utilizada em nosso estudo (3,0 mg/kg), prejudicaram a reconsolidação da memória condicionada de ratos à metanfetamina (YU *et al.*, 2009) e à nicotina (FANG *et al.*, 2011). Além disso, esses resultados também se alinham aos de Bucherelli e colaboradores (2006). Nesse trabalho foi que mostraram que a micro infusão deste antagonista dos receptores CB1 na amígdala, prejudicou a memória de condicionamento contextual aversivo em ratos.

Curiosamente, nenhuma das doses testadas do agonista canabinoide não seletivo, WIN 55,212-2, alterou significativamente a PCL induzida pela morfina nos testes de 7 e 14 dias após a reativação. Além de não ser seletivo aos receptores canabinoides, o agonista canabinoide WIN 55,212-2, apresenta afinidade por outros receptores (DI MARZO, 2009). Por exemplo, estudos têm demonstrado que o WIN 55,212-2 é capaz de influenciar a atividade dos receptores vaniloides do tipo TRPV1 por vias que não envolvem a ativação de receptores CB1 ou CB2 (WANG *et al.*, 2012). Além de ativar receptores do tipo PPAR γ (GIULIANO *et al.*, 2009), de maneira que a falta de seletividade desse fármaco poderia justificar os resultados obtidos.

Por outro lado, os ratos tratados após a reativação da memória com URB597 (1,0 mg/kg) apresentaram um aumento no índice de PCL no teste realizado 7 (mas não 14) dias depois. Esse efeito transitório do URB597 parece ser mediado pela ativação dos receptores CB1, pois o pré-tratamento com o antagonista dos receptores CB1 em uma dose sem efeito *per se* (1,0 mg/kg), foi capaz de prevenir o aumento da PCL promovido pelo URB597. Adicionalmente, a ativação dos receptores canabinoides no hipocampo pelo 2-AG, agonista total de ambos os receptores canabinoides, também promoveu um aumento da PCL induzida pela morfina. Conjuntamente, essas observações reforçam a hipótese de que os eCBs parecem exercer facilitar a reconsolidação da memória condicionada ao opioide.

Por outro lado, tanto os resultados referentes ao antagonismo dos receptores CB1 pelo rimonabanto, quanto aqueles concernentes à ativação dos receptores CB1 pelo agonista WIN 55,212-2, são de certo modo contrários aos de estudos prévios envolvendo memórias aversivas (SUZUKI *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2006; KOBILO *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008). Por exemplo, Kobiló e colaboradores (2007) mostraram que a ativação dos receptores canabinoides CB1/CB2 por meio da infusão do WIN 55,212-2 na região cortical da ínsula, inibiu a aquisição e a reconsolidação da memória aversiva condicionada pelo paladar. Ademais, o bloqueio dos receptores canabinoides CB1, na mesma estrutura, pelo rimonabanto não influenciou a reconsolidação da memória aversiva. De modo semelhante, a infusão de diferentes agonistas canabinoides (WIN 55,212-2 ou HU210), na amígdala, após a reativação da memória, bloqueou a reconsolidação da memória aversiva de sobressalto em ratos (LIN *et al.*, 2006). Por outro lado, de Oliveira Alvares e colaboradores demonstraram que a infusão intra-hipocampal de outro antagonista canabinoide CB1, AM251, potencializou a reestabilização da memória, enquanto que a infusão de anandamida no hipocampo dorsal de ratos prejudicou a reconsolidação da memória de medo ao contexto (DE OLIVEIRA ALVAREZ *et al.*, 2008). Apesar das diferenças encontradas, os trabalhos mencionados demonstraram a importância dos receptores CB1 hipocámpais para a labilização da memória (SUZUKI *et al.*, 2004; 2008), bem como que os receptores CB1 presentes no hipocampo, amígdala, e córtex são importantes para a reestabilização da memória (LIN *et al.*, 2006; KOBILO *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2008). A discrepância entre os nossos resultados e os estudos anteriormente citados pode ser devido à natureza emocional das tarefas comportamentais empregadas (hedônicos *vs.* medo). Além disso, podem refletir os efeitos eCBs em diferentes estruturas encefálicas envolvidas em cada uma dessas memórias.

Conforme abordado na Introdução, a investigação do papel do sistema eCB sobre os efeitos reforçadores induzidos por drogas de abuso tem sido focada na atividade dos receptores canabinoides do tipo CB1. Neste trabalho, foi avaliado, de maneira pioneira, os efeitos da administração sistêmica de fármacos seletivos para os receptores canabinoides CB2 sobre a reconsolidação de memórias condicionadas à morfina. A ativação dos receptores canabinoides CB2, pelo AM1241 (na dose de 10 mg/kg) apresentou uma tendência em reduzir a preferência condicionada à morfina. No entanto, nenhuma das doses testadas do antagonista seletivo dos receptores CB2 AM630 foi capaz de alterar o

parâmetro PCL nos testes subsequentes ao tratamento. À primeira vista, esses resultados, parecem estar de acordo com a literatura envolvendo o sistema eCB em modelos animais de dependência. Por exemplo, Gamaledin e colaboradores (2012) mostraram que a administração sistêmica de AM1241 ou de AM630 não afeta o comportamento preditivo de busca pela nicotina em ratos treinados a autoadministrarem a droga (GAMALEDIN *et al.*, 2012). Por outro lado, outros trabalhos apresentaram evidências interessantes acerca do envolvimento dos receptores CB2 em modelos animais de dependência (ISHIGURO *et al.*, 2007; XI *et al.*, 2011; ARACIL-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

Ishiguro e colaboradores (2007) mostraram que camundongos expostos ao estresse crônico moderado exibem um aumento da preferência ao consumo voluntário de álcool, quando tratados com JWH015, um agonista canabinoide seletivo CB2, além de expressarem menos o gene que codifica os receptores CB2 no mesencéfalo ventral, se comparados com o grupo controle (ISHIGURO *et al.*, 2007). O tratamento com o antagonista seletivo dos receptores CB2 (AM630), previne o desenvolvimento da preferência ao álcool. O mesmo estudo também detectou um polimorfismo funcional no gene que codifica a expressão dos receptores CB2 em japoneses alcoolistas. Os autores sugerem que esse polimorfismo poderia aumentar a vulnerabilidade ao alcoolismo (ISHIGURO *et al.*, 2007). Ademais, outro trabalho minucioso mostrou que a ativação central dos receptores canabinoides CB2 diminui os efeitos reforçadores induzidos pela cocaína em ratos (XI *et al.*, 2011). A administração em diferentes locais (sistêmica, intranasal ou intra-NAc) de dois diferentes agonistas seletivos dos receptores CB2 (JWH015 ou GW405833) inibiram a autoadministração endovenosa operante e a hiperlocomoção induzidas pela cocaína. Ainda, foi demonstrado que a infusão no NAc do antagonista seletivo CB2 (AM630), aumenta a liberação de dopamina e a locomoção em resposta a administração de cocaína em camundongos de tipo selvagem ou nocautes para os receptores CB1, mas não nos animais nocautes para os receptores CB2. Contudo, a administração sistêmica do AM630 não altera os níveis extracelulares de dopamina, nem o comportamento em resposta ao psicoestimulante (XI *et al.*, 2011). Outro trabalho, também mostrou que os receptores CB2 desempenham um papel importante no desenvolvimento de sensibilização locomotora e nos efeitos reforçadores da cocaína em roedores (ARACIL-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Camundongos que super expressam os receptores CB2 apresentam diversas alterações frente à cocaína, as quais incluem: menor resposta locomotora e menor sensibilização locomotora após a

exposição aguda e repetida, aversão condicionada ao lugar e menor consumo (autoadministração operante). Essas observações comportamentais foram acompanhadas de evidências de alterações neuroquímicas relacionadas ao sistema de recompensa, como o aumento na expressão da enzima tirosina hidroxilase (60%) e dos transportadores de dopamina (88%) na ATV, bem como a redução na expressão do gene do receptor μ -opioide (25%) no NAc (ARACIL-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Embora incipientes, esses estudos abrem novos precedentes para a pesquisa na área, pois sugerem que os receptores CB2 podem estar implicados na modulação dos efeitos reforçadores induzidos por drogas de abuso, de maneira distinta da atividade dos receptores canabinoides CB1 (MORALES & BONCI, 2012).

Em vista destas evidências, é possível hipotetizar que os efeitos sutis do AM1241, assim como a ausência de efeitos do AM630, sobre a reconsolidação da memória condicionada à morfina, possam estar relacionados com propriedades farmacocinéticas desses fármacos, incluindo a capacidade de penetrarem a barreira hematoencefálica. Além disso, à luz de todas essas evidências, a ausência de efeitos do agonista canabinoide WIN 55,212-2 poderia ser consequência da ativação conjunta de ambos os receptores canabinoides CB1 e CB2, já que a seletividade do agonista por CB2 é limitada. Portanto, o papel dos receptores CB2 na modulação das propriedades reforçadoras induzida por drogas é ainda matéria de debate científico.

No presente estudo, tanto a potencialização do efeito da anandamida, promovida pela administração sistêmica do inibidor da FAAH, quanto a ativação intra-hipocampal dos receptores canabinoides pelo agonista total, 2-AG, promoveram um aumento da PCL quando administrados imediatamente após a reativação. Em conjunto, esses achados indicam que ambos os eCB, anandamida e 2-AG, estão envolvidos na regulação da reconsolidação da memória contextual condicionada ao opioide. Estudos indicam que o 2-AG é o principal eCB envolvido na regulação da plasticidade sináptica (KANO *et al.*, 2009; KIM & ALGER, 2010). Assim, estudos realizados com inibidores seletivos da degradação do 2-AG (inibidores das enzimas DAGL ou MAGL) ou através da ablação dos genes que codificam essas enzimas, ressaltaram o papel fundamental do 2-AG na modulação da plasticidade sináptica de curto e longo prazo (LUCHICCHI & PISTIS, 2012). Novos estudos utilizando essas ferramentas farmacológicas poderiam ajudar a esclarecer melhor o papel dos eCB e dos receptores CB2 na reconsolidação da memória condicionada à droga.

Estudos de imageamento cerebral em indivíduos dependentes de drogas revelaram que o desejo compulsivo pela droga envolve a ativação dos circuitos de memória, incluindo, hipocampo, amígdala e estriado dorsal, os quais recebem inervação dopaminérgica (MALDONADO *et al.*, 2006) e também processam memórias declarativas, contextuais e espaciais (EICHENBAUM, 1999). Tem-se proposto que o hipocampo é crucial no processamento das memórias contextuais ligadas às drogas (FERBINTEANU & MCDONALD, 2001; MILECKIC *et al.*, 2006) e está implicado na “fissura” evocada pelo contexto e no comportamento de busca por drogas (CHILDRESS *et al.*, 1999; KOOB, 2009).

