



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

LUCAS ANTÔNIO DOS SANTOS BARBOSA

**O BETA-CARIOFILENO, AGONISTA CANABINOIDE CB2, DIMINUI A SALIÊNCIA
MOTIVACIONAL E AS PROPRIEDADES REFORÇADORAS DO CREME DE AVELÃ
E CHOCOLATE EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis
2022

LUCAS ANTÔNIO DOS SANTOS BARBOSA

**O BETA-CARIOFILENO, AGONISTA CANABINOIDE CB2, DIMINUI A SALIÊNCIA
MOTIVACIONAL E AS PROPRIEDADES REFORÇADORAS DO CREME DE AVELÃ
E CHOCOLATE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira.

Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane Ribeiro de Carvalho.

Florianópolis
2022

À minha família. Este é o melhor *feedback* que eu poderia dar por todo sacrifício, incentivo e dedicação com a minha educação. Mesmo sem exemplos, eles acreditaram no poder que ela pode exercer.

Dedico.

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

Barbosa, Lucas Antônio dos Santos

O BETA-CARIOFILENO, AGONISTA CANABINOIDE CB2, DIMINUI A SALIÊNCIA MOTIVACIONAL E AS PROPRIEDADES REFORÇADORAS DO CREME DE AVELÃ E CHOCOLATE EM CAMUNDONGOS / Lucas Antônio dos Santos Barbosa; orientador, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, coorientadora, Cristiane Ribeiro de Carvalho, 2022.

102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Recompensa alimentar. 3. Sistema endocanabinoide. 4. Receptores canabinoídeos do tipo CB2. 5. Beta-cariofileno. I. Moreira, Eduardo Luiz Gasnhar. II. Carvalho, Cristiane Ribeiro de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Lucas Antônio dos Santos Barbosa

O beta-cariofileno, agonista canabinoide CB2, diminui a saliência motivacional e as propriedades reforçadoras do creme de avelã e chocolate em camundongos.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Rafael Cypriano Dutra, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Rafael Mariano de Bitencourt, Dr.

Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL

Prof. Wagner Luis Reis, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Morgana Duarte da Silva, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Durante esse período de trabalho tive a oportunidade de crescimento tanto pessoal quanto profissional. A conclusão desse trabalho vem acompanhada de pessoas que me auxiliaram durante sua realização e eu sou muito grato por todos que me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço a minha mãe, Marinalva, pelo amor incondicional e pelos incentivos constantes que me proporcionou.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira e a minha coorientadora Dra. Cristiane Ribeiro de Carvalho que me receberam, acreditaram no meu trabalho e me prestaram todo apoio necessário durante o período de mestrado. Obrigado pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência, pela disponibilidade. Agradeço também aos meus colegas do Neuroscience Coworking Lab, Adriano, Eslen, Giovanna, Izolene, Peterson, Sara e Wellington pela cooperação, amizade, compartilhamento de ideias e discussão. Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, com que tanto aprendi. E aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, pelas conversas descontraídas e companheirismo.

Agradeço aos amigos com quem dividi o lar. Obrigado Amanda, Jaimet, Severo e Victor, por todo incentivo, apoio e parceria durante esses anos.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pela bolsa de estudo. E assim também a todas as pessoas não mencionadas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização da minha dissertação.

“A Função da educação é ensinar a pessoa a pensar intensamente e a pensar criticamente. (...) esse é o objetivo da verdadeira educação” (MARTIN LUTHER KING, 1947).

RESUMO

Transtornos alimentares possuem uma forte relação com a desregulação da via de recompensa e aumento da saliência motivacional por comida. Estes transtornos acarretam prejuízos à saúde física e/ou psicossocial. O sistema endocanabinoide está envolvido em processos de memória, motivação e reforço induzido por recompensas, podendo sua modulação, através de canabinoides exógenos, ter um papel chave no tratamento destes transtornos. O beta-cariofileno possui destaque dentre estes canabinoides exógenos por ser um agonista de receptores CB2 e também por atuar na via de recompensa. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar as ações do beta-cariofileno sobre as propriedades reforçadoras e motivacionais induzidas por alimento palatável em camundongos, investigando, ainda, se os efeitos foram mediados pela ativação dos receptores CB2. Neste estudo, camundongos da linhagem Swiss (machos e fêmeas) foram utilizados para: i) padronizar o protocolo de preferência condicionado por lugar (PCL) induzida pela recompensa palatável; ii) avaliar o efeito *per se* do beta-cariofileno no protocolo de PCL; iii) avaliar o efeito do beta-cariofileno sobre a expressão da PCL induzida por recompensa palatável; iv) e avaliar se os efeitos do beta-cariofileno nos protocolos de PCL e *runway* são mediados pela ativação dos receptores CB2. Através da aplicação desses protocolos foi observado que o beta-cariofileno reverteu a PCL induzida por recompensa alimentar e reduziu o comportamento motivado no teste de *runway*. O antagonismo do receptor CB2 pelo AM630 bloqueou as propriedades reforçadoras e motivacionais do beta-cariofileno na PCL e *runway* e o agonismo do receptor CB2 pelo JWH133 mimetizou os efeitos do beta-cariofileno. Isto demonstra que a farmacodinâmica do composto pode se dar pela ativação de receptores CB2. Assim, conclui-se que o beta-cariofileno inibe as propriedades reforçadoras e motivacionais induzidas por alimento palatável em camundongos fêmeas através da ativação dos receptores CB2.

Palavras-chave: Recompensa alimentar. Sistema endocanabinoide. Receptores canabinoides do tipo CB2. Beta-cariofileno. Motivação.

ABSTRACT

Eating disorders have a strong relationship with dysregulation of the reward pathway and increased motivational salience for food. These disorders lead to consequential damage to physical and psychosocial health. The endocannabinoid system is involved in specific processes of memory, motivation, and reward-induced reinforcement, and its modulation, through exogenous cannabinoids, may play a vital role in treating these disorders. Beta-caryophyllene stands out among these exogenous cannabinoids for being an agonist of CB2 receptors and acting in the reward pathway. Thus, this study aimed to evaluate the actions of beta-caryophyllene on the reinforcing and motivational properties induced by palatable food in mice, also investigating whether the activation of CB2 receptors mediated the effects. In this study, Swiss mice (male and female) were used for: i) standardize the Conditioned Place Preference (CCP) protocol induced by the palatable reward; ii) evaluate the per se effects of beta-caryophyllene in the CCP protocol; iii) evaluate the effects of beta-caryophyllene on CCP expression induced by palatable reward; iv) and assess whether the activation of CB2 receptors mediates the effects of beta-caryophyllene in CCP and runway protocols. It was observed that beta-caryophyllene reversed the CPP induced by food reward and reduced the motivated behavior in the runway test. CB2 receptor antagonism by AM630 blocked the reinforcing and motivational properties of beta-caryophyllene in CCP and runway, and CB2 receptor agonism by JWH133 mimicked the effects of beta-caryophyllene. The present results demonstrate that the compound's pharmacodynamics can occur through the activation of CB2 receptors. Thus, beta-caryophyllene inhibits the reinforcing and motivational properties induced by palatable food in female mice through the activation of CB2 receptors.

Keywords: Food reward. Endocannabinoid system. Beta-caryophyllene. CB2 cannabinoid receptors. Motivation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 COMPORTAMENTO ALIMENTAR E TRANSTORNOS DA ALIMENTAÇÃO	17
1.2 COMPORTAMENTO ALIMENTAR INDUZIDO POR RECOMPENSA	19
1.3 PAPEL DA DOPAMINA NA REGULAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR	25
1.4 INTERAÇÃO DA DOPAMINA COM OS HORMÔNIOS LEPTINA E GRELINA NA REGULAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR	29
1.5 SISTEMA ENDOCANABINOIDE	32
1.6 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E RECOMPENSA ALIMENTAR	35
1.7 BETA-CARIOFILENO E RECOMPENSA ALIMENTAR	39
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 ANIMAIS	44
4.2 DROGAS E REAGENTES	44
4.3 PROTOCOLO DE JEJUM E HABITUAÇÃO À RECOMPENSA PALATÁVEL DOCE	45
4.4 PROTOCOLO DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LOCAL	45
4.5 PROTOCOLO DO <i>RUNWAY</i>	48
4.6 DELINIAMENTO EXPERIMENTAL	51
4.6.1 Padronização da PCL induzida recompensa palatável em camundongos Swiss machos e fêmeas sob jejum	51
4.6.3 Avaliar os efeitos do beta-cariofileno sobre a expressão da PCL induzida por recompensa palatável em camundongos fêmeas sob jejum	53

4.6.4 Investigar os efeitos dos agonistas seletivos dos receptores canabinoides CB2, beta-cariofileno e JWH133, sobre a saliência motivacional para obter a recompensa em animais sob jejum treinados na tarefa do <i>runway</i>	53
4.6.5 Avaliar se os efeitos do beta-cariofileno sobre a saliência motivacional para obter a recompensa em animais sob jejum treinados na tarefa do <i>runway</i> são mediados pela ativação dos receptores canabinoides CB2.	53
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS	55
5.1 PADRONIZAÇÃO DA PCL INDUZIDA PELA RECOMPENSA PALATÁVEL EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS E FÊMEAS.	55
5.2 ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE BETA-CARIOFILENO APARENTEMENTE NÃO INDUZ EFEITOS REFORÇADORES <i>PER SE</i> EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SOB JEJUM NA TAREFA DE PCL.....	57
5.3 OS AGONISTAS SELETIVOS DOS RECEPTORES CB2, BETA-CARIOFILENO E JWH133, SUPRIMEM A SALIÊNCIA MOTIVACIONAL PARA OBTER A RECOMPENSA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SOB JEJUM TREINADAS NA TAREFA DO <i>RUNWAY</i>	61
5.4 O BETA-CARIOFILENO ATENUA A EXPRESSÃO DA PCL INDUZIDA POR RECOMPENSA PALATÁVEL EM ANIMAIS SOB JEJUM	58
5.5 O PRÉ-TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DOS RECEPTORES CANABINOIDES CB2 PREVINE OS EFEITOS DO BETA-CARIOFILENO SOBRE O DESEMPENHO DOS ANIMAIS NA TAREFA DE <i>RUNWAY</i>	68
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICES	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de representação esquemática do controle do comportamento alimentar.....	20
Figura 2 – Diagrama de representação esquemática do mecanismo homeostático no controle do comportamento alimentar.	22
Figura 3 – Expressões hedônicas positivas (“gostar”) induzidas em resposta a soluções de sacarose.....	24
Figura 4 – Representação esquemática do sistema endocanabinoide.	35
Figura 5 – Diagrama apresentando como a ativação dos receptores canabinoides modulam o sistema dopaminérgico mesolímbico.....	38
Figura 6 – Estruturas químicas dos sesquiterpenos bicíclicos (E)-beta-cariofileno, (Z) - beta-cariofileno, óxido de cariofileno e o isômero de anel aberto alfa humuleno (alfa-cariofileno).....	39
Figura 7 – Esquema ilustrativo do protocolo de preferência condicionada ao lugar induzida por recompensa palatável.....	48
Figura 8 – Esquema ilustrativo do protocolo <i>runway</i>	50
Figura 9 – Esquema ilustrativo da sequência de apresentação dos blocos experimentais.	51
Figura 10 – Desenvolvimento de PCL induzida por recompensa palatável em camundongos machos e fêmeas.....	56
Figura 11 - O beta-cariofileno <i>per se</i> não induz o desenvolvimento de PCL em camundongos fêmeas.	58
Figura 12 – Efeito do beta-cariofileno sobre a expressão da PCL induzida por recompensa palatável em animais sob jejum.....	60
Figura 13 – Efeitos do beta-cariofileno sobre o incentivo à saliência motivacional para comer a recompensa em camundongos fêmeas sob jejum treinadas na tarefa do <i>runway</i>	64
Figura 14 – Peso corporal dos animais na avaliação do beta-cariofileno sobre o incentivo à saliência motivacional para comer a recompensa em camundongos fêmeas sob jejum treinadas na tarefa do <i>runway</i>	65

Figura 15 – Efeitos do agonista seletivo CB2, JWH133, sobre o incentivo à saliência motivacional para comer a recompensa em camundongos fêmeas sob jejum treinadas na tarefa do <i>runway</i>	67
Figura 16 – O pré-tratamento com o antagonista dos receptores canabinoides CB2, AM630, previne os efeitos do beta-cariofileno sobre a motivação e aprendizagem durante fase de desempenho após treinamento dos animais na tarefa do <i>runway</i>	70

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Características de transtornos alimentares de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais..... 18
- Quadro 2** – O quadro abaixo apresenta a média do tempo gasto com as “distrações” durante os três dias de tratamento farmacológico na tarefa do *runway*. 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG – Araquidonoilglicerol.

AgRP – Proteína relacionada à *Agouti*.

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico.

Anandamida – Aracdonoil etanolamida.

ANOVA – Análise de variância.

ATV – Área tegmental ventral.

BCF – Beta-cariofileno.

CB – Canabinoides.

CCK – Colecistocinina.

CEUA-UFSC - Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Santa Catarina da UFSC.

COX – Cicloxigenases.

DL50 – Dose letal oral aguda.

DSM-5 – Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, quinta edição.

eCB – Endocanabinoide.

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos.

EPM – Erro padrão da média.

ERK – quinase regulada por sinal extracelular

FDA – *Food and Drug Administration*.

GABA – Ácido gama-aminobutírico.

GHSR – Receptores de grelina.

GLP-1 – Peptídeo semelhante ao glucagon 1.

LepR – Receptores de Leptina.

LOX – Lipoxigenase.

NAc – Núcleo *accumbens*.

NAH – Núcleo arqueado hipotalâmico.

NPV – núcleo paraventricular hipotalâmico.

NPY – neuropeptídeo Y.

OXM – oxintomodulina.

PCL – Preferência condicionada por lugar.

POMC – Pró-opiomelanocortina.

PPAR – Receptor ativado por proliferador de peroxissoma.

PsicowLab – *Neuroscience Coworking Lab*.

PYY – Peptídeo YY.

SNC – Sistema nervoso central.

THC – Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

TRPV1 – Receptor potencial transitório de vaniloide tipo-1.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho tem como ponto de partida a modulação de um comportamento motivado, a fome¹. Provavelmente a fome é um dos impulsos motivacionais mais fortes e ancestrais, que pode interagir com outros impulsos motivacionais, incluindo interações sociais, ansiedade, medo e sono. A fome é um fator importante na regulação da ingestão alimentar (JENNINGS et al., 2019; BURNETT et al., 2016; KEENE et al., 2010).

A ingestão de alimentos também é regulada por vias de recompensa que processam informações sobre o aspecto prazeroso (hedônico) e sobre o incentivo (motivacional) da ingestão alimentar. Os circuitos homeostáticos e de recompensa que participam do controle da ingestão de alimentos estão inter-relacionados: O famoso ditado “a fome é o melhor tempero” assume que todos os alimentos têm um valor gratificante, que é influenciado pela fome e pela disponibilidade de alimentos. De uma perspectiva evolutiva, a recompensa alimentar tem um papel duplo: (i) promover a busca e a ingestão de alimentos quando a comida é escassa e, (ii) promover a ingestão excessiva de alimentos quando eles estão disponíveis, com o objetivo de estabelecer estoques de energia suficientes. Se o alimento for gratificante, isso motivará os animais a sair para o meio ambiente em busca dele, garantindo não apenas um suprimento adequado de calorias, mas também que os alimentos consumidos sejam de composição nutricional diversa. Em termos evolutivos, tais características costumavam ser vantajosas, pois garantiam com que os alimentos fossem consumidos quando disponíveis, permitindo que a energia fosse armazenada no corpo, para futuras necessidades em ambientes onde as fontes de alimentos eram escassas e/ou não confiáveis. No entanto, nas sociedades modernas, onde a comida é amplamente disponível, essa adaptação pode se tornar um problema (ZHENG *et al.*, 2009), uma vez que o consumo excessivo está relacionado ao desenvolvimento de doenças, como a obesidade, diabetes, hipertensão, dislipidemias, entre outras (HUME; JACHS; MENZIES, 2016; YU, 2017).

¹ A fome pertence às necessidades fisiológicas e representa um déficit de energia que motiva a ingestão de alimentos: a principal fonte de energia do corpo humano (GÓMEZ-MARTÍNEZ et al., 2021).

O comportamento alimentar é caracterizado por um conjunto de ações associadas ao ato de comer, desde a escolha do alimento até a sua ingestão. A resposta repetida do indivíduo frente ao alimento define o conceito de hábito alimentar. Desse modo, comportamento e hábito alimentar são conceitos interligados, complementares e essenciais para o êxito nos tratamentos, intervenções, ou ações preventivas em indivíduos que apresentam distúrbios alimentares (VAZ e BENNEMANN, 2014).

1.1 COMPORTAMENTO ALIMENTAR E TRANSTORNOS DA ALIMENTAÇÃO

Alterações persistentes na alimentação e no comportamento alimentar são entendidos como transtornos alimentares, os quais podem causar prejuízos na saúde física e/ou psicossocial do indivíduo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). O aumento nas taxas de transtornos alimentares em todo o mundo levou a um aumento na atenção aos fatores que afetam o comportamento alimentar (RIBEIRO *et al.*, 2018; COCCURELLO E MACCARRONE, 2018; BADO *et al.*, 2019). Os transtornos alimentares afetam principalmente indivíduos do sexo feminino, tem início na adolescência, sendo que cerca de uma em cada dez adolescentes são acometidas por essas doenças (MICALI *et al.*, 2015; XIMENES *et al.*, 2010; CASTRO; BRANDÃO, 2018; NAPOLITANO *et al.*, 2019). Em relação ao grupo mais vulnerável, 13% são marcadas por angústias, comprometimento funcional, aumento do risco de obesidade futura, depressão, suicídio, abuso de substâncias e mortalidade que são alguns dos fatores de risco associados aos transtornos alimentares (STICE, *et al.*, 2019).

Em decorrência da ingestão alimentar excessiva ou restrição alimentar, os indivíduos podem desenvolver diferentes subtipos de transtornos. O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) classifica 8 subtipos de transtornos alimentares, como pode ser observado no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Características de transtornos alimentares de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais.

Transtorno alimentar	Características
Transtorno de Compulsão Alimentar	Episódios recorrentes do consumo, em um tempo determinado, de uma quantidade de alimento maior do que a maioria das pessoas consumiria em um mesmo período e sob condições análogas.
Transtorno Alimentar Restritivo Evitativo	Esquiva ou restrição do consumo dos alimentos, causando um insucesso considerável em atender as demandas de nutrição, ou ingestão energética insuficiente pelo indivíduo.
Anorexia Nervosa	Restrição contínua da ingestão calórica, medo acentuado de ganhar peso ou engordar, e perturbação na percepção do próprio peso ou da própria forma.
Bulimia Nervosa	Associação de três características essenciais: (i) os episódios regulares de compulsão alimentar, (ii) comportamentos compensatórios inapropriados de maneira recorrente para impossibilitar o ganho de peso e (iii) autoavaliação indevidamente influenciada pela forma e peso corporal.
Transtorno de Ruminação	Regurgitação repetida de alimento de maneira constante.
Pica ou Alotriofagia	Ingestão persistente de substâncias não nutritivas e não alimentares, sendo esta ingestão inadequada ao estágio de desenvolvimento do indivíduo (por exemplo: gelo, farinha, terra, cabelo e giz).
Outro Transtorno Alimentar Especificado	Inclui os seguintes diagnósticos: (i) anorexia nervosa atípica, onde todos os critérios para anorexia nervosa são preenchidos, exceto que, apesar da perda de peso significativa, o peso do indivíduo está dentro ou acima da faixa normal. (ii) bulimia nervosa (de baixa frequência e/ou duração limitada), aqui todos os critérios para bulimia nervosa são atendidos, exceto que a compulsão alimentar e comportamentos compensatórios indevidos ocorrem, em média, menos de uma vez por semana e/ou por menos de três meses. (iii) transtorno de compulsão alimentar (de baixa frequência e/ou duração limitada), sendo todos os critérios para transtorno de compulsão alimentar preenchidos, exceto que a hiperfagia ocorre, em média, menos de uma vez por semana e/ou por menos de três meses. (iv) transtorno de purgação, onde há comportamento de purgação recorrente para influenciar o peso ou a forma do corpo (por exemplo vômitos autoinduzidos; uso indevido de laxantes, diuréticos ou outros medicamentos) na ausência de compulsão alimentar. (v) síndrome do comer noturno, nela há episódios recorrentes de ingestão noturna, manifestados pela ingestão ao despertar do sono noturno ou pelo consumo excessivo de alimentos depois de uma refeição noturna.
Transtorno Alimentar Não Especificado	São transtornos subclínicos que não apresentam todos os critérios diagnósticos.

Fonte: Adaptado de American Psychiatric Association (2014).

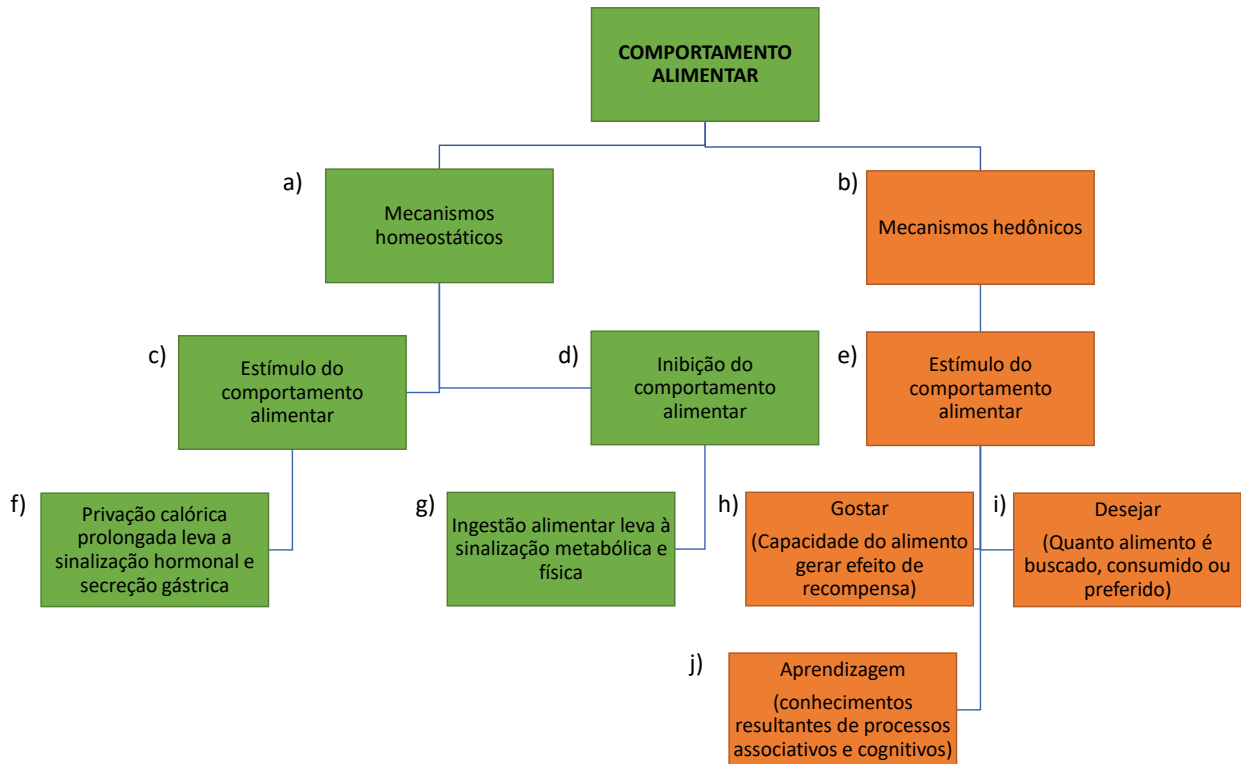
Os transtornos sumarizados no **Quadro 1**, particularmente aqueles que envolvem a ingestão alimentar excessiva, possuem uma forte relação com a desregulação da via

de recompensa cerebral e com aumento da saliência motivacional por comida (SEGURA-SERRALTA *et al.*, 2019; BLUME; SCHMIDT e HILBERT, 2019). Além disso, evidências sugerem que uma disfunção no sistema mesocorticolímbico, que representa a principal via neural que impulsiona a alimentação hedônica, pode ser um dos principais mecanismos que contribuem ao desenvolvimento de distúrbios alimentares que envolvem o comer descontrolado e compulsivo. Por exemplo, indivíduos com transtorno de compulsão alimentar apresentam maior sensibilidade à recompensa alimentar (SCHIENLE *et al.*, 2009; GELIEBTER *et al.*, 2016; SIMON *et al.*, 2016).

1.2 COMPORTAMENTO ALIMENTAR INDUZIDO POR RECOMPENSA

A regulação do comportamento alimentar envolve uma complexa interação do sistema nervoso central (SNC) com componentes periféricos (SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). Conforme observado na **Figura 1**, podem ser identificados didaticamente dois níveis de controle, um homeostático (**Figura 1a**) e outro hedônico (**Figura 1b**) (BERTHOUD; MÜNZBERG; MORRISON, 2017; HUME; JACHS; MENZIES, 2016; STOJAKOVIC *et al.*, 2017).

Figura 1 – Diagrama de representação esquemática do controle do comportamento alimentar.

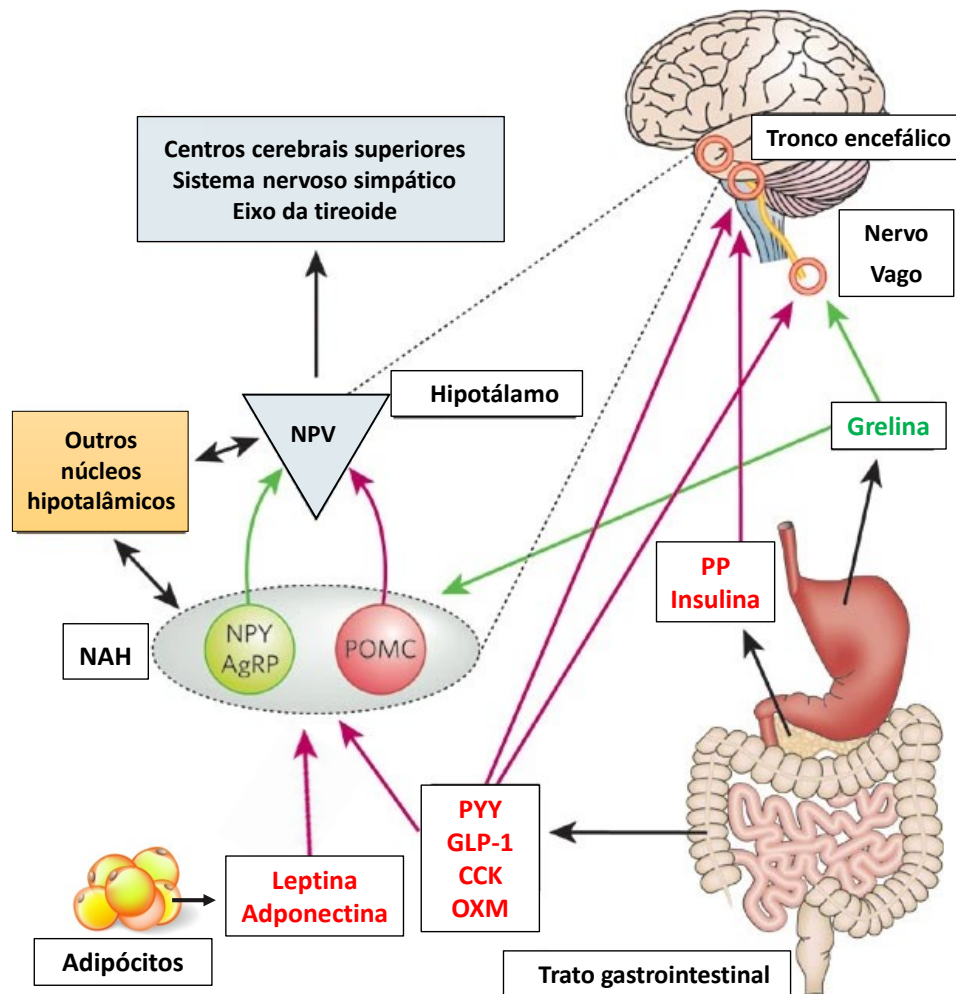


Fonte: Berthoud, Münzberg e Morrison (2017); Hume, Jachs e Menzies (2016); Stojakovic *et al.* (2017); Espel-Huynh, Muratore e Lowe (2018); Stopyra *et al.* (2021); Liu e Kanoski (2018); Reynaert *et al.* (2016); Lenoir *et al.* (2007); Madsen e Ahmed (2015); Small, Jones-Gotman e Daghera (2003) e Volkow *et al.* (2003).