Apesar do enfoque unicamente comportamental deste trabalho, nossos resultados parecem estar em consonância com as evidências acerca do efeito neuromodulador do 2-AG na plasticidade sináptica da via mesocorticolímbica, uma vez que tanto a infusão do 2-AG no hipocampo quanto a potencialização da sinalização da anandamida pelo URB597, parecem facilitar a expressão da memória condicionada à morfina. Os eCB agem como mensageiros retrógrados regulando a plasticidade sináptica em diversas estruturas encefálicas. Por exemplo, o 2-AG medeia a LTD em sinapses inibitórias na região CA1 do hipocampo (CHEVALEYRE & CASTILLO, 2003), assim como a plasticidade sináptica dependente de receptores glutamatérgicos metabotrópicos em fatias de hipocampo de roedores (OHNO-SHOSAKU *et al.*, 2002). Utilizando camundongos nocautes para a enzima MAGL, os quais apresentam níveis de 2-AG consideravelmente elevados, Pan e colaboradores (2011) relataram o aumento da DSI na região CA1 do hipocampo, que foi acompanhada pelo incremento na LTP e um aumento no desempenho cognitivo, quando comparado com seu respectivo controle genético. Outras evidências, obtidas em cultura de neurônios hipocampais, apontam que tanto o 2-AG, quanto os inibidores da enzima MAGL, modulam a plasticidade sináptica de curta duração através da DSE (STRAIKER & MACKIE, 2005; STRAIKER *et al.*, 2009) e da DSI (STRAIKER & MACKIE, 2009; STRAIKER *et al.*, 2011).

Assim, é possível especular que, durante a desestabilização da memória, os eCB sejam liberados em estruturas específicas, como amígdala basolateral, hipocampo e NAc, e influenciem a neurotransmissão noradrenérgica, através da modulação da atividade GABAérgica (Figura 25). Assim, a liberação dos eCB culminaria com a ativação dos receptores β -adrenérgicos, os quais estão fortemente envolvidos na reestabilização de memórias hedônicas (TRONSON & TAYLOR, 2007). O que parece consistente, com o fato que os receptores

CB1, presentes nos interneurônios GABAérgicos podem suprimir a liberação do GABA, e consequentemente aumentar a liberação de noradrenalina (por desinibição), facilitando a consolidação da memória (ATSAK *et al.*, 2012).

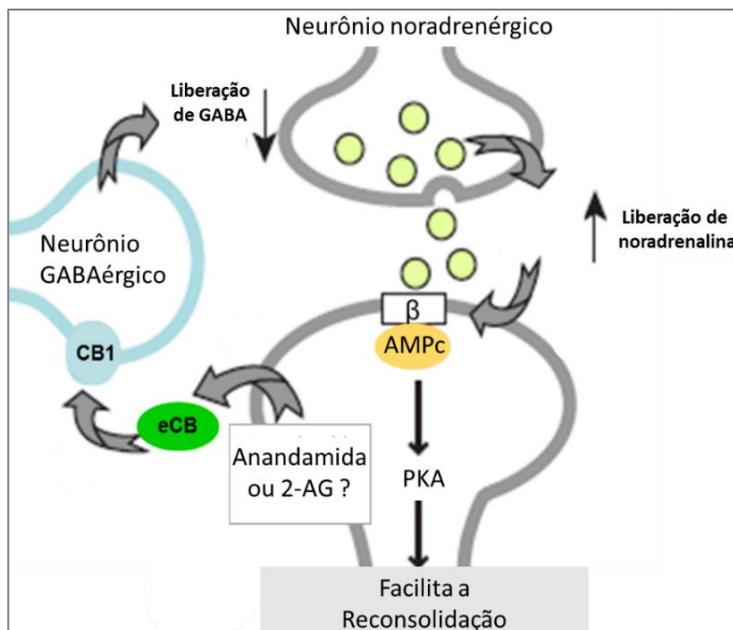


Figura 25. Mecanismo sugerido para o envolvimento dos eCBs na reconsolidação da memória condicionada à droga. Os eCBs liberados sob demanda em algumas estruturas encefálicas inibiriam os neurônios GABAérgicos, o que levaria ao aumento da liberação de noradrenalina e consequentemente facilitaria a reconsolidação da memória contextual ligada à droga (Figura modificada de ATSAK *et al.*, 2012).

A literatura em geral sugere que os eCB anandamida e 2-AG, desempenham funções neuromodulatórias diferentes nos comportamentos relacionados à droga em diferentes modelos animais. Por exemplo, foi demonstrado que o URB597 não exerce *per se* efeitos reforçadores em roedores e macacos (GOBBI *et al.*, 2005; JUSTINOVA *et al.*, 2008). Além disso, a potencialização da sinalização da anandamida, pelo URB597, não produz a generalização dos efeitos discriminatórios do Δ^9 THC em ratos (GOBBI *et al.*, 2005), não causa tolerância cruzada com agonistas canabinoides, e também não promove a dessensibilização dos receptores CB1 após a administração repetida

(SCHLOSBERG *et al.*, 2010). Em contrapartida, a potencialização da sinalização do 2-AG, devido à inibição da MAGL, promove efeitos comportamentais que não são observados após a inibição crônica da enzima FAAH, tais como: redução da locomoção (LONG *et al.*, 2009; 2012), tolerância aos agonistas CB1, dessensibilização e regulação negativa dos receptores CB1 (SCHLOSBERG *et al.*, 2010). Nesse contexto, tem-se proposto que o 2-AG exerce maior impacto sobre a modulação da recompensa induzida por drogas de abuso (SCHLOSBERG *et al.*, 2010). Cabe mencionar que a inibição da FAAH aumenta os níveis endógenos de anandamida, produzindo efeitos do tipo ansiolítico (KATHURIA *et al.*, 2003) e do tipo antidepressivo (GOBBI *et al.*, 2005) em roedores, sem produzir efeitos canabimiméticos clássicos de agonistas canabinoides, como o Δ^9 THC, conhecidos como tétrede comportamental: hipolocomoção, catalepsia, hipotermia e analgesia (GIUFFRIDA *et al.*, 2001; KATHURIA *et al.*, 2003).

Poucos estudos têm investigado as interações entre o 2-AG e a anandamida sobre os efeitos reforçadores induzido por drogas de abuso. Alguns trabalhos sugerem que a anandamida e o 2-AG podem exibir perfis diferentes durante a exposição à droga. Por exemplo, foi mostrado que durante a autoadministração de heroína ocorre um aumento nos níveis de anandamida e uma redução de 2-AG na porção *shell* do NAc, medida através de microdiálise. Além de existir uma correlação significativa entre conteúdo de ambos os eCBs com a quantidade de heroína consumida pelos ratos (CAILLÈ *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou que os níveis de anandamida e 2-AG em algumas estruturas da via mesocorticolímbica são alterados após a administração aguda de morfina, a retirada prolongada e a expressão de sensibilização induzida pelo opioide eCB (VIGANÒ *et al.*, 2004). De um modo geral, houve um aumento dos níveis de anandamida no hipocampo, NAc e *caudado-putâmen* e uma diminuição das concentrações de 2-AG, nestas regiões, sugerindo que a exposição crônica aos opioides pode promover adaptações homeostáticas no sistema eCB (VIGANÒ *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado que os níveis de 2-AG são fortemente reduzidos em muitas áreas límbicas durante a tolerância à morfina (VIGANÒ *et al.*, 2003). Seguindo a mesma linha de raciocínio, foi demonstrado que os inibidores da MAGL podem suprimir os sintomas de abstinência, no modelo animal da abstinência precipitada pelo antagonista opioide (naloxona) (RAMESH *et al.*, 2011). Isso implica que o 2-AG pode desempenhar um papel proeminente na abstinência aos opioides. Embora nossos resultados provenham de uma abordagem distinta, eles evidenciam o efeito facilitatório promovido pela potencialização do

sistema eCB, seja pela anandamida ou pelo 2-AG, sobre a reconsolidação de memórias ligadas à droga.

A literatura científica a respeito dos efeitos da inibição farmacológica da enzima FAAH em modelos animais de dependência é bastante controversa. Por exemplo, foi mostrado que a administração do URB597 aumenta o consumo e a preferência pelo etanol em ratos (BLEDNOV *et al.*, 2007), enquanto em outro estudo o URB597 impediu a aquisição da PCL induzida pela nicotina, bem como a autoadministração e a reinstalação do comportamento operante de busca pela droga (SCHERMA *et al.*, 2008). Em outro estudo, o URB597 não alterou os efeitos reforçadores da heroína em ratos treinados a autoadministrar a droga em um esquema progressivo de resposta (SOLINAS *et al.*, 2005). Naquele estudo, os autores propuseram que a modulação dos efeitos reforçadores da heroína produzidos pelo URB597 não se devia à liberação de eCBs em resposta ao opioide, mas em resultado de interações nas vias de transdução de sinal decorrentes da ativação dos receptores opioide e canabinoide (SOLINAS *et al.*, 2005).

A inibição da FAAH também aumenta os níveis endógenos de duas outras N-aciletanolamidas: oleiletanolamida e palmitoiletanolamida, as quais são estruturalmente muito semelhantes à anandamida. Além disso, ambos os compostos são ligantes endógenos dos receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomos PPAR- α (O'SULLIVAN, 2007). Tendo em vista que a oleiletanolamina facilita a consolidação da memória aversiva através da ativação noradrenérgica da amígdala basolateral, e que esse efeito é mediado pela ativação dos receptores PPAR- α (MAZZOLA *et al.*, 2009), parece natural considerar os efeitos da inibição FAAH e a ativação do PPAR em conjunto. Certamente são necessários estudos adicionais para investigar a participação dos receptores PPAR e de outros receptores como o TRPV1 na reconsolidação da memória condicionada à droga.

Ainda em relação aos efeitos do URB597, deve-se considerar que o amplo espectro de efeitos causados pela inibição da degradação de uma família de compostos seja diferente dos efeitos seletivos causados pela manipulação de um único membro desta família (KATHURIA *et al.*, 2003; FEGLEY *et al.*, 2005). Por exemplo, camundongos nocautes para o gene da FAAH, assim como animais do tipo selvagem que receberam tratamento com o URB597, apresentaram níveis maiores de anandamida (e outras N-aciletanolamidas) quando comparados aos respectivos controles, mas o seu perfil comportamental de base não se assemelha ao dos animais que receberam a anandamida exógena ou Δ^9 THC (CRAVATT *et al.*, 2001; FEGLEY *et al.*, 2005). Isso pode justificar, em

parte, ao menos a diferença dos resultados obtidos com o URB597 e o WIN 55,212-2.

Assim, esses resultados contrastantes obtidos com o WIN 55,212-2 e com o URB597 parecem relacionados aos mecanismos de ação distintos de cada um. De tal modo, seria esperado que a administração sistêmica do agonista WIN 55,212-2 afetasse todas as populações de receptores canabinoides (CB1 e CB2) e, por conseguinte, produzisse efeitos que pudessem ser bastante diferentes dos efeitos específicos produzidos pelo bloqueio genético ou farmacológico da enzima FAAH (KATHURIA *et al.*, 2003; FEGLEY *et al.*, 2005). Isso porque, os efeitos da inibição da enzima causariam um incremento dos efeitos da anandamida somente nos locais e nos momentos em que ela seria liberada no encéfalo (KATHURIA *et al.*, 2003; FEGLEY *et al.*, 2005).

Em relação à segunda hipótese deste estudo, esta resultou em evidências inéditas de que o CBD interrompe de maneira persistente a reconsolidação da memória hedônica condicionada à diferentes classes de drogas de abuso (depressora e psicoestimulante) no modelo da PCL em ratos, mas não interfere na reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos em ratos.

Em nosso entendimento existe apenas um estudo prévio mostrando o efeito do CBD sobre a reconsolidação de memórias relacionadas à drogas de abuso. Trata-se de um recente estudo clínico piloto randomizado duplo-cego e controlado por placebo, conduzido com 24 tabagistas. Metade dos participantes recebeu um inalador contendo CBD e a outra com placebo, e ambos foram instruídos a usar o inalador quando sentissem o desejo de fumar. O tratamento com o CBD, durante uma semana, reduziu em cerca de 40% o consumo de cigarros e esse efeito se manteve após o término do tratamento. Apesar deste trabalho não ter investigado como o CBD produziu esse efeito, é possível que o efeito do CBD possa estar relacionado com um prejuízo na reconsolidação (MORGAN *et al.*, 2013). Além disso, um estudo anterior do mesmo grupo mostrou que o CBD diminui os efeitos hedônicos ou “apetitivos” do Δ^9 THC em humanos que fumavam maconha (MORGAN *et al.*, 2010). Apesar das diferentes abordagens, esses estudos fornecem indícios acerca do potencial do CBD no tratamento da dependência, particularmente por reduzir o desejo compulsivo pela droga que frequentemente pode levar a recaídas.

Evidências indicam que exposições curtas ao estímulo condicionado tendem a induzir a reconsolidação da memória, enquanto as sessões de reativação mais prolongadas ou repetidas induzem a extinção da memória estabelecida (SUZUKI *et al.*, 2004; TRONSON &

TAYLOR, 2007). Para minimizar a possibilidade da ocorrência da extinção do aprendizado, neste estudo, as sessões de reativação foram breves (10 min) e espaçadas, em geral com intervalo de 7 dias entre elas. É pouco provável que a extinção tenha ocorrido, por dois motivos: (i) os eCBs não parecem estar envolvidos na extinção do aprendizado associado a estímulos recompensadores (drogas e reforços naturais) (LUTZ, 2007) e (ii) a ativação do sistema eCB facilita o processo de extinção em vez de prejudicar processos cognitivos (ZANETTINI *et al.*, 2011).

Apesar do efeito amnésico do CBD sobre a reconsolidação, o fenômeno de recuperação espontânea não exclui completamente a possibilidade de ter ocorrido uma facilitação da extinção. Afinal, o CBD também pode promover a facilitação da extinção de memórias pavlovianas (PARKER *et al.*, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2008; DO MONTE *et al.*, 2013). No âmbito comportamental, a facilitação da extinção, assim como o prejuízo da reconsolidação, refletem uma redução das respostas condicionadas. Entretanto, a extinção não afeta a memória original, tornando-a passível de recuperação espontânea e de reinstalação. No presente estudo, o efeito do CBD persistiu por até 21 dias e, convém salientar, preveniu a reinstalação do comportamento extinto de busca pela droga, após a subsequente exposição dos ratos à dose desafio da droga e ao estresse agudo. Esses achados reafirmam que os efeitos do CBD são decorrentes da interferência no processo de reconsolidação e não na facilitação da extinção da memória ligada à droga.

Um estudo conduzido por Parker e colaboradores (2004) mostrou que o CBD e o Δ^9 THC, facilitam a extinção da PCL induzida pelos psicoestimulantes cocaína e anfetamina. Contudo, os efeitos de ambos (CBD e Δ^9 THC) não são mediados pelos receptores CB1, pois não foram revertidos pelo antagonista dos receptores CB1 rimonabanto. Apesar daquele trabalho ter abordado a extinção, e não a reconsolidação da memória, o mesmo fornece indícios de que o CBD interfere no aprendizado condicionado à droga, o que vai de encontro aos nossos resultados.

Os efeitos do CBD aqui apresentados parecem alinhar-se a um estudo que avaliou o efeito do CBD durante as diferentes fases de comportamento de autoadministração endovenosa operante de heroína, incluindo a manutenção, extinção e recaída em ratos (REN *et al.*, 2009). Os autores salientaram que o CBD atenuou, de modo específico e persistente, o comportamento preditivo de busca pela heroína reinstalado pela exposição a pistas condicionadas. Entretanto, o CBD

não interferiu em outros comportamentos, incluindo o consumo de heroína, a extinção do aprendizado operante, e a reinstalação do comportamento preditivo de busca pela droga quando foi administrada uma dose nova desafio de heroína. A redução do comportamento preditivo de busca pela droga foi acompanhada por uma menor expressão de RNA mensageiro para os receptores CB1 no NAc. Esses dados são consistentes com a observação de que o bloqueio dos receptores CB1 inibe o comportamento de busca pela droga induzido por pistas (DE VRIES *et al.*, 2003).

Tem-se proposto que uma das finalidades da reconsolidação seria a de integrar novas informações ou novas experiências às memórias previamente consolidadas (NADER *et al.*, 2000; SARA, 2000; ROSSATO *et al.*, 2007). Quando a memória de reconhecimento de objetos é reativada na presença de uma nova informação, este traço de memória torna-se susceptível ao efeito amnésico de inibidores de síntese proteica (AKIRAV & MAROUN, 2006; ROSSATO *et al.*, 2007). O CBD não interferiu na reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos. O tratamento com o CBD não alterou a memória do objeto novo e nem a memória do objeto familiar que foi apresentado durante as sessões de treino e reativação. Além disso, a memória para o objeto familiar, apresentado somente durante a sessão de treino permaneceu intacta. De maneira interessante, pode-se inferir que o efeito amnésico do CBD não se aplica a memórias com caráter emocional/motivacional baixo. Neste sentido, o resultado negativo do CBD pode representar uma certa vantagem em relação à outros agentes amnésicos que prejudicam a reconsolidação da memória de maneira inespecífica.

Alguns trabalhos anteriores mostraram o efeito do CBD sobre a facilitação da extinção (BITENCOURT *et al.*, 2008; DO MONTE *et al.*, 2013) ou o prejuízo da reconsolidação (STERN *et al.*, 2012) de memórias aversivas. Em comum, estes trabalhos mostram que o CBD atenua as respostas de medo condicionado, frente ao contexto previamente associado ao estímulo aversivo (choque nas patas). Além disso, nesses trabalhos o efeito do CBD parece ser mediado pela ativação dos receptores canabinoides CB1, uma vez que o efeito foi prevenido pelo bloqueio dos receptores CB1 (BITENCOURT *et al.*, 2008; STERN *et al.*, 2012). Também tem sido proposto que o efeito do CBD envolve a inibição da enzima FAAH, que degrada a anandamida (BISOGNO *et al.*, 2001; IZZO *et al.*, 2009), o que se contrapõe aos resultados do presente estudo. Ainda assim, é possível que os efeitos do CBD sobre a reconsolidação de memórias hedônicas envolvam a ativação dos receptores CB2, e não CB1.

Apesar das semelhanças no que se refere aos efeitos finais inibitórios do CBD sobre reconsolidação das memórias pavlovianas aversivas (STERN *et al.*, 2012) e associadas à droga (presente estudo) é pouco provável que os seus efeitos envolvam o mesmo mecanismo. Tal sugestão advém da observação que a ativação direta ou indireta dos receptores CB1 facilita a reconsolidação de memórias hedônicas, ao contrário do que fora proposto para as memórias aversivas (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008; STERN *et al.*, 2012).

Em culturas de neurônios hipocâmpais de ratos, o CBD reduz o potencial de ação espontâneo em da mesma maneira que os agonistas CB1 (WIN55,212 e Δ^9 THC), além de reduzir a transmissão sináptica dessas células, caracterizada pela redução do potencial pós-sináptico excitatório. Em ambos os casos, o efeito do CBD foi revertido pelo antagonista dos receptores CB1 (AM251) e pelo agonista inverso e antagonista do receptor serotoninérgico do tipo 5-HT1A (LY320135 e WAY100135, respectivamente) (LEDGERWOOD *et al.*, 2011). Também foi relatado que o CBD pode atuar como agonista inverso de receptores CB1 (THOMAS *et al.*, 2007), agonista dos receptores CB2 (ARNOLD *et al.*, 2012), agonista dos receptores de potencial transitório TRPV1 e TRPV2 (ARNOLD *et al.*, 2012) ou ainda, inibindo a função dos receptores de acetilcolina $\alpha 7$ -nicotínicos (MAHGOUB *et al.*, 2013). Esse cenário, reflete um pouco o amplo espectro de ação do CBD e não descarta a possibilidade dos efeitos observados neste trabalho envolverem outros mecanismos além da sinalização eCB.

O presente estudo demonstra que a administração concomitante de doses subefetivas do CBD juntamente com o agonista canabinoide seletivo CB2, mas não com antagonista CB1 ou com antagonista CB2, parece atenuar a preferência de lugar condicionada à morfina. Esses resultados fornecem indícios de um possível efeito sinérgico do CBD e do AM1242 na ativação dos receptores CB2. Além disso, os efeitos do CBD sobre a reconsolidação de memórias hedônicas parecem envolver a ativação dos receptores CB2, e não CB1 (Figura 26). Contudo essa questão merece ser investigada com afinco, uma vez que o bloqueio seletivo dos receptores CB2 não promoveu mudanças significativas na PCL e os efeitos do agonista canabinoide seletivo dos receptores CB2 não foram tão pronunciados.

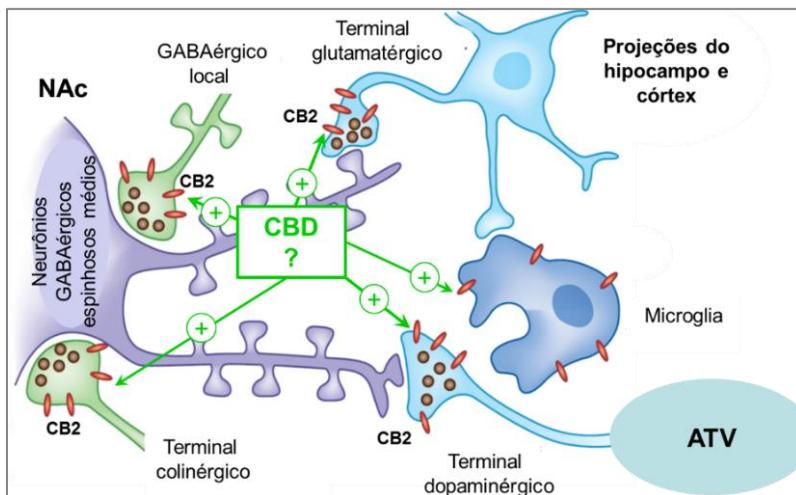


Figura 26. Possível envolvimento dos receptores CB2 nos efeitos do CBD sobre a reconsolidação da memória. A ativação dos receptores CB2 no NAc diminui a liberação de dopamina, reduzindo os efeitos reforçadores de drogas de abuso. Desse modo, a ativação dos receptores CB2 poderia modular a função dos neurônios GABAérgicos MSN no NAc, assim como a liberação de GABA, glutamato, acetilcolina da via mesolímbica exercendo um forte impacto sobre a reconsolidação da memória hedônica. Assim, podemos especular que o CBD agindo sobre receptores CB2, poderia prejudicar a reconsolidação da memória associada à droga (Figura modificada de MORALES & BONCI, 2012).