Os mecanismos homeostáticos, a partir da privação calórica prolongada, impulsionam uma série complexa de processos fisiológicos, como a sinalização hormonal e a secreção gástrica de grelina (produzida principalmente pelas células épsilon do estômago quando o estômago está vazio), que estimulam o comportamento alimentar (**Figura 1c**) (ESPEL-HUYNH; MURATORE; LOWE, 2018). Por outro lado, os processos fisiológicos pós-prandiais, como mudanças nos sinais físicos de distensão gástrica e intestinal, bem como a sinalização metabólica via hormônios peptídicos do trato gastrointestinal, inibem o comportamento alimentar (**Figura 1d**) (STOPYRA *et al.*, 2021). A **Figura 2** representa o mecanismo homeostático no controle do comportamento alimentar. Nela, podemos observar que os peptídeos reguladores do apetite, incluindo a grelina, são capazes de promover a fome e evocar o comportamento alimentar.

Enquanto, a leptina, a adiponectina (produzidas principalmente pelo pelos adipócitos) e a insulina (produzida nas células beta das ilhotas de Langerhans, do pâncreas endócrino) sinalizam saciedade. Esses sinais fazem interface com os circuitos de recompensa por meio do hipotálamo lateral e por meio de receptores específicos localizados na área tegmental ventral (ATV). Acredita-se que núcleo arqueado hipotalâmico seja importante na integração de sinais de homeostase de energia circulante periférica. Neurônios dessa região que expressam neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado à agouti (AgRP) sinalizam para aumentar o apetite, e neurônios pró-opiomelanocortina (POMC), que expressam melanocortina, sinalizam para reduzir o apetite. O núcleo paraventricular hipotalâmico (NPH) é considerado um alvo crítico desses neurônios núcleo arqueado hipotalâmico. O NPH sinaliza para os centros cerebrais superiores e o sistema nervoso simpático, e regula o eixo da tireoide (e.g., secreção de hormônio estimulante da tireoide e hormônio adrenocorticotrófico). Os neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico também se projetam para outros núcleos hipotalâmicos que sinalizam, por sua vez, para o núcleo arqueado hipotalâmico e o NPH para modular sua atividade (REICHELT; WESTBROOK; MORRIS, 2015; MURPHY; BLOOM, 2006).

Figura 2 – Diagrama de representação esquemática do mecanismo homeostático no controle do comportamento alimentar.



Legenda: Setas verdes indicam sinais orexígenos e setas vermelhas indicam sinais anorexígenos. NPV: núcleo paraventricular hipotalâmico, NAH: Núcleo arqueado hipotalâmico, NPY: neuropeptídeo Y, AgRP: Proteína relacionada à Agouti, POMC: Pró-opiomelanocortina, PYY - Peptídeo YY, GLP-1: Peptídeo semelhante a glucagon 1, CCK: Colecistocinina e OXM: oxintomodulina. Após uma refeição o PYY, GLP-1, CCK e OXM são liberados das células L do intestino. Eles podem estimular diretamente as vias anorexígenas no hipotálamo e no tronco cerebral, e também podem atuar através do nervo vago. Após uma refeição o pâncreas libera insulina e PP o que pode reduzir o apetite ao sinalizar diretamente para os neurônios no tronco cerebral. A grelina é liberada do estômago em jejum e pode estimular a ingestão de alimentos através da sinalização direta para o hipotálamo ou através do nervo vago. O Núcleo arqueado hipotalâmico é importante na integração dos sinais da homeostase da energia do hormônio intestinal. Os neurônios NPY / AgRP e os neurônios POMC sinalizam para o núcleo paraventricular hipotalâmico e outros núcleos hipotalâmicos para aumentar ou diminuir o apetite, respectivamente. Fonte: Adaptado de Murphy e Bloom (2006).

Os mecanismos homeostáticos envolvem o controle do balanço energético em resposta ao balanço energético geral ou outros tipos de necessidade metabólica. Já os mecanismos hedônicos, regulam a ingestão alimentar com base no valor de recompensa do alimento. Esse mecanismo envolve aprendizado, memória e processos cognitivos, que podem afetar a alimentação com base em experiências aprendidas e aspectos hedônicos dos alimentos palatáveis – aqueles com alta densidade energética, ricos em carboidratos simples, gorduras saturadas e sal – (**Figura 1h-j**) (LIU; KANOSKI, 2018). Esses alimentos palatáveis agem como recompensas potentes, promovendo seu consumo (mesmo na ausência de um requisito energético), através do desencadeamento de associações aprendidas entre o estímulo e a recompensa estabelecidas através de condicionamento pavloviano² (**Figura 1j**) (REYNAERT *et al.*, 2016; LENOIR *et al.*, 2007; MADSEN; AHMED, 2015).

Nesse sentido, os mecanismos hedônicos são extremamente relevantes para o consumo excessivo de alimentos palatáveis, pois estimulam o comer compulsivo e/ou a preocupação com a comida em indivíduos que já se encontram saciados, podendo sobrepor-se à regulação homeostática (**Figura 1a**) e induzir consumo não pela necessidade nutricional (BERTHOUD; MÜNZBERG; MORRISON, 2017).

No mundo moderno, os seres humanos, geralmente, ingerem alimentos na ausência de uma retroalimentação metabólica que indique uma diminuição das reservas energéticas (VOLKOW *et al.*, 2008). Esse padrão alimentar hedônico envolve percepções psicofisiológicas de recompensa alimentar. Os componentes psicológicos da recompensa envolvem (i) a aprendizagem (**Figura 1j**), que inclui conhecimentos resultantes de processos associativos e cognitivos; (ii) a emoção ou “gostar” (**Figura 1h**), que reflete a experiência imediata ou a vontade de experimentar a sensação de “prazer”, ou seja, o valor hedônico de consumir um alimento; e (iii) a motivação para comer ou “desejar” comer o alimento (**Figura 1i**) (SMALL; JONES-GOTMAN; DAGHERA, 2003; VOLKOW *et al.*, 2003).

Neste contexto, Berridge e colaboradores (2008), descreveram três aspectos da recompensa: gostar (“*liking*”), desejar (“*wanting*”) e a aprendizagem dirigida ao estímulo

² O processo pelo qual a experiência com uma relação condicional concede a capacidade de promover padrões de comportamento adaptativos que não ocorreram antes da experiência (FANSELOW; WASSUM, 2015).

reforçador (**Figuras 2h-j**). Apesar de estarem intimamente ligados, estes aspectos podem ser dissociáveis. De modo que gostar e desejar refletem, respectivamente, o caráter hedônico e a motivação para obter uma recompensa, enquanto o processo de aprendizagem compreende as associações e previsões sobre recompensas adquiridas através da experiência.

No âmbito da pesquisa experimental, o "desejar" é normalmente medido em humanos por classificações subjetivas de desejo. Em animais, este componente é inferido por medidas que refletem o quanto o alimento é buscado, consumido ou preferido (**Figura 1i**). Já o "gostar" refere-se ao impacto hedônico "prazeroso" induzido pelas recompensas, que vêm à tona na consciência, e são medidas através de critérios subjetivos de sensação de prazer em humanos adultos. Por outro lado, em animais e bebês humanos, o "gostar" pode ser avaliado por meio das expressões orofaciais hedônicas induzidas por estímulos palatáveis (**Figura 1h**) (MORALES e BERRIDGE, 2020). Essas expressões podem ser observadas na **Figura 3**.

Figura 3 – Expressões hedônicas positivas ("gostar") induzidas em resposta a soluções de sacarose.



Fonte: Morales e Berridge (2020).

Componentes emocionais e motivacionais das recompensas alimentares podem existir objetivamente, sem que haja consciência deles. Portanto, eles podem estar implícitos, o que assume particular importância, uma vez que os indivíduos podem reagir à estímulo recompensador, sem que haja consciência do estímulo ou da resposta hedônica a ele (SMALL; JONES-GOTMAN; DAGHERA, 2003).

Os componentes do controle hedônico da ingestão alimentar são traduzidos e integrados através da via mesocorticolímbica, formada pelo núcleo *accumbens* (NAc), estriado ventral, ATV, córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (BERTHOUD, 2012). O caminho percorrido pela informação palatável é mais complexo, pois depende do valor nutricional e sensorial do alimento. As informações alimentares que estimulam os receptores sensoriais serão processadas em diferentes regiões encefálicas. O local desse processamento dependerá do tipo de sentido, podendo ocorrer no córtex temporal (visão), no bulbo olfatório (olfato), no tálamo (textura) e no núcleo do trato solitário (paladar). Em seguida, as informações sensoriais se projetam para a ATV e NAc (ROLLS, 2006). A amígdala transforma as informações recebidas dessas regiões em estímulos hedônicos, enquanto o hipocampo registra a experiência (KELLEY; BERRIDGE, 2002). Dessa forma, o NAc, a ATV, o hipotálamo lateral, a amígdala, e o córtex pré-frontal são regiões cerebrais envolvidas no controle hedônico (SIMON *et al.*, 2017). Além de hormônios e outras substâncias mediadoras, diversos sistemas de neurotransmissores estão envolvidos com o controle hedônico do comportamento alimentar, tais como o sistema dopaminérgico, sistema opioide, e sistema endocanabinoide (eCB) (KONSTANTAKOPOULOS, 2018; BERRIDGE, 2009).

1.3 PAPEL DA DOPAMINA NA REGULAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O circuito de recompensa cerebral é constituído por neurônios, principalmente dopaminérgicos, com corpos celulares localizados na ATV no mesencéfalo, projetando seus axônios para o NAc, tubérculo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (JORDAN; XI, 2019). Vale ressaltar que a ATV é uma área heterogênea que contém neurônios dopaminérgicos (cerca de 60%), GABAérgicos, (cerca de 30%) e glutamatérgicos (cerca de 10%) (MARGOLIS *et al.*, 2006; NAIR-ROBERTS *et al.*, 2008; YAMAGUCHI *et al.*, 2011). Os neurônios dopaminérgicos da ATV, geralmente, apresentam três modos de disparo. Os neurônios podem ser silenciosos, tonicamente ativos, e disparar em rajadas. Quando estão tonicamente ativos, normalmente, disparam potenciais de ação em baixas frequências. Em comparação com outros neurotransmissores, como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA), os níveis de dopamina permanecem elevados por mais tempo, permitindo efeitos trans sinápticos

generalizados (FIELDS *et al.*, 2007). As funções fisiológicas desempenhadas pela ATV envolvem a liberação de dopamina e subsequente ligação aos receptores dopaminérgicos nas áreas-alvo, tais como o NAc. O sistema dopaminérgico participa de diversos processos fisiológicos além da recompensa, tais como emoção, cognição, memória, controle do movimento voluntário, entre outros (BERRIDGE *et al.*, 2016; WALKER *et al.*, 2017; GARDANEH, 2010). A ação da dopamina na via de recompensa cerebral, leva à sensação de prazer e, através de conexões entre este circuito e estruturas relacionadas à formação de memórias, desenvolvem-se respostas reforçadoras e formação de hábitos (TOMAZI *et al.*, 2017). As propriedades reforçadoras de diferentes substâncias, ou estímulos, estão relacionadas com uma ação direta ou indireta no sistema dopaminérgico (VOLKOW; WISE; BALER, 2017). O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico é crucial para o desenvolvimento de comportamentos de busca por sugestões (dicas/pistas) associadas à recompensa que as predizem. Essas associações são adquiridas através do pareamento de dicas/pistas ao estímulo recompensador através do condicionamento Pavloviano. No contexto do comportamento alimentar, é importante que os animais sejam capazes de avaliar o valor nutricional dos alimentos quando encontram pistas relacionadas, como o cheiro ou a visão de determinado alimento. Com o tempo, as pistas específicas elicitam respostas antecipatórias condicionadas que são associadas à recompensa que as pistas preveem. Os neurônios dopaminérgicos apresentam disparos em rajadas durante a exposição de recompensas inesperadas, como comida, e essa taxa de disparos é maior para recompensas maiores (TOBLER; FIORILLO; SCHULTZ, 2005). Quando uma pista ou dica é associada a uma recompensa em várias sessões de exposição (pareamento), os animais aprendem que a sugestão prediz a recompensa e os disparos em rajada dos neurônios dopaminérgicos mudam para o início da exposição (SCHULTZ, 2010; WAELTI; DICKINSON; SCHULTZ, 2001). Nesse contexto, neurônios dopaminérgicos codificam um “erro de predição/previsão de recompensa” que impulsiona o aprendizado. O erro de previsão de recompensa codifica a diferença entre um resultado previsto e o resultado real (SCHULTZ, 2010). Consequentemente, o papel da dopamina na recompensa é mais complexo do que a mera codificação do valor hedônico (WISE, 2006). A exposição repetida à recompensa alimentar leva a uma redução da responsividade dopaminérgica

que, gradualmente, é transferida para as dicas/pistas associados à essa recompensa (por exemplo o cheiro da comida), o qual são, desta forma, processados como preditores de recompensa, tornando-se um estímulo condicionado à recompensa (EPSTEIN; TEMPLE; BOUTON, 2009; SCHULTZ, 2010). É importante ressaltar que quando a sinalização da dopamina no NAc é perturbada, o aprendizado associativo é prejudicado (NICOLA *et al.*, 2005). Além disso, o sistema mesocorticolímbico apresenta uma importância na atenção e na atribuição de valor reforçador e/ou aversivo a estímulos motivacionais, podendo alterar a sinalização dependente da dopamina, assim como da sua força sináptica (COCCURELLO, 2019).

As ações da dopamina são mediadas pela ativação dos receptores dopaminérgicos que são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G, os quais são divididos em 5 subtipos diferentes, didaticamente, subdivididos em duas famílias: do tipo D1 (D1 e D5) e do tipo D2 (D2, D3 e D4). A ativação dos receptores do tipo D1 causa o aumento da produção de AMPc, promovendo a excitabilidade neural. Enquanto, a ativação de D2 reduz a produção de AMPc e, conseqüentemente, reduz a excitabilidade neural (MISHRA; SINGH; SHUKLA, 2018). Os receptores do tipo D1 possuem uma maior densidade de expressão no estriado, NAc, substância negra *pars reticulata* e bulbo olfatório. Os receptores do tipo D2 são expressos, principalmente, no estriado, globo pálido externo (GPe), NAc, amígdala, córtex cerebral, hipocampo e glândula pituitária (MISHRA; SINGH; SHUKLA, 2018). Os neurônios dopaminérgicos contêm diferentes subtipos de receptores de dopamina que apresentam afinidades distintas pela dopamina. Devido à atividade tônica dos neurônios dopaminérgicos da ATV, há um nível basal de dopamina nas áreas-alvo que age, preferencialmente, sobre os receptores D2 de alta afinidade. O disparo em rajadas induz um aumento transitório nos níveis de dopamina, que também promove a ativação de receptores D1 com menor afinidade (GONON, 1997; WIGHTMAN; ROBINSON, 2002). O sistema dopaminérgico tem sido implicado em diversas funções, sendo que os distintos padrões de atividade neuronal contribuem com diferentes aspectos fisiológicos. Por exemplo, a atividade tônica desempenha um papel importante na regulação da função motora. Por outro lado, apesar de ambas as atividades (tanto tônica quanto a fásica) serem importantes para a motivação, a atividade fásica (disparo em rajadas) tem sido associada aos comportamentos dirigidos por recompensa

(SCHULTZ, 2010; YUN *et al.*, 2004). O consumo de alimentos palatáveis pode desencadear uma grande liberação de dopamina de maneira transitória e ativar os receptores do tipo D1. Já os receptores do tipo D2 são sensíveis à níveis tônicos de dopamina, relacionados à liberação basal da mesma (BAIK, 2013).

A regulação do sistema dopaminérgico tem recebido muita atenção nos últimos anos, devido às consequências que sua disfunção pode trazer, como o desenvolvimento de comportamentos aditivos e obesidade relacionada à recompensa alimentar, dois grandes problemas de saúde pública (BAIK, 2013). Ambos, drogas de abuso e alimentos altamente palatáveis estão associadas a características reforçadoras, motivadoras, e até compulsivas, que são codificadas pela neurotransmissão dopaminérgica na via mesocorticolímbica (SALAMONE; CORREA, 2012). O envolvimento da dopamina na recompensa alimentar também tem sido associado à saliência motivacional, ou seja, "desejar" comida em oposição ao "gostar" de comida, um efeito que parece envolver o estriado dorsal e o NAc (BERRIDGE, 2009). Nesse contexto, a sinalização dopaminérgica é considerada essencial no processo de motivação para obter recompensas alimentares, mas não para o consumo real dessas recompensas (SALAMONE *et al.*, 2001; COUSINS; SOKOLOWSKI; SALAMONE, 1993; NOWEND *et al.*, 2001). Projeções dopaminérgicas dos neurônios da substância negra para o corpo estriado dorsolateral também estão envolvidas na regulação do consumo de alimentos. Acredita-se que a antecipação das recompensas alimentares seja mediada por um circuito neural mais amplo que, além do sistema de recompensa cerebral, inclui núcleos hipotalâmicos (WISE, 2006, SCHULTZ, 2010; KING; HENTGES, 2011). Em termos gerais, o sistema mesocorticolímbico tem sido implicado nos efeitos reforçadores de recompensas naturais, como comida ou sexo, e de drogas de abuso, uma vez que esses estímulos aumentam a taxa de disparo de neurônios dopaminérgicos da ATV e a liberação de dopamina em áreas-alvo (SCHULTZ, 2010; ADAMANTIDIS *et al.*, 2011). O disparo em rajadas dos neurônios dopaminérgicos na ATV tem efeito reforçador positivo, uma vez que os animais "autoadministram" ativamente esses padrões de estimulação cerebral (WITTEN *et al.*, 2011). Além disso, a ativação direta desses neurônios aumenta a autoadministração operante de recompensas alimentares (ADAMANTIDIS *et al.*, 2011). Vale ressaltar que animais sob jejum apresentam maior motivação para comer durante a

restrição alimentar (ADAMANTIDIS *et al.*, 2011; CARR, 2007), além de se esforçarem mais para obter alimento com valor energético crescente, e apresentarem mais respostas operantes vigorosas quando são capazes de ganhar mais alimento (WISE, 2006; CARR, 2007). Animais sob restrição alimentar podem apresentar níveis basais de dopamina mais baixos no NAc (POTHOS; CREESE; HOEBEL, 1995), embora essas mudanças nem sempre sejam observadas (STUBER *et al.*, 2002; CADONI *et al.*, 2003). Contudo, a maioria dos estudos mostra um aumento na liberação de dopamina quando os animais recebem comida (VERHAGEN *et al.*, 2009). Por outro lado, o bloqueio farmacológico dos receptores dopaminérgicos, em ratos sob restrição alimentar, diminui o desempenho/esforço para obter comida (ABERMAN; WARD; SALAMONE, 1998). Também, há um aumento da sinalização dopamina quando animais sob restrição alimentar são expostos a dicas relacionadas à comida e uma maior motivação para a obtenção de alimento.

1.4 INTERAÇÃO DA DOPAMINA COM OS HORMÔNIOS LEPTINA E GRELINA NA REGULAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Conforme mencionado, o comportamento alimentar é regulado por diversos circuitos neurais que controlam diferentes aspectos do comportamento alimentar, tais como motivação, saciedade, e recompensa por comida. Esses circuitos neurais estão sob controle regulatório de hormônios periféricos, como a leptina e a grelina, que sinalizam informações sobre o estado metabólico e atuam em neurônios específicos da circuitaria que participa do comportamento alimentar, tais como os neurônios hipotalâmicos. Além da entrada hormonal nessa circuitaria, a leptina e a grelina também atuam no sistema dopaminérgico mesolímbico (via de recompensa), que sinaliza informações específicas relacionadas à recompensa que podem direcionar o comportamento alimentar. Não está claro até que ponto o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico contribui especificamente para os efeitos de ambos os hormônios no comportamento alimentar. Contudo, sabe-se que o sistema de recompensa é influenciado pela ação de ambos os hormônios leptina e grelina. Esses hormônios têm ações diretas sobre a função da ATV, e agem nos núcleos hipotalâmicos que se projetam para a ATV.

A leptina sinaliza informações sobre a adiposidade para o cérebro, facilitando o aumento no gasto de energia e diminuindo a ingestão de alimentos. A leptina exerce suas ações através da ligação ao receptor de leptina (LepR) que consiste num receptor do tipo tirosina quinase. Os receptores LepR são localizados em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, neurônios do neuropeptídeo Y (NPY) / proteína relacionada com Agouti (AgRP) (SCHWARTZ *et al.*, 2000; VAN DEN TOP *et al.*, 2004) e neurônios pró-opiomelanocortina (POMC). Cerca de 75-90% dos neurônios dopaminérgicos da ATV coexpressam receptores LepR (HOMMEL *et al.*, 2006; FULTON *et al.*, 2006; FIGLEWICZ *et al.*, 2003). A infusão aguda de leptina em fatias cerebrais de ATV causa hiperpolarização dos neurônios dopaminérgicos e diminui a frequência de disparos neuronais (HOMMEL *et al.*, 2006). Camundongos com déficit de leptina são obesos, hiperfágicos e têm gasto de energia diminuído. Além disso, eles apresentam níveis reduzidos de dopamina no NAc e expressam menos de tirosina hidroxilase na ATV (FULTON *et al.*, 2006). Ademais, assim como os pacientes obesos (WANG *et al.*, 2001), roedores obesos também apresentam redução na expressão de receptores D2 na ATV (ROSEBERRY *et al.*, 2007), a qual pode ser restaurada pelo tratamento com leptina (PFAFFLY *et al.*, 2010). No geral, esses estudos indicam que a sinalização dopaminérgica na ATV é reduzida em animais com deficiência de leptina. Além disso, a administração de leptina na ATV também reduz a liberação de dopamina no NAc (KRÜGEL *et al.*, 2003). Esse efeito que pode ser decorrente de um efeito inibitório direto da leptina sobre os neurônios dopaminérgicos da ATV (HOMMEL *et al.*, 2006). Similarmente, injeções de leptina no ventrículo cerebral diminuem a motivação para obter recompensa alimentar (FIGLEWICZ *et al.*, 2006). Em conjunto, essas evidências sugerem uma forte relação do sistema dopaminérgico mesolímbico nas ações da leptina sobre a redução da ingestão de alimentos e a recompensa alimentar.

A grelina é um hormônio que facilita a alimentação através da ativação dos receptores de grelina (GHSR) que são acoplados à proteína Gαq estimulatória. Os receptores GHSR são expressos em diferentes áreas do cérebro envolvidas no comportamento alimentar, incluindo hipotálamo (núcleo arqueado, hipotálamo dorsomedial e hipotálamo ventromedial e núcleo paraventricular) e ATV (HORVATH; DIANO; TSCHOP, 2003; MONDAL *et al.*, 2005). No núcleo arqueado, os receptores

GHSR são expressos nos neurônios NPY e AgRP, sendo que a ação da grelina sobre esses receptores estimula o comportamento alimentar aumentando a frequência, mas não o tamanho das refeições (HORVATH; DIANO; TSCHOP, 2003; TSCHÖP; SMILEY; HEIMAN, 2000; DAVIS, 2018). A grelina está envolvida na antecipação das refeições. Os níveis plasmáticos de grelina se correlacionam com a atividade antecipatória que leva à ingestão de alimentos (VERHAGEN *et al.*, 2011; DAVIS, 2018), a qual está diminuída em animais cuja sinalização da grelina é bloqueada farmacologicamente ou em animais nocautes para o receptor GHSR (VERHAGEN *et al.*, 2011; BLUM *et al.*, 2009; DAVIS, 2018). Além disso, os receptores GHSR são colocalizados com a tirosina hidroxilase em cerca de 35-60% dos neurônios dopaminérgicos da ATV (ABIZAID *et al.*, 2006; ZIGMAN *et al.*, 2006; GUAN *et al.*, 1997). Ao contrário do que ocorre com a leptina em fatias de neurônios dopaminérgicos da ATV, a grelina aumenta a taxa de disparos dos neurônios dopaminérgicos. Curiosamente, esse efeito é abolido pelo bloqueio dos receptores de glutamato, mas não pela neurotransmissão GABAérgica (ABIZAID *et al.*, 2006). Isso indica que os efeitos da grelina são mediados por entradas glutamatérgicas pré-sinápticas. A administração sistêmica de grelina aumenta os níveis de dopamina no NAc (QUARTA *et al.*, 2009). Nessa mesma linha de raciocínio, a infusão de grelina na ATV aumenta a autoadministração operante de sacarose, e também aumenta a liberação de dopamina no NAc (JERLHAG *et al.*, 2007). De modo semelhante, a infusão crônica de grelina na ATV aumenta a ingestão de alimentos de maneira dependente da dose. É importante ressaltar que o aumento na ingestão de alimentos por injeção sistêmica de grelina são bloqueados pela injeção local de antagonista da grelina na ATV (KING *et al.*, 2011; HOMMEL *et al.*, 2006). Esses resultados indicam que a ATV medeia, pelo menos parcialmente, o aumento da motivação e do consumo de alimentos induzidos pela grelina. Em animais sob restrição alimentar, a ativação dos receptores GHSR facilitam a atividade antecipatória da alimentação e aumenta a autoadministração de alimentos. Este aumento no desempenho pode ser bloqueado pela injeção de um antagonista de GHSR na ATV (SKIBICKA *et al.*, 2011). A sinalização da grelina na ATV também parece desempenhar um papel no comportamento de escolha do alimento. Quando é dada a escolha entre ração padrão e comida mais palatável, ambos os camundongos nocaute dos receptores GHSR, bem como ratos sistemicamente tratados com um antagonista da grelina,

apresentam uma supressão na ingestão de comida palatável, mas não na ingestão de ração (EGECIOGLU *et al.*, 2010). Concomitantemente, a administração de grelina na ATV aumenta a ingestão de alimentos palatáveis, mas não de ração, durante uma hora de exposição a ambos os tipos de alimento (EGECIOGLU *et al.*, 2010). Além disso, tem sido demonstrada uma desregulação da sinalização da grelina em pacientes magros que sofrem de anorexia nervosa, bem como aqueles com compulsão alimentar periódica, os quais apresentam níveis plasmáticos elevados de grelina (SHIYA *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2003). De modo que, esse perfil de restrição na ingestão de alimentos concomitante ao aumento da sinalização da grelina, sugere que anorexia nervosa pode ser uma condição associada à “resistência às ações da grelina” (MILJIC *et al.*, 2006).