O CBD apresenta propriedades ansiolíticas bem documentadas na literatura (CRIPPA *et al.*, 2004; ZUARDI *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2012). Diversos trabalhos demonstram que os efeitos ansiolíticos e antidepressivos do CBD são mediados pelos receptores 5-HT_{1A} (RUSSO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2012). Assim, um possível efeito ansiolítico do CBD poderia contribuir, potencialmente, para os efeitos comportamentais observados, uma vez que fármacos com atividade ansiolítica como o midazolam, agonista dos receptores GABAérgicos, também prejudicam a reconsolidação da memória condicionada à morfina (ROBINSON *et al.*, 2011). Entretanto, nossos resultados indicam que embora o tratamento agudo com o CBD prejudique a subsequente reinstalação da PCL extinta em ratos, ele não altera o comportamento do tipo ansiedade nem os níveis plasmáticos de corticosterona após um longo período de manipulação. Este fato sugere, que as propriedades

ansiolíticas do CBD parecem não estar relacionadas com os efeitos observados no presente estudo.

Neste estudo, foi demonstrado que a administração do CBD, após a reativação da memória hedônica, atenua a subsequente “memória motivacional aversiva” precipitada pela naltrexona no mesmo contexto. Esses achados estão de acordo com os de um interessante trabalho, no qual a administração sistêmica e intra-hipocampal de inibidores da síntese proteica (anisomicina e ciclohexamida) ou a infusão de um inibidor da PKA (Rp-cAMP) no hipocampo de ratos, pós-reativação da memória hedônica, prejudicaram a aversão condicionada no mesmo contexto (TAUBENFELD *et al.*, 2010). A partir dos estudos pioneiros de O’Brien e colaboradores (1998), sabe-se que as pistas condicionadas à abstinência frequentemente provocam “sentimentos de euforia” ou “fissura” pela droga, que podem levar os indivíduos dependentes de heroína à recaída (O’BRIEN *et al.*, 1988). Deste modo, a abstinência motivacional condicionada, contribui para a “fissura” pela droga, aumentando o risco de recaída em indivíduos abstinentes (WIKLER & PESCOR, 1967; TIFFANY, 1990; O’BRIEN *et al.*, 1998). Além disso, sugere que existe uma ligação entre a memória hedônica original, estabelecida durante o uso repetido da droga e a memória motivacional condicionada à abstinência, e ambas favorecem a recaída (SIEGEL *et al.*, 2000; SCHULTEIS *et al.*, 2004; TAUBENFELD *et al.*, 2010). Assim, pode-se inferir que ao prejudicar a reestabilização da memória hedônica original, o CBD também tenha afetado o componente motivacional aversivo associado à droga. No entanto, como o CBD também apresenta propriedades “anti-aversivas”, não se deve descartar a possibilidade de que o efeito encontrado seja decorrente de outros efeitos que não envolvem a reconsolidação.

Por fim, nos ratos cronicamente expostos à morfina durante a aquisição da PCL e que tiveram a memória reativada após a retirada da droga, o CBD não interferiu na reconsolidação da memória contextual ligada à droga. Este resultado vai ao encontro de outros trabalhos que mostraram que um histórico de exposição a morfina pode fortalecer a memória condicionada à droga, tornando-a menos susceptível de ser desestabilizada e interrompida por agentes amnésicos como propranolol e midazolam (ROBINSON & FRANKLIN, 2010; ROBINSON *et al.*, 2011). Demonstrou-se também que a sensibilização à morfina acelera o condicionamento (LU *et al.*, 2002). Deste modo, a exposição crônica à morfina pode ser considerada como uma espécie de sensibilização extrema, e seria de se esperar um fortalecimento no condicionamento, onde os quatro ciclos de condicionamento convencionais com a morfina

produziriam uma forte memória condicionada e resistente ao processo de reconsolidação (NADER & EINARSON, 2010; AUBER *et al.*, 2013). Além disso, a exposição a um regime crônico de morfina induz alterações na plasticidade sináptica que poderiam contribuir para a perda do efeito amnésico do CBD (ROBINSON & FRANKLIN, 2010). As terapias baseadas na reconsolidação apresentam limitações, como a intensidade e a idade da memória, as quais podem reduzir o sucesso do tratamento (NADER & EINARSON, 2010; AUBER *et al.*, 2013). Entretanto, isso não descarta o potencial do tratamento com CBD como abordagem terapêutica anti-recaída, uma vez que a gravidade da dependência pode variar consideravelmente entre indivíduos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Conforme mencionado na Introdução, existe uma vasta literatura mostrando que a manipulação farmacológica da sinalização eCB por meio do bloqueio dos receptores CB1 é capaz de suprimir a autoadministração de opioides e comportamentos preditivos de busca pela droga em animais de experimentação. Além disso, um estudo clínico preliminar indicou a eficácia do antagonista CB1 na terapia antitabagista em relação ao grupo que recebeu tratamento placebo (LE FOLL *et al.*, 2008). Esse estudo clínico, denominado STRATUS (STudies with Rimonabant And Tobacco USE), envolveu 6500 pacientes da Europa e EUA desenvolvido para avaliar o papel do antagonista seletivo de CB1 (rimonabanto), na interrupção do tabagismo, na abstinência em longo prazo e na prevenção de ganho de peso (após o paciente parar de fumar). Resultados preliminares do STRATUS nos EUA demonstraram que a taxa de abandono do tabagismo foi significativamente maior no grupo tratado com rimonabanto (20 mg/dia) comparado ao placebo. Também houve uma redução significativa do ganho de peso após a interrupção do tabagismo nos indivíduos tratados com rimonabanto (CAHILL & USSHER, 2011). Além disso, o perfil de segurança do antagonista seletivo dos receptores CB1 foi favorável neste estudo. Contudo, a comercialização do rimonabanto foi proibida em 2007 devido ao aumento da incidência de distúrbios de ansiedade, depressão e também pela maior incidência de tentativas de suicídio nos pacientes que utilizavam este fármaco para o controle da obesidade (FERNANDEZ & ALLISSON, 2004; NATHAN *et al.*, 2011). Certamente são necessários mais estudos para determinar estratégias alternativas para modular a transmissão eCB no sentido de prevenir os efeitos psiquiátricos adversos promovidos pelo bloqueio seletivo dos receptores CB1.

O tratamento atual da dependência de opioides compreende abordagens multidisciplinares como psicoterapia, grupos de ajuda mútua (Narcóticos Anônimos) e farmacoterapia. Embora o tratamento farmacológico da dependência a opioides possua uma efetividade superior sobre as outras formas de tratamento, a incidência de retomada ao uso da droga é bastante elevada no primeiro ano de tratamento (BALTIERI *et al.*, 2004). A farmacoterapia convencional tem como alvo os receptores μ -opioides. A estratégia utilizada na etapa de desintoxicação é a substituição da droga por outros agonistas μ -opioides, como a metadona e a buprenorfina, que possuem tempo de meia vida mais longos que a heroína/morfina. Posteriormente, já na fase de manutenção da abstinência, é frequentemente indicado o uso de antagonistas opioides como a naloxona (POTENZA *et al.*, 2011). Apesar disso, o tratamento farmacológico não inibe de forma eficaz o desejo compulsivo pela droga na maioria dos pacientes e, de fato, são relatadas altas taxas de recaída nesses indivíduos (WALTER *et al.*, 2008). As recaídas são frequentemente evocadas por memórias relacionadas ao uso da droga. Nesse contexto, a interrupção do processo de reconsolidação de memórias associadas à droga abre novas oportunidades terapêuticas para a dependência às drogas.

O presente estudo fornece evidências de que o sistema eCB participa da reconsolidação da PCL induzida pela morfina em ratos, uma vez que a ativação direta e indireta dos receptores canabinoides, particularmente dos receptores CB1, pelos dois principais agonistas endógenos facilita a reconsolidação da memória hedônica. A ativação dos receptores CB2 também interferiu na desestabilização da memória hedônica, de maneira oposta e menos pronunciada. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a liberação dos eCB parece ser crucial para a manutenção da memória após a labilização. Fornecem, ainda, indícios do potencial dos receptores CB1 e CB2 como alvos interessantes de terapias que possam atenuar as respostas condicionadas à droga, o que pode ter uma repercussão importante se aplicadas na clínica como terapia anti-recaída.

Além disso, as evidências deste estudo ressaltam o potencial terapêutico do CBD, dada a sua especificidade em atenuar a reconsolidação de memórias hedônicas condicionadas à diferentes classes de drogas de abuso (psicoestimulante e depressora), enfraquecer as respostas motivacionais aversivas condicionadas à droga, sem afetar a reconsolidação de uma memória neutra. O CBD não exhibe propriedades reforçadoras próprias em animais de experimentação (PARKER *et al.*, 2004; KATSIDONI *et al.*, 2013) e apresenta efeitos adversos fracos em

seres humanos (CONSROE *et al.*, 1991; TOMIDA *et al.*, 2006), o que torna esse composto um agente terapêutico potencial para o tratamento da dependência, utilizando estratégias baseadas na reconsolidação de memórias estabelecidas entre a droga e os estímulos condicionados. Apesar das limitações das terapias baseadas na reconsolidação que podem limitar o sucesso do tratamento, como a força e a idade da memória por exemplo.

Certamente, são necessários estudos adicionais para investigar, detalhadamente os substratos neurobiológicos relacionados ao efeito modulatório dos eCBs sobre a reconsolidação da memória, assim como o mecanismo de ação do CBD, e as possíveis alterações neuromoleculares decorrentes do seu efeito.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que o sistema eCB participa da reconsolidação da PCL induzida pela morfina, particularmente através da ativação dos receptores canabinoides do tipo CB1. Isso sugere que esses receptores podem ser um alvo interessante na terapia farmacológica da dependência às drogas. Além disso, o presente estudo fornece as primeiras evidências do potencial terapêutico do CBD na interrupção persistente de memórias mal adaptativas relacionadas a drogas de abuso de diferentes classes (morfina e cocaína).

Extrapolando nossos resultados para a condição humana com as devidas cautelas, acreditamos que os tratamentos baseados na interrupção da reconsolidação requerem menos sessões terapêuticas e conferem uma maior probabilidade de abstinência em longo prazo. Isso certamente seria uma vantagem sobre os tratamentos profiláticos anti-recaída. A manipulação da sinalização eCB no contexto da reconsolidação poderia ajudar os indivíduos dependentes a lidar com o desejo patológico de busca pela droga e com as recorrentes recaídas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR MA, RODRIGUEZ-ARIAS M, MINÁRRO J. Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. **Brain research reviews** 2009; 59(2):253-77.

AKIRAV I, MARROUN M. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Cerebral Cortex** 2006; 16(12):1759-65.

ALBERINI CM, MILEKIC MH, TRONEL S. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. **Cellular and molecular life sciences** 2006; 63(9):999-008.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders **DSM-V**. 2013; 5th ed.

ANGGADIREDJ K, NAKAMICHI M, HIRANITA T *et al.*, Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade. **Neuropsychopharmacology** 2004; 29(8):1470-8.

ARACIL-FERNÁNDEZ A, TRIGO JM, GARCÍA-GUTIÉRREZ MS *et al.*, Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB₂ receptors. **Neuropsychopharmacology** 2012; 37(7):1749-63.