O sistema eCB também participa de forma semelhante à da grelina na regulação do balanço energético e do comportamento alimentar. Vale ressaltar, que os receptores canabinoides (CB) são amplamente distribuídos em regiões cerebrais cruciais para a regulação do comportamento alimentar tais como, hipotálamo, e sistema de recompensa (por vezes, sobrepostos aos receptores de grelina). Evidências experimentais, indicam que o sistema eCB e a grelina interagem mutuamente na regulação da ingestão de alimentos com base em princípios homeostáticos e hedônicos (TING *et al.*, 2015; KOLA *et al.*, 2008).

1.5 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O sistema eCB (**Figura 4**) é peculiar por sua história e aspectos fisiológicos. Estudos fisiológicos e farmacológicos desse sistema foram realizados inicialmente com substâncias extraídas de plantas do gênero *Cannabis sp.* (KANO, 2014). Em 1964, o pesquisador israelense Rafael Mechoulam identificou e caracterizou o composto Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), principal responsável pelos efeitos psicoativos da planta *Cannabis sp.* Sabe-se que as ações induzidas pelo Δ^9 -THC são mediadas pela ativação dos receptores canabinoides (GAONI e MECHOULAM, 1964; MATHEW *et al.*, 2021).

O sistema eCB é constituído pelas enzimas de biossíntese e degradação dos ligantes endógenos (eCB – lipídios originados a partir de ésteres, éteres e amidas de ácidos graxos de cadeia longa polinsaturada). Diversos ligantes endógenos tem sido apontado como eCBs, principalmente, porque compartilham semelhanças estruturais

com os eCBs e interagem com o sistema eCB por vias canônicas ou não (GONÇALVES *et al.*, 2020). Entretanto, os eCB 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e a araquidonoil etanolamida (anandamida) continuam sendo os representantes mais bem caracterizados.

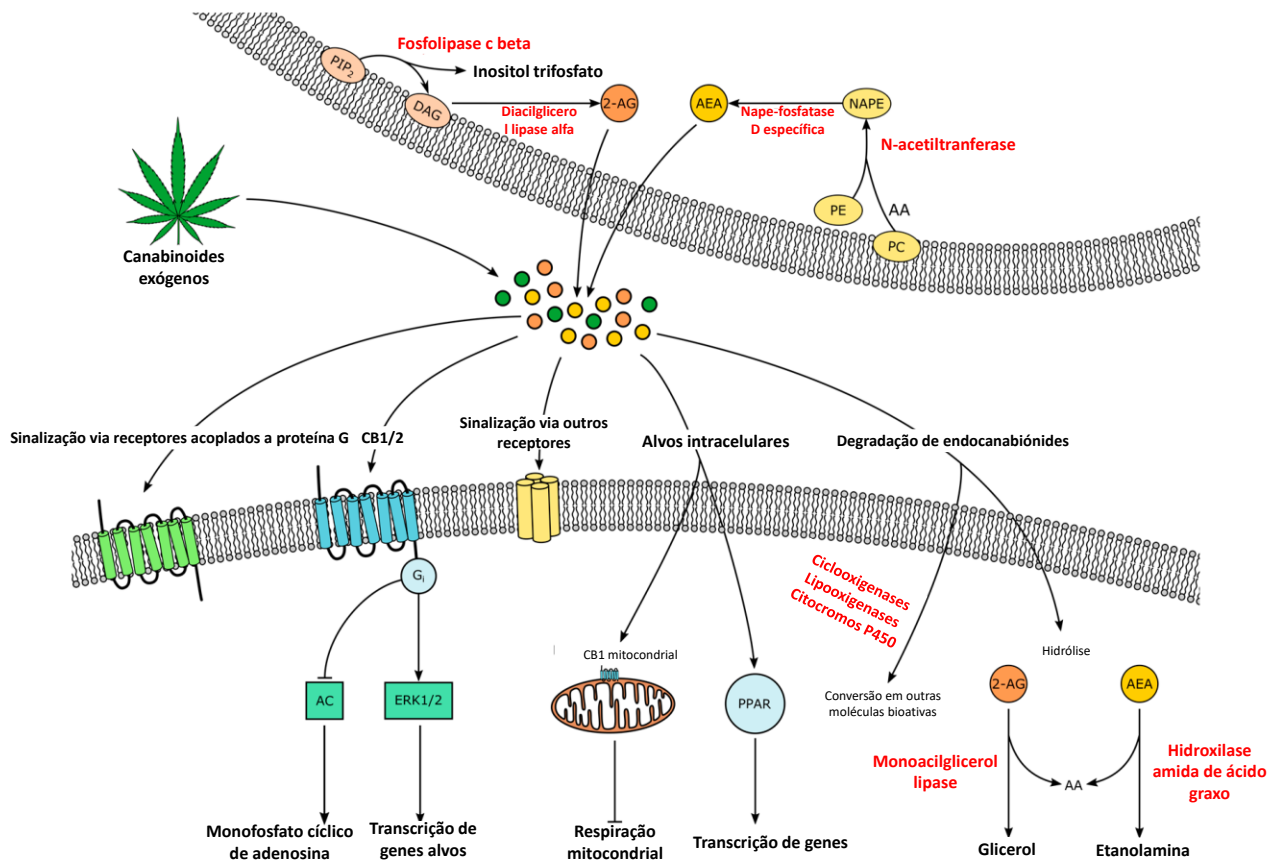
Ambos os receptores do tipo CB1 e CB2 são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G inibitórios, sendo expressos em diversos tecidos. Enquanto os receptores CB1 são mais abundantes no SNC, os receptores CB2 são expressos predominantemente em tecidos periféricos (MACKIE, 2008; BATISTA *et al.*, 2014; GOBIRA *et al.* 2019; STERN *et al.*, 2017). A anandamida e o 2-AG são produzidos sob demanda a partir de fosfolipídios de membrana em terminais neuronais, mediante elevação intracelular de Ca^{2+} , após ativação concomitante dos receptores canabinoides. A anandamida é sintetizada pela ação da fosfolipase-D, enquanto o 2-AG é sintetizado pela diacilglicerol lipase. A anandamida e 2-AG se difundem para a fenda sináptica, e assim como o fitocanabinoide THC e os agonistas canabinoides sintéticos, são capazes de ativar os receptores canabinoides. A anandamida e o 2-AG são recaptadas nas terminações nervosas pré ou pós-sinápticas, possivelmente, através de um transportador especializado, em seguida, são catabolizados por enzimas amida hidrolase de ácido graxo e monoacilglicerol lipase, respectivamente (STERN *et al.*, 2017). De modo simplificado, a anandamida e o 2-AG são liberados de neurônios pós-sinápticos, após despolarização neuronal, e ativam receptores canabinoides pré-sinápticos, atuando como mensageiros retrógrados (produzido no neurônio pós-sináptico para agir em receptores pré-sinápticos e inibir a liberação do neurotransmissor do neurônio pré-sináptico onde ele foi produzido) (HOWLETT *et al.* 2002, PIOMELLI 2003, FITZGERALD, SHOBIN *et al.* 2012). Contudo, os endocanabinoides também podem atuar de maneira autócrina (agindo no próprio neurônio de origem e parácrina (agindo em neurônios e células vizinhas (GODOY-MATOS *et al.*, 2006).

Os receptores CB1 acoplam-se, principalmente, à proteína G_i e G_q , enquanto CB2 acopla-se apenas a G_i . Os receptores CB1 são mais expressos nos axônios e terminais pré-sinápticos de neurônios na amígdala, hipocampo, córtex, tratos de saída dos gânglios da base e cerebelo. Em geral, associados à neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos, onde sua ativação inibe a liberação de GABA e glutamato, respectivamente (SHABAZI, 2020). Por outro lado, os receptores CB2 são expressos,

principalmente, nas células imunes, bem como em tecidos periféricos, incluindo o fígado (MALLAT *et al.*, 2006), tecido adiposo (STAROWICZ *et al.*, 2008; SPOTO *et al.*, 2006; ROCHE *et al.*, 2006) e células das ilhotas pancreáticas que expressam insulina (BERMUDEZ-SILVA *et al.*, 2006), onde destaca-se um possível papel destes receptores na homeostase energética. Além disso, os receptores CB2 também são expressos em regiões encefálicas envolvidas na regulação do apetite (STEMPEL *et al.*, 2016; VAN SICKLE *et al.*, 2005).

De forma geral, a ativação de receptores canabinoides promove a redução da excitabilidade do neurônio e reduz a liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, neuropeptídeos e outros mediadores químicos (HOWLETT *et al.*, 2002). A ativação dos receptores CB1 resulta na supressão da liberação de neurotransmissores. Enquanto, a ativação dos receptores CB2 hiperpolariza a membrana pós-sináptica (ZHANG *et al.*, 2014). Além dos receptores CB1 e do CB2, os eCB podem interagir com outros alvos. Por exemplo, com receptor potencial transitório de vaniloide tipo-1 (TRPV1), um canal iônico localizado em terminais nervosos pós-sinápticos, cuja ativação pelos eCB leva à despolarização (TOTH; BLUMBERG; BOCZAN, 2009). A anandamida, assim como outros ácidos graxos de etanolamidas, oleoiletanolamida e palmitoiletanolamida, interage com receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) – particularmente com o subtipo PPAR- α – um fator de transcrição ativado por ligante que também pode desencadear eventos de sinalização não genômica. Os receptores PPAR estão localizados no núcleo de diferentes tipos celulares na periferia e no SNC e desempenham importante papel na regulação do balanço energético e do comportamento alimentar entre outras funções (SIHAG; JONES, 2018).

Figura 4 – Representação esquemática do sistema endocanabinoide.



Legenda: Os eCBs Anandamida (representado por AEA) e 2-AG são produzidos sob demanda a partir de precursores lipídicos e liberados no meio extracelular. Canabinoides endógenos e exógenos agem através dos mesmos sistemas de sinalização: A ligação aos receptores CB1 ou CB2 acoplados à proteína Gi desencadeia cascatas intracelulares que levam, por exemplo, à inibição da adenilil ciclase (AC) ou à regulação da transcrição através de quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs). Os eCBs também podem interagir com receptores acoplados a proteína GPCR como o TRPV1 e, intracelularmente, CB1 mitocondrial (mtCB1) e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs). A sinalização é terminada por hidrólise, mas eCBs também podem servir como substratos para ciclooxygenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) ou citocromos P450, produzindo outros compostos bioativos. Observe que todos os processos ilustrados não precisam ocorrer em células distintas, pois a sinalização autócrina eCB também foi mostrada.

Fonte: Adaptado de Horn *et al.* (2018).

1.6 SISTEMA ENDOCANABINOIDE E RECOMPENSA ALIMENTAR

O sistema eCB desempenha um papel crucial na homeostasia, regulação do balanço energético (uso e armazenamento de energia) e no controle do apetite (HORN

et al., 2018). Os primeiros indícios foram os estudos demonstrando o aumento dos níveis dos eCB, 2-AG e anandamida dentro do cérebro e da periferia de animais obesos (ALVHEIM *et al.*, 2012, DI MARZO *et al.*, 2001, MATIAS *et al.*, 2006). Da mesma forma, a administração central dos agonistas de receptores canabinoides promovem o consumo excessivo de alimentos, sugerindo que os canabinoides podem ter um papel importante no comportamento alimentar (JAMSHIDI; TAYLOR, 2001, WILLIAMS; KIRKHAM, 1999).

Os eCB (anandamida e 2-AG) estimulam a ingestão de alimentos, particularmente aumentando o consumo de alimentos palatáveis, agindo através da ativação receptores CB1 expressos nas regiões mesocorticolímbicas (LAU *et al.*, 2017). Além dos eCB clássicos, os lipídeos estruturalmente semelhantes aos eCBs, como palmitoiletanolamida e oleoiletanolamida, são considerados ligantes dos receptores PPAR α , também desempenham um papel importante na modulação do comportamento alimentar atuando como mediadores da saciedade (Romano *et al.*, 2015). Distúrbios na sinalização eCB têm sido implicados com transtornos alimentares (SCHERMA *et al.*, 2015). Por exemplo, níveis plasmáticos elevados de anandamida foram encontrados em pessoas com sobrepeso / obesidade e pacientes com transtorno de compulsão alimentar (Monteleone *et al.*, 2005). A maior parte dos estudos acerca do papel do sistema eCB na regulação do apetite é focada nos receptores CB1, uma vez que, compostos que reduzem a atividade dos receptores CB1 como o rimonabanto reduzem o apetite e o peso corporal em roedores magros e obesos induzidos por dieta. Nesse sentido, o rimonabanto foi considerado um agente anti-obesidade promissor. No entanto, em pouquíssimo tempo o rimonabanto foi retirado do mercado devido aos seus efeitos adversos psiquiátricos, os quais incluíam ansiedade, depressão e ideação suicida (DESPRES *et al.*, 2005).

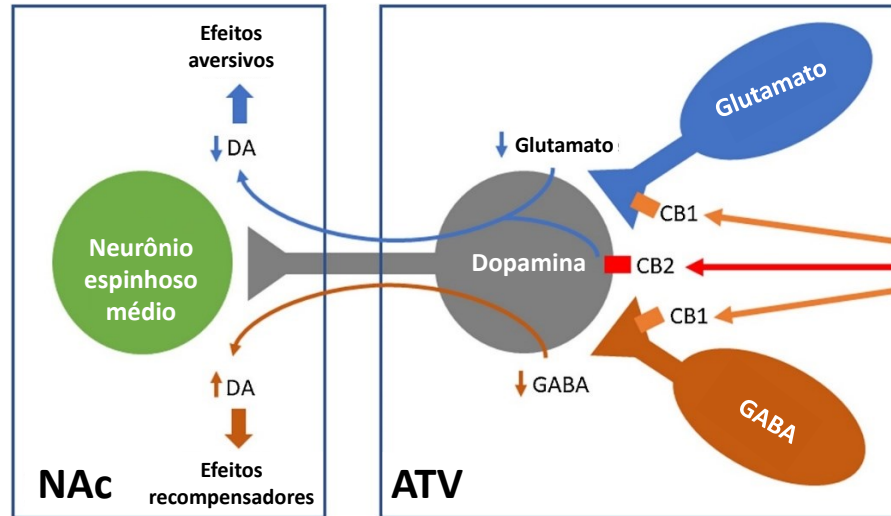
Por outro lado, o bloqueio farmacológico dos receptores CB2 via a injeção intracerebroventricular ou intraperitoneal (i.p.) do antagonista AM630 produz um aumento significativo na ingestão de alimentos em roedores não obesos (GONG *et al.*, 2006; WERNER *et al.*, 2003; ONAIVI *et al.*, 2008). Da mesma forma, a deleção dos receptores CB2 gera um fenótipo obeso relacionado à idade, caracterizado pelo aumento na ingestão de alimentos, peso corporal e hipertrofia do tecido adiposo (AGUDO *et al.*, 2010; ENGELI, 2012). Com relação à homeostase da glicose, a administração aguda do agonista do receptor CB2, JWH-133, melhora a tolerância à glicose em ratos não obesos

(BERMUDEZ-SILVA *et al.*, 2007), o que indica um envolvimento do receptor na melhora do diabetes associado à obesidade.

O sistema eCB desempenha um importante papel regulador da via de recompensa cerebral, através da ativação dos receptores canabinoides que modulam a atividade dos neurônios dopaminérgicos envolvidos nas respostas relacionadas à recompensa (MALDONADO, VALVERDE *et al.* 2006). Atuando diretamente na via de recompensa cerebral ou através da interação com diferentes núcleos hipotalâmicos, os quais podem modular a transmissão sináptica na ATV e NAc (LAU *et al.*, 2017). O bloqueio dos receptores CB1 têm sido amplamente relacionados com a modulação da via de recompensa tanto pela inibição da sinalização GABAérgica, quanto glutamatérgica. As quais culminam com a redução da liberação de dopamina, resultando numa redução do consumo de drogas (álcool, tabaco, cocaína e etc...), bem como reduzindo comportamentos de busca pela droga, os quais podem levar a recaídas frequentes (HORN *et al.*, 2018).

Diferentemente dos receptores CB1, a ativação dos receptores CB2, parece modular negativamente a liberação de dopamina no NAc (**Figura 5**), reduzindo o consumo de drogas de abuso e suprimindo os comportamentos reforçadores, tais como o comportamento de busca pela droga e a fissura, os quais podem levar à recaída (CANSECO-ALBA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2019; ONAIVI *et al.*, 2008; XI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2017, 2014, 2015).

Figura 5 – Diagrama apresentando como a ativação dos receptores canabinoides modulam o sistema dopaminérgico mesolímbico.



Legenda: A ativação dos receptores CB2 pode exercer efeitos na recompensa por modular negativamente os níveis de dopamina no NAc. A dopamina regula as cascatas de sinalização nas células que podem alterar a transcrição de genes e podem desencadear alterações neuroadaptativas e comportamentais nas estruturas cerebrais com alterações na síntese de proteínas.

Fonte: Adaptado de Jordan e Xi (2019).

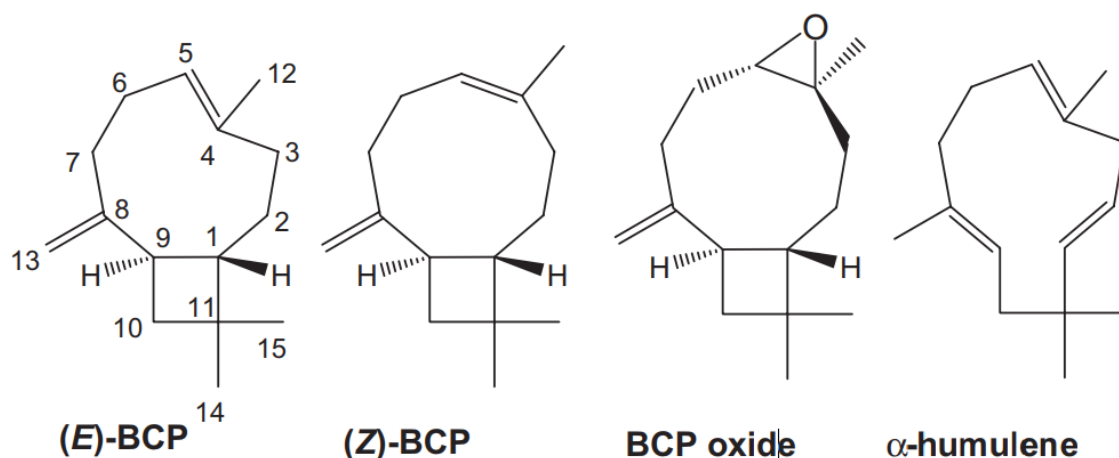
Como alvo terapêutico, os receptores CB2 têm uma vantagem notável sobre os receptores CB1. Os receptores CB1 são os principais responsáveis pelos efeitos psicotrópicos e psicotomiméticos do THC, bem como pelos efeitos adversos psiquiátricos de fármacos como o rimonabanto (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020; ZOU; KUMAR, 2018). O antagonista CB1 (rimonabanto/SR141716A) foi desenvolvido para o tratamento da obesidade, porém devido aos efeitos adversos relacionados ao humor, ele foi prontamente retirado do mercado (ARRONE *et al.*, 2010; PROIETTO *et al.*, 2010; MOREIRA; CRIPPA, 2009). Em contraste, acredita-se que os receptores CB2 são um alvo promissor para a descoberta de novos medicamentos para o tratamento de distúrbios que envolvem uma desregulação da via de recompensa cerebral, tais como distúrbios do comportamento alimentar e dependência de drogas, ao mesmo tempo que evita os graves efeitos colaterais psiquiátricos associados ao CB1 (AN *et al.*, 2020). Os receptores CB2 podem ser ativados pelo beta-cariofileno, sendo considerado um

composto potencial para o tratamento de distúrbios que envolvem uma desregulação da via de recompensa (GERTSCH, 2008).

1.7 BETA-CARIOFILENO E RECOMPENSA ALIMENTAR

Sesquiterpenos são metabólitos secundários encontrados em uma grande variedade de plantas, que apresentam diversos efeitos biológicos e farmacológicos (DI SOTTO *et al.*, 2010; DUHAMEL *et al.*, 2016). O beta-cariofileno, é um sesquiterpeno bicíclico, conhecido quimicamente como (trans-(1R,9S)-8-Metileno-4,11,11-trimetilbicyclo[7.2.0](trans-(1R,9S)-8-Metileno-4,11,11-trimetilbicyclo[7.2.0] (VIJAYALAXMI *et al.*, 2015). Opticamente, β -cariofileno e iso-cariofileno são isômeros trans e cis duplo, respectivamente, enquanto α -humuleno é um isômero de anel aberto, como pode ser visto na **Figura 6**. Nas plantas, o sesquiterpeno é comumente encontrado em seus óleos essenciais em combinação com iso-cariofileno ou α -humuleno. (BUDAVARI *et al.*, 1996).

Figura 6 – Estruturas químicas dos sesquiterpenos bicíclicos (E)-beta-cariofileno, (Z) -



beta-cariofileno, óxido de cariofileno e o isômero de anel aberto alfa humuleno (alfa-cariofileno).

Fonte: Gertsch *et al.* (2008).

O beta-cariofileno tem origem natural e está presente em muitos óleos essenciais, encontrado em diferentes plantas, especiarias e alimentos, como o orégano (*Origanum vulgare* L.), canela (*Cinnamomum* spp.), pimenta preta (*Piper nigrum* L.),

cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), lúpulo (*Humulus lupulus*), germander (*Teucrium* spp.), óleo de copaíba (*Copaiba* spp) e *Cannabis* spp. (FIDYT *et al.*, 2016; GHELARDINE *et al.*, 2001; DE ALMEIDA *et al.*, 2013; YANG; NIE, 2016; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2016). A planta *Cannabis* contém mais de 100 compostos terpeno-fenólicos farmacologicamente ativos, conhecidos como canabinoides. O beta-cariofileno é um dos principais constituintes (cerca de 35%) no óleo essencial de maconha (*Cannabis sativa* L.), que é considerada uma importante fonte tradicional de canabinoides derivados de plantas ou fitocanabinoides (HENDRICKS *et al.*, 1975; CALLEJA *et al.*, 2013). Geralmente, nas plantas, o beta-cariofileno apresenta maior concentração nas partes aéreas, folhas, flores e florescimento e em traços em raízes, rizomas, caules e cascas de diferentes plantas (LUCCA *et al.*, 2015; DIAS DDE *et al.*, 2012).

Como características físico-químicas, a baixa solubilidade em água é a mais citada, o que sugere sua elevada afinidade pela membrana celular e capacidade de transposição da barreira hematoencefálica (FIDYT *et al.*, 2016). Além disso, devido ao seu sabor aromático fraco, é usado comercialmente como aditivo alimentar e em cosméticos. A toxicidade do beta-cariofileno vem sendo estudada *in vivo* e *in vitro*. Esta substância, atualmente, é considerada não mutagênica, não genotóxica e a dose letal oral aguda (DL50) em ratos é relatada como acima 5000 mg/kg de peso corporal (SCHMITT; LEVY; CARROLL, 2016). O beta-cariofileno é uma substância aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (VARGA *et al.*, 2018; YAMAGUCHI; LEVI, 2017).

O beta-cariofileno é considerado um agonista seletivo dos receptores canabinoides do tipo CB2 (Ki de 155 nmol/l para receptores CB2 humanos, sem afinidade significativa para ligação ao receptor CB1) (GERTSCH, 2008). Dentre as atividades farmacológicas descritas na literatura, destacam-se a atividade antiproliferativa, anestésica, antiviral, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e os efeitos neuroprotetores em modelos de isquemia cerebral, convulsão, hipóxia em células da glia, doença de Alzheimer e depressão (LOIZZO *et al.*, 2008; GHELARDINI *et al.*, 1999; DUKINC; BENZIC; VUKO, 2011; HO *et al.*, 2011; SHAFAGHAT, 2011; KOBAYASHI *et al.*, 2011; CALLEJA *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015; GUO

et al., 2014; CHENG *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2018). Ademais, algumas evidências sugerem o potencial terapêutico do beta-cariofileno no tratamento da dependência de drogas (Al MANSOURI *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2020, 2021; GALAJ *et al.*, 2021). Por exemplo, a administração sistêmica de beta-cariofileno, diminui o consumo de álcool e a preferência condicionada ao lugar induzida por álcool em camundongos (Al MANSOURI *et al.*, 2014), reduz a autoadministração operante de cocaína, nicotina e metanfetamina, bem como a motivação e os comportamentos de busca pelas drogas em roedores (HE *et al.*, 2020; 2021; GALAJ *et al.*, 2021). Esses efeitos do beta-cariofileno sobre os comportamentos reforçadores induzidos por diferentes drogas de abuso parecem envolver a supressão da sinalização dopaminérgica na via de recompensa (ZHANG *et al.*, 2014).

Diante do exposto, a hipótese desse estudo é que a ativação seletiva dos receptores canabinoides CB2, por meio da administração sistêmica do beta-cariofileno, possa modular negativamente as propriedades reforçadoras e motivacionais induzidas por recompensa palatável, possivelmente, através da modulação da via de recompensa.

2 JUSTIFICATIVA

O sistema eCB participa da regulação de diversos processos fisiológicos, como a ingestão de alimentos, metabolismo energético e termogênese (AKBAS *et al.*, 2009; COTA *et al.*, 2003; DI MARZO *et al.*, 2001). Contudo, apesar do notório potencial terapêutico dos receptores canabinoides do tipo CB1, os efeitos colaterais psiquiátricos graves decorrentes do seu bloqueio farmacológico parecem não superar os benefícios do seu uso clínico, justificando a necessidade de explorar novos alvos terapêuticos que também possam modular a recompensa e motivação sem afetar o humor, tais como os receptores CB2.

O beta-cariofileno é um composto aprovado pela FDA e EFSA como aditivo alimentar. A ativação dos receptores CB2 não está associada aos efeitos psicotrópicos e psicotomiméticos típicos de agonistas dos receptores CB1 como THC. Além disso, o beta-cariofileno possui boa biodisponibilidade, baixa toxicidade e um ótimo perfil de segurança com efeitos colaterais mínimos (AKBAS *et al.*, 2009; GERTSCH, 2008; ROSSI *et al.*, 2018). Estas características tornam o composto um excelente candidato para abordagens terapêuticas envolvendo o sistema de recompensa, o que justifica o seu uso neste trabalho.