ARNOLD JC. The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. **Pharmacology, biochemistry, and behavior** 2005; 81(2):396-06.

ARNOLD JC, HONE P, HOLLAND ML *et al.*, CB₂ and TRPV1 receptors mediate cannabinoid actions on MDR1 expression in multidrug resistant cells. **Pharmacological reports** 2012; 64(3):751-7.

AUBER A, TEDESCO V, JONES CE *et al.*, Post-retrieval extinction as reconsolidation interference: methodological issues or boundary conditions? **Psychopharmacology (Berl)** 2013; 226: 631-47.

BALTIERI DA, STRAIN EC, DIAS JC *et al.*, Brazilian guideline for the treatment of patients with opioids dependence syndrome. **Revista brasileira de psiquiatria** 2004; 26(4):259-69.

BARDO MT, BEVINS RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology (Berl)** 2000; 153: 31-43.

BERKE JD, HYMAN SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. **Neuron** 2000; 25: 515-32.

BERNARDI RE, LATTAL KM, BERGER SP. Anisomycin disrupts a contextual memory following reactivation in a cocaine-

induced locomotor activity paradigm. **Behavioral neuroscience** 2007; 121:156-63.

BERNARDI RE, RYABININ AE, BERGER SP *et al.*, Post-retrieval disruption of a cocaine conditioned place preference by systemic and intrabasolateral amygdala β 2 and α 1-adrenergic antagonists. **Learning & memory** 2009; 16:777-89.

BHATTACHARYYA S, MORRISON PD, FUSAR-POLI P *et al.*, Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. **Neuropsychopharmacology** 2010; 35(3):764-74.

BHATTACHARYYA S, FUSAR-POLI P, BORGWARDT S *et al.*, Modulation of mediotemporal and ventrostriatal function in humans by Delta9-tetrahydrocannabinol: a neural basis for the effects of Cannabis sativa on learning and psychosis. **Archives of general psychiatry** 2009; 66: 442–51.

BLEDNOV YA, CRAVATT BF, BOEHM SL 2nd *et al.*, Role of endocannabinoids in alcohol consumption and intoxication: studies of mice lacking fatty acid amide hydrolase. **Neuropsychopharmacology** 2007; 32:1570–82.

BISOGNO T, HANUS L, DE PETROCELLIS L *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** 2001; 134: 845-52.

BITENCOURT RM, PAMPLONA FA, TAKAHASHI RN. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. **European neuropsychopharmacology** 2008; (12):849-59.

BLISS TV, COLLINGRIDGE GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature** 1993; 361: 31-9.

BOUTON ME. Context and behavioral processes in extinction. **Learning & memory** 2004; 11(5):485-94.

BOUTON ME, MOODY EW. Memory processes in classical conditioning. **Neuroscience and biobehavioral reviews** 2004; 28(7):663-74.

BRAIDA D, POZZI M, PAROLARO D *et al.*, Intracerebral self administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the rat: interaction with the opioid system. **European journal of pharmacology** 2001; 413:227– 34.

BROWN TE, LEE BR, SORG BA. The NMDA antagonist MK-801 disrupts reconsolidation of a cocaine-associated memory for conditioned place preference but not for self-administration in rats. **Learning & memory** 2008; 15(12):857-65.

BRUNET A, ORR SP, TREMBLAY J *et al.*, Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiological responding during subsequent script-driven traumatic imagery in posttraumatic stress disorder. **Journal of psychiatric research** 2008; 42:503–06.

BUCHERELLI C, BALDI E, MARIOTTINI C *et al.*, Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. **Learning & memory** 2006; 13:426-30.

CAILLÉ S, PARSONS LH. SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. **The European journal of neuroscience** 2003;18(11):3145-149.

CAILLÉ S, ALVAREZ-JAIMES L, POLIS I *et al.*, Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. **The journal of neuroscience** 2007;27(14):3695-702.

CAMPOS AC, MOREIRA FA, GOMES FV *et al.*, Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philosophical transactions of the Royal society of London. Series B, biological sciences** 2012; 367:3364-78.

CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, MEDINA JH *et al.*, Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learning & memory** 2004; 11(5):572-78.

CARBÓ TANO M, MOLINA VA, MALDONADO H *et al.*, Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: the role of the GABAergic system. **Neuroscience** 2009; 158: 387-01.

CHAPERON F, SOUBRIÉ P, PUECH AT *et al.*, Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 1998; 135:324–32.

CHEVALEYRE V, CA STILLO PE. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. **Neuron** 2003; 38(3):461–72.

CHILDRESS AR, MOZLEY PD, MCELGIN W *et al.*, Limbic activation during cue-induced cocaine craving. **The American journal of psychiatry** 1999; 156:11–8.

CIPPITELLI A, BILBAO A, HANSSON AC *et al.*, Cannabinoid CB1 receptor antagonism reduces conditioned reinstatement of ethanol-seeking behavior in rats. **The European journal of neuroscience** 2005 ; 21 : 2243–51.

COHEN C, PERRAUT G, VOLTZ C *et al.*, SR141716, a central cannabinoid (CB1) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. **Behavioural pharmacology** 2002; 13: 451–63.

COHEN C, PERRAUT G, GRIEBEL G *et al.*, Nicotine-associated cues maintain nicotine seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). **Neuropsychopharmacology** 2005; 30: 145–55.

CONKLIN CA, TIFFANY ST. Applying extinction research and theory to cue-exposure addiction treatments. **Addiction** 2002; 97(2):155-67.

CONSROE P, LAGUNA J, ALLENDER J *et al.*, Controlled clinical trial of cannabidiol in Huntington's disease. **Pharmacology, biochemistry and behavior** 1991; 40:701–08.

CRAVATT BF, DEMAREST K, PATRICELLI MP *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** 2001; 98(16):9371–76

CRIPPA JA, ZUARDI AW, GARRIDO GE *et al.*, Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. **Neuropsychopharmacology** 2004; 29: 417-26.

CARLSON G, WANG Y, ALGER BE. Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. **Nature Neuroscience** 2002; 5:723–4.

CASTILLO PE, YOUNTS TJ, CHÁVEZ AE *et al.*, Endocannabinoid signaling and synaptic function. **Neuron** 2012; 76:70–81.

CAHILL K, USSHER MH. Cannabinoid type 1 receptor antagonists for smoking cessation. **The Cochrane database of systematic reviews [electronic resource]** 2011; 16(3): CD005353.

CHÁVEZ AE, CHIU CQ, CASTILLO PE. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. **Nature Neuroscience** 2010; 13: 1511-18.

DAS RK, KAMBOJ SK, RAMADAS M *et al.*, Cannabidiol enhances consolidation of explicit fear extinction in humans. **Psychopharmacology (Berl)** 2013; 226:781-92.

DAVIS S, RENAUDINEAU S, POIRIER R *et al.*, The formation and stability of recognition memory: what happens upon recall? **Frontiers in behavioral neuroscience** 2010;19(4):177.

DEBIEC J, LEDOUX JE, NADER K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron** 2002; 36: 527-38.

DEBIEC J, LEDOUX JE. Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD. **Annals of the New York academy of sciences** 2006; 1071:521-24.

DE OLIVEIRA ALVARES L, PASQUALINI GENRO B, DIEHL F *et al.*, Oposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. **Neuroscience** 2008; 154 (4):1648-55.

DE VRIES TJ, HOMBERG JR, BINNEKADE R *et al.*, Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 2003. 168:164–69.

DE VRIES TJ, SCHOFFELMEER ANM. Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. **Trends in pharmacological sciences** 2005; 26(8): 420–26.

DI CHIARA G, TANDA G, BASSAREO V *et al.*, Drug addiction as a disorder of associative learning: role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. **Annals of the New York academy of sciences** 1999; 877: 461–485.

DI MARZO V, FONTANA A, CADAS H *et al.*, Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature** 1994; 372:686-91.

DI MARZO V, MELCK D, BISOGNO T *et al.*, Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends in neurosciences** 1998; 21(12):521-28.

DI MARZO V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology** 2008; 160:1-24.

DI MARZO V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. **Pharmacological research: The official journal of the Italian pharmacological society** 2009; 60: 77–84.

DI MARZO V, PETROSINO S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. **Current opinion in lipidology** 2007;18(2):129-40.

DO MONTE FH, SOUZA RR, BITENCOURT RM *et al.*, Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. **Behavioural brain research** 2013; 250:23-7.

DUDAI Y. The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? **Annual review of psychology** 2004; 55:51-86.

ECONOMIDOU D, MATTIOLI L, CIFANI C *et al.*, Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 2006 Jan;183(4):394-03.

ELLGREN M, SPANO SM, HURD YL. Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. **Neuropsychopharmacology** 2007; 32(3):607-15.

ENNACEUR A, DELACOUR J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research** 1988; 31 (1): 47-59.

EICHENBAUM H. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. **Behavioural brain research** 1999; 103:123–33.

EVERITT BJ, ROBBINS TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience** 2005; 8: 1481–89.

FANG Q, LI FQ, LI YQ *et al.*, Cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant disrupts nicotine reward associated memory in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior** 2011; 99:738–42.

FATTORE L, COSSU G, SPANO S *et al.*, Cannabinoids and reward: interactions with the opioid system. **Critical reviews in neurobiology** 2004; 16(1-2):147-58.

FATTORE L, SPANO S, COSSU G *et al.*, Cannabinoid CB(1) antagonist SR 141716A attenuates reinstatement of heroin self-administration in heroin-abstinent rats. **Neuropharmacology** 2005; 48(8):1097-04.

FEGLEY D, GAETAN S, DURANTI A *et al.*, Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide leiolethanolamide deactivation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** 2005; 313:352–58.

FERBINTEANU J, MCDONALD RJ. Dorsal/ventral hippocampus, fornix, and conditioned place preference. **Hippocampus** 2001; 11:187–00.

FERNANDEZ JR, ALLISON DB. Rimonabant Sanofi-Synthelabo. **Current opinion in investigational drugs** 2004;5: 430–35.

FOLTIN RW, HARNEY M. Conditioned effects of environmental stimuli paired with smoked cocaine in humans. **Psychopharmacology (Berl)** 2000;149(1):24–33.

FORGET B, HAMON M, THIÉBOT MH. Cannabinoid CB1 receptors are involved in motivational effects of nicotine in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 2005;181: 722–34.

FORGET B, COEN KM, LE FOLL B. Inhibition of fatty acid amide hydrolase reduces reinstatement of nicotine seeking but not break point for nicotine self-administration--comparison with CB(1) receptor blockade. **Psychopharmacology (Berl)** 2009;205(4):613–24.

FREEDLAND CS, SHARPE AL, SAMSON HH *et al.*, Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. **Alcoholism, clinical and experimental research** 2001; 25: 277–282

FRICKS-GLEASON AN, MARSHALL JF. Post-retrieval b-adrenergic receptor blockade: effects on extinction and reconsolidation of cocaine-cue memories. **Learning & memory** 2008; 15: 643–48.

GAMALEDDIN I, ZVONOK A, MAKRIYANNIS A *et al.*, Effects of a selective cannabinoid CB2 agonist and antagonist on intravenous nicotine self administration and reinstatement of nicotine seeking. **PLoS One [electronic resource]** 2012; 7(1): e29900.

GARCÍA-GUTIÉRREZ MS, GARCÍA-BUENO B, ZOPPI S *et al.*, Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABAA receptors. **British journal of pharmacology** 2012; 165(4): 951–64.