3 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as ações do beta-cariofileno sobre as propriedades reforçadoras e motivacionais induzidas por alimento palatável (creme de avelã com chocolate) em camundongos, investigando, ainda, se os efeitos são mediados pela ativação dos receptores CB2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o efeito do sexo no desenvolvimento da preferência condicionada ao lugar, induzida pela recompensa, em camundongos;
- Investigar se o beta-cariofileno apresenta propriedades reforçadoras *per se*, na tarefa de preferência/aversão condicionada ao lugar em camundongos fêmeas;
- Investigar o efeito da administração sistêmica de beta-cariofileno sobre a expressão da preferência condicionada ao lugar, induzida pela recompensa, em camundongos fêmeas;
- Avaliar os efeitos dos agonistas seletivos dos receptores CB2, beta-cariofileno e JWH133, sobre o incentivo à saliência motivacional induzido pela recompensa em camundongos fêmeas treinados na tarefa do *runway*.
- Investigar se os efeitos do beta-cariofileno sobre o incentivo à saliência motivacional induzido pela recompensa na tarefa do *runway* são mediados pela ativação dos receptores CB2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 198 camundongos (180 fêmeas e 18 machos) da linhagem Swiss, entre 3 e 6 meses de idade. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos no *Neuroscience Coworking Lab* (PsicowLab), situado no Departamento de Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências Biológicas. Os animais foram alojados em caixas plásticas (42 x 34 x 17 cm), com no máximo 10 animais por caixa. Estas foram mantidas em estantes ventiladas (Nuvilab CR1, Nuvital; Quimtia Nutrientes SA, Colombo, PR, Brasil), com livre acesso à água e comida. As estantes foram programadas com condição controlada de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 06:00 às 18:00 h). Os camundongos foram familiarizados com as condições da gaiola, da colônia e manuseio humano por sete dias antes de iniciar os experimentos. Para a realização dos estudos comportamentais, os animais foram mantidos na sala de experimentação por, pelo menos, 1 hora antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados seguindo normas internacionais de bem-estar animal recomendadas pela diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (CONCEA, 2013), estando de acordo com a Lei Federal 11.794 de 2008 (BRASIL, 2008). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC (CEUA-UFSC 7966250520). Utilizou-se o número mínimo de animais, com uma duração mínima de tempo para a obtenção de dados consistentes.

4.2 DROGAS E REAGENTES

O beta-cariofileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi suspenso em 5% de tween e solução salina de NaCl 0,9% usando sonicação. Ambos antagonista e agonista seletivos do receptor CB2 (respectivamente, AM630 e JWH133) (Tocris Cookson, Bristol, Reino Unido), foram dissolvidos em 2,5% DMSO e solução salina de NaCl 0,9%. Todas as drogas foram injetadas intraperitonealmente (i.p.) com volume de 10 ml/kg ajustado ao peso corporal. Foram escolhidas doses de cada fármaco com base em estudos anteriores (AL MANSOURI, 2014; DE CARVALHO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014) ou experimentos pilotos.

4.3 PROTOCOLO DE JEJUM E HABITUAÇÃO À RECOMPENSA PALATÁVEL DOCE

Primeiramente, é importante salientar que, neste trabalho, o termo “jejum” refere-se a um estado onde o animal é completamente privado de alimentos, mas tem livre acesso à água. Um dos objetivos do presente estudo foi a padronização dos protocolos experimentais no PsicowLab. Na elaboração dos protocolos foi considerada a premissa de que o jejum pode estimular a ingestão da recompensa palatável, seja pelo aumento da motivação pela busca de alimentos (ADAMANTIDIS *et al.*, 2011; CARR, 2007), ou pela indução de estresse. Sabe-se que tanto o estresse crônico quanto o agudo, aumentam a busca por estímulos recompensadores em ambos os sexos, e esse efeito é ainda maior em fêmeas devido ao efeito do estradiol sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e, conseqüente, estimulação da transmissão dopaminérgica na via de recompensa mesocorticolímbica (ECK; BANGASSER, 2020; QUIGLEY *et al.*, 2021; ADAM; SPEL, 2007).

Para aumentar a motivação da recompensa alimentar, todos os camundongos jejuaram durante 4-6 horas por dia, três dias antes do início dos experimentos e durante o período experimental. Os animais foram habituados à recompensa por três dias consecutivos antes dos experimentos começarem, afim de evitar a neofobia. Após o período de jejum, um recipiente contendo a recompensa (creme de avelã com chocolate da marca Ritter Alimentos S/A) foi introduzido na gaiola de moradia, por 30 minutos, para habituar os animais à recompensa apresentada posteriormente. Os animais foram pesados nos três primeiros dias consecutivos e, depois desse período, foram pesados a cada dois dias até o final dos experimentos. Nenhum animal apresentou mais de 10% de perda de peso corporal durante nossas investigações, sendo tal perda considerada abaixo dos *endpoints* humanitários em diretrizes internacionais.

4.4 PROTOCOLO DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LOCAL

Esta tarefa é utilizada para avaliar a capacidade do animal em associar o efeito reforçador da substância com dicas do ambiente após a aprendizagem que envolve um condicionamento associativo Pavloviano (SUN *et al.*, 2018). O protocolo experimental de preferência condicionada ao lugar (PCL) utilizado nesse estudo foi baseado no trabalho

de Delamater *et al.* (2000) e padronizado através de experimentos-piloto, uma vez que no estudo de Delamater e coautores foi realizado um protocolo de preferência condicionada ao lugar (PCL) induzida por soluções de sacarose em camundongos em estado de jejum, e no presente estudo o estímulo reforçador e a forma de apresentação da recompensa foram completamente diferentes.

O procedimento de PCL consistiu em 3 fases: pré-teste, condicionamento e teste. Os experimentos foram realizados em quatro caixas de madeira retangulares e idênticas, formadas por dois compartimentos A e B (com dimensões de 20 x 30 x 40 cm), conectados através de uma porta de guilhotina (5 x 10 cm). Os compartimentos A e B continham diferentes dicas visuais (listras verticais pretas vs. Pretas e brancas), táteis (duas texturas diferentes do piso), além de pistas olfativas (café vs. Odor de baunilha). Durante as sessões de condicionamento dentro de cada compartimento, havia um recipiente circular de plástico (3 cm de diâmetro) impregnado com odor de café ou de baunilha fixado na parede, além de uma tampa de metal que continha a recompensa doce (creme de avelã com chocolate da marca Ritter Alimentos S/A) ou que estava vazia (sem recompensa). Assim, a recompensa alimentar sempre foi apresentada na presença do odor de café, enquanto no compartimento oposto, o recipiente que continha a recompensa estava vazio (sem recompensa) e havia odor de baunilha. Estudos piloto não revelaram preferência basal para os compartimentos quando foram associados apenas aos dois odores (café *versus* baunilha). Este fato sugere que não há preferência por um odor em detrimento do outro entre os roedores. Todos os experimentos de PCL foram realizados sob baixa iluminação (20 lux). O comportamento de cada animal foi registrado através de uma câmera de vídeo posicionada acima do aparelho e monitorada em uma sala adjacente. Ao final de cada sessão, os animais retornam às suas respectivas gaiolas de moradia e os aparatos foram limpos com papel toalha embebidos com solução de etanol a 5%.

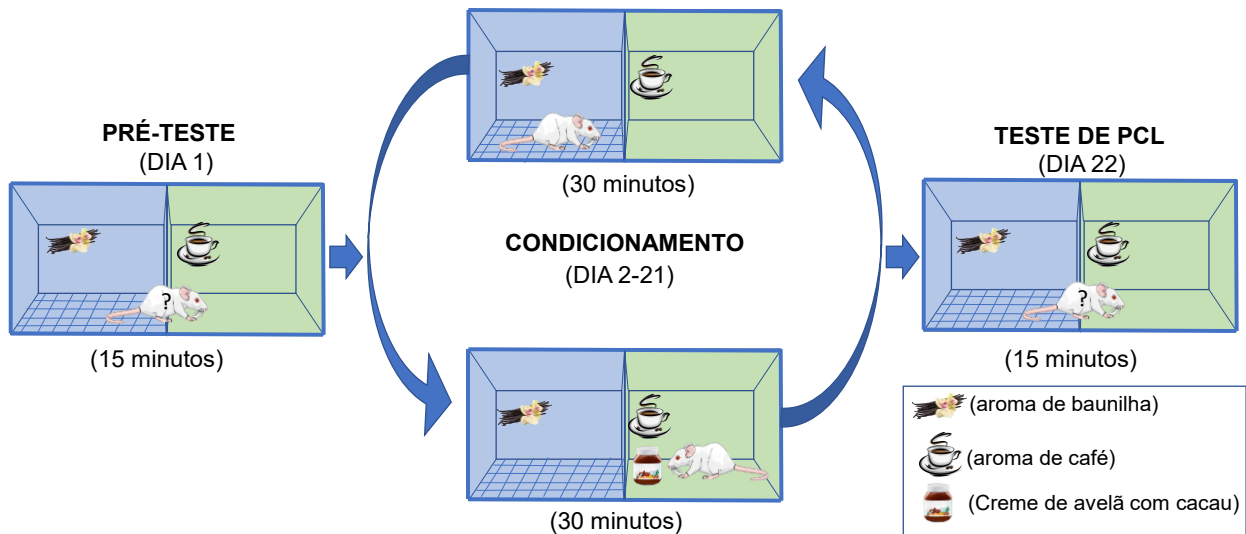
Devido à consistência pastosa da recompensa e às perdas (restos de recompensa que grudavam nas patas e no focinho dos animais), o consumo durante as sessões de condicionamento foi arbitrariamente registrado com pontuações entre 1 e 7, conforme: 1 = < 5%, 2 = 5-10%, 3 = 10-25%, 4 = 25-50%, 5 = 50-75%, 6 = 75-95% e 7 = 95-100%. Considerando que os animais tinham o acesso voluntário à recompensa palatável na

câmara PCL durante os dias (alternados) de condicionamento, os camundongos que consumiram pouca recompensa nos primeiros quatro dias de ensaio (\leq pontuação 3) não foram incluídos nas análises estatísticas. Este critério de exclusão foi baseado em um experimento piloto, onde durante as três primeiras sessões de condicionamento com acesso à recompensa, os animais que apresentaram pontuação de consumo igual ou inferior a 3, não desenvolveram a PCL induzida pela recompensa associada ao aroma de café, em comparação com o grupo de controle (sem recompensa/aroma de baunilha). O índice de consumo de recompensas e os pesos corporais dos camundongos, em jejum, foram aferidos afim de avaliar o impacto do jejum e da ingestão de recompensas durante o experimento.

No pré-condicionamento (dia 1, pré-teste), cada camundongo foi colocado no aparato para explorá-lo livremente por 15 minutos. Para o registro do tempo gasto em cada câmara, as quatro patas do animal deveriam permanecer dentro do local. Foram excluídos do estudo os animais que apresentam forte preferência incondicionada (gastos > 540 segundos) nesse dia. Conforme as preferências basais, os animais foram divididos em dois grupos equivalentes. Em seguida, as diferentes combinações dos dois compartimentos (A e B) foram contra balanceadas entre os grupos. Durante 20 dias consecutivos (fase de condicionamento), cada animal foi submetido a uma sessão de condicionamento que consistia em manter o animal confinado durante 30 min em um dos compartimentos. Assim, cada camundongo foi submetido a 10 sessões de condicionamento na presença da recompensa (creme de avelã com chocolate da marca Ritter Alimentos S/A + aroma de café) e dez sessões de condicionamento na câmara oposta (sem a recompensa + aroma de baunilha) em dias alternados. Após o condicionamento, os animais eram testados (24 h após a última sessão de condicionamento, no dia 22) para verificar se haviam desenvolvido a PCL. Os animais tiveram acesso de 15 minutos ao aparelho para ambas as câmaras do aparato de PCL, ou seja, o mesmo procedimento foi utilizado no pré-teste. O parâmetro de PCL foi representado pela diferença (em segundos) entre o tempo gasto no compartimento pareado com creme de avelã com chocolate no teste após o condicionamento e o tempo gasto no mesmo compartimento durante o pré-condicionamento (SUN *et al.*, 2018). O índice PCL foi analisado pelo teste t de uma amostra para comparar a porcentagem de

preferência (índice de PCL) com um valor arbitrário de 50%. A **Figura 7** apresenta o esquema ilustrativo do presente protocolo de PCL.

Figura 7 – Esquema ilustrativo do protocolo de preferência condicionada ao lugar induzida por recompensa palatável.



Fonte: O próprio autor.

4.5 PROTOCOLO DO *RUNWAY*

A tarefa de *runway* consiste em um paradigma de aprendizagem instrumental, onde se observa curvas de aquisição do aprendizado de incentivo à saliência motivacional através de medidas da latência para atingir a recompensa, bem como medidas de velocidade e trajetórias indicativas de motivação e comportamento dirigido ao reforço. O protocolo experimental foi baseado no estudo de Peciña *et al.*, (2003). A tarefa do *runway* foi utilizada para avaliar os efeitos do tratamento farmacológico sobre a saliência motivacional para buscar a recompensa dos animais previamente treinados.

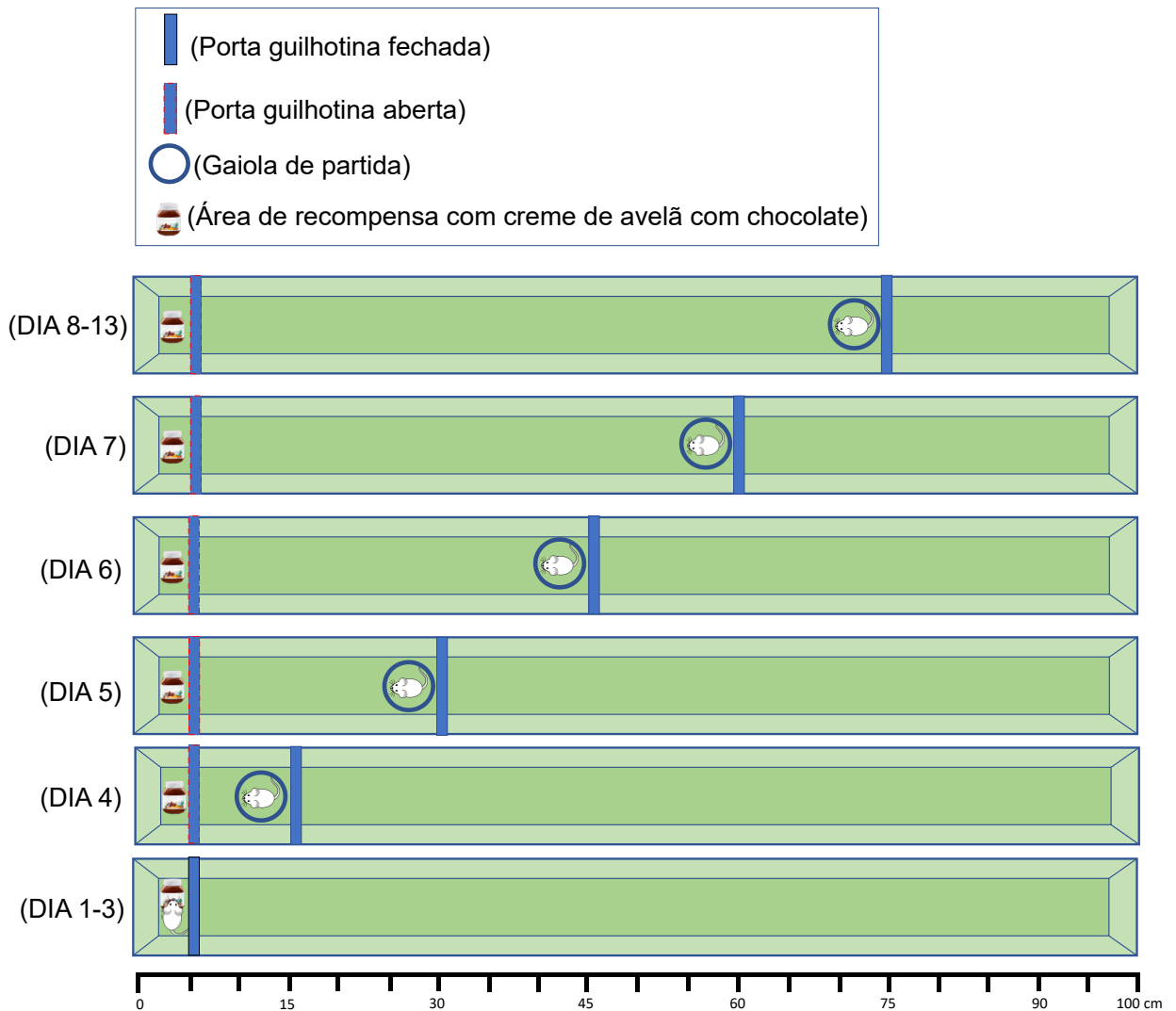
O aparato consistia em uma pista (10 x 100 x 60 cm) dividida em três compartimentos: uma região de partida (10 x 15 x 60 cm) onde foi colocada uma gaiola móvel de partida, uma pista central (10 x 65 x 60 cm) e uma área de recompensa (10 x 15 x 60 cm) fixa na extremidade distal e oposta à região de partida. Duas portas deslizantes do tipo guilhotina (10 x 60 cm e 2,5 cm de espessura) separavam as áreas de partida e de recompensa na pista. A área de partida era movida de lugar através da pista, podendo estar de 15 a 75 cm da área de recompensa ao longo de cada sessão.

Uma tampa metálica era colada na área de recompensa contendo, aproximadamente, 2,0 g de creme de avelã com chocolate. Ao longo dos treinos, em cada sessão era apresentada uma recompensa “fresca” para cada animal, a fim de evitar pistas olfativas. O registro dos parâmetros era feito através de uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato. Além disso as latências para atingir a área de recompensa e para comer, foram registradas por um experimentador em tempo real durante cada sessão de treino.

O protocolo do *runway* consistiu em 3 fases: (i) pré-exposição/habituação, (ii) aquisição de aprendizagem e (iii) desempenho após treinamento. Nas sessões de pré-exposição/habituação (dias 1-3), os camundongos foram mantidos confinados dentro da área de recompensa com livre acesso à recompensa por 5 minutos. Foi registrada a latência para comer a recompensa durante os 3 dias. A fase de aquisição de aprendizagem ocorreu entre os dias 4 e 9. Na sessão de treino 4, a área de partida foi colocada a 15 cm da área de recompensa e o animal foi mantido por 30 segundos com a porta fechada. Após esse período, a porta foi aberta para que o animal a prosseguisse para a pista. Camundongos que não deixaram a área de partida dentro de 3 minutos, eram conduzidos, suavemente, em direção à área de recompensa. Esse procedimento foi repetido para os demais treinos, movendo-se apenas a área de recompensa. No treino 5, área de partida foi movida para 45 cm da área de recompensa, no treino 6 para 60 cm e nos treinos 7 a 9 para 75 cm da recompensa. A fase de desempenho após treinamento começou a partir do dia 10, fixando a área de partida a 75 cm da recompensa. Nos dias 10, 11 e 12, os animais receberam tratamentos farmacológicos de 30 a 60 min antes de cada sessão. No dia 13, os animais foram novamente testados, com tratamento, porém na ausência de jejum. A velocidade de conclusão da tarefa foi calculada para cada sessão, através da razão entre a latência para alcançar a área de recompensa e o comprimento da pista. A saída da área de partida foi registrada quando as quatro patas do animal estavam fora da área de partida e vice-versa para a entrada na área de recompensa. Foi permitido que cada animal comesse a recompensa por um período de 30 segundos, após iniciar a comer a recompensa dentro da área de recompensa. Em seguida, o animal era retirado, e colocado na sua gaiola de moradia e o aparato foi limpo com papel toalha embebidos com solução de etanol a 5%.

Uma câmera de vídeo registrou o comportamento no protocolo de *runway* para a análise subsequente da (i) latência para deixar a caixa de partida; (ii) latência para alcançar a caixa de metas; (iii) velocidade média (cm/s) enquanto corre em direção à recompensa (incluindo pausas e reversões) e (iv) latência para o camundongo comer após alcançar a área de recompensa. A latência para iniciar o consumo da recompensa e o tempo gasto durante o seu consumo foram pontuados manualmente por um experimentador cego às condições experimentais. A **Figura 8** apresenta o esquema ilustrativo do presente protocolo de *runway*.

Figura 8 – Esquema ilustrativo do protocolo *runway*.

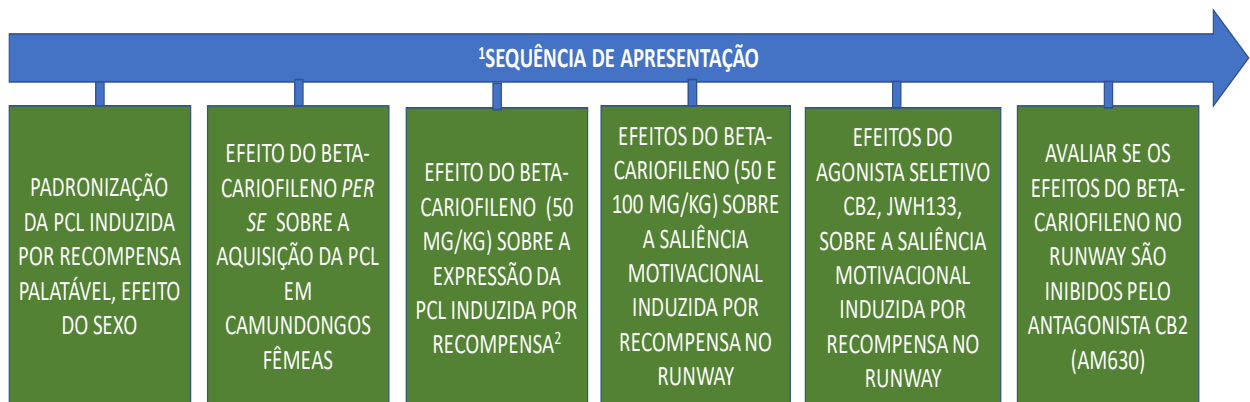


Fonte: O próprio autor.

4.6 DELINIAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos citados a seguir foram agrupados em blocos, os quais foram desenvolvidos para responder diferentes questões deste estudo utilizando as metodologias descritas anteriormente. A sequência de apresentação desses blocos foi esquematizada na **Figura 9**.

Figura 9 – Esquema ilustrativo da sequência de apresentação dos blocos experimentais.



¹ A ordem de apresentação não representa a ordem em que os experimentos foram realizados.

² Experimento realizado com os animais que passaram pelo experimento anterior de *runway* (animais não *naïve*).

Fonte: O próprio autor.

4.6.1 Padronização da PCL induzida recompensa palatável em camundongos Swiss machos e fêmeas sob jejum.

O objetivo desse experimento foi, inicialmente, padronizar o protocolo descrito no item 4.4. nas condições experimentais do PsicowLab e, em seguida, comparar o efeito do sexo na aquisição da PCL induzida por chocolate ao leite da marca Nestlé S.A. Os animais foram submetidos ao esquema de jejum e habituação à recompensa descrito no item 4.3.

4.6.2 Avaliar se o beta-cariofileno pode induzir efeitos reforçadores *per se* em camundongos fêmeas na tarefa de PCL.

O objetivo desse experimento foi investigar se a administração sistêmica do beta-cariofileno seria capaz de induzir efeitos reforçadores (positivos ou negativos) *per se*, ou seja, preferência ou aversão condicionada ao lugar, respectivamente. Para isso, os

animais passaram pelo protocolo de jejum e habituação à recompensa. Em seguida, foram submetidos a um protocolo enviesado de PCL, diferente daquele descrito no item 4.4. O protocolo de PCL utilizado foi adaptado de DE CARVALHO *et al.*, (2016) e consistiu em (i) pré-condicionamento (dia 1), (ii) condicionamento (dias 2-5) e (iii) teste pós-condicionamento (dia 6). No pré-condicionamento, o animal foi colocado em um dos compartimentos com as portas das guilhotinas abertas, tendo livre acesso aos dois compartimentos, durante 15 minutos. Durante as sessões de condicionamento, os animais foram randomizados e divididos em 2 grupos: beta-cariofileno na dose de 100 mg/kg e solução veículo. Os animais que receberam beta-cariofileno (100 mg/kg, i.p.) eram sempre imediatamente confinados, por 45 minutos, no compartimento em que eles permaneceram menos tempo no pré-condicionamento. Na sessão seguinte, o animal recebeu o tratamento com solução veículo e foi confinado no compartimento oposto ao realizado. O condicionamento foi conduzido através de duas sessões diárias, com intervalo de 6h entre elas, totalizando 8 sessões de treinamento (4 sessões com a droga, alternadas por 4 com veículo, exceto para o grupo veículo que recebeu apenas solução veículo em todas as sessões do condicionamento). A ordem das injeções foi contrabalanceada entre os grupos e entre os dias de condicionamento. No dia seguinte, o animal recebeu uma injeção de solução salina e foi confinado no outro compartimento. Após 24 horas da última sessão de condicionamento, os animais foram colocados no aparato e foi avaliado se eles desenvolveram a memória associativa induzida pelo beta-cariofileno, através da expressão ou não de preferência / aversão condicionada ao lugar. Ambos os testes de pré- e pós-condicionamento foram conduzidos na ausência de qualquer tratamento. Cada animal foi colocado em um dos compartimentos e teve livre acesso ao aparato, durante 15 minutos, onde foi registrado o tempo gasto pelo animal em cada compartimento. O parâmetro de PCL foi representado pela diferença (em segundos) entre o tempo gasto no compartimento pareado com beta-cariofileno durante o pré-condicionamento e no teste (SUN *et al.*, 2018).

4.6.3 Avaliar os efeitos do beta-cariofileno sobre a expressão da PCL induzida por recompensa palatável em camundongos fêmeas sob jejum.

Diferentemente dos demais experimentos, este experimento não foi conduzido com animais naïve, mas com animais que já haviam sido testados no *runway*. Para isso, após um período de descanso de 7 dias, os animais previamente submetidos aos protocolos de jejum e *runway* (descritos no item 4.3 e 4.4) foram treinados na tarefa de PCL induzida por recompensa palatável, sendo que cada animal recebeu 10 sessões de pareamento com a recompensa alternados por 10 sessões sem recompensa, conforme já descrito. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: metade recebeu uma única administração intraperitoneal de beta-cariofileno (50 mg/kg) e outra metade que recebeu o tratamento com o veículo, 30 minutos antes da realização do teste da PCL. O objetivo desse experimento era avaliar se o pré-tratamento com o beta-cariofileno seria capaz de interferir na expressão da PCL induzida por recompensa palatável em camundongos fêmeas sob jejum.

4.6.4 Investigar os efeitos dos agonistas seletivos dos receptores canabinoides CB2, beta-cariofileno e JWH133, sobre a saliência motivacional para obter a recompensa em animais sob jejum treinadas na tarefa do *runway*.

Grupos independentes de camundongos fêmeas foram submetidas ao protocolo de jejum e habituação apresentado no item 4.3 e, em seguida, ao protocolo de *runway* (item 4.5). Durante os dias 10, 11 e 12 do protocolo de *runway*, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de beta-cariofileno (nas doses de 50 ou 100 mg/kg), JWH133 (10 mg/kg) ou solução veículo 30 min antes de cada sessão. Os animais foram reavaliados 24h depois, na ausência do jejum e na presença de tratamento farmacológico.

4.6.5 Avaliar se os efeitos do beta-cariofileno sobre a saliência motivacional para obter a recompensa em animais sob jejum treinados na tarefa do *runway* são mediados pela ativação dos receptores canabinoides CB2.

Camundongos fêmeas foram submetidas ao protocolo de jejum e habituação descritos no item 4.3, em seguida, foram treinadas no protocolo de *runway* (descrito no item 4.5.). Durante os dias 10, 11 e 12 do protocolo *runway*, os animais foram divididos

em 4 grupos, sendo que a metade dos animais recebeu pré-tratamento com o antagonista seletivo dos receptores CB2 (AM630, 1 mg/kg i.p) e a outra solução veículo 30 min antes de serem tratados com beta-cariofileno (50 mg/kg, i.p) ou veículo. Após 30 min, após a segunda injeção o desempenho dos animais foi mensurado através da latência para atingir a área da recompensa e velocidade média (cm/s) para completar a tarefa de incentivo à saliência motivacional pela recompensa.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média + erro padrão da média (E.P.M.). As comparações estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com medidas repetidas quando necessário. Na sessão resultados, os testes estatísticos realizados estão explicitados de acordo com cada metodologia experimental. Quando significativa a ANOVA, múltiplas comparações *post hoc* foram feitas utilizando o teste de Bonferroni. O nível de significância aceito para os testes foi de 5% ($p < 0,05$). A análise dos dados foi realizada usando o software *Statistica 7* (Statsoft, Inc., EUA), e os gráficos foram elaborados por meio do software *GraphPad 7* (GraphPad Inc., EUA).

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DA PCL INDUZIDA PELA RECOMPENSA PALATÁVEL EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS E FÊMEAS.

O objetivo deste experimento foi comparar o efeito do sexo no desenvolvimento da preferência condicionada ao lugar, induzida pela recompensa, em camundongos. Para tanto, foi aplicado o teste estatístico ANOVA de duas vias (sexo e chocolate) para o índice de PCL induzida pela recompensa palatável. A análise não detectou diferença significativa entre no fator sexo, porém revelou um efeito significativo do chocolate ($F_{1, 27} = 14,867$; $p < 0,01$) e uma interação entre chocolate e sexo ($F_{1, 27} = 6,7342$; $p < 0,05$ **Figura 10a**). O teste *post hoc* revelou que as fêmeas expostas à recompensa apresentaram um aumento no índice de preferência quando comparadas aos machos ($p < 0,05$), bem como, em relação ao seu respectivo controle ($p < 0,001$).

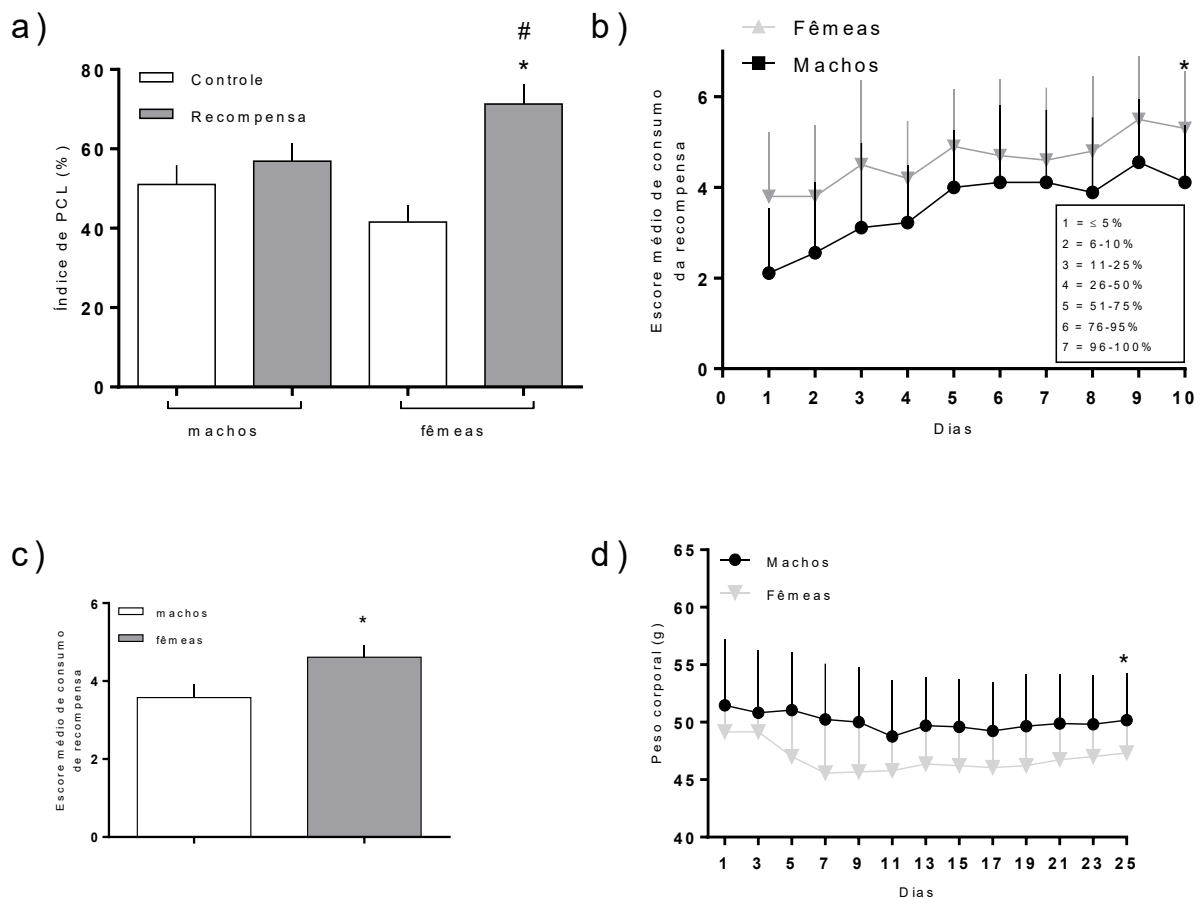
A ANOVA de uma via com repetição, avaliando o escore de consumo da recompensa, revelou diferença significativa entre os grupos ($F_{1, 17} = 5,0220$, $p = 0,03867$, **Figura 10c**) e no fator repetição ($F_{9, 153} = 5,8768$, $p = 0,00001$, **Figura 10b**). A análise *post hoc* revelou que as fêmeas expostas à recompensa apresentaram um aumento no escore de consumo quando comparadas aos machos ($p < 0,05$). Quando os resultados foram comparados ao primeiro dia de consumo, pôde-se observar que os animais expostos apresentaram um aumento no escore de consumo ($p < 0,01$).

Para a variável peso corporal, obtida ao longo do período experimental, foi aplicado o teste estatístico ANOVA de uma via com repetição. O teste revelou diferença entre os sexos ($F_{1, 34} = 4,9698$; $p < 0,05$), variável repetição ($F_{12, 408} = 9,1738$; $p < 0,001$ **Figura 10d**) e interação entre os fatores ($F_{12, 408} = 1,8046$; $p < 0,05$). O peso dos animais no dia 1 foi significativamente menor comparado aos demais dias de estudo ($p < 0,01$). O teste *post hoc* revelou que as fêmeas apresentaram menor peso estatisticamente significativo quando comparadas aos machos ($p < 0,05$).

Conforme estabelecido no protocolo de PCL (vide Material e Métodos), para este experimento foram excluídas as 3 fêmeas que, no total de 10 sessões, comeram menos de 25% da recompensa. Os machos não foram excluídos porque, no geral, eles apresentaram um baixo escore de consumo da recompensa (entre 2 e 3) nas 3 primeiras sessões e, possivelmente, por isso não desenvolveram PCL pela recompensa palatável,

uma vez que a baixa quantidade/intensidade das exposições à recompensa pode ter prejudicado a aquisição do aprendizado associativo. Os resultados desse teste confirmam que o protocolo de PCL, nas condições de padronização no PsicowLab, é mais favorável à indução de PCL em camundongos fêmeas. Desta forma, foram utilizados camundongos fêmeas nos experimentos subsequentes.

Figura 10 – Desenvolvimento de PCL induzida por recompensa palatável em camundongos machos e fêmeas.



Legenda: O índice de PCL representado pelo percentual de tempo gasto no compartimento associado à recompensa versus compartimento sem recompensa, média + erro padrão da média (EPM), durante o pré-teste e teste dos grupos machos e fêmeas. **(a)** * indica uma diferença significativa ($p < 0,01$) em comparação ao grupo controle do respectivo grupo e # indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle de animais machos. **(b)** *indica diferença significativa ($p < 0,01$) comparado com o dia 1 **(c)** * indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao grupo de machos. **(d)** Pesos corporais médios (+ EPM)

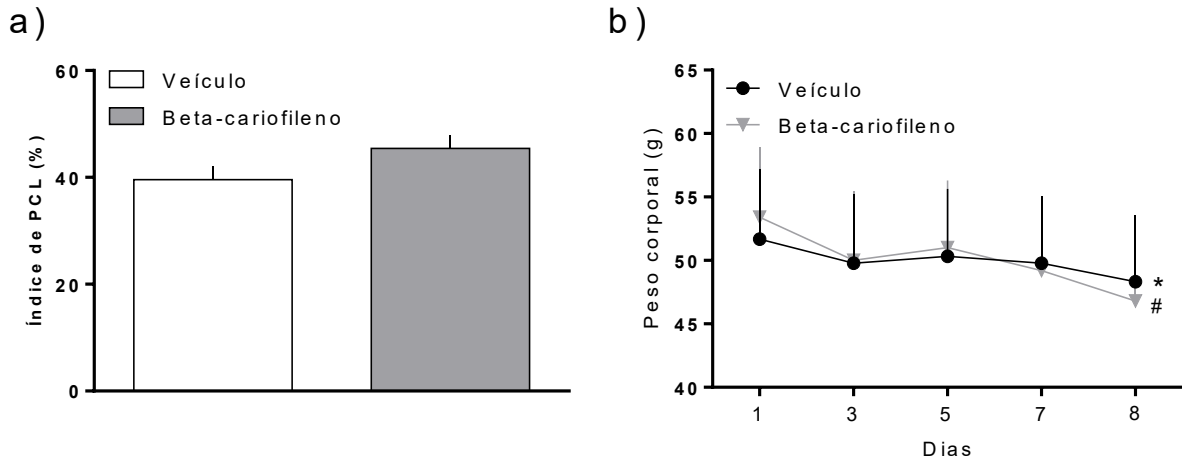
através do protocolo de PCL. * Indica diferença significativa ($p < 0,01$) comparado com os demais dias. N=7-9/grupo.

5.2 ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE BETA-CARIOFILENO APARENTEMENTE NÃO INDUZ EFEITOS REFORÇADORES *PER SE* EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SOB JEJUM NA TAREFA DE PCL.

O objetivo deste experimento foi investigar se o beta-cariofileno apresenta propriedades reforçadoras *per se*, na tarefa de preferência/aversão condicionada ao lugar em camundongos fêmeas. Conforme definido no protocolo de PCL (vide Material e Métodos), foi excluído 1 animal que apresentou preferência por um dos compartimentos antes do condicionamento. O beta-cariofileno administrado na dose de 100 mg/kg durante as sessões de condicionamento não induziu PCL em camundongos fêmeas. A ANOVA de uma via não detectou diferença significativa entre os grupos em relação ao índice de preferência ($F_{1,17} = 2,6488$; $p = 0,12202$, **Figura 11a**).

Para a variável peso corporal, obtida ao longo do período experimental, foi aplicado o teste estatístico ANOVA de uma via com repetição. Não houve diferença entre os grupos ($F_{1,17} = 0,00179$; $p = 0,96677$), porém o teste revelou diferença na interação entre os fatores ($F_{4,68} = 5,8183$; $p = 0,00044$, **Figura 11b**) e na variável repetição ($F_{4,68} = 49,549$, $p = 0,00001$). O teste *post hoc* aponta que os animais perderam peso no decorrer do estudo. O peso dos animais no dia 9 foi estatisticamente menor que nos demais dias ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos e ambos os grupos apresentaram perda de peso ao longo do período experimental, sendo o peso do dia 9 menor que nos demais dias ($p < 0,05$).

Figura 11 – O beta-cariofileno *per se* não induz o desenvolvimento de PCL em camundongos fêmeas.



Legenda: A PCL foi expressa pelo tempo gasto no compartimento associado ao beta-cariofileno (média + EPM) durante o pré-teste e teste dos camundongos fêmeas. **(a)** A ingestão da recompensa em sessões de condicionamento é expressa por um índice (vide Material e Métodos). **(b)** Pesos corporais médios (+ EPM) através do protocolo de PCL. * e # indicam diferença significativa comparado com as demais variáveis do seu respectivo grupo. N= 9-10/grupo.

5.3 O BETA-CARIOFILENO ATENUA A EXPRESSÃO DA PCL INDUZIDA POR RECOMPENSA PALATÁVEL EM ANIMAIS SOB JEJUM

O objetivo deste experimento foi investigar o efeito da administração sistêmica de beta-cariofileno sobre a expressão da preferência condicionada ao lugar, induzida pela recompensa, em camundongos fêmeas. Em relação aos dados brutos da PCL, foi aplicado ANOVA de uma via, onde as análises estatísticas do tempo gasto nos compartimentos durante o pré-condicionamento e teste revelaram um efeito significativo apenas para a interação entre os grupos ($F_{3, 48} = 9,14$; $p < 0,00001$; **Figura 12a**). Não foi identificado efeito significativo do tratamento (beta-cariofileno x veículo), nem uma interação entre tratamento e fator repetição. O grupo controle apresentou uma preferência significativa pela câmara pareada com a recompensa palatável associada ao aroma de café ($p < 0,002$) durante o teste, mas não no pré-condicionamento.

Considerando que a PCL pode ser estabelecida quando os grupos permanecerem mais tempo na câmara pareada com recompensa palatável em relação ao tempo gasto no mesmo compartimento no dia do pré-condicionamento, o grupo tratado com beta-

cariofileno não exibiu nenhuma preferência considerável por nenhum dos compartimentos durante o pré-condicionamento e o teste. Além disso, os camundongos tratados com beta-cariofileno passaram menos tempo na câmara pareada com a recompensa associada ao aroma de café ($p < 0,0003$) quando comparados com o grupo controle no teste, indicando supressão da PCL.

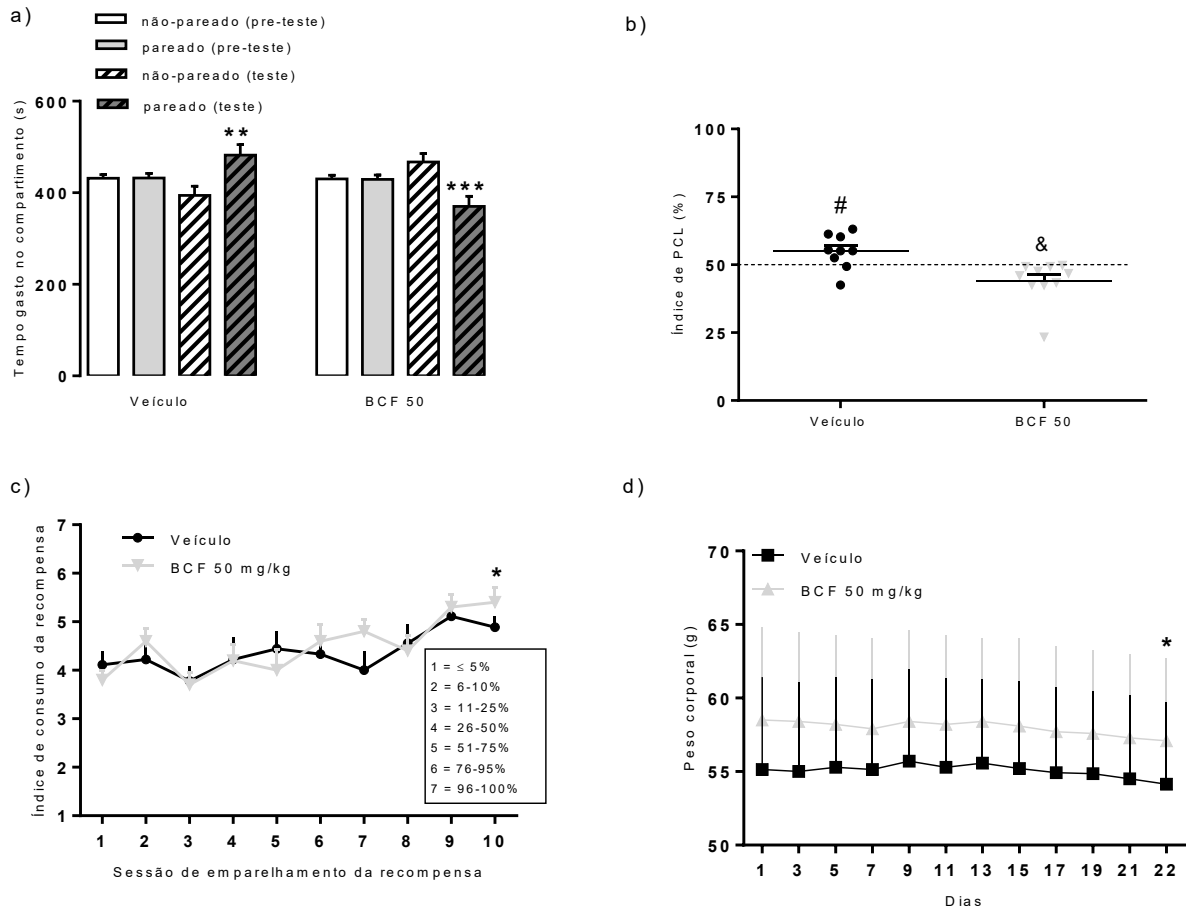
Também foi analisado o tempo gasto no compartimento associado à recompensa antes e após o condicionamento. O grupo controle exibiu uma PCL significativa ($F_{1, 16} = 13,02$; $p < 0,002$) e a diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado com a recompensa e tempo gasto no compartimento oposto, revelou que o grupo controle permaneceu mais tempo no compartimento associado à recompensa no teste. Enquanto, os animais que receberam uma única dose de beta-cariofileno antes do teste deixaram de exibir PCL e gastaram menos tempo ($-60,33 \pm 30$ segundos) no compartimento associado à recompensa no teste. A análise estatística realizada (ANOVA de uma via) para o índice PCL revelou uma diferença significativa entre o beta-cariofileno e o grupo controle ($F_{1, 16} = 13,5$; $p < 0,002$; **Figura 12b**). Por fim, apenas o grupo controle diferiu consideravelmente no índice PCL em comparação com a porcentagem arbitrária do valor de preferência de 50% dada pelo teste t de *Student* de uma amostra ($t=-3,67$; $p < 0,002$, **Figura 12b**). Em conjunto, estes resultados indicam que o tratamento com beta-cariofileno antes do teste pode prevenir a expressão de PCL induzida por recompensa palatável em camundongos fêmeas sob jejum.

Os dados de ingestão durante as sessões de condicionamento foram registrados como um índice de consumo de recompensa. Houve aumento no consumo de recompensa ao longo das sessões de condicionamento ($F_{9, 153} = 5,55$; $p < 0,000001$, **Figura 12c**), principalmente, quando comparado ao consumo nas duas últimas sessões em relação às duas primeiras. Não foi detectada diferença significativa entre os grupos para o consumo de recompensa durante o PCL.

A **Figura 12d** mostra as diferenças nos pesos corporais dos animais em jejum ao longo do protocolo de PCL. Em relação ao fator repetição ($F_{11, 242} = 4,1177$, $p = 0,00001$), os animais apresentaram diminuição expressiva no peso corporal nos últimos dois dias em comparação com o primeiro, durante a PCL, mas nenhuma diferença significativa foi

encontrada entre os grupos ($F_{1, 22} = 1,4449$, $p = 0,24213$) ou interação entre grupos (controle, beta-cariofileno) e repetição foram observadas ($F_{11, 242} = 0,28989$, $p = 0,98738$).

Figura 12 – Efeito do beta-cariofileno sobre a expressão da PCL induzida por recompensa palatável em animais sob jejum.



Legenda: **(a)** Os símbolos ** indicam uma diferença significativa entre o grupo controle da câmara pareada versus câmara não pareada durante o teste de PCL e *** em comparação com o grupo beta-cariofileno na mesma câmara e teste. # indica que uma única injeção beta-cariofileno antes do teste reduz o índice PCL em comparação com o grupo controle e & indica uma diferença significativa em comparação com o valor arbitrário de 50%. **(b)** A ingestão da recompensa em sessões de condicionamento é expressa por um índice (vide Material e Métodos) e pesos corporais médios + EPM) através do protocolo de PCL **(c-d)**. * denotam um efeito principal significativo da repetição (dias). N=9-10/grupo.

5.4 OS AGONISTAS SELETIVOS DOS RECEPTORES CB2, BETA-CARIOFILENO E JWH133, SUPRIMEM A SALIÊNCIA MOTIVACIONAL PARA OBTER A RECOMPENSA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SOB JEJUM TREINADAS NA TAREFA DO *RUNWAY*.

O objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos dos agonistas seletivos dos receptores CB2, beta-cariofileno e JWH133, sobre o incentivo à saliência motivacional induzido pela recompensa em grupos independentes de camundongos fêmeas treinados na tarefa do *runway* (Figuras 12 e 13).

A **Figura 13** ilustra o desempenho de camundongos fêmeas sob jejum na tarefa do *runway* que receberam beta-cariofileno na fase de testes. Não houve tratamento farmacológico durante as sessões de pré-exposição à área de recompensa (dias 1-3) nem nas fases de incentivo ao aprendizado (dias 4-9). Portanto, não foi detectado efeito significativo nas análises de comparação entre os seguintes grupos experimentais independentes: beta-cariofileno 50 mg/kg *versus* Veículo e beta-cariofileno na dose de 100 mg/kg *versus* Veículo, nessas duas etapas de treinamento.

Os animais em jejum apresentaram uma diminuição no tempo para comer a recompensa durante as sessões de pré-exposição ao longo de 3 dias de exposição (beta-cariofileno 50 mg/kg *versus* Veículo: $F_{2, 36} = 11,6$, $p < 0,0001$ e beta-cariofileno na dose de 100 mg/kg *versus* Veículo: $F_{2, 36} = 9,90$, $p < 0,0004$). No geral, as comparações *post hoc* indicaram que todos os grupos exibiram uma diminuição significativa $p < 0,05$ na latência para comer a recompensa no dia 3 em comparação com o dia 1.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas para os parâmetros de latência para comer a recompensa e velocidade média (cm/s) para atingir a área de recompensa não revelou efeito significativo para ambos os fatores tratamento (beta-cariofileno 50 mg/kg x veículo) e repetição, durante a fase de aprendizado por incentivo à saliência motivacional da recompensa palatável.

No entanto, na fase de testes de desempenho pós-treinamento, a ANOVA de uma via com medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento (beta-cariofileno 50 mg/kg x veículo) na latência para comer a recompensa ($F_{1, 17} = 9,95$, $p < 0,006$; **Figura 13a**) e na velocidade média (cm/s) para atingir à área de recompensa ($F_{1, 17} = 19,37$; $p < 0,0004$; **Figura 13b**). No fator repetição, foi encontrado efeito significativo apenas para a latência para comer a recompensa ($F_{3, 54} = 3,03$, $p = 0,05$) e não houve interação entre

tratamento versus fator repetição para nenhum desses parâmetros. Os animais que receberam beta-cariofileno 50 mg/kg apresentaram um aumento na latência para comer a recompensa em comparação com o grupo controle nos dias 11 ($p < 0,02$) e 12 ($p = 0,05$), porém, os resultados não diferiram significativamente entre estes grupos nos dias 10 e 13. Estatisticamente, o grupo beta-cariofileno 50 mg/kg apresentou um aumento expressivo da latência para comer a recompensa no dia 11 em comparação com o dia 10 ($p < 0,006$). Ademais, os animais que receberam beta-cariofileno 50 mg/kg apresentaram uma menor velocidade média para atingir área de recompensa do que o grupo controle nas sessões 11 e 12 ($p = 0,01$ e $p < 0,04$, respectivamente).

Em relação aos animais tratados com beta-cariofileno na dose de 100 mg/kg seu respectivo grupo controle, a ANOVA de uma via com medidas repetidas, indicou um efeito significativo do fator de repetição (sessões 4-9) para a latência para comer a recompensa ($F_{5, 90} = 3,95$; $p < 0,003$; **Figura 13c**) e para a velocidade média (cm/s) para alcançar a área de recompensa ($F_{5, 90} = 12,22$; $p < 0,000001$; **Figura 13b**) ao longo da fase de aprendizado por incentivo. Não foi detectado efeito significativo do tratamento nem interação entre as variáveis tratamento e repetição. As comparações *post hoc* revelaram uma diferença significativa na latência para comer a recompensa do dia 4 em relação ao dia 6 ($p < 0,04$) e do dia 6 em relação aos dias 8 e 9 (para ambos $p < 0,005$). Os resultados demonstraram que a partir do dia 7 em diante, houve um aumento na velocidade média (cm/s) dos dias 7-9 em relação à sessão 4 ($p < 0,04$; $p < 0,0007$ e $p < 0,0000001$, respectivamente) e à sessão 5 ($p = 0,05$; $p < 0,001$ e $p < 0,000001$, respectivamente).

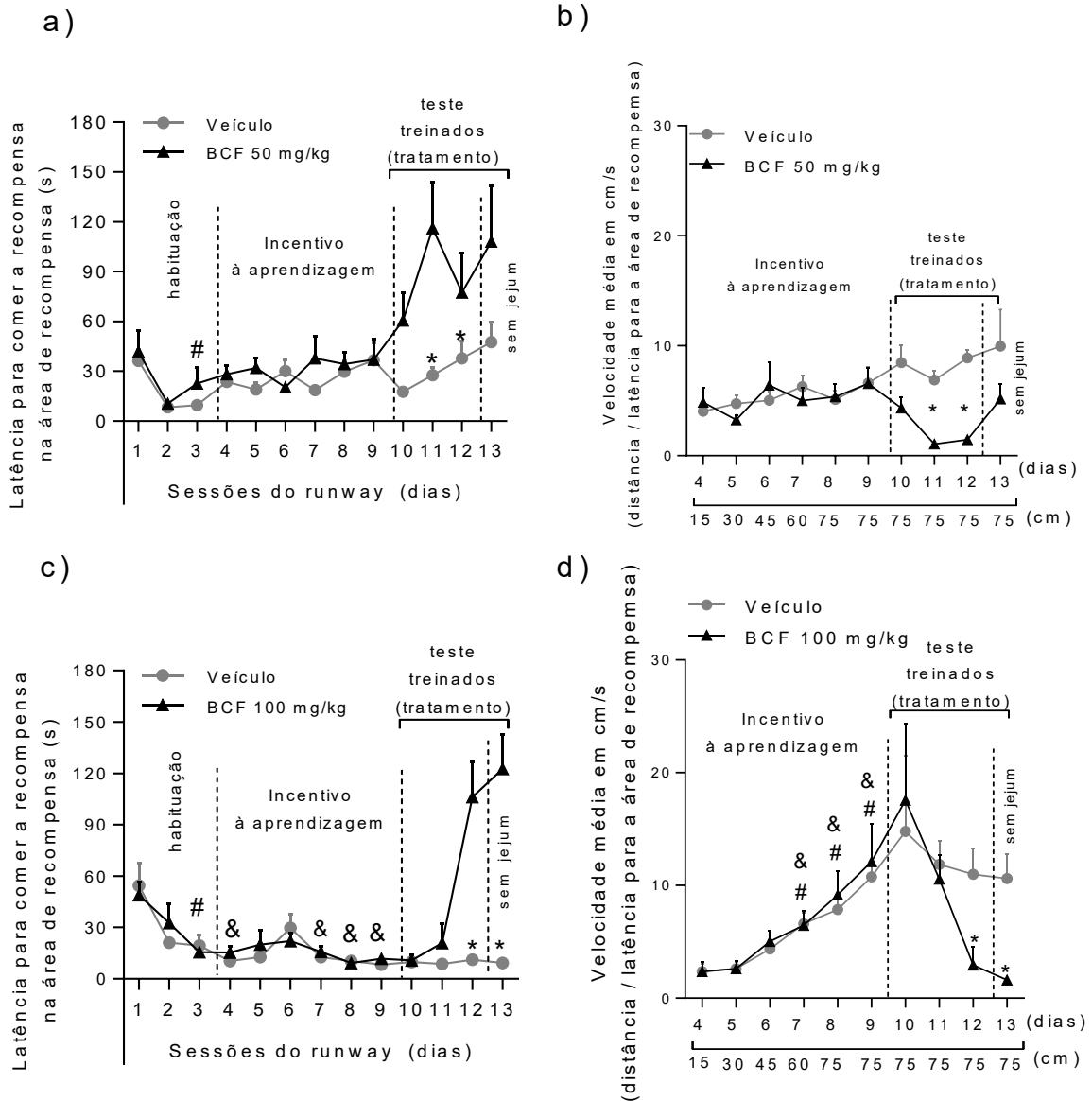
Durante a fase de testes de performance pós-treinamento, a ANOVA de uma via com medidas repetidas revelou um efeito significativo de tratamento ($F_{1, 18} = 18,64$; $p < 0,0004$), repetição ($F_{3, 54} = 15,75$; $p < 0,00001$) e uma interação entre os dois fatores $F_{3, 54} = 6,71$; $p < 0,001$) na latência para comer a recompensa. Os animais que receberam beta-cariofileno na dose de 100 mg/kg tiveram um aumento na latência para comer a recompensa em comparação com o grupo controle nos dias 12 ($p < 0,002$) e 13 ($p < 0,0003$), mas não há diferença entre esses grupos nos primeiros dois dias de tratamento. Também foi demonstrado que o grupo beta-cariofileno na dose de 100 mg/kg apresentou latência significativamente maior para comer a recompensa a partir do dia 12 em comparação com o 10 ($p < 0,0000001$) e o 11 ($p < 0,000002$). Além disso, um efeito

significativo do tratamento ($F_{1, 18} = 53,92$, $p < 0,000001$) e uma interação entre o tratamento e os fatores de repetição ($F_{3, 54} = 11,56$; $p < 0,0001$) foram detectados para a velocidade média (cm/s). Os animais que receberam beta-cariofileno na dose de 100 mg/kg apresentaram, significativamente, menor latência que o grupo controle apenas nos dias 11, 12 e 13 ($p < 0,000001$, $p < 0,00001$ e $p < 0,04$, respectivamente).