GIUFFRIDA A, BELTRAMO M, PIOMELLI D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** 2001; 298:7–14

GIULIANO M, PELLERITO O, PORTANOVA P *et al.*, Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: involvement of the transcription factor PPAR gamma. **Biochimie** 2009; 91(4):457–65.

GOBBI G, BAMBICO FR, MANGIERI R *et al.*, Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America** 2005; 102 (51):18620–25.

GRUETER BA, BRASNJO G, MALENKA RC. Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. **Naure Neuroscience** 2010. 13, 1519–1525.

HARLOE JP, THORPE AJ, LICHTMAN AH. Differential endocannabinoid regulation of extinction in appetitive and aversive Barnes maze tasks. **Learning & memory** 2008; 15:806–09.

HARRIS JA, JONES ML, BAILEY GK *et al.*, Contextual control over conditioned responding in an extinction paradigm. **Journal of experimental psychology. Animal behavior processes** 2000; 26: 179-85.

HEIMER L, ZAHM DS, CHURCILL L *et al.*, Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. **Neuroscience** 1991; 41, 89–125.

HEINRICHS SC, LEITE-MORRIS KA, CAREY RJ *et al.*, Baclofen enhances extinction of opiate conditioned place preference. **Behavioural brain research** 2010;207(2):353-9.

HERNANDEZ PJ, KELLEY AE. Long-term memory for instrumental responses does not undergo protein synthesis-dependent reconsolidation upon retrieval. **Learning & memory** 2004; 11: 748–54.

HÖLTER SM, KALLNIK M, WURST W *et al.*, Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively motivated learning task. **European journal of pharmacology** 2005; 510:69–74.

HOWLETT AC, BARTH F, BONNER TI *et al.*, International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacological reviews** 2002; 54:161-02.

HOWLETT AC, BREIVOGEL CS, CHILDERS SR, *et al.*, Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. **Neuropharmacology** 2004;47 Suppl 1:345-58.

HYMAN SE, MALENKA RC, NESTLER EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annual review of neuroscience** 2006; 29: 565–98.

HUSTON JP, SILVA MA, TOPIC B *et al.*, What's conditioned in conditioned place preference? **Trends in pharmacological sciences** 2013; 34: 162–166.

ISHIGURO H, IWASAKI S, TEASENFITZ L *et al.*, Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. **The pharmacogenomics journal** 2007; 7: 380–85.

ITZHAK Y. Role of the NMDA receptor and nitric oxide in memory reconsolidation of cocaine-induced conditioned place

preference in mice. **Annals of the New York academy of sciences** 2008; 1139:350-57.

IZQUIERDO I. Memórias. **Artmed** 2011. Porto Alegre.

IZZO AA, BORRELLI F, CAPASSO R *et al.*, Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in pharmacological sciences** 2009; 30: 515-27.

JACOB W, MARSCH R, MARSICANO G *et al.*, Cannabinoid CB1 receptor deficiency increases contextual fear memory under highly aversive conditions and long-term potentiation in vivo. **Neurobiology of learning and memory** 2012; 98: 47-55.

JAVADI AH, CHENG P. Transcranial direct current stimulation (tDCS) enhances reconsolidation of long-term memory. **Brain stimulation** 2013;6(4):668-74.

JENTSCH JD, OLAUSSON P, NESTLER EJ *et al.*, Stimulation of protein kinase a activity in the rat amygdala enhances reward-related learning. **Biological psychiatry** 2002; 15:52(2):111-18.

JENTSCH JD, TAYLOR JR. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. **Psychopharmacology** 1999; 146:373-90.

JOHNSON SW, WU YN. Multiple mechanisms underlie burst firing in rat midbrain dopamine neurons in vitro. **Brain research** 2004; 1019(1-2):293-6.

JUSTINOVA Z, MANGIERI RA, BORTOLATO M *et al.*, Fatty acid amide hydrolase inhibition heightens anandamide signaling without producing reinforcing effects in primates. **Biological psychiatry** 2008; 64: 930-37.

KAANG BK, LEE SH, KIM H. Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry** 2009;15: 430-5.

KAUER JA, MALENKA RC. Synaptic plasticity and addiction. **Nature reviews. Neuroscience** 2007;8(11):844-58.

KALIVAS PW *et al.*, Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. **Neuron** 2005; 45(5):647-50.

KALIVAS PW, O'BRIEN C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. **Neuropsychopharmacology** 2008;33(1):166-80.

KANO M, OHNO-SHOSAKU T, HASHIMOTODANI Y *et al.*, Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiological reviews** 2009; 89(1):309-80.

KATHURIA S, GAETANI S, FEGLEY D *et al.*, Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. **Nature medicine** 2003; 9:76–8.

KATONA I, SPERLÁGH B, SÍK A, *et al.*, Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axonal terminals of specific hippocampal interneurons. **The Journal of neuroscience** 1999; 19:4544–58.

KATONA I, URBÁN GM, WALLACE M *et al.*, Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. **The Journal of neuroscience** 2006; 26(21):5628–37.

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;18(2):286-96.

KAUER JA. Learning mechanisms in addiction: Synaptic plasticity in the ventral tegmental area as a result of exposure to drugs of abuse. **Annual review of physiology** 2004; 66: 447–75.

KAWAMURA Y, FUKAYA M, MAEJIMA T *et al.*, The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. **The journal of neuroscience** 2006; 26:2991–01.

KILTS CD. Imaging the roles of the amygdala in drug addiction. **Psychopharmacology bulletin** 2001; 35(1):84–94.

KIM J, AALGER BE. Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. **Nature Neuroscience** 2010; 13(5):592–00.

KINTDT M, SOETER M, VERVLIET B. Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. **Nature neuroscience** 2009; 12:256-58.

KOBILO T, HAZVI S, DUDAI Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. **European journal of neuroscience** 2007; 25:3417–21.

KOOB GF, LE MOAL M. Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. **Science** 1997; 278:52–8.

KOOB GF. Dynamics of Neuronal Circuits in Addiction: Reward, Antireward, and Emotional Memory. **Pharmacopsychiatry** 2009; 42: (1) 32-4.

KOOB GF, LE MOAL M. Plasticity of reward neurocircuitry and the ‘dark side’ of drug addiction. **Nature neuroscience** 2005; 8:1442–44.

LALLEMAND F, WITTE P. Ethanol induces higher BEC in CB1 cannabinoid receptor knockout mice while decreasing ethanol preference. **Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)** 2005; 40(1):54-62.

LARANJEIRA R *et al.*, II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas - Consumo de Álcool no Brasil: Tendências entre 2006/2012. São Paulo: INPAD; 2013 [acesso em 13 agosto 2013]. Disponível em: http://inpad.org.br/wpcontent/uploads/2013/04/LENAD_ALCOOL_Res ultados-Preliminares.pdf

LEDGERWOOD CJ, GREWOOD SM, BRETT RR *et al.*, Cannabidiol inhibits synaptic transmission in rat hippocampal cultures and slices via multiple receptor pathways. **British journal of pharmacology** 2011; 162: 286-94.

LEE JL. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. **Nature neuroscience** 2008; 11: 1264-6.

LEE JL, EVERITT BJ, THOMAS KL. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science** 2004; 304:839-43.

LEE JLC, DI CIANO P, THOMAS KL *et al.*, Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. **Neuron** 2005; 47:795-01.

LE FOLL B, GOLDBERG SR. Rimonabant, a CB1 antagonist, blocks nicotine-conditioned place preferences. **Neuroreport** 2004; 15; 15(13):2139-43.

LEWIS DJ. Psychobiology of active and inactive memory. **Psychological bulletin** 1979; 86:1054-83.

LI CS, SINHA R. Inhibitory control and emotional stress regulation: neuroimaging evidence for frontal-limbic dysfunction in psycho-stimulant addiction. **Neuroscience and biobehavioral review** 2008; 32(3):581-97.

LIN HC, MAO SC, GEAN PW. Effects of intra-amygdala infusion of CB1 receptor agonists on the reconsolidation of fear potentiated startle. **Learning & memory** 2006; 13:316-21.

LIM EP, TAN CH, JAY TM *et al.*, Locus coeruleus stimulation and noradrenergic modulation of hippocampo-prefrontal cortex long-term potentiation. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the collegium internationale neuropsychopharmacologicum (CINP)** 2010; 13:1219-31.

LONG JZ, NOMURA DK, VANN RE *et al.*, Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America** 2009; 106(48):20270-5.

LONG JZ, LI W, BOOKER L *et al.*, Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. **Nature chemical biology** 2009; 5(1):37-44.

LU L, XU NJ, GE X *et al.*, Reactivation of morphine conditioned place preference by drug priming: role of environmental cues and sensitization. **Psychopharmacology (Berl)** 2002; 159 (2):125-32.

LU L, SHEPARD JD, HALL FS *et al.*, Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. **Neuroscience and biobehavioral review** 2003; 27 (5):457-91.

LUCHICCHI A, PITIS M. Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. **Molecular neurobiology** 2012; 46(2):374-92.

LUPICA CR, RIGEL AC. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. **Neuropharmacology** 2005; 48: 1105-16.

LUTZ B. The endocannabinoid system and extinction learning. **Molecular neurobiology** 2007; 36:92-01.

MAHGOUB M, KEUN-HANG SY, SYDORENKO V *et al.*, Effects of cannabidiol on the function of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. **European journal of pharmacology** 2013; 15: 720(1-3):310-9.

MALDONADO R. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. **Trends in neuroscience** 2006; 29(4):225-32.

MANWELL LA, SATVAT E, LANG ST *et al.*, FAAH inhibitor, URB-597, promotes extinction and CB(1) antagonist, SR141716, inhibits extinction of conditioned aversion produced by naloxone-precipitated morphine withdrawal, but not extinction of conditioned preference produced by morphine in rats. **Pharmacology, biochemistry and behavior** 2009; 94:154-62.

MACKIE K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: **Handbook of experimental pharmacology** 2005; 168: 299-325. Berlin, Germany: Springer.

MARSICANO G, WOTJAK CT, AZAD SC *et al.*, The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature** 2002; 418:530–34.

MAS-NIETO M, POMMIER B, TZAVARA ET *et al.*, Reduction of opioid dependence by the CB(1) antagonist SR141716A in mice: evaluation of the interest in pharmacotherapy of opioid addiction. **British journal of pharmacology** 2001; 132:1809-16.

MATAMALES M, BERTRAN-GONZALEZ J, SALOMON L. Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. **PLoS One [electronic resource]** 2009; 4(3):e4770.

MAZZOLA C, MEDALIE J, SCHERMA M *et al.*, Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. **Learning & memory** 2009; 16: 332–37.

MCGAUGH JL. Time-dependent processes in memory storage. **Science** 1966; 153:1351-58.

MCGAUGH JL. Making lasting memories: remembering the significant. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America** 2013; 8:110(2):10402-7.

MELLO NK. Behavioral studies of alcoholism, in *Biology of Alcoholism*, eds B. Kissin and H. Begleiter, **Plenum press** 1972; New York, 210–219.

MECHOULAM R, PARKER L. Cannabis and alcohol: a close friendship. **Trends in pharmacological sciences** 2003; 24(6):266-68.