O peso corporal dos animais tratados com beta-cariofileno na dose de 50 mg/kg está apresentado na **Figura 14a**. Nesta análise foi aplicado o teste ANOVA de uma via com medidas repetidas e a análise diferença significativa no fator repetição ($F_{6, 108} = 9,3031$, $p = 0,00001$), sem diferença entre os grupos ($F_{1, 18} = 0,07451$, $p = 0,78799$) ou interação entre os grupos ($F_{6, 108} = 0,96705$, $p = 0,45114$). O peso dos animais foi significativamente menor comparado ao dia 1 ($p < 0,04$) (teste *post hoc* de Bonferroni).

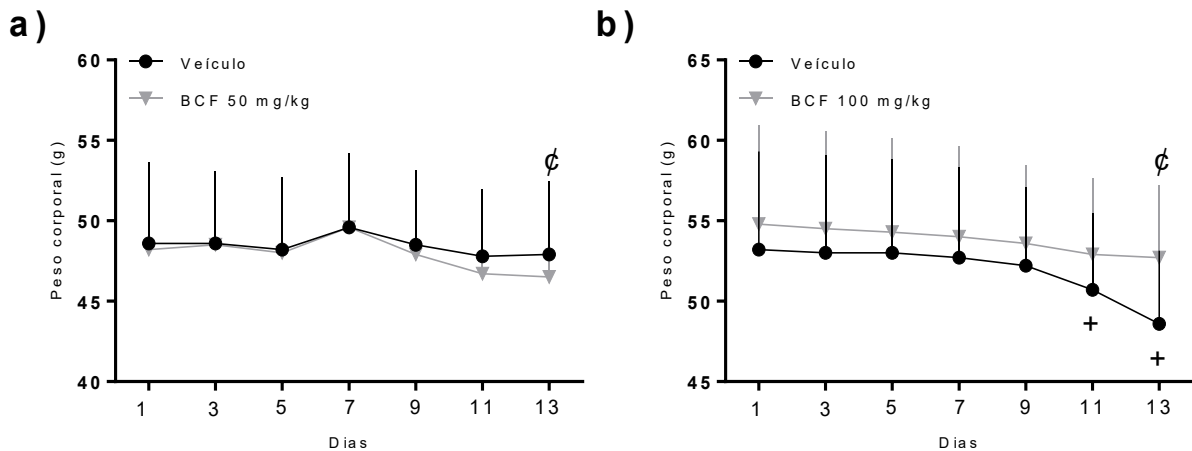
Já a **Figura 14b** representa o peso corporal no protocolo de *runway* utilizando 100 mg/kg de beta-cariofileno. Para análise foi aplicada a ANOVA de uma via com medidas repetidas e a análise apontou diferença significativa no fator repetição ($F_{7, 126} = 19,848$, $p = 0,0001$) e interação entre os grupos ($F_{7, 126} = 2,8757$, $p = 0,00807$), sem diferença entre os grupos ($F_{1, 18} = 0,58356$, $p = 0,45482$). Os animais apresentaram redução significativa do peso ($p = 0,000003$) (teste *post hoc* de Bonferroni). Também foi observado que os animais tratados com beta-cariofileno apresentaram redução significativa de peso nos dias 13 e 15 comparado ao dia 1 do grupo beta-cariofileno e grupo controle ($p = 0,009$) (teste *post hoc* de Bonferroni).

Figura 13 – Efeitos do beta-cariofileno sobre o incentivo à saliência motivacional para comer a recompensa em camundongos fêmeas sob jejum treinadas na tarefa do *runway*.



Legenda: O desempenho no *runway* foi medido pela latência para comer recompensa e velocidade média (cm/s) para atingir a área de recompensa. Os símbolos @, # e & indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com os dias 1, 4 e 5, respectivamente. * indica diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo dia. N=7-10/grupo.

Figura 14– Peso corporal dos animais na avaliação do beta-cariofileno sobre o incentivo à saliência motivacional para comer a recompensa em camundongos fêmeas sob jejum treinadas na tarefa do *runway*.



Legenda: O desempenho no *runway* foi medido pela latência para comer recompensa e velocidade média (cm/s) para atingir a área de recompensa. ϕ indica diferença significativa dos grupos comparado ao dia 1. N=7-10/grupo.

A **Figura 15** ilustra o desempenho de camundongos fêmeas sob jejum na tarefa do *runway* que receberam tratamento com agonista seletivo dos receptores CB2, JWH133, na fase de testes. Camundongos fêmeas em jejum desenvolveram o aprendizado nas primeiras 9 sessões (**Figura 15a**). Não houve tratamento farmacológico durante as sessões de pré-exposição à área de recompensa (dias 1-3) e as fases de incentivo ao aprendizado (dias 4-9). Consequentemente, a ANOVA de uma via com medidas repetidas não revelou nenhum efeito significativo do fator de tratamento nas análises comparativas entre JWH133 versus Veículo. Os animais em jejum apresentaram uma diminuição na latência para comer a recompensa durante as sessões de pré-exposição à área de recompensa ao longo dos 3 dias de exposição (JWH133 versus Veículo: $F_{2, 18} = 7,80$, $p < 0,004$). As comparações *post hoc* indicaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos na latência para comer a recompensa no dia 3 em comparação com o dia 1.

Durante o treinamento (sessões 4-9) da fase de aquisição da aprendizagem por incentivo dos grupos JWH133 e seu respectivo controle, a ANOVA de uma via com

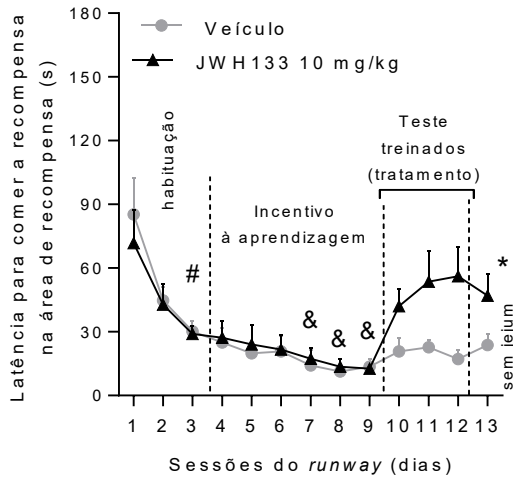
medidas repetidas revelou efeito significativo do fator de repetição para ambas as medidas: latência para obter a recompensa alimentar ($F_{5, 45} = 3,64$, $p < 0,08$; **Figura 15a**) e velocidade média (cm/s) para atingir a área de recompensa ($F_{5, 45} = 7,12$, $p < 0,00006$; **Figura 15b**). Para ambos os parâmetros, nenhum efeito significativo do tratamento nem interação entre eles foram observados. Camundongos fêmeas em jejum apresentaram uma expressiva diminuição da latência nos dias 7-9 em comparação com o dia 4 pelo teste *post hoc* de Bonferroni ($p = 0,05$, $p < 0,02$ e $p < 0,05$, respectivamente). Além disso, os animais em jejum exibiram um aumento da velocidade média das sessões 6-9 em comparação com a sessão 4 ($p < 0,03$; $p < 0,004$, $p < 0,008$ e $p < 0,00004$, respectivamente/teste *post hoc* de Bonferroni).

Na fase de teste (sessões 10-13), os animais receberam uma injeção (i.p.) 30 minutos antes das primeiras três sessões. No dia seguinte, os animais foram novamente testados na ausência de jejum. A ANOVA de uma via com medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento com o JWH133, agonista seletivo de receptores CB2, em comparação com o Veículo ($F_{1, 9} = 6,88$, $p < 0,03$). Nenhum efeito significativo de repetição (sessões 10-12), nem interação entre repetição e tratamento foram encontrados.

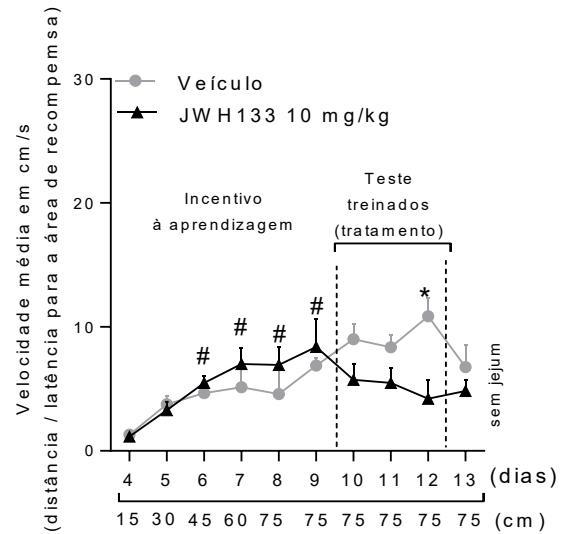
A **Figura 15** ilustra o peso corporal durante a tarefa de runway. A ANOVA de uma via com medidas repetidas apontou diferença significativa no fator repetição ($F_{6, 66} = 2,7900$, $p = 0,01765$) sem diferença entre os grupos ($F_{1, 11} = 0,78386$, $p = 0,39491$) e interação entre os grupos ($F_{6, 66} = 0,61170$, $p = 0,72009$). Os animais dos grupos JWH133 e Controle apresentaram redução significativa de peso ao longo do período experimental ($p = 0,009$) (teste *post hoc* de Bonferroni).

Figura 15 – Efeitos do agonista seletivo CB2, JWH133, sobre o incentivo à saliência motivacional para comer a recompensa em camundongos fêmeas sob jejum treinadas na tarefa do *runway*.

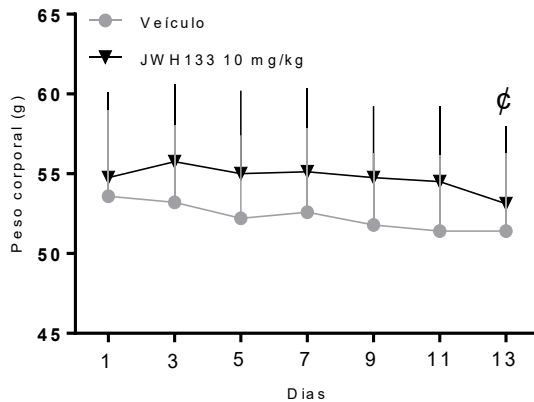
a)



b)



c)



Legenda: O desempenho no *runway* foi medido pela latência para comer recompensa e velocidade média (cm/s) para atingir a área de recompensa. Os símbolos @, # e & indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com os dias 1, 4 e 5, respectivamente. * indica diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo dia. ϕ indica diferença significativa dos grupos comparado ao dia 1. N=7-10/grupo.

5.5 O PRÉ-TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DOS RECEPTORES CANABINOIDES CB2 PREVINE OS EFEITOS DO BETA-CARIOFILENO SOBRE O DESEMPENHO DOS ANIMAIS NA TAREFA DE *RUNWAY*.

O objetivo deste experimento foi investigar se os efeitos do beta-cariofileno sobre o incentivo à saliência motivacional induzido pela recompensa na tarefa do *runway* eram mediados pela ativação dos receptores CB2. Durante as sessões de pré-exposição na área de recompensa (dias 1-3) e incentivo à aprendizagem (dias 4-9), não houve efeitos significativos dos grupos (Veículo / Veículo, Veículo / beta-cariofileno, AM630 / Veículo ou AM630 / beta-cariofileno) através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Foi detectada diferença significativa apenas no fator repetição na latência para comer a recompensa ao longo de 3 dias de habituação ($F_{2,54} = 34,48$, $p < 0,00001$) e nos 6 dias da fase de incentivo à aprendizagem ($F_{5,135} = 5,32$, $p < 0,00017$) e para a velocidade média em cm/s ($F_{5,135} = 23,54$, $p < 0,000001$) (**Figura 16**).

Camundongos fêmeas em jejum apresentaram uma diminuição na latência para comer a recompensa durante as sessões de pré-exposição na área de recompensa ao longo de 3 dias de exposição ($F_{2,54} = 34,48$, $p < 0,00001$). No geral, os animais em jejum apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na latência para comer recompensa no dia 3 em comparação com o dia 1 e também reduziram as latências para comer recompensa no dia 4 versus dias 8 e 9 ($p < 0,0005$ e $p < 0,003$) e do dia 5 contra os dias 8 e 9 (para ambos $p < 0,03$ e $p = 0,05$).

Por outro lado, os animais em jejum exibiram um aumento na velocidade nos dias 6-9 em comparação com os dias 4 ($p < 0,00004$; $p < 0,00004$, $p < 0,0000001$ e $p < 0,0000001$, respectivamente) e de 8-9 em comparação com o dia 5 ($p < 0,00001$ e $p < 0,000001$, respectivamente). Durante a fase de teste, a ANOVA de uma via com medidas repetidas revelou um efeito significativo dos grupos ($F_{1,18} = 18,64$, $p < 0,0004$) e do fator repetição ($F_{3,54} = 15,75$, $p < 0,00001$), mas nenhuma interação entre os dois fatores foi encontrada na latência para comer a recompensa (**Figura 16a**). Os animais do grupo Veículo / beta-cariofileno apresentaram um aumento no tempo para comer a recompensa em comparação com os outros grupos nos dias 11 e 12, respectivamente: Veículo / Veículo ($p < 0,0005$ e $p < 0,004$), AM630 / Veículo ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$) e AM630 /

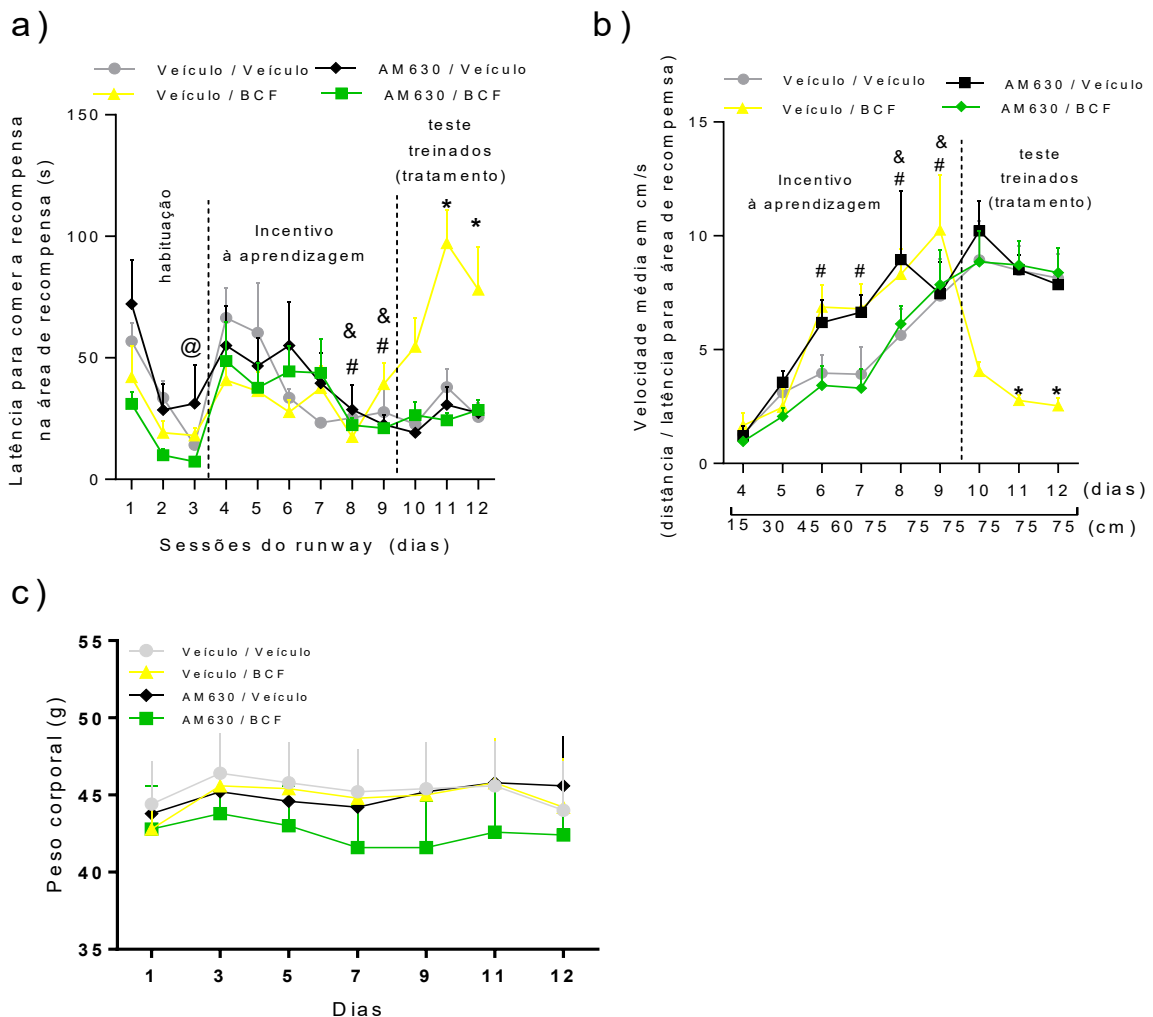
beta-cariofileno ($p < 0,000007$ e $p < 0,009$). Além disso, nenhuma diferença significativa entre esses grupos foi encontrada nos 3 dias.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas da velocidade média revelou um efeito significativo dos grupos ($F_{3, 37} = 16,94$, $p < 0,0001$; **Figura 16b**). Não foram observadas diferenças consideráveis no fator repetição e interação entre os fatores. O grupo Veículo / beta-cariofileno apresentou velocidade média inferior nos dias 11 e 12 em comparação aos demais grupos, respectivamente: Veículo / Veículo ($p < 0,006$ e $p < 0,007$), AM630 / Veículo ($p < 0,007$ e $p < 0,02$) e AM630 / Veículo ($p < 0,02$ para ambos). Além disso, a ANOVA de duas vias (pré-tratamento *versus* tratamento) revelou efeito significativo do pré-tratamento ($F_{1,27} = 9,62$, $p < 0,0001$ e $F_{1,27} = 19,08$, $p < 0,001$), tratamento ($F_{1,27} = 10,23$, $p < 0,0001$ e $F_{1,27} = 15,79$, $p < 0,05$) e uma interação entre eles ($F_{1,27} = 7,41$, $p < 0,001$ e $F_{1,27} = 14,48$, $p < 0,01$) na latência para comer a recompensa e na velocidade média, respectivamente entre os dias 10-12. As comparações *post hoc* revelaram que o grupo Veículo / beta-cariofileno apresentou maior latência para atingir a área de recompensa em comparação com os grupos Veículo / Veículo ($p < 0,034$), AM630 / beta-cariofileno ($p < 0,01$) e AM630 / beta-cariofileno ($p < 0,04$). Foi observado que o grupo Veículo / beta-cariofileno apresentou maior latência para comer a recompensa do que outros grupos na fase de teste (Veículo / beta-cariofileno *versus* Veículo / Veículo, $p < 0,05$; Veículo / beta-cariofileno *versus* AM630 / beta-cariofileno, $p < 0,001$ e Veículo / beta-cariofileno *versus* AM630 / beta-cariofileno, $p = 0,05$). Além disso, não foi observada diferença significativa dos grupos Veículo / Veículo, AM630 / beta-cariofileno e AM630 / beta-cariofileno entre si. Esses resultados confirmam os nossos achados anteriores, e sugerem que o pré-tratamento com AM630, antagonista seletivo do receptor canabinoide CB2, preveniu os efeitos do beta-cariofileno sobre a motivação para obter a recompensa na tarefa *runway*, indicando que os efeitos do beta-cariofileno são mediados pela ativação dos receptores CB2.

A **Figura 16c** apresenta os dados do peso corporal. Aqui foi aplicado o teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas e a análise apontou diferença significativa no fator repetição ($F_{6, 168} = 35,496$, $p = 0,00001$) e interação entre os grupos ($F_{24, 168} = 1,6711$, $p = 0,03268$), sem diferença estatística entre os grupos ($F_{4, 28} = 0,33565$, $p = 0,85159$). O peso dos animais nos dias 11 e 13 foi significativamente menor comparado

aos demais dias ($p < 0,01$) (teste de Newman Keuls). O teste *post hoc* também revelou que o peso dos animais do grupo AM630 e beta-cariofileno, no dia 13, foi menor que os outros dias do mesmo grupo ($p < 0,01$) (teste *post hoc* Bonferroni).

Figura 16 – O pré-tratamento com o antagonista dos receptores canabinoides CB2, AM630, previne os efeitos do beta-cariofileno sobre a motivação e aprendizagem durante fase de desempenho após treinamento dos animais na tarefa do *runway*.



Legenda: Desempenho de quatro grupos medidos através da latência para atingir a recompensa durante as fases de pré-exposição, aquisição de aprendizado e teste da tarefa de *runway*. Símbolos @, # e & indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com os dias 1, 4 e 5, respectivamente. * indica uma diferença significativa em relação ao grupo Veículo/beta-cariofileno em relação aos dias 11 e 12. N=7-8/grupo. Fonte: O próprio autor.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido para investigar os efeitos do beta-cariofileno sobre as propriedades reforçadoras e motivacionais induzidas por alimento palatável em camundongos em jejum, utilizando as tarefas de PCL e *runway*. No presente estudo foi demonstrado que o beta-cariofileno suprime as propriedades motivacionais e reforçadoras induzidas por recompensa palatável, uma vez que o beta-cariofileno reduziu o comportamento motivado por recompensa no teste de *runway* e prejudicou a expressão da PCL induzida por alimento palatável. Também foi demonstrado que as ações do beta-cariofileno sobre o incentivo à saliência motivacional induzido pela recompensa na tarefa do *runway* envolvem a ativação de receptores CB2, visto que antagonismo dos receptores CB2 preveniu os efeitos do beta-cariofileno sobre a motivação para buscar a recompensa. Além disso, o agonista seletivo CB2, JWH-133, promoveu efeitos semelhantes aos do beta-cariofileno nessa tarefa. Tomados em conjunto, nossos achados demonstram de maneira pioneira que o beta-cariofileno reduz o reforço e a saliência motivacional por comida palatável em camundongos sob jejum.

Os dados da padronização da PCL demonstraram um efeito dimórfico entre os sexos. Apenas as fêmeas desenvolveram preferência significativa pelos compartimentos condicionados à recompensa e apresentaram maior consumo de recompensa em comparação com os machos, sendo este um fator determinante para a aquisição de PCL. Sinclair *et al.* (2017) obtiveram resultados similares aos do presente estudo. Os autores avaliaram as diferenças sexuais em respostas comportamentais e neuroquímicas relacionadas com recompensa palatável em ratos *Sprague-Dawley*, além de demonstrar que apenas as fêmeas desenvolveram PCL induzida por recompensa palatável. As análises comportamentais revelaram que a duração média do tempo gasto no consumo da recompensa, durante as sessões de emparelhamento, foi mais longa nas fêmeas do que nos machos. Essas observações são semelhantes aos resultados do nosso estudo, uma vez que no presente estudo as fêmeas apresentaram maior escore de consumo de recompensa médio ao longo do protocolo experimental de PCL quando comparadas aos machos. Os autores justificam essa diferença pelo resultado do seu segundo protocolo, onde marcadores neuroquímicos indicativos de ativação da via de recompensa mesocorticolímbica foram, significativamente, maiores nas fêmeas do que nos machos.

Sabe-se que existem diferenças nos comportamentos motivados entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas parecem mais responsivas para aquisição de comportamentos motivados do que os machos. A etiologia dessas diferenças pode estar relacionada à influência dos hormônios gonadais nas respostas comportamentais e neurais aos alimentos palatáveis, onde o estradiol parece facilitar a aquisição de comportamentos motivados (QUIGLEY *et al.*, 2021; SONG; KALYANI; BECKER, 2018). Essa influência hormonal foi demonstrada no estudo de Babbs, Wojnicki e Corwin (2011), onde os autores demonstraram que o 2-hidroxiestradiol, um metabólito do estradiol, aumenta a sinalização da dopamina, assim como a ingestão de recompensa palatável em ratos machos e fêmeas. Apesar das fêmeas serem mais responsivas a alimentos palatáveis nos protocolos de PCL, os machos também podem desenvolver PCL induzidas por recompensas palatáveis (TUPLIN; HOLAHAN, 2019; ONAOLAPO; ONAOLAPO, 2018). Isso vai depender do tipo de protocolo experimental utilizado, tais como o tipo de recompensa palatável utilizada, número de sessões de condicionamento, tempo de condicionamento, presença de estímulos contextuais (pistas visuais, táteis e de odor) e nível de estresse dos animais (SUN *et al.*, 2018). Visto que os animais machos não desenvolveram a PCL com o protocolo utilizado no presente estudo, os demais experimentos foram conduzidos apenas em camundongos fêmeas.

Foi observado que os animais apresentaram uma ligeira perda de peso nas últimas sessões de ambos os protocolos de PCL e runway. Contudo, essa perda de peso corporal parece não estar associada aos tratamentos farmacológicos e sim ao protocolo de jejum pelo que os animais passaram. Em estudo de Mousavi, Ali; Askari, Nayere e Vaez-Mahdavi (2020), a restrição alimentar também gerou perda significativa de peso corporal de ratos Wistar machos adultos. Durante a elaboração dos protocolos foi levado em consideração a premissa de que a restrição alimentar facilita a ingestão de alimentos através de mecanismos homeostáticos envolvidos na regulação do comportamento alimentar, como a elevação nos níveis de grelina, que é capaz de promover a fome e evocar ingestão de alimentos. Além disso, a restrição alimentar repetitiva produz várias neuroadaptações cerebrais relacionadas à recompensa (HABERNY *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2006; 2012; STAMP *et al.*, 2008; VIALOU *et al.*, 2011). Estes incluem a diminuição da velocidade máxima de captação de dopamina (ZHEN *et al.*, 2006), regulação negativa

da expressão do gene da pré-prodinaorfina basal, regulação positiva da atividade de proteínas quinases (MAPK) induzida pela estimulação do receptor de dopamina D1 e fosforilação CREB (HABERNY *et al.*, 2005) e acúmulo de o fator de transcrição estável Δ fosB (STAMP *et al.*, 2008; VIALOU *et al.*, 2011). Essas mudanças no cérebro e no comportamento observadas em indivíduos em estado de restrição alimentar podem estar relacionadas com alterações de hormônios que regulam o comportamento alimentar e hormônios relacionados ao estresse, os quais modulam os circuitos de recompensa do cérebro. Por exemplo, dependendo do tipo de regime de restrição alimentar pode-se induzir um aumento de 5 a 10 vezes na corticosterona plasmática e um aumento de 75% nos níveis de grelina. Todos esses sinais periféricos interagem com a via de recompensa cerebral. Hormônios de estresse, em particular, o cortisol/corticosterona tem sido implicados em comportamentos de busca por drogas de abuso em indivíduos sob restrição alimentar (CARR, 2002). Tanto o estado de alimentação quanto o estresse podem aumentar a sensibilidade comportamental aos efeitos de drogas de abuso, mesmo em indivíduos que nunca tiveram contato com as drogas. Em modelos animais de dependência de drogas, o estado de alimentação tem efeitos diretos e profundos nos comportamentos relacionados às drogas. Por exemplo, a restrição alimentar aumenta a PCL induzida por anfetaminas (STUBER *et al.* 2002) também favorece a autoadministração de diferentes classes de drogas de abuso (CARROLL *et al.* 1979; CARROLL *et al.* 1981).

O beta-cariofileno na dose de 100 mg/kg não foi capaz de induzir reforço positivo ou negativo *per se* na tarefa de PCL. Isso sugere que o beta-cariofileno não apresenta efeitos hedônico/aversivo, diferentemente, do fitocanabinoide THC que apresenta efeitos reforçadores bifásicos hedônico/aversivo (SPILLER *et al.*, 2019). Além disso, a administração aguda de beta-cariofineno na dose de 50 mg/kg aboliu a PCL induzida pela recompensa palatável, sem alterar a atividade locomotora (**Apêndice A**). Levando em consideração as diferenças metodológicas e conceituais, esse resultado pioneiro, se assemelha aos estudos que demonstram que ligantes que ativam os receptores CB2, tais como o beta-cariofileno e o JWH-133, reduzem o consumo e as propriedades reforçadoras de diferentes drogas de abuso (DELIS *et al.*, 2017). Por exemplo, o JWH133 inibe de uma maneira dependente da dose a autoadministração operante de cocaína e

os níveis de dopamina no NAc em camundongos selvagem e nocaute para os receptores CB1, mas não em camundongos nocaute para os receptores CB2 (XI *et al.*, 2011). O agonista CB2, JWH133, inibe a aquisição e a expressão da sensibilização comportamental induzida pela cocaína em camundongos (DELIS *et al.*, 2017). De modo semelhante, o beta-cariofileno prejudica a autoadministração operante de nicotina, metanfetamina ou cocaína, bem como os comportamentos de busca induzidos por drogas de abuso (HE *et al.*, 2019, 2021; GALAJ *et al.* 2021). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com beta-cariofileno (na faixa de 30-50 mg/kg) reduziu o consumo voluntário de álcool e inibiu a aquisição da PCL induzida por etanol em camundongos (AL MANSOURI *et al.*, 2014; OPPONG-DAMOAHA *et al.*, 2019). Apesar das diferenças metodológicas desses trabalhos em relação aos achados do presente estudo, de certa forma existe uma semelhança entre eles, uma vez que os nossos resultados sugerem que o beta-cariofileno - através da ativação de receptores CB2 - diminui a saliência motivacional induzida por uma recompensa natural, a qual é refletida pela redução de comportamentos de busca pela recompensa palatável na tarefa do *runway*, assim como pela redução da expressão da memória associativa condicionada à recompensa alimentar na tarefa da PCL. Após demonstrar que o beta-cariofileno na dose de 50 mg/kg suprimiu os comportamentos motivados pela recompensa palatável na tarefa do *runway*, foi demonstrado que os efeitos do composto são mediados pela ativação de receptores CB2, visto que o bloqueio seletivo desses receptores através do antagonista AM630, reverteu o efeito do beta-cariofileno no mesmo teste. O estudo de He *et al.* (2020) corrobora os achados do presente estudo. Os autores demonstraram que o beta-cariofileno, inibiu um comportamento motivado de maneira dependente da dose, enquanto o pré-tratamento com AM630 reverteu esse efeito. O que indica que os efeitos do beta-cariofileno são mediados pela ativação dos receptores CB2. A inibição do comportamento motivado induzida pela ativação dos receptores CB2 através de outros agonistas também foi demonstrada em outros trabalhos. Martín-Sánchez *et al.* (2019) demonstraram que o JWH133 reverteu a PCL induzida tanto por álcool quanto por recompensa palatável em camundongos C57BL. Já no estudo de Canseco-Alba *et al.* (2019), utilizando camundongos C57BL machos, os autores demonstraram que o pré-tratamento com o JWH133 prejudicou o desenvolvimento da PCL induzidas tanto por

cocaína quanto pela nicotina. Enquanto, Delis *et al.* (2017), observaram que o pré-tratamento com JWH133, reverteu a aquisição e a prejudicou a expressão da PCL induzida por cocaína em ratos Sprague-Dawley.

De um modo geral, os animais apresentaram uma diminuição nas latências para comer a recompensa e um aumento na velocidade média para alcançar a área de recompensa, ao longo das etapas de habituação e aquisição de aprendizagem nas diferentes levadas do protocolo de *runway*. Esse resultado indica que, conforme os animais aprendem que a entrada na área de recompensa está associada à presença da recompensa palatável (creme de avelã com chocolate), seu comportamento dirigido pela motivação para acessar ao local da recompensa se fortalece. Esses dados são consistentes com as pesquisas de Khan e Pand (2020), Akhiary *et al.* (2018) e Spangenberg e Wichman (2018), onde os animais desenvolveram aprendizagem para obter a recompensa no paradigma de *runway*. No presente estudo foi demonstrado que tratamento repetido com os agonistas seletivos dos receptores canabinoides CB2, beta-cariofileno e JWH-133, atenuou o incentivo à saliência motivacional ("querer") para obter a recompensa palatável em camundongos fêmeas em jejum alimentar treinadas na tarefa do *runway*. Além disso, os efeitos do beta-cariofileno foram prevenidos pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo dos receptores CB2 (AM630). A ativação dos receptores canabinoides do tipo CB2, por ambos os agonistas, ao longo das sessões de desempenho após treinamento, diminuiu o incentivo à saliência motivacional para o creme de avelã com chocolate em camundongos fêmeas em estado de jejum. No geral, os animais que receberam o tratamento com os agonistas seletivos CB2 pareciam estar menos focados em obter uma recompensa alimentar durante as sessões de treino (particularmente, após o segundo dia de tratamento) do que os seus respectivos grupos controle. Isso porque tanto os grupos tratados com beta-cariofileno (ambas as doses), quanto o grupo que recebeu JWH-133 exibiram menores velocidades médias (cm/s) para alcançar a área de recompensa e/ou apresentam maiores latências para comer recompensa após atingirem a área de recompensa quando comparados aos seus respectivos grupos de controle. Portanto, eles completaram as sessões de treinamento mais lentamente do que os animais de controle em pelo menos um dos dias de tratamento. Esse atraso para conclusão da tarefa por parte dos animais que receberam

tratamento com agonistas canabinoides CB2 (beta-cariofileno ou JWH-133) pode ser atribuído ao maior tempo gasto com “distrações” na pista. O tempo gasto com “distrações” foi atribuído ao tempo total gasto na manifestação comportamentos tais como pausas na pista (incluindo comportamento de autolimpeza); reversões investigativas; e regressões no trajeto, ou seja, locomover-se em direção oposta ao local da recompensa (apêndice A). Vale ressaltar que os tratamentos farmacológicos com agonistas CB2 não afetaram o desempenho motor dos animais. Isso significa que, quando descontarmos o tempo gasto com as distrações na pista, a velocidade dos animais tratados com beta-cariofileno ou JWH-133 não foi maior do que os seus respectivos grupos controle que receberam veículo durante o treinamento (**apêndice A, quadro 2**). Uma das interpretações possíveis para o maior atraso para obter a recompensa apresentado pelos animais tratados com os agonistas dos receptores canabinoides CB2, comparado com seus respectivos grupos controles, é que esse atraso relativo poderia ser reflexo de déficits atenção ou memória decorrentes do tratamento farmacológico. Nesse caso, se a premissa fosse verdadeira, os animais com déficits de atenção e memória não lembrariam da recompensa disponível no final da pista e, provavelmente, se dirigiriam ao local mais devagar. Além disso, o déficit de atenção também poderia aumentar a distração dos animais durante o treinamento devido à maior dificuldade de distinguir entre os aspectos relevantes e irrelevantes presentes no ambiente durante os testes (AGMO *et al.*, 1997). No entanto, alguns argumentos refutam contra essa interpretação. Por exemplo, tanto o beta-cariofileno, como outros agonistas de CB2, parecem ter efeitos benéficos sobre a cognição e a memória (CHENG *et al.*, 2014; RATANO *et al.*, 2017; LINDSEY *et al.*, 2019). Além disso, a ativação dos receptores CB2 reverte os déficits de atenção induzidos pela administração do antagonista glutamatérgico, MK-801, na tarefa de inibição do pré-pulso do reflexo de sobressalto em camundongos (KHELLA *et al.*, 2014). Essas evidências nos permitem descartar a possibilidade de que os efeitos dos agonistas dos receptores CB2 (beta-cariofileno e JWH-133) na tarefa do *runway* possam estar relacionados prejuízo cognitivo induzido pelo tratamento farmacológico.

Curiosamente, tanto para os animais que receberam beta-cariofileno (na dose de 50 mg/kg) quando os que receberam o JWH-133, a interrupção do jejum no dia 13 parece abolir as diferenças entre esses grupos em comparação com seus respectivos grupos de

controle. A ausência de jejum pode ter contribuído para diminuir o incentivo à saliência motivacional para obter a recompensa nos animais tratados com os agonistas CB2. Conseqüentemente, esses dados reforçam a hipótese de que os efeitos dos agonistas CB2 são devidos à supressão da motivação decorrente do estado de saciedade dos animais, uma vez que o “desejo” por obter comida é determinado não apenas pelo alto teor reforçador (calórico ou palatável) dos alimentos, mas também pelo balanço energético (ZELLNER *et al.*, 2009).

Apesar do presente estudo ter demonstrado o envolvimento dos receptores CB2 neste efeito nas ações do beta-cariofileno sobre as propriedades reforçadoras e motivacionais induzidas por alimento palatável em camundongos fêmeas, a participação de outros alvos não foi explorada nesse estudo. Os receptores PPAR desempenham um importante papel na regulação do balanço energético e do comportamento alimentar (SIHAG; JONES, 2018). Sabe-se que o beta-cariofileno pode interagir com receptores PPAR, conforme demonstrado no estudo de GALAJ *et al.* (2021), uma vez que o bloqueio dos receptores PPAR- α e PPAR- γ revertem o efeito do beta-cariofileno sobre a manifestação de comportamentos reforçados pela cocaína em roedores. Além disso, as ações do beta-cariofileno, possivelmente, envolvem uma interação com a neurotransmissão dopaminérgica na via de recompensa. Embora no presente trabalho o papel da dopamina não tenha sido investigado, existem dados na literatura que apoiam essa perspectiva (JORDAN; XI, 2019; VERHAGEN *et al.*, 2009; ABERMAN; WARD; SALAMONE, 1998). Ademais, uma das limitações do presente estudo foi a utilização apenas de animais sob jejum. Considerando que a obesidade é altamente correlacionada ao comer compulsivo, seria interessante investigar futuramente, os efeitos do beta-cariofileno sobre a saliência motivacional induzida por recompensa palatável em animais obesos, bem como o impacto do tratamento repetido sobre efeitos metabólicos e perda de peso em modelos experimentais.

Kelley e Berridge (2002) argumentam que as recompensas são incentivos hedônicos essenciais, não apenas reforçadores de hábitos. Nesse sentido, o ato de comer pode reduzir a experiência negativa da fome, porém o ato de comer quando se está saciado não necessariamente cumpre essa função. A ingestão de alimentos palatáveis é, frequentemente, um comportamento aprendido motivado e direcionado a

um objetivo, às vezes associado a desejos intensos, quiçá compulsivos por comida (GREENO *et al.*, 2000). Os alimentos palatáveis são, muitas vezes, percebidos como "alimentos que trazem conforto", e são consumidos para reduzir o estresse ou estados afetivos negativos (DALLMAN *et al.*, 2003). Assim, os comportamentos alimentares refletem não apenas o estado de fome/saciedade, mas também estados afetivos ou comportamentos aprendidos motivados por memórias ou por dicas ambientais que remetem à sensação de prazer e conforto.

A exposição a alimentos palatáveis é capaz de ativar a via de recompensa cerebral e os resultados do nosso estudo corroboram, indiretamente, essa questão. Diversas evidências não clínicas indicam que os receptores CB2 estão presentes na via de recompensa e outras estruturas que participam da regulação do comportamento alimentar (ISHIGURO *et al.*, 2012, KIM e LI, 2015; SPILLER *et al.*, 2019; SVÍŽENSKÁ; DUBOVÝ e ŠULCOVÁ, 2008). Os receptores CB2 parecem ser expressos, em neurônios dopaminérgicos (XI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014, 2015), enquanto os receptores CB1 são expressos, principalmente, em neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (HAN *et al.*, 2017; SZABO *et al.*, 2002). Assim, a ativação farmacológica dos receptores CB2 inibe o disparo neuronal na ATV e a liberação de dopamina no NAc (XI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014, 2015). Esses estudos demonstram que os receptores CB2, expressos na ATV, podem modular a excitabilidade neuronal dopaminérgica na via de recompensa. Considerando que os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo desempenham papéis cruciais na recompensa cerebral, na motivação e em diferentes comportamentos dirigidos por reforço, nós especulamos que os efeitos dos agonistas canabinoides CB2 envolvam, ao menos em parte, a supressão da atividade de neurônios dopaminérgicos, que codificam a saliência motivacional relacionada à recompensa alimentar. Contudo, são necessários estudos para investigar o papel da sinalização dopaminérgica nas ações do beta-cariofileno sobre a supressão da motivação e reforço induzidos por alimentos palatáveis em roedores.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram de forma pioneira que o beta-cariofileno apresentou eficácia farmacológica na redução da saliência motivacional e no reforço positivo induzido por alimentos palatáveis em animais sob jejum. Isso torna o composto um promissor candidato para o desenvolvimento de novas estratégias

terapêuticas voltadas para o tratamento de distúrbios alimentares que envolvam o consumo compulsivo de alimentos palatáveis.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o beta-cariofileno inibe as propriedades reforçadoras e motivacionais induzidas por alimento palatável em camundongos fêmeas em jejum. O composto estudado não apresenta propriedades reforçadoras/aversivas *per se*, mas suprime a PCL induzida por alimento palatável em camundongos. Ambos os agonistas seletivos dos receptores CB2, JW133 e beta-cariofileno, inibiram a saliência motivacional (“querer”) induzida por alimento palatável, e os efeitos do beta-cariofileno foram abolidos pelo pré-tratamento com o antagonista dos receptores CB2 AM630. Isso indica que os efeitos do beta-cariofileno sobre o incentivo à saliência motivacional induzido pela recompensa na tarefa do *runway* foram mediados pela ativação dos receptores CB2.

REFERÊNCIAS

- ABERMAN, J. E.; WARD, S. J.; SALAMONE, J. D. Effects of dopamine antagonists and accumbens dopamine depletions on time-constrained progressive-ratio performance. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 61, n. 4, p. 341-348, 1998.
- ABIZAID, Alfonso *et al.* Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 12, p. 3229-3239, 2006.
- ADAM, Tanja C.; EPEL, Elissa S. Stress, eating and the reward system. **Physiology & behavior**, v. 91, n. 4, p. 449-458, 2007.
- ADAMANTIDIS, Antoine R. *et al.* Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 30, p. 10829-10835, 2011.
- AHMED, S. H. The science of making drug-addicted animals. **Neuroscience**, v. 211, p. 107-125, 2012.
- AKBAS, F. *et al.* A critical review of the cannabinoid receptor as a drug target for obesity management. **Obesity reviews**, v. 10, n. 1, p. 58-67, 2009.
- AKHIARY, Mona *et al.* Methamphetamine self-administration in a runway model of drug-seeking behavior in male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 175, p. 27-32, 2018.
- AL MANSOURI, Shamma *et al.* The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 260-268, 2014.
- ALVHEIM, Anita R. *et al.* Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. **Obesity**, v. 20, n. 10, p. 1984-1994, 2012.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION *et al.* DSM-5: **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Artmed Editora, 2014.
- AN, Dongchen *et al.* Targeting cannabinoid receptors: Current status and prospects of natural products. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 14, p. 5064, 2020.
- ANDRADE-SILVA, Magaiver *et al.* The cannabinoid 2 receptor agonist β -caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by *Mycobacterium bovis* BCG by inhibiting neutrophil migration. **Inflammation Research**, v. 65, n. 11, p. 869-879, 2016.

ANOOSHE, Mahsa *et al.* Cannabidiol efficiently suppressed the acquisition and expression of methamphetamine-induced conditioned place preference in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 404, p. 113158, 2021.

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

ARONNE, L. J. *et al.* A clinical trial assessing the safety and efficacy of taranabant, a CB1R inverse agonist, in obese and overweight patients: a high-dose study. **International journal of obesity**, v. 34, n. 5, p. 919-935, 2010.

BABBS, R. K.; WOJNICKI, F. H. E.; CORWIN, R. L. W. Effect of 2-hydroxyestradiol on binge intake in rats. **Physiology & behavior**, v. 103, n. 5, p. 508-512, 2011.

BADO, Patrícia *et al.* Association between uncontrolled eating and caudate responses to reward cues. **bioRxiv**, p. 1-8, 2019.

BAHI, Amine *et al.* β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & behavior**, v. 135, p. 119-124, 2014.

BAIK, Ja-Hyun. Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. **BMB reports**, v. 46, n. 11, p. 519, 2013.

BATISTA, Luara A. *et al.* Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs. **Behavioural pharmacology**, v. 25, n. 5 and 6, p. 425-433, 2014.

BERKE, Joshua D.; HYMAN, Steven E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. **Neuron**, v. 25, n. 3, p. 515-532, 2000.

BERRIDGE, Kent C. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. **Physiology & behavior**, v. 97, n. 5, p. 537-550, 2009.

BERRIDGE, Kent C.; KRINGELBACH, Morten L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 457-480, 2008.

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

BERRIDGE, Kent C.; ROBINSON, Terry E.; ALDRIDGE, J. Wayne. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 65-73, 2009.

BERTHOUD, Hans-Rudolf. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 478-487, 2012.

BERTHOUD, Hans-Rudolf; MÜNZBERG, Heike; MORRISON, Christopher D. Blaming the brain for obesity: integration of hedonic and homeostatic mechanisms. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1728-1738, 2017.

BLUM, Ian D. *et al.* Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 351-359, 2009.

BLUME, Marie; SCHMIDT, Ricarda; HILBERT, Anja. Executive functioning in obesity, food addiction, and binge-eating disorder. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 54, 2019.

BRASIL, Casa Civil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Seção**, v. 1, p. 1-2, 2008.

BUDAVARI, S. *et al.* The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co. **Inc**, v. 450, p. 1674, 1996.

BURNETT, C. Joseph *et al.* Hunger-driven motivational state competition. **Neuron**, v. 92, n. 1, p. 187-201, 2016.

CADONI, Cristina *et al.* Selective psychostimulant sensitization by food restriction: differential changes in accumbens shell and core dopamine. **European journal of neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 2326-2334, 2003.

CAHILL, Kate; USSHER, Michael H. Cannabinoid type 1 receptor antagonists (rimonabant) for smoking cessation. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 3, 2007.

CALLEJA, Miguel Angel *et al.* The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British journal of nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394-401, 2013.

CANSECO-ALBA, Ana *et al.* Behavioral effects of psychostimulants in mutant mice with cell-type specific deletion of CB2 cannabinoid receptors in dopamine neurons. **Behavioural brain research**, v. 360, p. 286-297, 2019.

CARR, Kenneth D. Chronic food restriction: enhancing effects on drug reward and striatal cell signaling. **Physiology & behavior**, v. 91, n. 5, p. 459-472, 2007.

CASTRO, Priscila da Silva; BRANDÃO, Elaine Reis. Desafios da atenção à anorexia nervosa na adolescência: etnografia em serviço público de saúde no Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 2917-2926, 2018.

CECCARELLI, Ilaria *et al.* The CB2 agonist β -caryophyllene in male and female rats exposed to a model of persistent inflammatory pain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, 2020.

CHEN, De-Jie *et al.* Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 312-316, 2017.

CHENG, Yujie; DONG, Zhi; LIU, Sha. β -Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway. **Pharmacology**, v. 94, n. 1-2, p. 1-12, 2014.

CHOI, In-Young *et al.* Activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 3, p. 928-939, 2013.

COCCURELLO, Roberto. Anhedonia in depression symptomatology: Appetite dysregulation and defective brain reward processing. **Behavioural brain research**, v. 372, p. 1-14, 2019.

COCCURELLO, Roberto; MACCARRONE, Mauro. Hedonic eating and the “delicious circle”: from lipid-derived mediators to brain dopamine and back. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 271, 2018.

COHEN, Jeremiah Y. *et al.* Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. **nature**, v. 482, n. 7383, p. 85-88, 2012.

COLOMBO, Giancarlo *et al.* Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. **Life sciences**, v. 63, n. 8, p. PL113-PL117, 1998.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA**. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2013. 50 p. Disponível em: <https://pages.cnpem.br/ceua/wp-content/uploads/sites/56/2015/06/DBCA.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2021.

COOPER, Sarah; ROBISON, A. J.; MAZEI-ROBISON, Michelle S. Reward circuitry in addiction. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 3, p. 687-697, 2017.

COTA, Daniela *et al.* The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 3, p. 423-431, 2003.

COUSINS, Michael S.; SOKOLOWSKI, Jonathan D.; SALAMONE, John D. Different effects of nucleus accumbens and ventrolateral striatal dopamine depletions on instrumental response selection in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 46, n. 4, p. 943-951, 1993.

CRISTINO, Luigia; BISOGNO, Tiziana; DI MARZO, Vincenzo. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 9-29, 2020.

DAVIS, Jon. Hunger, ghrelin and the gut. **Brain research**, v. 1693, p. 154-158, 2018.

DE ALMEIDA BORGES, Vinícius Raphael *et al.* Development of a high performance liquid chromatography method for quantification of isomers β -caryophyllene and α -humulene in

copaiba oleoresin using the Box-Behnken design. **Journal of Chromatography B**, v. 940, p. 35-41, 2013.

DE CARVALHO, Cristiane Ribeiro *et al.* Endocannabinoids underlie reconsolidation of hedonic memories in Wistar rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 7, p. 1417-1425, 2014.

DE OLIVEIRA, Danillo R. *et al.* Monoamine involvement in the antidepressant-like effect of β -caryophyllene. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 17, n. 4, p. 309-320, 2018.

DELAMATER, Andrew R.; SCLAFANI, Anthony; BODNAR, Richard J. Pharmacology of sucrose-reinforced place-preference conditioning: effects of naltrexone. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 4, p. 697-704, 2000.

DELIS, Foteini *et al.* Attenuation of cocaine-induced conditioned place preference and motor activity via cannabinoid CB2 receptor agonism and CB1 receptor antagonism in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 269-278, 2017.

DI MARZO, Vincenzo *et al.* Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. **Nature**, v. 410, n. 6830, p. 822-825, 2001.

DI MARZO, Vincenzo. Endocannabinoids: an appetite for fat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 31, p. 12567-12568, 2011.

DI MARZO, Vincenzo. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 2, p. 77-84, 2009.

DI SOTTO, Antonella *et al.* Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, n. 1-2, p. 23-28, 2010.

DIAS, Daiane de O. *et al.* Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica chimica acta**, v. 721, p. 79-84, 2012.

DOYON, Christian *et al.* Effects of rimonabant (SR141716) on fasting-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activation in lean and obese Zucker rats. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3403-3410, 2006.

DUHAMEL, Nina *et al.* Convenient synthesis of deuterium labelled sesquiterpenes. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 40, p. 4496-4499, 2016.

DUNKIĆ, Valerija; BEZIĆ, Nada; VUKO, Elma. Antiphytoviral activity of essential oil from endemic species *Teucrium arduini*. **Natural product communications**, v. 6, n. 9, p. 1934578X1100600940, 2011.

ECK, Samantha R.; BANGASSER, Debra A. The effects of early life stress on motivated behaviors: a role for gonadal hormones. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2020.

EGECIOGLU, Emil *et al.* PRECLINICAL STUDY: FULL ARTICLE: Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. **Addiction biology**, v. 15, n. 3, p. 304-311, 2010.

ENGELI, Stefan. Central and peripheral cannabinoid receptors as therapeutic targets in the control of food intake and body weight. **Appetite Control**, p. 357-381, 2012.

EPSTEIN, Leonard H. *et al.* Habituation as a determinant of human food intake. **Psychological review**, v. 116, n. 2, p. 384, 2009.

ESPEL-HUYNH, Hallie M.; MURATORE, Alexandra F.; LOWE, M. R. A narrative review of the construct of hedonic hunger and its measurement by the Power of Food Scale. **Obesity science & practice**, v. 4, n. 3, p. 238-249, 2018.

FANSELOW, Michael S.; WASSUM, Kate M. The origins and organization of vertebrate Pavlovian conditioning. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 1, p. a021717, 2016.

FIDYT, Klaudyna *et al.* β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

FIELDS, Howard L. *et al.* Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 30, p. 289-316, 2007.

FIGLEWICZ, D. P. *et al.* Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. **Brain research**, v. 964, n. 1, p. 107-115, 2003.

FIGLEWICZ, Dianne P. *et al.* Intraventricular insulin and leptin decrease sucrose self-administration in rats. **Physiology & behavior**, v. 89, n. 4, p. 611-616, 2006.

FITZGERALD, Megan L.; SHOBIN, Eli; PICKEL, Virginia M. Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: implications for limbic and striatal output. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 21-29, 2012.

FULTON, Stephanie *et al.* Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. **Neuron**, v. 51, n. 6, p. 811-822, 2006.

GALAJ, Ewa *et al.* Beta-caryophyllene inhibits cocaine addiction-related behavior by activation of PPAR α and PPAR γ : repurposing a FDA-approved food additive for cocaine use disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 46, n. 4, p. 860-870, 2021.

GAONI, Yechiel; MECHOULAM, Raphael. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American chemical society**, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, María S. *et al.* Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABAA receptors. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 951-964, 2012.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, María S. *et al.* Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1773-1784, 2010.