MELIS M, PITIS M. Hub and switches: endocannabinoid signalling in midbrain dopamine neurons. **Philosophical transactions of the Royal society of London. Series B, biological sciences** 2012; 367:3276–85.

MILEKIC MH, BROWN SD, CASTELLINI C *et al.*, Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. **The journal of neuroscience** 2006; 26: 3010–20.

MILER CA, MARSHALL JF. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. **Neuron** 2005; 47:873-84.

MILNER B, SQUIRE LR, KANDEL ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron** 1998;20(3):445-68.

MILTON AL. Drink, drugs and disruption: memory manipulation for the treatment of addiction. **Current opinion in neurobiology** 2013;23(4):706-12.

MILTON AL, EVERITT BJ. The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. **Neuroscience and biobehavioral reviews** 2012;36(4):1119-39.

MILTON AL, EVERITT BJ. The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: implications for the treatment of addiction. **The European journal of neuroscience** 2010; 31: 2308-19.

MISANIN JR, MILER RR. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science** 1968; 160:554-55.

MORALES M, BONCI A. Getting to the core of addiction: Hooking CB2 receptor into drug abuse? **Nature medicine** 2012; 5:18(4):504-5.

MORGAN CJ, DAS RK, JOYE A *et al.*, Cannabidiol reduces cigarette consumption in tobacco smokers: preliminar findings. **Addictive behaviors** 2013; 38: 2433-36.

MORRIS RG, ANDERSON E, LYNCH GS *et al.*, Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature** 1986; 319: 774-76.

MUCHA RF, HERZ A. Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning. **Psychopharmacology (Berl)** 1985;86(3):274-80.

MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature** 1993; 365: 61-5.

MUELLER D, PERDIKARIS D, STEWART J. Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. **Behavioural brain research** 2002;136(2):389-97.

MÜLLER CP. Episodic memories and their relevance for psychoactive drug use and addiction. **Frontiers in behavioral neuroscience [electronic resource]** 2013; 23:7:34.

MÜLLER CP, SHUMANN G. Drugs as instruments: a new framework for non-addictive psychoactive drug use. **The behavioral an brain sciences** 2011;34(6):293-10.

NADER K, EINARSSON EO. Memory reconsolidation: an update. **Annals of the New York academy of sciences** 2010; 1191: 27-41.

NADER K, SCHAFFE GE, LE DOUX JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature** 2000; 406:722-26.

NADER K. Memory traces unbound. **Trends in neurosciences** 2003; 26:65–72.

NAPOLITANO M, MARFIA GA, VACCA A *et al.*, Modulation of gene expression following long-term synaptic depression in the striatum. **Brain research. Molecular brain research** 1999;72(1):89-96.

NATHAN PJ, O'NEILL BV, NAPOLITANO A *et al.*, Neuropsychiatric adverse effects of centrally acting antiobesity drugs. **CNS neuroscience & therapeutics** 2011;17(5):490-05.

NAVARRETE F, RODRÍGUEZ-ARIAS M, MARTÍN-GARCÍA E *et al.*, Role of CB2 cannabinoid receptors in the rewarding, reinforcing, and physical effects of nicotine. **Neuropsychopharmacology** 2013; 38(12): 2515-24.

NAVARRO M, CARRERA MR, FRATTA W *et al.*, Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. **The journal of neuroscience** 2001; 21:5344–50.

NAVARRO M, CARRERA MR, DEL ARCO I *et al.*, Cannabinoid receptor antagonist reduces heroin self-administration only in dependent rats. **European journal of pharmacology** 2004;501: 235–37.

NESTLER EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature neuroscience** 2205; 8:1445–49.

O'BRIEN CP, TESTA T, O'BRIEN TJ *et al.*, Conditioned narcotic withdrawal in humans. **Science** 1977; 195(4282):1000-02.

O'BRIEN CP, CHILDRESS AR, MCLELLAN AT *et al.*, Types of conditioning found in drug-dependent humans. **NIDA research monograph** 1988; 84:44–61.

O'BRIEN CP, CHILDRESS AR, EHRMAN R *et al.*, Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)** 1998; 12: 15–22.

O'SULLIVAN SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. **British journal of pharmacology** 2007;152(5):576-82.

O'SULLIVAN SE, KENDALL PJ, KENDALL DA. Endocannabinoids and the cardiovascular response to stress. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)** 2012; 26(1):71-82.

OHNO-SHOSAKU T, TSUBOKAWA H, MIZUSHIMA I *et al.*, Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. **The journal of neuroscience** 2002;22(10):3864-72.

OGREN SO, ERIKSSON TM, ELVANDER-TOTTIE E *et al.*, The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory. **Behavioural brain research** 2008; 195: 54-77.

OLESON EB, BECKERT MV, MORRA JT *et al.*, Endocannabinoids shape accumbal encoding of cue-motivated behavior via CB1 receptor activation in the ventral tegmentum. **Neuron** 2012;73:360-73.

OLDS J, MILNER P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. **Journal of comparative and physiological psychology** 1954; 47(6):419-27;

OLMOS JS, HEIMER L. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. **Annals of the New York academy of sciences** 1999; 877:1-32.

ONAIVI ES. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. **Neuropsychobiology** 2006;54(4):231-46.

O'SULIVAN SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. **British journal of pharmacology** 2007; 152:576-82.

O'SULIVAN SE, KENDALL PJ, KENDALL DA. Endocannabinoids and the cardiovascular response to stress. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)** 2012;26(1):71-82.

PACHER P, BÁTKAI S, KUNOS G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological reviews** 2006;58(3):389-62.

PALAONE G, BOTREAU F, STEWART J. The facilitative effects of D-cycloserine on extinction of a cocaine-induced conditioned place preference can be long lasting and resistant to reinstatement. **Psychopharmacology (Berl)** 2009;202(1-3):403-9.

PAN B, WANG W, ZHONG P, *et al.*, Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. **The journal of neuroscience** 2011; 31(38):13420-30.

PANDOLFO P, VENDRUSCOLO LF, SORDI R *et al.*, Cannabinoid-induced conditioned place preference in the spontaneously hypertensive rat-an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **Psychopharmacology (Berl)** 2009; 205(2):319-26.

PAMPLONA FA, PREDIGER RD, PANDOLFO P *et al.*, The cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 facilitates the extinction of

contextual fear memory and spatial memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 2006; 188:641–49.

PARKER LA, BURTON P, SORGE RE *et al.*, Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 2004;175(3):360-66.

PAVLOV IP. Conditioned Reflexes. Oxford 1927; **Oxford university press**.

PATEL S, CRAVATT BF, HILLARD CJ. Synergistic interactions between cannabinoids and environmental stress in the activation of the central amygdala. **Neuropsychopharmacology** 2005;30(3):497-07.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego 1998; **Academic press**.

PECIÑA S, BERRIDGE KC. Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? **The journal of neuroscience** 2005; 14:25(50):11777-86.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE *et al.*, Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods** 1985; 14(3):149-67.

PERTWEE RG. Pharmacological actions of cannabinoids. **Handbook of experimental pharmacology** 2005;(168):1-51.

PIAZZA PV, DEROCHE-GAMONET V. A multi-step general theory of transition to addiction. **Psychopharmacology (Berl)** 2013; 229:387–13.

PICKEL VM, CHAN J, KASH TL *et al.*, Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. **Neuroscience** 2004;127(1):101-12.

POWER AE, BERLAU DJ, MCGAUGH JL *et al.*, Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: the role of re-exposure duration. **Learning & memory** 2006;13(1):27-34.

POTENZA MN, SOFUOGLU M, CARROLL KM *et al.*, Neuroscience of behavioral and pharmacological treatments for addictions. **Neuron** 2011; 69(4):695-712.

QUIRK GJ. Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. **Learning & memory** 2002;9(6):402-7.

QUINN JJ, MA QD, TINSLEY MR *et al.*, Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial pré-frontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learning & memory** 2008;15: 368- 72.

REN Y, WHITTARD J, HIGUERRA-MATAS A, *et al.*, Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin-seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. **The journal of neuroscience** 2009; 29(47):14764-69.

REN ZY, LIU MM, XUE YX *et al.*, A critical role for protein degradation in the nucleus accumbens core in cocaine reward memory. **Neuropsychopharmacology** 2013; 38(5):778-90.

RIOS C, GOMES I, DEVI LA. Mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis **British journal of pharmacology** 2006; 148(4):387-95.

ROBBE D, ALONSO G, DUCHAMP F *et al.*, Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. **The journal of neuroscience** 2001; 21(1):109-16.

ROBBINS TW, EVERITT BJ. Drug addiction: bad habits add up. **Nature** 1999; 398: 567–70.

ROBBINS TW, ERSCHKE KD, EVERITT BJ. Drug addiction and the memory systems of the brain. **Annals of the New York academy of sciences** 2008; 1141: 1–21.

ROBINSON MJ, FRANKLIN KB. Reconsolidation of a morphine place preference: impact of the strength and age of memory on disruption by propranolol and midazolam. **Behavioural brain research** 2010; 213(2):201-7.

RODRÍGUEZ ML, CAMPOS J, FORCATO C *et al.*, Enhancing a declarative memory in humans: the effect of clonazepam on reconsolidation. **Neuropharmacology** 2013; 64:432-42.

RODRIGUEZ-ORTIZ CJ, DE LA CRUZ V, GUITIÉRREZ R *et al.*, Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. **Learning & memory** 2005; 12(5):533-7

ROSSATO JI, BEVILAQUA LR, MYSIKIW JC *et al.*, On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & memory** 2007; 14: 36–46.

RUSSO EB, BURNETT A, HALL B *et al.*, Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. **Neurochemical research** 2005; 30(8):1037-43.

SADLER R, HERZIG V, SCHIMIDT WJ. Repeated treatment with the NMDA antagonist MK-801 disrupts reconsolidation of memory for amphetamine conditioned place preference. **Behavioural pharmacology** 2007; 18: 699–03.

SANCHEZ CJ, BAILIE TM, WU WR *et al.*, Manipulation of dopamine D1-like receptor activation in the rat medial prefrontal cortex alters stress- and cocaine-induced reinstatement of conditioned place preference behavior. **Neuroscience** 2003; 119:(2)497–05.

SANCHIS-SEGURA C, SPANAGEL R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction biology** 2006; 11(1):2-38.

SARA SJ. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learning & memory** 2000; 7(2):73– 84.

SCHENEIDER AM, SHERMAN W. Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. **Science** 1968; 159:219-22.

SCHERMA M, PANLILIO LV, FADDA P. Inhibition of anandamide hydrolysis by cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-3-yl ester (URB597) reverses abuse-related behavioral and neurochemical effects of nicotine in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** 2008;327(2):482-90.

SCHULTEIS G, LIU J, AMITAI N *et al.*, Context- and cue-conditioned potentiation of acute morphine dependence and withdrawal. **Pharmacology, biochemistry and behavior** 2005; 82:82–89.

SIDHPURA N, PARSONS LH. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior. **Neuropharmacology** 2011;61(7):1070-87.

SIMONNET A, CADOR M, CAILLÉ S. Nicotine reinforcement is reduced by cannabinoid CB1 receptor blockade in the ventral tegmental area. **Addiction biology** 2013;18(6):930-6.

SORG BA. Reconsolidation of drug memories. **Learning & memory** 2012; 36:1400-17.