GELIEBTER, Allan *et al.* Greater anterior cingulate activation and connectivity in response to visual and auditory high-calorie food cues in binge eating: preliminary findings. **Appetite**, v. 96, p. 195-202, 2016.

GERTSCH, Jürg *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GHELARDINI, C. *et al.* Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 387-389, 2001.

GHELARDINI, Carla *et al.* Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta medica**, v. 65, n. 08, p. 700-703, 1999.

GOBIRA, Pedro H. *et al.* Opposing roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the stimulant and rewarding effects of cocaine. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1541-1551, 2019.

GODOY-MATOS, Amélio F. de *et al.* O sistema endocanabinoide: novo paradigma no tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 390-399, 2006.

GÓMEZ-MARTÍNEZ, Diana G. *et al.* A bioinspired model of short-term satiety of hunger influenced by food properties in virtual creatures. **Cognitive Systems Research**, v. 66, p. 46-66, 2021.

GONÇALVES, Elaine CD *et al.* Terpenoids, cannabimimetic ligands, beyond the cannabis plant. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1567, 2020.

GONON, François. Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 15, p. 5972-5978, 1997.

GUAN, Xiao-Ming *et al.* Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. **Molecular brain research**, v. 48, n. 1, p. 23-29, 1997.

GUO, Kexin *et al.* Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia. **Journal of molecular neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 41-48, 2014.

HE, Yi *et al.* β -Caryophyllene, a dietary terpenoid, inhibits nicotine taking and nicotine seeking in rodents. **British journal of pharmacology**, v. 177, n. 9, p. 2058-2072, 2020.

HENDRIKS, Henk *et al.* Mono-terpene and sesqui-terpene hydrocarbons of essential oil of Cannabis-sativa. **Phytochemistry**, v. 14, n. 3, p. 814-815, 1975.

HO, C. L. *et al.* Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of Neolitsea parvigemma from Taiwan. *Natural Product Communications*, v. 6, n. 9, p. 1357-1360, 2011.

HOMMEL, Jonathan D. *et al.* Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. **neuron**, v. 51, n. 6, p. 801-810, 2006.

HORN, Henrike *et al.* Endocannabinoids in body weight control. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 2, p. 55, 2018.

HORVATH, Tamas L.; DIANO, Sabrina; TSCHOP, M. Ghrelin in hypothalamic regulation of energy balance. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 3, n. 8, p. 921-927, 2003.

HOWLETT, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 2, p. 161-202, 2002.

HUME, Catherine; JACHS, Barbara; MENZIES, John. Homeostatic responses to palatable food consumption in satiated rats. **Obesity**, v. 24, n. 10, p. 2126-2132, 2016.

JAMSHIDI, Nazila; TAYLOR, David A. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 6, p. 1151-1154, 2001.

JENNINGS, Joshua H. *et al.* Interacting neural ensembles in orbitofrontal cortex for social and feeding behaviour. **Nature**, v. 565, n. 7741, p. 645-649, 2019.

JERLHAG, Elisabet *et al.* Preclinical study: ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. **Addiction biology**, v. 12, n. 1, p. 6-16, 2007.

JORDAN, Chloe J.; XI, Zheng-Xiong. Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: From genes to behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 98, p. 208-220, 2019.

KANO, Masanobu *et al.* Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiological reviews**, 2009.

KEENE, Alex C. *et al.* Clock and cycle limit starvation-induced sleep loss in Drosophila. **Current biology**, v. 20, n. 13, p. 1209-1215, 2010.

KELLEY, Ann E.; BERRIDGE, Kent C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. **Journal of neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 3306-3311, 2002.

KHAN, Yasmin; PANDY, Vijayapandi. Morinda citrifolia Linn.(Noni) fruit extract attenuates ethanol seeking behavior in mouse runway paradigm. **Journal of research in pharmacy (online)**, v. 24, n. 5, p. 632-639, 2020.

KING, Connie M.; HENTGES, Shane T. Relative number and distribution of murine hypothalamic proopiomelanocortin neurons innervating distinct target sites. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25864, 2011.

KING, S. J. *et al.* Motivation to obtain preferred foods is enhanced by ghrelin in the ventral tegmental area. **Hormones and behavior**, v. 60, n. 5, p. 572-580, 2011.

KIM, Jimok; LI, Yong. Chronic activation of CB2 cannabinoid receptors in the hippocampus increases excitatory synaptic transmission. **The Journal of physiology**, v. 593, n. 4, p. 871-886, 2015.

KOBAYASHI, Cristine *et al.* Pharmacological evaluation of Copaifera multijuga oil in rats. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.

KOCH, Marco. Cannabinoid receptor signaling in central regulation of feeding behavior: a mini-review. **Frontiers in neuroscience**, v. 11, p. 293, 2017.

KOLA, Blerina *et al.* The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. **PloS one**, v. 3, n. 3, p. e1797, 2008.

KONSTANTAKOPOULOS, George. Psychobiology of feeding behaviour. **Dialogues In Clinical Neuroscience & Mental Health**, v. 1, n. 2, p.9-15, 2018.

KRÜGEL, Ute *et al.* Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. **European journal of pharmacology**, v. 482, n. 1-3, p. 185-187, 2003.

LAMELA, Immacolata *et al.* Olfactory priming reinstates extinguished chocolate-induced conditioned place preference. **Appetite**, v. 54, n. 1, p.237-240, 2010.

LAU, Benjamin K. *et al.* Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 38-51, 2017.

LENOIR, Magalie *et al.* Intense sweetness surpasses cocaine reward. **PLoS ONE**, v. 2, n. 8, 2007.

LIU, Clarissa M.; KANOSKI, Scott E. Homeostatic and non-homeostatic controls of feeding behavior: Distinct vs. common neural systems. **Physiology & behavior**, v. 193, p. 223-231, 2018.

LIU, Hao *et al.* Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochemical research**, v. 40, n. 1, p. 118-123, 2015.

LIU, Qing-Rong *et al.* Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2017.

LOIZZO, M. R. *et al.* Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 6, p. 1002-1012, 2008.

LUCCA, Leticia G. *et al.* Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 104, p. 144-148, 2015.

LUPICA, Carl R.; RIEGEL, Arthur C.; HOFFMAN, Alexander F. Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. **British journal of pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 227-234, 2004.

MA, Zegang *et al.* Mechanisms of cannabinoid CB2 receptor-mediated reduction of dopamine neuronal excitability in mouse ventral tegmental area. **EBioMedicine**, v. 42, p. 225-237, 2019.

MACKIE, Ken. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, p. 10-14, 2008.

MADSEN, Heather B.; AHMED, Serge H. Drug versus sweet reward: Greater attraction to and preference for sweet versus drug cues. **Addiction Biology**, v. 20, n. 3, p. 433-444, 2015.

MAJCHER-MAŚLANKA, Iwona *et al.* The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 57, p. 24-33, 2017.

MALDONADO, Rafael; VALVERDE, Olga; BERRENDERO, Fernando. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 4, p. 225-232, 2006.

MALLAT, A.; LOTERSZTAJN, S. Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases. **Journal of endocrinological investigation**, v. 29, n. 3, p. 58, 2006.

MARGOLIS, Elyssa B. *et al.* The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons?. **The Journal of physiology**, v. 577, n. 3, p. 907-924, 2006.

MARTÍN-GARCÍA, Elena *et al.* Differential control of cocaine self-administration by GABAergic and glutamatergic CB1 cannabinoid receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 9, p. 2192-2205, 2016.

MARTÍN-SÁNCHEZ, Ana *et al.* Alcohol-induced conditioned place preference is modulated by CB2 cannabinoid receptors and modifies levels of endocannabinoids in the mesocorticolimbic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 183, p. 22-31, 2019.

MATIAS, I.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. **International journal of obesity**, v. 30, n. 1, p. S7-S12, 2006.

MATHEW, Bijo *et al.* An Agathokakological Tale of Δ 9-THC: Exploration of Possible Biological Targets. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 7, p. 823-834, 2021.

MECHOULAM, Raphael; PARKER, Linda A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual review of psychology**, v. 64, p. 21-47, 2013.

MICALI, Nadia *et al.* Adolescent eating disorders predict psychiatric, high-risk behaviors and weight outcomes in young adulthood. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 54, n. 8, p. 652-659. e1, 2015.

MILJIC, D. *et al.* Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 4, p. 1491-1495, 2006.

MISHRA, Akanksha; SINGH, Sonu; SHUKLA, Shubha. Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: possible implication for Parkinson's disease. **Journal of experimental neuroscience**, v. 12, p. 1-8, 2018.

MISHRA, Akanksha; SINGH, Sonu; SHUKLA, Shubha. Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: possible implication for Parkinson's disease. **Journal of experimental neuroscience**, v. 12, p. 1179069518779829, 2018.

MONDAL, Muhtashan S. *et al.* Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. **Regulatory peptides**, v. 126, n. 1-2, p. 55-59, 2005.

MORALES, Ileana; BERRIDGE, Kent C. 'Liking' and 'wanting' in eating and food reward: Brain mechanisms and clinical implications. **Physiology & behavior**, p. 113152, 2020.

MOREIRA, Fabrício A.; CRIPPA, José Alexandre S. The psychiatric side-effects of rimonabant. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 31, p. 145-153, 2009.

MOUSAVI, Ali; ASKARI, Nayere; VAEZ-MAHDAVI, Mohammad Reza. Augmentation of morphine-conditioned place preference by food restriction is associated with alterations in the oxytocin/oxytocin receptor in rat models. **The American journal of drug and alcohol abuse**, v. 46, n. 3, p. 304-315, 2020.

MURPHY, Kevin G.; BLOOM, Stephen R. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 854-859, 2006.

NAIR-ROBERTS, Radha Goh *et al.* Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 1024-1031, 2008.

NAPOLITANO, Francesco *et al.* Assessment of knowledge, attitudes, and behaviors toward eating disorders among adolescents in Italy. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 8, p. 1448, 2019.

NICOLA, S. M. *et al.* Nucleus accumbens dopamine release is necessary and sufficient to promote the behavioral response to reward-predictive cues. **Neuroscience**, v. 135, n. 4, p. 1025-1033, 2005.

NOWEND, K. L. *et al.* D1 or D2 antagonism in nucleus accumbens core or dorsomedial shell suppresses lever pressing for food but leads to compensatory increases in chow consumption. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 69, n. 3-4, p. 373-382, 2001.

ONAIVI, Emmanuel S. *et al.* CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. **Journal of psychopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 92-103, 2012.

ONAIVI, Emmanuel S. *et al.* Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression. **Annals of the new York Academy of Sciences**, v. 1139, p. 434, 2008.

ONAOLAPO, A. Y.; ONAOLAPO, O. J. Food additives, food and the concept of 'food addiction': is stimulation of the brain reward circuit by food sufficient to trigger addiction?. **Pathophysiology**, v. 25, n. 4, p. 263-276, 2018.

OPPONG-DAMOAH, Aboagyewaah *et al.* The sesquiterpene beta-caryophyllene oxide attenuates ethanol drinking and place conditioning in mice. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01915, 2019.

PANAGIS, George; MACKEY, Brian; VLACHOU, Styliani. Cannabinoid regulation of brain reward processing with an emphasis on the role of CB1 receptors: a step back into the future. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 92, 2014.

PANAGIS, George; MACKEY, Brian; VLACHOU, Styliani. Cannabinoid regulation of brain reward processing with an emphasis on the role of CB1 receptors: a step back into the future. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 92, 2014.

PAOLO, S. D. Dopamine on D2-like receptors "reboosts" dopamine D1-like receptor-mediated behavioural activation in rats licking for sucrose. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 7, p. 1085-1096, 2010.

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

PATEL, Sachin; RADEMACHER, David J.; HILLARD, Cecilia J. Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 880-888, 2003.

PECINA, Susana *et al.* Hyperdopaminergic mutant mice have higher “wanting” but not “liking” for sweet rewards. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 28, p. 9395-9402, 2003.

PFAFFLY, Jennifer *et al.* Leptin increases striatal dopamine D2 receptor binding in leptin-deficient obese (*ob/ob*) mice. **Synapse**, v. 64, n. 7, p. 503-510, 2010.

PIOMELLI, Daniele. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873-884, 2003.

POTHOS, Emmanuel N.; CREESE, Ian; HOEBEL, Bartley G. Restricted eating with weight loss selectively decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and alters dopamine response to amphetamine, morphine, and food intake. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 6640-6650, 1995.

PROIETTO, Joseph *et al.* A clinical trial assessing the safety and efficacy of the CB1R inverse agonist taranabant in obese and overweight patients: low-dose study. **International journal of obesity**, v. 34, n. 8, p. 1243-1254, 2010.

QUARTA, Davide *et al.* Systemic administration of ghrelin increases extracellular dopamine in the shell but not the core subdivision of the nucleus accumbens. **Neurochemistry international**, v. 54, n. 2, p. 89-94, 2009.

QUIGLEY, Jacqueline A. *et al.* Sex differences in vulnerability to addiction. **Neuropharmacology**, p. 108491, 2021.

RAVINET TRILLOU, Christine *et al.* Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 2, p. R345-R353, 2003.

REICHELT, A. C.; WESTBROOK, R. F.; MORRIS, M. J. Integration of reward signalling and appetite regulating peptide systems in the control of food-cue responses. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 22, p. 5225-5238, 2015.

REYNAERT, Marie-Line *et al.* Hedonic sensitivity to natural rewards is affected by prenatal stress in a sex-dependent manner. **Addiction Biology**, v. 21, n. 6, p. 1072-1085, 2016.

RIBEIRO, Gabriela *et al.* Association between hedonic hunger and body-mass index versus obesity status. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

ROCHE, Régis *et al.* Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. **Histochemistry and cell biology**, v. 126, n. 2, p. 177-187, 2006.

ROESCH, Matthew R.; CALU, Donna J.; SCHOENBAUM, Geoffrey. Dopamine neurons encode the better option in rats deciding between differently delayed or sized rewards. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 1615-1624, 2007.

ROLLS, Edmund T. Brain mechanisms underlying flavour and appetite. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1123-1136, 2006.

ROSEBERRY, Aaron G. *et al.* Decreased vesicular somatodendritic dopamine stores in leptin-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 7021-7027, 2007.

ROSS, Ruth A. Allosterism and cannabinoid CB1 receptors: the shape of things to come. **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 11, p. 567-572, 2007.

ROSSI, Francesca *et al.* Role of cannabinoids in obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2690, 2018.

SALAMONE, J. D. *et al.* Nucleus accumbens dopamine depletions make animals highly sensitive to high fixed ratio requirements but do not impair primary food reinforcement. **Neuroscience**, v. 105, n. 4, p. 863-870, 2001.

SALAMONE, John D.; CORREA, Mercè. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. **Neuron**, v. 76, n. 3, p. 470-485, 2012.

SALVIATO, Beatriz Zanutto *et al.* Female but not male rats show biphasic effects of low doses of Δ 9-tetrahydrocannabinol on anxiety: can cannabidiol interfere with these effects?. **Neuropharmacology**, v. 196, p. 108684, 2021.

SCHIENLE, Anne *et al.* Binge-eating disorder: reward sensitivity and brain activation to images of food. **Biological psychiatry**, v. 65, n. 8, p. 654-661, 2009.

SCHMITT, D.; LEVY, R.; CARROLL, B. Toxicological evaluation of β -caryophyllene oil: subchronic toxicity in rats. **International journal of toxicology**, v. 35, n. 5, p. 558-567, 2016.

SCHULTZ, Wolfram. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. **Behavioral and brain functions**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2010.

SCHWARTZ, Gary J.; ZELTSER, Lori M. Functional organization of neuronal and humoral signals regulating feeding behavior. **Annual review of nutrition**, v. 33, p. 1-21, 2013.

SCHWARTZ, Michael W. *et al.* Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.

SEGURA-SERRALTA, Mara *et al.* Executive functions and emotion regulation in obesity and eating disorders. **Nutrición Hospitalaria**. V. 36, n. 1, p. 167-172, 2019.

SHAFAGHAT, Ali. Antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oils from flower, leaf and stem of *Origanum vulgare* ssp. *viride* growing wild in northwest Iran. **Natural product communications**, v. 6, n. 9, p. 1934578X1100600933, 2011.

SHAHBAZI, Fred *et al.* Cannabinoids and cannabinoid receptors: the story so far. **Iscience**, v. 23, n. 7, p. 101301, 2020.

SHIYA, Tomomi *et al.* Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 1, p. 240-244, 2002.

SIHAG, J.; JONES, P. J. H. Oleoylethanolamide: The role of a bioactive lipid amide in modulating eating behaviour. **Obesity Reviews**, v. 19, n. 2, p. 178-197, 2018.

SIMON, Joe J. *et al.* Integration of homeostatic signaling and food reward processing in the human brain. **JCI insight**, v. 2, n. 15, 2017.

SIMON, Joe J. *et al.* Neural signature of food reward processing in bulimic-type eating disorders. **Social cognitive and affective neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 1393-1401, 2016.

SINCLAIR, Elaine B. *et al.* Preliminary evidence of sex differences in behavioral and neural responses to palatable food reward in rats. **Physiology & behavior**, v. 176, p. 165-173, 2017.

SKIBICKA, Karolina P. *et al.* Ghrelin directly targets the ventral tegmental area to increase food motivation. **Neuroscience**, v. 180, p. 129-137, 2011.

SLOAN, Matthew E. *et al.* The endocannabinoid system as a target for addiction treatment: Trials and tribulations. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 73-83, 2017.

SMALL, Dana M.; JONES-GOTMAN, Marilyn; DAGHERA, Alain. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. **NeuroImage**, v. 19, p. 1709-1715, 2003.

SOLINAS, Marcello; YASAR, Sevil; GOLDBERG, Steven R. Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse. **Pharmacological research**, v. 56, n. 5, p. 393-405, 2007.

SONG, Zhimin; KALYANI, Manu; BECKER, Jill B. Sex differences in motivated behaviors in animal models. **Current opinion in behavioral sciences**, v. 23, p. 98-102, 2018.

SOTAK, Bethany N. *et al.* Dysregulation of dopamine signaling in the dorsal striatum inhibits feeding. **Brain research**, v. 1061, n. 2, p. 88-96, 2005.

SPANGENBERG, Elin MF; WICHMAN, Anette. Methods for investigating the motivation of mice to explore and access food rewards. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 57, n. 3, p. 244-252, 2018.

SPILLER, Krista J. *et al.* Cannabinoid CB1 and CB2 receptor mechanisms underlie cannabis reward and aversion in rats. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 9, p. 1268-1281, 2019.

SPOTO, B. *et al.* Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. **Biochimie**, v. 88, n. 12, p. 1889-1897, 2006.

STAROWICZ, Katarzyna M. *et al.* Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. **Obesity**, v. 16, n. 3, p. 553-565, 2008.

STEMPEL, A. Vanessa *et al.* Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific plasticity in the hippocampus. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 795-809, 2016.

STERN, Cristina AJ *et al.* Effects of cannabinoid drugs on aversive or rewarding drug-associated memory extinction and reconsolidation. **Neuroscience**, v. 370, p. 62-80, 2018.

STICE, Eric; JOHNSON, Sarah; TURGON, Roxane. Eating disorder prevention. **Psychiatric Clinics**, v. 42, n. 2, p. 309-318, 2019.

STOJAKOVIC, Andrea *et al.* Effects of nicotine on homeostatic and hedonic components of food intake. **Journal of Endocrinology**, v. 235, n. 1, p. R13-R31, 2017.

STOPYRA, Marion A. *et al.* The influence of homeostatic mechanisms on neural regulation of food craving in anorexia nervosa. **Psychological medicine**, v. 51, n. 6, p. 1011-1019, 2021.

STUBER, Garret D. *et al.* Food restriction modulates amphetamine-conditioned place preference and nucleus accumbens dopamine release in the rat. **Synapse**, v. 46, n. 2, p. 83-90, 2002.

SVÍŽENSKÁ, Ivana; DUBOVÝ, Petr; ŠULCOVÁ, Alexandra. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures—a short review. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 501-511, 2008.

SUN, Yongmei *et al.* A conditioned place preference protocol for measuring incubation of craving in rats. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 141, p. e58384, 2018.

TANAKA, Muneki *et al.* Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, n. 7, p. 829-835, 2003.

TING, Ching-Heng *et al.* Differential modulation of endogenous cannabinoid CB1 and CB2 receptors in spontaneous and splice variants of ghrelin-induced food intake in conscious rats. **Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 230-235, 2015.

TOBLER, Philippe N.; FIORILLO, Christopher D.; SCHULTZ, Wolfram. Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1642-1645, 2005.

TOBLER, Philippe N.; FIORILLO, Christopher D.; SCHULTZ, Wolfram. Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1642-1645, 2005.

TOMAZI, Lediane *et al.* A nonrewarding NMDA receptor antagonist impairs the acquisition, consolidation, and expression of morphine conditioned place preference in mice. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 710-721, 2017.

TÓTH, Attila; BLUMBERG, Peter M.; BOCZÁN, Judit. Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). **Vitamins & Hormones**, v. 81, p. 389-419, 2009.

TRIGO, Jose M. *et al.* Effects of fixed or self-titrated dosages of Sativex on cannabis withdrawal and cravings. **Drug and alcohol dependence**, v. 161, p. 298-306, 2016.

TSCHÖP, Matthias; SMILEY, David L.; HEIMAN, Mark L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 908-913, 2000.

TUPLIN, Erin W. Noye; HOLAHAN, Matthew R. Exploring time-dependent changes in conditioned place preference for food reward and associated changes in the nucleus *accumbens*. **Behavioural brain research**, v. 361, p. 14-25, 2019.

VAN DEN TOP, Marco *et al.* Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 493-494, 2004.

VAN SICKLE, Marja D. *et al.* Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **Science**, v. 310, n. 5746, p. 329-332, 2005.

VANDREY, Ryan *et al.* The dose effects of short-term dronabinol (oral THC) maintenance in daily cannabis users. **Drug and alcohol dependence**, v. 128, n. 1-2, p. 64-70, 2013.

VARGA, Zoltan V. *et al.* β -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 320-334, 2018.

VAZ, Diana Souza Santos; BENNEMANN, Rose Mari. Comportamento alimentar e hábito alimentar: uma revisão. **Revista uningá review**, v. 20, n. 1, 2014.

VERHAGEN, Linda AW *et al.* Acute and chronic suppression of the central ghrelin signaling system reveals a role in food anticipatory activity. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 5, p. 384-392, 2011.

VERHAGEN, Linda AW *et al.* Dopamine and serotonin release in the nucleus accumbens during starvation-induced hyperactivity. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 309-316, 2009.

VERTY, Aaron NA; ALLEN, Andrew M.; OLDFIELD, Brian J. The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. **Obesity**, v. 17, n. 2, p. 254-261, 2009.

VIJAYALAXMI, A. *et al.* Anti-arthritic and anti inflammatory activity of beta caryophyllene against freund's complete adjuvant induced arthritis in wistar rats. **Journal of Bone Reports & Recommendations**, v. 1, n. 29, p. 1-10, 2015.

VOLKOW, Nora D. *et al.* Brain dopamine is associated with eating behaviors in humans. **International Journal of Eating Disorders**, v. 33, n. 2, p. 136-142, 2003.

VOLKOW, Nora D. *et al.* Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1507, p. 3191-3200, 2008.

VOLKOW, Nora D.; WISE, Roy A.; BALER, Ruben. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 12, p. 741-752, 2017.

WAEELTI, Pascale; DICKINSON, Anthony; SCHULTZ, Wolfram. Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 43-48, 2001.

WALKER, Deena M. *et al.* Adolescence and reward: making sense of neural and behavioral changes amid the chaos. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 45, p. 10855-10866, 2017.

WANG, Gene-Jack *et al.* Brain dopamine and obesity. **The Lancet**, v. 357, n. 9253, p. 354-357, 2001.

WIGHTMAN, R. Mark; ROBINSON, Donita L. Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward'. **Journal of neurochemistry**, v. 82, n. 4, p. 721-735, 2002.

WILLIAMS, Claire M.; KIRKHAM, Tim C. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. **Psychopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 315-317, 1999.

WISE, Roy A. Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1149-1158, 2006.

WITTEN, Ilana B. *et al.* Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. **Neuron**, v. 72, n. 5, p. 721-733, 2011.

XI, Zheng-Xiong *et al.* Brain cannabinoid CB 2 receptors modulate cocaine's actions in mice. **Nature neuroscience**, v. 14, n. 9, p. 1160-1166, 2011.

XIMENES, Rosana; COUTO, Geraldo; SOUGEY, Everton. Eating disorders in adolescents and their repercussions in oral health. **International Journal of Eating Disorders**, v. 43, n. 1, p. 59-64, 2010.

YAMAGUCHI, Tsuyoshi *et al.* Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 23, p. 8476-8490, 2011.

YANG, Jianming; NIE, Qingjuan. Engineering Escherichia coli to convert acetic acid to β -caryophyllene. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2016.

YANG, Peng; WANG, Lirong; XIE, Xiang-Qun. Latest advances in novel cannabinoid CB2 ligands for drug abuse and their therapeutic potential. **Future medicinal chemistry**, v. 4, n. 2, p. 187-204, 2012.

YU, Yi-Hao. Making sense of metabolic obesity and hedonic obesity. **Journal of Diabetes**, v. 9, n. 7, p. 656-666, 2017.

YUN, Irene A. *et al.* The ventral tegmental area is required for the behavioral and nucleus accumbens neuronal firing responses to incentive cues. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 12, p. 2923-2933, 2004.

ZHANG, Hai-Ying *et al.* Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 46, p. E5007-E5015, 2014.

ZHANG, Hai-Ying *et al.* Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. **Addiction biology**, v. 22, n. 3, p. 752-765, 2017.

ZHANG, Hai-Ying *et al.* Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice and rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 4, p. 1037-1051, 2015.

ZHENG, Danielle; DE VACA, Soledad Cabeza; CARR, Kenneth D. Food restriction increases acquisition, persistence and drug prime-induced expression of a cocaine-conditioned place preference in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 3, p. 538-544, 2012.

ZHENG, H *et al.* Appetite control and energy balance regulation in the modern world: reward-driven brain overrides repletion signals. **International Journal Of Obesity**, v. 33, n. 2, p.1-9, 2009.

ZIGMAN, Jeffrey M. *et al.* Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 494, n. 3, p. 528-548, 2006.

ZOU, Shenglong; KUMAR, Ujendra. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 833, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Quadro 2 – O quadro abaixo apresenta a média do tempo gasto com as “distrações” durante os três dias de tratamento farmacológico na tarefa do *runway*.

Grupos de tratamento	Tempo médio gasto com as distrações* durante os treinos nos dias 10-12 da tarefa de <i>runway</i> (s)	Tempo médio gasto em movimentos no sentido direto da recompensa (s)
Veículo	2,0 ± 1,07	7 ± 0,55
Beta-cariofileno (50 mg/kg)	20 ± 4,3 (p < 0,05) #	6 ± 1,86
Veículo	10 ± 1,8	6,2 ± 0,4
Beta-cariofileno (100 mg/kg)	15 ± 2,15 (p < 0,05) #	7 ± 1,22
Veículo	2,5 ± 0,66	5 ± 0,75
JWH-133 (10 mg/kg)	9 ± 3,2 (p < 0,05) #	6 ± 0,9

*As distrações incluem pausas, comportamento de autolimpeza, movimentos de avaliação de risco, levantamentos e reversões na trajetória em direção oposta à recompensa. # indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle no mesmo parâmetro através do teste T.