SPANO MS, FATTORE L, COSSU G *et al.*, CB1 receptor agonist and heroin, but not cocaine, reinstate cannabinoid-seeking behaviour in the rat. **British journal of pharmacology** 2004;143(3):343-50.

SCHLOSBURG JE, BLANKMAN JL, LONG JZ *et al.*, Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. **Nature neuroscience** 2010; 13(9):1113-19.

SCHIFFER WK, LIEBLING CN, REISZEL C *et al.*, Cue-induced dopamine release predicts cocaine preference: positron emission tomography studies in freely moving rodents. **The journal of neuroscience** 2009; 29: 6176–85.

SIEGEL S. Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. **Journal of comparative and physiological psychology** 1975;89(5):498-06.

SIEGEL S, HINSON RE, KRANK MD *et al.*, Heroin "overdose" death: contribution of drug-associated environmental cues. **Science** 1982; 216(4544):436-7.

SINGH ME, VERTY AN, MCGREGOR IS *et al.*, A cannabinoid receptor antagonist attenuates conditioned place preference but not behavioural sensitization to morphine. **Brain research** 2004; 1026(2):244–53.

SOLINAS M, PANLILIO LV, ANTONIOU K *et al.*, The cannabinoid CB1 antagonist N-piperidiny-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl) -4-methylpyrazole-3-carboxamide (SR-141716A) differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous reinforcement, fixed ratio, and progressive ratio schedules of drug self-administration in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** 2003; 306(1):93-02.

SOLINAS M, PANLILIO LV, GOLDBERG SR. Exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) increases subsequent heroin taking but not heroin's reinforcing efficacy: a self-administration study in rats. **Neuropsychopharmacology** 2004 ; 29(7):1301-11.

SOLINAS M, GOLDBERG SR, PIOMELLI D. The endocannabinoid system in brain reward processes. **British journal of pharmacology** 2008;154(2): 369-83.

SORIA G, MENDIZÁBAL V, TOURIÑO C *et al.*, Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. **Neuropsychopharmacology** 2005; 30:1670–80.

STERN CA, GAZARINI L, TAKAHASHI RN *et al.*, On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology** 2012; 37(9):2132-42.

STRAIKER A, MACKIE K. Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. **The journal of physiology** 2005; 569(2):501–17.

STAIKER A, HU SS, LONG JZ *et al.*, Monoacylglycerol lipase limits the duration of endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of excitation in autaptic hippocampal neurons. **Molecular pharmacology** 2009; 76(6):1220–27.

STRAIKER A, MACKIE K. Cannabinoid signaling in inhibitory autaptic hippocampal neurons. **Neuroscience** 2009; 163(1):190–01.

STAIKER A, WAGER-MILLER J, HU SS *et al.*, COX-2 and fatty acid amide hydrolase can regulate the time course of depolarization-induced suppression of excitation. **British journal of pharmacology** 2011; 164(6):1672–83.

SUGIURA T, KONDO S, SUKAGAWA A *et al.*, 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical and biophysical research communications** 1995; 215(1):89–97.

SUZUKI A, JOSSELYN SA, FRANKLAND PW *et al.*, Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **The journal of neuroscience** 2004; 24(20):4787-95.

SUZUKI A, MUKAWA T, TSUKAGOSHI A *et al.*, Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. **Learning & memory** 2008; 15: 426–33.

TAUBENFELD SM, MURAVIEVA EV, GARCIA-OSTA A *et al.*, Disrupting the memory of places induced by drugs of abuse weakens motivational withdrawal in a context-dependent manner. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America** 2010;107(27):12345-50.

TEPPER JM, BOLAM JP. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. **Current opinion in neurobiology** 2004; 14: 685–92

THÉBERGE FR, MILTON AL, BELIN D *et al.*, The basolateral amygdala and nucleus accumbens core mediate dissociable aspects of drug memory reconsolidation. **Learning & memory** 2010; 17:444-53

THOMAS A, BAILLIE GL, PHILLIPS AM *et al.*, Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of

CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. **British journal of pharmacology** 2007;150: 613-23.

TIFFANY ST. A cognitive model of drug urges and drug-use behavior: role of automatic and nonautomatic processes. **Psychological review** 1990; 97: 147–68.

TOMIDA I, AZUARA-BLANCO A, HOUSE H *et al.*, Effect of sublingual application of cannabinoids on intraocular pressure: a pilot study. **Journal of glaucoma** 2006; 15:349–353.

TORREGROSSA MM, KALIVAS PW. Microdialysis and the neurochemistry of addiction. **Pharmacology, biochemistry and behavior** 2008; 90:261–72.

TRIGO JM, MARTIN-GARCÍA E, BERRENDERO F, *et al.*, The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. **Drug and alcohol dependence** 2010; 108(3):183-94.

TRONSON NC, TAYLOR JR. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nature reviews. Neuroscience** 2007; 8: 262–75.

TRONSON NC, TAYLOR JR. Addiction: a drug-induced disorder of memory reconsolidation. **Current opinion in neurobiology** 2013; 23: 573-80.

TZESCHENTKE TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addiction biology** 2007; 12:227-62.

UNODC World Drug Report 2013 (United Nations publication, Sales No. E.13.XI.6). ISBN: 978-92-1-056168-6.

VALJENT E, CORBILLÉ AG, BERTRAN GONZALEZ J *et al.*, Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America** 2006; 103:2932-37.

VANDERSCHUREN LJ, KALIVAS PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology (Berl)** 2000;151(2-3):99-20.

VARVEL SA, LICHTMAN AH. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics** 2002; 301:915–24.

VIGANÒ D, GRAZIA CASCIO M, RUBINO T *et al.*, Chronic morphine modulates the contents of the endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol, in rat brain. **Neuropsychopharmacology** 2003; 28(6):1160–67.

VIGANÒ D, VALENTI M, CASCIO MG *et al.*, Changes in endocannabinoid levels in a rat model of behavioural sensitization to morphine. **The European journal of neuroscience** 2004; 20(7):1849–57.

VINKLEROVA J, NOVÁKOVÁ J, SULCOVÁ A *et al.*, Inhibition of methamphetamine self administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)** 2002; 16:139–43.

VINOD KY, YALAMANCHILI R, THANOS PK *et al.*, Genetic and pharmacological manipulations of the CB(1) receptor alter ethanol preference and dependence in ethanol preferring and nonpreferring mice. **Synapse** 2008; 62(8): 574-81.

VINOD KY, SANGUINO E, YALAMANCHILI R *et al.*, Manipulation of fatty acid amide hydrolase functional activity alters sensitivity and dependence to ethanol. **Journal of neurochemistry** 2008; 104(1):233-43.

VOLKOW ND, BALER RD, COMPTON WM *et al.*, Adverse health effects of marijuana use. **The New England journal of medicine** 2014; 370(23):2219-27.

Xi ZX, GILBERT JG, PENG XQ *et al.*, Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. **The journal of neuroscience** 2006; 26(33):8531-36.

Xi ZX, SPILLER K, PAK AC *et al.*, Cannabinoid CB1 receptor antagonists attenuate cocaine's rewarding effects: experiments with self-administration and brain-stimulation reward in rats. **Neuropsychopharmacology** 2008; 33(7):1735-45.

Xi ZX, PENG XQ, LI X *et al.*, Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. **Nature neuroscience** 2011; 14:1160–66.

ZANETTINI C, PANLILIO LV, ALICKI M *et al.*, Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. **Frontiers in behavioral neuroscience** 2011; 5:57.

ZUARDI AW, HALLAK JE, DURSUN SM *et al.*, Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)** 2006; 20(5):683-6.

YU LL, WANG XY, ZHAO M *et al.*, Effects of cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in consolidation and reconsolidation of methamphetamine reward memory in mice. **Psychopharmacology (Berl)** 2009; 204(2):203-11.

WALTER M, WIESBECK GA, BLOCK N *et al.*, Psychobiological responses to drug cues before and after methadone intake in heroin-dependent patients: a pilot study. **European neuropsychopharmacology** 2008;18(5): 390-93.

WANG X, CEN X, LU L. Noradrenaline in the bed nucleus of the stria terminalis is critical for stress-induced reactivation of morphine-conditioned place preference in rats. **European journal of pharmacology** 2001; 432:153–61.

WANG B, ZHANG B, GE X *et al.*, Inhibition by peripheral electric stimulation of the reinstatement of morphine-induced place preference in rats and drug-craving in heroin addicts. **Beijing Da Xue Xue Bao.** 2003; 35:241–47.

WANG W, CAO X, LIU C Cannabinoid WIN55,212-2 inhibits TRPV1 in trigeminal ganglion neurons via PKA and PKC pathways. **Neurological sciences: Official journal of the Italian neurological society and of the Italian society of clinical neurophysiology** 2012; 33:79–85.

WANG H, LUPICA CR. Release of endogenous cannabinoids from ventral tegmental area dopamine neurons and the modulation of synaptic processes. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry** 2014; 52:24-7.

WILLIAMS SM, GOLDMAN-RAKIC PS. Characterization of the dopaminergic innervation of the primate frontal cortex using a dopamine-specific antibody. **Cerebral cortex** 1993; 3: 199-22.

WIKLER A. Recent progress in research on the neurophysiological basis of morphine addiction. **The American journal of psychiatry** 1948; 105: 329–38.

WIKLER A, PESCOR FT. Classical conditioning of a morphine abstinence phenomenon, reinforcement of opioid-drinking behavior and relapse in morphine-addicted rats. **Psychopharmacologia** 1967; 10:255–84.

WILSON RI, NICOLL RA. Endocannabinoid signaling in the brain. **Science** 2002; 296:678–82.

WINTERS BD, SAKSIDA LM, BUSSEY TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neuroscience and biobehavioral reviews** 2008; 32, 1055–70.

WINTERS BD, TUCCI MC, DACOSTA-FURTADO M. Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. **Learning & memory** 2009; 16, 545–53.

WISE RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. **Neuron** 2002; 36(2):229-40.

WISE RA. Dopamine, learning and motivation. **Nature reviews. Neuroscience** 2004; 5:483-94.

WHITE NM. Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. **Addiction** 1996; 91: 921-49.

9. ANEXO

9.1. Lista de publicações durante o doutorado

- ✓ **De Carvalho CR**, Pamplona FA, Cruz JS, Takahashi RN (2014). Endocannabinoids underlie reconsolidation of hedonic memories in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*; 231(7):1417-25. doi: 10.1007/s00213-013-3331-2.
- ✓ Moreira EL, Aguiar AS Jr, **De Carvalho CR**, Santos DB, de Oliveira J, de Bem AF, Xikota JC, Walz R, Farina M, Prediger RD (2013) Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. *Neuroscience Letters* 29; 541:193-8. doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.043.
- ✓ **De Carvalho CR**, Cruz JS, Takahashi RN (2012) Prolonged exposure to caffeinated alcoholic solutions prevents the alcohol deprivation effect in rats. *Journal of Caffeine Research* 2(2): 83-89. doi: 10.1089/caf.2012.0013.
- ✓ Moreira EL, Rial D, Duarte FS, **De Carvalho CR**, Horst H, Pizzolatti MG, Prediger RD, Ribeiro-do-Valle RM. (2010) Central nervous system activity of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology* (8):1061-8. doi: 10.1111/j.2042-7158.2010.